

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

THESE
PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTORAT D'ETAT
En : SCIENCES DE LA NATURE
Spécialité : BIOCHIMIE-IMMUNOLOGIE

Par

HABIBA OUSSEDIK-OUMEHDI

Thème

**EFFET DE L'IRRADIATION GAMMA SUR LES PROPRIETES
BIOCHIMIQUES ET IMMUNOLOGIQUES DU VENIN DE *Cerastes*
cerastes : APPORT DANS L'IMMUNOTHERAPIE OPHIDIENNE**

Soutenue publiquement le 18/12/2007 devant le jury composé de :

Mr. R. BAKOUR, Professeur, USTHB.	Président
Mme. F. LARABA-DJEBARI, Professeur, USTHB.	Directeur de thèse
Mme. C. TOUIL, Professeur, USTHB.	Examineur
Mme. D. SATTA, Professeur, Université Mentouri.	Examineur
Mme. S. OUALI-HASNAOUI, Maitre de conférences, USTHB.	Examineur
Mme. D. HAMMOUDI-TRIKI, Maitre de conférences, USTHB.	Examineur
Mr. A. MATI, Docteur, Université Mouloud Mammeri.	Examineur

Au nom d'Allah, le Tout Miséricordieux, le Très Miséricordieux.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire de la Faculté des Sciences Biologiques (USTHB) et au laboratoire de Recherche et Développement sur les Venins de l'Institut Pasteur d'Algérie, sous la direction du Professeur F. Laraba-Djebari.

J'exprime tout particulièrement ma gratitude à Mme F. Laraba-Djebari pour avoir dirigé et encadré ce travail, pour ses intarissables et précieux conseils, pour sa rigueur scientifique et surtout pour ses encouragements et son soutien. Qu'elle veuille bien trouver ici l'expression de ma profonde et incommensurable reconnaissance.

Mes vifs remerciements s'adressent à :

Mr R. Bakour qui me fait le grand honneur de présider ce jury.

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

Mme D. Satta qui m'honore de sa présence afin d'e juger ce travail.

Mme D. Hammoudi-Triki, pour son soutien, ses précieux conseils, son amabilité et pour avoir bien voulu accepter d'examiner cette thèse.

Mme S. Ouali-Hasnaoui qui me fait l'honneur d'accepter d'examiner ce travail.

Mr A. Mati pour l'honneur qu'il me fait de bien vouloir accepter de juger cette thèse.

Mes vifs remerciements s'adressent aussi à Sonia et à Fatah pour leur précieuse aide, ainsi qu'à Nadia, Nouara, Lila, Loubna, Amina, Hynda, Fatima, Sassia, Assia, Souad et Amel.

Je remercie tout particulièrement mes amies Malika, Fadhéla, Zohra, Dalila et Souad.

Je dédie ce travail à :

Mes très chers parents pour leur sagesse et leur indéfectible soutien. Tout le mérite leur revient.

Mon mari Farid et à mes chers enfants Djaffar-Younes, Sarah et Maya pour leur dévouement.

Mes frères et sœurs Baya, Mourad, Leila, Aicha, Khaled, Amine, à leurs conjoints et à leurs enfants.

Ma belle- maman Nouara et à ses enfants.

Toute ma famille.

Communications

H. Oussedik-Oumehdi et F. Laraba-Djebari.

Projet d'étude de l'immunogénicité et du degré de détoxification du venin de *Viperidae* soumis à différents traitements physico-chimiques. I^{re} journée scientifique sur l'étude de l'envenimation scorpionique et ophidienne : Venins et Sérothérapie. Alger 23/12/1997.

H. Oussedik-Oumehdi et F. Laraba-Djebari.

Stratégie de recherche de fractions immunoréactives dans le venin de *Cerastes cerastes* par DOT-ELISA. Workshop : Application des biotechnologies en santé. USTHB-ALESCO. Alger 18-24/10/1998

F. Laraba-Djebari ; **H. Oussedik-Oumehdi** ; M.F. Martin-Euclaire et P. Marchot.

Biochemical studies of *Cerastes cerastes* venom and research of immunoreactive components by DOT-ELISA. Conference on venomous snakes and treatment of snakebite victims. Cho-Ray Hospital. Ho Chi Minh, Viet-nam 25-26/11/1998.

F. Laraba-Djebari; **H. Oussedik-Oumehdi** ; M.F. Martin-Euclaire et P. Marchot.

Properties of serine proteinases from snake venoms and their immunological and phamacological use. IIIrd Arab conference on modern biotechnology and areas of application in the arab world. Cairo, Egypt 14-17/12/1998.

H. Oussedik-Oumehdi et F. Laraba-Djebari.

Mise en évidence d'une fraction immunodominante dans le venin de *Cerastes cerastes*. IV^{eme} Salon de la connaissance. Université M'Hamed Bouguerra, Boumerdes 28-30/03/2000.

F. Laraba-Djebari ; L. Hamza ; R. Belkhodja et **H. Oussedik-Oumehdi**.

Biological and pharmacological activities of proteins isolated from snake venoms. Ist African congress on biology and health. Setif 23-23/04/2000.

H. Oussedik-Oumehdi et F. Laraba-Djebari.

Le venin de *Cerastes cerastes* : effets et immunothérapie. Conférences de l'IPA. Alger 06/11/2000.

L. Hamza, R. Belkhodja, **H. Oussedik-Oumehdi**, H. Abib, N. Heffar, F. Amrane et F. Laraba-Djebari.

Constituants moléculaires et physiopathologie des venins de *Viperidae*. IIème journées scientifiques de l'ANDRS. Oran 17-18/12/2003.

H. Oussedik-Oumehdi, L. Abib, H. Abib, N. Bennacef-Heffar et F. Laraba-Djebari.

Détoxification et préservation de l'immunogénicité des venins de scorpion et de serpents après irradiation gamma. IVèmes journées scientifiques de l'ANDRS. Faculté de médecine de Tlemcen 06, 07 et 08/09/2005.

H. Oussedik-Oumehdi et F. Laraba-Djebari

Effet de l'irradiation gamma au cobalt⁶⁰ sur l'activité hémorragique et sur les propriétés immunologiques du venin de *Cerastes cerastes*.

32° Anniversaire de l'USTHB. 15-26 Avril 2006. Alger.

A. Mendil, N. Chaou, F. Chérifi, A. Saci, L. Abib, N. Bennacef-Heffar, H. Boukhalfa-Abib, S. Adi-Bessalem, **H. Oussedik-Oumehdi**, L. Hamza, S. Sami-Merah, D. Hammoudi-Triki et F. Laraba-Djebari.

Effets des venins et de leurs biomolécules sur les modifications physiopathologiques induites lors d'envenimations expérimentales.

Réseau International des Instituts Pasteur, 1ère Réunion Maghreb-Iran, 25-26/01/07, IPA, Maroc.

A. Mendil, N. Chaou, F. Chérifi, A. Saci, L. Abib, N. Bennacef-Heffar, H. Boukhalfa-Abib, S. Adi-Bessalem, **H. Oussedik-Oumehdi**, L. Hamza, S. Sami-Merah, D. Hammoudi-Triki et F. Laraba-Djebari.

Apport de l'immunothérapie dans le traitement des envenimations expérimentales scorpionique et ophidienne.

Réseau International des Instituts Pasteur, 1ère Réunion Maghreb-Iran, 25-26/01/07, IPA, Maroc.

H. Oussedik-Oumehdi, H. Boukhalfa-Abib et F. Laraba-Djebari.

Irradiation gamma au ^{60}Co du venin de *Cerastes cerastes* : implications sur les effets physiopathologiques et immunologiques.

Journées de Radiobiologie Appliquée, 27-28/02/07, CRNA, Alger.

A. Mendil, N. Chaou, F. Chérifi, A. Saci, L. Abib, N. Bennacef-Heffar, H. Boukhalfa-Abib, S. Adi-Bessalem, **H. Oussedik-Oumehdi**, L. Hamza, S. Sami-Merah, D. Hammoudi-Triki et F. Laraba-Djebari.

Envenimations scorpionique et ophidienne : irradiation gamma, autre approche d'optimisation de l'immunothérapie.

Journées de Radiobiologie Appliquée, 27-28/02/07, CRNA, Alger.

H. Oussedik-Oumehdi et F. Laraba-Djebari.

Irradiation gamma au ^{60}Co du venin de *Cerastes cerastes* : effets sur les propriétés biochimiques et immunologiques.

Journées de Radiobiologie Appliquée, 27-28/02/07, CRNA, Alger.

H. Boukhalfa-Abib, **H. Oussedik-Oumehdi**, N. Bennacef-Heffar, L. Abib et F. Laraba-Djebari.

Modification de la toxicité et de l'immunogénicité des venins de scorpion et de serpent après traitement par deux doses de rayonnement gamma.

Journées de Radiobiologie Appliquée, 27-28/02/07, CRNA, Alger.

L. Abib, H. Boukhalfa-Abib, **H. Oussedik-Oumehdi**, N. Bennacef-Heffar et F. Laraba-Djebari.

Évaluation biologique et immunologique des effets de l'irradiation gamma sur les venins de serpent et de scorpion.

Vèmes Journées Scientifiques de l'ANDRS, 09, 10 et 11/04/07, Annaba.

Sommaire

Liste des abréviations

I. Introduction	1
II. Revue bibliographique	3
II.1. Les serpents	3
II.2. Venins de serpents	4
II.2.1. Enzymes de serpents	5
II.2.1.1. Protéinases	5
II.2.1.1.1. Les métalloprotéinases	5
II.2.1.1.2. Les sérine protéinases	6
II.2.1.2. Les phospholipases A ₂	6
II.2.1.3. Les L-amino-acide oxydases	12
II.2.1.4. Les Hyaluronidases	12
II.2.1.5. Les acétylcholinestérases	12
II.2.1.6. Les phosphoestérases	13
II.2.2. Les toxines de venins de serpents	13
II.2.3. Venin de <i>Cerastes cerastes</i>	14
II.3. Physiopathologie de l'envenimation vipérine	14
II.3.1. L'hémorragie	15
II.3.2. L'œdème	21
II.3.3. La nécrose des tissus	21
II.3.4. Les troubles de la coagulation	22
II.4. Immunothérapie antivenimeuse	25
II.5. Atténuation des venins	27
II.6. Irradiation gamma	27
II.6.2. Effet des rayons gamma sur les molécules biologiques	30
II.6.3. Irradiation gamma des venins de serpents	30
II.7. Réponse inflammatoire	35
II.7.1. L'histamine et la sérotonine	35
II.7.2. Les médiateurs lipidiques	36

II.7.2. Cytokines pro-inflammatoires et fonctions effectrices	38
II.7.3. Autres médiateurs de l'inflammation	38
II.8. Les anti-inflammatoires	40
III. Matériel et méthodes	43
III.1.1. Matériel biologique	43
III.1.2. Animaux	43
III.1.3. Matériel non biologique	43
III.2. Méthodes	44
III.2.1. Irradiation gamma du venin	44
III.2.2. Implications de l'irradiation gamma sur les propriétés biochimiques du venin de <i>Cerastes cerastes</i>	44
III.2.2.1. Analyse du comportement électrophorétique du venin natif et des venins irradiés par SDS-PAGE	44
III.2.2.2. Détermination des activités enzymatiques avant et après irradiation gamma	45
III.2.2.2.1. Détermination de l'activité arginine ester hydrolase	45
III.2.2.2.2. Détermination de l'activité amidolytique	45
III.2.2.2.3. Détermination de l'activité caséinolytique	46
III.2.2.2.4. Détermination de l'activité coagulante	47
III.2.2.2.5. Détermination de l'activité phospholipasique	47
III.2.3. Implications de l'irradiation gamma sur les activités biologiques du venin de <i>Cerastes cerastes</i>	47
III.2.3.1. Evaluation de la toxicité résiduelle après irradiation gamma du venin	47
III.2.3.2. Evaluation de l'activité hémorragique du venin natif et des venins irradiés	47
III.2.3.3. Détermination de l'activité dermonécrotique du venin de <i>Cerastes cerastes</i> avant et après irradiation gamma	48
III.2.3.3.1. Mise en évidence d'une activité dermonécrotique du venin natif : test macroscopique	48
III.2.3.3.2. Mise en évidence d'une activité dermonécrotique du venin natif : approche histologique	48
III.2.3.3.3. Effets de quelques inhibiteurs sur l'activité dermonécrotique du venin de <i>Cerastes cerastes</i>	49

