

République Algérienne Démocratique et Populaire.  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique.  
Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene.  
USTHB – ALGER.

Faculté des Sciences Biologiques.  
FSB

Mémoire présenté en vue de l'obtention du  
Diplôme de Magister  
En : Sciences de la nature  
Spécialité: Biochimie – Immunologie

Par  
Mme Chafai-Larabi Nassima

Sujet:

Rôle d'une Phospholipase myotoxique isolée  
à partir du venin de *Cerastes cerastes* dans les phénomènes  
inflammatoires et myonécrotiques

Soutenu le 18 /07/2007 devant le jury:

-Mr : R. Bakour	Professeur à la FSB	Président
-Mme : C. Touil-Boukoffa	Professeur à la FSB	Examinatrice
-Mme : S. Ouali	Maître de conférence à la FSB	Examinatrice
-Mme : D. Hammoudi-Triki	Maître de conférence à la FSB	Examinatrice
-Mme : F. Laraba-Djebari	Professeur à la FSB	Directrice de thèse

## Sommaire

<b>Introduction</b>	1
<b>Les Serpents</b>	2
I.1. Les Serpents Venimeux	2
I.2. Classification des serpents	2
I.2.1. Les Aglyphes	2
I.2.2. Les Opisthoglyphes	2
I.2.3. Les Protéroglyphes	2
I.2.4. Les soléno-glyphes	2
I.3. Les <i>Viperidae</i>	2
I.4. La Vipère à cornes <i>Cerastes cerastes</i>	4
I.5. Composition des venins de <i>viperidae</i>	4
I.5.1. Les Enzymes	5
I.5.1.1. Les Protéases : E.C.( 3.1.1.4 )	5
I.5.1.1.1. Les Serine –Protéases	5
I.5.1.1.2. Les Métallo protéinases	7
I.5.1.1.2.1. Métallo protéinases de la classe I (P-I)	7
I.5.1.1.2.2. Métalloprotéinases de la classe II (P-II)	7
I.5.1.1.2.3. Métalloprotéinases de la classe III (P-III)	7
I.5.1.1.2.4. Métalloprotéinases de la classe IV (P-IV)	8
I.5.1.1.3. Les Hyaluronidases (E.C.4.2.9.9.1)	12
I.5.1.1.4. Les Acétylcholinestérase ( EC.3.1.1.7)	12
I.5.1.1.5. Les L-Aminoacide oxydases (EC.1.4.3.2)	12
I.5.1.1.6. Les Phospholipases A <sub>2</sub> ( PLA <sub>2</sub> ; EC.3.1.1.4 )	12
I.5.1.1.6.1. Classification des PLA <sub>2</sub>	13
I.5.1.1.6.1.1. Les PLA <sub>2</sub> du groupe I	13
I.5.1.1.6.1.2. Les PLA <sub>2</sub> du groupe II	13
I.5.1.1.6.1.3. Le groupe III des PLA <sub>2</sub>	13
I.5.1.1.6.1.4. Le quatrième groupe IV	13
I.5.1.1.6.2. Effets pharmacologiques des PLA <sub>2</sub>	15
I.5.1.1.6.3. Mécanisme d'action des PLA <sub>2</sub>	17
I.5.1.1.6.4. Les Récepteurs des PLA <sub>2</sub>	19
I.5.1.1.6.5. Les Inhibiteurs des PLA <sub>2</sub> (PLI <sub>s</sub> )	19
I.5.1.1.6.5.1. Inhibiteurs de type $\alpha$	20
I.5.1.1.6.5.2. Inhibiteurs de type $\beta$	20
I.5.1.1.6.5.3. Inhibiteurs de type $\gamma$	20
I.5.2. Les Myotoxines	22
I.5.2.1. Les Peptides Myotoxiques	22
I.5.2.2. Les PLA <sub>2</sub> Myotoxiques	22
1.6. Symptômes d'envenimation vipérine	25
1.7. Physiopathologie des envenimations vipérines	27
I.7.1. L'œdème inflammatoire provoqué par les venins de serpents	27
I.7.1. L'œdème inflammatoire provoqué par les venins de serpents	27
I.7.2. L'hémorragie	27

I.7.3. L'effet myonécrotique	27
I.8. La réponse inflammatoire	29
I.8.1. La Migration leucocytaire	29
I.8.2. La production de Cytokines	29
I.9. Variation du métabolisme enzymatique	32
I.9.1. Les Transaminases	32
I.9.1.1. Transaminase glutamique oxaloacétique (TGO) EC.2.6.1.1.	32
I.9.1.2. Transaminase glutamique pyruvique (TGP) EC.2.6.1.2	32
I.9.1.3. La lactate déshydrogénase (LDH) EC.1.1.1.2.7.	32
I.9.1.4. La Créatine Kinase (CK) EC 2.7.3.2.	32
I.10. Modifications histologiques	33
I.10.1. Le Muscle Squelettique	33
I.10.2. Le Muscle Cardiaque	33
I.11. Traitement des envenimations	34
I.11.1. Immunothérapie	34
I.11.2. Traitement symptomatique	34
I.12. Mécanisme d'action des Anti inflammatoires Stéroïdiens	34
I.12.1. L'Hydrocortisone	34
I.12.2. Mécanisme d'action de l'Hydrocortisone	35
I.12.3. Autres traitements	35
I.13. Cristallisation des PLA <sub>2</sub>	36
<b>II. Matériel et méthodes</b>	37
<b>II.1. Matériel</b>	37
II.1.1. Matériel biologique	37
II.1.1.1. Le venin	37
II.1.1.2. Les souris	37
II.1.1.3. Les rats	37
II.1.1.4. La Lécithine	37
II.1.1.5. Les globules rouges	37
II.1.2. Produits chimiques et réactifs	37
II.2. Méthodes	38
II.2.1. Fractionnement du venin de <i>Cerastes cerastes</i> par chromatographie d'exclusion moléculaire sur Sephadex G-75	38
II.2.2. Mise en évidence de l'activité phospholipasique	38
II.2.3. Détermination de l'activité myotoxique au niveau du venin et des fractions chromatographiques par dosage de la Créatine Kinase dans le sérum et les muscles cardiaque et squelettique	39
II.2.3.1. Dosage de la créatine phosphokinase	39
II.3. Purification	39
II.3.1. Purification de la fraction GF2 issue de la gel filtration par chromatographie échangeuse de cations sur CM-Sephadex C-50	39
II.3.2. Purification de la fraction issue de la CM-Sephadex-C-50 par chromatographie échangeuse d'anions sur DEAE-A-50	40

II.3.3. Etude de l'homogénéité du venin et de ses fractions par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodecyl sulphate de sodium (SDS-PAGE)	40
II.4. Effet du venin de <i>Cerastes cerastes</i> et des fractions C2 et D1 sur les muscles squelettique et cardiaque	41
II.4.1. Effet myonécrotique du venin de <i>Cerastes cerastes</i> sur le muscle et le cœur	41
II.4.2. Effets du venin de <i>Cerastes cerastes</i> sur le muscle et le cœur	41
II.4.3. Effets histopathologiques de la fraction purifiée D1	41
II.4.4. Effet du venin et des fractions C <sub>2</sub> et D <sub>1</sub> sur les activités enzymatiques (CPK ;LDH ;TGO ;TGP)	44
II.4.4.1. Activité de l'Alanine amino-transférase ( ALAT) (E.C. 2.6.1.2)	44
II.4.4.2. Activité de l'Aspartate amino- transférase (ASAT ) (E.C. 2.6.1.1)	44
II.4.4.3. Activité de la Créatine -kinase ( CK ) (E.C. 2.7.3.2 )	45
II.4.4.4. Activité de la Lactate déshydrogénase ( LDH ) ( E. C. 1.1.1.27 )	45
II.4.5. Effet d'un anti-inflammatoire stéroïdien :(hydrocortisone) sur l'activité des	46
II.5. Etude de la réponse inflammatoire	46
II.5.1. Dosage des ctokines IL1- $\alpha$ ;IL1- $\beta$ ; IL-10 ; IL-6 ; IFN- $\gamma$	46
II.5.2. Effet du venin et de ses fractions sur la migration leucocytaire	47
II.6. Etude des effets histopathologiques du venin de <i>Cerastes cerastes</i> et de ses fractions C2 et D1	48
II.7. Cristallisation de la fraction purifié D1	49
<b>III. Résultats et discussions</b>	50
III.1. Purification de la fraction phospholipasique à partir du venin de <i>Cerastes cerastes</i>	50
III.1.1. Fractionnement du venin par chromatographie d'exclusion moléculaire sur Sephadex G-75	50
III.1.2. Purification de la fraction GF2 mytoxique et phospholipasique par chromatographie échangeuse de cations sur CM-Sephadex C-50	52

III.1.3. purification de la fraction C3 issues de la CM-Sephadex C-50 sur DEAE Sephadex-A-50	54
III.1.4. Electrophorèse du venin de <i>Cerastes cerastes</i> et de ses fractions sur SDS PAGE	57
III.1.5. Cristallisation de la fraction purifiée D1	59
III.2. Etude de la réponse inflammatoire	60
III.2.1. Effet du venin et de ses fractions sur la migration leucocytaire	60
III.2.2. Etude des effets du venin de <i>Cerastes cerastes</i> et de ses fractions C2 et D1 sur la production de cytokines	64
III.3. Effets du venin de <i>Cerastes cerastes</i> et de ses fractions C2 et D1 sur le muscle squelettique et le myocarde	70
III.3.3.1. Effets histopathologiques du venin de <i>Cerastes cerastes</i> sur le muscle cardiaque	70
III.3.3.2. Effets histopathologiques du venin de <i>Cerastes cerastes</i> sur le myocarde	73
III.3.3.3. Effets histopathologiques de la fraction C2 sur le muscle squelettique	73
III.3.3.4. Effets histopathologiques de la fraction C2 sur les muscle cardiaque	75
III.3.3.5. Effets histopathologiques de la fraction D1 sur le muscle squelettique	75
III.3.3.6. Effets histopathologiques de la fraction D1 sur les muscle cardiaque	75
III.4. Mise en évidence de l'activité de l'activité myotoxique du venin de <i>Cerastes cerastes</i> et de ses fractions par le dosage de la Créatine kinase	82
III.4.1 Effet myotoxique du venin de <i>Cerastes cerastes</i> sur le myocarde et le muscle squelettique	82
III.4.2. Dosage de l'activité de la créatine kinase dans le sérum, le muscle squelettique et cardiaque de souris envenimées avec la fraction C2	86
III.4.3. Dosage de l'activité de la créatine kinase dans le sérum, le muscle	86

squelettique et cardiaque de souris envenimées avec la fraction purifiée D1

III.5. Effet du venin de *Cerastes cerastes* et des ses fractions sur l'activité de certaines enzymes impliquées dans le métabolisme musculaire TGO, TGP, LDH 90

III.6. Effet d'un anti inflammatoire stéroïdien (hydrocortisone) sur les activités enzymatiques étudiées 91

**Discussion générale** 92

**Conclusion** 95

**Perspectives** 96

**Bibliographie** 97

**Annexes**

**Résumé**

**Abstract**

## I. Introduction

La valeur absolue de l'incidence globale des envenimations ophidiennes et leur sévérité demeure méconnue. Elles sont cependant estimées approximativement à 5 millions de cas par an et environ 50000 décès particulièrement dans les zones rurales, en Asie en Amérique latine et en Afrique (Warrel, 1996; Chippaux 1998; Chippaux et Gaysson, 1998).

En plus de la mortalité, la morbidité chronique est un important problème de santé publique dans les pays émergents (amputations, déformations et insuffisances rénales)

Les morsures de serpents de la famille des *Viperidae* provoquent des altérations pathologiques locales au niveau du site d'injection tels que l'hémorragie, la formation d'œdème et la myonécrose (Cardoso et al, 1993, Warrel 1995)

Le venin de la vipère à cornes *Cerastes cerastes* contient différentes enzymes dont certaines ont été purifiées. Les travaux réalisés sur ce venin ont montrés que ces altérations résultent de l'action combinée de protéases, de facteurs hémorragiques et de phospholipases A2 (Laraba – Djebari et al, 1990 ;1995; Lifshits 2002)

En plus des altérations histologiques, les venins de *Viperidae* induisent une réponse inflammatoire locale caractérisée par une infiltration leucocytaire et stimulent la synthèse d'une pléthore de médiateurs endogènes de l'inflammation tels que les cytokines et les eicosanoïdes (Gutiérrez et al, 1986; Chaves et al, 1995 ; Farsky et al, 2000 ; Chacur et al, 2001; Chavez, 2005).

Dans le but de mieux comprendre les effets induits par les venins de *Viperidae* et en particulier celui de *Cerastes cerastes*, nous nous sommes intéressés à l'étude des effets physiopathologiques de ce venin et de sa fraction phospholipasique ainsi que l'effet inhibiteur d'un anti inflammatoire sur la phospholipase.

Dans cette étude nous avons recherché et mis en évidence l'activité phospholipasique myotoxique en utilisant une série de techniques chromatographiques et enzymatiques.

Un test d'homogénéité de la fraction phospholipasique myotoxique a été réalisé en effectuant une électrophorèse sur SDS PAGE ainsi qu'un essai de cristallisation de la Phospholipase.

Dans le cadre de ce travail, les altérations et les désordres physiopathologiques induites par le venin de *Cerastes cerastes* et par sa fraction phospholipasique au niveau du muscle squelettique et cardiaque, ont été mis en évidence 3 et 24 heures après envenimation de souris.

Le dosage des enzymes marqueurs des lésions musculaires; LDH, TGO, TGP et CK a été entrepris ainsi que l'effet d'un anti inflammatoire stéroïdien sur la libération enzymatique induite par le venin de *Cerastes cerastes* et par sa fraction phospholipasique.

Un dosage de certaines cytokines sériques et une numération des cellules leucocytaires sur lavages péritonéaux ont été également réalisés.

## **I. Les Serpents**

Les serpents sont des animaux amniotiques, poïkilothermes (à sang froid) et carnivores qui se retrouvent dans les régions chaudes du globe terrestre (Chippaux., 1999 ; Golvan., 1983).

Les serpents appartiennent à l'embranchement des vertébrés, classe des réptiles l'ordre des squamates et sous ordre des ophidiens (Guinsbourg., 1970; Platel, 1991 ; Audebert, 1993) (figure 1).

### **I.1. Les Serpents Venimeux**

Il existe environ 2700 espèces d'ophidiens repertoriés, mais seul un cinquième est venimeux (Gruber., 1992).

Les serpents venimeux possèdent des glandes qui secrètent le venin. Ces glandes sont considérées comme les homologues des glandes parotides chez l'homme. Elles sont revêtues d'un épithélium formé d'une seule couche cellulaire sécrétrice de venin et de crochets ; qui sont des dispositifs mécaniques permettant l'innoculation du venin à la manière d'une seringue hypodermique (Platel., 1991 ; Audebert., 1993; Beaumont, 2000).

### **I.2. Classification des serpents**

En fonction de l'anatomie de leur appareil inoculateur, les serpents sont divisés en 4 groupes : les Aglyphes, les Opisthoglyphes, les Protéoglyphes et les Solénoglyphes, (Figure 1).

#### **I.2.1 - Les Aglyphes**

Leur venin inoffensif est souvent mélangé à de la salive (Grassé, 1976 ; 1980)

#### **I.2.2 - Les Opisthoglyphes**

Ils sont peu dangereux pour l'homme car lors d'une morsure l'injection du venin reste superficielle (Golvan., 1983; Kunkel et al, 1984; Meter et Stocker, 1991).

#### **I.2.3 - Les Protéoglyphes**

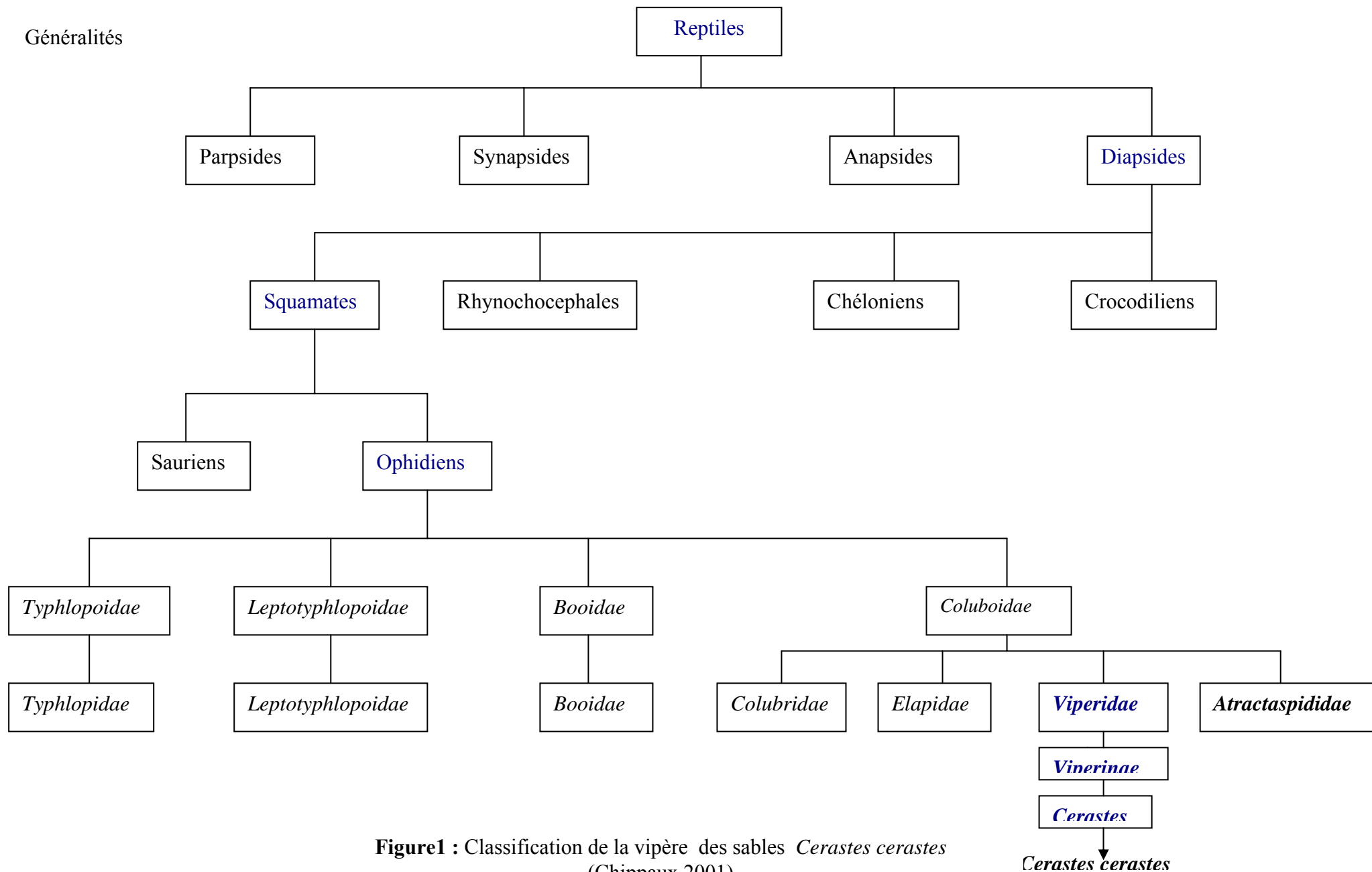
Ils comprennent deux familles : Les *Elapidae* (serpents terrestres) et les *Hydrophidae* (serpents marins).

#### **I.2.4 - Les solénoglyphes**

Ils sont pourvus de crochets mobiles et longs situés en avant du maxillaire supérieur, c'est l'appareil venimeux le plus performant qui permet lors d'une morsure, une injection intra-musculaire très profonde du venin. (Fretly., 1975, Maume, 1983). Ils regroupent 2 familles : Les *Viperidae* et les *Crotalidae*.

### **I.3. Les *Viperidae***

Les vipères sont des serpents nocturnes hautement venimeux. Ils ont un corps trapu, une tête triangulaire et sont dotés de crochets longs et mobiles (Ernest et Zug, 1999). Plus de 90 % des envenimations par morsures de serpents rencontrées en Afrique tropicale sont dues à des morsures de *Viperidae* (Chippaux et al., 1999).



**Figure1 :** Classification de la vipère des sables *Cerastes cerastes* (Chippaux,2001)

#### I.4. La Vipère à cornes *Cerastes cerastes*

La vipère à cornes ou vipère du sable *Cerastes cerastes* est largement répandue dans les régions chaudes et désertiques du globe terrestre (Künkel *et al.*, 1984; Laraba-Djebari, 1996). Sa répartition s'étend de la côte atlantique du Maghreb jusqu'à la péninsule arabique en passant par l'Égypte et le désert du Negev, où elle est un sérieux problème de santé publique. (Labib *et al.*, 1979; Kochva, 1998), (Tableau I).

En Algérie, La vipère à cornes est retrouvée sur le versant meridional, dans les régions désertiques et même sur les hauts plateaux sans pour autant s'éloigner du climat saharien ( Gruber., 1992 ; Laraba-Djebari, 1996).

Cette vipère s'enterre dans le sable, seules les cornes restent visibles. Sa morsure est mortelle, si elle n'est pas traitée immédiatement (Laraba-Djebari, 1995).

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

Sous – espèce	Répartition géographique
<i>Cerastes cerastes cerastes</i> (Linnoeus, 1758)	Afrique du nord, de la Mauritanie à l'Égypte.
<i>Cerastes cerastes gasperitti</i> (Arnold, 1980)	Syrie, Palestine, Jordanie, Irak, Arabie Saoudite.
<i>Cerastes cerastes karlhorthi</i> (Sochoch, 1974)	Mauritanie, Algérie, Tunisie, Mali, Niger.
<i>Cerastes cerastes mutila</i> (Doumergue, 1901)	Libye, Soudan, Égypte, Palestine.
<i>Cerastes cerastes hoofi</i> (Werner et Sivan, 1999)	-

#### I.5. Composition des venins de *viperidae*

Le venin se présente sous forme liquide, visqueux de couleur jaune ombrée et d'aspect huileux. (Boquet, 1970).

Le venin est un mélange complexe constitué de 18 à 67% de matières solides dont 90 % sont des protéines ayant des activités biologiques diverses (Laraba-Djebari., 1984; Menez, 1993 ; Bon, 2000a).

Les toxines présentes dans les venins de serpents ont des actions pharmacologiques qui conduisent au blocage du fonctionnement du système nerveux central, des muscles ou du système cardio-vasculaire.

Les venins de serpents contiennent également des enzymes qui provoquent des dommages capillaires locaux, des necroses tissulaires, des hémorragies et des douleurs vives.

Des variations dans la composition et la toxicité des venins de serpents appartenant à la même espèce ont été constatées (Than., 1985 ; Wuster, 1996).

## I.5.1. Les Enzymes

Les venins de serpents contiennent de nombreuses enzymes de nature et de fonction différentes.

Les venins de *Viperidae* en particulier représentent une des sources les plus riches en enzymes dont la majorité sont des hydrolases à l'exception des L – aminoacides oxydases qui sont des oxydoréductases (Schwartz *et al.*, 1984 ; Laraba-Djebari, 1996).

### I.5.1.1. Les Protéases : E.C.( 3.1.1.4 )

Les venins de *vepiridae* sont particulièrement riches en protéases (Vilojen *et al.*, 1979 ; Laraba-Djebari, 1996).

Les protéases constituent un groupe hétérogène d'enzymes de masse moléculaire variable (15 et 380 kDa), (Wisner *et bon.*, 2002).

Certaines protéinases ayant un effet protéolytique, sont impliquées dans la pathogenèse de la nécrose tissulaire et de l'hémorragie (Ramirez *et al.*, 1990 ; Thireau,1995 ; Gutierrez *et Rucavado.*, 2000). D'autres protéases exercent des effets activateurs ou inhibiteurs sur les mécanismes hémostatiques (Alexander *et al.*, 1988 ; Faure *et al.*, 2000 ; Joseph *et al.*, 2002).

Les enzymes qui agissent sur les facteurs de la cascade de coagulation et l'endothélium vasculaire sont douées d'activité pro et anti-coagulante. En effet, les protéases anti-coagulantes provoquent chez l'homme de graves troubles se caractérisant par des saignements continus et un syndrome hémorragique.

Au niveau plasmatique l'action des protéinases aboutit à la dégradation du fibrinogène. Cet effet est accentué par la présence d'hémorragines qui attaquent directement la paroi vasculaire et les plaquettes sanguines, (Kini *et Evans.*, 1992).

Certaines protéases possèdent à la fois une activité fibrinolytique et fibrinogénolytique, alors que d'autres ne possèdent que l'activité fibrinogénolytique, ces dernières sont connues sous le nom de protéinases de type thrombine (Laraba-Djebari *et al.*, 1995).

Les protéases des venins de serpents sont classées en fonctions de leur structure en serine protéases et en métallo protéases (Wang *et al.*, 2002).

#### I.5.1.1.1. Les Sérine -Protéases

Les serine-protéases sont abondantes dans les venins de *Viperidae* et de *Crotalidae* (elles représentent jusqu'à 20 % des protéines totales du venins). Les sérine-protéases sont capables de rompre l'équilibre hémostatique de leur proie quand elles sont associées à d'autres protéines du venin ; Seules elles n'exercent aucune activité toxique (Brand *et al.*, 2000 ; Bon *et al.*, 2001),(Figure 2).

Un certain nombre de sérine-protéases ont été isolées à partir du venin de *Cerastes cerastes*, il s'agit notamment de :

La RP 34 (Laraba-Djebari *et al.*, 1992) ; Afâacytine (Laraba-Djebari *et al.*, 1995) ;La Cerastocytine et la Cerastotine (Marrakchi *et al.*, 1997).

-La RP34 est une  $\alpha$  –fibrinogénase qui dégrade les chaînes  $\alpha$  du fibrinogène (Laraba-Djebari *et al.*, 1992).

-Afâacytine est une sérine protéase qui active le facteur X induisant la libération de sérotonine à partir des plaquettes sanguines (Laraba-Djebari *et al.*, 1995).

-La Cerastocytine et la Cerastotine sont des enzymes de type thrombine à effet pro coagulant. La Cerastocytine présente une action activatrice directe sur l'agrégation plaquettaire.

-La Cerastotine agit indirectement en présence de fibrinogène,(Tableau II).

Tableau II: Caractérisation de certaines Sérine Protéases purifiées à partir du venin de *Cerastes cerastes*

Sérine Protéase	Caractéristiques	Principaux effets	Références
<b>Fraction coagulante de <i>Cerastes cerastes</i></b>	Protéinase de pm 140 KDa et un p I de 3,2	Activité caséinolytique ( 3ΔDO/mg/h) Effet toxique à partir de 6 mg/Kg en ip	El asmar et al.,1986
<b>RP 34</b>	Protéinase à sérine constituée de 2 sous unités de PM 48,5 Kda et un pl de 3,75	α-fibrinogenase, activité vis-à-vis de la caseine , une activité esterhydrolase et une activité amidase sur les substrats synthétiques	Laraba-Djebari et al.,1992; Laraba-Djebari ,1996.
<b>Fraction IV a</b>	Sérine protéase de type thrombine, c'est un dimère avec un p I > 9,6	Active l'agrégation des plaquettes selon un mécanisme similaire à celui de la thrombine	Basheer et al.,1995.
<b>Afaacytine</b>	Protéinase glycosylée constituée de 2 sous unités avec un p I de 6,25 et un pm 40 Kda, le Ca++ est nécessaire pour la cohésion structurale de la molécule	fibrinogenase qui dégrade les 2 chaînes α et β du fibrinogène, agit directement sur l'agrégation plaquettaire et libère la sérotonine c'est une thrombine-like mais non inhibée par les inhibiteurs de la thrombine	Laraba-Djebari et al.,1995; Laraba-Djebari ,1996.
<b>Cerastatine</b>	PM de 32 KDa	Inhibe l'agrégation plaquettaire induite par la thrombine et le collagène	Marrakchi et al., 1997.
<b>Cerastocytine</b>	30 KDa	Enzyme thrombine - like, activité procoagulante active l'agrégation plaquettaire	Marrakchi et al., 1997.
<b>RCC - PPP</b>	Isoforme de la Cerastocytine	Activateur des plaquettes	Dekhil et al.,2003.

### **I.5.1.1.2. Les Métalloprotéinases**

Les venins de serpents, en particulier ceux de *Viperidae* et de *Crotalidae* contiennent une grande diversité de métalloprotéinases hémorragiques dont le poids moléculaire varie entre 20 et 100 kDa (Jia et al., 1996 ; Kamiguti et al., 1998 ; Wisner et Bon, 2002).

Les métalloprotéinases n'exercent leur action catalytique qu'en présence d'un ion métallique, le plus souvent le Zinc (Markland., 1998). Elles ont pour principale cible la membrane basale de l'endothélium cellulaire, dont l'effet se traduit par une importante extravasation du sang, (Marsh., 1994 ;Perez et Sanches,1999 ; Gutiérrez et Rucavado, 2000). Elles sont donc capables de dégrader plusieurs constituants de la matrice extra cellulaire (collagènes, protéoglycanes, fibronectines, laminines), elles sont impliquées dans la pathogenèse de la nécrose tissulaire (Wang et al., 2002).

Ces enzymes sont également à l'origine du syndrome hémorragique qui se manifeste localement puis s'étend de manière systémique contribuant ainsi au choc cardio-vasculaire (Franceschi et al., 2000).

Elles altèrent la fonction des plaquettes avec leur domaine non catalytique desintegrin – like et le domaine riche en cystéine ce qui expliquerait l'amplification de l'effet hémorragique. ( Kamiguti et al., 1996 ; De Moura Da Silva et al, 1999 ; Jia et al,2000). Elles dégradent le facteur X de coagulation après altération des capillaires sanguins (Gutierrez et Rucavado., 2000) (Tableau III).

Les métalloprotéinases hémorragiques sont également connues sous le nom d'hémorragines ou toxines hémorragiques et elles sont subdivisées en 4 classes selon leurs structures et leurs masses moléculaires (Zhang et al., 1994 ; Bjarnason et Fox, 1994 ; Lomonte et al, 1996 ; Hati et al, 1999 ; Franceschi et al, 2000),( Figure 2).

#### **I.5.1.1.2.1. Métallo protéinases de la classe I (P-I)**

Les hémorragines ont une masse moléculaire d'environ 24 kDa. D'un point de vue structural elles possèdent uniquement un domaine « métalloprotéinases », constitué de 20 acides aminés avec 3 résidus Histidine indispensables pour l'activité protéolytique de l'enzyme.

Le ligand du zinc au niveau du site actif de la métallo protéinase est constitué d'une molécule d'eau associée à trois résidus histidine (Jia et al., 1996 ; Rucavado et al,1999 ; Omari-Satoh et al, 2000 ; Wang et al., 2002),( Figure 3 ).

#### **I.5.1.1.2.2. Métallo protéinases de la classe II (P-II)**

Il s'agit d'enzymes de masse moléculaire variant de 30 à 60 kDa, elles possèdent outre le domaine protéinase, un domaine de 10 kDa dit « desintegrin – like » (Markland., 1998).

D'un point de vue fonctionnel, le domaine « desintegrin – like » permet l'attachement des protéinases hémorragiques sur des sites particuliers des cellules endothéliales ou des plaquettes, ainsi que l'amplification de l'action des hémorragines en affectant l'agrégation des plaquettes ( Kamiguti et al., 1998 ; Franceschi et al, 2000),(Figure 3).

#### **I.5.1.1.2.3. Métallo protéinases de la classe III (P-III)**

Elles possèdent en plus des domaines protéinase et « desintegrin – like » un domaine de 14 kDa riche en cystéine (Takeya et a.,l 1990). Leur masse moléculaire est d'environ 55 kDa (Kawiguti et al., 1998 ; Franceschi et al, 2000),(figure 3).

**I.5.1.1.2.4. Métallo protéinases de la classe IV (P-IV)**

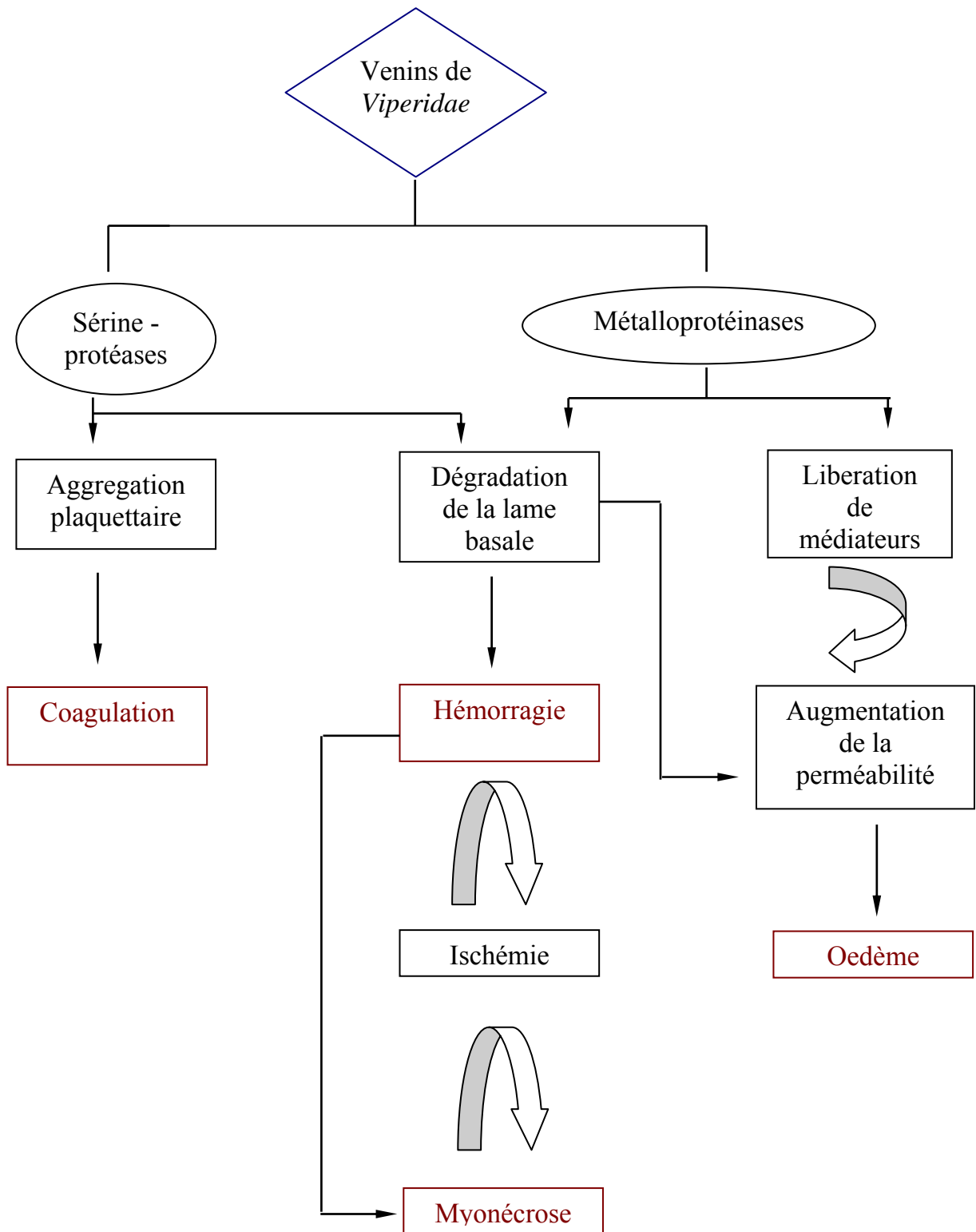
Ces enzymes ont un poids moléculaire d'environ 95 kDa, elles possèdent en plus des trois domaines (protéinase, desintegrin – like et le domaine riche en cystéine) un domaine de type « lectin » lié aux chaînes polypeptidiques des métalloprotéinases par des ponts dissulfures (Zhang et *al.*, 1994 ; Gutierrez et Rucavado, 2000 ; Matsui et *al.*, 2000), (Figure 3).

Les métallo protéinases isolées à partir des venins de *Viperidae* sont les principaux constituants du venin responsables de l'hémorragie, (Kamiguti et *al.*, 1996; Gutiérrez et Rucavado, 2000).


Les métallo protéinases induisent la myonécrose, des altérations de la peau, des phénomènes inflammatoires et la dégradation des constituants de la matrice extra cellulaire (Kamiguti et *al.*, 1996; Moura Da Silva et *al.*, 1999; Jia et *al.*, 2000).

Les métalloprotéinases présentent une action fibrino(géno)lytique directe qui dégrade préférentiellement les chaînes  $\alpha$  du fibrinogène (Markland., 1998).

Une métallo protéinase ; Alternagine isolée à partir du venin de *Bothrops alternatus* induit des effets pharmacologiques similaires à ceux provoqués par les PLA2 myotoxiques telle que la formation d'œdème et la myotoxicité ; avec cependant des mécanismes d'action différents ( Gay et *al.*, 2005).

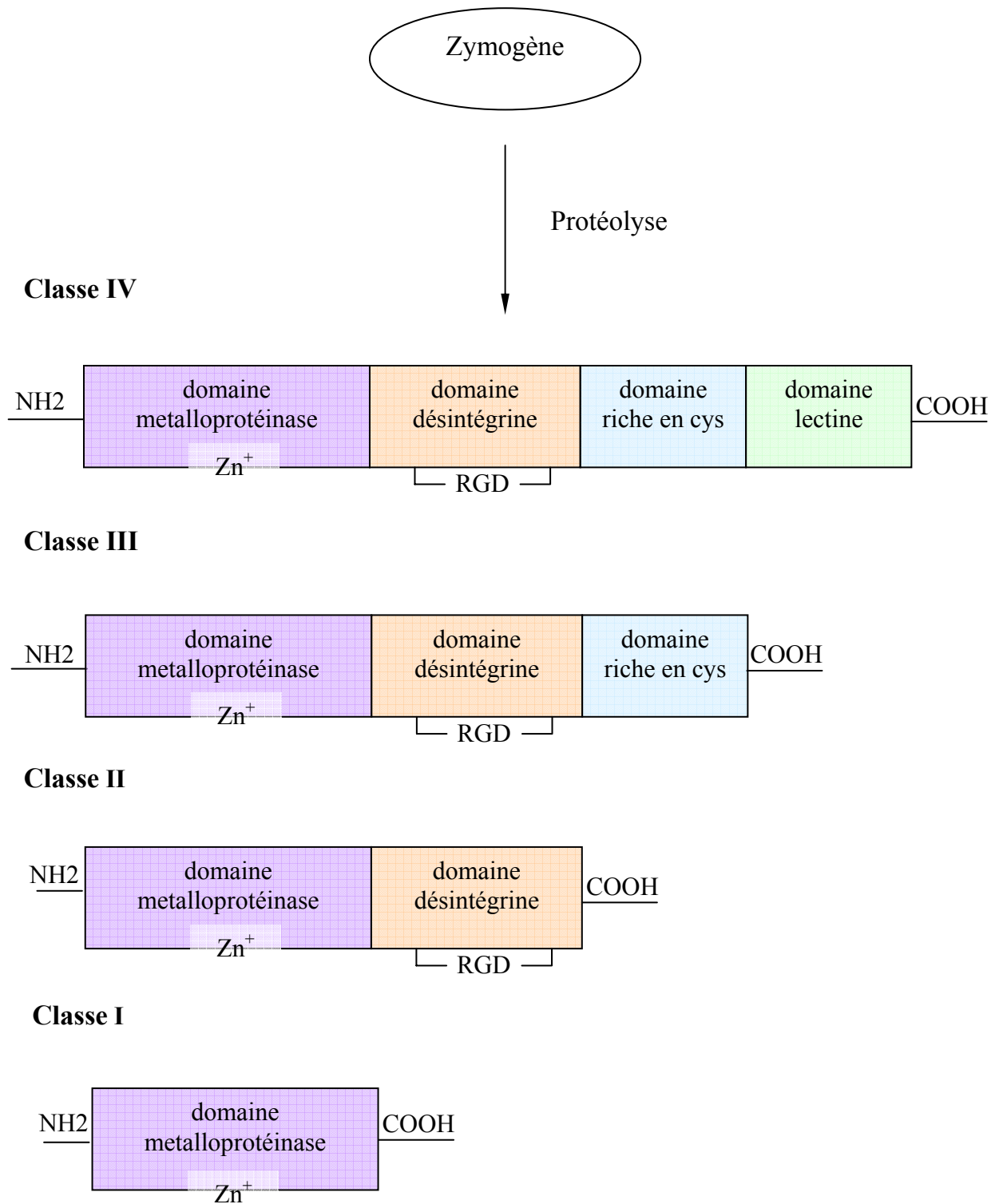


**Figure 2:** Effets physiopathologiques provoqués par les metalloprotéinases et les sérine-protéinases des venins de *Viperidae*

→ Action directe ;  Action indirecte  
 (Mandelbaum., 1990 ; Maruyama et *al.*, 1992 et 1993 ; Alberts et *al.*, 1994 ; Bjarnason et Fox., 1994 ; De Araujo et *al.*, 1996 ; Markland., 1998 ; Hati et *al.*, 1999 ; Chow et Kini., 1999)

**Tableau III : Classification de certaines métalloprotéinases purifiées à partir de venins de serpents**

Venin	Molécule	Propriétés biologiques	Référence
<i>Bothrops atrox</i>	Batroxobin	Fibrinogénase	Stocker et Barlow., Nikai et <i>al.</i> , 1985
<i>Trimeresurus mucrosquamaus</i>	Factor a	Fibrinogénase	Nikai et <i>al.</i> , 1986
<i>Agkistrodon halys blomhoffi</i>	HR1	Fibrinogénase	Takeya et <i>al.</i> , 1990
<i>Trimeresurus flavoviridis</i>	HR1B	Intégrine	Mandelbaum., 1990
<i>Bothrops jararaca</i>	Facteur HF <sub>2</sub> et bothropasin	Fibrinogénase, dégrade la caséine et les B-chaines de l'insuline	Ownby et <i>al.</i> , 1990 Siigur et Siigur., 1991
<i>Agkistrodon bilineatus bilineatus</i>	Bilitoxin	Lyse des cellules endothéliales	Kini et Evans., 1992
<i>Vipera lebetina</i>	Lebetase	Fibrinogénase	
<i>Naja nigricollis crawshawii</i>	F1	α-fibrinogénase	Kini et Evans., 1992
<i>Trigraminus gramineus</i>	Trigramin	Intégrine	Kini et Evans., 1992
<i>Bitis arietans</i>	Bitistatin	Intégrine	
<i>Bothrops jararaca</i>	Jararafibrase I et II	Dégradation de collagène IV, de gélatine, de laminine, de fibronectine	Maruyama et <i>al.</i> , 1992
<i>Bothrops jararaca</i>	Jararafibrase III et IV	Fibrinogénase, dégrade collagène IV, gélatine, laminine et fibronectine	Maruyama et <i>al.</i> , 1993 ; Gutiérrez et Lomonte., 1995 ; Rucavado et <i>al.</i> , 1998 ; Franceschi et <i>al.</i> , 2000
<i>Bothrops asper</i>	BaPI	Fibrinogénase et dermonécrose	
<i>Bothrops asper</i>	BaH4	Hémorragie et myonécrose	
<i>Bothrops jararaca</i>	Jararhagin	Fibrinogénase	Sugiki et <i>al.</i> , 1995 ; Kamiguti et <i>al.</i> , 1996
<i>Crotalus atrox</i>	Catrocollastatin C	Inhibition de l'agrégation plaquettaire	Calvette et <i>al</i> 2000
<i>Bothrops neuwiedi</i>	Neuwiedase	Dégradation des composants de la matrice extracellulaire	Rodrigues et <i>al</i> 2001 Anai et <i>al.</i> , 2002
<i>Bothrops jararaca</i>	Jararafibrase	Epuisement des facteurs de la coagulation II, V et VIII	Leonardi et <i>al.</i> , 2002
<i>Vipera ammodytes ammodytes</i>	VaH1 et VaH2	Inhibition de l'agrégation plaquettaire	
<i>Bothrops alternatus</i>	Alternagine	Myotoxicité et formation d'œdème	Gay et <i>al.</i> , 2005



**Figure 3 :** Représentation schématique des différentes classes de métallos protéinases  
(Kini et Evans., 1992)

#### **I.5.1.1.3. Les Hyaluronidases (E.C.4.2.9.1)**

Les Hyaluronidases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des liaisons glycosidiques de certains mucopolysaccharides du tissu conjonctif des animaux. Elles facilitent la diffusion des toxines dans les tissus de la victime (Goyffon., 1995 ; Laraba-Djebari et *al.*, 1996 ; Ernest et Zug, 1999).

#### **I.5.1.1.4. Les Acétylcholinestérase ( EC.3.1.1.7).**

L'activité Acétylcholinestérase a été mise en évidence dans des venins d'*Elapidae* et *Hydrophidae*, mais pas dans ceux des *Viperidae* et *Crotalidae*.

#### **I.5.1.1.5. Les L-Aminoacide oxydases (EC.1.4.3.2)**

La L-Aminoacide oxydase est une flavoglycoprotéine qui catalyse la desamination oxydative des L-acides aminés en acide  $\alpha$  – cétonique avec libération d'ammoniaque et de peroxyde d'hydrogène (Maume., 1983 ; Zeller, 1984).

Cette enzyme à un effet activateur sur la coagulation plasmatique, l'agrégation des plaquettes, l'induction de l'apoptose et de l'oedème ainsi que sur l'hémolyse, (Ali et *al.*, 2000).

#### **I.5.1.1.6. Les Phospholipases A<sub>2</sub> ( PLA<sub>2</sub> ; EC.3.1.1.4 )**

Les PLA<sub>2</sub> représentent une grande famille d'enzymes lipolytiques qui catalysent l'hydrolyse de la liaison Acyl – Ester à la position Sn – 2 des 1,2-diacyl-3-Sn-phosphoglycerides libérant les phospholipides et les acides gras (Van Deenen et *al.*, 1963; Kini, 1997; Kudo et Murakami, 2002).

Les PLA<sub>2</sub> existent sous forme intra et extra cellulaire et n'exercent leur activité catalytique qu'en présence d'un ion divalent et plus souvent le calcium, (Dennis., 1994; Six et Dennis, 2000; Doley et *al.*, 2002).

Ces enzymes ont été identifiées dans les tissus des mammifères, dans les venins d'arthropodes et de serpents. Elles sont présentes dans différents organes tels que le rein, les glandes salivaires, le foie, le cerveau et l'intestin, (Laraba-Djebari., 1984). Elles sont particulièrement abondantes dans le pancréas et dans les venins de serpents.

Récemment, les PLA<sub>2</sub> ont été retrouvées dans le liquide synovial où elles jouent un rôle important dans l'hypersensibilité et les maladies inflammatoires chroniques (Vadas et Pruganski., 1986 ; Vadas et al, 1993). En effet, elles ont été impliquées dans de nombreux processus physiopathologiques comme les rhumatismes, l'arthrite, l'asthme, le psoriasis, le choc septique et le syndrome du stress respiratoire chez les adultes, (Touqui et Alaoui-El-Azher., 2001 ; Murakami et Kudo, 2002).

Les PLA<sub>2</sub> des venins de *Viperidae* sont des enzymes de 120 à 130 acides aminés dont la masse est d'environ 14 kDa, elles comptent parmi les constituants les plus pharmacologiquement actifs et toxiques du venin. En plus de leur activité enzymatique, elles présentent une multitude d'effets biologiques dont la neurotoxicité post et pré synaptique, la cardiotoxicité, la myotoxicité, la cytotoxicité, l'hémolyse, l'inhibition ou l'induction de l'agrégation plaquettaire, l'anticoagulation, la formation d'oedème, la convulsion et l'hypotension (Rupvano et *al.*, 1986; Rosenberg., 1989; Chwetzoff et *al.*, 1989; Stefansson et *al.*, 1990; Cicala et Cirino, 1993; Huang et *al.*, 1993 ; Kini, 1997; Gutierrez et Lomonte, 1997; Kini., 1997; Ownby, 1998; Ownby et *al.*, 1999; Kemparaju et *al.*, 1999; Fuly et *al.*, 2000 ;

## Généralités

Chakraborty et al, 2002 ). Elles sont également impliquées dans l'apoptose des neurones et d'autres types cellulaires .(Herkert et al, 2001 ;Taketo et Sonoshita, 2002 ;Shakhmane et al, 2003).

La toxicité des PLA<sub>2</sub> est accentuée lorsque celles –ci sont associées à d'autres constituants du venin telles que les protéases ( Lering et al., 1995; Lu et al, 2002).

Les PLA<sub>2</sub> stimulent la synthèse d'agents inflammatoires via des processus enzymatiques et non enzymatiques dans les membranes cellulaires (Zallen et al., 1998 ; De Castre et al,2000). Elles induisent la migration des neutrophiles par des mécanismes directs et indirects qui entraîneraient la génération de médiateurs chemoattractants comme le leucotriène B<sub>4</sub> et le PAF (Gambero et al., 2002).

### **I.5.1.1.6.1. Classification des PLA<sub>2</sub>**

Plusieurs classifications des PLA<sub>2</sub> sont établies ; selon leur origine (sécrétée ou cytosolique), leur structure primaire, le nombre et la position des ponts dissulfures.

En comparant les séquences analytiques, les PLA<sub>2</sub> de plusieurs familles de serpents présentent des homologies avec les PLA<sub>2</sub> pancréatiques des mammifères (Kini., 1997).

Nogueira et collaborateurs en (2005) ont montré que la Crotoxine ; une PLA<sub>2</sub> isolée du venin de *Crotalus durissus collilineatus*, présente un effet insulino-tropique in vitro.

Malgré les différences dans leur propriétés pharmacologiques, les PLA<sub>2</sub> partagent 44 à 99% d'homologies structurales. (Scott., 1997).

Elles sont classées en 4 groupes ( Valentin et Lambeau., 2000), (Tableau IV)

**I.5.1.1.6.1.1. Les PLA<sub>2</sub> du groupe I :** sont retrouvées dans les venins d'*Elapidae*.

**I.5.1.1.6.1.2. Les PLA<sub>2</sub> du groupe II :** sont présentes dans les venins de *Viperidae*. Ce groupe est divisé en 2 sous groupes, le variant [Asp<sup>49</sup>] PLA<sub>2</sub> catalytiquement active et le variant [Lys<sup>49</sup>] PLA<sub>2</sub> catalytiquement inactive, (Maraganore et al., 1984 ; Maraganore et Heindrikson., 1986). Ce dernier, malgré la perte de l'activité catalytique conserve et exerce son action myotoxique et inflammatoire. (Gutierrez et Lomonte., 1995 ; Gutierrez et Lomonte, 1997; Ownby, 1999; Ward et al, 2000 ; Lomonte et al, 2003).

**I.5.1.1.6.1.3. Le groupe III des PLA<sub>2</sub> :** est retrouvé dans les venins d'abeilles, de lézards, de scorpions et de poissons.

**I.5.1.1.6.1.4. Le quatrième groupe IV :** est constitué d'une seule PLA<sub>2</sub>, la conodipine- m, isolée à partir du venin de *Conus magus*.

**Tableau IV : Classification des PLA<sub>2</sub>** (Ménez., 1987 ; Harris., 1997 ; Faure., 2000 ; Valentin et Lambeau., 2000).

Groupe des PL <sub>2</sub>	Nombre de résidus d'acides aminés	Nombre de ponts disulfures	Venins
I	120	7	<i>Hydrophiidae</i> <i>Elapidae</i>
II	125 et une extension de 5 à 7 résidus à l'extrémité C-terminale	7	<i>Viperidae</i> <i>Crotalidae</i>
III	130 à 136	5 à 6	Abeille, Lézard Scorpion
IV	Constitué de 2 chaînes de 77 et 42 résidus	6	Cône

Récemment, une nouvelle classification des PLA<sub>2</sub> a été proposée, en fonction des homologies structurales et de la localisation des PLA<sub>2</sub>. Elles sont subdivisées en onze groupes distincts (A.Gambero et al, 2004).

l'intérêt grandissant suscité par les PLA<sub>2</sub> a permis d'élaborer des techniques de purification de plus en plus performantes pour l'étude de ces enzymes; en effet, la structure primaire et tridimensionnelle de plusieurs PLA<sub>2</sub> de venins a été déterminée, (Arni et Ward., 1996 ; Balsinde et al, 1999 ; Six et Dennis,2000).

Dans le venin de *Cerastes cerastes*, cette enzyme présentent un poids moléculaire de 14,5 kDa et pHi de 5,4. Elle agit sur les lecithines et libère la lysolecithine hémolytique qui provoque la lyse des globules rouges après hydrolyse des phospholipides membranaires, (Laraba-Djebari et Martin Eauclaire., 1990).

Une autre PLA<sub>2</sub> possédant une forte activité neurotoxique a été purifiée à partir du venin de *Crotalus durissus terrificus* par Toyama et al., (2000). Cette PLA<sub>2</sub> appelée F15 se comporte comme une enzyme allostérique avec des paramètres cinétiques élevés (Vmax de 8,5 nmol/min/mg et un Km de 38,5 mM) et des paramètres physico-chimiques permettant de la classer parmi les PLA<sub>2</sub> basiques (PM de 14,5 KDa et un PI de 8,85).

Cette fraction se caractérise également par son effet bactéricide sur les bactéries Gram<sup>+</sup> et Gram<sup>-</sup> et présente une grande homologie de séquence avec la région riche en cystéine des PLA<sub>2</sub> myotoxiques, (Toyama et al, 2000).

Belo et al (2005) ont isolé et caractérisé une nouvelle PLA<sub>2</sub> neurotoxique appelée (MIDCA 1) à partir du venin de *Micrurus dumerilii carinicauda* (serpent corail).

Sa masse moléculaire est de 15 kDa, sa séquence d'acides aminés a été déterminée. Elle présente des analogies structurales avec les PLA<sub>2</sub> des autres venins de serpents. Ces homologies sont de 77,7 % avec MICNIA et B de *Micrurus nigrociuctus* et 71,5% avec NAJMO de *Naja mossambica*.

## Généralités

MIDCA 1 existe sous forme monomérique, PLA<sub>2</sub> Asp (D)<sup>49</sup> catalytiquement active et anticoagulante (Toyama et al., 2000).

MIDCA 1 cause des blocages irréversibles dans la transmission neuromusculaire (Dreyer et Penner., 1987 ; Rowan et Harvey, 1988 ; Dodds et al, 1997 ; Flink et Atchinson, 2003).

### I.5.1.1.6.2. Effets pharmacologiques des PLA<sub>2</sub>

Les PLA<sub>2</sub> des venins de serpents se caractérisent par leurs multiples activités physiopathologiques telles que l'hémolyse, la myotoxicité, la neurotoxicité, l'activité anticoagulante, la formation d'œdème; La cardiotoxicité et l'agrégation plaquettaire (Fletcher et al, 1981; Vishwanath et al, 1987; Wang et Teng, 1990; Liu et al, 1991; Kihara et al, 1992 ; Bon, 1997; Gubensek et al, 1997; Fletcher et Rosenberg, 1997; Gutiérrez et Lomonte, 1997 ; Gopalakrishnakone et al, 1997; Evans et Kini, 1997; Yamaguchi et al, 2001).

Toutes ces activités pharmacologiques pourraient être retrouvées dans les isoenzymes d'une même espèce. Cinq iso enzymes de PLA<sub>2</sub> ont été isolées du venin de *T flavoviridis* et elles reproduisent la plupart de ces effets, (Ishimaru et al., 1980; Oda et al, 1990 ; Kihara et al, 1992; Liu et al, 1990; Yoshizumi et al, 1990; Yamaguchi et al, 2001).

En 2003, un sixième iso enzyme PLA<sub>2</sub> [Asp<sup>49</sup>] neuro et myotoxique a été isolée de ce venin. C'est une PLA<sub>2</sub> basique avec un pI de 10,3, appelée PLA-N, qui induit une activité apoptotique à l'égard des cellules cancéreuses (Chijiwa et al, 2003a).

Dans la plupart des cas, les PLA<sub>2</sub> des venins de serpents exercent leurs activités pharmacologiques indépendamment des autres constituants du venin, c'est le cas de Notexine et de Ammodytoxine (Gubensek et al, 1997). Certains de ces effets pharmacologiques des PLA<sub>2</sub> sont potentialisés lorsque celle-ci sont complexées à d'autres facteurs protéiques.

Quelques fois les liaisons de ces complexes (PLA<sub>2</sub> – Protéines) sont covalentes comme pour β- bungarotoxine. Alors que pour d'autres comme Crotoxine, Mojavetoxine, Taipoxine et Textilotoxine; Les interactions sont non covalentes (Bon., 1997).

Les complexes (PLA<sub>2</sub> – Protéines) ont une activité neurotoxique pré synaptique.

La sous unité protéique est considérée comme un chaperon qui faciliterait la liaison de la PLA<sub>2</sub> au site actif des cellules cibles (Kini., 2003).

Les PLA<sub>2</sub> myotoxiques provoquent l'élévation de la perméabilité membranaire ;Il en résulte alors une élévation de la concentration calcique intracellulaire, entraînant ainsi une hyper contraction musculaire (Gutiérrez et al ., 2003; Sergio et al, 2003)(Tableau V).

Les PLA<sub>2</sub> myotoxiques sont les constituants majeurs de la toxicité, induisant le plus de d'altération au niveau des tissus et organes de leur proies (Ohno et al, 2003).

Tableau V : Propriétés biologiques des PLA<sub>2</sub>

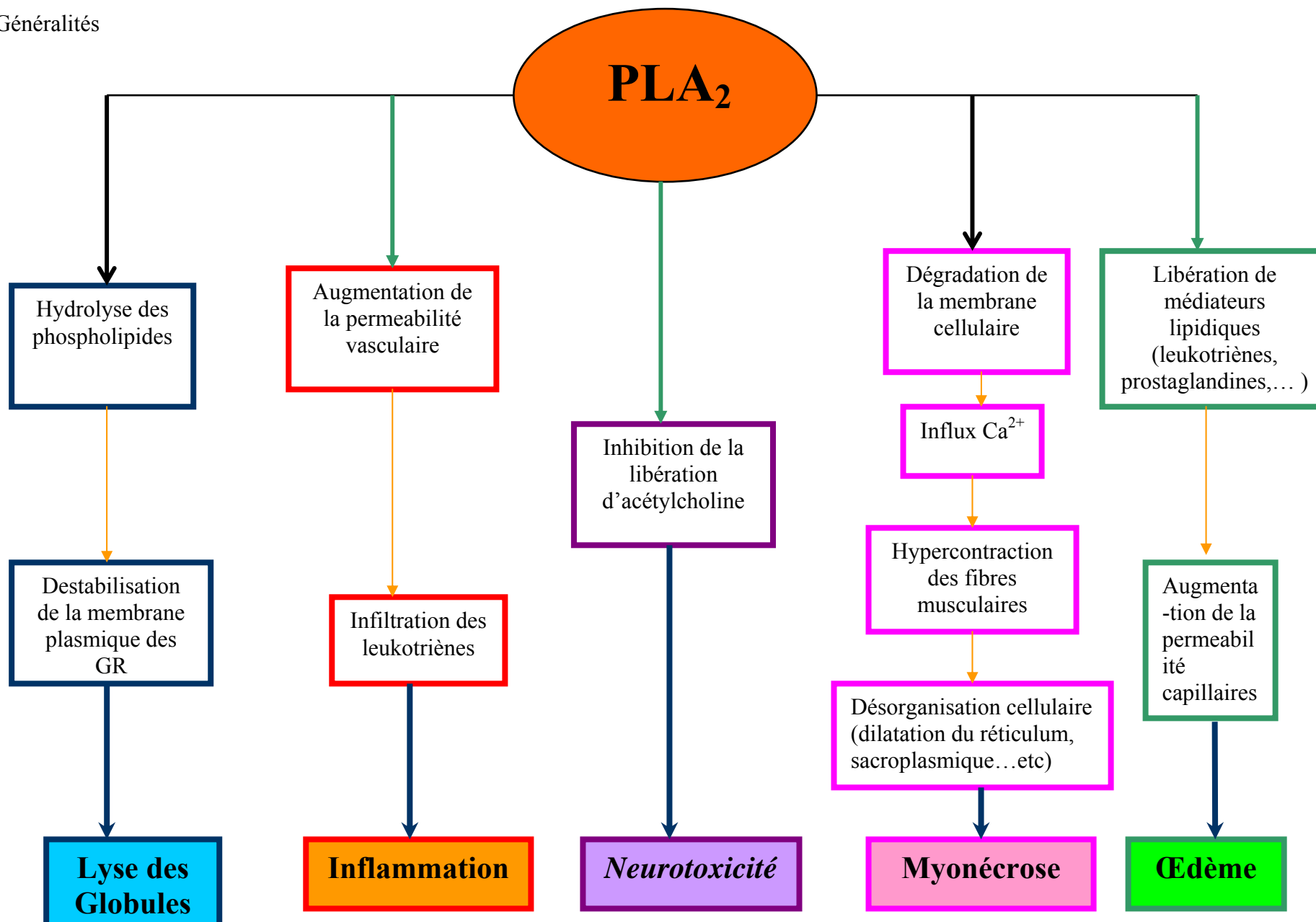
Venin	Molécule	Propriétés biologiques	Référence
<i>Notechis scutatus scutatus</i>	Notexin	Autolyse des cellules musculaires, hydrolyse des phospholipides des cellules musculaires et neurotoxicité	Plushkal et <i>al.</i> , 1978 ; Harris et MacDonell., 1981 ; Harris et <i>al.</i> , 2000
<i>Pseudechis porphyriacus</i>	Pseudexin	Activité neurotoxique et hémolytique	Vaughan et <i>al.</i> , 1981
<i>Trimeresurus mucrosquamatus</i>	TMV-PLA <sub>2</sub>	Activité anticoagulante	Ouyang et Huang., 1983d
<i>Bohtrops asper</i>	Myotoxin	Myonécrose de coagulation	Gutiérrez et <i>al.</i> , 1984
<i>Crotalus scutulatus</i>	Mojave toxin	Activités neurotoxique et hémolytique	Gutiérrez et <i>al.</i> 1984
<i>Bitis caudalis</i>	Caudoxin	Neurotoxicité	Harris., 1985
<i>Bungarus fasciatus</i>	Ceruleotoxin	Neurotoxicité	Harris., 1985
<i>Pseudonaja textilis</i>	Textilotoxin	Neurotoxicité	Harris., 1985
<i>Enhydrina schistosa</i>	Myotoxin VI-5b	Myotoxicité	Harris., 1985
<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Crotoxin	Diminution de la contraction des cellules myocardiques et nécrose	Gopalakrishnakone et <i>al.</i> , 1984 ; Santos et <i>al.</i> , 1990
<i>Crotalus viridis viridis</i>	CVV myotoxin	Hypercontraction des cellules musculaire et myotoxicité	Ownby et Colberg., 1993
<i>Bothrops asper</i>	Myotoxine Lys-49	Myonécrose	Lomonte et <i>al.</i> , 1994b
<i>Ophiodeschis australis</i>	VA-PLA <sub>2</sub>	Dégénérescence des myofibrilles	Huang et Gopalakrishnakone., 1997
<i>Pseudechis australis</i>	Mulgotoxin	Myotoxicité et altération du rein	Gopalakrishnakone et <i>al.</i> , 1997
<i>Vipera russelli</i>	VRV-PL-V et VRV-PL-VIII <sub>a</sub>	Myotoxicité	Gopalakrishnakone et <i>al.</i> 1997
<i>Ophiophagus hannah</i>	OHV A-PLA <sub>2</sub>	Activité anti-plaquettaire	Huang et <i>al.</i> , 1997
<i>Bungarus multicinctus</i>	β-Bungarotoxin	Paralysie neuromusculaire	Dixon et Harris., 1999
<i>Pseudechis australis</i>	Pa-1G, Pa-5, Pa-12C, Pa-15	Myotoxicité	Fry., 1999
<i>Oxyuranus scutellatus</i>	Taipoxin	Neurotoxicité et myotoxicité	Harris et <i>al.</i> , 2000
<i>Bothrops jararacussu</i>	Bothropstoxins	Cytotoxicité sur les cellules en culture et myonécrose	Andriao-Escarso et <i>al.</i> , 2000

#### **I.5.1.1.6.3. Mécanisme d'action des PLA<sub>2</sub>**

Les PLA<sub>2</sub> exercent leurs effets pharmacologiques selon des mécanismes dépendants ou indépendants de leur activité enzymatique.

L'hydrolyse des phospholipides membranaires et la libération des lysopholipides et les acides gras par les PLA<sub>2</sub> est exercée grâce à des interactions électrostatiques entre les résidus positifs (region carboxy terminale) de la PLA<sub>2</sub> et les sites (chargés négativement) de la membrane cellulaire (protéoglycans), (Teixeira., 2003) (Figure 4).

Les PLA<sub>2</sub> basiques purifiées à partir du venin de *Naja nigricollis* se lient au récepteur membranaire par des interactions électrostatiques et non électrostatiques. Ce qui aura pour conséquence l'induction de la libération des agents chimioattractifs (LTB<sub>4</sub> et PAF), (Lin et al., 1999; Gambero et al, 2002) (Figure 4). Les PLA<sub>2</sub> peuvent agir comme des agonistes ou antagonistes, en interférant dans l'interaction des protéines cibles avec leurs ligands physiologiques, (Kini et Evans., 1989a; Kini et al, 2001) (Figure 4).



**Figure 4** : Principaux effets physiopathologiques causés par les PLA2 des venins de serpents (kini., 2003 ; chen et *al.*, 1994 ; chaves et *al.*, 1998 ; Castro et *al.*, 2000 ; Harris et *al.*, 1985 ; Ownby et *al.*, 1990 ; Gutiérrez et *al.*, 1995 ; Teixeira et *al.*, 2003) Effet direct, effet indirect, effet intermédiaire, effet physiologique définitif, correspondent respectivement à :

#### I.5.1.1.6.4. Les Récepteurs des PLA<sub>2</sub>

Les différents sites spécifiques des PLA<sub>2</sub> déterminent l'affinité de ces dernières pour leur cible protéique (Kini et Evans., 1989a).

L'identification de ces sites permet :

- la compréhension du rapport structure/ fonction des PLA<sub>2</sub>
- le développement de stratégies qui permettent de neutraliser la toxicité et les effets pharmacologiques des PLA<sub>2</sub>
- le développement de nouveaux prototypes de recherches et de traitements pharmaceutiques qui cibleraient des fonctions spécifiques (Kini., 2003).

Plusieurs sites spécifiques aux PLA<sub>2</sub> pré synaptiques ont été identifiés :

- TCBP-49 de la Taipoxine (Dodds et al., 1995,1997; Kirkpatrick et al, 2000).
- CAPT, le récepteur protéique de la crotoxine de *Torpedo* (Krizaj et al,1996; Faure et al, 2003).
- La Calmoduline (Vucemilo et al,1998; Sribar et al, 2001)
- La Crocalbine (Hseu et al., 1990; 1997; 1999).
- Les récepteurs des PLA<sub>2</sub> de type M (Lambeau et Lazdunski., 1999; Vardjan et al, 2001) ils sont exprimés à la surface des cellules membranaires musculaires, identifiés comme étant les cibles cellulaires pour OS<sub>1</sub> et OS<sub>2</sub> les iso enzymes de la PLA<sub>2</sub> d'*Oxyuranus scutellatus*.

Le récepteur de type M possède une séquence répétitive de type G de huit lectines distinctes, calcium-dépendantes qui possèdent des domaines CRDS (domaines de reconnaissance des carbohydrates) ils sont localisés du côté extra cellulaire. Ces domaines ont été identifiés dans différentes protéines tels que les lectines protéiques, les surfactants protéiques pulmonaires et particulièrement dans quelques inhibiteurs des PLA<sub>2</sub> isolés à partir de sérums ou de plasma de serpents (Drickamer et Taylor., 1993 ; Fame, 2000).

- Les récepteurs de type N (neuronal) : elles sont très abondantes dans le cerveau du rat (Lambeau et al., 1989, 1991).
- Le facteur Xa de coagulation sanguine qui est la cible protéique des PLA<sub>2</sub> anticoagulantes (Stefansson et al., 1989, 1990; Evans et Kini, 1997; Mounier et al, 1998 ; Kerns et al, 1999).

En ce qui concerne les PLA<sub>2</sub> myotoxiques il s'agit d'interactions électrostatiques entre les résidus cationiques de la surface de la molécule avec un domaine des phospholipides chargé négativement. Ainsi la pénétration du Ca<sup>++</sup> entraîne la formation de « lésions delta » suivie d'une hyper contraction des myofilaments. (Mebs et Ownby., 1990 ; Gutiérrez et Lomonte, 1995; Dias et al, 2001).

#### I.5.1.1.6.5. Les Inhibiteurs des PLA<sub>2</sub> (PLI<sub>s</sub>)

Les inhibiteurs des PLA<sub>2</sub> ont été purifiés à partir de sérum ou plasma de serpents venimeux (*Agkistrodon blomhoffii siniticus*, *Borthrops asper*, *Naja naja kaouhtia*,...) et non venimeux (*Python reticulates*, *Elaphe quadrivirgata*) ; (Okumura et al., 1998; 2002).

Selon leur homologie de séquences d'acides aminés, les inhibiteurs sont classés en trois groupes : PLI<sub>s</sub> α, β, γ. (Ohkura et al., 1997).

## Généralités

La présence de ces inhibiteurs des PLA<sub>2</sub> est associée à la résistance des serpents aux effets délétères des PLA<sub>2</sub>. (Domont et *al.*, 1991 ; Faure, 2000 ; Perales et Domont, 2002 ; Fortes-Dias, 2002).

### I.5.1.1.6.5.1. Inhibiteurs de type $\alpha$

Ils ont été décrits surtout chez les *Viperidae*, et purifiés à partir de sérums des serpents *Trimeresurus flavoridis*, *Agkistrodon blomhoffi siniticus* et *Borthrops asper* ; Ce sont des glycoprotéines composées de sous unités de 147 acides aminés. Ces sous unités forment des structures oligomériques liées de façon non covalente (Ohkura et *al.*, 1993 ; Lizano et *al.*, 1997).

Ils sont caractérisés par la présence d'un domaine homologue au domaine CRD (Carbohydrate Recognition Domain). Ils présentent également une homologie avec l'apoprotéine SP-A du surfactant pulmonaire qui inhibe l'activité PLA<sub>2</sub> du venin de *Trimeresurus flavoridis* (Drickamer et Taylor., 1993 ; Fischer et *al.*, 1994) (Tableau VI).

### I.5.1.1.6.5.2. Inhibiteurs de type $\beta$

Se sont des glycoprotéines acides de 160 kDa constituées de sous unités monomériques de 308 acides aminés et 4 N – glycosylation par unité (Okumura et *al.*, 1998).

Ces inhibiteurs ont été purifiés initialement à partir du sérum de *Agkistrodon blomhoffi siniticus*, (tableau VI).

### I.5.1.1.6.5.3. Inhibiteurs de type $\gamma$

Ils ont été purifiés à partir du sérum de toutes les espèces de serpents venimeux (*Viperidae* et *Hydrophidae*) comme *Agkistrodon blomhoffi siniticus* et *Borthrops asper* et non venimeux comme *Python reticulatus* et *Elaphe quadrivirgata* appartenant respectivement aux superfamilles des *Colubridae* et *Boiidae* (Okumura et *al.*, 1999 ; Thwin et *al.*, 2000)

Les inhibiteurs de type  $\gamma$  sont présents dans le plasma d'une multitude de serpents. Ils sont caractérisés par la présence d'un motif structural à trois doigts qui contient un résidu cystéine unique.

Les inhibiteurs de type  $\gamma$  présentent une homologie structurale avec un grand nombre de protéines de mammifères ayant diverses fonctions biologiques, comme la super famille des protéines Ly -6, l'U-PAR, le récepteur de l'activateur de l'urokinase et les neurotoxines de venins de serpents (Ohkura et *al.*, 1994a,b), CNF (facteur neutralisant le venin de *Crotalus durissus terrificus*) et CICS (inhibiteur de crotoxine) .

Les inhibiteurs de type  $\gamma$  purifiés à partir du sérum de *Crotalus durissus terrificus*, inhibent l'activité enzymatique et toxique des venins de *Viperidae* tels que des  $\beta$ - bungarotoxines, ATx (ammodytoxines de *Vipera ammodytes ammodytes*) (Faure et *al.*, 2000), (Tableau VI).

Tableau VI: Les inhibiteurs des PLA<sub>2</sub> (PLIs) isolés à partir du plasma de serpents (Ohkura et al,1997)

Type d'inhibiteurs de la PLA <sub>2</sub>	Facteur neutralisant	Source	Famille	Classe	Références
<b>PLI <math>\alpha</math> (CRD-like)</b>	<b>PLI (A et B)</b>	<i>Trimeresurus flavoviridis</i>	<i>Viperidae</i>	Groupe II	Kogaki et al., 1989
	<b>PLI – <math>\alpha</math></b>	<i>Agkistrodon blomhoffii siniticus</i>	<i>Viperidae</i>	Groupe II acide	Ohkura et al., 1997
	<b>BaMIP</b>	<i>Bothrops asper</i>	<i>Viperidae</i>	Myotoxine I et II	Lizano et al., 1997
	<b>CgMIP-II</b>	<i>Cerrophidion godmani</i>	<i>Viperidae</i>	Myotoxine II	Lizano et al., 2000
	<b>Bmj MIP</b>	<i>Bothrops moojeni</i>	<i>Viperidae</i>	Groupe II acide et basique	Soares et al., 2003
<b>PLI <math>\beta</math> (riche en Leucine)</b>	<b>PLI-<math>\beta</math></b>	<i>Agkistrodon blomhoffii siniticus</i>	<i>Viperidae</i>	Groupe II basique	Ohkura et al., 1997
	<b>Eq PLI<math>\beta</math></b>	<i>Elaphe quadrivirgata</i>	<i>Colubridae</i>	Groupe II basique	Okumura et al., 2002
<b>PLI <math>\gamma</math></b>	<b>PLI – <math>\gamma</math></b>	<i>Agkistrodon blomhoffii siniticus</i>	<i>Viperidae</i>	Groupe I,II et III	Ohkura et al., 1997
	<b>CgMIP – I</b>	<i>Cerrophidion godmani</i>	<i>Viperidae</i>	Myotoxine I	Lizano et al., 2000
	<b>CICS</b>	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	<i>Viperidae</i>	Crotoxine	Perales et al., 1995
	<b>CNF</b>	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	<i>Viperidae</i>	Crotoxine	Fortes-Dias et al., 1994
	<b>NnK - PLI <math>\gamma</math></b>	<i>Naja naja kaouhtia</i>	<i>Elapidae</i>	Groupe I et II	Ohkura et al., 1994a
	<b>PLI <math>\gamma</math></b>	<i>Laticauda semifasciata</i>	<i>Hydrophidae</i>	Groupe I,II et III	Ohkura et al., 1999
	<b>Eq PLI <math>\gamma</math></b>	<i>Elaphe quadrivirgata</i>	<i>Colubridae</i>	Groupe I,II et III	Okumura et al., 1999
	<b>PIP</b>	<i>Python reticulates</i>	<i>Boiidae</i>	Groupe II et III; Dabioatoxine, PL-V et PL - IIIa	Thwin et al., 2000
	<b>NAI</b>	<i>Notechis ater</i>	<i>Elapidae</i>	Groupe III et pancréatique	Hains et Broady, 2000
	<b>NSI</b>	<i>Notechis scutatus</i>	<i>Elapidae</i>	Groupe I,II et III	Hains et Broady, 2000

## **I.5.2. Les Myotoxines**

Les myotoxines sont particulièrement présentes dans les venins de *Viperidae*, elles provoquent souvent de graves altérations du tissu musculaire et sont soit de nature phospholipasique (PLA<sub>2</sub> myotoxique) ou polypeptidique (peptides myotoxiques)

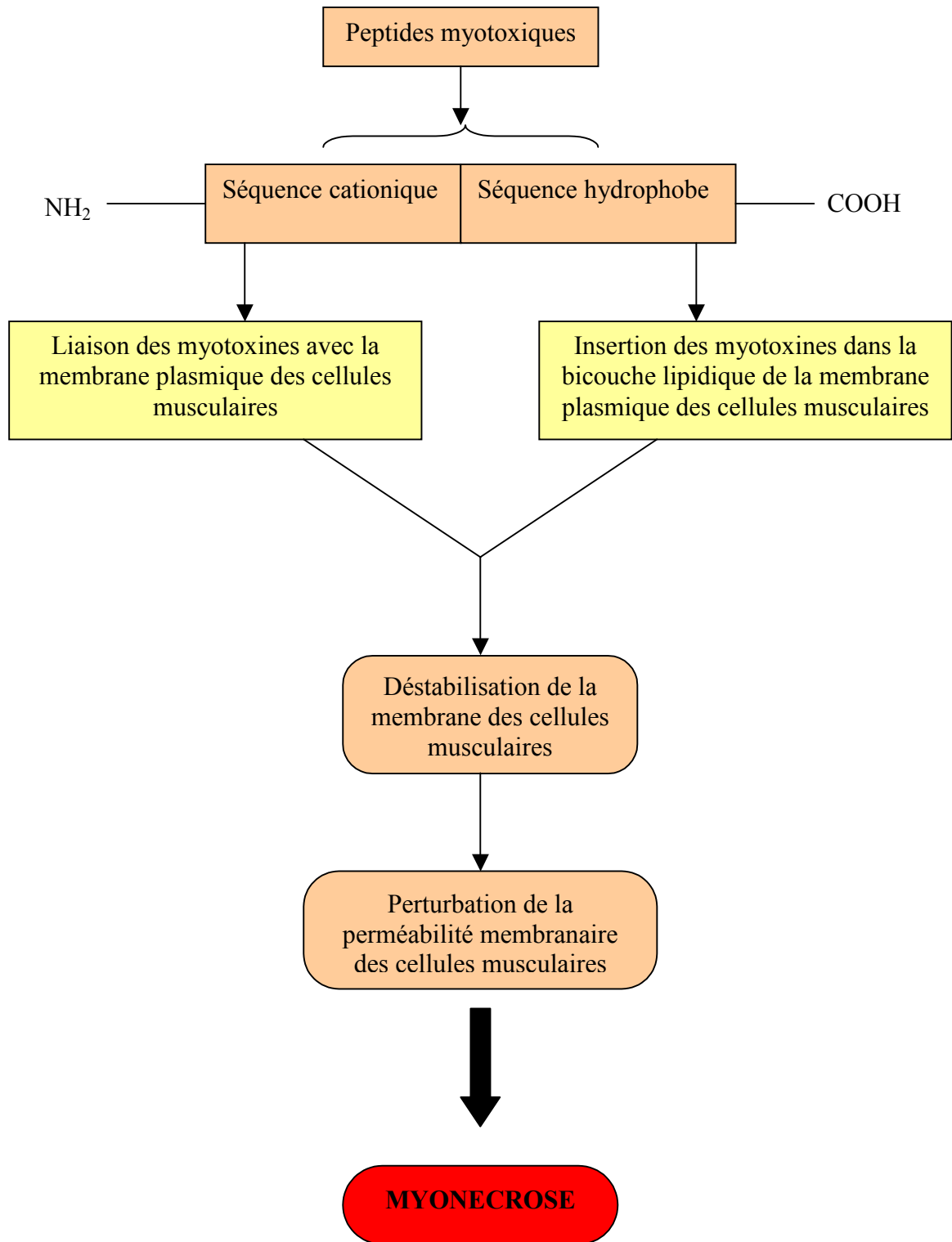
### **I.5.2.1. Les Peptides Myotoxiques**

Ils sont dépourvus d'activité enzymatique. Leur activité myotoxique semble être liée à la présence de 2 séquences peptidiques qui se suivent et qui sont reliées par 3 à 4 ponts dissulfures, la première séquence est cationique, riche en acides aminés chargés positivement, la deuxième séquence est riche en acides aminés hydrophobes, (Kini et Iwanaga., 1986 ; Lomonte et *al*, 1999a; Angulo et *al*, 2001), (Figure 5).

### **I.5.2.2. Les PLA<sub>2</sub> Myotoxiques**

Les PLA<sub>2</sub> myotoxiques peuvent être douées d'activité phospholipasique ou en être dépourvues, (Kini et Iwanaga., 1986 ; Johnson et Ownby, 1993 ; Fuly et *al*, 2000). Elles possèdent des résidus très conservés au niveau du site actif ( His 48, Asp 49, Tyr 52 et Asp 99). Le résidu Asp 49, se lie au Ca<sup>++</sup> ; Cette liaison est indispensable à l'activité catalytique de la PLA<sub>2</sub> (Ward et *al*, 1998).

D'autres PLA<sub>2</sub> présentent une substitution de Asp 49 au niveau du site actif par une Lysine ou une Serine. Cette substitution empêche la fixation du Ca<sup>++</sup>, entraînant ainsi la perte de l'activité phospholipasique, alors que l'activité myotoxique est conservée, (Lomonte et *al* ; 1990 ; Francis et *al*, 1991 ; Ward et *al*, 1998 ; Angulo et *al*, 2001), (Figure 6)



**Figure 5:** Mécanisme d'action des polypeptides myotoxiques

(Gutiérrez et Lomonte, 1995; Angulo et *al*, 1997; Boer-Lima et *al*, 1999; Harris et *al*, 2000)

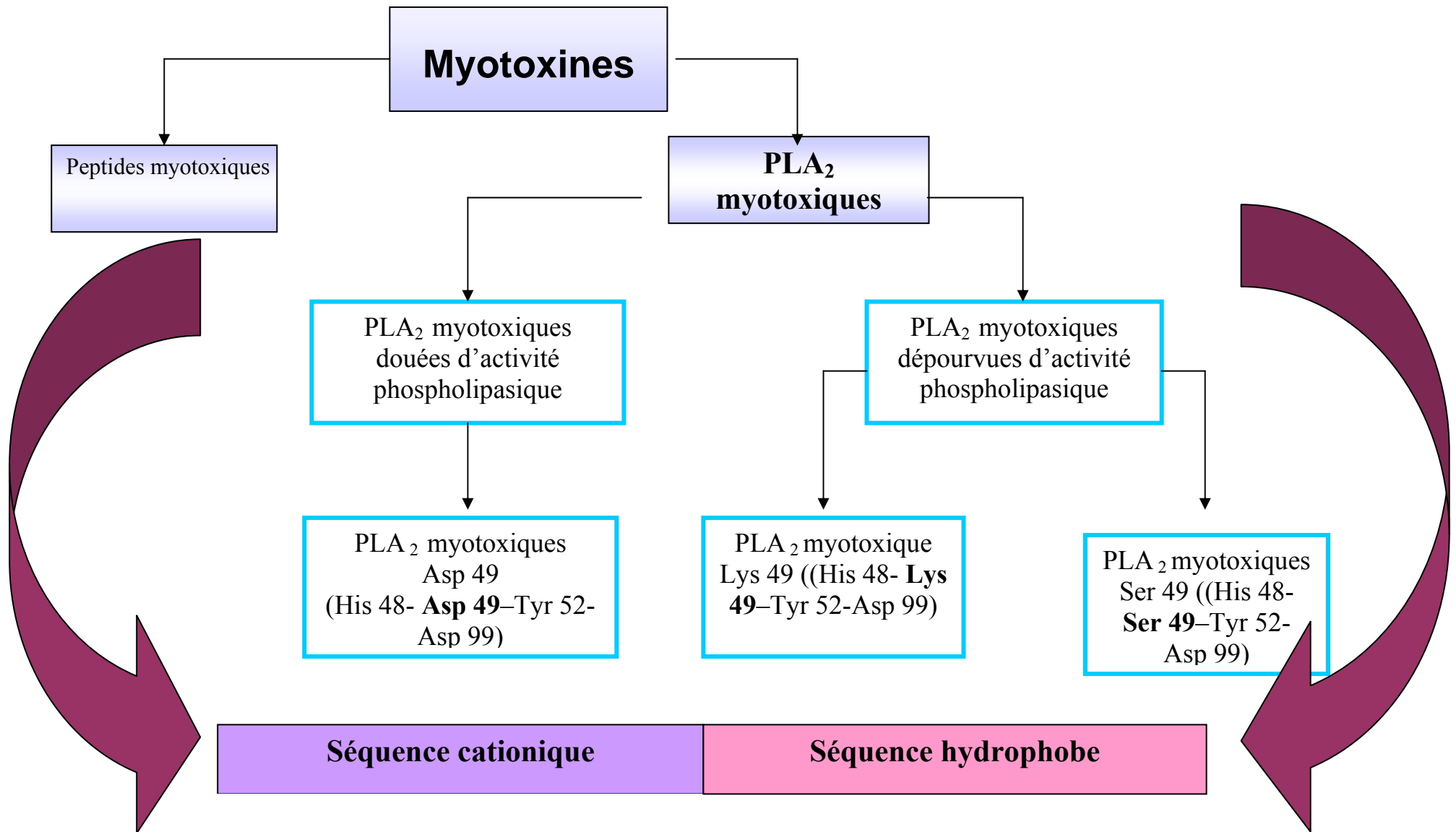


Figure 6 : Classification des myotoxines (Kini et Iwanaga., 1996; 1986; Lomonte et al., 1999; Angelo et al ., 2001; Fuly et al, 2000)

## 1.6. Symptômes d'envenimation vipérine

Les symptômes d'envenimation par les *Viperidae* varient chez l'homme, selon la quantité de venin injectée, du site d'injection, de l'âge, de la taille et de la réaction particulière de chaque individu. Dans l'envenimation par *Cerastes cerastes* l'œdème apparaît presque immédiatement après la morsure et s'étend de manière loco – régionale, suivi d'une douleur intense et persistante à la surface des lésions ecchymotiques, puis apparaît une blessure suintante et une nécrose localisée au niveau du site de morsure (M. Lifshitz et *al.*, 2002).

Les victimes souffrent d'agitations, d'angoisse, de sensation nauséuse et de vomissements, d'hémorragie, d'une accélération du rythme cardiaque pouvant évoluer vers un collapsus, une détresse respiratoire et une insuffisance rénale (Serve., 1992; Gutierrez et *al.*, 1996).

La cause principale des décès par morsures de serpents est due soit à une coagulation intra vasculaire pulmonaire, soit à un œdème pulmonaire ou à des troubles cardiovasculaires. (Laraba-Djebari., 1996).

Une classification des manifestations cliniques suite aux morsures a permis de grader les envenimations (Tableau VII).

**Tableau VII: Evaluation clinique de la gravité d'une envenimation Vipérine**

(Audebert et al,1993; 1994; Mion et al, 2002)

Grade	Envenimation	Symptomatologie	Taux de venin sérique (ng/ml)
0	Absente	Traces de crochets au niveau de la morsure, pas d'oedème ni de réaction locale ou systémique	$1 \pm 0,3$
1	Minimale	Oedème local, pas de symptômes systémiques	$5 \pm 1,8$
2	Modérée	Oedème régional douloureux, apparition d'ecchymoses,ou signes généraux modérés( hypotension, vertiges, vomissements, diarrhée,...)	$32 \pm 7$
3	Sévère	Oedème extensif au- de là de la racine du membre, ecchymoses pouvant être généraliser, apparition de nécrose cutanée, hypotension prolongée et manifestations systémiques (asthénie, vertiges,vomissements, transpiration, syndrome hémorragique, crampes musculaires douloureuses, convulsions et coma).	$126 \pm 50$

## **1.7. Physiopathologie des envenimations vipérines**

L'envenimation vipérine est caractérisée par l'apparition d'un œdème extensif, d'un syndrome inflammatoire, d'une nécrose évolutive et d'un syndrome hémorragique dont le traitement spécifique est l'immunothérapie; Elle est souvent associée à un traitement symptomatique notamment un anti- inflammatoire.

### **I.7.1. L'œdème inflammatoire provoqué par les venins de serpents**

L'œdème est une rétention pathologique de liquide dans les tissus de l'organisme en particulier dans le tissu conjonctif. Il est souvent accompagné d'une sensation de fatigue et se manifeste par un gonflement de la peau et des tissus sous jacents entraînant des dommages dans les parois des capillaires, une dégénérescence du tissu musculaire, particulièrement du tissu conjonctif qui peut évoluer en nécroses sévères (Gutierrez et *al.*, 1996).

L'œdème est la conséquence de la libération d'agents vasoactifs : histamine, sérotonine, bradykinine, prostaglandines et leucotriènes ( De Moura et *al.*, 1998).

Afin de diminuer la réaction inflammatoire extensive, il est préconisé d'administrer des anti-inflammatoires qui pourraient inhiber la synthèse des prostaglandines ( De Moura et *al.*, 1998).

### **I.7.2. L'hémorragie**

L'hémorragie est une conséquence fatale de l'envenimation vipérine. Les processus modulants sa survenue sont complexes en raison d'interaction fréquente et contradictoire des constituants du venin (Chippaux., 1999).

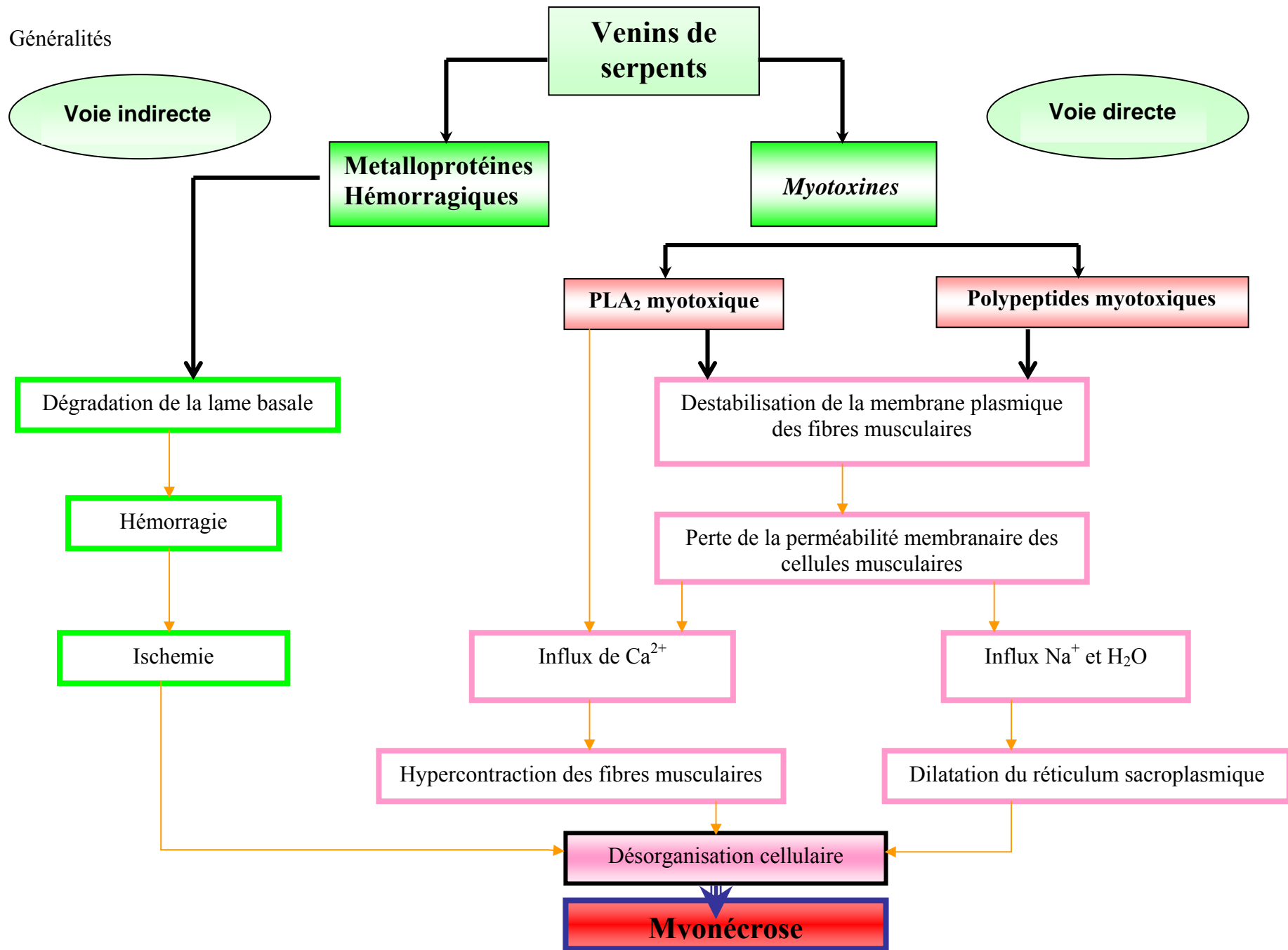
Les facteurs responsables de l'hémorragie sont des métallo protéinases à zinc, elles dégradent les constituants de la matrice extra-cellulaire. (Gutierrez et Rucavado., 2000).

L'hémorragie peut être provoquée également par les PLA2 myotoxiques qui hydrolysent les phospholipides membranaires, induisant la lyse cellulaire(Ownby et *al.*, 1998).

### **I.7.3. L'effet myonécrotique**

Après inoculation de venin, le muscle strié se nécrose et ses noyaux deviennent pycnotiques puis disparaissent. D'après les études histologiques effectuées par Ownby et Colberg en 1988, suite à une envenimation ophidienne, il existe 3 types de myonécroses :

- Une myonécrose myolytique où les cellules sont lysées en absence d'hémorragie (le terme myolytique est attribué à un état initial des cellules endommagées par les toxines)
- Une nécrose coagulative : qui est caractérisée par des cellules endommagées qui ont un aspect hyalin, amorphe accompagné d'une hémorragie (Ownby et Colberg., 1988).
- Une nécrose mixte : dans ce cas, le tissu affecté présente une hémorragie, qui est induite notamment par les venins des *Viperidae* essentiellement hémorragiques et nécrosants (Figure 7).



**Figure 7 :** Effet myonécrotique lors d'une envenimation ophidienne induit par différents facteurs ; les myotoxines ; les metalloprotéines hémorragiques. (Ownby et al, 1990; Gutierrez et Lomonte., 1995; Mandelbaum., 1990; Harris et al., 2000) (effet direct, effet intermédiaire, effet définitif, correspond respectivement à :



## **I.8. La réponse inflammatoire**

L'inflammation est un mécanisme de défense de l'organisme contre les agents pathogènes, c'est une réponse protectrice, immédiate et précoce du tissu lésé pour la reconstitution de ses fonctions normales.