III.2.3.3.4. Effet de quelques anti-inflammatoires sur l'activité dermonécrotique du venin de <i>Cerastes cerastes</i>	49
III.2.3.3.5. Evaluation de l'activité dermonécrotique des venins irradiés	50
III.2.4. Implications de l'irradiation gamma sur les propriétés immunologiques du venin de <i>Cerastes cerastes</i>	50
III.2.4.1. Préparation des immun-sérums	50
III.2.4.1.1. Détermination des titres anticorps des immun-sérums par ELISA Simple	50
III.2.4.1.2. Détermination de l'immunoréactivité des immun-sérums par western-blot	51
III.2.4.2. Etude de la capacité neutralisante des anti-venins natif et irradiés de <i>Cerastes cerastes</i>	51
III.2.4.2.1. Evaluation de la toxicité résiduelle en présence d'immunothérapie	51
III.2.4.2.2. Evaluation de l'activité hémorragique résiduelle en présence d'immunothérapie	52
III.2.4.2.3. Evaluation de l'activité dermonécrotique résiduelle en présence d'immunothérapie	52
IV. Résultats et discussion	53
IV.1. Effet de l'irradiation gamma sur les propriétés biochimiques des venins irradiés	53
IV.1.1. Effet de l'irradiation gamma sur le comportement électrophorétique du venin de <i>Cerastes cerastes</i>	53
IV.1.2. Evaluation des activités enzymatiques du venin natif et des venins irradiés	54
IV.1.2.1. Détermination des activités protéolytiques	54
IV.1.2.2. Détermination de l'activité coagulante	58
IV.1.2.3. Détermination de l'activité phospholipasique	61
IV.2. Effets de l'irradiation gamma sur les activités biologiques	63
IV.2.1. Toxicité résiduelle des venins irradiés	63
IV.2.2. Activité hémorragique résiduelle des venins irradiés	63
IV.2.3. Evaluation de l'activité dermonécrotique des venins natif et irradiés	65
IV.2.3.1. Activité dermonécrotique du venin natif de <i>Cerastes cerastes</i>	65
IV.2.3.1.1. Estimation de la dose minimale nécrotique	65

IV.2.3.1.2. Etude histopathologique de l'activité dermonécrotique du venin natif de <i>Cerastes cerastes</i>	68
IV.2.3.1.3. Effet de deux anti-protéasiques sur l'activité dermonécrotique	68
IV.2.3.1.3.1. Effet du Na ₂ EDTA sur l'activité dermonécrotique du venin de <i>Cerastes cerastes</i>	70
IV.2.3.1.3.2. Effet du PMSF sur l'activité dermonécrotique du venin de <i>Cerastes cerastes</i>	70
IV.2.3.1.4. Effet des anti-inflammatoires sur l'activité dermonécrotique du venin de <i>Cerastes cerastes</i>	
IV.2.3.1.4.1. Effet de la dexaméthasone sur l'activité dermonécrotique du venin de <i>Cerastes cerastes</i>	74
IV.2.3.1.4.2. Effet de la pentoxifylline sur l'activité dermonécrotique du venin de <i>Cerastes cerastes</i>	75
IV.2.3.1.4.3. Effet de l'indométacine sur l'activité dermonécrotique du venin de <i>Cerastes cerastes</i>	75
IV.2.3.2. Activité dermonécrotique des venins irradiés	79
IV.3. Implications de l'irradiation gamma sur les propriétés immunogènes et antigéniques du venin <i>Cerastes cerastes</i>	82
IV.3.1. Titres anticorps des immun-sérums	82
IV.3.3. Immunoréactivité des immun-sérums avec le venin natif	84
IV.4. Capacité neutralisante des anti-venins natif et irradiés	84
IV.4.1. Toxicité résiduelle du venin natif en présence d'immunothérapie	84
IV.4.2. Activité hémorragique résiduelle du venin natif en présence d'immunothérapie	86
IV.4.3. Activité dermonécrotique résiduelle du venin natif en présence d'immunothérapie	88
V. Discussion générale	91
VI. Conclusion et perspectives	102
VII. Références bibliographiques	104

Liste des abréviations

APP : acute phase proteins

BSA : bovine sérum albumine

Cci1 : venin de *Cerastes cerastes* irradié à 1 kGy

Cci2 : venin de *Cerastes cerastes* irradié à 1 kGy

Cox : cyclo-oxygénase.

DFP : diisopropylfluorophosphate

Dis-like : disintegrin-like domain

DL₅₀ : dose létale 50 ; dose qui tue la moitié du lot des animaux utilisés

DMH : dose minimale hémorragique

DMN : dose minimale nécrotique

DMO : dose minimale œdématisante

EDTA : éthylène diamine tétra-acétique

ELISA : enzyme linked immunosorbent assay

HETE: acide hydroxy-eicosatétraénoïque

HPETE : Acide hydroperoxy éicosatétraénoïque

Hsp 90 : Heat-shock protein

IL : interleukine

i.d. : intra-dermique

i.p. : intra-péritonéale

LAAO: L-amino acid oxydase

LT : leucotriènes

LTB₄ : leucotriènes B₄

LX : lipoxines

NO : oxyde nitrique

iNOS : inducible nitric oxide synthase

SDS : sodium dodécyl sulfate

PAF : Platelet Activating Factor

PG : prostaglandine

PLA₂ : phospholipase A₂

PM : poids moléculaire

s.c. : sous-cutanée

sPLA₂ : snake phospholipase A₂

SVMP: snake venom metalloproteinases

TCA: trichloro-acétate

TGF-β : transforming growth factor β

TNF : tumor necrosis factor

TXA₂: thromboxane A₂

Introduction

Introduction

L'envenimation ophidienne constitue, en Afrique, un problème de santé publique majeur (Bon 2000 ; Bellefleur et Le Dantec, 2005). Plus de 100 000 décès sont enregistrés dans le monde, dont 20 000 sur le continent africain et 400 000 de victimes d'envenimation gardent des séquelles fonctionnelles graves et permanentes. Les données épidémiologiques permettent d'estimer plus de 5 millions de cas d'envenimations par an, avec un taux de mortalité de 2,5 %. En Afrique tropicale, les morsures de *Viperidae* sont responsables de 90 % des envenimations (Chippaux et *al.*, 1999).

En Algérie, deux espèces de vipères sévissent dans les zones désertiques et dans les hauts plateaux, *Cerastes cerastes* et *Vipera lebetina*. La vipère à corne *Cerastes cerastes* est considérée comme étant l'un des serpents les plus redoutables. Sa morsure est toujours grave et souvent mortelle. Les composants toxiques de ce venin ont plusieurs cibles, notamment le foie, le rein, le poumon, le muscle squelettique et cardiaque ainsi que le pancréas (Abib 2002, Chérifi 2004).

Le venin des *Viperidae* est un mélange complexe de biomolécules toxiques et non toxiques. Ces molécules provoquent de graves hémorragies, principal symptôme des envenimations vipérines, qui débutent au niveau du site de la morsure puis deviennent systémiques. Ces venins provoquent également l'œdème et des dommages tissulaires. Différents composants du venin sont responsables de ces diverses activités toxiques. Il s'agit notamment de métalloprotéinases, de sérine protéinases, de phospholipases A₂ et de molécules interférant dans les mécanismes hémodynamiques, dont certaines ont été caractérisées (Laraba-Djebari et Martin-Eauclaire, 1990 ; Laraba-Djebari et *al.*, 1992 ; 1995 ; Marrakchi et *al.*, 1997 ; Theakston et Kamiguti, 2002 ; Escalante et *al.*, 2003).

L'immunothérapie est le seul traitement efficace des envenimations ophidiennes. Elle consiste en l'injection de fragments Fab'₂ d'immun-sérums produits par hyper-immunisation de chevaux avec le venin. L'état de santé des animaux producteurs se fragilise à long terme, en raison de l'action des composants toxiques du venin sur plusieurs organes vitaux. Cette altération de l'état physique des animaux producteurs entraîne, d'une part, une diminution de l'efficacité de système immunitaire, réduisant ainsi la qualité des anticorps produits et d'autre part une diminution de la longévité.

Plusieurs approches ont été appliquées pour atténuer les venins, mais la plupart des procédés physico-chimiques utilisés réduisent leurs propriétés immunogènes (Flowers 1966 ; Kocholaty et *al.*, 1968 ; Costa et *al.*, 1985 ; Tejasen et Otolenghi, 1970 ; Guidolin, et *al.*, 1989). L'irradiation gamma semble la méthode de choix car elle permet non seulement d'atténuer la toxicité des venins, mais permet également de préserver les propriétés immunologiques des molécules irradiées (Hati et *al.*, 1990 ; Murata et *al.*, 1990; Nascimento et *al.*, 1996 ; Clissa et *al.*, 1999).

Dans cette étude, une irradiation gamma utilisant deux doses de rayonnements de 1 et 2 kGy a été appliquée au venin de *Cerastes cerastes*, dans l'optique d'atténuer sa toxicité afin de l'utiliser dans des protocoles d'immunisation d'animaux.

Dans un premier temps, une caractérisation des propriétés biochimiques des venins irradiés a été effectuée, en vue d'examiner les altérations subis par ces derniers sous l'effet des rayons gamma

Dans un deuxième temps, nous avons déterminé l'effet des rayons gamma sur les activités biologiques du venin de *Cerastes cerastes*. Ces activités sont l'activité hémorragique et l'activité dermonécrotique. L'activité dermonécrotique a d'abord été mise en évidence et caractérisée dans le venin natif de *Cerastes cerastes*. Des anti-inflammatoires ont été testés, dans un but thérapeutique, sur cette activité biologique. Enfin, une étude de l'effet de l'irradiation gamma, sur l'activité dermonécrotique du venin de *Cerastes cerastes*, a été réalisée par des tests macroscopiques ainsi que par une étude histopathologique .

Des immun-sérums dirigés contre les venins natif et irradiés ont été préparés par immunisation de lapins. Ces immun-sérums ont été caractérisés par une approche immunologique (titres anticorps, immunoréactivité avec le venin natif). Dans une deuxième étape, les capacités neutralisantes de ces immun-sérums ont été analysées, par des tests de séroneutralisation effectués *in vivo* chez le modèle murin. Ces tests ont porté sur l'activité toxique du venin ainsi que sur les activités hémorragique et dermonécrotique.

Revue bibliographique

II- Revue bibliographique

II.1. Les serpents

Les serpents existent depuis plus de 130 millions d'années. Ce sont des reptiles amniotiques poïkilothermes. Leur taille varie de 12 cm (petites couleuvres) à 10 m (anaconda, python). Il existe environ 2500 espèces de serpents dont 540 sont venimeuses.

Les serpents sont répartis en 4 groupes : les Aglyphes, les Opisthoglyphes, les Protéroglyphes et les Solénoglyphes.

Les espèces venimeuses appartiennent aux familles du groupe des Protéroglyphes (*Elapidae*, *Hydrophidae*) et des Solénoglyphes (*Crotalidae*, *Viperidae*).