L'inflammation est caractérisée par une augmentation de la perméabilité vasculaire, la formation d'œdème, une vasodilatation, une migration leucocytaire de la microcirculation vers les tissus lésés, une production accrue de cytokines pro et anti inflammatoires et une douleur locale.

### **I.8.1. La Migration leucocytaire**

Durant la phase aigue de l'inflammation, les neutrophiles sont les premières cellules à s'accumuler dans les tissus (Ryan et Majno., 1977).

Le recrutement des neutrophiles est médié par des facteurs chimiques plasmatiques (complément, kinines et protéines dérivées du système de coagulation), ou des médiateurs chimiotactiques cellulaires (eicosanoides comme les leucotriènes, les cytokines, les chemokines, l'histamine et la sérotonine), (Teixeira et *al.*,2003).

Le processus de chimiotactisme est suivi d'une phagocytose par des cellules compétentes. (Garcia-Leme et *al.*, 1973 ; Ryan et Majno, 1977 ; Granger et Kubes, 1994 ; Springer, 1994). Durant ce processus le phagocyte augmente sa consommation d'oxygène qui sera utilisé par le système NaDPH-oxidase dans la production d'anion super oxyde (NO) et de peroxyde d'oxygène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) qui vont dégrader le matériel ingéré. (Babior., 1999,2004 ; Babior et *al.*, 2002).

Le neutrophile subit alors l'apoptose et est ingéré par les macrophages (Greenberg., 1999 ; Aderen et Underhill, 1999).

### **I.8.2. La production de Cytokines**

Certaines cytokines pourraient jouer un rôle majeur dans la physiopathologie des altérations systémiques induites par les venins de serpents (Petricevich et *al.*,2000).

Les cytokines sont des protéines de faible poids moléculaire. Elles jouent un rôle dans les interactions cellulaires et permettent l'activation de différents systèmes, en interagissant avec des récepteurs membranaires spécifiques présents à la surface des cellules cibles ( Janeway et *al.*, 2003 ; Arend et Gabay, 2004). Ils sont impliqués dans l'inflammation et les phénomènes immuns (Sunday et *al.*, 1999). Ce sont des médiateurs de toutes les phases du processus inflammatoire.

Les cytokines sont synthétisées par des cellules immunes et non immunes en réponse à un stimulus par des agents environnementaux ou inflammatoires.

L'IL-1 est produite par les monocytes/macrophages, mais également par d'autres cellules. Cette cytokine joue un rôle majeur dans l'induction des réactions inflammatoires et des protéines de la phase aigue de l'inflammation. Elle est considérée, ainsi que l'IL-6, comme une cytokine pro inflammatoire ( Simons et Hoyt., 1994).

L'IL-1 et l'IL-6 sont impliquées dans l'induction de l'expression des molécules d'adhésion et la libération de médiateurs chimiotactiques par les leucocytes. Un taux élevé d'IL-1 pourrait entraîner des perturbations systémiques tels que le choc septique et la mort (Martin et *al.*, 1994) (Tableau VIII).

## Généralités

l'IL-1 agit en synergie avec le TNF- $\alpha$  sur les hépatocytes, les fibroblastes et les cellules endothéliales, en induisant la production de médiateurs pro inflammatoires tels que les prostaglandines, les leucotriènes, le PAF, le NO et le SIRS (Syndrome systémique de la réponse inflammatoire) (Amaral et Rezende., 1997; D'Suze et *al*, 1999; 2003) (Tableau VIII).

L'IL-6 est sécrétée par la plupart des cellules, en particulier les cellules mésenchymateuses. L'IL-1 et l'IL-6 induisent la fièvre, stimulent la production des protéines de la phase aigue par les hépatocytes et l'activation des cellules T et B ainsi que la migration leucocytaire. (Suwa et *al.*, 2002) (Tableau VIII)

Les cytokines anti-inflammatoires dont l'IFN -  $\gamma$  et l'IL-10 modulent négativement la réponse inflammatoire; Ces cytokines activent les macrophages dans les réponses immunitaires à médiation cellulaire.

Elles inhibent la libération des cytokines pro inflammatoires et l'expression des enzymes ( impliquées dans la sécrétion des médiateurs inflammatoires) comme la cyclo - oxygénase 2 et la NO synthase. Howard et O'Garra ont montré que l'elevation de l'IL-10 dans l'inflammation ou le syndrome systémique de la réponse inflammatoire (SIRS). Contribuait au rétablissement de l'homéostasie(Howard et O'Garra., 1992), (Tableau VIII).

Tableau VIII: Principaux effets de certaines cytokines, leurs sources et cibles cellulaires (Male,1992)

<b>Cytokines</b>	<b>Sources cellulaires</b>	<b>Cibles cellulaires</b>	<b>Principaux effets</b>
<b>IL - 1<math>\alpha</math></b>	Macrophages, cellules épithéliales, cellules B et T	Cellules T et B, hépatocytes, macrophages, lymphocytes et cellules endothéliales	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Expression des molécules d'adhérence</li> <li>• Libération des médiateurs chimiotactiques</li> <li>• Costimulation des lymphocytes</li> </ul>
<b>IL - 1<math>\beta</math></b>	Macrophages, cellules épithéliales, cellules T	Cellules T et B et de nombreuses autres cellules	
<b>IL - 6</b>	Cellules T, fibroblastes et monocytes, cellules endothéliales	Cellules T et B et hépatocytes	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Médiation cellulaire et humorale de la réponse immunitaire.</li> <li>• Synthèse des protéines de la phase aigue.</li> </ul>
<b>IL - 10</b>	Cellules Th2	Cellules Th1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibition de la synthèse des cytokines pro inflammatoires</li> </ul>
<b>IFN - <math>\gamma</math></b>	Cellules Th1	Cellules B, NK et macrophages	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Favorise la cytotoxicité des cellules NK.</li> </ul>

## **I.9. Variation du métabolisme enzymatique**

Le déroulement harmonieux des processus métaboliques n'est possible que parce que chaque cellule dispose de son propre capital enzymatique génétiquement déterminé. Les enzymes existent en faible concentration dans le sérum d'un sujet sain. Dès que le tissu ou organe subit un stimulus (inflammation, infection, nécrose, ...), les enzymes présentes dans les cellules de ce tissu, franchissent les parois cellulaires passent dans les liquides interstitiels puis dans le sérum. Il en résulte une augmentation sérique de cette enzyme parallèle à sa diminution tissulaire. Ce phénomène pathologique est la conséquence :

- D'une Cytolyse qui entraîne l'apparition brusque et importante des enzymes dans le milieu sanguin.
- D'une modification métabolique qui se traduit par l'accroissement de la synthèse enzymatique, entraînant forcément l'augmentation de son passage transmembranaire.

### **I.9.1. Les Transaminases**

Les transaminases catalysent le transfert d'un groupement amine ; Il en existe 2 types :

#### **I.9.1.1 Transaminase glutamique oxaloacétique (TGO) EC.2.6.1.1.**

Cette enzyme également appelée aspartate aminotransférase est présente dans le foie, le rein et les muscles squelettique et cardiaque. Son augmentation sérique est la conséquence d'une atteinte du système cardio-vasculaire ou du muscle squelettique ou d'une lésion hépatique, son dosage n'est donc significatif que lorsqu'elle est associée à d'autres examens.

#### **I.9.1.2 Transaminase glutamique pyruvique (TGP) EC.2.6.1.2**

Elle est également appelée alanine aminotransférase. Sa concentration hépatique et très élevée, elle est également retrouvée dans le rein, les muscles squelettique et cardiaque mais en faible concentration. Les affections hépatiques entraînent son passage dans le sérum.

#### **I.9.1.3 La lactate déshydrogénase (LDH) EC.1.1.1.2.7.**

C'est une enzyme tetramérique à  $\text{NAD}^+$  qui possède 5 iso-enzymes, qui se retrouvent dans tous les organes à différentes concentrations. En raison de son ubiquité, son dosage n'a de valeur diagnostique qu'associé à d'autres enzymes.

#### **I.9.1.4 La Créatine Kinase (CK) EC 2.7.3.2.**

La créatine kinase ou ATP créatine N-phosphotransférase est une enzyme essentielle du métabolisme énergétique, et est une enzyme clé du métabolisme musculaire. Il existe 3 iso-enzymes : CKMB à prédominance myocardique, CKMM surtout musculaire et CKBB cérébrale.

L'augmentation de son activité sérique pourrait être physiologique ou pathologique. En effet, elle augmente avec l'effort musculaire, après une électrostimulation ou même une simple injection intra musculaire. Son augmentation pathologique est successive à une

myopathie, un infarctus du myocarde, des désordres cérébraux vasculaires ou à des lésions musculaires..

## I.10. Modifications histologiques

Les venins de serpents provoquent des altérations physiologiques pouvant être déterminées par une approche histologique du tissu lésé.

### Rappels anatomo- histologiques

#### I.10.1 Le Muscle Squelettique

Le muscle squelettique est formé de fibres musculaires de 10 à 100  $\mu\text{m}$ . Il se divise en deux parties :

- Le corps : C'est la partie centrale, contractile, de couleur rouge rosée.
- Les tendons : situés aux extrémités des muscles d'apparence blanche, peu extensibles, ils sont fixés aux os et ou au tissu conjonctif.

Le muscle squelettique est recouvert dans son ensemble par une couche de tissu connectif ; **l'épimysium**. Lorsque cette couche pénètre dans le muscle ; on l'appelle **perimisium**. Ce dernier divise le muscle en plusieurs fascicules; chacun d'eux contient entre 20 et 40 fibres musculaires qui sont séparées les unes des autres par l'**endomysium**.

Les vaisseaux sanguins et les nerfs pénètrent dans l'epimisium puis se ramifient à l'intérieur du perimisium et de l'endomysium (Wheater., 2001 ).

La fibre musculaire possède une paroi; Le **sarcolemme** ; Cette membrane se compose de la lame basale et de la membrane plasmique.

Les fibres musculaires sont des cellules cylindriques non anastomosées, plurinucléées; les noyaux sont placés en périphérie de la fibre, immédiatement contre la face interne du sarcolemme

Les fibres contiennent dans leur sarcoplasme des myofibrilles qui sont constituées chacune de deux types de filaments :

- Les filaments épais constitués de myosine.
- Les filaments fins constitués d'actine.

Une des extrémités des filaments fins est fixée à une structure protéique perpendiculaire à leur axe: la bande **Z** .

La distance entre deux bandes Z délimite l'unité fonctionnelle du muscle ; le **sarcomère** .

Le muscle squelettique est doué de la propriété de se contracter et de se décontracter .

#### I.10.2. Le Muscle Cardiaque

Le cœur est un organe creux mû par un muscle le myocarde. La paroi du cœur est composée de trois couches distinctes ;

- Epicarde (**epicardium**) qui se compose de cellules épithéliales et de tissu conjonctif ; C'est le feuillet viscéral du péricarde séreux.

- Myocarde; le plus épais ; ou muscle cardiaque est constitué de cellules musculaires anastomosées riches en mitochondries. Les fibres musculaires cardiaques striées et ramifiées sont de longues cellules cylindriques renfermant un ou deux noyaux ovoïdes et centraux. Le myocarde est à l'origine des contractions du cœur.

- Endocarde (**endocardium**) ; Il se trouve à l'intérieur du myocarde ; C'est une couche additionnelle de cellules épithéliales et de tissu conjonctif (Tortora.,1988 ).

## **I.11. Traitement des envenimations**

### **I.11.1. Immunothérapie**

Un siècle après sa découverte par Albert Calmette en 1894, l'immunothérapie antivenimeuse demeure l'unique thérapeutique spécifique et efficace de l'envenimation grave, particulièrement lorsque les possibilités de traitements symptomatiques sont restreintes, (Chippaux et Goyffon., 1998).

L'immunothérapie consistait, alors, en l'injection de sérums préparés à partir d'animaux hyper immunisés avec le venin.

Les sérums ont été purifiés de façon à n'injecter que la fraction neutralisante, il s'agissait des Ig G.

Actuellement les antivenins sont sous forme de fragments  $F(ab')_2$  obtenus après digestion de l'Ig G par la pepsine, ou de fragments  $F(ab)$  qui sont obtenus après traitement de l'immunoglobuline par la papaïne pour éliminer le fragment Fc (Rivière et Bon., 1999).

Les anticorps peuvent être dirigés soit contre le venin d'une seule espèce (sérum mono spécifique ou monovalent), soit contre plusieurs espèces (sérum polyvalent).

En Algérie, le sérum antivipérin utilisé est un sérum bivalent constitué de  $F(ab')_2$  équins anti *Cerastes cerastes* et anti *Vipera lebertina* produit par l'institut Pasteur d'Algérie.

### **I.11.2. Traitement symptomatique**

L'immunothérapie est souvent associée à un traitement symptomatique visant à corriger les altérations physiologiques causées par l'envenimation.

Ce traitement consiste en l'administration d'analgésiques périphériques (agissant à l'endroit de la douleur) et parfois il faut recourir à des analgésiques centraux lorsque la douleur est intense, un traitement anxiolytique (Audebert., 1993), une corticothérapie, des antiallergiques (adrénaline), des anticonvulsants, des anti émétiques et des anti-pyrétiques.

## **I.12. Mécanisme d'action des Anti inflammatoires Stéroïdiens**

Les venins de serpents induisent une réaction inflammatoire qui implique l'intervention de plusieurs facteurs de l'inflammation. Afin de cibler ces médiateurs, il est préconisé d'utiliser des anti inflammatoires caractérisés par leur capacité de diminuer la réaction inflammatoire au stade aigu ou chronique.

### **I.12.1. L'Hydrocortisone**

L'Hydrocortisone est un anti inflammatoire mixte agissant au stade primaire, secondaire et en phase aigue de l'inflammation. C'est un glucocorticoïde qui bloque la réaction inflammatoire en inhibant l'augmentation de la perméabilité capillaire, ce qui conduit à une regression de l'œdème et une diminution de la libération de diverses substances vasoactives dans les tissus (Rossier.,1989).

## Généralités

L'Hydrocortisone diminue l'adhésion des macrophages et des granulocytes à l'endothélium lésé. Il inhibe la production de facteurs chimiotactiques qui favorisent la migration leucocytaire.

Le complexe Hydrocortisone – Récepteur formé dans le cytoplasme neutralise en outre le NF- $\kappa$ B activateur de la transcription des gènes à l'origine des molécules pro inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-2, cyclooxygénase 2 )et de facteurs d'adhésion, ICAM (intercellular adhesion molecule) (Flower et Blackwell., 1979 ;Flower et Rothwell, 1994; Ferreira et *al*, 1997). Ce complexe neutralise partiellement la protéine AP-1 ; formée à partir des protéines Fos et Jun activatrice de la transcription de plusieurs gènes impliqués dans la synthèse des protéines pro inflammatoires.

En plus de son effet anti inflammatoire , l'hydrocortisone présente un effet anti allergique, immuno suppresseur, hyper glycémiant, minéralocorticoïde et favorise l'augmentation du calcium intra cellulaire, (Allain., 2005).

### I.12.2. Mécanisme d'action de l'Hydrocortisone

L'Hydrocortisone augmente la synthèse de la lipocortine; une protéine qui a la capacité de se lier aux phospholipides membranaires et de sequestrer le calcium. De ce fait, elle inhibe la PLA2 (responsable de la libération de l'acide arachidonique à partir des phospholipides membranaires; Ce qui induit la réduction de la synthèse des prostaglandines, thromboxanes, leucotriènes et du PAF.

### I.12.3. Autres traitements

Actuellement de nouvelles stratégies de recherches apparaissent dans la thérapeutique de l'envenimation; Il s'agit de protéines isolées à partir de sérum de serpents venimeux et non venimeux, de mammifères et de plantes ayant des propriétés inhibitrices de certains effets du venin.

- DM 64 est une protéine anti myotoxique isolée à partir du sérum de l'opossum.(Mélo et Suarez-Kurtz., 1988).

- WSG est extraite d'une plante *Withania somnifera*, son effet myotoxique est dirigé contre NNXIa –PLA2 du venin de *Naja naja* .(Rocha et *al.*, 2002).

- Bm;MIP PLI $\alpha$ , inhibiteur est de type  $\alpha$ , il est isolé à partir du plasma de *Bothrops moojeni* et inhibe l'activité PLA $_2$  de la même espèce (Soares et *al.*, 2003).

Ces protéines semblent être considérées comme une alternative pour le traitement des morsures de serpents mais aussi comme un antagoniste potentiel de l'activité des PLA $_2$  associée au processus inflammatoire chez l'humain.

### I.13. Cristallisation des PLA<sub>2</sub>

L'élucidation de la structure tridimensionnelle par cristallisation et par diffraction aux rayons X est en progrès permanent. Elle apporte des informations susceptibles d'être utilisées pour comprendre le rapport structure / fonction de la PLA<sub>2</sub> (Bortoleto et al., 2002).

Cette structure a été déterminée pour de nombreuses phospholipases tels que :

- Les PLA<sub>2</sub> [Asp 49] du groupe I : isolée du venin de *Naja najes atra* (Scott et al., 1990), celle isolée à partir du venin de *Naja naja naja* (Fremont et al., 1993) et de *Notechis .s. scutatus* (Westerlund et al., 1992).

- Les PLA<sub>2</sub> du groupe II catalytiquement actives [Asp 49] du venin de *Crotalus atrox* (Brunie et al., 1985); les PLA<sub>2</sub> du venin de *Agkistrodon halys blomhoffii* (Tomoo et al., 1994); PLA<sub>2</sub> du venin de *T. flavoviridis* (Suzuki et al., 1995), celles de *A. halys pallas* (Wang et al., 1996b) et les PLA<sub>2</sub> purifiées à partir de *Deinagkistrodon acutus* (Gu et al, 2002).

De même pour les PLA<sub>2</sub> du groupe II qui sont catalytiquement inactives [Lys 49]. Hollande et al en 1990 ont déterminé la structure cristallographique de la PLA<sub>2</sub> du venin d'*Agikostodon piscivorus piscivorus* (Hollande et al., 1990 ; Scott et al, 1992) et celle de *Bothrops asper* fût déterminée par Arni et al en 1995.

Les PLA<sub>2</sub> [Asp 49] du groupe I ont une structure monomérique. Certaines PLA<sub>2</sub> du groupe II comme la PLA<sub>2</sub> [Asp 49] de *C.atrox*, celle de *T. flavoviridis* , la myotoxine II ; PLA<sub>2</sub> [Lys 49] de *Bothrops asper* et la PLA<sub>2</sub> acide [Asp 49] PLA<sub>2</sub> de *D. acutus* sont dimériques.

Quand bien même les PLA<sub>2</sub> soient de différentes origines, leurs monomères seraient analogues du point de vue structural. (Ohno et al., 2003).

## **II. Matériel et méthodes**

### **II.1 Matériel**

#### **II.1.1 Matériel biologique**

##### **II.1.1.1 Le venin**

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

##### **II.1.1.2 Les souris**

Les souris blanches de race N'MERY ( $20 \pm 2$  g), sont fournies par l'animalerie de l'Institut Pasteur d'Algérie (annexe de kouba).

##### **II.1.1.3 Les rats**

Les rats wistar ( $120 \pm 20$  g), sont fournis par l'animalerie de l'Institut Pasteur d'Algérie (annexe de kouba ).

##### **II.1.1.4 la Lécithine**

La lécithine est extraite à partir d'un jaune d'œuf frais.

##### **II.1.1.5 Les globules rouges**

Les globules rouges sont obtenus à partir de sang de moutons sains, il est prélevé sur citrate trisodique 0,13 M; fourni par l'Institut Pasteur d'Algérie (Annexe de kouba).

#### **II.1.2. Produits chimiques et réactifs**

Les produits chimiques et réactifs proviennent de différentes firmes. Ils sont fournis par le Laboratoire de Recherche et de Développement sur les Venins de l'Institut Pasteur d'Algérie et par le Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire de la FSB de l'USTHB.

**Sigma** : Hématoxyline, Eosine, OPD

**Merck** : Tris HCl, Acétate d'ammonium, Ethanol, Toluène, Glycérol, Phosphate mono et bipotassique, SDS, Méthanol, Acide acétique, Bleu de bromophénol, Bleu de coomassie, Acrylamide, bisacrylamide, Formol, Chlorure de potassium.

**Labosi** : Acide chloridrique, Soude

**Panréac** : Paraffine, Acide picrique, Eukitt, Isopropanol

**Pharmacia biotech:** les gels Sephadex G-75, DEAE-Sephadex A-50 et CM Sephadex-C-50.

**Prolabo :** HCl, Ammoniaque, NH<sub>4</sub> Sulfate.

**Amersham Biosciences :** les cytokines (IL1- $\alpha$  ; IL1- $\beta$  ; IL-6 ; IL10 et IFN- $\gamma$ ).

**Roche :** les réactifs pour le dosage des enzymes (CK ; LDH ; TGO ; TGP)

## II.2 Méthodes

### II.2.1 Fractionnement du venin de *Cerastes cerastes* par chromatographie d'exclusion moléculaire sur Sephadex G-75

La filtration moléculaire permet la séparation des molécules selon leur taille. Les molécules de haut poids moléculaire sont éluées en premier tandis que les molécules de faible poids moléculaire pouvant s'introduire dans les pores du gel sont éluées par ordre décroissant. Le Sephadex G-75 est préalablement gonflé dans un tampon acétate d'ammonium 0,1 M; pH 8,5, filtré et équilibré à pH8,5. Le venin de *Cerastes cerastes* (1g) est déposé à la surface du gel. L'échantillon est élué à l'aide d'un débit de 18 ml/h avec un tampon d'acétate d'ammonium 0,1 M; pH 8,5. La lecture de l'absorbance des éluats est effectuée à 280 nm. Les fractions qui révèlent une activité phospholipasique sont rassemblées et lyophilisées.

### II.2.2 Mise en évidence de l'activité phospholipasique

L'activité phospholipasique est déterminée selon la méthode d'hémolyse indirecte des globules rouges de Cesari et Boquet (1935) modifiée par Laraba-Djebari et Martin Eauclaire (1990) . Le sang de mouton prélevé sur un tampon citrate trisodique 0,13M; pH 4 est centrifugé à 2000 g pendant 10 minutes. Les globules rouges récupérés subissent plusieurs lavages avec une solution de NaCl à 0,9 % puis une centrifugation à 4000 g pendant 20 minutes. La lécithine à 1% est reconstituée dans un tampon phosphate 0,13M; pH 7 et préincubée à 37°C pendant 30 minutes.

Dans une série de tubes, les échantillons de venin et des fractions (0,010UDO) issues de la filtration moléculaire (G-75 ) sont mis en solution dans un tampon phosphate 0,13M; pH 7 avec un volume de 500  $\mu$ l de lécithine. Après incubation du mélange réactionnel à 37°C pendant 1 heure, un volume de 1 ml de globules rouges préalablement dilués au 1/20 (540nm = 0,996) est ajouté dans chaque tube et mis à incuber à 4°C pendant 30 minutes. Les différents échantillons et témoin sont centrifugés à 4000 g pendant 15 minutes. La présence ou l'absence d'hémolyse des globules rouges est alors observée à l'œil nu.

## **II.2.3 Détermination de l'activité myotoxique du venin et des fractions chromatographiques ; par détermination du taux de Créatine Kinase dans le sérum et les muscles cardiaque et squelettique**

L'activité myotoxique est déterminée par le dosage de la Créatine Kinase dans le sérum et dans les homogénats de cœur et de muscle squelettique. Le venin et sa fraction GF2 correspondant à (0,010 UDO) est injectée à des souris soit par voie intramusculaire pour le muscle soit par voie intrapéritonéale pour le cœur. Les animaux sont sacrifiés après 3 heures d'envenimation. Le sang, le cœur et le muscle squelettique sont prélevés. Après homogénéisation des organes (cœur et muscle), le sang et les homogénats sont centrifugés à 2400 g pendant 10 minutes. Le sérum et les surnageants obtenus seront utilisés pour le dosage enzymatique de la Créatine Kinase .

### **II.2.3.1 Dosage de la créatine phosphokinase**

Le dosage de la Créatine Kinase est réalisé selon le protocole du fournisseur Roche sur un automate « INTEGRA 400 ».

A un volume de 20 µl d'échantillon (sérum, homogénats de muscles cardiaque ou squelettique) sont ajoutés 100 µl de réactif de CK. Après une incubation de 3 min à 37°C une première lecture de l'absorbance est effectuée à 340nm. Après une deuxième incubation de 2 min, une autre lecture est effectuée. La variation moyenne de DO/min est déterminée. L'activité CK en UI/L est calculée en multipliant la  $\Delta$  DO/min par un coefficient égal à 107.

## **II.3 Purification**

### **II.3.1 Purification de la fraction GF2 issue de la gel filtration par chromatographie échangeuse de cations sur CM-Sephadex C-50**

La chromatographie échangeuse d'ions a pour principe la fixation d'un soluté sur un support rendu actif par la présence de sites ioniques : les échangeurs d'ions. Les supports chargés positivement échangent des anions alors que les supports chargés négativement échangent des cations.

La chromatographie échangeuse d'ions permet donc de séparer les protéines selon leur charge. Ces protéines sont liées de façon réversible à l'échangeur d'ions par des liaisons ioniques. Leur élution se fait soit par une augmentation progressive de la force ionique ou par variation du pH du tampon.

La fraction GF2 (PLA 2 myotoxique) (200 UDO) issue de la filtration moléculaire sur Sephadex G-75 est soumise à une chromatographie échangeuse de cations en utilisant un gel CM-Sephadex C-50. Le gel est préalablement gonflé dans un tampon acétate d'ammonium à 0,1M pH 8,5, dégazé, coulé dans une colonne de type Pharmacia (2,5 x 40cm) et équilibré à pH 8,5.

La fraction GF2 est éluée avec tampon acétate d'ammonium 0,1 M; pH 8,5. Après une première élution, un gradient de force ionique d'acétate d'ammonium 0,1- 0,5 M; pH 8,5 y est appliqué, suivi d'un tampon 2 M. Le débit est maintenu constant à 18 ml/heure.

Les DO sont lues à 280 nm puis les fractions collectées sont soumises aux tests d'activités phospholipasique et myotoxique .

### **II.3.2 Purification de la fraction issue de la CM-Sephadex-C-50 par chromatographie échangeuse d'anions sur DEAE-A-50**

La fraction CM-3 (40 UDO) issue de la CM-C-50 est soumise à une seconde purification en utilisant un échangeur anionique le DEAE-Sephadex A-50.

Le gel est gonflé, dégazé et équilibré avec un tampon acétate d'ammonium 0,1 M; pH 8,5 et coulé dans une colonne (1x10 cm).

Une première élution se fait avec le tampon précédemment cité, il est appliqué ensuite un gradient de force ionique d'acétate d'ammonium 0,1 - 0,5 M; pH 8,5, suivi d'une élution avec le même tampon à 2 M. La lecture des DO des éluats est effectuée à 280 nm et les fractions issues de cette chromatographie sont soumises aux tests d'activités phospholipasique et myotoxique.

### **II.3.3 Etude de l'homogénéité du venin et de ses fractions par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodecyl sulphate de sodium (SDS-PAGE)**

L'électrophorèse est un procédé basé sur le déplacement des protéines en fonction de leur masse moléculaire, sous l'influence d'un champ électrique continu. La présence de SDS ( $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{11}\text{-SO}_3\text{Na}^+$ ), un agent dénaturant qui s'adsorbe sur les protéines leur cédant une charge négative. Ces dernières migrent alors en fonction de leur masse moléculaire (Hames *et al*, 2000; Weil, 2001).

Les échantillons (venin, fractions D1 et C2 ) sont mis en présence de SDS et de glycérol à 10 % et sont chauffés à 100°C pendant 5 minutes.

Après refroidissement, 0,01% de bleu de bromophénol est ajouté dans chaque échantillon. Les échantillons (0,020 UDO) sont ensuite déposés sur 1 gel de polyacrylamide à 15% selon (Laemmli 1970) .

A la fin de la migration, les échantillons et marqueurs de PM sont soumis à une coloration au bleu de Coomassie R 250 dissout dans l'isopropanol à 25% et l'acide acétique.

Les marqueurs de PM utilisés sont :

Phosphorylase b (94 kDa); Albumine (64 kDa); Ovalbumine ( 43 kDa); Anhydrase Carbonique (30kDa); Inhibiteur de la trypsine (20,1 kDa) ;  $\alpha$  - lactalbumine (14,4 kDa) .

La révélation des protéines se fait après décoloration dans des bains d'acide acétique à 1%.

La détermination des masses moléculaires est réalisée par extrapolation sur une courbe étalon  $R_f = f(\log M_m)$ .

## **II.4. Effet du venin de *Cerastes cerastes* et des fractions C2 et D1 sur les muscles squelettique et cardiaque**

L'étude physiopathologique des souris envenimées par le venin de *Cerastes cerastes* et par les fractions C<sub>2</sub> et D<sub>1</sub> sur le muscle squelettique et cardiaque permet de visualiser les altérations tissulaires et les perturbations enzymatiques survenues après injection de 2 doses sub-létale et DL50 correspondant respectivement à (25 et 50 µg) après 3 heures et 24 heures d'envenimation.

### **II.4.1. Effet du venin de *Cerastes cerastes* sur le muscle et le cœur**

10 lots de souris ont été utilisés pour cette étude; 4 lots ont reçu 2 doses: 25 et 50 µg par voie i.p. Un lot témoin a reçu 500 µl de NaCl 0,9%.

Les autres lots ont reçu un volume de 100 µl des 2 doses par voie i.m. Un dernier lot servant de témoin a reçu 100 µl de NaCl 0,9 %.

Les souris (5 lots) sont sacrifiées après 3 heures d'envenimation, les 5 lots de souris restants sont sacrifiées après 24 heures. Le sang et les organes sont prélevés pour des études biochimique (dosage des enzymes: CK ;LDH ; TGO ;TGP) et histologique pour les organes (cœur et muscle squelettique) .

### **II.4.2. Effet de la fraction chromatographique C2 sur le muscle squelettique et cardiaque**

Afin de mettre en évidence les effets histopathologiques induits par la fraction C<sub>2</sub>, 10 lots de souris ont été utilisés :

2 lots ont reçu une dose sublétale de la fraction C<sub>2</sub> par voie i.m.

2 lots ont reçu une dose létale par voie i.m.

1 lot témoin a reçu 100 µl de NaCl

Les 4 autres lots ont reçu respectivement : Une dose sublétale ,une dose létale par voie i.p. et le lot témoin a reçu 500 µl de NaCl

La moitié des souris des différents lots est sacrifiée après 3h d'envenimation; l'autre moitié après 24h.

Le sang et les organes sont récupérés et soumis à une étude enzymatique et histologique

### **II.4.3. Effets histopathologiques de la fraction D1**

L'étude des effets de la fraction purifiée D<sub>1</sub> sur le muscle squelettique et cardiaque a nécessité l'utilisation de 10 lots de souris répartis de la même façon que pour la fraction C<sub>2</sub>.

2 lots de souris ont reçu 25 µg de la fraction D<sub>1</sub>,

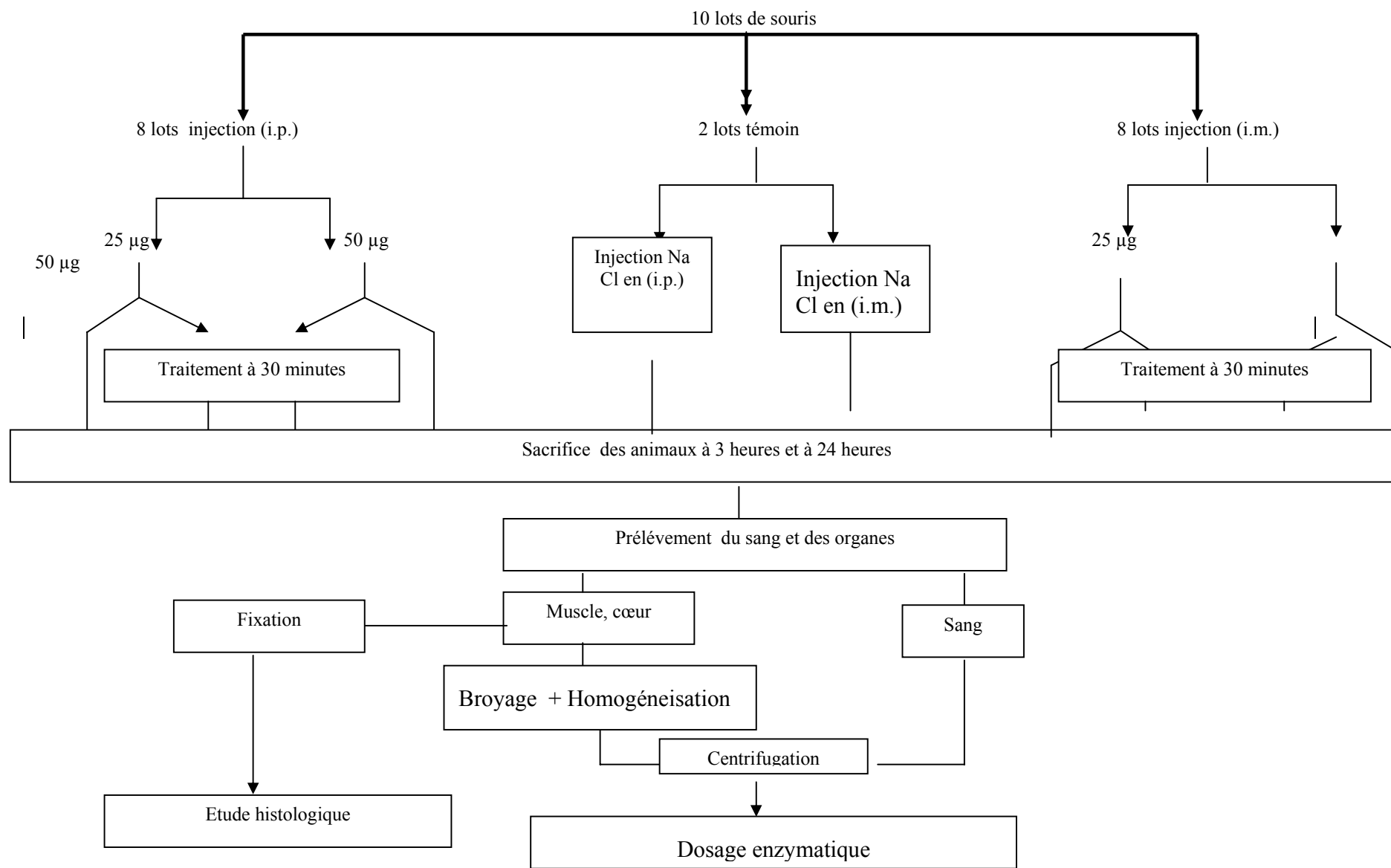
2 lots ont reçu 50 µg de cette fraction

1 lot témoin a reçu 500 µl de NaCl par voie i.p.

Les 4 lots restants reçoivent respectivement les mêmes doses par voie i.m et le dernier lot témoin a reçu 100 µl de NaCl 0,9 % .

Les animaux sont scarifiés après 3 heures et 24 heures d'envenimation.

Le sang et les organes sont prélevés pour des études biochimique (dosage des CK; LDH; TGO; TGP) et histologique pour les organes (cœur et muscle).



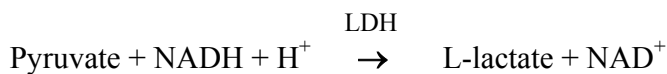
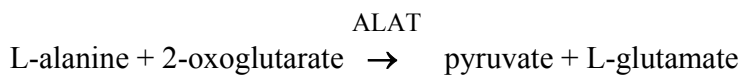
**Figure 9 :** Schéma récapitulatif du protocole expérimental de l'envenimation des souris avec le venin de *Cerastes cerastes* et ses fractions C2 et D1

#### II.4.4. Effet du venin et des fractions C<sub>2</sub> et D<sub>1</sub> sur les activités enzymatiques (CPK; LDH; TGO; TGP)

Parallèlement à l'étude histologique, un dosage des enzymes CPK, LDH, TGO et TGP est effectué sur le sérum et les homogénats de muscles squelettique et cardiaque. Ils sont centrifugés à 2000 g pendant 5 min; Le dosage est réalisé sur un automate « INTEGRA 400 » (Roche) selon la méthode préconisée par le fournisseur.

##### II.4.4.1. Activité de l'Alanine amino-transférase ( ALAT) (E.C. 2.6.1.2)

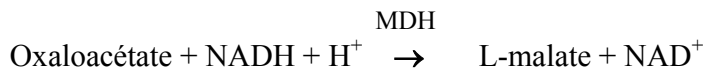
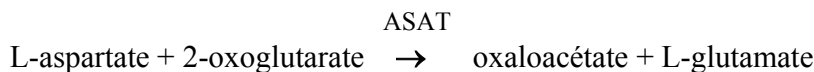
L'ALAT catalyse la réaction entre la L-alanine et le 2-oxoglutarate. Le pyruvate formé est réduit par le NADH, dans une réaction catalysée par la lactate-déshydrogénase (LDH), pour donner du L-lactate et du NAD<sup>+</sup>.



La vitesse d'oxydation du NADH est directement proportionnelle à l'activité de l'ALAT. L'activité est mesurée par la diminution de l'absorbance à 340 nm.

##### II.4.4.2. Activité de l'Aspartate amino- transférase (ASAT ) (E.C. 2.6.1.1)

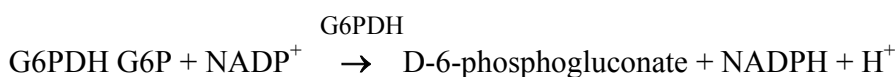
L'ASAT de l'échantillon catalyse le transfert du groupement amine entre le L-aspartate et le 2-oxoglutarate pour former de l'oxaloacétate et du L-glutamate. L'oxaloacétate réagit ensuite avec le NADH, en présence de malate-déshydrogénase (MDH), pour former du NAD<sup>+</sup> selon la réaction suivante :



La vitesse d'oxydation du NADH est directement proportionnelle à l'activité de l'ASAT, mesurée également selon la diminution de l'absorbance à 340 nm.

#### II.4.4.3. Activité de la Créatine -kinase ( CK ) (E.C. 2.7.3.2 )

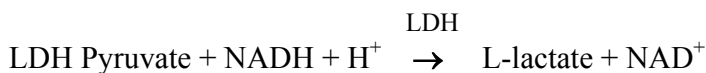
La CK est activée par la N-acétylcystéine (NAC). La CK activée commence par catalyser la déphosphorylation de la créatine- phosphate. Dans une réaction couplée catalysée par l'hexokinase (HK), le glucose est phosphorylé en D-glucose-6-phosphate (G6P) par l'ATP produit par la première réaction. Enfin, la glucose-6- phosphate déshydrogénase (G6PDH) catalyse l'oxydation du G6P par le NADP<sup>+</sup> en 6-phosphogluconate et en NADPH.



La vitesse de formation du NADPH est directement proportionnelle à l'activité catalytique de la CK. Elle se mesure par l'augmentation de l'absorbance à 340 nm.

#### II.4.4.4. Activité de la Lactate déshydrogénase ( LDH ) ( E. C. 1.1.1.27 )

La LDH catalyse la réaction entre le pyruvate et le NADH pour former le L-lactate et le NAD<sup>+</sup>.



La vitesse initiale d'oxydation du NADH est directement proportionnelle à l'activité catalytique de la LDH. Elle est mesurée avec la diminution de l'absorbance à 340 nm.

#### **II.4.5. Effet d'un anti-inflammatoire stéroïdien ; Hydrocortisone sur l'activité des enzymes CK, LDH, TGO et TGP**

Cette étude permet de déterminer l'effet d'un traitement symptomatique en absence de toute sérothérapie sur le métabolisme des activités des enzymes étudiées : TGO, TGP, CPK et LDH.

Après envenimation de 32 lots de souris avec 2 doses : 25 et 50 µg de venin, de la fraction C2 et de la fraction purifiée D1 ; L'hydrocortisone (10 mg /Kg) est administrée par voie intra musculaire à la moitié des souris 30 minutes après envenimation.

Le sacrifice des animaux est effectué après 3 heures et 24 heures d'envenimation, le sérum et les homogénats d'organes sont ensuite soumis aux dosages enzymatiques de la CK, LDH, TGO et TGP.

### **II.5. Etude de la réponse inflammatoire**

L'envenimation de rats avec le venin de *Cerastes cerastes*, la fraction chromatographique C2 et la fraction D1 provoquent des désordres physiologiques entraînant la libération de médiateurs inflammatoires tels que les eicosanoïdes et les cytokines.

#### **II.5.1 Dosage des cytokines IL1- $\alpha$ ; IL1- $\beta$ ; IL-10 ; IL-6 ; IFN- $\gamma$**

Le dosage des cytokines IL1- $\alpha$  ; IL1- $\beta$  ; IL-10 IL-6 et IFN- $\gamma$  a été réalisé après envenimation de 15 lots rats avec des doses sublétales de venin et de ses fractions C2 et D1.

Les rats (5 lots) ont reçu une dose sublétale de venin natif, 5 lots ont reçu une dose sublétale de C2 et les 5 autres une dose sublétale de la fraction purifiée D1, le dernier lot représentant le témoin a reçu un volume de 100 µl de NaCl 0,9 % par voie sous-cutanée. Les rats sont sacrifiés après 30 minutes, 3 heures, 6 h et 24 h d'envenimation. Le sang est récupéré pour le dosage des différentes cytokines.

Le dosage est effectué par un test ELISA sandwich ; ce test utilise des anticorps monoclonaux spécifiques qui captent les cytokines ; l'ajout d'anticorps biotylés permet d'augmenter l'affinité du complexe formé vis à vis de la streptavidine couplée à la peroxydase qui va quantifier ce complexe après addition du substrat chromogène.

Les micro plaques sont préalablement sensibilisées avec un anticorps anti-cytokines à doser notamment (-IFN- $\gamma$  ; IL1- $\alpha$  ; IL1- $\beta$  ; IL-10 ; IL 6).

Les étalons standards et les échantillons sériques sont déposés à raison de 50 µl par puits et en « duplicate ».

La microplaque est ensuite incubée à température ambiante pendant 1 heure.

Les anticorps biotylés sont déposés à raison de 50 µl par puits, la microplaque est réincubée pendant 1 heure dans les mêmes conditions que précédemment.

Après une série de lavages, 100 µl d'une solution contenant le conjugué (Streptavidine – HRP) sont déposés dans chaque puits, la microplaque est incubée de nouveau à 25° pendant 30 minutes.

La révélation de l'activité enzymatique est réalisée par l'addition du substrat spécifique à l'enzyme ; Le TMB (3-3',5-5'tetramethyl benzidine ) à raison de 100 µl par puits.

L'incubation se fait à l'obscurité pendant 30 minutes afin de permettre le développement de la réaction; Celle ci est arrêtée par addition de 100 µl d'une solution d'arrêt (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) dans chaque puits.

L'intensité de la réaction est mesurée à 450 nm, elle est directement proportionnelle à la quantité de cytokines présentes dans les échantillons et standards.

Les différentes étapes de la réaction sont communes pour le dosage de toutes les cytokines sauf pour l'IL1-α, où les anticorps biotinylés sont incubés pendant 2 heures avec les échantillons et standard.

**Tableau IX : Gamme des étalons standards des cytokines et seuil de sensibilité du test ELISA**

Cytokines	Seuil de détection (pg/ ml)	concentration des cytokines de la gamme étalon (pg/ml)
Il - 1α	< 15	0 - 51,2 - 128 - 320 - 800 - 2000
Il- 1β	12	0 - 25,6 - 64- 160 - 400-1000-2500
Il - 6	< 16	0 - 31 - 125 - 250 - 500 - 1000- 2000
Il-10	< 3	0 - 16 -31 - 62 - 125 - 250 -500
IFN - γ	< 2	0 -7,8 - 15,6 - 31,2 - 62,5 - 125 -250- 500

## II.5.2 Effet du venin et de ses fractions sur la migration leucocytaire

L'inflammation est caractérisée par une augmentation de la perméabilité vasculaire, la formation d'œdème et la migration des leucocytes de la circulation sanguine vers les tissus endommagés ( Zulliani et *al*, 2005 ). Cette étude a nécessité 13 lots de rats; 6 lots ont reçu chacun 25 µg de venin natif , de la fraction C2 et de la fraction D1 ; les 6 autres lots reçoivent 50 µg de venin et fractions par voie (i.p)

Un lot témoin a reçu 500 µl de NaCl 0,9%

Après 6 heures d'envenimation la moitié des animaux est sacrifiée et leur cavité péritonéale subit un lavage avec 10 ml de PBS hépariné; pH 7,2

Le reste des animaux est sacrifié 24 heures après envenimation. Les lavages péritonéaux sont alors récupérés .

Le comptage cellulaire se fait avec un système hématologique *ADVIA<sup>TM</sup>* qui dénombre la totalité des cellules présentes dans l'exsudat péritonéal.

Les populations leucocytaires sont identifiées par la confrontation de deux méthodes :

La méthode cytochimique utilise des anticorps monoclonaux couplés à la peroxydase et la mesure de la DO de la chromatine et lobulation des noyaux après lyse sélective.

La méthode peroxydase utilise deux canaux indépendants de comptage cellulaire :

La cytochimie peroxydasique utilisant le 4 chloro-1-naphtol comme substrat chromogène.

La différenciation cellulaire par mesure de la diffraction lumineuse (taille) et de l'absorption lumineuse (intensité de la coloration).

L'analyse des populations leucocytaires permet l'identification de chaque type cellulaire en fonction de sa position, zone et de sa densité puis de comptabiliser le nombre de cellules de chaque population.

## **II.6 Etude des effets histopathologiques du venin de *Cerastes cerastes* et de ses fractions C2 et D1**

L'étude histopathologique permet de visualiser l'état des tissus après envenimation par le venin de *Cerastes cerastes* et par ses fractions C2 et D1.

Cette étude a été réalisée au niveau des muscles squelettique et cardiaque selon le protocole expérimental suivant :

Après sacrifice des animaux , les organes sont prélevés puis les muscles squelettiques sont plongés dans du formol à 10% et les cœurs dans du bouin aqueux. Ils y sont maintenus pendant 48 heures ,puis lavés à l'eau courante pendant 24 heures .

Les organes sont ensuite déshydratés dans des bains d'alcools de degrés alcoolométriques croissants .

Les organes subissent alors une imprégnation dans trois bains successifs de paraffine pendant 15 minutes, 1 heure et 24 heures respectivement.

L'inclusion des organes dans la paraffine se fait dans des cassettes qui vont être réfrigérées .

Les blocs obtenus sont réduits en couches de 2,5 µm à l'aide d'un microtome.

Le déparaffinage se fait dans 2 bains de xylène puis la réhydratation dans des bains d'alcools de titre décroissant (100°, 95°, 80, 70°).