Les serpents sont retrouvés partout sur la planète (Tableau I). Cependant, ils diminuent en nombre et en espèces à mesure que l'on s'élève en latitude. Les espèces les plus dangereuses habitent les régions tropicales. Les serpents venimeux ont développé un appareil venimeux plus ou moins spécialisé constitué d'un organe sécréteur ou glande venimeuse et un organe inoculateur ou crochet venimeux associés fonctionnellement aux éléments osseux et musculaires céphaliques. Les espèces venimeuses se distinguent entre elles par la mobilité et la position des dents sur la mâchoire supérieure.

Les *Viperidae* sont les serpents les plus spécialement adaptés à la fonction venimeuse, du fait de la toxicité de leur venin, de la quantité contenue dans leur glandes et du pouvoir offensif de leur crochets, longs perforés, sans sillon externe d'où leur nom de Solénoglyphes (Boué et al, 1974). Les *Crotalinae* et les *Viperinae* représentent les deux sous familles de *Viperidae*. La sous famille des *Viperinae* regroupe 8 genres dont celui de *Cerastes*.

Cerastes cerastes est une vipère qui appartient à la famille des *Viperidae*, dérivant de la super famille des *Xénophidae*, sous ordre *Ophidia*. Son habitat s'étend depuis la côte atlantique de l'Afrique du nord jusqu'à l'Asie occidentale en passant par le Moyen Orient.

En Algérie, *Cerastes cerastes* (vipère à cornes) largement répandue dans les régions désertiques et dans les hauts plateaux, est l'une des vipères les plus dangereuses. La taille moyenne de cette vipère est de 60 cm et peut atteindre 80 cm pour certaines espèces. Sa couleur jaune ambrée, s'harmonisant avec la couleur du sable lui permet d'être invisible durant la journée. Nocturne, elle représente un réel danger, sa morsure étant souvent handicapante voire mortelle.

II.2. Venins de serpents

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

La composition des venins de serpents est très complexe. Ces mélanges biologiques renferment des peptides, des protéines enzymatiques et non enzymatiques, des amines biogènes, des flavines, des nucléotides et de faibles quantités de zinc, de cuivre et de fer. Le venin a pour fonction première l'immobilisation et la digestion de la proie.

Tableau I: Distribution géographique des serpents dangereux (Vargaftig 1984).

Europe	Vipères (<i>Vipera aspis</i> et <i>Vipera berus</i>).
Afrique	Vipères (<i>Vipera lebetina</i> , <i>Cerastes</i> , <i>Bitis</i> , <i>Echis</i>) ; Elapidae: cobras (<i>Naja haje</i> <i>Naja melanoleuca</i> , <i>Naja nigricollis</i> , <i>Naja nivea</i>); mambas (<i>Dendroaspis</i>) ; <i>Dispholidus typus</i> .
Asie	<i>Hydrophidae</i> (<i>Enhydrina</i>); <i>Elapidae</i> (<i>Naja</i> , <i>Bungarus</i>); <i>Viperidae</i> (<i>Vipera</i> , <i>Cerastes</i> , <i>Echis</i>); <i>Crotalidae</i> (<i>Agkistrodon</i> , <i>Trimeresurus</i>).
Australie Pacifique	<i>Elapidae</i> (<i>Oxyuranus scutellatus</i>).
Amériques	Crotales (à sonnette; sans sonnette); <i>Agkistrodon</i> , <i>Bothrops</i> , <i>Lachesis mutus</i> , <i>Elapidae</i> (<i>Micrurus</i>).

II.2.1. Enzymes de venins de serpents

II.2.1.1. Protéinases

Les protéinases de serpents constituent un groupe hétérogène d'enzymes qui diffèrent sur le plan structural et fonctionnel. Ces enzymes sont essentiellement impliquées dans la pathogénèse de l'hémostase et dans la nécrose tissulaire (Ramirez et *al.*, 1990). Certaines protéinases sont fibrino(géno)lytiques ou fibrinolytiques (enzymes thrombine-like) (Laraba-Djebari et *al.*, 1992 ; Laraba-Djebari et *al.*, 1995 ; Laraba-Djebari 1996).

Ces enzymes peuvent être douées d'activité coagulante ou anticoagulante, et donc interférer dans le processus de la coagulation sanguine. Les protéinases à activité anticoagulante sont responsables de l'hydrolyse du fibrinogène, conduisant souvent à un syndrome hémorragique. Les protéinases de venins sont réparties en 2 grandes classes d'enzymes : les métalloprotéinases et les sérine protéinases (Jin et *al.*, 2001 ; Bortoleo et *al.*, 2002 ; Samel et *al.*, 2002).

II.2.1.1.1. Les métalloprotéinases des venins de *Viperidae*

Ce sont essentiellement des enzymes Zn^{2+} dépendantes (Bjarnason et Fox, 1994 ; Hati et *al.*, 1999) et peuvent être Ca^{2+} ou Zn^{2+}/Ca^{2+} dépendantes. Elles sont capables de dégrader les composants de la lame basale de l'endothélium cellulaire à l'origine d'une extravasation du sang (Gutierrez et Rucavado, 2000 ; Mebs, 2001) et de la dégradation des composants de la matrice extracellulaire (collagène, laminine, fibronectine et protéoglycannes). Elles sont impliquées dans la pathogénèse de la myonécrose, de l'œdème et sont à l'origine de la nécrose tissulaire (Ruccavado et *al.*, 2000). Certaines métalloprotéinases sont $\alpha(\beta)$ fibrinogénases et peuvent avoir une action activatrice sur le facteur X et sur la prothrombine. Les métalloprotéinases hémorragiques sont dites hémorragines et sont classées suivant leurs structures et leurs masses moléculaires en 4 classes (Figure 1) :

- SVMP (snake venom metalloproteinases) de classe I : cette classe comprend les métalloprotéinases de masse moléculaire comprise entre 20 et 30 kDa, possédant un domaine protéinase avec un site de fixation du Zn^{2+} ainsi qu'un site catalytique.
- SVMP de classe II : ce sont les métalloprotéinases de masse moléculaire comprise entre 30 et 60 kDa. En plus du domaine protéinase, elles possèdent du côté C terminal un domaine désintégrine (Dis-like). Ce domaine jouerait un rôle dans la fixation des métalloprotéinases sur les cellules endothéliales et sur les plaquettes sanguines induisant une inhibition de l'agrégation plaquettaire.

- SVMP de classe III : cette classe renferme les métalloprotéinases de masse moléculaire comprise entre 60 et 90 kDa. Elles possèdent trois domaines, un domaine protéinase, un domaine désintégrine et un domaine riche en résidus cystéine du côté C terminale de l'enzyme. Ces métalloprotéinases sont caractérisées par une forte activité hémorragique.
- SVMP de classe IV : cette classe comprend les protéinases de masse moléculaire supérieure à 90 kDa. En plus des trois domaines cités pour les métalloprotéinases de classe III, elles possèdent un domaine de type lectine C du côté C terminal.

Plusieurs SVMP ont été caractérisées dans les venins de serpents, certaines présentant des activités fibrinolytiques, hémorragiques et coagulantes (Kini et Evans, 1992).

II.2.1.1.2. Les sérine protéinases

Les sérine protéinases sont présentes dans les venins de *Viperidae* et de *Crotalidae*. Elles sont caractérisées par la conservation de la triade catalytique Ser (195), His (57) et Asp (102). Elles appartiennent à la sub-famille des sérine protéinases de type thrombine avec une haute identité de séquence (60-66 %) (Braud et al, 2000). Elles sont sensibles au DFP (Laraba-Djebari et al, 1992).

Les sérine protéinases interviennent à différentes étapes de l'hémostase (Figure 2): Elles interviennent dans l'agrégation des plaquettes avec une activité thrombine-like (El Asmar et al, 1995) et dans la fibrinolyse de la fibrine (Samel et al, 2002) ce qui induit une réduction de la viscosité du sang (Koh et al, 2001). Elles peuvent être β fibrinogénase, activatrices du facteur V, de la protéine C et du plasminogène.

Certains venins de serpents contiennent également des sérine protéinases ayant une activité activatrice du facteur X (Laraba-Djebari et al., 1995) et sur la prothrombine (Morita 1998).

II.2.1.2. Les phospholipases A₂ (E.C.3.1.1.4)

Les phospholipases de venins de serpents de type PLA₂ représentent une famille de protéines semblables sur le plan structural. Ce sont des enzymes Ca²⁺ dépendantes qui hydrolysent les phospholipides en position sn-2 libérant des acides gras et des lysophospholipides (Laraba-Djebari et Martin-Eauclaire, 1990 ; Dennis 1994). Elles sont impliquées dans la régulation de la biosynthèse des médiateurs lipidiques notamment les

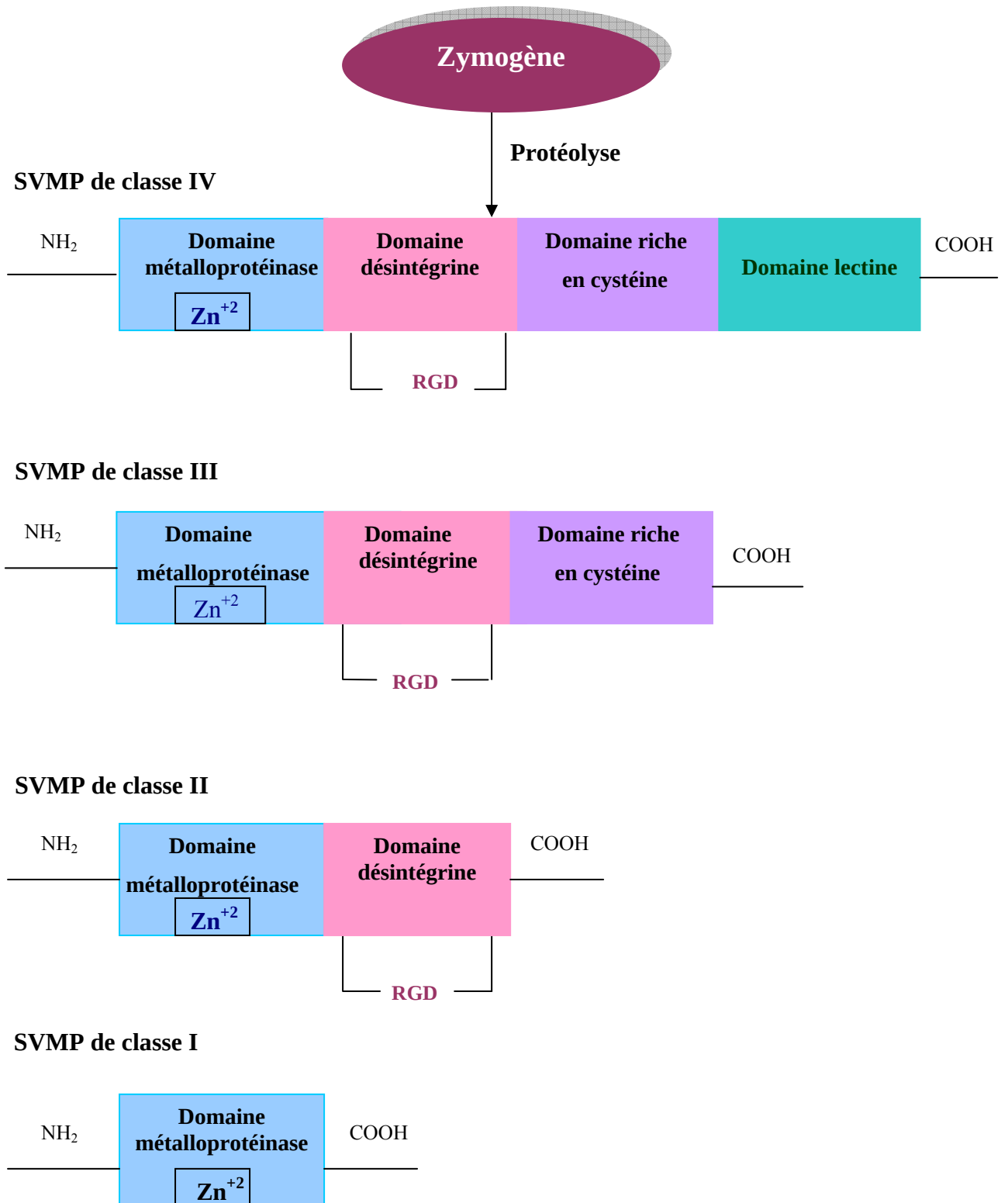


Figure 1 : Organisation structurale des différentes classes de métalloprotéinases de serpents (SVMP) (Kini et Evans, 1992).

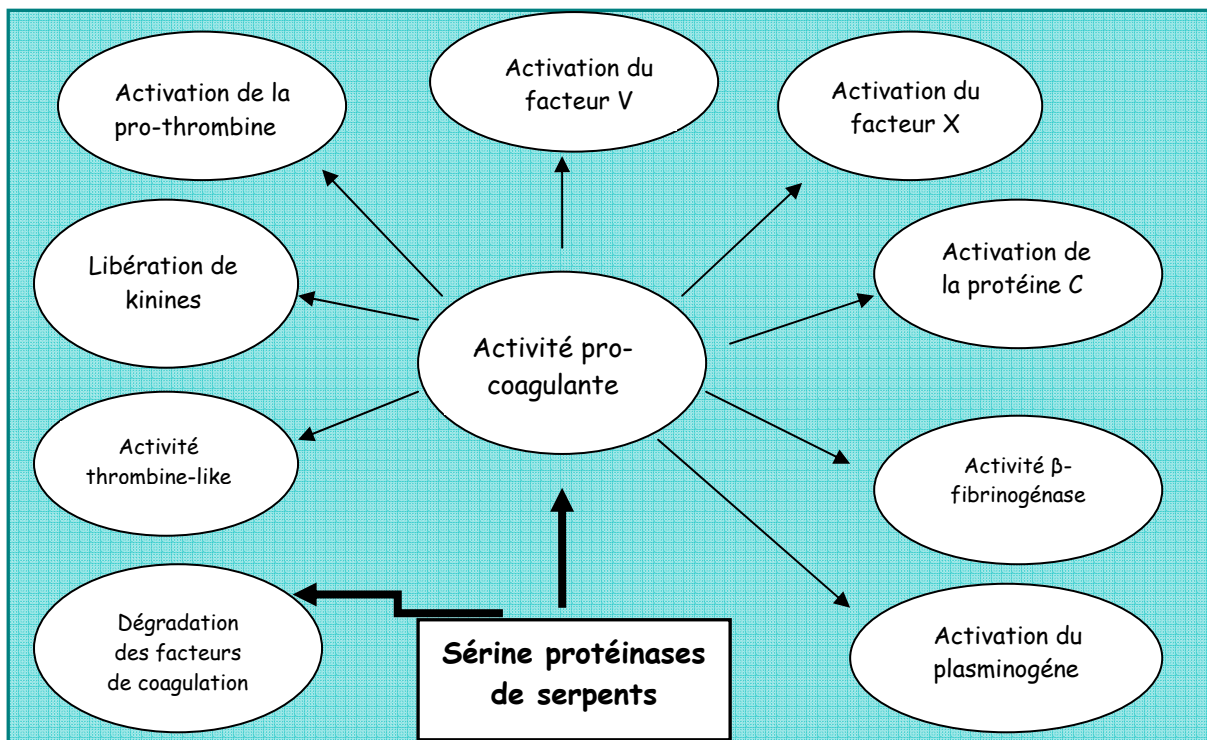


Figure 2: Implication des sérine protéinases de venins de serpents dans les perturbations hémostatiques (Kornalik 1985 ; Laraba-Djebari et *al.*, 1992, 1995 ; Ouyang et *al.*, 1992 ; Matsui et *al.*, 2000 ; Siigur et *al.*, 2001).

prostaglandines et les leucotriènes. Les PLA₂ ont une masse moléculaire qui varie entre 13 et 18 kDa.

Sur la base de leur source, masse moléculaire, homologie de séquence en acides aminés, nombre de ponts disulfures et effets pathologiques, les PLA₂ sont réparties en 11 groupes. Les PLA₂ de serpents (sPLA₂) appartiennent au groupe IA pour les *Elapidae* et les *Hydrophidae* et au groupe IIA pour les *Viperidae* et les *Crotalidae* (Dufton et Hider 1983).

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

- les sPLA₂ Asp 49 (D49) possédant un résidu aspartate en position 49 et ayant une forte activité catalytique
- les sPLA₂ Lys 49 (K49) avec un résidu lysine en position 49 et ayant une faible activité catalytique.

D'autres sous groupes de sPLA₂ Asp 49 ont été identifiés, il s'agit notamment des sPLA₂ N 49 où le résidu aspartate est substitué par un résidu asparagine (Tsai et al., 2004 ; Wei et al., 2006), des sPLA₂ Gln 49 (Bao et al., 2005) et des sPLA₂ Arg 49 (Wei et al., 2006a).

L'activité catalytique des PLA₂ est Ca²⁺ dépendante. La fixation du calcium se fait dans le domaine comprenant les résidus 26-34 et 49. Les résidus Tyr 28, Gly 30, Gly 32 et Asp 49 sont obligatoirement requis pour la fixation du calcium en cédant un atome d'oxygène. Ces quatre sites sont conservés dans les sPLA₂ D49, les dotant d'une activité catalytique élevée. La substitution du résidu aspartate par un autre résidu réduit de façon considérable l'activité catalytique de l'enzyme, suggérant que la longueur et la charge de cette partie de la structure de l'enzyme sont déterminants pour la fixation du calcium (Li et al., 2001).

Les PLA₂ se fixent sur un récepteur transmembranaire de type M, constitué de cinq domaines dont le domaine CRD-like (Valentin et Lambeau, 2000) (Figure 3). La fixation de l'enzyme à son récepteur, via la boucle de calcium, entraîne une perte de l'activité catalytique.

En plus de l'activité enzymatique, les sPLA₂ possèdent d'autres activités telles que l'activité hémolytique (Laraba-Djebari et Martin-Eauclaire, 1990 ; Lu et al., 2002a), l'activité anti-coagulante (Soares et al., 2000), l'agrégation des plaquettes (Lu et al., 2002b ; Fuly et al., 2004), les activités pro-inflammatoires (Lloret et Moreno, 1993 ; Zuliani et al., 2005) et l'activation des mastocytes (Lloret et Moreno, 1993 ; Landucci et al., 1998 ; Kanashiro et al., 2002) (Figure 4). Wei et al (2006b) ont isolé et cloné une sPLA₂ R49 (la promutoxine) à partir du venin de *Protobothrops mucrosquamatus*, où le résidu aspartate est substitué par un résidu arginine.

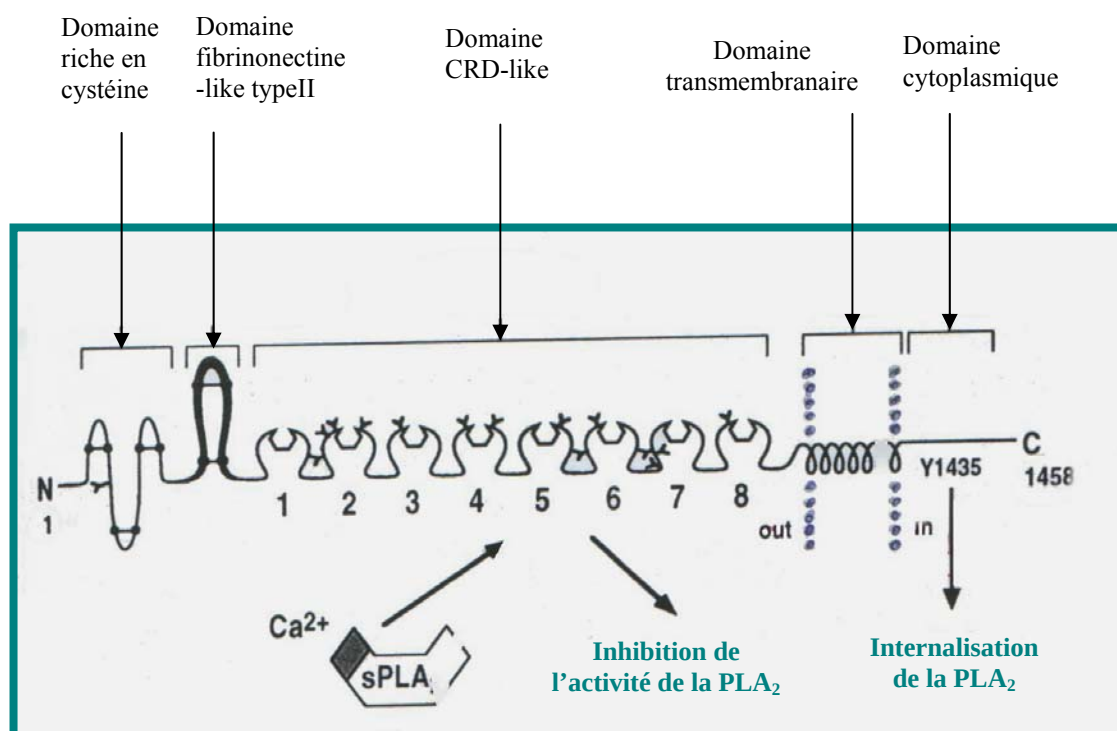


Figure 3: Représentation schématique du récepteur des sPLA₂ (Valentin et Lambeau, 2000).

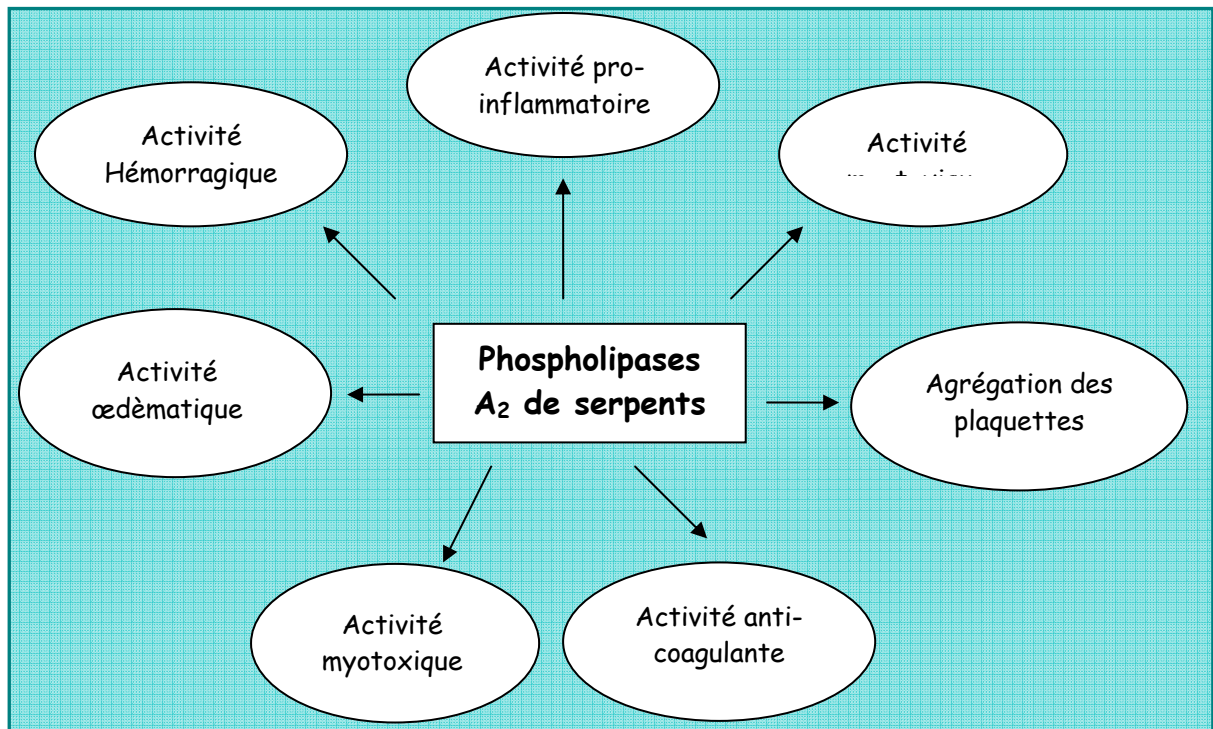


Figure 4: Schéma représentant les différentes activités des phospholipases A₂ de serpents (Laraba-Djebari et Martin-Eauclaire, 1990 ; Lloret et Moreno, 1993 ; Landucci et *al.*, 1998 ; Soares et *al.*, 2000 ; Lu et *al.*, 2002a,b ; Kanashiro et *al.*, 2002 ; Zuliani et *al.*, 2005 ; Wei et *al.*, 2006b).