La coloration des coupes est réalisée à l'Hématoxyline – Eosine. L'hématoxyline colore les noyaux en bleu alors que l'éosine colore le cytoplasme en rose, les fibres conjonctives (surtout le collagène) d'un rose tirant sur le violet et les globules rouges en rouge clair à jaune, (Hould, 1984).

Les coupes sont déshydratées sur lames et montées à « l'Eukitt » qui va permettre l'adhérence à la lame .

La prise de photos est réalisée sur microscope photonique au grossissement 400 à l'aide d'un appareil à photos numérique.

## **II.7 cristallisation de la fraction purifié D1**

Après purification, 5µg/µl de la fraction D1 ayant une activité phospholipasique et myotoxique contenu dans un tampon acétate d'ammonium; pH 8,5 est soumise à un essai de cristallisation selon le protocole suivant :

La cristallisation est réalisée par la méthode de vapeur diffusion, utilisant une plaque de 24 puits (Jancarik et Kim,1991).

Un volume de 1 µl de la solution protéique est déposée sur une lamelle auquel est ajouté 1µl de solution de précipitation (Tris – HCl 0,1 M; NH<sub>4</sub> Sulfate 2M); 1 ml de cette solution est déposé dans le puits; la lamelle est ensuite déposée dessus. La cristallisation à 20° C et pendant une durée indéterminée s'effectue alors (4 semaines environ dans le cas de la fraction D1).

### III. Résultats et discussions

#### III.1 Purification de la fraction phospholipasique à partir du venin de *Cerastes cerastes*

Le venin de *Cerastes cerastes* a subi plusieurs étapes chromatographiques afin d'isoler la fraction responsable de l'activité phospholipasique et myotoxique. Après chaque étape de purification, ces deux activités sont déterminées.

##### III.1.1 Fractionnement du venin par chromatographie d'exclusion moléculaire sur Sephadex G-75

Un gramme de venin de *Cerastes cerastes* (1000 UDO) a été fractionné par gel filtration sur Sephadex G-75.

L'élution est réalisée avec un tampon acétate d'ammonium 0,1M ; pH 8,5 avec un débit constant de 20ml/h. La lecture de l'absorbance de chaque tube est effectuée à 280 nm.

Le profil chromatographique du venin fractionné a révélé 3 pics (GF1, GF2, GF3)(figure 10).

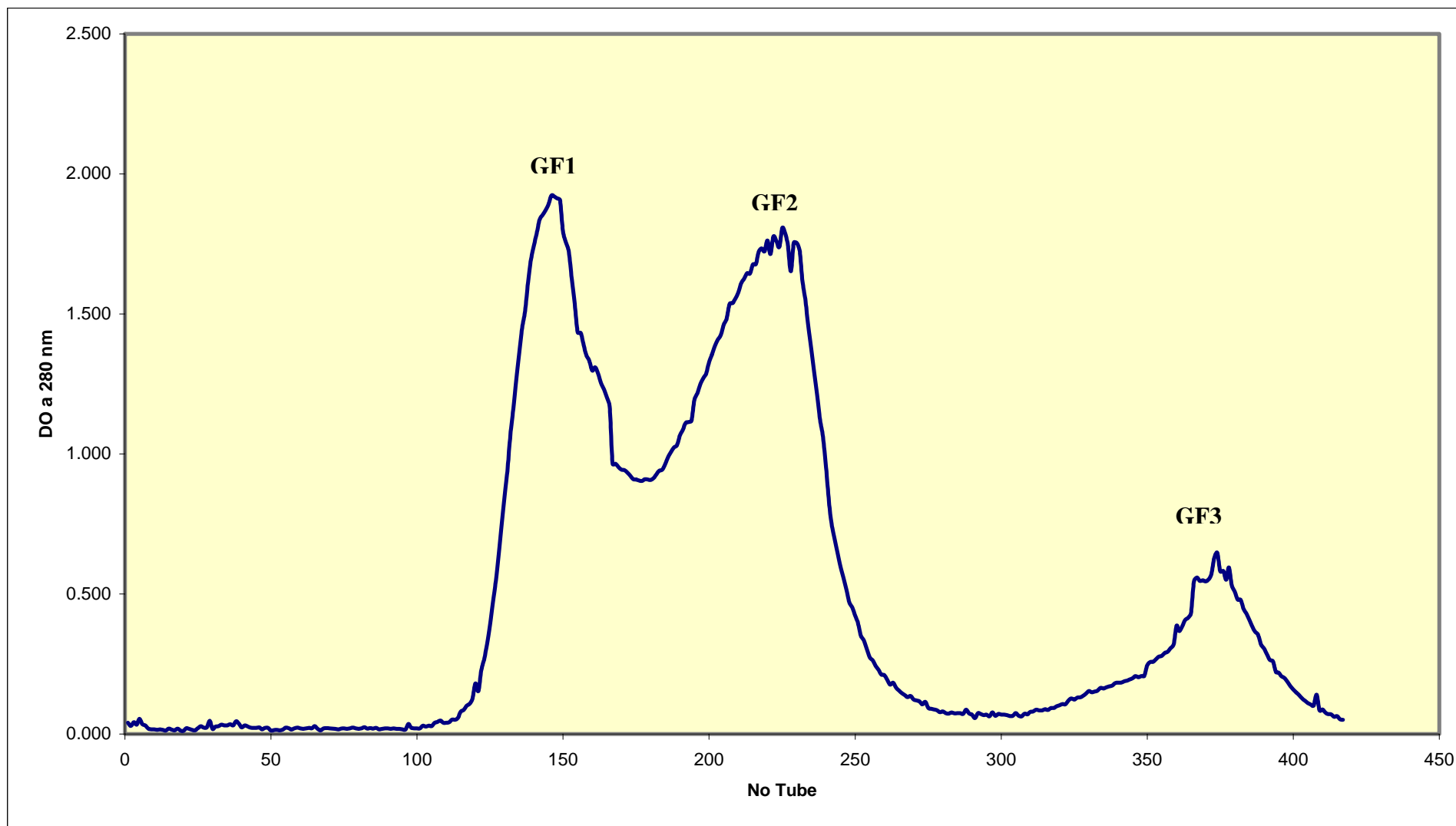
Les fractions ont été soumises aux tests d'activité phospholipasique et myotoxique. L'activité phospholipasique du venin de *Cerastes cerastes* a été retrouvée au niveau de la fraction GF2 et la 2<sup>ème</sup> moitié de la fraction GF1.

L'activité myotoxique déterminée par le dosage de la Créatine Kinase a révélé que les fractions GF1 et GF2 provoquent une augmentation sérique de la CK chez les souris envenimées.

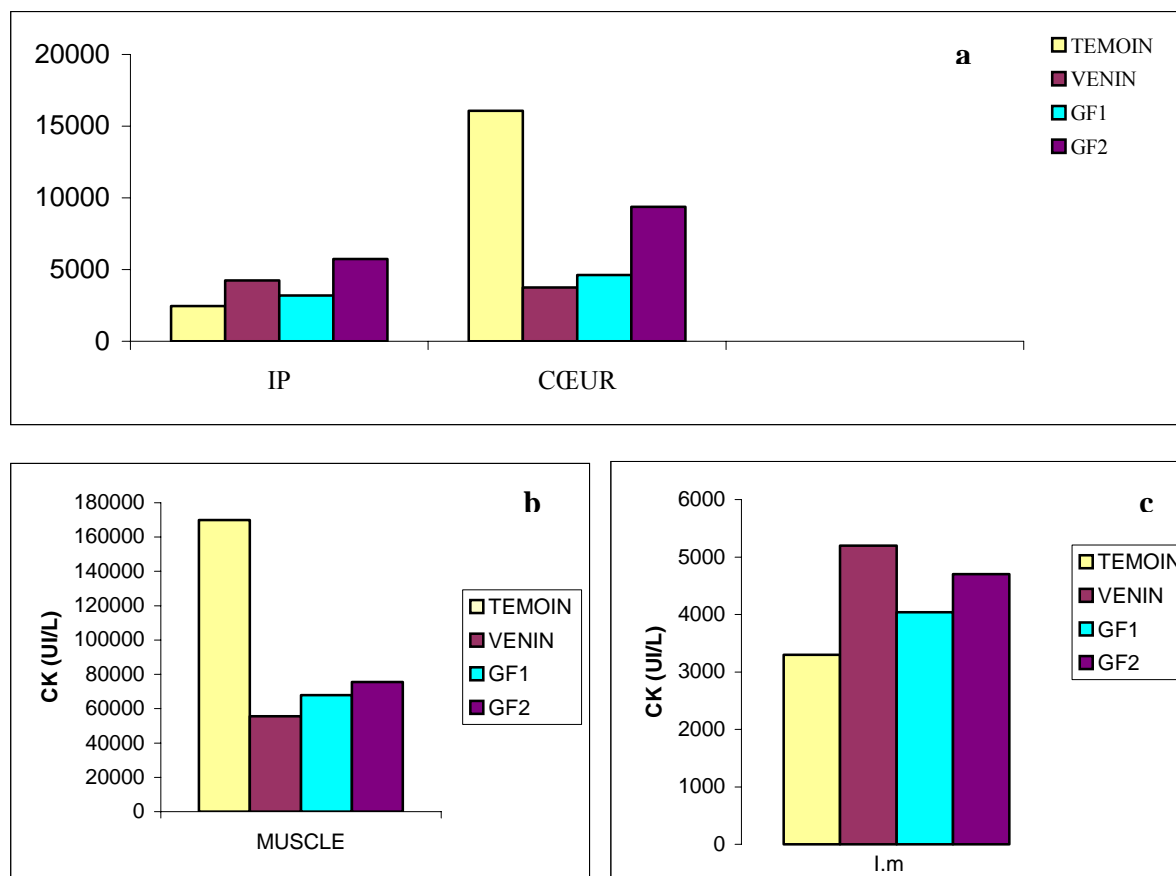
Cette élévation est estimée respectivement à 4040 U/L et 4700 U/L par rapport au témoin estimé à 3300 UI/L, Par voie intra musculaire ( Figure 11).

L'augmentation par voie intra péritonéale est de 3190 UI/L et 5730 UI/L respectivement par rapport au témoin qui est de 2450 UI/L (Figure 11).

L'augmentation de la Créatine kinase sérique est parallèle à sa diminution au niveau des muscles squelettique et cardiaque.



**Figure 10** : Fractionnement du venin de *Cerastes cerastes* (1000 UDO) par filtration moléculaire utilisant une colonne Pharmacia (5X100) cm. Tampon d'élution : Ac NH<sub>4</sub> 0,1M; pH 8,5. Débit constant à 18ml /heure.



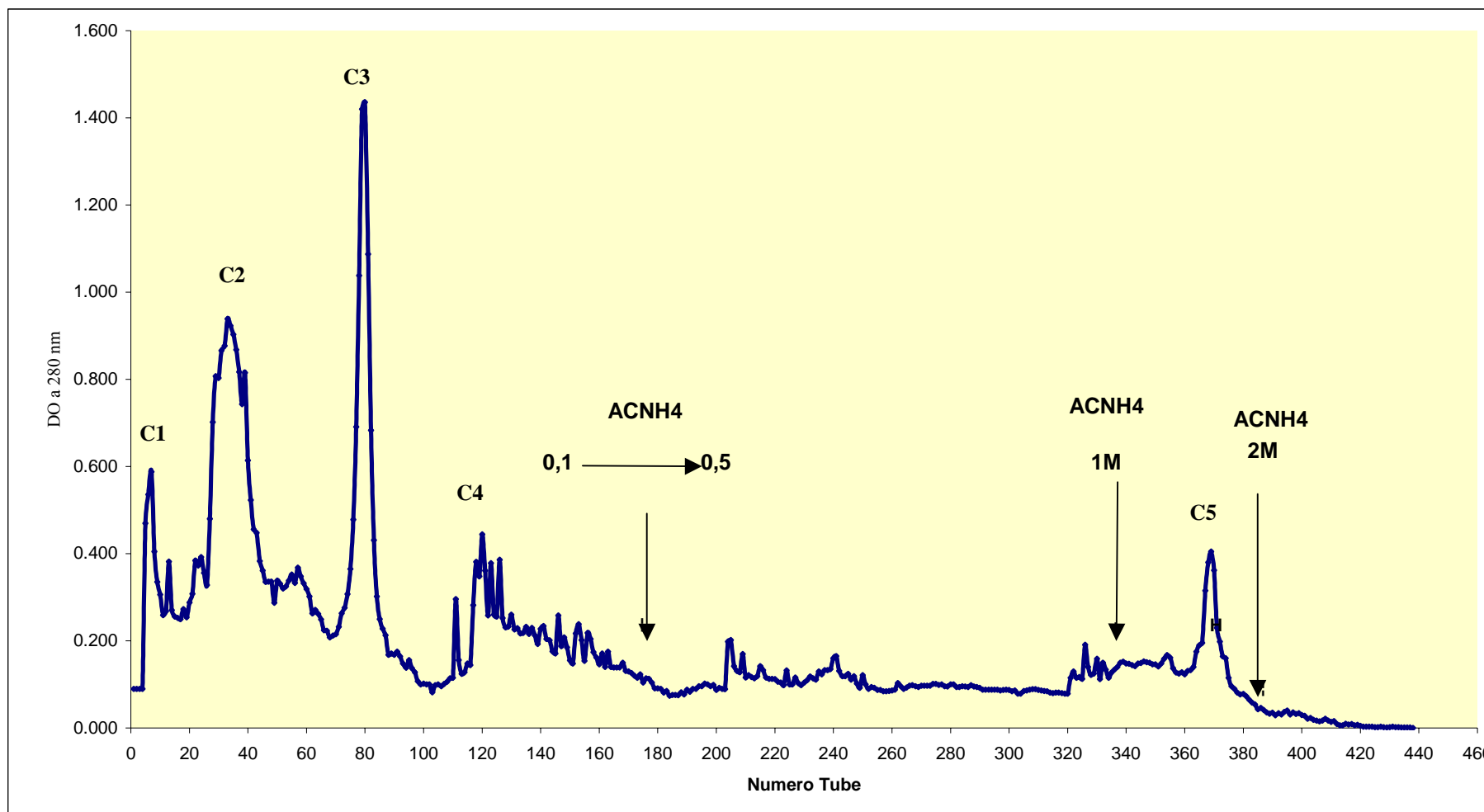
**Figure 11** : Evaluation de l'activité myotoxique **a)** au niveau du cœur et du sérum en i.p. **b)** au niveau du muscle squelettique ; **c)** au niveau sérique en i.m ; 3 heures après injection des fractions issues de la filtration moléculaire.

### III.1.2 Purification de la fraction GF2 myotoxique et phospholipasique par chromatographie échangeuse de cations sur CM-Sephadex C-50

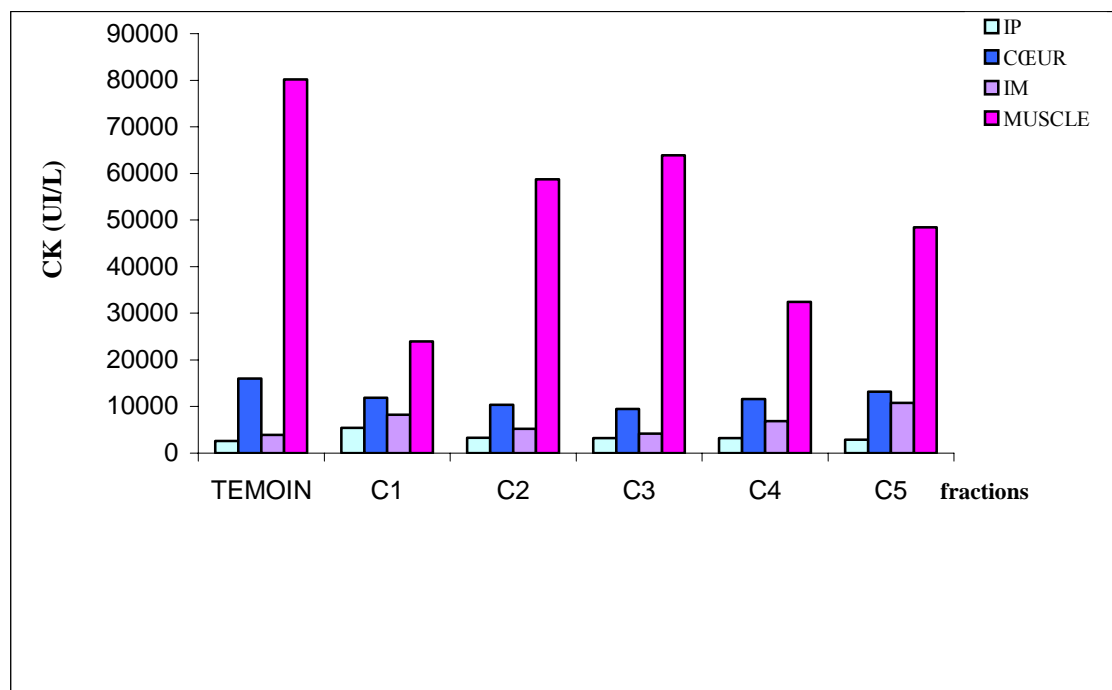
La fraction GF2 subit une chromatographie échangeuse de cations sur CM-Sephadex C-50 .

L'élution avec un tampon acétate d'ammonium 0,1 M; pH 8,5 avec un débit constant de 18 ml /h a permis la révélation de quatre pics C1, C2, C3 et C4. Un gradient de force ionique acétate d'ammonium de 0,1 à 0,5M suivi d'une élution à 1M a permis d'éluer la fraction C5 (figure 12).

Les fractions C2, C3,C4 et C5 sont doués d'activité phospholipasique ; Seule la fraction C1 en est dépourvue. Les 5 fractions C1, C2, C3,C4 et C5 sont myotoxiques (figure(13)).



**Figure 12** : Purification de la fraction GF2 (200 UDO) myotoxique et phospholipasique par chromatographie échangeuse de cations sur CM-Sephadex C-50. Tampon d'éluion d'Ac NH<sub>4</sub> 0,1M ; pH 8,5. Débit 18ml /heure.

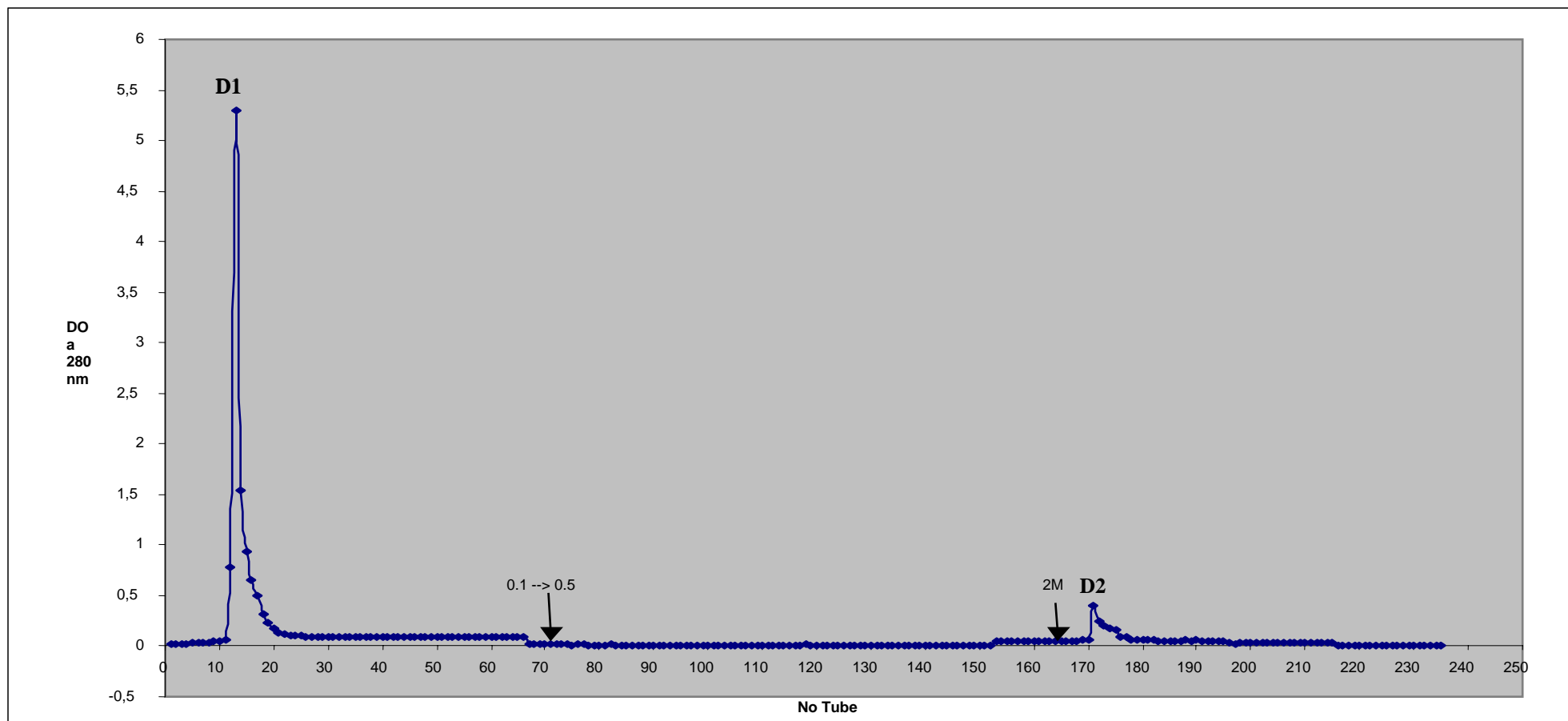


**Figure 13** : effet myotoxique des fractions issues de la chromatographie échangeuse de cations CM-C-50 au niveau sérique et musculaire (muscle cardiaque et squelettique) 3heures après envenimation.

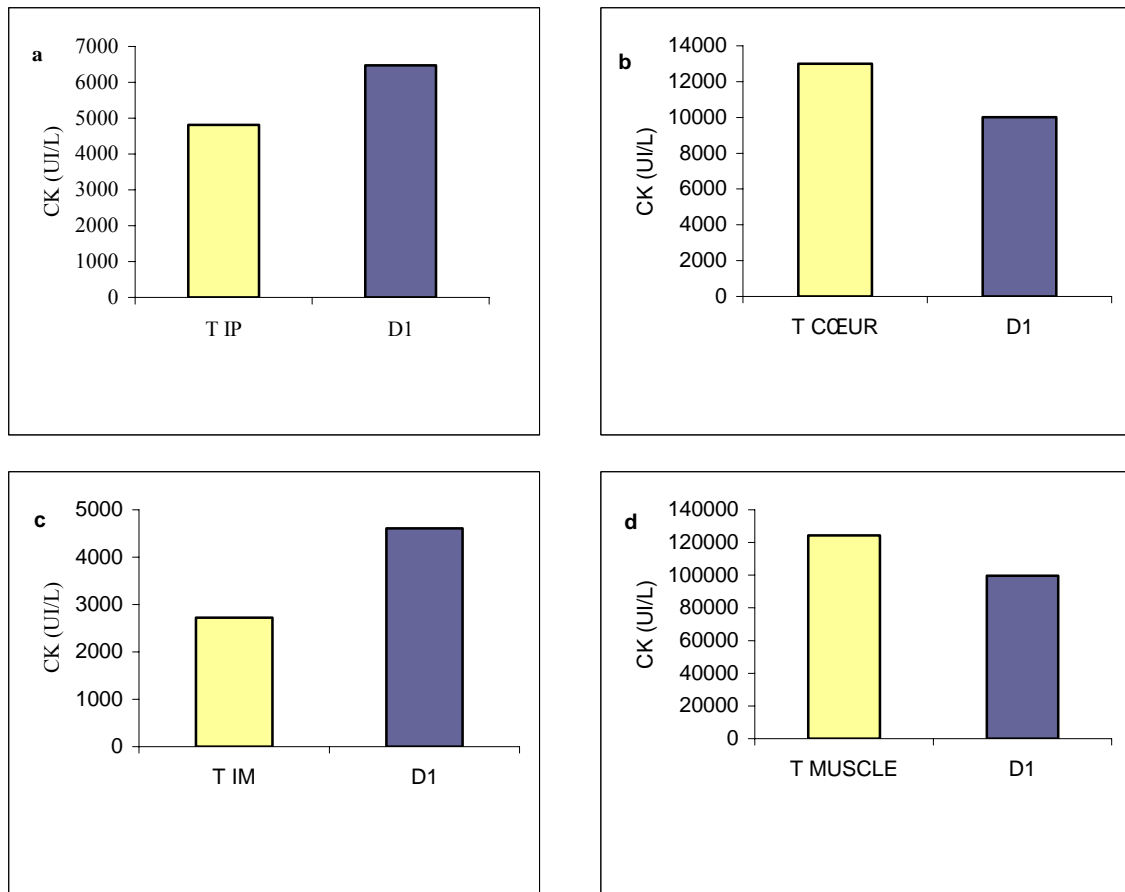
### III.1.3 Purification de la fraction C3 issue de la CM-Sephadex C-50 sur DEAE- Sephadex A- 50

La fraction C3 douée d'activité phospholipasique et myotoxique issue de la CM-Sephadex C-50 est soumise à une seconde étape de purification sur DEAE Sephadex- A-50 (figure 14). Le profil chromatographique révèle la présence de deux pics. La 1<sup>ère</sup> fraction D1 majoritaire a été éluée avec le tampon acétate d'ammonium 0,1M; pH 8,5. Une deuxième fraction (D2) a été éluée après application du tampon acétate d'ammonium 2 M.

La fraction D1 est douée d'activité phospholipasique myotoxique. La fraction D2 a révélé la présence des deux activités également ( Figure 15).



**Figure 14** : Purification des molécules phospholipasiques issues de la fraction C3 (40 UDO) par chromatographie échangeuse d’anions sur DEAE-Sephadex-A-50. Débit 18ml/heure ; tampon d’élution ACNH<sub>4</sub> 0,1; pH 8,5



**Figure 15** : évaluation de l'activité enzymatique de la CK **a)** au niveau du sérum en i.p **b)** au niveau du muscle cardiaque **c)** au niveau sérique en i.m **d)** au niveau du muscle squelettique ; 3 heures après injection des fractions issues de la chromatographie échangeuse d'anions sur DEAE -Sephadex -A-50.

### **III.1.4. Electrophorèse du venin de *Cerastes cerastes* et de ses fractions par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS**

Une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS est utilisée pour déterminer l'homogénéité des fractions issues des différentes étapes chromatographiques d'estimer leurs masses moléculaires (Figures 16 et 17). L'estimation des masses moléculaires des protéines est déterminée par extrapolation sur la courbe étalon préétablie avec les marqueurs de poids moléculaires connus ( Figure 1 ; Annexe).

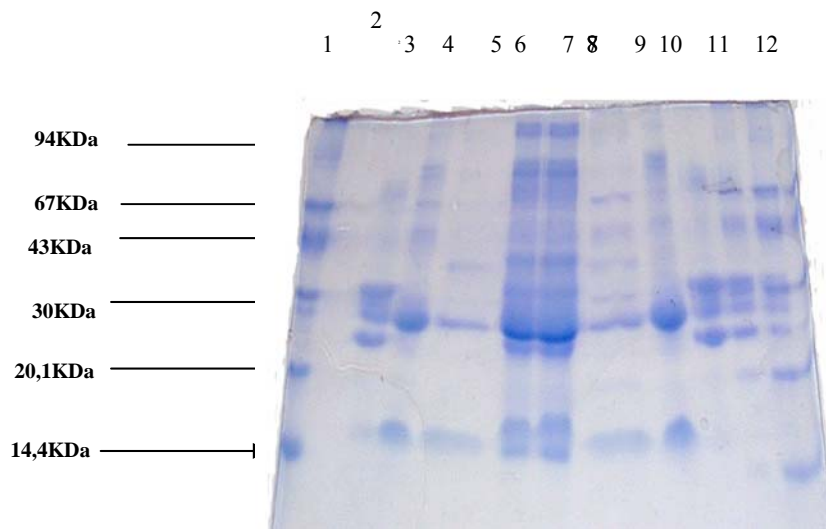
Les pistes 6 et 7 correspondant à la fraction GF2 issue de la filtration moléculaire a révélée la présence de 7 bandes protéiques dont les masses moléculaires sont estimées à 14890 ; 42630 ; 55550 ; 59270 ; 66730 ; 73150 ; 96500.

La fraction C1 issue de la chromatographie échangeuse de cations révèle 6 bandes (pistes 5 et 8) dont les masses moléculaires sont estimées à 15675 ; 44630 ; 56000 ; 81155.

La fraction C2 (pistes 4et 9)révèle 6 bandes avec des masses moléculaires de 14890 ; 42630 ; 61550 ; 67000 ; 73150 ; 80230.

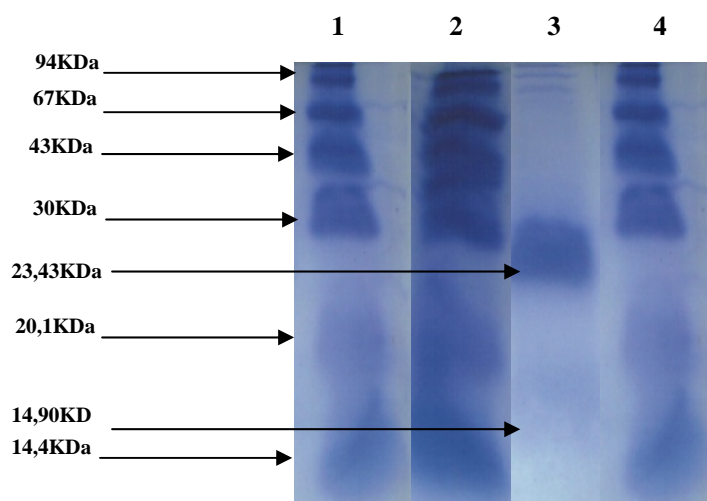
La fraction C3 révèle 4 bandes protéiques (pistes 3 et 10) dont les poids moléculaires sont de 14890 ; 42630 ; 61550 ; 67000 ; 73150 ; 80215.

La fraction C4 révèle 6 bandes protéiques de masses moléculaires estimées à 14900 ; 20100 ; 42630 ; 60145 ; 67000 ; 93930. La fraction D1 issue de la chromatographie échangeuses d'anions révèle 2 bandes protéiques de masses moléculaires de 14900 et 23430.



**Figure 16:** Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS du venin de *Cerastes cerastes* et des fractions issues de la chromatographie échangeuse de cations sur CM Sephadex C-50

- Piste 1 et 12 : Les marqueurs de poids moléculaire
- Piste 2 et 11 : La fraction C1
- Piste 3 et 10 : La fraction C2
- Piste 4 et 9 : La fraction C3
- Piste 5 et 8 : La fraction C4
- Piste 6 et 7 : Le venin de *Cerastes cerastes*



**Figure 17:** Electrophorèse de la fraction C2 (piste 2) et de la fraction D1(PLA2 myotoxique)( piste 3)  
Piste 1 et 4 : Les marqueurs de poids moléculaire

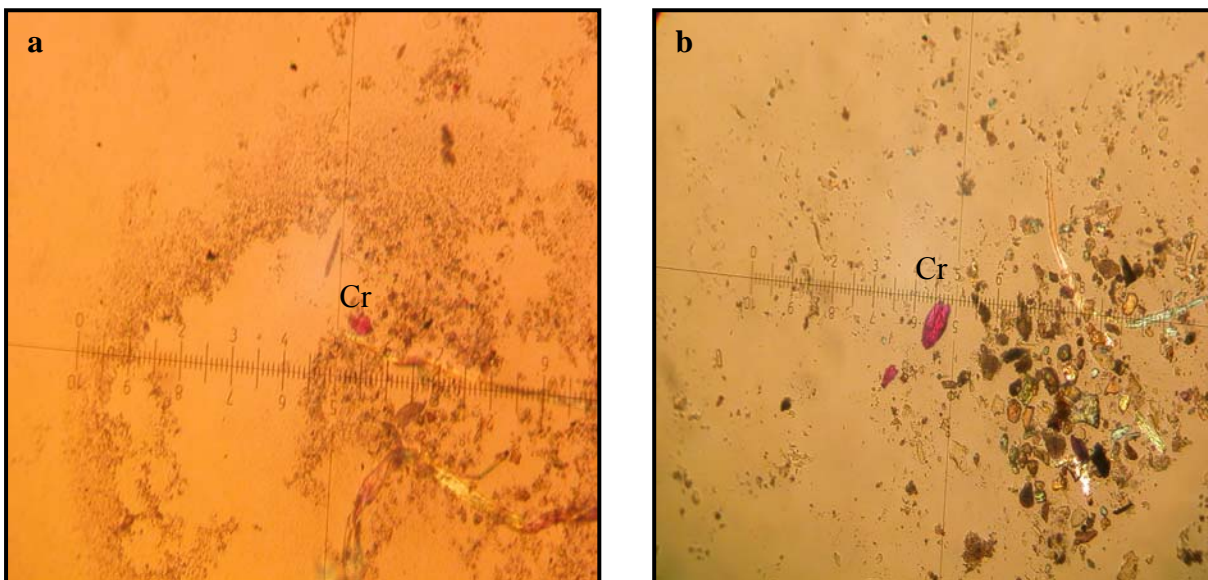
### III. Cristallisation

La Fraction D1 possédant l'activité phospholipasique et myotoxique, possédant 2 bandes protéiques de PM 14900 et 23430 a subi une cristallisation en utilisant une solution de précipitation contenant du Tris-HCl et du NH<sub>4</sub> Sulfate .

Le cristal se forme après 4 semaines environ et ses dimensions sont de 0,9X0,3X0,2mm

La cristallisation de la PLA2 démontre l'utilité des tampons poly anioniques et des sels qui facilitent la cristallisation des myotoxines.

Les myotoxines de trois venins du genre *Bothrops* forment des cristaux en présence de sulfate ou de citrate (Arni et *Gutiérrez*, 1993 ; Arni et *al* ,1995a,b). Du fait que les myotoxines soient basiques , les poly anions pourraient diminuer la répulsion électrostatique intermoléculaire et permettre la cristallisation des espèces moléculaires par des agents précipitants (Achari et *al* ,1985), ( Figure 18).



**Figure 18:** Cristal d'une PLA2 myotoxique isolée du venin de *Cerastes cerastes*  
a) Après 4 semaines de croissance ; b) après 8 semaines de maturation.  
La taille approximative du cristal est de 0,9X 0,3 X 0,2 mm.

## III.2 Etude de la réponse inflammatoire

L'envenimation expérimentale avec le venin de *Cerastes cerastes* et ses fractions C2 et D1 induit une réaction inflammatoire caractérisée par une infiltration leucocytaire, une migration des neutrophiles. Leur accumulation dans la cavité péritonéale et une induction de la production de cytokines pro et anti inflammatoires.

### III.2.1 Effet du venin et de ses fractions C2 et D1 sur la migration leucocytaire

Le venin et ses fractions induisent une accumulation des leucocytes au site d'injection.

Le nombre de leucocytes dans les lavages péritonéaux est déterminé après 6 heures et 24 heures d'envenimation avec deux doses (25 et 50 µg) de venin et des fractions C2 et D1 dans la cavité péritonéale de rats

La dose sub létale n'induit pas d'infiltration leucocytaire importante dans la cavité péritonéale aussi bien pour le venin que pour ses fractions ; Alors qu'une DL50 (240 µg/120 g de rat) induit une infiltration très importante des leucocytes totaux 6 heures après envenimation ; Cependant les fractions C2 et D1 induisent une infiltration moins importante (Figure 19).

L'infiltration des polynucléaires neutrophiles observée à 6 h n'est pas significative sauf pour le venin à dose létale où elle est multiplié par un facteur 2, cependant cette infiltration est très importante après 24 heures avec les deux fractions à dose létale. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans l'étude histologique (Figure 21).

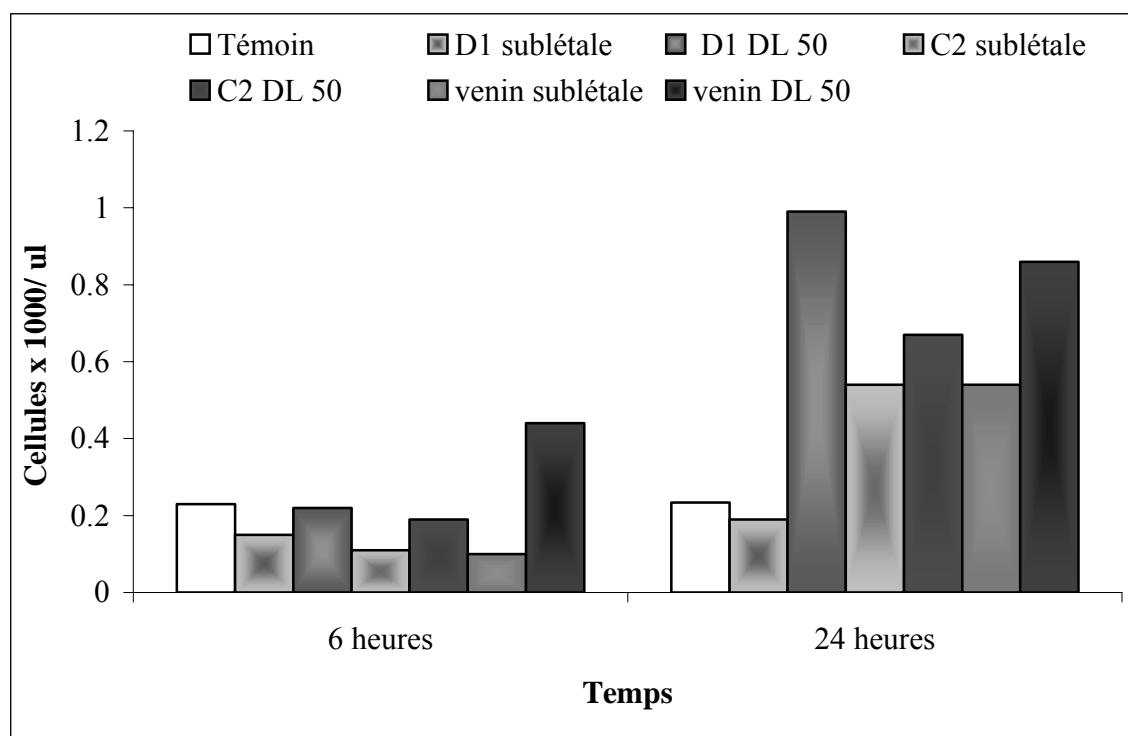
L'infiltration des monocytes est observée des 6 heures pour le venin et ses fractions. Cette infiltration de monocytes apparaît avec des pics importants a 24 heures pour le venin et ses fractions (Figure 20).

Des résultats similaires ont été observés après envenimation par *Thalassophryne natterii* avec une infiltration importante des monocytes ( Lima et al, 2003). Alors que TEL une lectine isolée à partir d'une plante *Talisia esculanta* induit une infiltration leucocytaire temps et dose dépendante avec une accumulation des neutrophiles plus importante que celle des monocytes ( Freire et al, 2003 ).

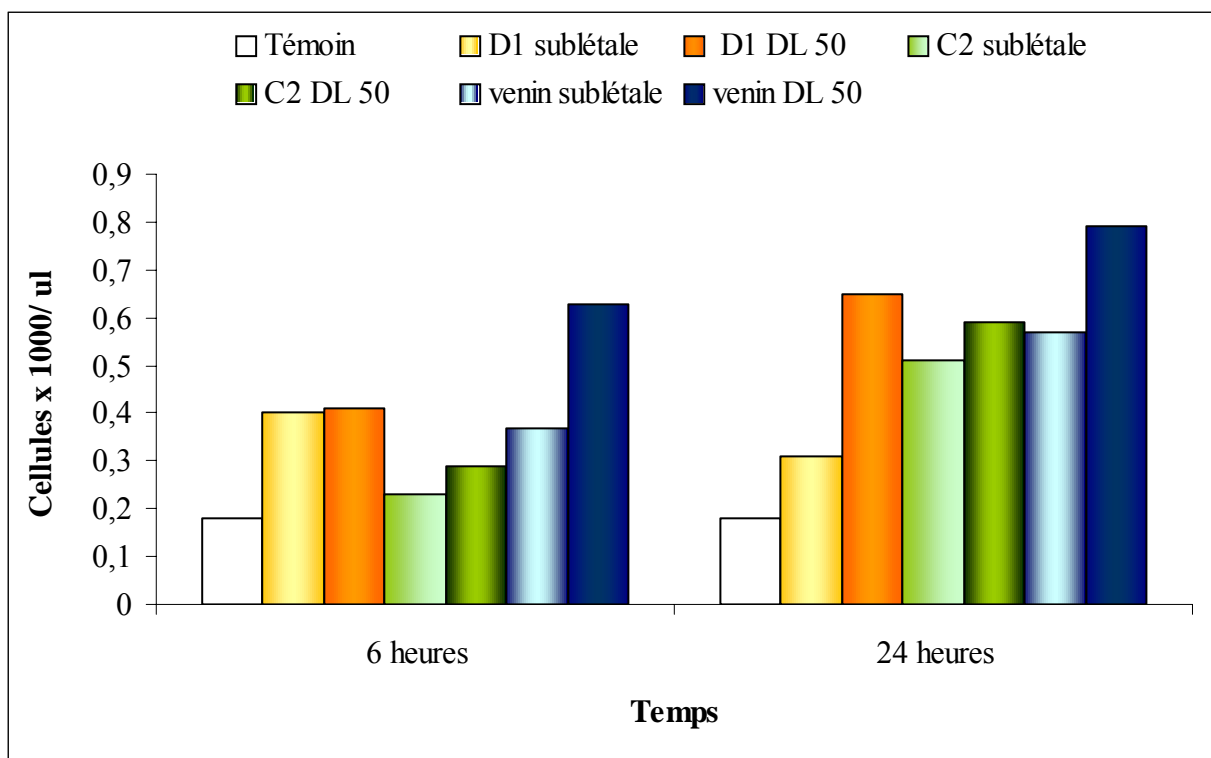
Arruda et collaborateurs (2003) ont observé une augmentation des neutrophiles dose-dépendante dans la cavité péritonéale murine après envenimation avec le venin de *Bothrops laucelatus* (Fer de lance) (Arruda et al, 2003).

L'envenimation avec des PLA2 myotoxiques purifiées à partir de *Bothrops asper* et *B.Jararacussu* induit également une infiltration leucocytaire composée de neutrophile et de monocytes (Gutiérrez et al, 1991; Lomonte et al, 1993; Zuliani et al, 2005)

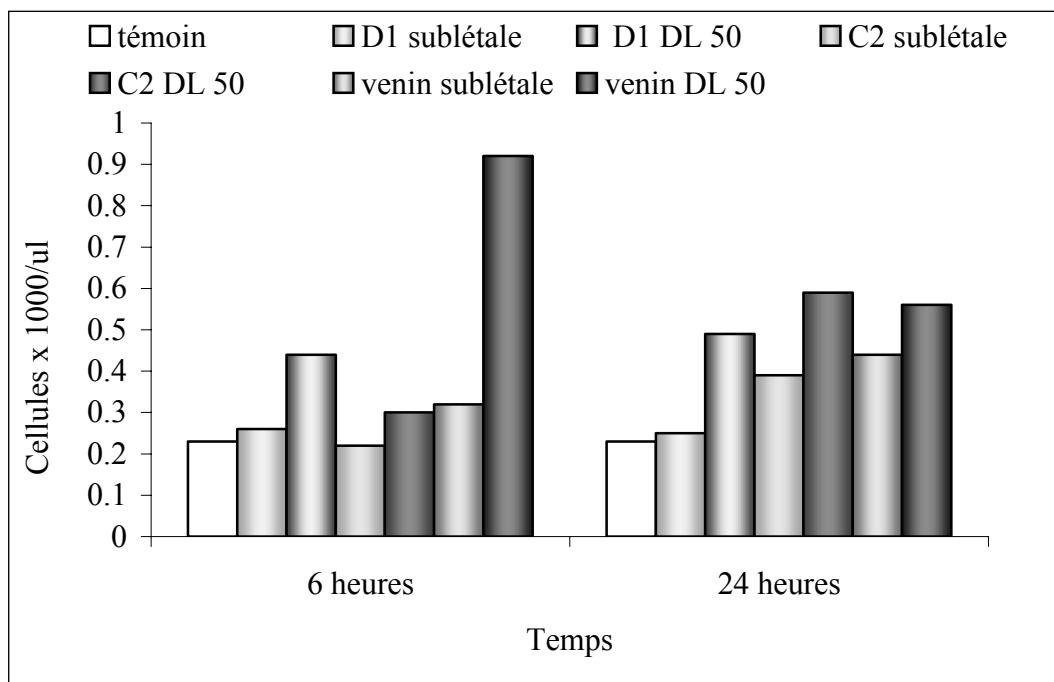
Les neutrophiles jouent un rôle vital dans la défense de l'hôte, leur accumulation et migration dépendent des médiateurs chimiques générés au site de la lésion. Leur recrutement est médié partiellement par l'activité PLA2. Cette induction est dépendante de la génération de substances chimiotactiques comme le PAF et les LTB4 via une voie de signalisation qui impliquerait l'activation de la protéine G la PKC et les PLA2 endogènes. (Lewis et Austen; 1988; Gambero et al, 2002; Gambero et al, 2004). La migration leucocytaire induite par le venin de *Viperidae* est partiellement médiée par l'activité phospholipasique et les produits de la 5-Lipoxygénase (Arruda et al, 2003).



**Figure 19** : Détermination des lymphocytes 6 h et 24 h après injection de (25 et 50µg) de venin de *Cerastes cerastes* et de ses fractions C2 et D1



**Figure 20:** Détermination de l'infiltration des monocytes 6h et 24h après envenimation avec 2 doses (25et50µg) de venin de *Cerastes cerastes* et de ses fractions C2 et D1



**Figure 21:** Effet du venin de *Cerastes cerastes* et de ses fractions C2 et D1 dans le recrutement des polynucléaires neutrophiles dans la cavité péritonéale de rats 6 et 24 heures après envenimation

### III.2.2 Etude des effets du venin de *Cerastes cerastes* et de ses fractions C2 et D1 sur la production de cytokines

L'envenimation de rats par voie sous cutanée avec des doses sublétales respectivement de venin de *Cerastes cerastes* et de ses fractions C2 et D1 déclenche une cascade d'événements inflammatoires dont la synthèse de cytokines inflammatoires (l'IL-1- $\alpha$ ; IL-1- $\beta$  et IL-6) et anti-inflammatoires (IFN- $\gamma$  et IL-10).

La production des cytokines pro inflammatoires ainsi que d'autres facteurs délétères peut contribuer à la propagation de l'inflammation dans différents organes (Pastor *et al*, 2003)

Le venin de *Cerastes cerastes* provoque une augmentation rapide et précoce de IL-1- $\alpha$ . En effet son apparition est observée dès 30 min avec un pic de 507 pg/ml à 3 heures et un 2<sup>ème</sup> pic (355 pg/ml) à 24h.

La fraction C2 non purifiée (phospholipasique et myotoxique) provoque une augmentation de IL-1- $\alpha$ . Les pics apparaissent à 3 h et 24 h avec des concentrations respectives de 323 pg/ml et de 288 pg/ml

La fraction D1 possédant l'activité myotoxique et phospholipasique induit également une élévation de l'IL-1- $\alpha$ , les pics apparaissent à 3 h et 24 h avec des concentrations de 451pg/ml et 300pg/ml respectivement (Figure 22).