Cette enzyme est dépourvue d'activité catalytique, est non hémorragique mais provoque l'œdème. Elle est capable d'induire une réponse inflammatoire caractérisée par la libération des cytokines IL-12, TNF- α , IL-6 et IL-1 β à partir d'une culture de monocytes humains et des cytokines IL-2, TNF- α , IL-6 à partir de lymphocytes T humains. L'induction des cytokines par cette PLA₂ serait indépendante de l'activité catalytique et se ferait via un mécanisme impliquant le récepteur de cette enzyme (Wei et *al.*, 2006b).

II.2.1.3. Les L-amino-acide oxydases (E.C.1.4.3.2)

Les L-amino-acide oxydases (LAAO) sont des enzymes de nature glycoprotéique, à coenzyme flavinique, à l'origine de la coloration jaune du venin. Elles catalysent la désamination oxydative des L acides aminés en α céto-acides avec libération de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Les venins de serpents sont riches en LAAO et certaines ont été isolées et caractérisées (Stiles et *al.*, 1991; Suhr et Kim, 1996; Ali et *al.*, 2000; Takatsuka et *al.*, 2001; Tempone et *al.*, 2001; Du et Clemetson, 2002; Sun et *al.*, 2003; Zhang et *al.*, 2003; Stabeli et *al.*, 2004; Toyama et *al.*, 2006).

Cette enzyme présente un intérêt en biochimie, en physiologie et en médecine en raison de ses nombreux effets sur diverses cellules incluant les cellules cancéreuses, les plaquettes et les microorganismes. Tõnismägi et *al* (2006) ont isolé une LAAO à partir du venin de *Vipera lebetina* de masse moléculaire 140 kDa, induisant l'agrégation des plaquettes et présentant une activité bactéricide sur *Escherichia coli* et sur *Bacillus subtilis*. La catalase, enzyme hydrolysant le peroxyde d'hydrogène, abolie l'effet bactéricide de cette enzyme, suggérant l'implication directe du peroxyde d'hydrogène dans ce processus.

II.2.1.4. Les Hyaluronidases (E.C.4.2.9.3.5)

Ces enzymes hydrolysent Ces enzymes hydrolysent les liaisons glucosidiques de certains mucopolysaccharides du tissu conjonctif d'animaux, tel que l'acide hyaluronique et le sulfate de chondroïtine. Ces enzymes augmentent la perméabilité des tissus facilitant la diffusion des toxines et induisent la destruction locale des capillaires et la nécrose tissulaire (Belairs 1976; Ernest et Zug, 1999).

II.2.1.5. Les acétylcholinestérases (E.C.3.1.1.7)

Ces enzymes sont abondantes dans les venins d'*Elapidae*. Elles se présentent sous forme de monomères solubles, formés d'un très court peptide, qui catalysent l'hydrolyse de l'acétylcholine en choline et en céto-acide (Cousin et Bon, 1999).

II.2.1.6. Les phosphoestérases

Ces enzymes hydrolysent sur les acides nucléiques (ADN et ARN). C'est le cas notamment des phosphodiesterases, des nucléotidases, des phosphomonoestérases et des endonucléases. Les phospho-diesterases sont des exonucléases caractérisée par leur capacité à séparer l'unité 5'-mononucléotide qui porte un groupe hydroxyle libre en position 3' de la chaîne nucléotidique, alors que les 5' nucléotidases catalysent l'hydrolyse des liaisons phosphates de l'AMP et de l'ADP en phosphate et adénosine. Quand aux endonucléases, elles sont de deux types: les unes sont des ribonucléases qui agissent sur les ARN_s et les autres sont des désoxy-ribonucléases qui agissent sur les ADN_s.

II.2.2. Les toxines de venins de serpents

II.2.2.1. Les cardiotoxines

Les cardiotoxines sont cytotoxiques. Elles sont retrouvées chez les *Crotalidae* et *Elapidae*. Leur action cible les fibres cardiaques, ce qui peut entraîner un arrêt cardiaque. La structure des cardiotoxines est semblable à celle des α neurotoxines. Elles sont constituées de 60 acides aminés, réticulés par 4 ponts disulfures.

II.2.2.2. Les myotoxines

Elles sont présentes dans les venins de *Viperidae* et de *Crotalidae*. Elles provoquent de graves nécroses au niveau des régions mordues ainsi que des œdèmes. Elles sont cytotoxiques pour les myoblastes en culture (Soares et *al.*, 2000). Certaines myotoxines ont une activité PLA₂ (PLA₂ myotoxiques). L'activité des polypeptides myotoxiques semble être liée à la présence de deux séquences peptidiques du côté C terminal liées par 4 ponts disulfures, une séquence riche en acides aminés cationiques et une séquence d'acides aminés hydrophobes (Kini et Iwanaga, 1986 ; Angulo et *al.*, 2001).

Les myotoxines semblent avoir la capacité de se lier à la membrane plasmique grâce à un récepteur protéique, puis pénètrent dans la bicouche lipidique (Lambeau et *al.*, 1994). Cette infraction est à l'origine d'une déstabilisation membranaire dont la conséquence est la perte de la régulation de la perméabilité aux ions et aux macromolécules (Gutiérrez et Lomonte, 1995). Un influx calcique est généré conduisant à divers mécanismes dégénératifs, notamment des altérations du cytosquelette (hypercontraction des myofilaments), des altérations mitochondriales et l'activation de protéases et de phospholipases Ca⁺² dépendantes, ce qui provoque des dommages tissulaires.

II.2.2.3. Les neurotoxines

Les neurotoxines sont les constituants les plus toxiques du venin. Elles sont pré-synaptiques (β -neurotoxines) en se liant au récepteur de l'acétylcholine de la jonction neuromusculaire ou post-synaptiques (α -neurotoxines) en empêchant la libération de l'acétylcholine. Elles provoquent des paralysies pouvant toucher le système cardiovasculaire et pulmonaire engendrant la mort rapide des victimes d'envenimation. Les neurotoxines sont absentes dans les venins de *Viperidae*.

II.2.3. Venin de *Cerastes cerastes*

Le venin de *Cerastes cerastes* présente comme tous les venins de *Viperidae* une forte activité hémorragique, une activité oedématisante ainsi qu'une activité nécrosante. Toutes ces activités sont le résultat de l'action de nombreux constituants du venin (notamment des enzymes) qui agissent en synergie produisant ces effets physiopathologiques.

Dans le venin de *Cerastes cerastes* ont été isolées et caractérisées plusieurs molécules parmi lesquelles :

- Une hyaluronidase présentant une masse moléculaire de 75 kDa (Labib et *al.*, 1979)
- Une PLA₂ de masse moléculaire de 14,5 kDa avec un PI de 5,4, qui hydrolyse la lécithine libérant la lysolécithine hémolytique (Laraba-Djebari et *al.*, 1992)
- Des sérine protéinases :

RP34: C'est une sérine-protéinase de type thrombine, constituée de deux sous-unités de 48.5 KDa chacune. Elle possède une activité protéolytique vis à vis de la caséine, et des activités arginine ester hydrolase et amidase sur des substrats synthétiques (Laraba-Djebari et *al.*, 1992).

Afaâcytine: c'est une sérine-protéinase de type thrombine, constituée de deux sous-unités α et β , son poids moléculaire est de 40 kDa (Laraba-Djebari et *al.*, 1995) et présente les propriétés de l' α fibrinase et de l' α , β fibrinogénase. Elle active le facteur X et libère la sérotonine en agissant sur l'agrégation plaquettaire (Laraba-Djebari et *al.*, 1995).

Cerastes F-4: C'est une protéase légèrement hémorragique, constituée de 193 acides aminés ayant un poids moléculaire de 22.5 kDa (Theakston et Kamiguti, 2002). Elle a une activité anti-coagulante et hydrolyse la chaîne α et β du fibrinogène. (El-Asmar et *al.*, 1986).

Cerastocytine: C'est une sérine-protéase de type thrombine ayant une activité amidolytique. Sa masse moléculaire est de 38 kDa. Elle permet l'agrégation des plaquettes ainsi que l'activation du facteur XIII (Marrakchi et *al.*, 1997).

Cerastotine: C'est une sérine-protéinase de type thrombine, ayant une activité protéolytique et un poids moléculaire de 40 kDa. (El-Ayeb et Karoui, 1997)

Fraction coagulante de *Cerastes cerastes*: La masse moléculaire de cette fraction est de 86 kDa (Theakston et Kamiguti, 2002).

II.3. Physiopathologie de l'envenimation vipérine

Les venins de *Viperidae* (*Viperinae* et *Crotalinae*) induisent des envenimations caractérisées par l'hémorragie en plus d'une pléthore de manifestations physiopathologiques incluant la nécrose, l'œdème, ainsi que des effets systémiques tels que la coagulopathie, la néphrotoxicité et les altérations hémodynamiques (Warrel 1995, 1996).

Les symptômes de l'envenimation varient chez l'Homme selon la quantité de venin injecté, le site de morsure, l'âge et le poids de la victime ainsi que la réaction particulière de chaque individu. Sa toxicité est la conséquence de l'ensemble des interactions de ses différents composants. Le pouvoir létal des venins est estimé par la dose létale 50 (DL 50). La DL₅₀ du venin de *Cerastes cerastes* est estimée à 2,5 mg/kg d'animaux (Laraba-Djebari 1996).

Lors d'une envenimation vipérine, le syndrome le plus apparent est l'œdème qui résulte d'une augmentation de la perméabilité capillaire. Des hémorragies apparaissent environ une heure après la morsure suivies par une nécrose 2 à 4 jours plus tard, elle est souvent associée à une surinfection spontanée. Le délai entre l'injection de venin et le décès, si celui-ci survient, est compris entre 12 heures et 6 jours.

Des signes généraux apparaissent avec une tendance au collapsus, des troubles du rythme cardiaque, des troubles digestifs (nausées, vomissement, diarrhée, douleurs abdominales), fébricule avoisinant les 38°C, des signes neurologiques (angoisse, agitation) ainsi que des hémorragies diffuses entraînant souvent le décès (Gentilini 1995).

II.3.1. L'hémorragie

Le syndrome hémorragique, qui caractérise les envenimations vipérines, est un symptôme qui apparaît très rapidement, après seulement quelques minutes d'envenimation (Gutiérrez et *al.*, 1984 ; Rucavado et *al.*, 1995) . L'hémorragie est extensive et peut toucher les organes vitaux, notamment les poumons, pouvant conduire au choc cardiovasculaire.

L'hémorragie locale contribue à l'installation de conditions ischémiques réduisant la capacité des tissus à se régénérer, alors que l'hémorragie systémique pouvant affecter plusieurs

organes peut conduire au choc cardiovasculaire (Cardoso et *al.*, 1993 ; Warrel 1996 ; Otero et *al.*, 2002).

La pathogénèse de l'hémorragie ophidienne implique une altération directe des vaisseaux sanguins par les toxines hémorragiques en synergie avec une large variété de composants du venin exerçant un effet sur l'hémostase. Ainsi, la rupture de la paroi des vaisseaux sanguins et la perturbation de l'hémostase de façon concomitante, contribue à l'installation de l'hémorragie. Cependant, l'installation de l'hémorragie peut se faire sous l'effet des hémorragines en absence de perturbations hémostatiques (Kamiguti et *al.*, 1992 ; Escalante et *al.*, 2003).

Les hémorragines de venin de serpents appartiennent à la famille des metzincs. Ces protéines sont caractérisées par la présence d'une séquence consensus de fixation du zinc « HEXXHXXGXXH ».

Les metalloprotéinases de venins de serpents sont synthétisées sous forme de zymogène. Le clivage de la pro-séquence conduit à l'activation de l'enzyme.

L'activité hémorragique dépend de l'activité protéolytique, car la chélation du zinc par l'EDTA ou l'inhibition de l'enzyme par l'O.phénanthroline ou les inhibiteurs peptidomimétiques abolissent complètement cet effet (Bjarnason et Fox, 1994 ; Escalante et *al.*, 2000).

Par ailleurs, les SVMP de classe III ont un pouvoir hémorragique supérieur aux SVMP de des autres groupes, particulièrement les SVMP de classe I, où plusieurs enzymes non hémorragiques ont été identifiées. Cependant, certaines des SVMP de classe III n'ont pas d'activité hémorragique, mais sont pourvues d'activité coagulante tel que l'activation de la prothrombine A (Loria et *al.*, 2003 ; Silva et *al.*, 2003).

Le mécanisme d'action des SVMP hémorragiques repose sur l'hydrolyse des composants de la lame basale des vaisseaux sanguins (Ohsaka 1979 ; Bjarnason et Fox, 1994 ; Gutiérrez et Rucavado, 2000).

Les observations ultra-structurales de coupes de vaisseaux montrent que l'extravasation du sang se produit, au bout de quelques minutes d'envenimation, au niveau des capillaires et des veinules accompagnée d'altérations morphologiques des cellules endothéliales (Ownby et *al.*, 1978 ; Ownby et Geren, 1987 ; Johnson et Ownby, 1993 ; Moreira et *al.*, 1994 ; Anderson et Ownby, 1997 ; Escalante et *al.*, 2003). Les altérations les plus typiques sont la réduction des vésicules de pinocytose et le détachement des cellules endothéliales de la lame basale, ainsi que des altérations touchant le cytosquelette cellulaire. Il est également observé, une réduction de l'épaisseur des cellules endothéliales avec apparition de zones de ruptures au niveau de la

membrane plasmique de ces cellules. L'extravasation du sang se fait à travers ces points de rupture (Mc Kay et *al.*, 1970 ; Ownby et *al.*, 1978 ; Ownby et Geren, 1987 ; Moreira et *al.*, 1994). En plus de ces altérations, les cellules endothéliales présentent des mitochondries de taille supérieure à la normale (enflées), des noyaux picnotiques, des ruptures de la membrane plasmique, caractéristiques d'une mort cellulaire par nécrose (Moreira et *al.*, 1994).

Les vaisseaux affectés présentent souvent au niveau de leurs parois des amas de plaquettes ainsi que des dépôts de fibrine (Mc Kay et *al.*, 1970 ; Ownby et *al.*, 1978 ; Ownby et Geren, 1987 ; Moreira et *al.*, 1994), reflétant une activation des mécanismes hémostatiques (Figure 5).

Par ailleurs, les observations au microscope électronique montrent un élargissement des jonctions intercellulaires qui apparaît principalement au niveau des veinules (Ohsaka et *al.*, 1975 ; Goncalves et Mariano, 2000). Les veinules participent aux réactions inflammatoires par contraction des cellules endothéliales et par élargissement des jonctions intercellulaires, comme réponse à de nombreux médiateurs inflammatoires, induisant une augmentation de la perméabilité capillaire (Collins 1999).

Ainsi, il est suggéré que les SVMP induisent une réponse inflammatoire locale, qui provoque la contraction des cellules endothéliales et un élargissement des jonctions intercellulaires. Des études ont, en effet, montré que l'extravasation du sang se fait en parallèle d'une intense réponse inflammatoire (Malucelli et Mariano, 1980 ; Goncalves et Mariano 2000).

Il apparaît donc, que deux principaux processus sont mis en place dans la pathogénèse de l'hémorragie induite par les SVMP :

- un processus prédominant, qui prend place principalement au niveau des vaisseaux sanguins, caractérisé par de profondes altérations des cellules endothéliales avec formation de zones de rupture au niveau de la membrane plasmique, à travers desquelles se produit l'extravasation du sang « hémorragie *per rhexis* ».
- Un élargissement des jonctions intercellulaire se produisant principalement au niveau des cellules endothéliales des veinules résultant d'une réaction inflammatoire induite par les SVMP « hémorragie par diapédèse ».

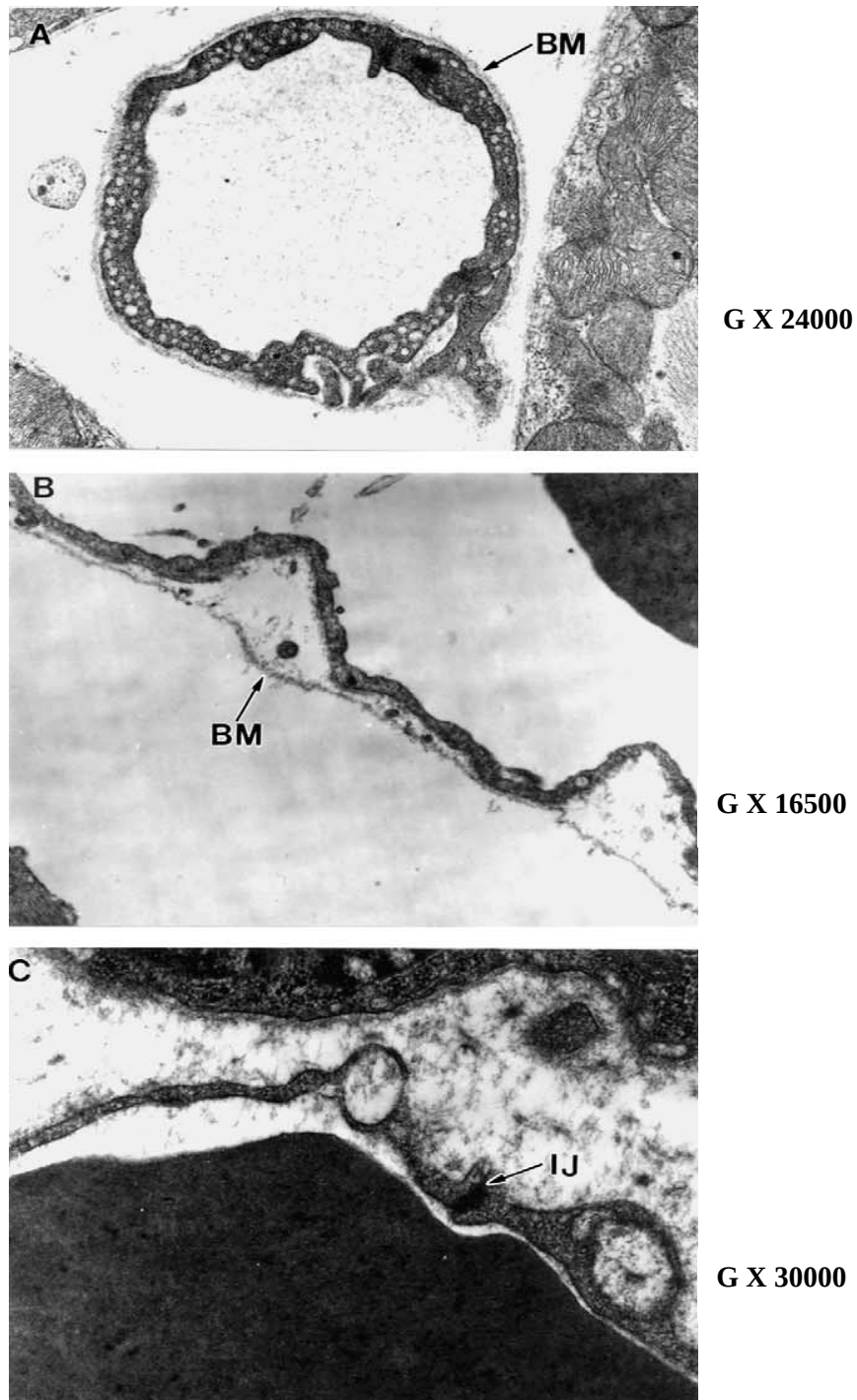


Figure 5 : Altérations ultra-structurales des capillaires sanguins dans le muscle squelettique murin, provoquées par la métalloprotéinase BaH1 du venin de *Bothrops asper*. **A :** micrographie d'un capillaire de structure normale (témoin NaCl) (G X 24000). **B :** micrographie d'un capillaire 1 min après injection de la toxine BaH1(G X 16500). **C :** micrographie d'un capillaire 15 min après injection de la toxine BaH1(G X 30000) (Moreira et *al.*, 1994).

BM : basement membrane, IJ : intercellular junction.

La lame basale est constituée de plusieurs composants majeurs parmi lesquels le collagène type IV, la fibronectine, la laminine et les protéoglycannes. Il semblerait que l'hydrolyse de ces composants par les SVMP, se fasse de façon dose et temps dépendants (Civello et *al.*, 1983 ; Bjarnason et *al.*, 1988 ; Marayuma et *al.*, 1992 ; Franceschi et *al.*, 2000). Une corrélation a également été rapportée entre l'activité protéinase sur la lame basale et l'activité hémorragique des SVMP isolées à partir du venin de *Crotalus atrox* (Bjarnason et *al.*, 1988). L'hydrolyse de la lame basale serait de ce fait une étape clef dans la pathogénèse de l'hémorragie induite par les SVMP (Bjarnason et *al.*, 1988).

D'autre part la dégradation sélective du collagène type IV a également été associée à la capacité des SVMP d'induire l'hémorragie (Mashiko et Takahashi, 1998). Les SVMP clivent les chaînes α_1 et α_2 du collagène type IV, au niveau de sites proches du domaine 7S (Bjarnason et *al.*, 1993 ; Bjarnason et Fox, 1994). Ces régions sont directement impliquées dans l'association des monomères de collagène type IV en tétramère. Un clivage intervenant au niveau de ces sites sous l'action des SVMP a un impact direct sur l'intégrité de la lame basale (Bjarnason et Fox, 1994).