L'IL-1- $\beta$  augmente après 3 heures d'envenimation avec des pics de concentrations respectives de 86,46pg/ml, 63,03pg/ml et 63,3 pg/ml pour le venin, la fraction C2 et la fraction purifiée D1. L'élévation la plus marquée apparaît après 24 heures avec des concentrations respectives de 229,32 pg/ml ; 121,21 pg/ml et 160 pg/ml. Figure(23).

L'IL-1 peut jouer un rôle dans la physiologie des altérations systémiques induites par les venins de serpents (Petricevich *et al*, 2000)

L'IL-1 induit l'expression des molécules d'adhésion par les cellules endothéliales et stimule la libération d'IL-6 et de TNF- $\alpha$  (Stylianou et saklatvala, 1998).

L'IL-1 peut contribuer également au redoublement des neutrophiles induit par les PLA2 myotoxiques (Zuliani *et al*, 2005).

Des résultats similaires ont été obtenus par Petricevich *et al*, 2000; Ils ont montré une augmentation sérique de l'IL-1 après envenimation de souris avec une DL50 de venin de *Bothrops asper*. Cependant, l'injection de (5  $\mu$ g / 20g de souris) de ce même venin ne provoque pas la libération d'IL-1 dans la cavité péritonéale murine. Cette différence est probablement liée à la dose et au site d'administration du venin suggérant que les cellules péritonéales ne soient pas impliquées dans la production d'IL-1 (Zamuner *et al* ; 2005).

La cinétique d'apparition de L'IL-6 dans le sérum des rats envenimés avec une dose sublétale de venin de *Cerastes cerastes* et de ses fractions C2 et D1 se traduit par des pics plus tardifs qui n'apparaissent qu'à partir de 3heures, avec des concentrations de (158,53 pg/ml et 50pg/ml) et à 24 h (168,29 pg/ml, 45 pg/ml) pour le venin et la fraction phospholipasique D1 respectivement.

La fraction C2 présente un pic à 3heures avec une concentration de 100 pg/ml.

Des résultats semblables ont été obtenus par Zuliani *et al.*, (2005) après injection à des souris par voie intra péritonéale d'une dose sublétale de PLA2 myotoxique isolée à partir du venin de *Bothrops asper*.

L'IL-1 et l'IL-6 sont d'importants médiateurs de la réponse inflammatoire; Leur augmentation parallèle est un indicateur positif du rôle régulateur de l'IL-1 dans la libération de l'IL-6 induite par les PLA2 myotoxique ou le venin *Viperidae*.

L'IL-6 et l'IL-1 sont d'importants signaux inducteurs de la synthèse des protéines de la phase aiguë de l'inflammation ( Mackiewicz et al, 1988, Lomonte et al, 1993)  
Ces deux cytokines sont considérées. comme des marqueurs de gravité de l'inflammation et leur taux est souvent corrélé avec la sévérité de l'envenimation.

L'IL-6 cause une leucocytose caractérisée par une neutropénie (Suwa et al, 2000 ; Snick, 1990).

L'IL-6 régule l'expression des ICAM-1 par les cellules endothéliales et diminue le taux des L-sélectines des neutrophiles circulants ce qui aboutit au phénomène d'adhésion ; La dernière étape de la migration cellulaire (Suwa et al, 2002).

La myonécrose paraît être l'inducteur de la libération systémique des cytokines Pro inflammatoires (Lomonte et al, 1993, Núñez et al, 2004)

La Jararhagine; Une métallo protéinase hémorragique isolée à partir du venin de *Bothrops jararaca* induit une élévation d'IL-1 et d'IL-6 suggérant ainsi une action synergique de ces 2 cytokines (Rucavendo et al, 2002 ; Laing et al, 2003) (Meki et al, 1998 ; D'suze et al, 2003 ; Fukuhara et al, 2003)

L'IL-1 et l'IL-6 peuvent induire ou potentialisent l'expression et la libération des PLA2 du groupe IIA (PLA2 présente dans les exsudats inflammatoires des mammifères) par conséquent, les cytokines pro inflammatoires et les PLA2 peuvent coopérer pour initier l'inflammation en stimulant leur sécrétion mutuelle (Crowl et al, 1991 ; Schalwijk et al, 1991).

L'IL-1 et l'IL-6 sont impliquées dans la pathogenèse des autres aspects des réactions inflammatoires comme la dégradation de la matrice extra cellulaire (Chavez et al; 2005).

Parallèlement à la production de cytokines pro inflammatoires, l'injection de doses sublétales de venin de *Cerastes cerastes* et de ses fractions C2 et D1 déclenche la libération de cytokines anti inflammatoires telles que l'IL-10 et l'IFN- $\gamma$  .

Le venin et sa fraction purifiée D1 (PLA2 myotoxique) induisent une élévation du taux d'IL-10 présentant des pics à 3 h avec des concentrations respectives de (256,95 et 136 pg/ml) et à 24 h avec des concentrations de 220,67 et 50,2pg/ml

La fraction C2 n'induit aucune élévation du taux d'IL-10 (Figure 25).

L'IL-10 joue un rôle majeur en modulant l'activation des cellules des lignées monocyte/macrophage et pourraient être impliquées dans la régulation de la synthèse des monokines (Marchant et al, 1995 ; Brantzaeg et al, 1996)

L'IL-10 inhibe la libération des cytokines pro inflammatoires et d'autres médiateurs tels que les prostaglandines NO, PAF et les leucotriènes (Bogdan et al, 1991; De waal et al, 1991) et son élévation réduit le processus inflammatoire (Howard et O'Garra, 1992) et améliore le SIRS (Brantzaeg et al, 1996 ; Marchant et al, 1995).

Dans les envenimations sévères, l'élévation de l'IL-10 peut être considérée comme une tentative de l'organisme pour rétablir l'homéostasie ( Fukuhara et al, 2003).

L'envenimation vipérine par *Cerastes cerastes* et par ses fractions C2 et D1 induit une élévation marquée de l'IFN- $\gamma$  à 3 heures avec des concentrations de 281,4pg/ml; 99 pg/ml et 125 pg/ml et à 24 heures avec des concentrations de 47,57 pg/ml ; 35 pg/ml et 100 pg/ml (figure 26).

L'interféron  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) est sécrété par les cellules Th1; cette cytokine favorise la production d'IL-1 et indirectement le développement d'une réponse Th1 en limitant l'expansion des lymphocytes Th2.

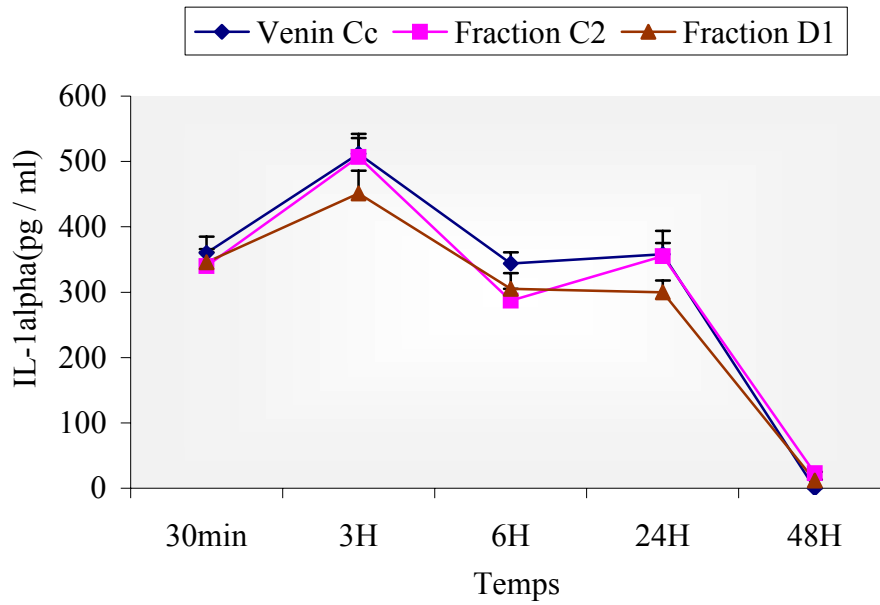
L'IFN- $\gamma$  amplifie de manière synergique la production de TNF- $\alpha$  et l'expression de la NO synthase ( iNOS) ( Filippi et *al*, 2001)

La PLA2 myotoxique joue un rôle important dans l'induction et le développement des événements inflammatoires.

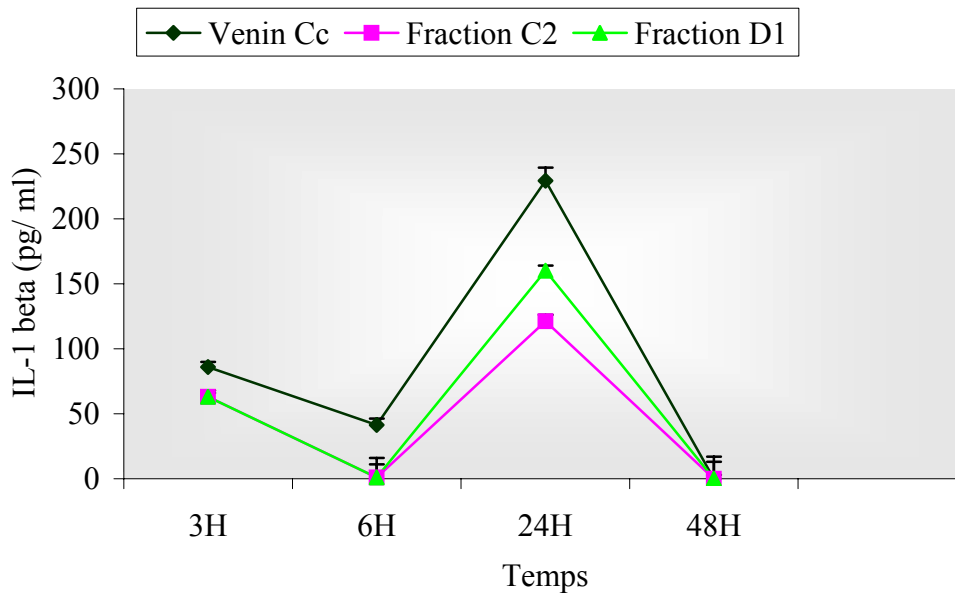
Dans notre travail l'élévation des cytokines pro et anti inflammatoires est très importante après injection du venin natif .

L'injection des fractions C2 et D1 (PLA2 myotoxique) induit une réponse inflammatoire moins importante que celle obtenue avec le venin, sauf pour l'IL-1 $\alpha$  qui est élevé, après administration des 3 échantillons. Ces résultats suggèrent qu'il y'ait une coopération entre les différents constituants du venin. Cet effet synergique est observé avec le venin qui présente les pics les plus importants. De plus, les cytokines étudiées lors de l'envenimation avec le venin de *Cerastes cerastes* et ses fractions C2 et D1 présentent une cinétique biphasique. La première phase correspondrait probablement à une réponse à médiation cellulaire. Le venin étant considéré comme un antigène, est capté par les CPA. Il est internalisé puis dégradé en petits peptides dans les lysosomes. Le CMH de classe II présente l'antigène aux lymphocytes T CD4+. Les cellules T activées produisent l'IL-2 et l'IFN- $\gamma$ , qui vont stimuler à leur tour la synthèse d'autres cytokines pro inflammatoires telles que l'IL-1 et l'IL-6.

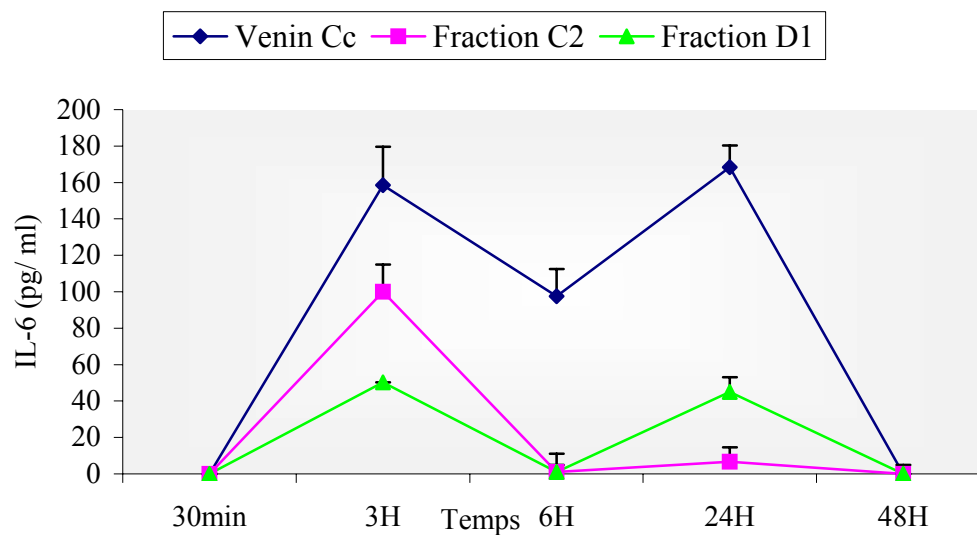
La diminution des concentrations sériques des cytokines lors de la première phase est probablement due, soit à la présence de cytokines anti inflammatoires tels que l'IL-10 et l'IFN- $\gamma$  qui inhibent la production de ces cytokines, soit à la libération de glucocorticoïdes produits suite à la cascade d'évènements inflammatoires déclenchés par ces mêmes cytokines. La deuxième phase se caractérise le plus souvent par l'apparition de fortes concentrations de la plupart des cytokines est probablement due à la libération d'autres substances vasoactives qui peuvent augmenter ou diminuer l'activité des cytokines.



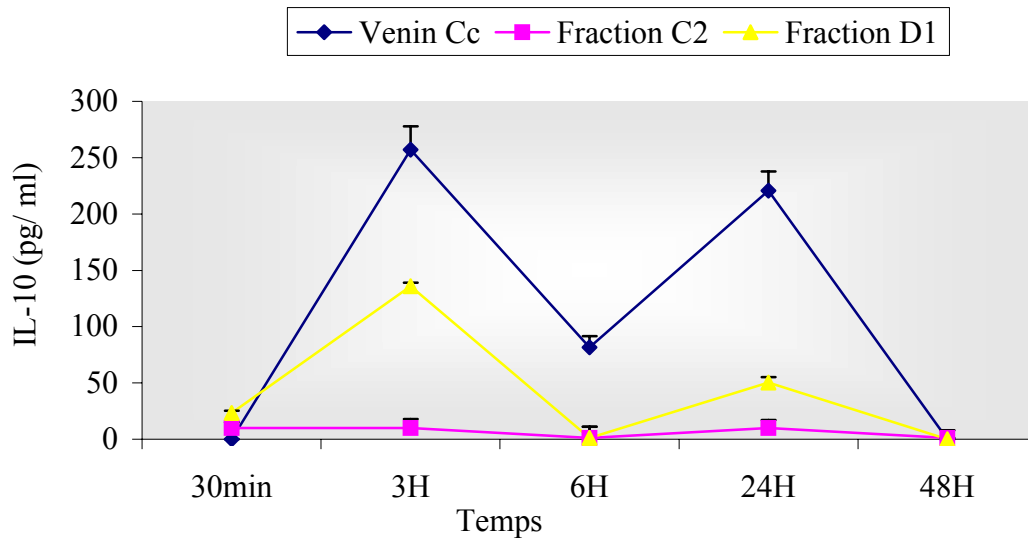
**Figure 22** : Cinétique d'apparition de l'IL-1  $\alpha$  dans le sérum de rats envenimés avec des doses sublétales de venin de *Cerastes cerastes* et de ses fractions C2 et D1



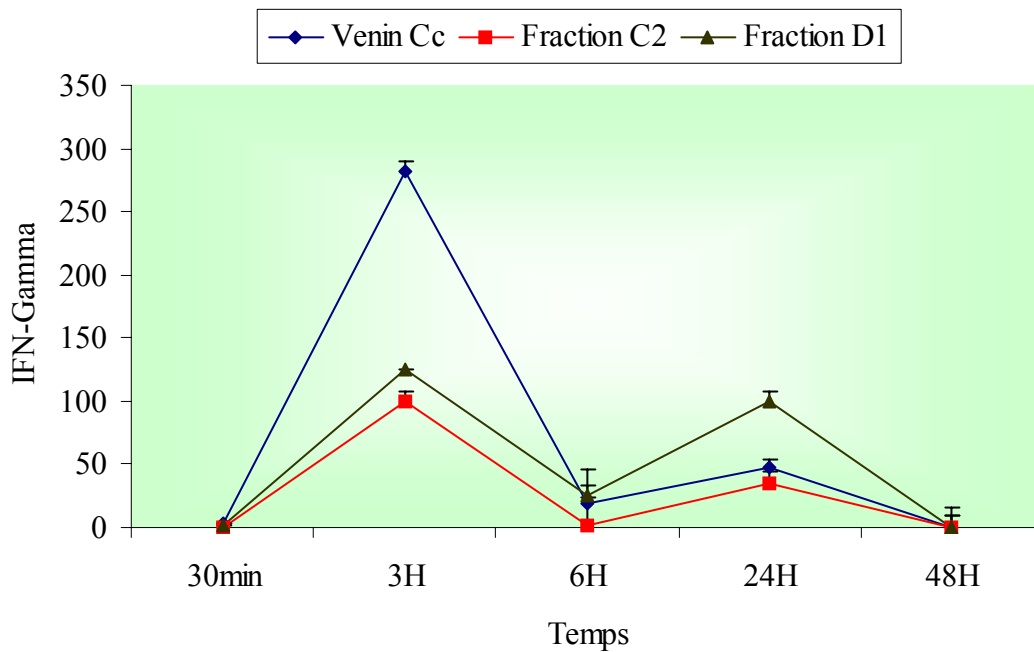
**Figure 23** : Cinétique d'apparition de l'IL-1  $\beta$  dans le sérum de rats envenimés avec des doses sublétales de venin de *Cerastes cerastes* et de ses fractions C2 et D1



**Figure 24** : Cinétique d'apparition de l'IL-6 dans le sérum de rats envenimés avec des doses sublétales de venin de *Cerastes cerastes* et de ses fractions C2 et D1



**Figure 25** : Cinétique d'apparition de l'IL-10 dans le sérum de rats envenimés avec des doses sublétales de venin de *Cerastes cerastes* et de ses fractions C2 et D1



**Figure 26** : Cinétique d'apparition de l'IFN- $\gamma$  dans le sérum de rats envenimés avec des doses sublétales de venin de *Cerastes cerastes* et de ses fractions C2 et D1

### **III.3.3 Effets du venin de *cerastes cerastes* et de ses fractions C2 et D1 sur les muscles squelettique et le myocarde**

L'objectif de cette étude est de mettre en évidence les altérations tissulaires causées par le venin de *Cerastes cerastes*, sa fraction C2 et sa fraction D1 avec deux doses (25 et 50 µg) , après 3 heures et 24 heures d'envenimation .

#### **III.3.3.1 Effets histopathologiques du venin de *Cerastes cerastes* au niveau du muscle cardiaque**

le tissu myocardique des souris témoins est constitué de cellules musculaires striées renfermant des noyaux périphériques allongés et de taille variable. L'administration de 25 µg de venin induit, après 3 h, la formation d'un œdème interstitiel, la désorganisation de certaines fibres musculaires, la nécrose de quelques fibres cellulaires; Les noyaux sont irréguliers, certains sont hypertrophiques. Il y'a apparition de plages hémorragiques, un remaniement de vaisseaux congestifs et la présence de cellules inflammatoires à prédominance polynucléaire.

Après 24 h d'envenimation, les mêmes altérations sont observées mais à des degrés plus importants; En effet l'œdème est extensif, l'hémorragie étendue, certaines cellules sont vidées ; il y'a apparition de foyers de nécrose; la majorité des noyaux sont irréguliers, pycnotiques et hypertrophiés, alors que d'autres sont caryolisés, ( Figure 27 ).

L'administration d'une DL 50 correspondant à (50µg) de venin, provoque, après 3 heures d'envenimation, une hémorragie plus importante, la plupart des cellules sont hypertrophiées et pâles, d'autres sont nécrosées, mais certaines cellules sont conservées, les noyaux des myocytes sont hypertrophiés, certains sont pycnotiques et d'autres ont subit une caryolyse et les vaisseaux sont congestifs.

Après 24 heures d'envenimation il y'a une désorganisation et une perte de striation des fibres Musculaires. La majorité des cellules sont nécrosées, la caryolyse est importante, à certains endroits, il y'a des fantômes de noyaux. Les suffusions hémorragiques sont plus étendues et sont parsemées de leucocytes. L'œdème y est très important et par endroits il est hémorragique, (figure 29).

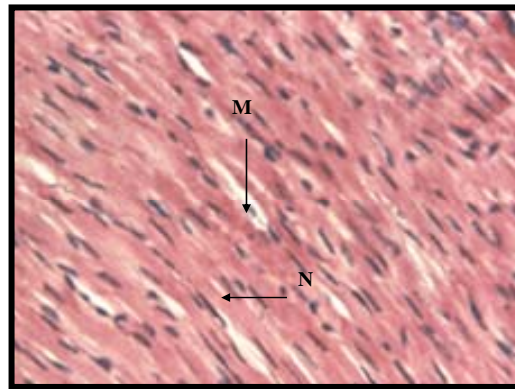
Des lésions similaires ont été observées suite a une envenimation par *Vipera radei* (Aznauria et al, 2006).

#### **III.3.3.2 Effets histopathologiques de la fraction C2 sur le myocarde**

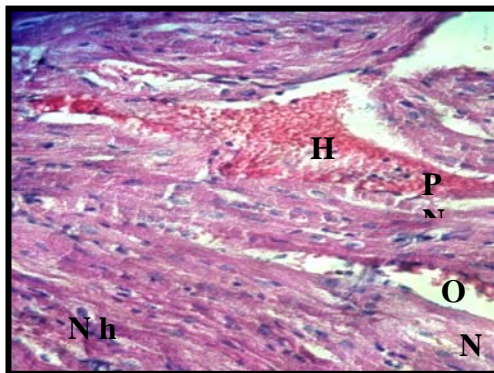
La fraction C2 issue de la chromatographie échangeuse de cations CM Sephadex C- 50 est Injectée a des souris par voie intra péritonéale avec deux doses (25 et 50 µg).

Une envenimation avec la dose subletale, montre après 3 heures, au niveau du myocarde, un peu d'hémorragie et un œdème interstitiel. La structure des cellules est conservée, cependant, certains noyaux sont hypertrophiés. Après 24 heures d'envenimation, l'œdème devient extensif, l'hémorragie plus intense, il y 'a apparition de cellules inflammatoires dans l'espace intercellulaire et les fibres musculaires paraissent désorganisées (Figure 27 ).

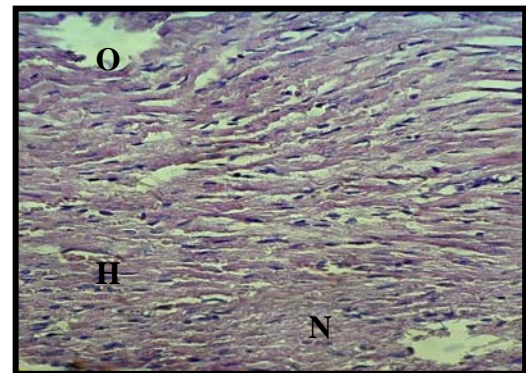
La fraction C2 avec une dose équivalente à une DL50 induit après 3 heures d'envenimation, des foyers hémorragiques, la formation d'œdème, et un début de désorganisation cellulaire.



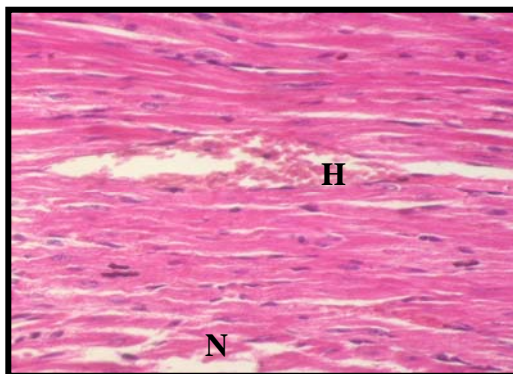
Muscle cardiaque témoin



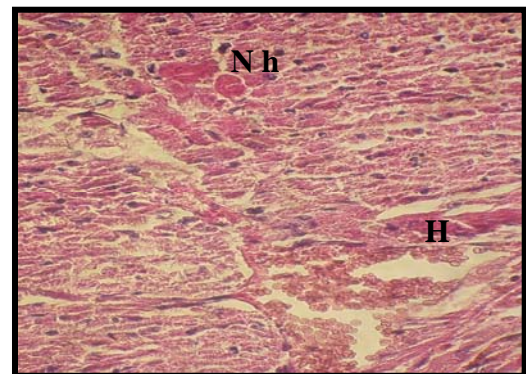
Venin sublétale 3 h



Venin sublétale 24 h



Fraction C2 sublétale 3 h

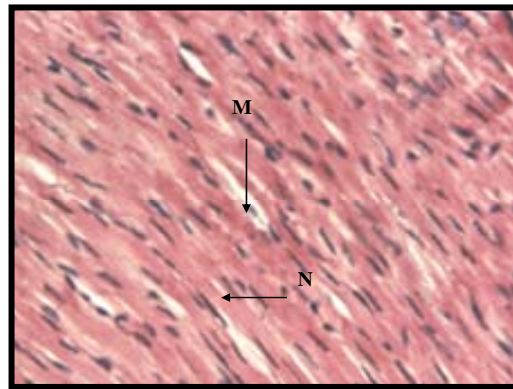


Fraction C2 sublétale 24 h

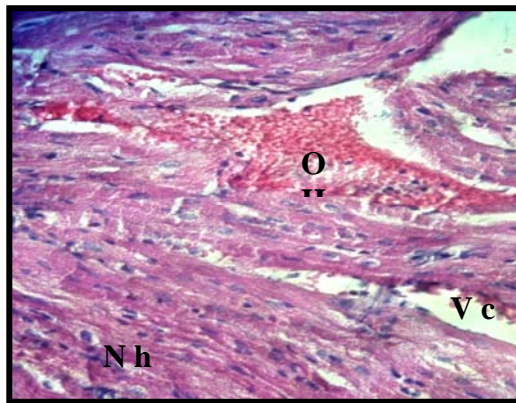
Figure 27 : Altération du muscle cardiaque de souris après envenimation 3 et 24 h avec une dose sublétale (25 µg) de venin de *Cerastes cerastes* et de sa fraction C2.

Coloration H & E. Gr X 400

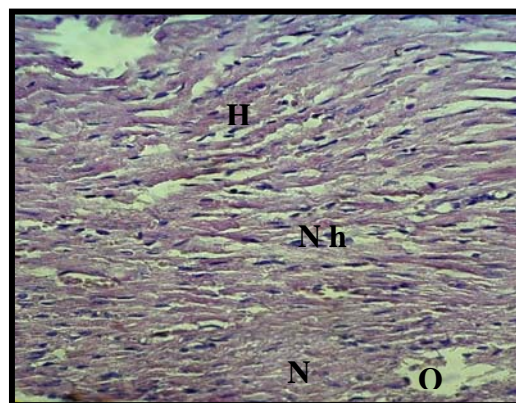
PN : Polynucléaire ; H : Hémorragie ; O : Œdème ; N : Nécrose ; N h : Noyaux hypertrophiés



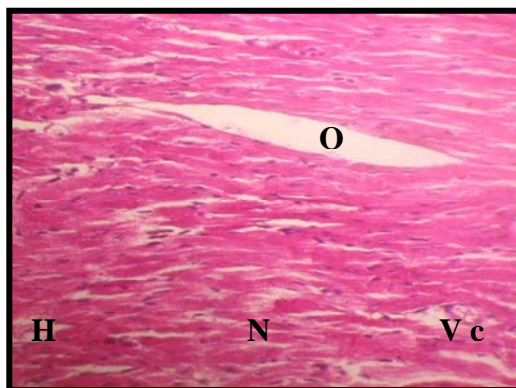
Muscle cardiaque témoin



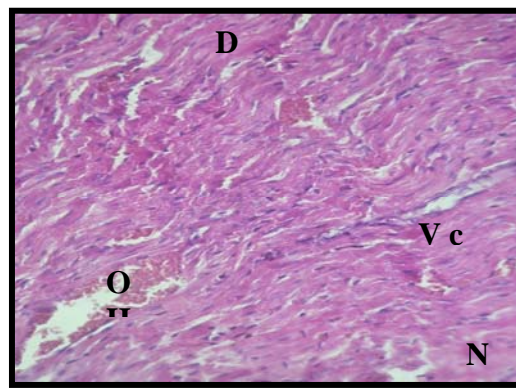
Venin sublétale 3 h



Venin sublétale 24 h



Fraction D1 sublétale 3 h



Fraction D1 sublétale 24 h

Figure 28 : Altération du muscle cardiaque de souris après envenimation avec une dose sublétale (25  $\mu$ g) de venin de *Cerastes cerastes* et de sa fraction D1.

Coloration H & E. GrX 400

**H** : Hémorragie ; **O** : Œdème ; **N** : Nécrose ; **Nh** : Noyaux hypertrophiés ; **Oh** : œdème hémorragique ; **Vc** : vaisseau congestif

Après 24 heures d'envenimation, l'hémorragie est plus importante, l'œdème y est hémorragique.

Il y'a présence de cellules inflammatoires. Certains noyaux sont irréguliers et d'autres ont disparus.

Certains myocytes semblent être fragmentés (Figure 29).

### **III.3.3.3 Effets histopathologiques de la fraction D1 sur le myocarde**

La fraction phospholipasique obtenue après une série de chromatographies est injectée à différentes doses (25 et 50 µg) par voie (i,p) pour le muscle cardiaque.

Après 3 heures d'envenimation avec une dose sub létale de la fraction D1, il apparaît au niveau du myocarde des plages hémorragiques, un œdème et la présence d'éléments inflammatoires constitués essentiellement par des polynucléaires neutrophiles, les vaisseaux sont congestifs mais la structure des cellules musculaires est plus ou moins conservée.

Après 24 heures d'envenimation, les foyers hémorragiques sont plus importants, l'œdème est plus étendu, les fibres myocardiques désorganisées, avec apparition de foyers de nécrose, la majorité des noyaux sont hypertrophiés, d'autres sont caryolisés (Figure 28 ).

Une dose (50 µg) correspondant à un DL50 de la fraction D1 induit, après 3 heures d'envenimation, l'apparition d'un œdème interstitiel important. Plusieurs foyers hémorragiques sont observés, les noyaux sont hypertrophiés, les fibres musculaires sont ondulées et de taille rétrécie avec apparition de cellules inflammatoires (Figure 30).

Après 24 heures, l'hémorragie est plus étendue, certains noyaux sont hypertrophiés et d'autres ont subi une caryolyse et d'autres ont disparus. L'œdème est persistant (Figure 30 ).

### **III.3.3.4 Effets histopathologiques du venin de *Cerastes cerastes* sur le muscle squelettique**

La myonécrose induite par le venin de *Cerastes cerastes* au niveau du muscle squelettique est mise en évidence suite a une envenimation avec 2 doses de venin 25 et 50µg et à deux intervalles de temps 3 heures et 24 heures.

L'analyse histologique des muscles de souris témoins montre des cellules cylindriques avec des noyaux ovoïdes situés en périphérie de la fibre musculaire.

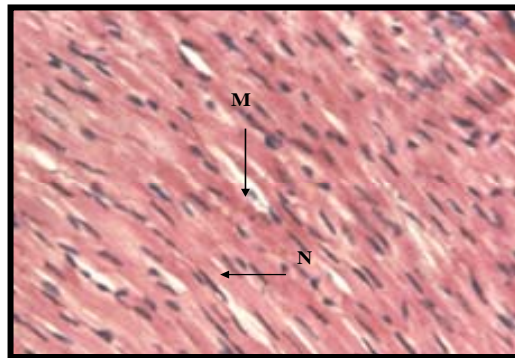
Après 3 heures d'envenimation, il y'a formation d'un œdème interstitiel, les cellules musculaires paraissent atrophiées avec un début de nécrose. L'hémorragie est présente accompagnée d'une infiltration de nombreux polynucléaires. Les vaisseaux sont congestifs ( Figure 31 ).

Après 24 heures d'envenimation avec le venin de *Cerastes cerastes*, l'hémorragie est plus importante, l'œdème extensif, les signes de nécrose sont plus apparents, ils se manifestent par une altération des myofibrilles et l'infiltrat inflammatoire est persistant, (Figure 31 ).

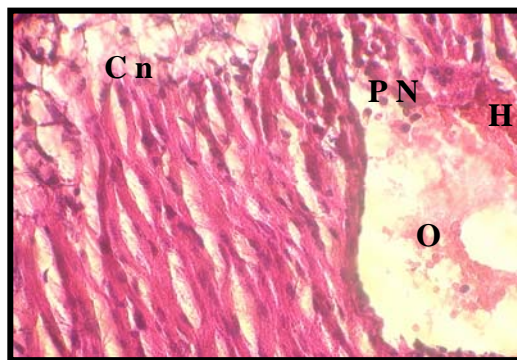
L'injection aux souris d'une DL50 de venin de *Cerastes cerastes* par voie (i, m) provoque dès 3 heures des altérations musculaires caractérisées par une forte hémorragie, la formation d'un œdème important, une infiltration leucocytaire et une altération des cellules musculaires (Figure 33 ).

Après 24 h d'envenimation, l'hémorragie est très étendue et la nécrose intense. En effet, les cellules musculaires ne sont plus délimitées, il y'a perte totale de la structure cellulaire

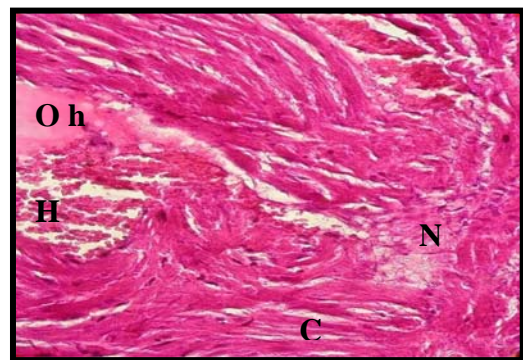
(cytolyse), des fantôme de noyaux sont observés et une infiltration massive des polynucléaires (Figure 33 ).



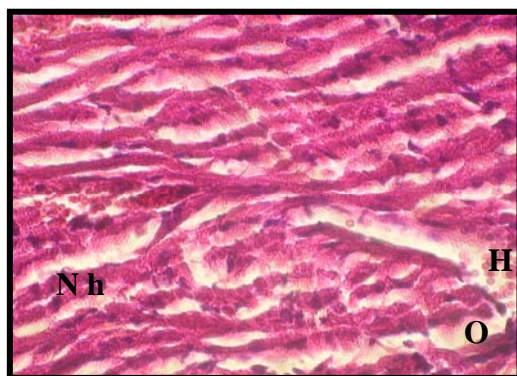
Muscle cardiaque témoin



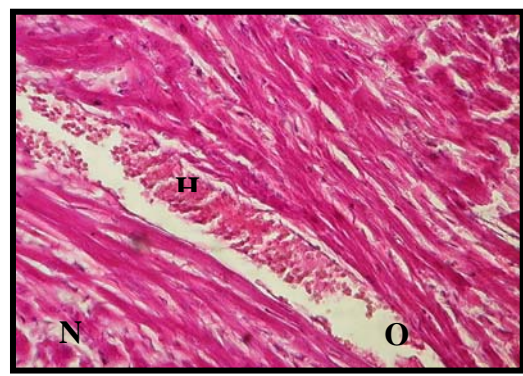
Venin DL50 3h



Venin DL50 24 h



Fraction C2 DL50 3 h



Fraction C2 DL50 24 h

Figure 29: Altération du muscle cardiaque de souris après envenimation avec une DL50 de venin de *Cerastes cerastes* et de sa fraction C2.

Coloration H & E. GrX 400

PN : Polynucléaire ; H : Hémorragie ; O : Œdème ; N : Nécrose ; C n : cellule nécrosée ; C : caryolyse ; Oh : œdème hémorragique ; Nh : noyaux hypertrophiés

### **III.3.3.5 Effets histopathologiques de la fraction C2 sur les muscles squelettique**

Au niveau du muscle squelettique, 3 heures après envenimation avec une dose sublétales de la fraction C2, une hémorragie et un infiltrat inflammatoire sont observés, l'apparition d'un œdème interstitiel et quelques cellules musculaires paraissent atrophiées (Figure 31 ).

Après 24 heures d'envenimation avec cette même fraction, les cellules inflammatoires sont très nombreuses, avec infiltration graisseuse, la nécrose musculaire est très apparente, elle est caractérisée par une désorganisation des fibres musculaires. Certaines cellules sont atrophiées et d'autres lysées. Il y'a un œdème hémorragique plus important (Figure 31 ).

L'injection d'une DL50 correspondant à (50 µg) de la fraction C2 induit une forte hémorragie, un infiltrat inflammatoire très important et un œdème interstitiel, il y'a un début de nécrose cellulaire; Certaines cellules sont atrophiées et d'autres lysées.

Après 24 heures d'envenimation, l'infiltrat inflammatoire est plus important et persistant, l'hémorragie est intense, la plupart des cellules sont lysées et les noyaux caryolysés (Figure 33 ).

### **III.3.3.6 Effets histopathologiques de la fraction D1 au niveau du muscle squelettique**

La fraction phospholipasique obtenue après une série de chromatographies est injectée par voie (i, m) à des souris et à différentes doses (25 et 50 µg).

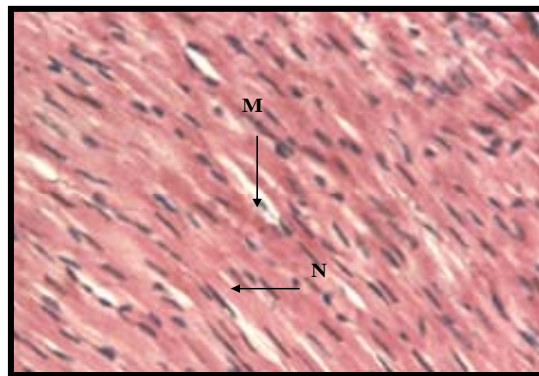
Au niveau du muscle squelettique, l'injection d'une dose sublétales de la fraction D1 induit, après 3 heures d'envenimation, la formation d'un œdème, la présence de quelques foyers hémorragiques, une infiltration de cellules inflammatoires mais la structure des fibres musculaires est conservée (Figure 32 ).

Après 24 heures ; l'hémorragie est plus étendue, l'œdème plus important, il y'a présence de cellules inflammatoires et de quelques foyers de nécrose (Figure 32 ).

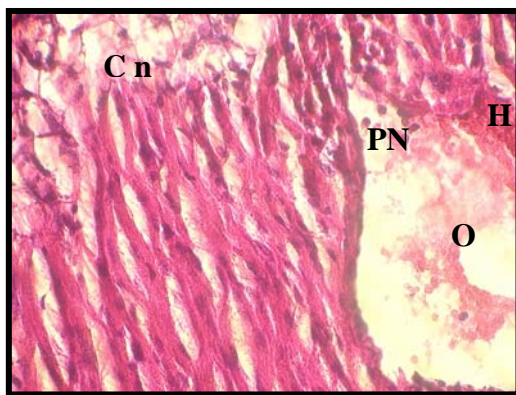
L'injection d'une DL50 (50 µg) de la fraction D1 provoque après 3 heures d'envenimation, une infiltration leucocytaire très marquée à prédominance polynucléaire, la présence de nappes hémorragiques est observée mais la structure des cellules est plus ou moins conservée (Figure 34 ).

Après 24 heures d'envenimation, l'œdème est extensif, l'hémorragie est plus étendue, les cellules inflammatoires sont plus nombreuses, certaines fibres cellulaires sont nécrosées et les noyaux sont hypertrophiés (Figure34).

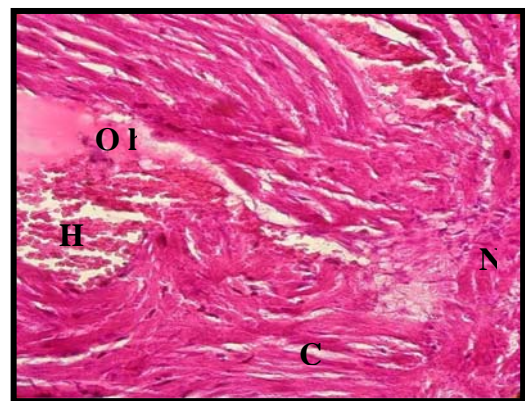
L'envenimation avec les fractions D1 et C2 montre des altérations tissulaires moins importantes que celles induites par le venin natif quelle que soit dose administrée.



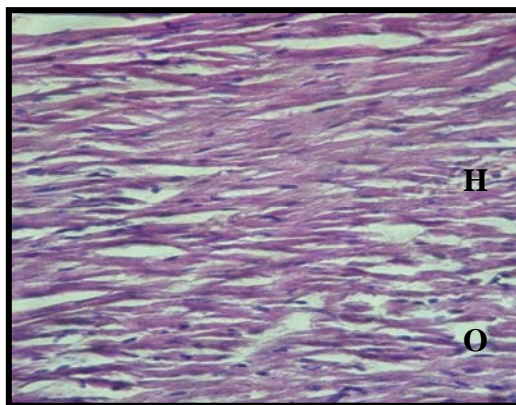
Muscle cardiaque témoin



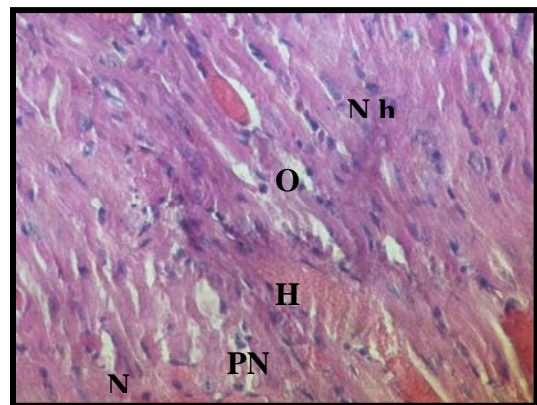
Venin DL50 3h



Venin DL 50 24 h



Fraction D1DL 50 3 h

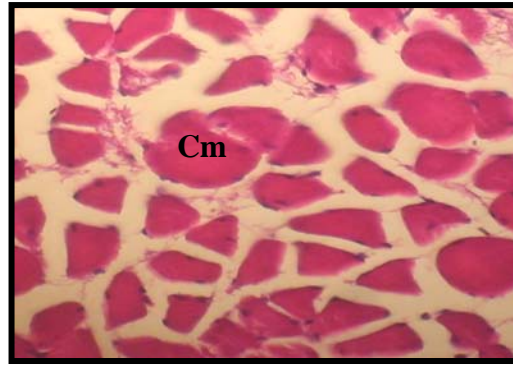


Fraction D1DL 50 24 h

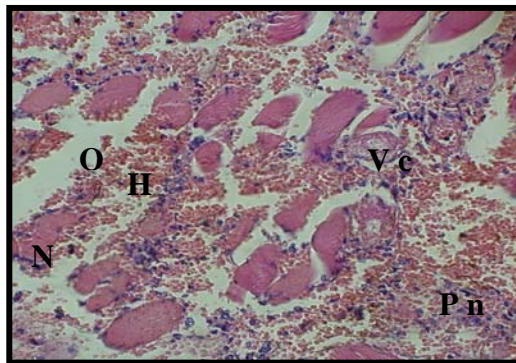
Figure 30 : Altération du muscle cardiaque de souris après envenimation avec une DL50 (50 µg) de venin de *Cerastes cerastes* et de sa fraction D1.

Coloration H & E. GrX 400

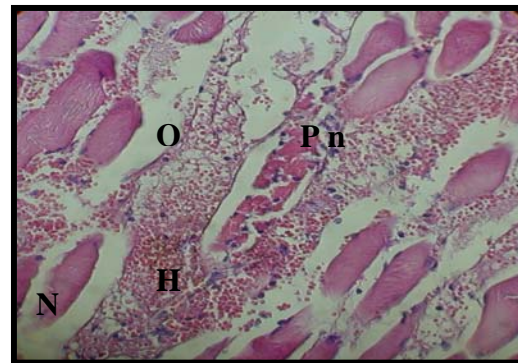
Cn : Cellules nécrosées , PN : Polynucléaire ; H : Hémorragie ; O : Œdème ; Oh : Œdème hémorragique ; N : Nécrose ; C : Caryolyse ; Nh : Noyaux hypertrophiés



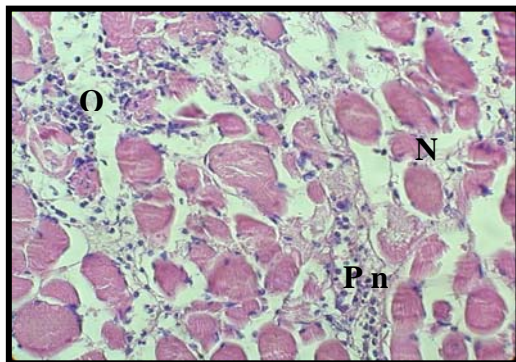
Témoin Muscle GX 400



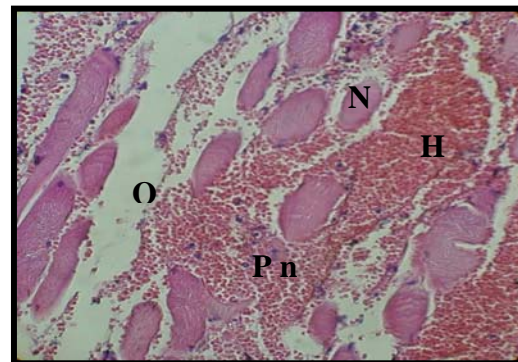
Venin (sublétale) 3h



Venin (sublétale) 24h



Fraction C2 (sublétale) 3 h



Fraction C2 (sublétale) 24

Figure 31 : Altération du muscle squelettique de souris après envenimation avec une dose sublétales de venin de *Cerastes cerastes* et de sa fraction C2.

Coloration H & E. GrX 400

PN : Polynucléaire ; H : Hémorragie ; O : Œdème ; N : Nécrose ; Cm : cellules musculaire ;

Les résultats obtenus à partir de l'étude histologique montrent que le venin de *Cerastes cerastes* induit une hémorragie, la formation d'œdème et des nécroses au niveau du myocarde qui pourraient être dues à l'action des myotoxines présentes dans le venin et qui semblent provoquer une lyse cellulaire comme c'est le cas des venins de *Crotalus durissus*, *Naja nigricollis*, *Vipera berus* et *Echis carinatus* (Pena et al; 2002).

Les altérations histologiques provoquées par le venin de *Cerastes cerastes* pourraient être dues à ses constituants qui affectent le processus musculaire. Les composants de ce venin peuvent avoir des effets indépendants et/ou synergiques (La myonécrose générée par le venin de *Cerastes cerastes* est probablement due à un effet synergique de ses constituants car les altérations induites par le venin natif sont nettement plus spectaculaires que celles induites par la fraction phospholipasique.

La myonécrose causée par les venins de serpents est probablement due à l'action indirecte comme conséquence de la dégénérescence des vaisseaux et de l'ischémie causée par les métalloprotéases à zinc qui digèrent les constituants de la membrane basale des cellules endothéliales et la matrice extracellulaire, induisant la destruction de l'endothélium ce qui permet le déversement des hématies à partir de la vasculature ou par un effet hydrolytique direct des PLA2 au niveau de la membrane plasmique des myocytes (Rosenfeld, 1971; Iddon et al, 1985; Rodrigues, 2004).

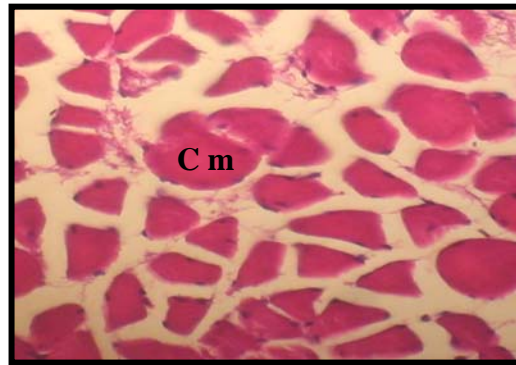
Les PLA2 sont les principaux constituants responsables des altérations musculaires. Elles affectent l'intégrité de la membrane plasmique (activité phospholipolytique). Les lysophospholipides ainsi libérés sont capables d'induire la nécrose musculaire. L'altération de la structure membranaire entraîne une augmentation de sa perméabilité aux macromolécules et ions (Diaz-Oreiro et Gutierrez, 1996; Gutiérrez et Ownby, 2003; Harris, 2003).

L'augmentation du calcium cytosolique est une étape critique dans le processus de la mort cellulaire. Dans le muscle squelettique, l'augmentation de calcium stimule l'hypercontraction des myofilaments et peut causer l'autolyse des fibres musculaires en activant les PLA2 endogènes et les protéinases Ca<sup>++</sup>-dépendantes (Shier, 1982; Gutierrez et al, 1983; Trump et al, 1982; Harris, 1984).

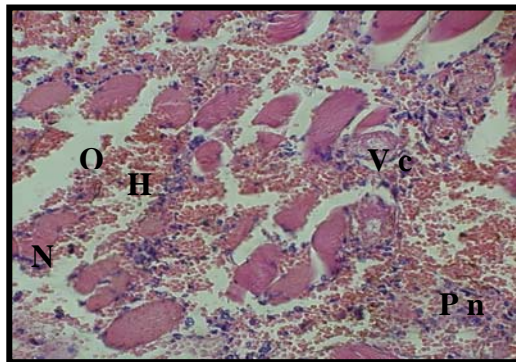
Du point de vue histologique, la myonécrose implique principalement une augmentation de la perméabilité des fibres musculaires, elles paraissent ondulées, leur taille est rétrécie et deviennent hémorragiques. L'hypercontraction des fibres crée une augmentation des espaces intercellulaires, une modification du diamètre des myofilaments, une rupture du sarcolemme et une accumulation extracellulaire de CK (Mebis et al, 1983; Melo et Suarez-Kurtz, 1987).

L'hémorragie et l'œdème sont deux phénomènes qui accompagnent la myonécrose causée par les venins de *viperidae*. L'œdème semble être causé par un déséquilibre entre la pompe Sodium-Potassium et Calcium-ATPase (Mebis et al; 1989; Larsen et al, 1990).

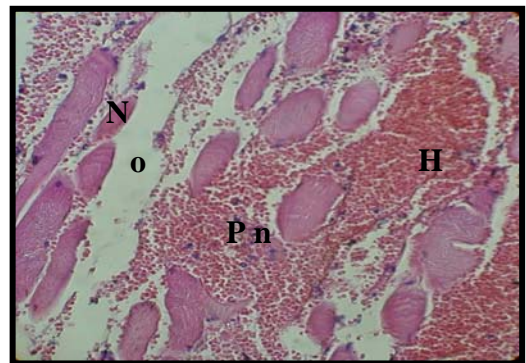
L'hémorragie est toujours associée à la myonécrose après envenimation par *Cerastes cerastes*. Elle est probablement la conséquence de l'effet indirect des hémorragines. Cette suggestion est en accord avec les travaux de Gay et al (2005) réalisés sur une métalloprotéase isolée à partir du venin de *Bothrops alternatus*; Ou de l'effet direct des PLA2; en effet l'ischémie locale



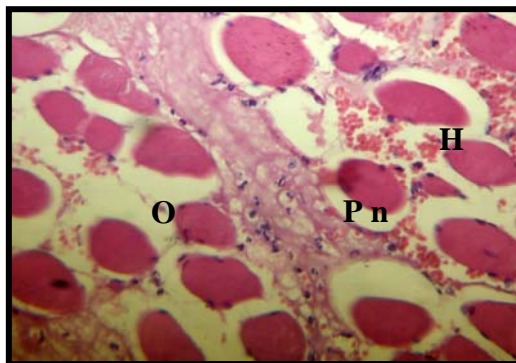
Témoin Muscle GX 400



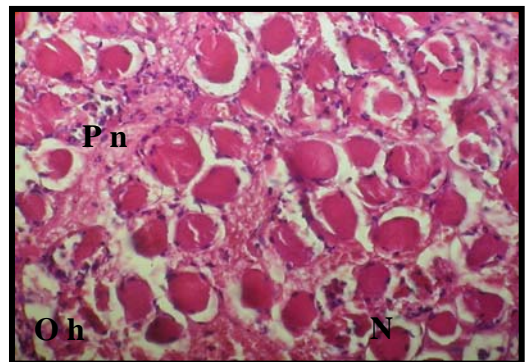
Venin (sublétale) 3h 3h



Venin (sublétale) 24h



Fraction D1 (sublétale) 3 h

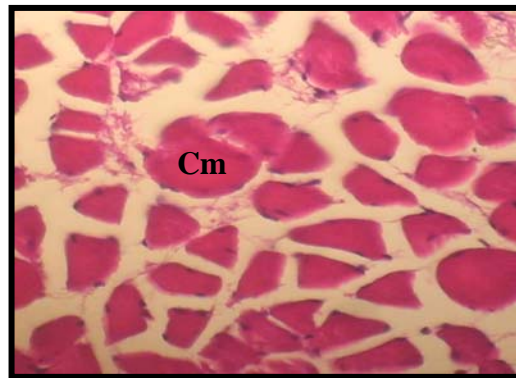


Fraction D1 (sublétale)

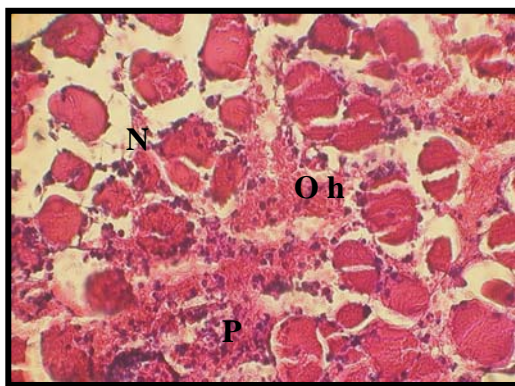
Figure 32 : Altération du muscle squelettique de souris après envenimation avec une dose sublétale de venin de *Cerastes cerastes* et de sa fraction D1.

Coloration H & E. GrX 400

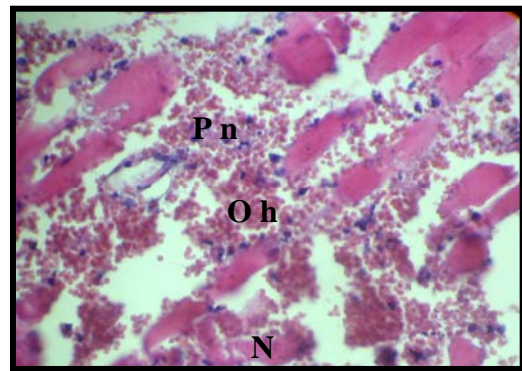
PN : Polynucléaire ; H : Hémorragie ; O : Œdème ; N : Nécrose ; C m : cellule musculaire ; V c : vaisseau congestif ; Oh : œdème hémorragique



Témoin Muscle (GX 400)



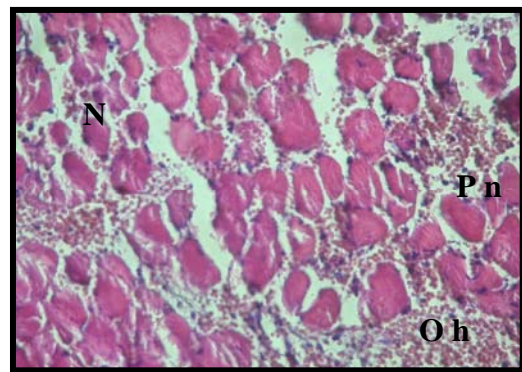
Venin (DL50) 3 h



Venin (DL50) 24 h



Fraction C2 (DL50) 3

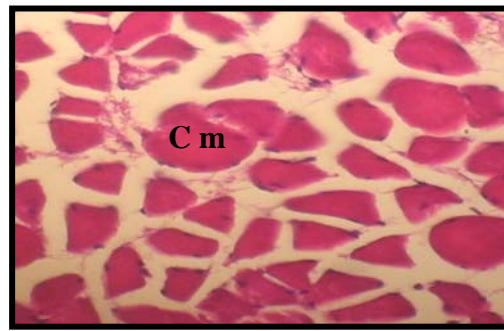


Fraction C2 (DL50) 24 h

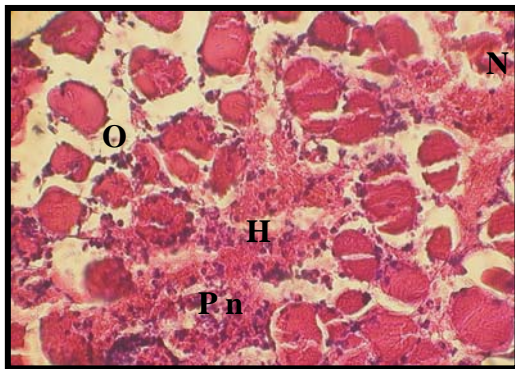
**Figure 33: Altération du muscle squelettique de souris après envenimation avec une DL50 de venin de *Cerastes cerastes* et de sa fraction C2.**

**Coloration H & E. GrX 400**

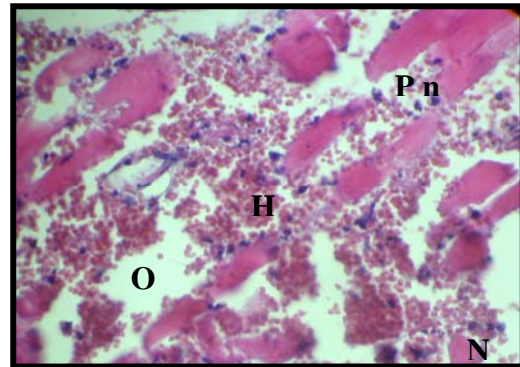
**PN** : Polynucléaire ; **H** : Hémorragie ; **O** : Œdème ; **N** : Nécrose ; **Oh** : œdème hémorragique ; **Cm** : cellule musculaire ; **Cn** : cellule nécrosé



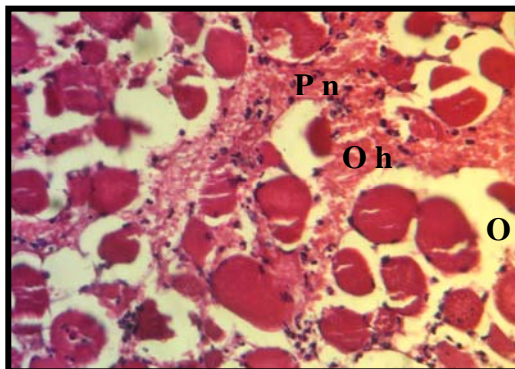
Témoin Muscle (GX 400)



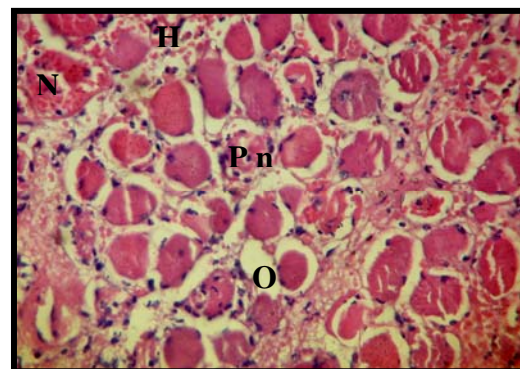
Venin (DL50) 3 h



Venin (DL50) 24 h



Fraction D1(DL50) 3h



Fraction D1 (DL50) 24h

**Figure 34: Altération du muscle squelettique de souris après envenimation avec une 50 de venin de *Cerastes cerastes* et de sa fraction D1.  
Coloration H & E. GrX 400**

**Pn** : Polynucléaire ; **H** : Hémorragie ; **O** : Œdème ; **N** : Nécrose ; **N h** : Noyaux hypertrophiés

produite par une lésion artérielle est due à l'action hydrolytique des PLA2. L'ischémie est associée à une hypoxie cellulaire et l'accumulation de lactate empêche la contraction musculaire. C'est le cas de ACL-I, une PLA2 isolée à partir du venin d'*Agkistrodon cotortrix laticinctus* et une PLA2 isolée à partir de *Bothrops asper* (Leite; 2004).

La myonécrose est également accompagnée d'une réponse inflammatoire caractérisée par une infiltration des cellules phagocytaires dans les espaces perivasculaires (Preston et al; 1990).

Les mêmes altérations ont été observées après injection de venin de *Pseudechis australis*, d'une PLA2 isolée à partir du venin de *Daboia russeli siamensis* ou de deux myotoxines BnpTx-1 et BnpTx-2 isolées à partir du venin de *Bothrops neuwiedi* (Gopalakrishnakone, 1997; Rodrigues et al, 2004).

### **III.4 Effet du venin de *Cerastes cerastes* et de ses fractions sur le métabolisme musculaire cardiaque et squelettique**

Le dosage de l'activité enzymatique de la créatine kinase (CK) dans les tissus musculaires cardiaque et squelettique et dans le sérum, permet de déterminer l'état des cellules dans les cas pathologiques telle que la myonécrose (Mebs et al, 1983, Gutiérrez et al, 1983; Nakada et al 1984; Melo et Kurtz, 1988; Preston et al, 1990).

#### **III.4.1. Effet myotoxique du venin de *Cerastes cerastes* sur le myocarde et le muscle squelettique**

L'envenimation de souris avec deux doses (sublétale et DL50) de venin de *Cerastes cerastes* par voie intra péritonéale a permis de suivre la variation de l'activité CK au niveau du myocarde après 3 heures et 24 heures d'envenimation.

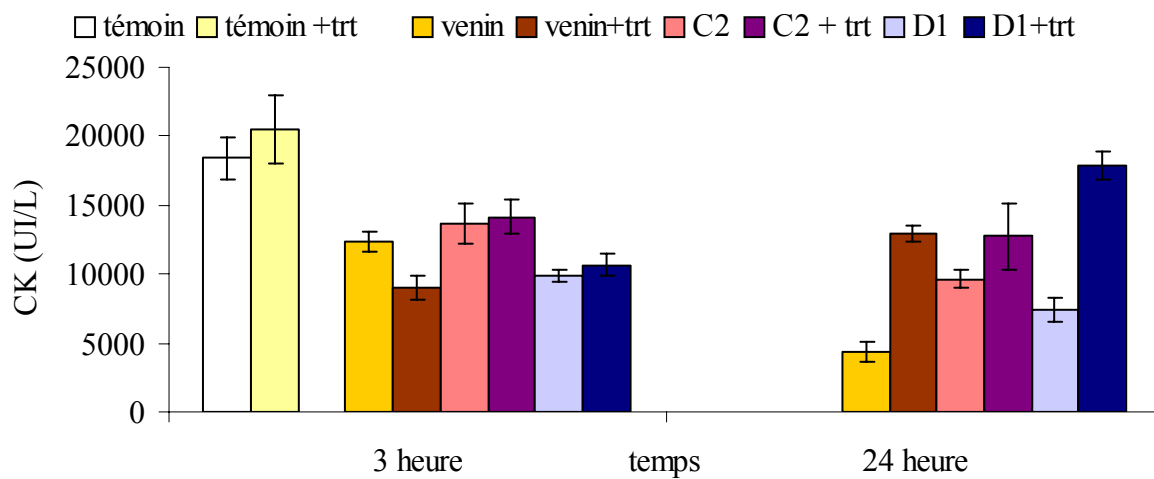
Le taux de CK diminue dans le cœur d'une manière temps et dose-dépendante. En effet avec une dose sublétale, l'activité CK diminue de 30,73 % à 3 heures et de 56,54 % à 24 heures (Figure 35).

Le venin de *Cerastes cerastes* utilisé avec une dose correspondant à une (DL50) induit une diminution plus importante de cette enzyme au niveau du myocarde

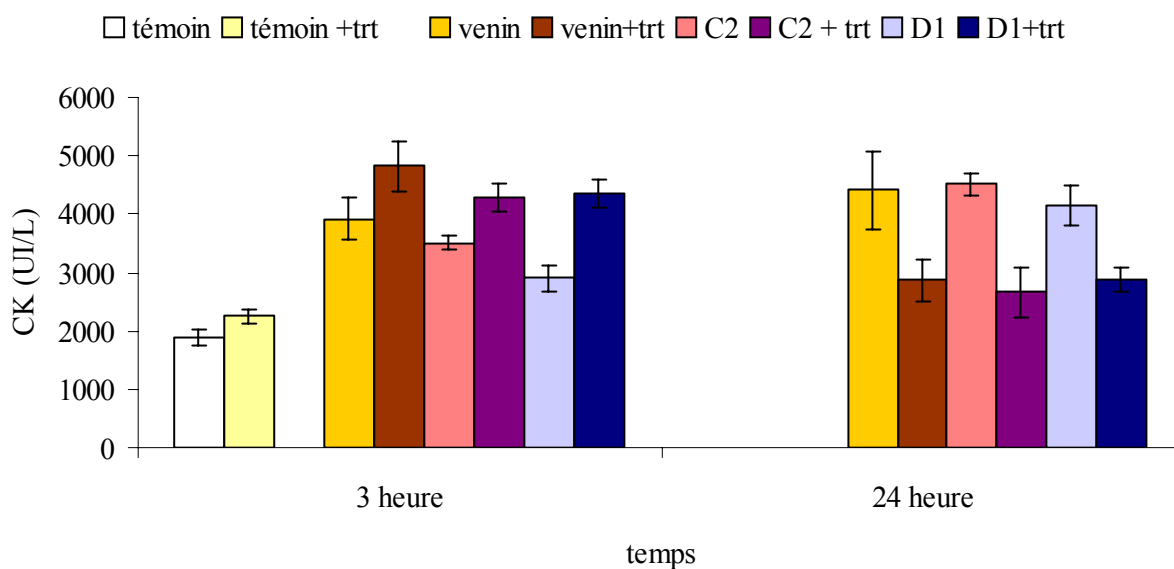
Parallèlement à sa diminution cardiaque, l'activité enzymatique de la CK est augmentée dans le sérum de la même manière que sa diminution tissulaire c'est à dire dose et temps dépendante. Cette augmentation sérique est proportionnelle à la concentration de venin injectée. L'injection d'une DL50 de venin induit une libération plus importante de CK dans le milieu extracellulaire. Cette libération de CK persiste au-delà de 24 heures, elle est plus importante qu'après 3 heures d'envenimation ( Figure 36).

Des résultats similaires ont été obtenus après envenimation accidentelle de 2 enfants par *Crotalus durissus terrificus* ; Oú, une libération de CK, LDH et TGO a été observée avec des pics qui se situent respectivement à 24, 48 et 72 heures. Cette élévation est corrélée à une nécrose du tissu musculaire squelettique (Cupo et al, 1988).

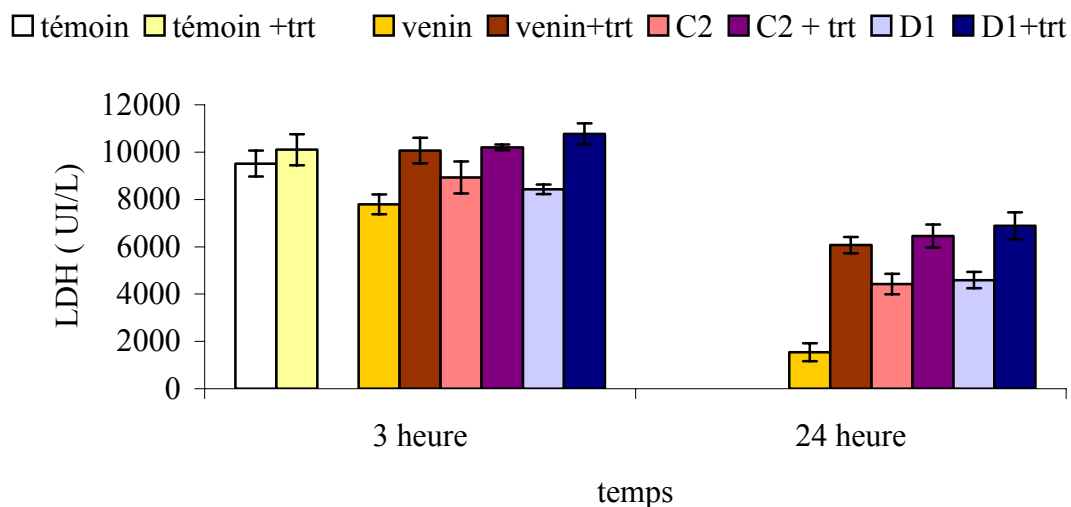
Le venin de *Notechis Scutatus* induit une élévation du taux de CK et de TGO, les pics se situent respectivement à 3 heures et entre 16 et 24 heures d'envenimation. L'augmentation de l'activité CK dans le sérum est proportionnelle aux altérations tissulaires musculaires (Preston et al, 1990)



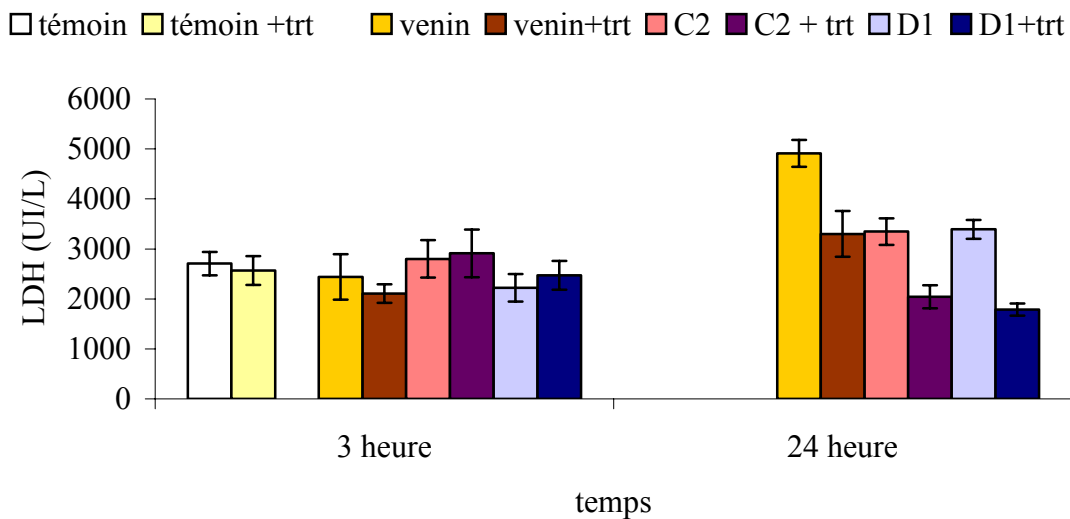
**Figure 35** : Cinétique de l'activité de la créatine Kinase dans le coeur de souris envenimées avec une dose sublétales de venin de *Cerastes cerastes* et de ses fractions C2 et D1 pré et post traitement



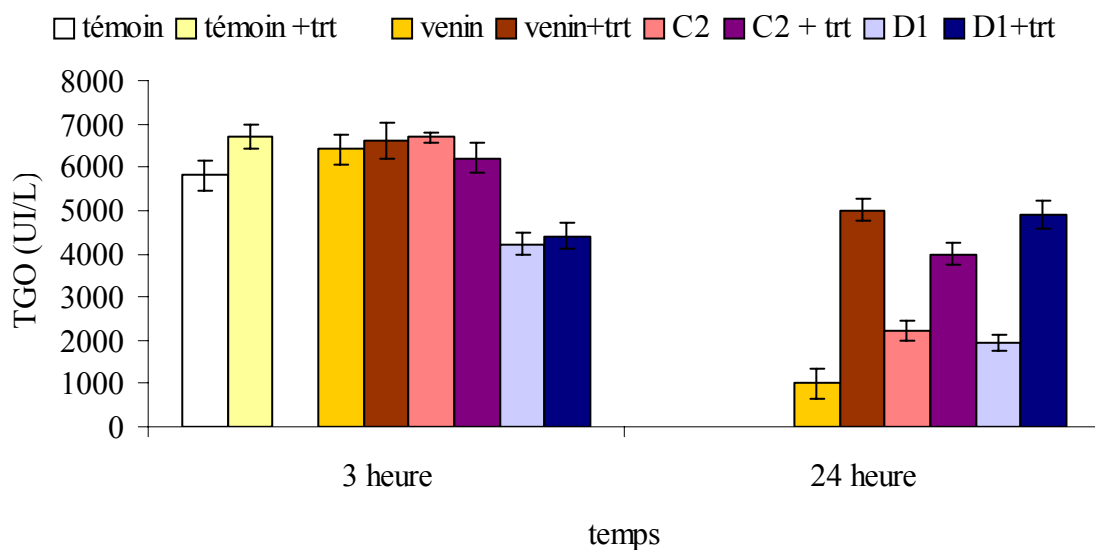
**Figure 36** : Cinétique de l'activité de la créatine Kinase dans le sérum de souris envenimées avec une dose sublétales de venin de *Cerastes cerastes* et de ses fractions C2 et D1 par voie i.p, pré et post traitement



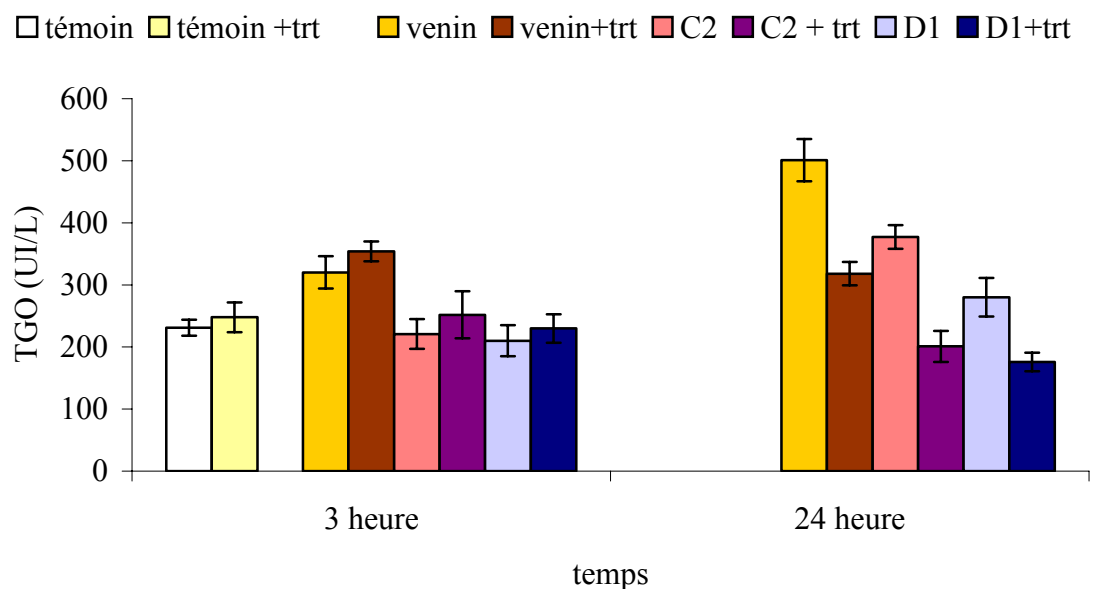
**Figure 37 :** Cinétique de l'activité de la Lactate Déshydrogénase dans le coeur de souris envenimées avec une dose sublétales de venin de *Cerastes cerastes* et de ses fractions C2 et D1 pré et post traitement



**Figure 38 :** Cinétique de l'activité de la Lactate Déshydrogénase dans le sérum de souris envenimées avec une dose sublétales de venin de *Cerastes cerastes* et de ses fractions C2 et D1 pré et post traitement par voie i.p



**Figure 39** : Cinétique de l'activité de la TGO dans le coeur de souris envenimées avec une dose sub létale de venin de *Cerastes cerastes* et de ses fractions C2 et D1 pré et post traitement



**Figure 40** : Cinétique de l'activité de TGO dans le sérum de souris envenimées avec une dose sub létale de venin de *Cerastes cerastes* et de ses fractions C2 et D1 pré et post traitement par voie i.p

### **III.4.2 Dosage de l'activité de la créatine Kinase dans le sérum, les muscles squelettique et cardiaque de souris envenimées avec la fraction C2**

L'injection d'une dose sub létale et d'une DL50 de la fraction C2 issue de la chromatographie échangeuse d'ions CM Sephadex C-50 induit également une augmentation de l'activité de la créatine Kinase sérique par voie i.p (figure 36) et par voie i.m (figure 42). Cette augmentation sérique est corrélée avec sa diminution dans les muscles cardiaque ( figure 35) et squelettique (figure 41).

Cette diminution est temps et dose dépendante comme il a été observé pour le venin de *Cerastes cerastes*.

### **III.4.3 Dosage de l'activité de la créatine Kinase dans le sérum, les muscles squelettique et cardiaque de souris envenimées avec la fraction purifiée D1 du venin de *Cerastes cerastes***

L'élévation du taux de Créatine kinase dans le sérum est un indicateur des altérations musculaires (Nakada et al, 1984).

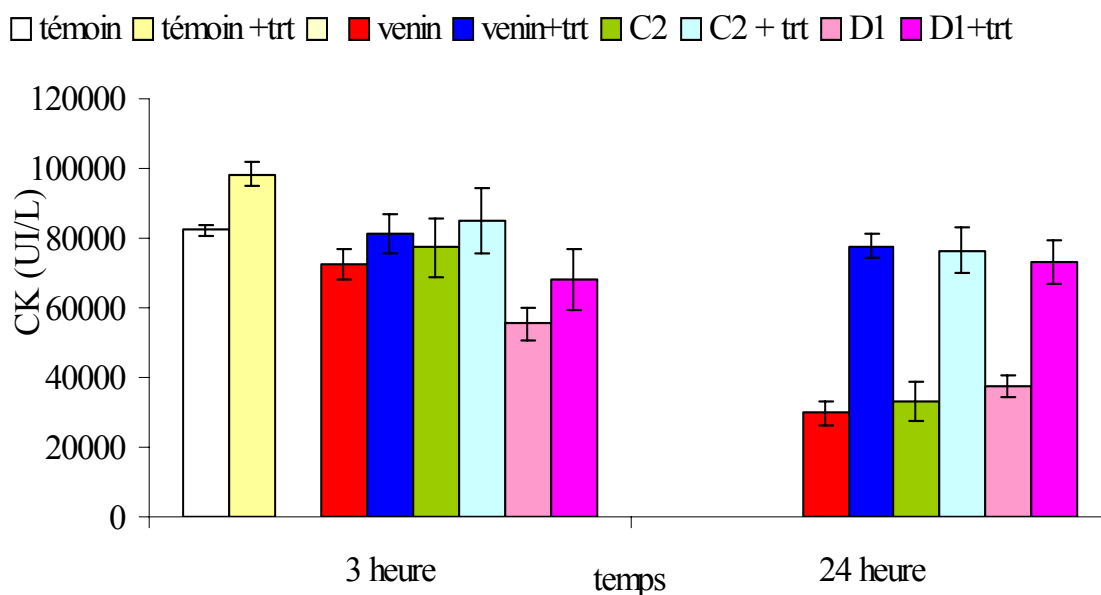
La fraction D1 douée d'activité phospholipasique et myotoxique induit une diminution du taux de Créatine Kinase au niveau des muscles squelettique et cardiaque. Cette diminution tissulaire est accompagnée d'une élévation du taux de la CK sérique (Figure 36 et 42) Cette cinétique est graduelle, comme pour le venin et la fraction C2, dose et temps dépendante, mais cette libération de CK est moins importante que celle induite par le venin.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Gutiérrez et al (1983), après injection d'une PLA2 isolée à partir du venin de *Bothrops asper* et du venin natif, l'augmentation du taux de Créatine kinase sérique est plus importante avec le venin.

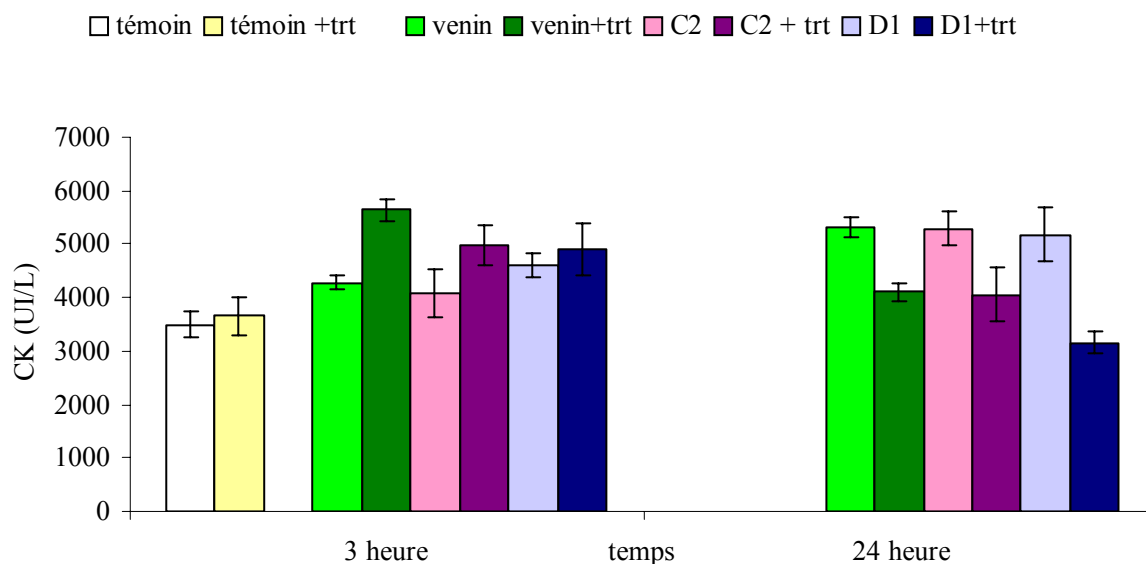
Une PLA2 isolée à partir du venin de *Pseudechis colletti* (Mebs et al, 1982), La myotoxine I du venin de *Bothrops atrox* (Nunez et al, 2004), BnpTx-II, BnpTx-I; 2 PLA2 isolée à partir du venin de *Bothrops neuwiedi pauloensis* (Rodrigues et al, 2004) induisent également une élévation de l'activité CK dans le sérum.

NN – Xia une PLA2 isolée à partir du venin de *naja naja* (Cobra indien) induit une augmentation de l'activité CK et de l'activité LDH dans le sérum de leurs victimes (Basavarajappa et al ; 1992)

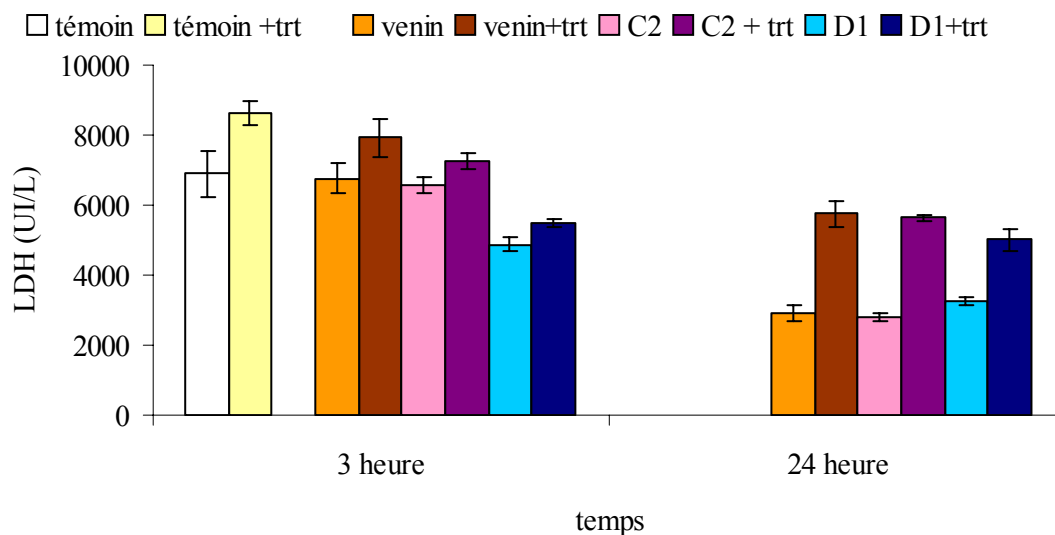
L'accumulation de la Créatine Kinase dans le milieu extracellulaire est proportionnelle aux lésions du sarcolemme causées par les myotoxines du venin ; elle reflète le degré d'altération musculaire; Plus la concentration sérique est élevée et plus importants sont les dégâts lésionnels. Il y'a une bonne corrélation entre la myotoxicité et la myonécrose (Mebs et al, 1983 ; Melo et Swarez –Kurts 1987; S.R. Zamuner et al, 2004).



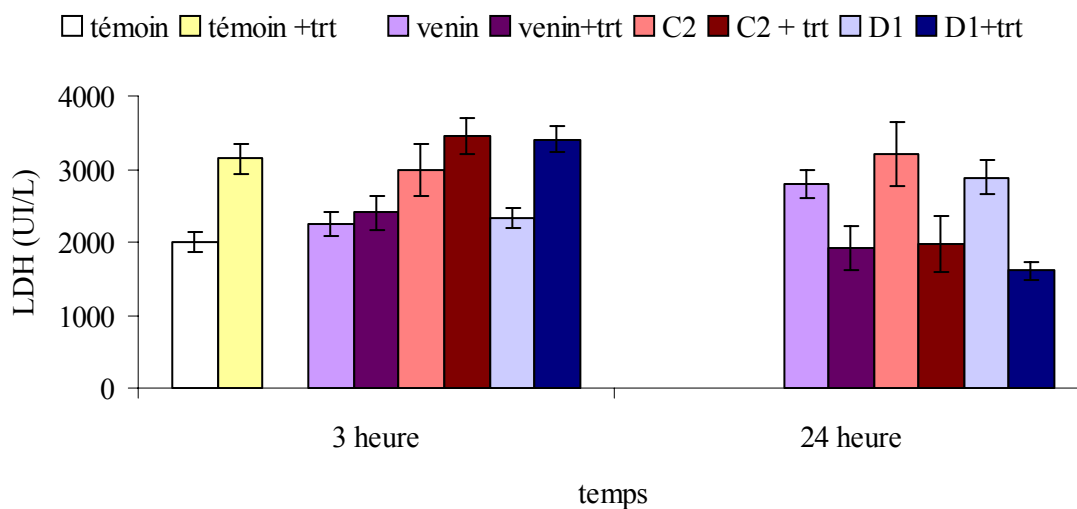
**Figure 41 :** Cinétique de l'activité de la créatine Kinase dans le muscle squelettique de souris envenimées avec une dose sub létale de venin de *Cerastes cerastes* et de ses fractions C2 et D1 pré et post traitement



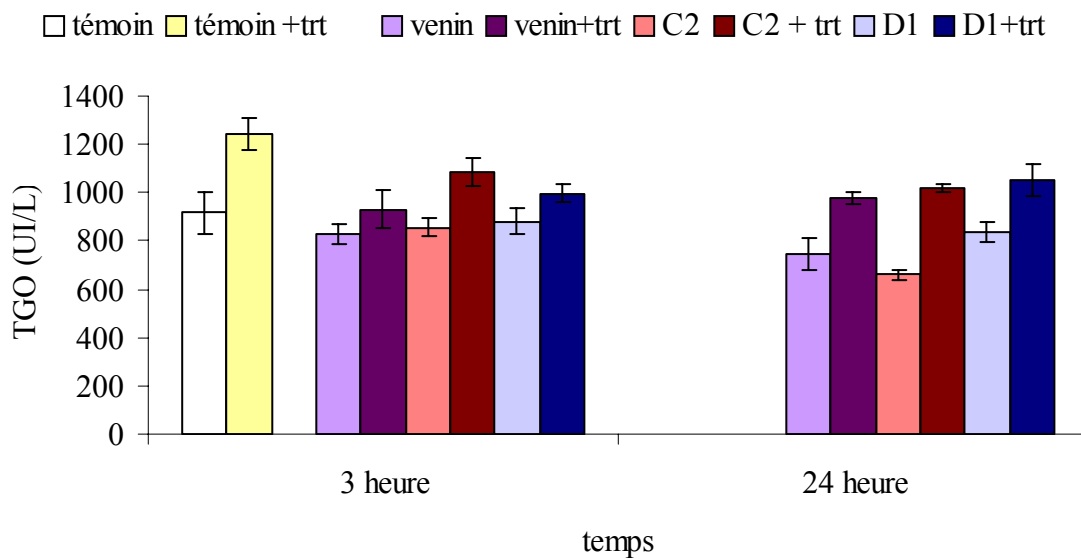
**Figure 42 :** Cinétique de l'activité de la Créatine Kinase dans le sérum de souris envenimées avec une dose sub létale de venin de *Cerastes cerastes* et de ses fractions C2 et D1 en intra musculaire, pré et post traitement



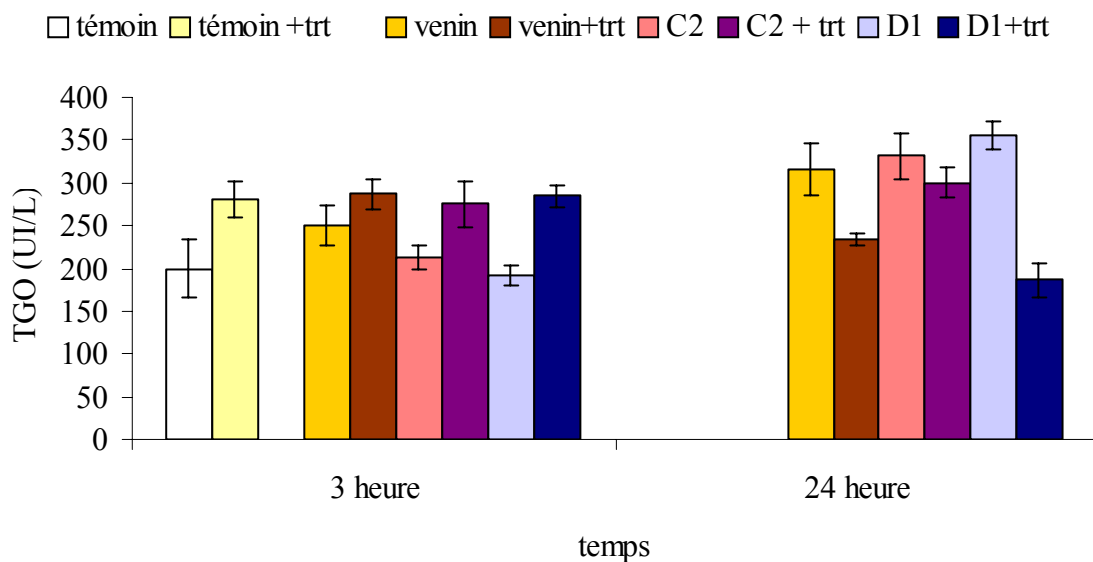
**Figure 43 :** Cinétique de l'activité de la Lactate Déshydrogénase dans le muscle squelettique de souris envenimées avec une dose sublétales de venin de *Cerastes cerastes* et de ses fractions C2 et D1 pré et post traitement



**Figure 44 :** Cinétique de l'activité de la Lactate Déshydrogénase dans le sérum de souris envenimées avec une dose sublétales de venin de *Cerastes cerastes* et de ses fractions C2 et D1 pré et post traitement par voie i.m.



**Figure 45 :** Cinétique de l'activité de la TGO dans le muscle squelettique de souris envenimées avec une dose sublétales de venin de *Cerastes cerastes* et de ses fractions C2 et D1 pré et post traitement



**Figure 46 :** Cinétique de l'activité de la TGO dans le sérum de souris envenimées avec une dose sublétales de venin de *Cerastes cerastes* et de ses fractions C2 et D1 pré et post traitement par voie i m

### **III.5 Effet du venin de *Cerastes cerastes* et des ses fractions sur l'activité de certaines enzymes impliquées dans le métabolisme musculaire TGO, TGP, LDH et CPK.**

L'étude des effets du venin de *Cerastes cerastes* et de ses fractions C2 et D1 sur les activités enzymatiques des transaminases (TGO, TGP) et de la LDH au niveau du cœur et du muscle squelettique a été réalisé sur des souris ayant reçues 2 doses (sublétale et létale) de venin, de la fraction C2 et de la fraction D1.

Les activités enzymatiques de la TGO, TGP et LDH dans le sérum et les homogénats de muscles squelettique et cardiaque sont déterminés après 3 heures et 24 heures d'envenimation.

Les résultats obtenus révèlent une baisse significative à 24 heures d'envenimation des activités LDH et TGO dans le cœur (figures 37 et 39) et dans le muscle squelettique (43 et 45) mais non significative de l'activité TGP.

Cette baisse des activités est proportionnelle à la dose de venin et des fractions injectées.

Parallèlement à sa baisse au niveau tissulaire, le taux enzymatique de la LDH augmente dans le sérum des souris envenimées par voie intra péritonéale (figure 38); par voie intramusculaire (figure 44).

Le taux de TGO augmente également dans le sérum des souris envenimées avec le venin ou les fractions C2 et D1, aussi bien par voie i.p (figure 40) que par voie i.m (figure 46).

Cette augmentation est progressive et atteint son maximum après 24 heures d'envenimation. En effet la libération de LDH et TGO est plus tardive que celle de la CK dont l'augmentation sérique débute après 3 heures d'envenimation.

Ce résultat pourrait s'expliquer également par le passage des enzymes depuis le compartiment tissulaire vers le compartiment sanguin. Ce passage est probablement provoqué par une cytolysse ou par une augmentation de la perméabilité cellulaire.

La diminution de l'activité enzymatique au niveau musculaire et cardiaque pourrait être due à l'inhibition de certaines enzymes; En effet l'accumulation de lactate dans les cellules musculaires (ischémie) constitue un inhibiteur direct de l'activité LDH.

L'ischémie induite par le venin inhibe l'initiation de la synthèse protéique ( Byrne et al, 1996).

Par ailleurs, du fait de son caractère ubiquitaire, la LDH pourrait être également apportée par les hématies dans les phénomènes hémorragiques induits par le venin ou ses fractions. Son interprétation diagnostique reste étroitement liée à d'autres paramètres biologiques et enzymatiques.