Par ailleurs, il est admis que les SVMP de classe III sont plus hémorragiques que les SVMP de classe I. De même qu'il est admis que les SVMP de classe III sont capables d'induire une hémorragie locale mais également une hémorragie systémique (Kamiguti et *al.*, 1991 ; Anderson et Ownby, 1997 ; Franceschi et *al.*, 2000 ; Escalante et *al.*, 2003), alors que les SVMP de classe I n'induisent qu'une hémorragie locale (Escalante et *al.*, 2003). Ces différences fondamentales peuvent être expliquées par les données suivantes:

- Les séquences désintégline (Dis-like) et les domaines riches en cystéine semblent diriger les SVMP de classe III vers des cibles particulières au niveau des vaisseaux sanguins, positionnant de façon optimale le domaine catalytique qui agit sur la structure de la paroi sanguine (Takeya et *al.*, 1990 ; Jia et *al.*, 1997). En effet, des séquences présentes au niveau du domaine Dis-like ou alors au niveau du domaine riche en cystéine semblent avoir la capacité de se lier aux intégrines α_2 et β_1 des cellules endothéliales (Jia et *al.*, 2000 ; Souza et *al.*, 2000 ; Moura-da-Silva et *al.*, 2001 ; Kamiguti et *al.*, 2003). Cela a notamment été décrit pour une hémorragine (la jararhagine) du venin de *Bothrops jararaca* (Tonjoni et *al.*, 2003) et la catrocollastatine du venin de *Crotalus atrox* (Zhou et *al.*, 1996).
- Les domaines Dis-like et riches en cystéine semblent contribuer à une inefficacité des mécanismes hémostatiques facilitant l'extravasation du sang. En effet, ces domaines semblent inhiber l'agrégation plaquettaire induite par le collagène en interagissant

avec les intégrines α_2 et β_1 présents au niveau de la membrane des plaquettes sanguines (Kamiguti et *al.*, 1996a ; Jia et *al.*, 1997 ; Moura-da-Silva et *al.*, 1999 ; Estevao-Costa et *al.*, 2000) réduisant la capacité des plaquettes à cautériser les vaisseaux endommagés. Kamiguti et *al.*, (1994a, 1996b) ont également montré que la jararhagine est susceptible d'hydrolyser le fibrinogène et le facteur de Willebrand.

- Les SVMP de classe III sont moins susceptibles, que les SVMP de classe I, à l'inhibition par les inhibiteurs protéasiques du plasma. Ainsi, les SVMP de classe III sont très faiblement inhibées par l' α_2 macroglobuline, alors que les SVMP de classe I sont fortement inhibées par cette protéine. Les contraintes stériques imposées par les domaines Dis-like et riches en cystéine serait à l'origine de cette faible inhibition (Kurecki et Kress, 1985 ; Baramova et *al.*, 1990 ; Kamiguti et *al.*, 1994b ; Estevao-Costa et *al.*, 2000 ; Escalante et *al.*, 2003).

La pathogénèse de la destruction des cellules endothéliales dans les tissus vasculaires suite à l'injection de SVMP est un phénomène rapide où apparaissent des altérations cellulaires ainsi que la rupture des vaisseaux sanguins. Le clivage protéolytique de la matrice extracellulaire, ainsi que la perte des interactions matrice-intégrines conduit à la mort cellulaire. De même que les cellules endothéliales sont affectées par les conditions ischémiques résultant de l'interruption locale de la circulation sanguine suite à l'hémorragie, à la thrombose des vaisseaux sanguins et à l'angionécrose (Queiroz et *al.*, 1985 ; Loria et *al.*, 2003). Cet effet tardif a pour conséquence de réduire la capacité des tissus et des vaisseaux à se régénérer. Par ailleurs, dans le cas des envenimations vipérines, en plus des SVMP, d'autres composants du venin contribuent aux dommages tissulaires tels que les désintégrines (Hong et *al.*, 2003 ; Wu et *al.*, 2003) et les L-amino-acide oxydases.

II.3.2. L'œdème

Il s'agit d'une infiltration du liquide séreux dans le tissu conjonctif, provoquant un gonflement de la zone mordue.

La formation d'un œdème est le résultat d'une augmentation de la perméabilité des capillaires sanguins qui a pour conséquence une fuite du contenu intra-vasculaire vers les espaces interstitiels. Cette augmentation de la perméabilité capillaire pourrait être liée à une action combinée de la PLA₂, de myotoxines, de protéases et de facteurs hémorragiques du venin des serpents. Dans les formes sévères, l'œdème devient extensif et s'accompagne d'hémorragies intenses (De Araujo et *al.*, 2000).

L'effet œdématisant est principalement attribué aux PLA₂ capables de dégrader les phospholipides membranaires. Cette hydrolyse conduit à la libération de précurseurs de la biosynthèse des prostaglandines, des prostaglandines et des leucotriènes. Ces molécules induisent l'augmentation de la perméabilité capillaire (Chaves et *al.*, 1995 ; Gutiérrez et Lomonte, 1995). Le venin de *Cerastes cerastes* est doué d'une activité œdématisante avec une DMO (dose minimale œdématisante) de 1,4 µg (Abib 2002).

II.3.3. La nécrose des tissus

Ce terme est employé en morphologie pour désigner les différentes variétés de modifications macroscopiques ou histologiques qui résultent de la mort d'une cellule ou d'un tissu lors d'accidents traumatiques, à la suite de certaines pathologies ou lors de déficits métaboliques. La nécrose est accompagnée habituellement d'une réponse inflammatoire qui consiste en la présence d'exsudats et de cellules spécialisées du système hématopoïétique comme les lymphocytes et les macrophages. A l'échelle cellulaire, une nécrose se traduit par un gonflement de la cellule et de la mitochondrie, fragmentation de la chromatine, l'éclatement cellulaire qui provoque la libération des enzymes impliquant la dégradation des cellules voisines et une inflammation nécrosante.

Dans le cas d'une envenimation ophidienne, la nécrose est le plus souvent humide, elle évolue rapidement en surface et/ou en profondeur, elle est souvent associée à une gangrène, cette dernière semble avoir pour origine l'effet cytolytique direct du venin (Reid et Theakston., 1984). Plusieurs composants des venins de Viperidae sont à l'origine d'intenses réactions inflammatoires et notamment les PLA₂ et les métalloprotéinases (Figure 6).

Les SVMP sont largement impliquées dans la pathogénèse de la nécrose musculaire, de la dermonécrose (Gutiérrez et *al.*, 1995a ; Rucavado et *al.*, 1998) ainsi que dans l'œdème. Ces activités sont également associées à une réponse inflammatoire (Gutiérrez et *al.*, 1995b ; Moura-da-Silva et *al.*, 1996). Rucavado et *al.* (2000) ont montré que le venin de *Bothrops asper* présente les activités hémorragique, myotoxique, œdématisante, et dermonécrotique. Les activités hémorragique, œdématisante, dermonécrotique ainsi que l'activité protéolytique sont inhibées par le CaNa₂EDTA et le Batimastat, un inhibiteur peptidomimétique des métalloprotéinases. Les auteurs rapportent que le Batimastat est plus efficace à inhiber ces activités, suggérant une forte implication des SVMP notamment dans la nécrose tissulaire.

Par ailleurs, Gutiérrez et al (1995a) ont rapporté que l'activité myonécrotique de la métalloprotéinase BaH1 isolée à partir du venin de *Bothrops asper*, est la conséquence des conditions ischémiques résultant de l'hémorragie.

D'autre part, les métalloprotéinases hémorragiques jouent un rôle fondamental dans la myonécrose, en affectant la régénération du muscle squelettique, car ce dernier a la capacité de se régénérer en cas de nécrose. En effet, l'activation des cellules satellites, qui sont des cellules myogéniques, situées au dessous de la lame basale des fibres musculaires, aboutit à la formation de myoblastes ayant la capacité de se multiplier et de fusionner afin de former les myotubules. Ce processus de régénération nécessite un apport sanguin adéquat. En perturbant l'intégrité des vaisseaux sanguins, les SVMP empêchent la régénération des tissus (Figure 7).

II.3.4. Les troubles de la coagulation

De nombreux constituants du venin peuvent être responsables des troubles de la coagulation sanguine dont on peut distinguer deux catégories physiopathologiques antagonistes. D'une part, les processus d'activation de la coagulation sanguine, principalement sous l'action d'activateurs de la prothrombine, du plasminogène, des facteurs V, IX et X (Figure 8). Cette activation conduit à une consommation des facteurs de la coagulation physiologiques, induisant leur disparition du sang de la victime. Le sang devient alors incoagulable faute de facteurs permettant sa coagulation. D'autre part, le caillot formé n'étant pas physiologique est instable et vite dégradé par les composants du venin ayant une activité fibrinolytique, conduisant à un syndrome hémorragique. La fibrinolyse est le résultat d'enzymes incluant des enzymes telles que certaines sérine protéinases, des métalloprotéinases, des L-amino-acide oxydase et certaines PLA₂, ainsi que des composants non enzymatiques parmi lesquels des lectines de type C, des inhibiteurs de protéases et des désintégrines. La principale étiologie des syndromes hémorragiques est la transformation du fibrinogène plasmatique en fibrine, qui constitue la trame du caillot sanguin, sous l'action d'enzymes thrombine-like. Le même venin peut contenir plusieurs substances activatrices ou destructrices du caillot sanguin, ce qui augmente son potentiel hémorragique.

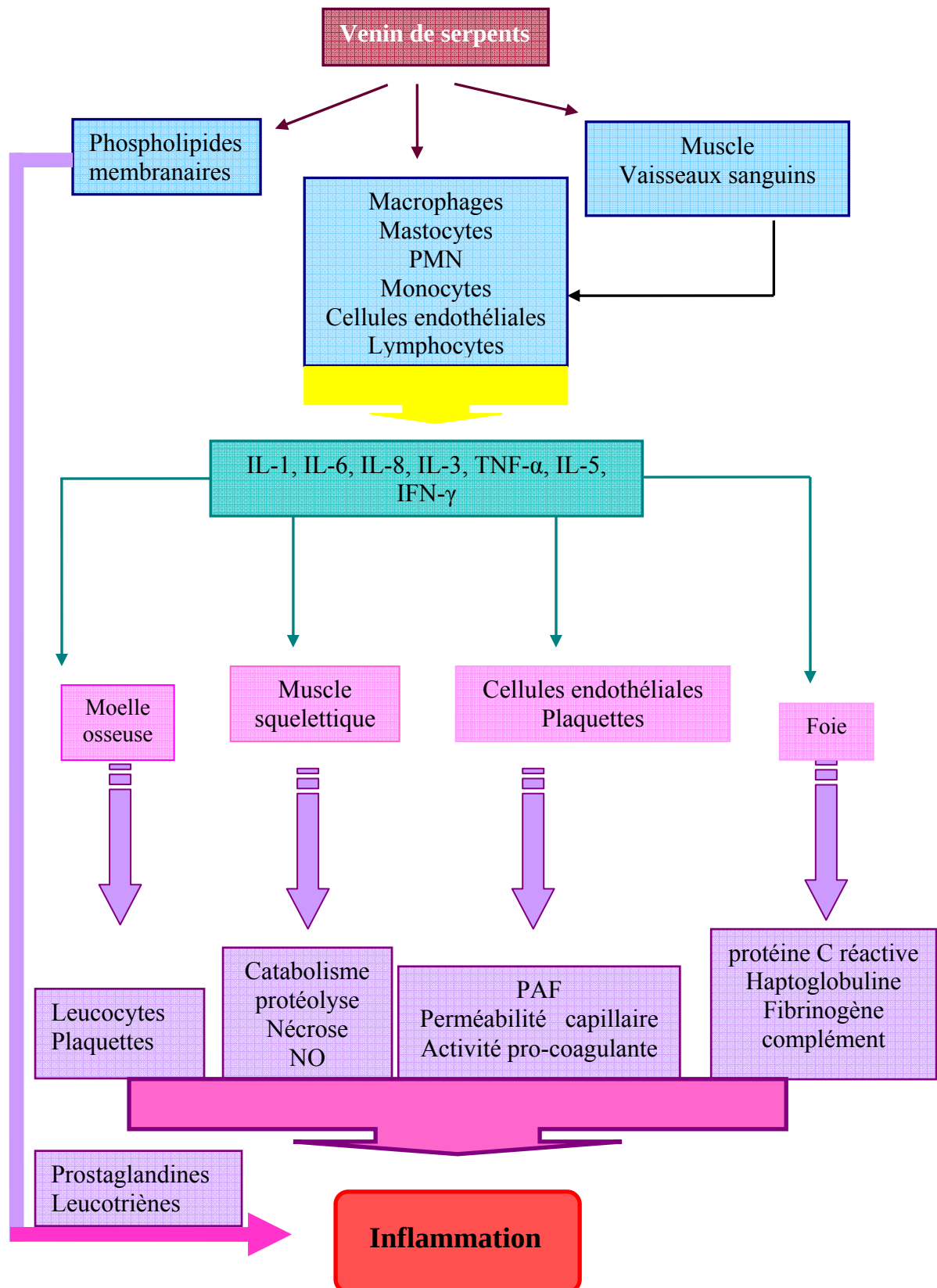


Figure 6: Effets des venins de serpents sur la réponse inflammatoire (Lloret et Moreno, 1993 ; Barraviera et *al.*, 1995 ; Petricevich et *al.*, 2000 ; Zuliani et *al.*, 2005 ; Wei et *al.*, 2006).