### **III.6 Effet d'un anti-inflammatoire stéroïdien (Hydrocortisone) sur les activités enzymatiques étudiées (CK ; LDH ; TGO )**

Afin de mettre en évidence l'effet d'un traitement symptomatique sur les activités enzymatiques musculaires et cardiaques (CK, LDH et TGO ) en absence de sérothérapie.

10 mg /kg de poids d'hydrocortisone sont administrés 30 minutes après envenimation de souris avec deux doses (25 et 50µg )de venin de *Cerastes cerastes*, de la fraction C2 et de la fraction purifiée D1.

Le dosage enzymatique est réalisé 3 heures et 24 heures, après sacrifice des animaux, dans le sérum et les homogénats de muscles squelettique et cardiaque.

Au niveau sérique; après 3 heures d'administration de l'hydrocortisone, les résultats obtenus révèlent que le taux des enzymes CK ; LDH et TGO demeure élevée aussi bien pour les souris envenimées avec du venin natif qu'avec la fraction C2 ou D1 et avec les deux doses sublétales et la DL 50. Figures(35jusqu'à 46)

Après 24 heures, les concentrations de CK, LDH et TGO diminuent considérablement dans le sérum des souris envenimées avec les trois substances et pour les deux doses administrées (figures : 36 ;38 ; 40 ; 42 ; 44 ; 46)

Au niveau tissulaire ;Parallèlement à leur dosage sérique, les activités enzymatiques de la CK ; LDH et TGO sont évaluées dans les muscles squelettique et cardiaque.

Après 3 heures, les activités enzymatiques restent inchangées pour le venin et ses fractions.

Après 24 heures d'administration du médicament, les activités enzymatiques de la CK ; LDH et TGO augmentent dans les muscles squelettique et cardiaque, suggérant un retour aux taux tissulaires témoins (Figures35 ; 37 ;39 ;41 ; 43 ; 45).

L'hydrocortisone est un glucocorticoïde qui bloque la réaction inflammatoire en inhibant l'augmentation de la perméabilité capillaire, ce qui conduit à une régression de l'œdème et une diminution de la libération des constituants cellulaires et des substances vasoactives dans le milieu extra cellulaire; cela implique l'intervention de la PLA2 dans la libération des enzymes dans le sérum.

L'utilisation d'un anti venin équin (BAV) contre les venins *Bothropiques* (*B.jararacussu*, *B. moojeni* et *B. neuwiedi*) induit la réduction de la libération de CK dans le sérum de souris (Zamunér et al ;2004).

## Discussion générale

Le venin de *Cerastes cerastes* est un mélange complexe de protéines et d'enzymes. Son administration à des animaux expérimentaux engendre une cascade d'évènements inflammatoires caractérisés par une augmentation de la perméabilité micro vasculaire, la formation d'œdème le recrutement des leucocytes au site d'injection, la libération de médiateurs inflammatoires qui miment un certain nombres de désordres inflammatoires locaux et systémiques chez l'humain, l'hémorragie et la myonécrose.

L'étude du venin de *Cerastes cerastes* et de ses fractions a été abordée par un essai de purification de la PLA2 après plusieurs étapes chromatographiques à savoir une filtration moléculaire qui a révélée la présence de 3 pics GF1, GF2 et GF3, suivie d'une chromatographie échangeuse de cations sur CM-Sephadex C-50 de la fraction GF2 et de la moitié de GF1 présentant l'activité phospholipasique et myotoxique.

La fraction C3 issue de cette chromatographie ayant subit une chromatographie échangeuse d'anions sur DEAE-Sephadex-A-50 a permis d'obtenir une fraction partiellement purifiée ; la fraction D1 qui est douée d'activité phospholipasique et myotoxique.

A l'électrophorèse en présence de SDS, cette fraction présente 2 bandes protéiques dont les masses moléculaires sont de 14800 et 23430 Da.

L'étude histologique au niveau du cœur montre que le venin de *Cerastes cerastes* et ses fractions C2 (6 bandes protéiques) et D1 (2 bandes protéiques) provoquent des altérations tissulaires évoluant rapidement vers une destruction de la structure myocardique. En effet 3 heures après envenimation, il y'a formation d'un œdème interstitiel accompagnée d'une hémorragie évoluant vers la nécrose.

Les mêmes altérations sont observées aussi bien avec le venin natif qu'avec les fractions C2 et D1; Cependant, les lésions provoquées par le venin sont plus intenses que celles induites par ses fractions.

Au niveau du cœur la partie sub endocardique semble être la plus touchée par le venin de *Cerastes cerastes* et par ses fractions; Les fibres sont fragmentées et il ne persiste que des fantômes de noyaux. Les mêmes résultats ont été observés par Nakamura (1986) qui a travaillé sur des cœurs de poulets. Les lésions cardiaques seraient probablement dues à l'hémorragie générée par les métalloproteinases ou à l'effet direct des PLA2 au niveau de la membrane plasmique (Rodrigues, 2004).

Au niveau du muscle squelettique, la myonécrose causée par le venin de *Cerastes cerastes* et par les fractions C2 et D1 est caractérisée par la formation d'œdème, l'apparition de plages hémorragiques et l'invasion des fibres musculaires nécrotiques par des cellules phagocytaires constituées principalement par des polynucléaires neutrophiles ; ces effets ont été également observés lors d'envenimations avec les venins de *Crotalus durissus*, *Naja nigricollis*, *Vipera berus* (Pena et al, 2002). Bothropstoxine-I, Bothropstoxine-II et piratoxin-I de *Bothrops neuwiedi paloensis* induisent le recrutement des neutrophiles dans la cavité pleurale de rats par des mécanismes indépendants des mastocytes (Castro et al, 2000).

La myotoxicité au niveau des muscles squelettique et cardiaque est évaluée par le dosage de CK qui révèle une élévation sérique de l'activité de cette dernière de manière temps et dose dépendante. Cette élévation est parallèle à sa diminution au niveau des muscles cardiaque et squelettique.

La baisse de l'activité de la CK pourrait être la conséquence de l'action des PLA2 qui altèrent la membrane cellulaire par leur pénétration grâce à leurs acides aminés hydrophobes et basiques. Les PLA2 du venin de *Bothrops jararacucussu*, *Crotalus viridis*, *Agkistrodon contortrix laticinctus* induisent la libération de CK et un blocage neuromusculaire chez les poulets et les préparations de muscle de mammifères (Melo et al, 1993 ; Melo et Ownby, 1999 ; Oshima-Franco et al, 2000).

Le dosage des enzymes TGO et LDH illustre l'effet cytotoxique du venin de *Cerastes cerastes* et de ses fractions C2 et D1 sur les muscles squelettique et cardiaque.

Le changement de perméabilité cellulaire permet le passage des enzymes depuis le compartiment tissulaire vers le sang.

Le dosage de la TGP n'a révélé aucune modification de sa concentration tissulaire ni sérique, ceci est probablement dû à sa faible concentration musculaire ; La TGP est principalement un enzyme du métabolisme hépatique.

Les effets locaux des envenimations vipérines sont difficiles à neutraliser avec les anti venins commerciaux ; Une corticothérapie pourrait compléter l'action de l'antivenin particulièrement dans la neutralisation des altérations tissulaires locales en inhibant indirectement la PLA2 et en réduisant la synthèse des médiateurs de l'inflammation via la synthèse de la lipocortine. L'administration d'hydrocortisone, 30 minutes après injection de venin de *Cerastes cerastes* et des fractions C2 et D1, réduit considérablement le taux sérique de CK, de LDH et de TGO, (Gutiérrez et al, 1981, 1986b; Flower, 1989; Lomonte et al, 1993; Thomas et al, 1998; Arruda et al, 2003)

La Dexaméthasone inhibe la migration des neutrophiles, la production de cytokines et d'autres médiateurs inflammatoires induits par *Bothrops erythromelas*, *Bothrops alternatus* (Flores et al, 1993), *Bothrops jararaca* (Farsky et al, 1997) et *Bothrops lanceolatus* (Arruda et al, 2003).

La dexaméthasone, l'indométacine et le méthylsergide inhibent la formation d'œdème induite par le venin de *Vipera lebetina* (Amrane, 2002).

La myonécrose est accompagnée d'une réponse inflammatoire caractérisée par une infiltration leucocytaire et une production de cytokines pro et anti inflammatoires.

Les venins de *Viperidae* ou leurs PLA2 purifiées stimulent la chémokinésie et le chimiotactisme au niveau des surfaces cellulaires. Ces effets impliquent la stimulation des polynucléaires neutrophiles par les PLA2 suivie par la liaison de ces dernières aux phospholipides membranaires, l'endocytose et la stimulation de la motilité des neutrophiles via les métabolites dérivés de l'acide arachidonique après action des PLA2 tels que les LTB4, des puissants chémoattractants pour les neutrophiles ; Leur interaction avec les récepteurs de surface du neutrophile induit le chimiotactisme, l'agrégation et

l'adhésion aux cellules endothéliales (Palmblad et al, 1990). Les LTB<sub>4</sub> causent également la dégranulation des neutrophiles, la libération d'enzymes lysosomales et la formation d'anions superoxydes. En plus des LTB<sub>4</sub>, les peptidoleucotriènes (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> et LTE<sub>4</sub>) exercent leurs effets sur la perméabilité vasculaire (Ford-hutchinson, 1990). Le PAF, un autre médiateur dérivé des phospholipides, est produit dans les leucocytes et les mastocytes. Ses activités inflammatoires incluent l'augmentation de la perméabilité vasculaire, l'œdème, l'infiltration et l'activation des neutrophiles (Teixeira et al., 2003).

Les cytokines sont produites par plusieurs types cellulaires dans les réponses immunes et inflammatoires. Les principales cytokines médiant l'inflammation sont l'IL-1 et le TNF( $\alpha$  et  $\beta$ ) (Dinarello, 1996). Les PLA<sub>2</sub> induisent l'augmentation d'IL-1 et d'IL-6.

L'IL-1 induit l'expression des molécules d'adhésion par les cellules endothéliales et stimule la libération d'IL-6 et de TNF- $\alpha$  (Stylianou et Saklatvala, 1998). Cette cytokine pourrait contribuer également à l'influx des leucocytes induit par les PLA<sub>2</sub> myotoxiques (Zuliani, 2005).

L'IL-6 peut contribuer à la migration des polynucléaires neutrophiles induits par le venin de *Bothrops asper* ; Cette cytokine présente des propriétés pro inflammatoires en activant et stimulant la maturation des neutrophiles (Hopkins, 2003).

Il a été montré que les PLA<sub>2</sub> myotoxiques sont capables de stimuler le chimiotactisme des neutrophiles, de dégranuler les mastocytes in vitro ( Landucci, 1998 ; Gambero et al, 2002, 2004), d'induire des événements inflammatoires et de libérer d'importants médiateurs de l'inflammation in vivo et in vitro ( Lomonte et al, 1993; Chavez et al, 1998 ; Zuliani et al, 2005).

Parallèlement à la production de cytokines pro inflammatoires, le venin de *Cerastes cerastes* et ses fractions C2 et D1 induisent la génération d'IFN- $\gamma$  et d'IL-10.

L'IFN- $\gamma$  favorise la production d'IL-1 et indirectement le développement d'une réponse Th1 en limitant l'expansion des lymphocytes Th2.

L'IL-10 joue un rôle majeur dans l'inhibition de la libération des cytokines pro inflammatoires et d'autres médiateurs tels que le monoxyde d'azote, le PAF, et les leucotriènes (Bogdan et al, 1991 ; De Waal et al, 1991), son élévation améliore le SIRS (Marchant et al, 1995 ; Bentrazaeg et al, 1996).

Les cytokines pourraient être impliquées dans la pathogenèse des autres aspects des altérations tissulaires locales comme la dégradation de la matrice extra cellulaire (Chavez et al, 2005).

## Conclusion

Le travail que nous avons réalisé a eu pour objectif d'étudier certains effets physiopathologiques immunologiques et biochimiques induit par le venin de *Cerastes cerastes* et par sa fraction phospholipasique.

Les résultats obtenus ont montré que le venin de *Cerastes cerastes* est doué d'activité phospholipasique mytoxique.

L'étude histologique a permis la mise en évidence des altérations tissulaires causées par le venin de *Cerastes cerastes* et par ses fractions D1 et C2 au niveau des muscles squelettique et cardiaque. Ces altérations comprennent l'hémorragie, l'œdème, la myonécrose et la réponse inflammatoire.

Les résultats ont révélé que les lésions tissulaires sont temps et dose dépendantes.

Cependant les altérations causées par le venin natif sont plus importante que celles provoquées par les fractions C2 et D1 suggérant l'effet synergique des constituants du venin.

Cette étude nous a permis d'une part de purifier une PLA2 mytoxique et d'autre part d'évaluer ces effets au niveau du muscle squelettique et cardiaque.

La toxicité du venin de *Cerastes cerastes* et de ses fractions est mise en évidence par un dosage de CK sérique et dans les homogénats de tissus musculaires squelettique et cardiaque. Il y'a libération de CK dans le sérum d'une manière temps et dose dépendante.

il y'a une bonne corrélation entre la myotoxicité et la myonécrose. La concentration sérique de CK et d'autant plus élevée que les lésions tissulaires sont élevées.

De plus le dosage de quelques enzymes du métabolisme musculaire révèle une augmentation de la Perméabilité membranaire entraînant la libération de TGO et LDH et de CK dans le sérum.

L'utilisation d'un traitement symptomatique a permis le retour à la normale des enzymes sériques CK, LDH et TGO par son effet inhibiteur sur la PLA2 induisant la diminution de la libération de ces enzymes dans les milieux vasculaires.

L'étude de la réponse inflammatoire par le dosage de quelques cytokines sériques et par le dénombrement des lymphocytes sur exsudat péritonéal a permis de montrer que le venin de *Cerastes cerastes*, sa fraction C2 et la fraction purifiée D1 sont impliquées dans les phénomènes inflammatoires avec cependant une prédominance de la fraction D1.

La migration leucocytaire induite par le venin de *Cerastes cerastes* est partiellement médiée par l'activité phospholipasique et les produits de la 5-Lipoxygénase (Aruda et al,2003).

---

## Perspectives

En continuité de ce travail il serait intéressant :

D'étudier les autres aspects inflammatoires tels que la participation des médiateurs de l'inflammation dans les manifestations locales et systémiques de l'envenimation vipérine par *Cerastes cerastes*.

D'utiliser des traitements anti inflammatoires visant à réduire l'accumulation des cellules de l'inflammation au niveau du site d'injection du venin ou de sa fraction phospholipasique.

D'associer la sérothérapie avec des traitements symptomatiques qui seraient susceptibles de compléter l'action du sérum anti venimeux particulièrement dans la neutralisation des altérations tissulaires locales.

De procéder à la diffraction aux rayons X de la PLA afin de déterminer sa structure tridimensionnelle et de comprendre son mécanisme d'action.

- **Achari, A., Radvanyi, F.R., Scott, D., Bon, C., Sigler, P.B., (1985).**  
Crystals of crotoxin suitable for high resolution X-ray diffraction analysis. *J. boil. Chem.* 260, 9385-9387
- **Aderem A., Underhill D.M. (1999).**  
Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol*; 17: 593—623.
- **Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. (1994).**  
Biologie moléculaire de la cellule. Troisième édition. Med.Sciences. Flammarion : 971-972 ; 992-993
- **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.
- **Ali, S.A., Stoeva, S., Abbasi, A., Alam, J.M., Kayed, R., Faigle, M., Neumeister, B., Voelter, W. (2000).**  
Isolation, structural and functional characterization of an apoptosis-inducing L-amino acid oxidase from leaf-nosed viper (*Eristocophis macmahoni*) snake venom. *Arch. Bioch. Biophys.* 384 : 210-226 (In Du, X.Y., Clemetson, K.J. (2002). Snake venom L-amino acid oxidases. *Toxicon.* 40 : 659-665)
- **Amaral FS., Rezende NA. (1997)**  
Both cardiogenic and non-cardiogenic factors are involved in the pathogenesis Of pulmonary oedema after scorpion envenomation. *Toxicon*, 35, 997-8.
- **Amrane, F. (2002).**  
Etude des coagulopathies, de la cytotoxicité et des désordres métaboliques provoqués par une envenimation expérimentale avec le venin natif de *Vipera lebetina*. *Thèse de Magister, USTHB, Alger.* 119 p.
- **Anai, K., Sugiki, M., Yoshida, E., Maruyama, M. (2002).**  
Neutralization of snake venom hemorrhagic metalloproteinase prevents coagulopathy after subcutaneous injection of *Bothrops jararaca* venom in rats. *Toxicon.* 40 : 63-68
- **Andrião-Escarso, S.H., Soares, A.M., Rodrigues, V.M., Angulo, Y., Diaz, C., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., Giglio, J.R. (2000).**  
Myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> in *Bothrops* snake venoms : effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. *Biochimie.* 82 : 755-763
- **Angulo, Y., Nunez, C.E., Lizano, S., Sorares, A.M., Lomonte, B. (2001)**  
Immunochemical properties of the N-terminal helix of myotoxin II, a lysine-49 phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon* 39(6) : 879-887
- **Arend, W.P., Gabay, C., (2004).**  
Cytokines in the rheumatic diseases. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 3, 41-67

- **Arita, H., Hanasaki, K., Nakano, T., Oka, S., Teraoka, H. and Matsumoto, K (1991).**  
Novel proliferative effect of phospholipase A<sub>2</sub> in Swiss 3T3 cells via specific binding site. *J. Biol. Chem* **266**, 19139-19141
- **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.
- **Arni.R. K, Gutierrez J. M. (1993).**  
Crystallization and preliminary diffraction data of two myotoxins isolated from the venoms of *Bothrops asper* (terciopelo) and *Bothrops nummifer* ( jumping viper). *Toxicon* **31**,1061 – 1064.
- **Arni.R. K., Ward R. J., Cintra, A.C.O., Giglio, J.R. ( 1995a).**  
Crystallization and preliminary diffraction data of bothropstoxin I isolated from the venom of *Bothrops jararacussu*. *Toxicon* **33**, 383-386.
- **Arni.R. K, Ward R. J, Gutierrez J. M and Tulinsky A. (1995b).**  
Structure of a calcium-independent phospholipase-like myotoxic protein from *Bothrops asper* venom *Acta Cryst. D***51**, 311-317.
- **Arni, R.K., Ward, R.J., 1996.**  
Phospholipase A<sub>2</sub>—a structural review. *Toxicon* **34**, 827–841.
- **Arruda, V.A., De Queiroz Guimaraes, A., Hyslop, S., Ferreira de Araujo, P.M., Bon, C.,Lobo de Araujo, A.,(2003).**  
*Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom stimulates leucocyte migration into the peritoneal cavity of mice. *Toxicon* **41**: 99-107.
- **Audebert, F. (1993).**  
Analyse clinique et pharmacocinétique des envenimations par les vipères européennes. Thèse de Doctorat. Université de Paris 167 pages
- **Aznavourian, A.V., Amiryman, S.V. (2006).**  
Histopathological changes induced by the venom of the snake *Vipera raddei* (Armenian adder). *Toxicon* **47**: 141-143.
- **Babior, B.M. (1999).**  
NADPH oxidase: an update. *Blood* **93**, 1464-1476.
- **Babior BM, Lambeth JD, Nauseef W (2002)**  
The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys* **397**: 342–344
- **Babior, B.M. (2004).**  
NADPH oxidase. *Curr. Opin. Immunol.* **16**:42-47.

- **Balsinde J, Balboa MA, Insel PA, Dennis EA (1999)**  
Regulation and inhibition of phospholipase A<sub>2</sub>. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **39**: 175-189
- **Basavarajappa BS, Gowda TV. (1992).**  
Comparative characterization of two toxic phospholipases A<sub>2</sub> from Indian cobra (*Naja naja naja*) venom. *Toxicon*. **30**(10):1227–1238.
- **Beaumont A. (2000).**  
Biologie animale des vertébrés. Edition Dunod (<sup>5ème</sup>), Paris : 53-70
- **Belo, C.A., Toyama, M. H., Toyama, D. O., Marangoni, S., Moreno, F. B., Cavada, B. S., Fontana, M. D., Hyslop, S., Carneiro, E. M., Boschero, A.C. (2005).**  
Determination of the amino acid sequence of a new phospholipase A<sub>2</sub> (MIDCA1) isolated from *Micrurus dumerilii carinicauda* venom. *The Protein Journal*, USA, v. 24, n. 3, p. 147-153.
- **Belo, CA., Leite, G.B., Toyama, M.H., Marangoni, S., Corrado, A.P., Fontana, M.D., Southan A., Rowan, E.G., Hyslop, S., RODRIGUES-SIMIONI, L. . (2005).**  
Pharmacological and structural characterization of a novel phospholipase A<sub>2</sub> from *Micrurus dumerilii carinicauda* venom. . *Toxicon*, v. 46, n. 7, p. 736-750.
- **Bjarnason, J. B., Fox, J.W. (1994).**  
Haemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmac. Ther* **62**:325-372.
- **Bogdan C, Vodovotz Y, Nathan C. 1991**  
Macrophage deactivation by interleukin 10. *J Exp Med*.174(6):1549–1555.
- **Bon, C. (1997)**  
Multicomponent neurotoxic phospholipase A<sub>2</sub> in Kini, R.M. (Ed), *Venom phospholipases A<sub>2</sub> enzymes : Structure, function and mechanism*. John Wiley & sons, chichester, UK, 1997, pp 269-285
- **Bon, C., Arocas, V., Braud, S., Francischcti, I., Leduc, M. (2000 a).**  
Snake venom in thrombosis and haemostatis. *XIII th word congress of the International Society of Toxinologie, Paris, September: 18-22.*
- **Bon C., Arocas V., Braud S., Francischehi I. M., Maraun R., Salion B., Wisner A., Zhang Y., Zingal R. (2001).**  
Snake venom in thrombosis and haemostasis. *Iram. Biomed. J.* **83** : 2-3.
- **Boquet, P. (1970).**  
Venins de serpents in traité de zoologie. Grassé., P. Tome **XIV**. Fascicule II. Editions Masson et Cie.
- **Bortoleto RK, Murakami MT, Watanabe L, Soares AM, Arni RK**  
Purification, characterization and crystallization of Jararacussin-I, a fibrinogen-clotting enzyme isolated from the venom of *Bothrops jararacussu*. *Toxicon* 2002 Sep; **40**(9) :1307- 12.

- **Brantzaeg, P., Osnes, I., Ovstebo, R., Joo, G.B., Kierulf, P., (1996).**  
Net inflammatory capacity of human septic shock plasma evaluated by a monocyte-based target cell-assay: identification of IL-10 as a major functional deactivator of human monocytes. *J. Exp. Med.* 184: 51-60.
- **Braud, S., Parry, M.A.A., Maroun, R., Bon, C., Wisner, A. (2000 ).**  
The contribution of residues 192 and 193 to the specificity of snake venom serine proteinases. *J. Bid. Chem.* 275: 1823-1828.
- **Brunie, S., Bolin, J., Gewirth, D., Sigler, P.B. (1985).**  
The refined crystal structure of dimeric phospholipase A<sub>2</sub> at 2.5 Å. Access to a shielded catalytic center. *J. Biol. Chem.* 280, 9742 – 9749.
- **Byrne, C.D. et Wild, S.H. (1996).**  
Lipids and secondary prevention of ischaemic heart disease. *Br. Med. J.* 313: 1273.
- **Calvette, J.J., Moreno-Murciano, M.P., Sanz, L., Jürgens, M., Schrader, M., Raida, M., Benjamin, D.C., Fox, J.F. (2000).**  
The disulfide bond pattern of catrocollastatin C, a disintegrin-like/cysteine-rich protein isolated from *Crotalus atrox* venom. *Protein Science.* 9 : 1365-1373
- **Cardoso, J.L.C., Fan, H.W., Franca, F.O.S., Jorge, M.T., Leite, R.P., Nishioka, S.A., Avila, A., Sano-Martins, I.S., Tomy, S.C., Santoro, M.L., Chudzinski, A.M., Castro, S.C.B., Kamiguti, A.S., Kelen, E.M.A., Hirata, M.H., Mirandola, R.M.S., Thekston, R.D.G., Warrell, 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
- **Castro, R.C., Landucci, E.C.T., Toyama, M.H., Giglio, J.R., Marangoni, S., De Nucci, G., Antunes, E. (2000).**  
Leukocyte recruitment induced by type II phospholipases A<sub>2</sub> into the rat pleural cavity. *Toxicon* 38, 1773-1785.
- **Cesari, E., Boquet, P. (1935)**  
Venins de serpents et anti-venins Ed. Med. Flammarion 1984 p63
- **Chacur, M., Picolo, G., Gutiérrez, J.M., Teixeira, C.F.P., Cury, Y., (2001)**  
Pharmacological modulation of hyperalgesia induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Toxicon* 39: 1173-1181.
- **Chakraborty, A.K., Hall, R.H., Ghose, A.C. (2002).**  
Purification and characterization of a potent hemolytic toxin with phospholipase A<sub>2</sub> activity from the venom of Indian Russell's viper. *Mol. Cell. Biochem.* 237, 95-12.
- **Chavez, F., Barboza, M., Gutiérrez, J.M., (1995).**  
Pharmacological study of edema induced by venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo) in mice. *Toxicon* 33: 31-39.

- **Chaves, F., Leon, G., Alvarado, V.H., Gutiérrez, J.M., (1998).**  
Pharmacological modulation of edema induced by Lys – 49 and Asp-49 myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon* 36, 1861-1869.
- **Chaves, F., Teixeira, C.F. P., Gutiérrez, J. M. (2005).**  
Role of TNF- $\alpha$ , IL- $\beta$  and IL-6 in the local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom : an experimental assessment in mice. *Toxicon* 45 : 171-178.
- **Chen, J., Engle, S. J., Seilhamer, J. J. & Tischfield, J. A. (1994)**  
Cloning and characterization of a novel rat and mouse low molecular weight Ca<sup>2+</sup> dependent phospholipase A<sub>2</sub>s containing 16 cysteines.. *J. Biol. Chem.* 269 : 23018-23024
- **Chijiwa T, Hamai S, Tsubouchi S, Ogawa T, Deshimaru M, Oda-Ueda N, Hattori S, Kihara H, Tsunasawa S, Ohno M**  
Interisland mutation of a novel phospholipase A<sub>2</sub> from *Trimeresurus flavoviridis* venom and evolution of Crotalinae group II phospholipases A<sub>2</sub>. *J Mol Evol* 2003 Nov; 57(5) :546-54.
- **Chippaux J. P and Goyffon M. (1998).**  
Venoms, antivenoms and immunotherapy. *Toxicon* 36: 823-846.
- **Chippaux, J.P., (1998).**  
Snake-bites : appraisal of the global situation. *Bull. World Health Org.* 76: 515
- **Chippaux, J-P (1999).**  
Les serpents d'Afrique Occidentale et Centrale. *Edition IRD, 280*
- **Chippaux, J-P., Amadi-Eddine, S., Fagot, P. (1999)**  
Diagnostic et surveillance des hémorragies dues aux envenimations vipérines en savane africaine. *Bull. Soc. Pathol. Exot* 92 : 109-113
- **Chow, G., Kini, R.M. (1999).**  
Scientific Standardization Committee Communication: *Inventory of exogenous factors from animal sources that induce platelet aggregation 1-10.*
- **Chwetzoff, S., Tsunasawa, S., Sakiyama, F., and Menez, A. (1989).**  
Nigexine, a phospholipase A<sub>2</sub> from cobra venom with cytotoxic properties not related to esterase activity. Purification, amino acid sequence, and biological properties. *J. Biol. Chem.* 264: 13289-13297. *J. Biol. Chem., Vol. 264, Issue 22, 13289-13297, Aug, 1989*
- **Cicala C, Cirino G. (1993).**  
Phospholipase A<sub>2</sub>-induced hypotension in the rat and its pharmacological modulation. *24(5):1197-202. Gen Pharmacol*
- **Crowl, R.M., Stoller, T.J., Conroy, R.R., Stoner, C.R. (1991).**  
Induction of Phospholipase A<sub>2</sub> Gene Expression in Human Hepatoma Cells by Mediators of the Acute Phase Response", *J. Biol. Chem.* 266, 2647-2651.

- **Cupo, P., Azevedo – Marques, M.M., Hering, S.E. (1988).**  
Clinical and laboratory features of South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in children. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 82, 924-929.
- **De Araujo, A.L., De Souza, A.O., Bon, C. (1996).**  
Pharmacological evaluation of paw oedema induced by *Bothrops lanceolatus* venom. *Toxicon* 34, 2 :165-166
- **De Castro, R.C., Landucci, E.C.T., Toyama, M.H., Giglio, J.R., Marangoni, S., De Nucci, G., Antunes, E. (2000)**  
Leucocyte recruitment induced by type II phospholipases A<sub>2</sub> into the rat pleural cavity. *Toxicon* 38, 1773-1785.
- **Dennis, E.A. (1994).**  
Diversity of group types, regulation and function of phospholipases A<sub>2</sub>. *J. Biol.Chem* 269: 13057-13060.
- **De Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. (1991).**  
Interleukin-10 inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med*, 174 :1209-1220.
- **Diaz, C., Lomonte, B., Zamudio, F., Gutierrez, J.M., (1995).**  
Purification and characterization of myotoxin IV, a phospholipase A<sub>2</sub> variant, from *Bothrops asper* snake venom. *Nat. Toxins* 3, 26–31.
- **Diaz, C., Leon, G., Rucavado, A., Rojas, N., Schroit, A.J., Gutierrez, J.M., (2001).**  
Modulation of the susceptibility of human erythrocytes to snake venom myotoxic phospholipases A<sub>2</sub>: role of negatively charged phospholipids as potential membrane binding sites. *Arch. Biochem. Biophys.* 391, 56–64.
- **Dinarello, C.A. (1996).**  
Cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Curr. Trop. Microbiol. Immunol.* 216,133-165.
- **Dixon, R.W., Harris, J.B. (1996).**  
Myotoxic activity of the phospholipase, notexin, from the venom of the Australian tiger snake. *J Neuropathology and Experimental Neurology.* 55, 2 : 1230-1237
- **Dixon, R.W., Harris, J.B. (1999).**  
Nerve terminal damage by  $\beta$ -bungarotoxin. *Am. J. of Pathology* 154, 2 : 447-455
- **Dodds, D., Schlingen, A.K., Lu, S.Y., Perin, M.S. (1995)**  
Novel reticular calcium binding protein is purified on taipoxin columns. *J. Neurochem* 64 : 2339-2344

- **Dodds, D.C., Omeis, I.A., Cushman, S.J., Helms, J.A., Perin, M.S. (1997)**  
Neuronal pentraxin receptor, a novel putative integral membrane pentraxin that interacts with neuronal pentraxin 1 and 2 and taipoxin-associated calcium-binding protein 49. *J. Biol. Chem.* 272 : 21488-21494
- **Doley, R., Mukherjee A.K., (2003)**  
Purification and characterization of an anticoagulant phospholipase A<sub>2</sub> from Indian monocled cobra (*Naja kaouthia*) venom, *Toxicon* 41 81–91.
- **Domont, G.B., Perales, J., Moussatché, H. (1991).**  
Natural anti – snake venom proteins. *Toxicon* 29, 1183 – 1194.
- **Dreyer F, Penner R. (1987).**  
The actions of presynaptic snake toxins on membrane currents of mouse motor nerve terminals. *J Physiol.* 386,455-463.
- **Drickamer, K., Taylor, M.E., (1993).**  
Biology of animal lectins. *Annu. Rev. Cell Biol.* 9, 237-264.
- **D'Suze G., Comellas A., Pesce L., Sevcik C and Sanchez-de-Leon R (1999)**  
Tityus discrepans venom produces a respiratory distress syndrome in rabbits through an indirect mechanism. *Toxicon* 37: 137-180.
- **D'Suze G., Monceda S., Gonzalez C., Sevcik C., Aguilar V and Alagon A. (2003)**  
Relationship between plasmatic levels of various cytokines, tumour necrosis factor, enzymes, glucose and venom concentration following Tityus scorpion sting. *Toxicon* 41: 367-375.
- **Ernest, C.H., Zug, R. (1999).**  
Snakes bites and venom (*Viperidae*). *Editions Harrison, New York, 126*
- **Evans, H.J., Kini, R.M. (1997).**  
Effects of phospholipase A<sub>2</sub> enzymes on platelet aggregation. In: Kini, R.M, editor. *Venom phospholipase A<sub>2</sub> enzymes: structur, function and mechanism.* Chichester: Wiley. p. 369-88.
- **Farsky, S.H.P., Walber, J., Costa – Cruz, M., Cury, Y., Teixeira, C.F.P. (1997).**  
Leukocyte response induced by *Bothrops jararaca* crude venom: in vivo and in vitro studies. *Toxicon* 35, 185-193.
- **Faure, G. (2000).**  
Natural inhibitors phospholipases A<sub>2</sub>. *Biochimie.* 82 : 833-840
- **Faure, G., Villela, C., Perales, J., and Bon, C. (2000).**  
Interaction of the neurotoxic and nontoxic secretory phospholipases A<sub>2</sub> with the crotoxin inhibitor from Crotalus serum *FEBS J.*, 267(15): 4799 - 4808.
- **Faure, G., Copic, A., Porrier, S.L., Gubensek, F., Bon, C., Krizaj, I. (2003)**  
Crotoxin acceptor protein isolated from Torpedo electric organ : binding properties to

crotoxin by surface plasmon resonance. *Toxicon* 41 : 509-517

- **Ferreira, S.H., Cunha, F.Q., Lorenzetti, B.B., Michelin, M.A., Perretti, M., Flower, R.J., Poole, S. (1997).**  
Role of lipocortin-1 in the anti-hyperalgesic actions of dexamethasone. *Br J Pharmacol* 121:883-888.
- **Filippi M, Rovaris M, Rocca MA, Sormani MP, Wolinsky JS, Comi G. (2001).**  
Glatiramer acetate reduces the proportion of new MS lesions evolving into 'black holes'. *Neurology*; 57: 731±3.
- **Fisher, A.B., Dodia, C., Chander, A., Beers, M.F., Bates, S.R. (1994).**  
Inhibition of *Trimeresurus flavoviridis* phospholipase A<sub>2</sub> by lung surfactant protein A (SP – A). *Biochem. Biophys. Acta* 1211, 256 – 262.
- **Fletcher JE, Rapuano BE, Condrea E, Yang CC, Rosenberg P. (1981)**  
Relationship between catalysis and toxicological properties of three phospholipases A<sub>2</sub> from elapid snake venoms. *Toxicol Appl Pharmacol.* 30;59 (2):375–388.
- **Fletcher, J. E. and Rosenberg, P. (1997).**  
The cellular effect and mechanism of action of presynaptically acting phospholipase A<sub>2</sub> toxins. In *Venom Phospholipase A<sub>2</sub> Enzymes: Structure, Function and Mechanism* (ed. R. M. Kini), pp. 413-454. Chichester, UK: Wiley.
- **Flinck, M.T., Atchison, W.D., (2003).**  
Iberioxin – induced block of Ca<sup>+2</sup> activated K<sup>+</sup> channels induces dihydropyridine sensitivity of A Ch release from mammalian motor nerve terminals. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 305, 646-652.
- **Flores, C.A., Zappellini, A., Prado – Franceschi, J., 1993.**  
Lipoxygenase-derived mediators may be involved in in vitro neutrophil migration induced by *Bothrops erythromelas* and *Bothrops alternatus* venoms. *Toxicon* 31, 1551-1559.
- **Flower, R.J. (1989).**  
Glucocorticoids and the inhibition of phospholipase A<sub>2</sub> In: Schelmer, R.P., Clamor, H.N., Oronsky, A.L. (Eds.), *Antiinflammatory Steroid Action. Basic and Clinical Aspect*, Academic Press, New York, pp. 48-66.
- **Flower RJ and Blackwell GJ (1979).**  
Anti-inflammatory steroids induce biosynthesis of a phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor which prevents prostaglandin generation. *Nature* 278: 456–459.
- **Ford – Hutchinson, A.W. (1990).**  
Leukotriene B<sub>4</sub> in inflammation *Crit. Rev. Immunol.* 10, 1 – 12.
- **Fortes-Dias, C.L. (2002)**  
Endogenous inhibitors of snake venom phospholipase A<sub>2</sub> in the blood plasma of snakes. *Toxicon* 4 : 481-484

- **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.
- **Francis, B., T.R. John, et autres. (1991).**  
Nouvelles toxines du venin du serpent commun de tigre (scutatus de scutatus de Notechis). *Toxicon* **29** (1) : 85-96.
- **Francis, B., Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., Kaiser, I.I. (1991)**  
Myotoxin II from *Bothrops asper* (Terciopela) venom is a lysine-49 phospholipase A<sub>2</sub>. *Arch. Biochem. Biophys* **284** : 352-359
- **Farsky S. H. P., Gonçalves L. R. C., Gutiérrez J. M., Correa A. P., Rucavado A., Gasque P., Tambourgi D. (2000).**  
*Bothrops asper* snake venom and its metalloproteinase Bap 1. activate the complement system. Role in leucocyte recruitment. *Médiators Inflamm.* **9**: 213-221.
- **Freire, M. G. M., Desouza, I. A., Silva, A. C. M., Macedo, M. L. R., Lima, M. S., Tamashiro, W. M. S. C., Antunes, E., Marangoni, S. (2003),**  
Inflammatory responses induced in mice by lectin from *Talisia esculenta* seeds, *Toxicon* vol. 42, n°3, pp. 275-280.
- **Fremont DH, Anderson DH, Wilson IA, Dennis EA, Xuong NH**  
Crystal structure of phospholipase A<sub>2</sub> from Indian cobra reveals a trimeric association. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993 Jan 1; **90**(1) :342-6.
- **Fretey, J. (1975).**  
Guides des reptiles et batraciens de France. *Edition Hatier, Paris, 211 p.*
- **Fry, B.G. (1999).**  
Structure-function properties of venom components from Australian elapids. *Toxicon.* **37** : 11-32
- **Fuly, A.L., Calil-Elias, S., Zingali, R.B., Guimaraes, J.A., Melo, P.A. (2000).**  
Myotoxic activity of acidic phospholipase A<sub>2</sub> isolated from *Lachesis muta* (Bushmaster) snake venom. *Toxicon* **38** (7): 961-972.
- **Fukuhara Y. D. M., Reis M. L., Dellalibera-Joviliani R., Cunha F. Q. C and Donadi E.A. (2003)**  
Increased levels of IL-1., IL-6, IL-8, IL-10 and TNF-. in patients moderately or severely envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. *Toxicon* **41**: 49-55.
- **Gambero, A., Landucci, E.C., Toyama, M.H., Marangoni, S., Giglio, J.R., Nader, H. B., Dietrich, C.P., De Nucci, G., Antunes, E., (2002).**  
Human neutrophil migration in vitro induced by secretory Phospholipases A<sub>2</sub>: a role for cell surface glycosaminoglycans. *Biochem. Pharmacol.* **63**, 65-72.

- **Gambero, A., Thomazzi, S.M., Cintra, A.C., Landucci, E.C., De Nucci, G., Antunes, E.(2004)**  
Signalling pathways regulating human neutrophil migration induced by secretory Phospholipases A<sub>2</sub>. *Toxicon* 44: 473-481..
- **Garcia Leme J., Hamamura L., Leite M.P. & Rocha E Silva M. (1973)**  
Pharmacological analysis of the acute inflammatory process induced in the rat's paw by local injection of carrageenin and by heating. *Br. J.Pharmacol.* 48: 88–96.
- **Gay, C.C., Leiva., L.C, Maruñak, S., Teibler, P., Acosta De Perez, O. (2005).**  
Proteolytic, edematogenic and myotoxic activities of hemorrhagic metalloproteinase isolated from *Bothrops alternatus* venom. *Toxicon* 46: 546-554.
- **Golvan, Y.J. (1983).**  
Éléments de parasitologie médicale. *Edition Flammarion, 553*
- **Gopalakrishnakone, P., Dampster, D.W., Hawgoog, B.J. and Elder, H.Y. (1984)**  
Cellular and mitochondrid changes induced in the structure of murine skeletal muscle by crotoxin, a neurotoxic phospholipase A<sub>2</sub> complex. *Toxicon* 22 : 85-98
- **Gopalakrishnakone, P. (1996)**  
Toxins and venoms myotoxicity. *Toxicon* 34 : 292
- **Gopalakrishnakone, P., Ponraj, D., Thwin, M..M. (1997).**  
Myotoxic phospholipases from snake venoms : general myoglobinuric and local myonecrotic toxins. (In *Venom phospholipase A<sub>2</sub> enzymes : structure, function and mechanism*). Edité par Kini, R.M : 287-320
- **Goyffon, F., Heurtant, J. (1995).**  
La fonction venimeuse. *Edition Ma CR5sson, 284 p*
- **Granger DN & Kubes P. (1994)**  
The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J Leukocyte Biol* 55: 662–675.
- **Grassé, P.P. (1976).**  
Précis de zoologie vertébrés T.II. *Edition Masson, 387 p.*
- **Grassé, P.P. (1980).**  
Traité de zoologie : Anatomie, systématique, biologie (Reptiles : caractères généraux et anatomie). *Edition Masson, 605 p.*
- **Greenberg, S. (1999).**  
Modular components of phagocytosis. *J. Leukoc. Biol.* 66, 712 – 717.
- **Gruber, U. (1992).**  
Guide des serpents d'Europe, d'Afrique du Nord et du Moyen Orient. *Editions Delachaux et Niestlé. Suisse, 227*

- **Gu, L.; Zhang, H.; Song, S.; Zhou, Y.; Lin, Z. (2002).**  
Structure of an acidic phospholipase A<sub>2</sub> from the venom of *Deinagkistrodon acutus*. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 58 (1), 104–110.
- **Gubensek, F., Krizoj, I., Pungercas, J. (1997)**  
Monomeric phospholipase A<sub>2</sub> neurotoxins. In : Kini, R.M., (Ed), *Venom phospholipases A<sub>2</sub> enzymes : Structure, function and mechanism*, Wiley, Chichester, England, pp 245-268
- **Guinsbourg, F., (1970).**  
*Précis de Zoologie des vertébrés*. Edition Masson (Paris) p 50-53
- **Gutiérrez, J M., Chaves, F., Bolanos, R., Cerdas, L., Rojas, E., Arroyo, O., Portilla, E. (1981).**  
Neutralizacion de los efectos locales del veneno de *Bothrops asper* por un antiveneno polivalente. *Toxicon* 19, 439-500.
- **Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., Portilla, E., Cerdas, L., Rojas, E. (1983)**  
Local effects induced by Coral snake venoms : Evidence of myonecrosis after experimental inoculations of venoms from five species. *Toxicon* 21,6 : 777-783
- **Gutiérrez, J M., Ownby, C.L., Odell, G.V. (1984).**  
Skeletal muscle regeneration after myonecrosis induced by crude venom and myotoxin from the snake *Bothrops asper* (Fer-de-Lance). *Toxicon.* 22, 5 :719-731
- **Gutiérrez, J.M., Chaves, F., Cerdas, L., (1986).**  
Inflammatory infiltrate in skeletal muscle injected with *Bothrops asper* venom. *Rev. Biol. Trop.* 34 : 209-219.
- **Gutiérrez, J M., Lomonte, B. and Cerdas, L. (1986b).**  
Isolation and partial characterization of a myotoxin from the venom of de snake *Bothrops nummifer*. *Toxicon* 24, 885-894.
- **Gutiérrez, J.M., Núñez, J., Díaz, C., Cintra, A.C.O., Honsi-Bradeburgo, M.I., Giglio, J.R.,(1991)**  
Skeletal muscle degeneration and regeneration after injection of Bothropstoxin-II, a phospholipase A<sub>2</sub> isolated from the venom of the snake *Bothrops jararacussu* . *Exp. Mol. Pathol.* 55: 217-229
- **Gutiérrez, J M., Lomonte, B. (1995).**  
Phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from *Bothrops asper* snake venoms. *Toxicon.* 33, 11 :1405-1424
- **Gutiérrez, J.M.,Borkow G., Ovadia M., (1996).**  
Inhibition of the hemorrhagic activity of *Bothrops asper* venom by novel neutralizing mixture. *Toxicon* 35 : 865-877.
- **Gutiérrez, J M., Lomonte, B. (1997).**  
Phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from *Bothrops asper* snake venoms. In *Venom phospholipase A<sub>2</sub> enzymes : structure, function and mechanism*. Edited by Kini, R.M : 321-349

- **Gutiérrez, J.M., Rucavado, A. (2000).**  
Snake venom metalloproteinases : their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie*. **82** : 841-850
- **Gutiérrez, J.M. and Ownby, C.L. (2003)**  
Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A<sub>2</sub> : insights into the mechanisms of local and systematic myotoxicity. *Toxicon* 42 : 915
- **Harris, J.B., Mac Donell, C.A. (1981).**  
Phospholipase A<sub>2</sub> activity of notexin and its role in muscle damage. *Toxicon*. **19**, 13 : 419-430
- **Harris, J.B. (1984).**  
Polypeptides from snake venoms which act on nerve and muscle. *Prog. Med. Chem.*21:63-110;
- **Harris, J.B. (1985)**  
Phospholipase in snake venoms and their effects on nerve and muscle. *Pharmacol. Ther* 31 : 79-102
- **Harris, J.B. (1997).**  
Toxic phospholipases in snake venom : an introductory review. (In *Venomous snakes Ecology, Evolution and Snakebite*. Edité par thorpe, R.S., Wüster, W., Malhotra, A. Publié pour The Zoological society of London. Calderon Press. Oxford. **70** : 235-250
- **Harris, J.B., Grubb, B.D, Maltin, C.A., Dixon, R. (2000).**  
The neurotoxicity of the venom phospholipase A<sub>2</sub>, Notexin and Taipoxin. *Experimental Neurology*. **161**: 517-526
- **Harris, J.B., (2003).**  
Myotoxic phospholipase A<sub>2</sub> and the regeneration of skeletal muscles. *Toxicon* 42:933-945.
- **Hati, R.N., Mitra, P., Sarber, S., Bhattacharya, K. K. (1999).**  
Snake venom haemorrhagins. *Crit. Rev. Toxicol* **29**: 1-19
- **Herkert M., Shakhman O., Schweins E. and Becker C.-M. (2001)**  
b-Bungarotoxin is a potent inducer of apoptosis in rat cultured neurons by receptor-mediated internalization. *Eur.J. Neurosci*. 14,821–828.
- **Holland DR, Clancy LL, Muchmore SW, Ryde TJ, Einspahr HM, Finzel BC,Heinrikson RL, Watenpaugh KD. (1990).**  
The crystal structure of a lysine 49 phospholipase A<sub>2</sub> from the venom of the cottonmouth snake at 2.0-Å resolution. *J Biol Chem*. **265**(29):17649–17656.
- **Hopkins, S.T. (2003).**  
The pathophysiological role of cytokines I *Leg. Med*. 5 ( suppl. 1), s 45- s 57.

- **Hould, R. (1984).**  
Techniques d'histopathologie et de cytopathologie. Ed. Maloine Paris, Ed. Décarie Montréal.
- **Howard, M., O'Garra, A. (1992).**  
Biological properties of interleukin 10. *Immunol. Today* 13, 198 – 200.
- **Hseu, M.J., Guillory, R.J., Tzeng, M.C. (1990).**  
Identification of a crotoxin-binding protein in membranes from guinea pig brain by photoaffinity labeling. *J. Bioenergy. Biomembr.* 22,39-50.
- **Hseu, M.J., Yen, C.Y., Tseng, C.C. and Tzeng, M.C. (1997)**  
Purification and partial amino acid sequence of a novel protein of the reticulocalbin family. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 239 : 18-22
- **Hseu, M.J., Yen, C.H. and Tzeng, M.C. (1999)**  
Crococalbin : a new calcium-binding protein that is also a binding protein for crotoxin, a neurotoxic phospholipase A<sub>2</sub>. *FEBS letters* 445 : 440-444
- **Huang, M.Z., Wang, Q.C., Liu, G.F. (1993).**  
Effects of an acidic phospholipase A<sub>2</sub> purified from *Ophiophagus hannah* (king cobra) venom on the rat heart. *Toxicon*. **31** : 627-635
- **Huang, M.Z., Gopalakrishnakone, P. (1996).**  
Pathological changes induced by an acidic phospholipase A<sub>2</sub> from *Ophiophagus hannah* venom on heart and skeletal muscle of mice after systemic injection. *Toxicon* **34**, 2 :201-211
- **Huang, M.Z., Gopalakrishnakone, P., Kini, M. (1997).**  
Role of enzymatic activity in the antiplatelet effects of a phospholipase A<sub>2</sub> from *Ophiophagus hannah* snake venom. *Life Sciences*. **61**, 22 : 2211-2217
- **Iddon D., Theakston R. D. G. et Ownby C. L. (1985).**  
The pathogenesis of local skin necrosis induced by *Naja haje* venom in mice. *Toxicon* **23**: 577.
- **Ishimaru K, Kihara H, Ohno M. (1980).**  
Purification and properties of phospholipase A from venom of *Trimeresurus flavoviridis* (Habu snake). *J Biochem (Tokyo)*. **88**(2):443–451.
- **Jancarik J., Kim S.H. (1991).**  
Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins, *J. Appl. Crystallogr.* **24**, pp. 409–411.
- **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., and Fox, J.W. (2000).**  
Inhibition of platelet aggregation by the recombinant cysteine-rich domain of the hemorrhagic snake venom metalloproteinase, atrolysin A. *Arch. Biochem. Biophys.* **373**: 281–286.
- **Johnson, E.K., Ownby, C.L. (1993)**  
Isolation of a myotoxin from the venom of *Agkistrodon contortrix laticinctus* (broad-banded copperhead) and pathogenesis of myonecrosis induced by it in mice. *Toxicon* **31** : 243-255
- **Joseph, J.S., Chung, M.C.M., 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.
- **Kaiser, I.I., Gutierrez, J.M., Plummer, D., Aird, S.D., Odell, G.V.,1990.**  
The amino acid sequence of a myotoxic phospholipase from the venom of *Bothrops asper*. *Arch. Biochem. Biophys.* **278**, 319±325.
- **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., Hay, C.R.M., Theakston, R.D.G., Zuzel, M. (1996).**  
Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. *Toxicon* **34**, 6 : 627-642
- **Kemparaju K., Krishnakanth T.P., Veerabasappa Gowda, T. (1999)**  
Purification and characterization of a platelet aggregation inhibitor acidic phospholipase A<sub>2</sub> from Indian saw-scaled viper (*Echis carinatus*) venom, *Toxicon* **37** : 1659-1671.
- **Kerns, R.T., Kini, R.M., Stefansson, S., Evans, H.J. (1999)**  
Targeting of venom phospholipases : the strongly anticoagulant phospholipases A<sub>2</sub> from *Naja nigricollis* venom binds to coagulation factor Xa to inhibit the prothrombinase complex. *Arch. Biochem. Biophys* **369** : 17-113
- **Kihara, Yasuyuki MD, PhD; Yoshikawa, Hiroyuki MD, PhD; Honda, Hidekazu MD, PhD; Fukumitsu, Ken-ichirou MD, PhD; Yamaguchi, Taizou MD, PhD; Otsuki, Makoto MD, PhD (2005).**  
Natural Disruption of Group 2 Phospholipase A<sub>2</sub> Gene Protects Against Choline-deficient Ethionine-supplemented Diet-induced Acute Pancreatitis and Lung Injury. Original Article *Pancreas.* **31**(1):48-53.
- **Kim Kwang Pyo, Rafter John D., Bittova Lenka, Han Sang Kyou, Snitko Yana., Munoz Nilda M, Leff Alan R., and Cho Wonhwa (2001).**  
Mechanism of Human Group V Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>)-induced Leukotriene Biosynthesis in Human Neutrophils A POTENTIAL ROLE OF HEPARAN SULFATE BINDING IN PLA<sub>2</sub> INTERNALIZATION AND DEGRADATION\* *J. Biol. Chem.*, Vol. **276**, Issue 14, 11126-11134.

- **Kini, R.M., Iwanaga, S. (1986).**  
Structure-function relationships of phospholipases I: prediction of presynaptic neurotoxicity. *Toxicon* **24**, 6 : 527-541
- **Kini, R.M., Evans, H.J. (1989 a).**  
Role of cationic residues in cytolytic activity : modification of lysine residues in the cardiotoxin from *Naja nigricollis* venom and correlation between cytolytic and antiplatelet activity. *Biochemistry* **28** : 9209-9215
- **Kini, R.M., Evans, H.J. (1989 b).**  
A common cytolytic region in myotoxins, hemolysins, cardiotoxins and antibacterial peptides. *Int. J. Peptide Protein Res* **34** : 277-286
- **Kini, R.M., (1997).**  
Phospholipase A<sub>2</sub>, a complex multifunctional protein puzzle in Kini, R.M., (ed.). *Venom phospholipase A<sub>2</sub> enzymes : structure, function and mechanism.* Wiley, Chichester UK, pp 1-28.
- **Kini, R.M., Evans, H.J. (1992).**  
Structural domains in venom proteins : evidence that metalloproteinases and nonenzymatic platelet aggregation inhibitors (disintegrins) from snake venoms are derived by proteolysis from a common precursor. *Toxicon* **30**, 3 : 265-293
- **Kini, R.M., (2003).**  
Excitement a head: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. *Toxicon* **42**: 827-840.
- **Kirkpatrick, L.L., Matzuk, M.M., Dodds, D.C., Perin, M.. (2000)**  
Comparison of biochemical interactions of the neuronal pentraxins. Neuronal pentraxin (NP) receptor binds to taipoxin and taipoxin-associated calcium-binding protein 49 via NP1 and NP2. *J. Biol. Chem.* **275** : 17786-17792
- **Kochva, E. (1998).**  
Venomous snakes of Israel: ecology and snake bite. *Public Health Rev.* **26**(3), 209 – 232.
- **Kogaki, H., Inoue, S., Ikeda, K., Samejima, Y., Omori-Satoh, T. & Hamaguchi, K.(1989)**  
Isolation and fundamental properties of the phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor from the blood plasma of *Trimeresurus flavoviridis*. *J. Biochem.* **106**, 966–971
- **Krifi, M.N., Miled, K., Abderrezek, M., El-Ayeb, M. (2002).**  
Effects of antivenom on *Buthus occitanus tunetanus* (Bot) scorpion venom pharmacokinetics: Towards an optimization of antivenom immunotherapy in a rabbit model. *Toxicon* **40**: 811-819.
- **Krisaj, I., Bieber, A.L., Ritonja, A., Gubensek, F. (1991).**  
The primary structure of ammodytin L, a myotoxic phospholipase A<sub>2</sub> homologue from *Vipera ammodytes* venom. *Eur. J. Biochem* **202**: 1165-1168.

- **Krizaj, I., Faure, G., Gubensek, F., Bon, C. (1996)**  
Re-examination of crotoxin-membrane interactions. *Toxicon* 34 : 1003-1009
- **Kudo, I. et M. Murakami, (2002).**  
Phospholipase A2 Enzymes, Prostaglandins and other Lipids Mediators, 68-69, pp.3-58
- **Kunkel, D.B., Curry, S.C., Vance, M.V., Ryan, P.J. (1984).**  
Reptile envenomations. *J. Toxicol. Chim. Toxicol* 81: 503-526.
- **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.
- **Laemmli, U.K., (1970).**  
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.  
*Nature* 227: 680-685.
- **Laing, G.D., Clissa, P.B., Theakston, R.D., Moura-da-Silva, A.M., Taylor, M.J. (2003).**  
Inflammatory pathogenesis of snake venom metalloproteinase-induced skin necrosis. *Eur J Immunol* 33: 3458-3463.
- **Lambeau, G., Lazdunski, M., Barhanin, J. (1991).**  
Properties of receptors for neurotoxic phospholipases A<sub>2</sub> in different tissues. *Neurochem. Res.* 16, 651-658.
- **Lambeau, G., Lazdunski, M. (1999).**  
Receptor for a growing family of secreted phospholipase A<sub>2</sub>. *TIPS.* 20: 162-170
- **Lambeau, G., Barhanin, J., Schweitz, H., Qar, J., Lazdunski, M. (1989)**  
Identification and properties of very high affinity brain membrane-binding sites for a neurotoxic phospholipase from the taipan venom *J. Biol. Chem.* 264 : 11503-11510
- **Landucci, E.C., Castro, R.C., Pereira, M.F., Cintra, A.C., Giglio, J.R., Marangoni, S., Oliveira, B., Cirino, G., Antunes, E., De Nucci, G. (1998).**  
Mast cell degranulation induced by two phospholipase A<sub>2</sub> homologues: dissociation between enzymatic and biological activities. *Eur. J. Pharmacol.* 343, 257-63.
- **Laraba-Djebari, F, et Martin-Eauclaire, M. F., Maucco, G., Matchot. P. (1995).**  
Afaâcytin an  $\alpha$   $\beta$ -fibrinogenase from *Cerastes cerastes* (Horned viper) venom, activates purified factor X and induces serotonin release from human blood platelets. *Eur. J. Biochem* 233 : 756-765.
- **Laraba-Djebari, F. (1984).**  
Contribution à l'étude structurale et biochimique de la phospholipase A<sub>2</sub> du venin de la vipère *Cerastes cerastes*. *Thèse de Magister, USTHB, Alger.* 72 p.

• **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.

• **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., Martin-Eauclaire, M.F. (1990).**

Purification and characterisation of phospholipase A<sub>2</sub> from *Cerastes cerastes* (horned viper) snake venom. *Toxicon* **28**, 6 :637-346

• **Larsen J. S., Schmidt T. A. et Kjeldson K. (1990).**

Isoproterenol induced cardiac hypertrophy is associated with balanced synthesis of muscle mass. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **22** : 5.

• **Leite,R.S, Ramos, O.H.P., Gomes, A.R.S., Salivini, T.F., Souza, D.H.F., Franco,W., Selistre-de-Aruja, H.S. (2004)**

Effets of myotoxic Asp 49 Phospholipase A2 (ACL-I PLA2) isolated from *Agkistrodon contortrix laticinctus* snake venom on water transport in the isolated toad urinary bladder. *Toxicon* 43: 847-853

• **Leonardi, A., Gubensek, F., Krizaj, I. (2002).**

Purification and characterisation of two hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the long-nosed viper, *Vipera ammodytes ammodytes*. *Toxicon* **40** : 55-62

• **Lewis, R.A., Austen, K.F. (1988).**

Leukotrienes. In: Gallin, J.L., Goldstein, I.M., Snyderman, R; (Eds.), *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*, Raven Press, New York, pp. 121 – 128.

• **Lifshitz, M., Kastel, H., Harman-Boehm., (2002).**

*Cerastes cerastes* envenomation in an 18 year old female: a case report. *Toxicon* 40:1227-1229.

• **Lima, C., Clissa, P.B., Piran – Soares, A., Tanjoni, I., Moura – da – Silva, A.N., Lopes - Ferreira, M. (2003).**

Characterisation of local inflammatory reponse induced by *Thalassophryne nattereri* fish venom in a mouse model of tissue injury. *Toxicon* 42: 499-507.

• **Lin YL, Tsai YL, Kuo YH, Liu YH, Shiao MS. (1999)**

Phenolic compounds from *Tournefortia sarmentosa*. *J Nat Prod.* 1999;**62**:1500–3. doi: 10.1021/np9901332.

• **Liu,C.S., Chen,J.M., Chang,C.H., Chen,S.W., Tsai,I.H., Lu,H.S. and Lo,T.B.(1990)**

Revised amino acid sequences of the three major phospholipases A2 from *Bungarus fasciatus* (banded krait) venom. *Toxicon*, 28, 1457–1468.

- **Liu, C.-S., Chen, J.-M., Chang, C.-H., Chen, S.-W., Teng, C.-M., Tsai, I.-H. (1991)**  
The amino acid sequence and properties of an edema-inducing Lys-49 phospholipase A<sub>2</sub> homolog from the venom of *Trimeresurus mucrosquamatus*. *Biochim. Biophys. Acta* **1077**, 362-370.
- **Lizano, S., Lomonte, B., Fox, J.W., Gutiérrez, J.M. (1997)**  
Biochemical characterization and pharmacological properties of a phospholipase A<sub>2</sub> myotoxin inhibitor from the plasma of the snake *Bothrops asper*. *Biochem. J.* **326** : 853-859
- **Lizano S, Angulo Y, Lomonte B, Fox JW, Lambeau G, Lazdunski M & Gutiérrez JM (2000)**  
Two phospholipase A<sub>2</sub> inhibitors from the plasma of *Cerrophidion (Bothrops) godmani* which selectively inhibit two different group II phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from its own venom: isolation, molecular cloning, and biological properties. *Biochemical Journal.* **346**, 631-639.
- **Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., Fustado, M.C., Otero, R., Rosno, J.P., Vargas, O., Carmona, E., Rovira, M.E. (1990)**  
Isolation of basic myotoxins from *Bothrops moojeni* and *Bothrops atrox* snake venoms. *Toxicon* **28** : 1137-1146
- **Lomonte B., Tarkowski A., Hanson L A (1993)**  
Host response to *Bothrops asper* snake. Analysis of edema formation, inflammatory cells and cytokine release in mouse model. *Inflammation* **17**: 93-105.
- **Lomonte, B., Moreno, E., Tarkowski, A., Hanson, L.A., Maccarana, M. (1994 b).**  
Neutralizing interaction between heparins and myotoxin II Lys-49 phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops asper* snake venom. Identification of a heparin-binding and cytolytic toxin region by the use of synthetic peptides and molecular modeling . *J.Biol. Chem* **269**, 29 : 867-873
- **Lomonte, B., León, G., Hanson, L. A (1996).**  
Similar effectiveness of Fab and F(ab')<sub>2</sub> antivenoms in the neutralization of the haemorrhagic activity of *Vipera berus* snake venom in mice. *Toxicon* **34**: 1197-1202.
- **Lomonte, B., Pizarro-cerda, J., Angulo, Y., Gorvel, J.P., Morano, E. (1999a)**  
Tyr → Trp-substituted peptide 115-129 of a Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> expresses enhanced membrane – damaging activities and reproduces its in vivo myotoxic effect. *Biochim. Biophys. Acta* **1461** : 19-26
- **Lomonte, B., Angulo, Y., Calderón, L., (2003).**  
An Overview of Lysine-49 Phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. *Toxicon* **42**:
- **Lomonte, B., Angulo, Y., Santamaria, C., (2003).**  
Comparative study of synthetic peptides corresponding to region 115–129 in Lys49 myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> from snake venoms. *Toxicon* **42**, 307–312.

- **Lu, Q.M., Jin, Y., Wei, J.F., Li, D.S., Zhu, S.W., Wang, W.Y., Xiong, Y.L. (2002).** Characterization and cloning of a novel phospholipase A<sub>2</sub> from the venom of *Trimeresurus jerdonii* snake. *Toxicon* **P** 1313-1319
- **Mackiewicz, A., Ganapathi M. K., Schultz D., Samols D., Reese J., Kushner I. (1988).** Regulation of rabbit acute phase protein biosynthesis by monokines. *Biochem. J.* **253**:851– 857.
- **Mandelbaum, F. R. (1990).** Snake venom haemorrhagins. *Mem. Inst. Butantan* **52 (1)**: 35-36.
- **Maraganore, J. M., Merutka, G., Cho, W., Welches, W., Kezdy, F. J. and Heinrikson, R. L. (1984)** A new class of phospholipase A<sub>2</sub> with lysine in place of aspartate 49. *J. Biol. Chem.* **259**, 13839–13843
- **Maraganore, J. M. & Heinrikson, R. L. (1985)** The role of lysyl residues of phospholipases A<sub>2</sub> in the formation of the catalytic complex *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **131**, 129-138
- **Marchant, A., Alegre, M.L., Hakim, A., Pierard, G., Marecaux, G., Friedman, G., De- Groote, D., Kahn, R.J., Vincent, J.L., Goldman, M., (1995).** Clinical and biological significance of interleukin-10 plasma levels in patients with septic shock. *J. Clin. Immunol.* **15** : 266-273.
- **Markland, F. S. (1998).** 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 : 261-271
- **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.
- **Martin, C., Saux, P., Mege, J.L., Perrin, G., Papazian, L., Guin, F. (1994).** Prognostic values of serum cytokines in septic shock. *Intensive Care Med.* **20**, 272 – 273.
- **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.

- **Matsui, R., Fujimura, Y., Titani, K., (2000).**  
Snake venom proteases affecting haemostasis and thrombosis. *Biochimie. Biophys. Acta* 1477: 146 – 156.
- **Meaume, J. (1983).**  
Les animaux venimeux, les reptiles In Golvan Y.J. *Eléments de parasitologie médicale.* Flammarion. 519-533
- **Mebs, D., Ehrenfeld, M et Samejima, Y.(1983)**  
Local necrotizing effect of snake venoms on skin and muscle : relationship to serum creatine kinase. *Toxicon* 21: 393-404
- **Mebs, D., Ownby, C.L. (1990)**  
Myotoxic components of snake venoms their biochemical activities. *Pharmacol. Ther* 48 : 223-236
- **Melo, P.A., Suarez-Kurtz, G., (1987).**  
Interaction of *Bothrops* venoms and antivenom on the release of creatine kinase from skeletal muscle. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 20: 821-824.
- **Melo, P.A., Suarez-Kurtz, G., (1988).**  
Release of sarcoplasmic enzymes from skeletal muscle by *Bothrops jararacussu* venom: antagonism by heparin and by the serum of South American marsupials. *Toxicon* 26: 87-95.
- **Melo, P.A., Homsí – Brandeburgo, M.I., Giglio, J.R. and Suarez-Kurtz, G.(1993).**  
Antagonism of the myotoxic effect of *Bothrops jararacussu* venom and bothrotoxin by polyanions. *Toxicon* 31, 285-291.
- **Melo, P.A., Ownby, C.L. (1999).**  
Ability of wedelolactone, heparin, and para – bromophenacyl bromide to antagonize the myotoxic effects of two crotaline venoms and their PLA<sub>2</sub> myotoxins. *Toxicon* 37, 199-215.
- **Meki, A.R.M.A., Mohey El Dean, Z.M. (1998).**  
Serum interleukin – 1  $\beta$ , interleukin – 6, nitric oxide and  $\alpha$  1- antitrypsin in scorpion envenomed children. *Toxicon* 36 (12), 1851-1859.
- **Menez, A. (1987).**  
Les venins de serpents. *La Recherche.* **18** : 886-893
- **Menez, A. (1993).**  
Structures des toxines des animaux terrestres. *Pour la Science.* **190**: 35-42
- **Mounier, C.M., Hackeng, T.M., Schaeffer, F., Faure, G., Bon, C., Griffin, J.H. (1998)**  
Inhibition of prothrombinase by human secretory phospholipase A<sub>2</sub> involves binding to factor Xa. *J. Biol. Chem.* 273 : 23764-23772

- **Moura-da-Silva, A.M., Línica, A., Della-Casa, M.S., Kamiguti, A.S., Ho, P.L., Crampton, J.M., and Theakston, R.D.G. 1999.**  
Jararhagin ECD-containing disintegrin domain: Expression in *Escherichia coli* and inhibition of the platelet-collagen interaction. *Arch. Biochem. Biophys.* **369**: 295–301
- **Murakami Makoto and Kudo Ichiro (2002).**  
Phospholipase A<sub>2</sub> J. Biochem, Vol. 131, No. 3 285-292
- **Nakada, K., Nakada, F., Ito, E., Inoue, F. (1984)**  
Quantification of myonecrosis and comparison of necrotic activity of snake venom by determination of creatine phosphokinase activity in mice sera. *Toxicon* 22(6) : 921-930
- **Nakamura K. (1986).**  
Focal myocardial necrosis with calcification in two young chickens. *J. Comp. Path.* **96**: 711-715.
- **Nikai, T., Mori, N., Kishida, M., Tsuboi, M., Sugihara, H. (1985).**  
Isolation and characterisation of hemorrhagic toxin g from the venom of *Crotalus atrox* (western diamondback rattlesnake). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **34** : 1167-1172
- **Nikai, T., Oguri, E., Kishida, M., Sugihara, H., Mori, N., Tu, A.T. (1986).**  
Reevaluation of hemorrhagic toxin, HR-1, from *Agkistrodon halys blomhoffii* venom : proof of proteolytic enzyme. *Int. J. Biochem* **18**, 2 : 103-108
- **Nogueira, T. C. A. ; Ferreira, F. ; Toyama, M. H. ; Stoppiglia, L. F. ; Marangoni, S. ; Boschero, A. C. ; Carneiro, E. M.(2005) .**  
Characterization of the insulinotropic action of phospholipase A<sub>2</sub> isolated from *Crotalus durissus collilineatus* rattlesnake venom on rat pancreatic islets. *Toxicon*, Inglaterra, v. 45, p. 243-248.
- **Núñez, V., Arce, V., Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., (2004)**  
Structural and functional characterisation of myotoxin I, a Lys 49 Phospholipase A<sub>2</sub> homologue from the venom of the snake *Bothrops atrox* . *Toxicon*
- **Oda, N., Ogawa, T., Ohno, M., Sasaki, H., Sakaki, J.Y., Kihara, H. (1990)**  
Cloning and sequence analysis of c DNA for *Trimeresurus flavoviridis* Phospholipase A<sub>2</sub> and consequent revision of the amino acid sequence. *J. Biochem*, **108**, 816–821.
- **Okumura, K., Ohkura, N., Inoue, S., Ikeda, K., and Hayashi, K.(1998).**  
A Novel Phospholipase A<sub>2</sub> Inhibitor with Leucine-rich Repeats from the Blood Plasma of *Agkistrodon blomhoffii siniticus* SEQUENCE HOMOLOGIES WITH HUMAN LEUCINE-RICH  $\alpha_2$ -GLYCOPROTEIN *J Biol Chem*, Vol. 273, Issue 31, 19469-19475.
- **Okumura, K., Masui, K., Inoue, S., Ikeda, K., Hayashi, K. (1999)**  
Purification, characterization and cDNA cloning of a phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor from the serum of the non-venomous snake *Elaphe quadrivirgata*. *Biochem. J.* **341** : 165-171

- **Okumura, K., Inoue, S., Ikeda, K., Hayashi, K. (2002)**  
Identification of  $\beta$ -type phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor in a nonvenomous snake, *Elaphe quadrivirgata*. Arch. Biochem. Biophys 48 : 124-130
- **Ohkura, N., Okura, H., Inoue, S., Ikeda, K., Hayashi, K. (1997)**  
Purification and characterization of three distinct types of phospholipase A<sub>2</sub> inhibitors from blood plasma of the Chinese mamushi, *Agkistrodon blomhoffii siniticus*. Biochem. J. 325 : 527-531
- **Ohkura, N., Inoue, S., Ikeda, K., Hayashi, K. (1993)**  
Isolation and amino acid sequence of a phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor from the blood plasma of *Agkistrodon blomhoffii siniticus*. Biochem. (Tokyo) 113 : 413-419
- **Ohkura, N., Inoue, S., Ikeda, K., Hayashi, K. (1994a)**  
Isolation and characterization of a phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor from the blood plasma of the Thailand cobra, *Naja naja kaouthia*. Biochem. Biophys. Res. Commun 200 : 784-788
- **Ohkura, N., Inoue, S., Ikeda, K., Hayashi, K. (1994b)**  
The two subunits of a phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor from the plasma of Thailand cobra having structural similarity to urokinase-type plasminogen activator receptor and LY-6 related proteins. Biochem. Biophys. Res. Commun 204 : 1212-1218
- **Ohno M., Chijiwa T., Oda-Ueda N., Ogawa T., Hattori S. 2003**  
Molecular evolution of myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> from snake venom. *Toxicon*, 2003, 42, 841-54.
- **Omari-Satoh, T., Yamakawa, Y., Mebs, D (2000).**  
The antihemorrhagic factor, erinocin, from the European hedgehog (*Erinaceus europaeus*), a metalloprotease inhibitor of large molecular size possessing ficolin/opsonin P<sub>35</sub> lectin domains. *Toxicon* 38 (11) : 1561-1580
- **Oshima-Franco, Y., Hyslop, S., Cintra, A.C., Giglio, J.R., da Cruz-Höfling, M.A., Rodrigues-Simioni, L. (2000).**  
Neutralizing capacity of commercial bothropic antivenom against *Bothrops jararacussu* venom and bothropstoxin-I. *Toxicon* 23(12):1832-9
- **Ouyang, C., Huang, T.F., (1983 d).**  
Potent platelet inhibitor from *Trimeresurus gramineus* snake venom. *Biochim. Biophys. Acta.* 57 : 332-341
- **Ownby, C.L., Colberg, T.R. (1988)**  
Classification of myonecrosis induced by snake venoms : venoms from *Crotalus viridis viridis*, *Crotalus atrox* and *Naja naja naja*. *Toxicon* 26 : 459-474
- **Ownby, C.L., Nika, T., Imai, K., Sugihara, H. (1990).**  
Pathogenesis of hemorrhage induced by bilitoxin, a hemorrhagic toxin isolated from the venom of the common cantil (*Agkistrodon bilineatus bilineatus*). *Toxicon* 28, 7 : 837-846

- **Ownby, C.L., Colberg, T.R. (1993).**  
Isolation and characterization of a PLA<sub>2</sub> myotoxin from prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom. *Toxicon*. **31** : 317
- **Ownby, C.L., Selistre -de-Aranjo, H.S., White S.P. Fletcher J.E. (1999).**  
Lysine 49 phospholipase A<sub>2</sub> proteins. *Toxicon* **37** : 411-445.
- **Ownby, C.L.,(1998).**  
Structure, function and biophysical aspects of the myotoxins from snake venoms. *J. Toxicol. Toxin Rev.* **17**: 213-238.
- **Palmblad, J., Lindstrom, P., Lerner, R. (1990).**  
Leukotriene B<sub>4</sub> induced hyperadhesiveness of endothelial cells for neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 166 (2), 848-851.
- **Pena,L., Vega, J., Finol, H.J., Mendez, M., Rodriguez, A.A. (2002)**  
Ultrastructural damages on adrenal gland, neuromuscular plate and skeletal caused by bec venom. *J Submicro. Cyto. Path. (Itakly)* 2 : 30-35
- **Pastor, C.M., Rubia-Brandt, L., Hadengue, A., Jordan, M., Morel, P., Frossard, J.L.,(2003).**  
Role of macrophage inflammatory peptide-2 in cerulein-induced acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury. *Lab. Invest.* 83: 471-478.
- **Perez, J.C., Sanchez, E. E. (1999).**  
Natural inhibitors to haemorrhagins in snake venoms and their potential use in medicine. *Toxicon* **37**: 703-728.
- **Perales, J., Damont, G.B. (2002)**  
Are inhibitors of metalloproteinases, phospholipase A<sub>2</sub> and myotoxines members of the innate immune system In : Menez, A., (Ed), *Perspectives in Molecular toxinology*, Wiley, Chichester, pp : 435-456
- **Petricevich L. V., Texeira C. F. P., Tamborgi D. V., Gutiérrez J. M. (2000)**  
Increments in serum cytokine and nitric oxide levels in mice injected with *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms. *Toxicon* **38**: 1253-1266.
- **Platel, (1991).**  
*Zoologie des cordés. Editions Ellipse, Paris* : 77-109.
- **Plushkal, M.G., Harris, J.B., Pennington, R.J., eaker, D. (1978).**  
Some biochemical responses of rat skeletal muscle to a single subcutaneous injection of a toxin (notexin) isolated from the venom of the australian tiger snake *Notechis scutatus scutatus*. *Clin. Exp. Phar and Physio* **5** : 131-141
- **Preston, S.A., Davis, C.E., Harris, J.B., (1990).**  
The assesement of muscle fibre loss after the injection of the venom of *Notechis scutatus* (Australian tiger snake). *Toxicon* **28**: 201-214.

- **Ramirez, G.A., Fletcher, P.L., Possani, L.D. (1990).**  
Characterization and cloning of novel phospholipases A from the venom of *Trimeresurus jerdonii* snake. *Toxicon* 40:1313-1319.
- **Rivière, G., Bon, C. (1999).**  
Immunothérapie antivénimeuse des envenimations ophidiennes : vers une approche rationnelle d'un traitement empirique. *Annales de l'Institut Pasteur* 10, 2 : 173-182
- **Rocha S.L.G., Lomonte B., Neves-Ferreira A.G.C., Trugilho M.R.O., Junqueira de Azevedo I.L.M., Ho P.L., Domont G., Gutiérrez J.M., Perales, J. (2002).**  
Functional analysis of DM64, an antimyotoxic protein with immunoglobulin-like structure from *Didelphis marsupialis* serum. *European Journal of Biochemistry* 269, 6052-6062.
- **Rodrigues, V.M., Soares, A.M., Andrião-Escarso, S ;H., Franceshi, A.M., Rucavado, A., Gutiérrez, J.M., Giglio, J.R. (2001).**  
Pathological alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* snake venom. *Biochimie.* 83 : 471-479
- **Rodrigues, V.M., Marcussi, S., Cambraia, R.S., De Araujo, A.L., Malta-Neto, N.R., Hamaguchi, A., Ferro, E.A.V., Honsi-Bradeburgo, M.I., Giglio, J.R., Soares, A.M., (2004).**  
Bactericidal and neurotoxic activities of two myotoxic phospholipase A2 from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom.
- **Rosenberg, P., (1989).**  
Phospholipases. In : Shier, W.T., Mebs, D. (Eds.), *Handbook of Toxinology*, Marcel Dekker, New York, pp. 67 – 277.
- **Rosenfeld G. (1971).**  
Symptomatology, pathology and treatment of snakes bites in south America. Bucherl W., Buckley EE., eds. *Venomous Animals and their venoms*. Volume 2. New York : Academic Press. 345-384.
- **Rowan EG, Harvey AL. (1988).**  
Potassium channel blocking actions of beta-bungarotoxin and related toxins on mouse and frog motor nerve terminals. *Br J Pharmacol.*94(3):839–847.
- **Rucavado, A., Flores-Sanchez, E., Franceshi, 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.
- **Rucavado, A., Nunez, J., Gutiérrez, J.M. (1998).**  
Blister formation and skin damage induced by Bap1, a haemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Int. J. Exp. Path* 79 : 245-254

- **Rucavado, A., Escalante, T., Teixeira, C.F.P., Fernandes, C.M., Dias, C., Gutiérrez, J. M. (2002).**  
Increments in cytokines and matrix metalloproteinases in skeletal muscle after injection of tissue-damaging toxins from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Mediators Inflamm.* 11, 121-128.
- **Ryan, GB, Majno, G**  
Acute inflammation: A review. *Am J Pathol* 1977 86: 183–276,
- **Santos, P.E.B., Souza, S.D., Freire-Maia, L., Almeida, A.P. (1990).**  
Effects of crotoxin on the isolated guinea pig heart. *Toxicon.* 28, 2 : 215-224
- **Scott, D.L., White, S.P., Otwinowski, Z., Yuan, W., Gelb, M.H. and Sigier, P.R. (1990)**  
Interfacial catalysis in the mechanism of phospholipase A<sub>2</sub>. *Science* 250 : 1541-1545
- **Scott, D.L., Achari, A., Vidal, J.C., Sigler, P.B., 1992.**  
Crystallographic and biochemical studies of the (inactive) Lys-49 phospholipase A<sub>2</sub> from the venom of *Agkistrodon piscivorus piscivorus*. *J. Biol. Chem.* 267, 22645–22657.
- **Scott, D.L., 1997.**  
Phospholipase A<sub>2</sub>: structure and catalytic properties. In: Kini, R.M. (Ed.). *Venom Phospholipase A<sub>2</sub> Enzymes: Structure, Function, and Mechanism*. John Wiley & Sons, England, pp. 97±128.
- **Schalwijk, C.G., J. Pfeilschifter, F. Märki, and H. Van den Bosch. (1991).**  
Interleukin-1b, tumor necrosis factor and forskolin stimulate the synthesis and secretion of group II phospholipase A<sub>2</sub> in rat mesangial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 174:268–275.
- **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.
- **Serve F. (1992).**  
Morsures de serpents en France. In *Urgences medico chirurgicales de l'adulte*. Carli P., Riou B., Arnette : 805-808.
- **Shakhman, Olena Herkert, Matthias, Andreas Humeny Christine Rose and Becker Cord-Michael (2003).**  
Induction by b-bungarotoxin of apoptosis in cultured hippocampal neurons is mediated by Ca<sup>2+</sup>-dependent formation of reactive oxygen species *Journal of Neurochemistry*, doi:10.1046/j.1471-4159.2003.02035.x 598
- **Shier, W.T. (1982).**  
Cytolytic mechanisms: self destruction of mammalian cells by activation of endogenous hydrolytic enzymes. *J. Toxicol. Tox. Rev.* 1: 1 – 32.

- **Sigur, E., Siigur, J. (1991).**  
Purification and characterization of lebetase, a fibrinolytic enzyme from *Vipera lebetina* (snake) venom. *Bioch. Biophys. Acta* 1074 : 223-229.
- **Simons, R.K., Hoyt, D.B. (1994).**  
Immunomodulation In: Maull, K.L., Cleveland, H.C., Feliciano, D.V., Rice, C.L., Trunkey, D.D., Wolfert, C.C. Jr. (Eds.), *Advances in Trauma and Critical Care*, Mosby, St Louis, MO, pp. 135 – 167. V
- **Six D. A., Dennis E. A. (2000).**  
The expanding superfamily of phospholipase A<sub>2</sub> enzymes : classification and characterization. *Bioch. Biophys. Acta* **14, 88** : 1-19.
- **Slavtchev, R.S., Ben Osman, F. (1969).**  
La vipère à cornes et son venin. Archives Institut Pasteur de Tunis, Tome XVI: 83-136.
- **Snick, J.V. (1990).**  
Interleukin – 6 : an overview. *Annu. Rev. Immunol.* 8, 253-278.
- **Soares, A.M., Maraisi, S., Stabeli, R.G., França, S.C., Giglio, J.R., Ward, R.J., Arantes, E.C. (2003)**  
Structural and functional analysis of Bmj MIP, a phospholipase A<sub>2</sub> myotoxin inhibitor protein from *Bothrops moojeni* plasma. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 302 : 193- 200
- **Springer TA. (1994).**  
Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration : the multistep paradigm. *Cell*; 76 : 301–314.
- **Stefansson, S., Kini, R.M., Evans, H.J. (1989)**  
The inhibition of clotting complexes of the extrinsic coagulation cascade by the phospholipase A<sub>2</sub> isoenzymes from *Naja nigricollis* venom. *Thromb. Res.* 55 : 481-491
- **Stefansson, S., Kini, R.M., Evans, H.J. (1990)**  
The basic phospholipase A<sub>2</sub> from *Naja nigricollis* venom inhibits the prothrombinase complex by a novel nonenzymatic mechanism. *Biochemistry* 29 : 7742-7746
- **Stocker, K., Barlow, G.H. (1976).**  
The coagulant enzyme from *Bothrops atrox* venom (batroxobin). *Meth. Enzymol* **45** : 214-223
- **Stylianou, E., Saklatvala, J., (1998).**  
Molecules in Focus Interleukin-1. *Intern. J. Biochem. Cell. Biol.* 30, 1075-1079.
- **Sribar, J., Copic, A., Paris, A., Sherman, N.E., Gubensek, F., Fox, J.W., Krizaj, I. (2001)**  
A high affinity acceptor for phospholipase A<sub>2</sub> with neurotoxic activity is a calmodulin. *J. Biol. Chem.* 276 : 12493-12496

- **Sugiki, M., Maruyama, M., Yoshida, E., Mihara, H., Kamiguti, A.S., Theakston, R.D.G. (1995).**  
Enhancement of plasma fibrinolysis *in vitro* by jararhagin, the main haemorrhagic metalloproteinase in *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon*. **33**, 12 : 1605-1617
- **Sundy, J.S., Patel, D.D., Haynes, B.F.(1999).**  
Cytokines in normal and pathogenic inflammatory responses, in: Gallin, J.L., Snyderman, R. (Eds.), *Inflammation. Basic Principles and Clinical Correlates*. Lippincott, Philadelphia, PA, pp.433-441.
- **Suwa, T., Hogg, J.C., Quinlan, K.B., Van Eeden, S.F., (2002).**  
The effect of interleukin-6 on L-selection levels on polymorphonuclear leukocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **283**, H879- H884.
- **Suzuki, A., Matsueda, E., Yamane, T., Ashida, T., Kihara, H. and Ohno, M. (1995).**  
Crystal structure analysis of phospholipase A<sub>2</sub> from *Trimeresurus flavoviridis* (habu snake) venom at 1.5 Å resolution. *J. Biochem. (Tokyo)* **117**, 730–740
- **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.
- **Taketo MM, Sonoshita M. (2002).**  
Phospholipase A2 and apoptosis. *Biochim Biophys Acta*, **1585**(2-3):72-76.
- **Teixeira-Clerc, F., Michalet, S., Menez, A., Kessler, P, (2003)**  
A cysteine-linkable, short cleavable photoprobe with dual functionality to explore protein-protein interfaces, *Bioconjugate Chemistry*, **14**(3) 554-562
- **Than, T., Sein, M et Pe, U., (1985).**  
Variation in russell's viper composition within different batches of collection. *Toxicon*.**23**: 616.
- **Thireau, M. (1995).**  
La fonction venimeuse. *Edition Masson, Barcelone*. 271 p.
- **Thomas, L., Tyburn, B., Ketterle, J., Biao, T., Mehdaoui, H., Moravie, V., Plumelle, Y., Bucher, B., Canonge, D., Marie – Nelly, C.A., Lang, J. (1998).**  
Prognostic significance of clinical grading of patients envenomed by *Bothrops lanceolatus* in Martinique. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **92**, 542-545.
- **Thwin, M; M., Gopalakrihnakone, P., Kini, R.M., Armugam, A., Jeyaseelan, K. (2000)**  
Recombinant antitoxic and anti-inflammatory factor from the nonvenomous snake Python reticulatus phospholipase A<sub>2</sub> inhibition and venom neutralizing potential. *Biochemistry* **39** : 9604-9611

- **Tomoo, K., Ohishi, H., Ishida, T., Inoue, M., Ikeda, K., Sumiya, S. & Kitamura, K.(1994).**  
X-ray crystal structure and molecular dynamics simulation of bovine pancreas phospholipase A<sub>2</sub>-n-dodecylphosphorylcholine complex. *Proteins: Proteins*.19(4):330-9.
- **Tortora, G.J., Anagnostakos, N.P. (1988).**  
Principes d'anatomie et de physiologie. Edition C.E.C. Collégial et universitaire, Canada.
- **Touqui L.; Alaoui-El-Azher M.(2001)**  
Mammalian Secreted Phospholipases A<sub>2</sub> and Their Pathophysiological Significance in Inflammatory Diseases *Current Molecular Medicine*, Volume 1, Number 6, pp. 739- 754(16)
- **Toyama M. H., Soares A. M., Wen-Hwa L., Polikarpov I., Giglio J. R., Marangoni S. (2000).**  
Amino acid sequence of piratoxin-II, a myotoxic Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> homologue from *Bothrops pirajai* venom. *Biochimie* **82** : 245-250.
- **Trump BF, Berezsky 1K, Cowley RA. (1982).**  
The cellular and subcellular characteristics of acute and chronic injury with emphasis on the role of calcium. In: Cowley RA, Trump BF, eds. *Pathophysiology of shock, anemia and ischemia*. Baltimore: Williams & Wilkins.
- **Vadas P, Browning J, Edelson J, Pruzanski W (1993)**  
Extracellular phospholipase A<sub>2</sub> expression and inflammation: the relationship with associated disease states. *J Lipid Mediators* 8:1-30
- **Vadas, P. and Pruzanski, W (1986)**  
Role of secretory phospholipase A<sub>2</sub> in the pathobiology of disease. *Lab. Invest.* 55: 391-399.
- **Valentin, E., Lambeau, G. (2000).**  
What can venom phospholipases A<sub>2</sub> tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipases A<sub>2</sub>? *Biochimie* **82** : 815-831
- **Van Deenen, L.L.M, De Hass, G.H. (1963)**  
The substrate specificity of phospholipase A<sub>2</sub>. *Biochem. Biophys. Acta* 7 : 538-553
- **Vardjan, N., Sherman, N.E., Pungercar, J., Fox, J.W., Gubensek, F., Krizaj, I. (2001)**  
High-molecular-mass receptors for ammodytoxin in pig are tissue-specific isoforms of m-type phospholipase A<sub>2</sub> receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 289 : 143-149
- **Vaughan, G.T., Sculley, T.B., Tirrell, R. (1981).**  
Isolation of hemolytic, toxic phospholipase from the venom of the Australian red-bellied black snake (*Pseudechis porphyriacus*). *Toxicon*. **19** : 95-101
- **Vilojen C. C., Meehan C. M. et Botes D. P. (1979).**  
Separation of *Bitis gabonica* venom arginin into Kinin6 releasing clotting and fibrinolytic factors. *Toxicon* **17** : 145-154.

- **Vishwanath, B.S., Kini, R.M., Gowda, T.V. (1987)**  
Characterization of three edema-inducing phospholipase A<sub>2</sub> enzymes from *Hab* (*Trimeresurus flacociridis*) venom and their interaction with the alkaloid aristolochic acid. *Toxicon* 25 : 501-515
- **Vucemilo, N., Copic, A., Gibensek, F., Krizaj, I. (1998)**  
Identification of a new high-affinity binding protein for neurotoxic phospholipases A<sub>2</sub>. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 251 : 209-212
- **Wang, J.P. and Teng, C.M. (1990).**  
Rat paw oedema and mast cell degranulation caused by two phospholipase A<sub>2</sub> enzymes isolated from *Trimeresurus mucrosquamatus* venom. *J. Pharm. Pharmacol.* 42(12):846-850.
- **Wang LF., Lin JY., Hsieh KH., Lin RH. (1996)**  
Epicutaneous exposure of rotein antigen induces a predominant Th2-like response with high IgE production in mice. *J. Immunol.*,156, 4079-82.
- **Wang XQ, Yang J, Gui LL, Lin ZJ, Chen YC, Zhou YC. (1996).**  
Crystal structure of an acidic phospholipase A<sub>2</sub> from the venom of *Agkistrodon halys pallas* at 2.0 Å resolution. *J Mol Biol.* 1996 Feb 9;255(5):669-76.
- **Wang W. J., Huang T. F., (2002).**  
Purification and characterization of a novel metalloproteinase Achuragine, from *agkistrodon acutus* venom. *Thromb. Haemosta.* **87** : 641-650.
- **Ward, R.J., Rodrigues Alves, A., Rugierro Neto, J., Arni, R.K., Casari, J. (1998)**  
A sequence space analysis of Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> : Clues towards identification of residus involved in a novel mechanism of membrane damage and in myotoxicity. *Protein Engng* 11 : 285-294
- **Ward M. W., Rego A. C., Frenguelli B. G. and Nicholls D. G. (2000)**  
Mitochondrial membrane potential and glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. *J. Neurosci.* 20, 7208–7219.
- **Warrell, D.A., (1995).**  
Clinical toxicology of snakebite in Asia, in: Meier, J., White, J.(Eds.), *Handbook of clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp.493-594.
- **Warrell, D.A. (1996)**  
Clinical features of envenoming from snake bites. In : Bon, C., Goyffon, M. (Eds), *Envenoming and their treatments*. Fondation Marcel Mérieux, Lyon
- **Westerlund, B., Nordlund, P., Uhlin, U., Eaker, D. and Eklund, H. (1992).**  
The three-dimensional structure of notexin, a presynaptic neurotoxic phospholipase A<sub>2</sub> at 2.0 Å resolution. *FEBS Lett.* 301, 159-164

- **Wisner., Bon, C. (2002).**  
Venins et hémostasie. *Toxines et recherche biomédicale. Edition scientifique et médicale, Elsevier* : 321-324.
- **Wuster, W., (1996).**  
Venomous snake systemic: Implication in snake bite treatment and toxicology. *Toxicon* 34 : 143.
- **Yamaguchi Y, Shimohigashi Y, Chijiwa T, et al.**  
Characterization, amino acid sequence and evolution of edema-inducing, basic phospholipase A2 from *Trimeresurus flavoviridis* venom. *Toxicon* 2001 Jul; 39(7) :1069-76.
- **Yoshizumi, K., Liu, S.Y., Miyata, T., Saita, S., Ohno, M., Iwanaga, S., Kihara, H.,(1990).**  
Purification and amino acid sequence of basic protein I, a lysine-49 phospholipase A2 with low activity, from the venom of *Trimeresurus flavoviridis* (Habu snake). *Toxicon* 28, 43–54.
- **Zallen G., Moore, E. E. Johnson, J. L. Tamura, D. Y. Barkin, M. Stockinger, H. and Silliman C. C. (1998).**  
New Mechanisms by Which Secretory Phospholipase A2 Stimulates Neutrophils to Provoke the Release of Cytotoxic Agents *Arch Surg*; 133(11): 1229 - 1233.
- **Zamunér, S.R., Da Cruz-Höfling, M.A., Corrado, A.P., Hyslop, S., Rodrigues Simioni, L.,(2004).**  
Comparison of the neurotoxic and myotoxic effects of Brazilian *Bothrops* venoms and their neutralization by commercial antivenom. *Toxicon* 44: 259-271.
- **Zamunér, S.R., Zuliani, J.P., Fernandes, C.M., Gutiérrez, J.M., Teixeira, C.F.P.(2005).**  
Inflammation induced by *Bothrops asper* venom: release of proinflammatory cytokines and eicosanoids molecules in leukocyte infiltration. *Toxicon* 46: 806-813.
- **Zeller E. A., (1984).**  
Enzymes of snake venom and their biological significance. *Adv. Enzymol.* 8 : 459-491
- **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
- **Zuliani P. Juliana, Cristina M. Fernandes, Stella R. Zamuner, José M. Gutiérrez, Ctarina F. P. Teixeira (2005).**  
Inflammatory events induced by Lys-49 and Asp-49 Phospholipases A<sub>2</sub> isolated from *Bothrops asper* snake venom : role of catalytic activity. *Toxicon* 45 : 335-346.