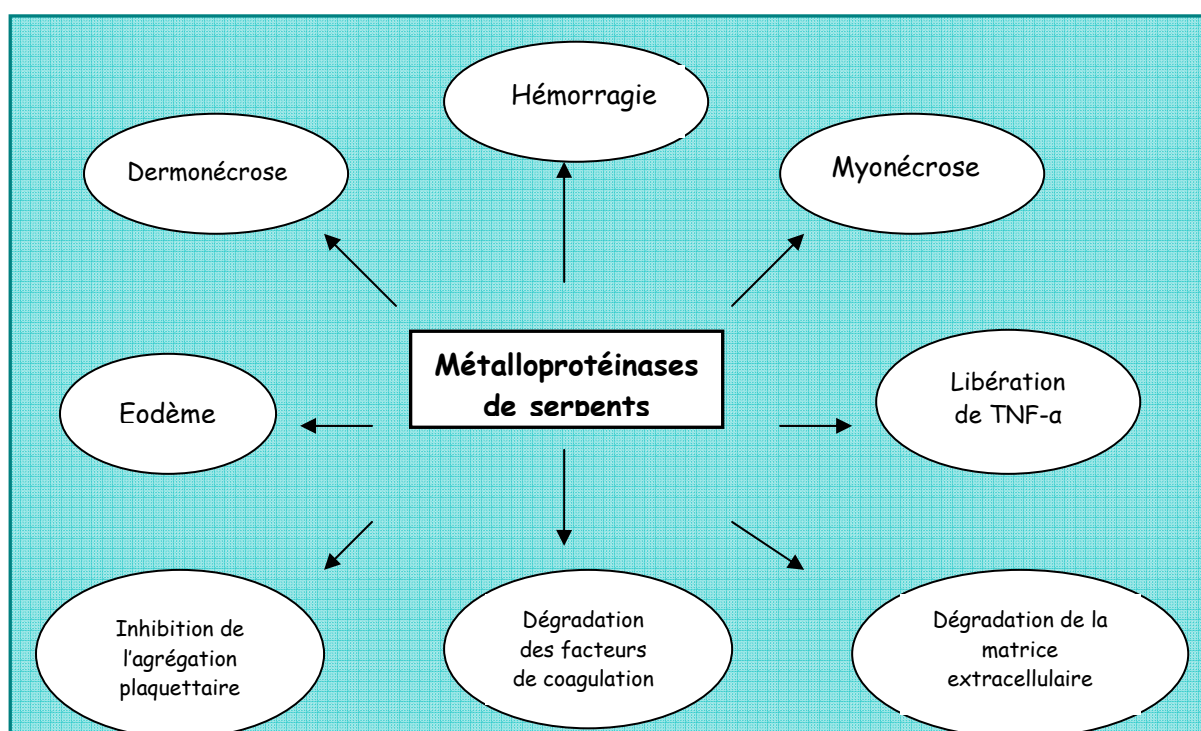


Figure 7: Rôle des métalloprotéinases de venins de serpents dans la pathogénèse de la destruction tissulaire après envenimation (Gutiérrez et Rucavado, 2000).

II.4. Immunothérapie antivenimeuse

Un traitement symptomatique semble suffisant lors d'envenimations bénignes ou modérées. Il consiste en l'administration d'antalgiques et d'antibiotiques. Cependant, une immunothérapie antivenimeuse semble nécessaire dans le cas d'envenimations sévères. Elle consiste en l'administration de sérums polyvalents dans le cas où l'espèce de vipère responsable de l'envenimation n'est pas identifiée (Bon 2000).

L'immunothérapie est efficace dans la mesure où elle est mise en œuvre avant la diffusion des substances toxiques vers les tissus avoisinants du site de morsure (Gentilini 1993).

L'administration du sérum antivenimeux doit être la plus précoce possible afin de neutraliser les composants toxiques du venin. Le succès thérapeutique dépendra du délai entre la morsure et l'administration de l'anticorps ; plus court est ce délai, meilleures seront les chances de succès (Scherrmann 2000). La dose optimale d'anticorps nécessaire à la neutralisation des composants toxiques du venin est un compromis entre la quantité et l'affinité des anticorps pour ces toxines. Ainsi une relative faiblesse de l'affinité de l'anticorps peut-être compensée par l'augmentation de la quantité administrée. A l'inverse, des anticorps de haute affinité peuvent être administrés avec des quantités plus faibles (Scherrmann 2000). L'administration du sérum se fait par voie intradermique ou intramusculaire. Mais lorsque l'intoxication revêt une gravité qui assombrit le pronostic, il est recommandé d'utiliser la voie intraveineuse en prenant les précautions d'usage pour éviter une réaction anaphylactique.

En Algérie, l'immunothérapie antivenimeuse consiste en l'injection d'un anti-venin produit par hyperimmunisation de chevaux avec les venins de *Cerastes cerastes* et de *Vipera lebetina*. Les anti-venins sont constitués de fragments $F(ab')_2$ minimisant ainsi le risque du choc anaphylactique.

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

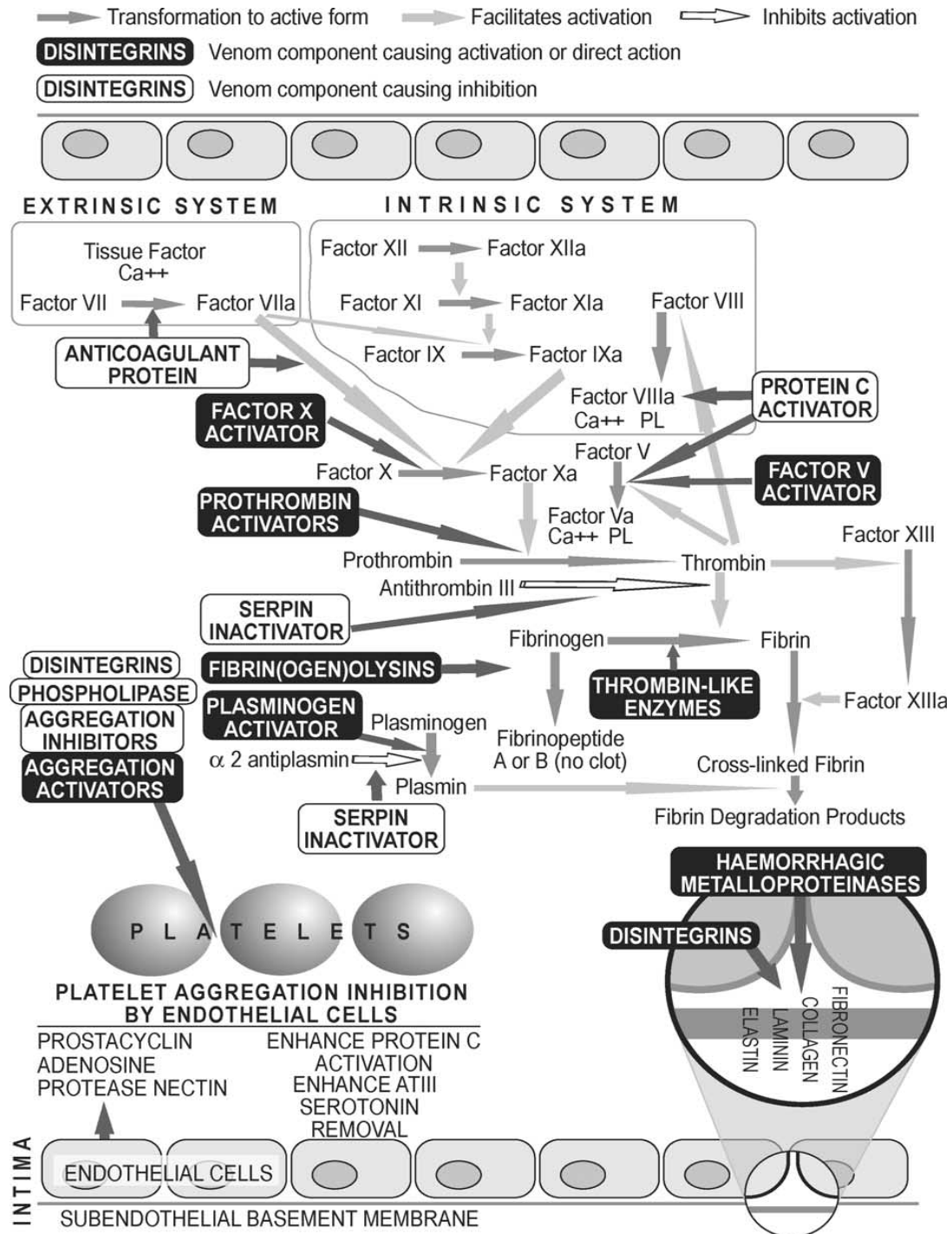


Figure 8 : Effet des venins de serpents sur la coagulation sanguine (White 2005).

II.5. Atténuation des venins

Plusieurs travaux ont été réalisés dans le but de détoxifier les venins et les toxines (Tableau II). Parmi ces méthodes, la fixation à la carboxyméthyl-cellulose (Moroz et *al.*, 1963), la photo-oxydation du venin en présence du bleu de méthylène (Kocholaty et *al.*, 1968), l'exposition au rayon X (Flowers 1966), le traitement aux rayons ultraviolets (Tejasen et Ottolenghi, 1970), le traitement avec du formaldéhyde par (Costa et *al.*, 1985), le glutaraldéhyde (Guidolin, et *al.*, 1989), le traitement à l'iode (Heneine et *al.*, 1986 ; Bicalho et *al.*, 1990) ainsi que l'encapsulation des toxines dans des liposomes (Freitas et Frézard, 1997). Cependant, la plupart de ces méthodes se sont avérées inefficaces, car elles nécessitent souvent l'addition de groupements exogènes aux protéines du venin. Ces groupements chimiques sont notamment responsables d'une synthèse d'anticorps non spécifiques aux composants antigéniques du venin. D'autre part, il semblerait que ces méthodes de détoxification font perdre aux protéines leur immunogénicité (Freitas et Frézard, 1997 ; Angulo et *al.*, 1997).

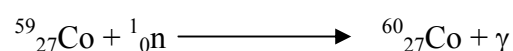
II.6. Irradiation gamma

La détoxification des venins a pour but de diminuer la toxicité de leurs constituants tout en préservant leurs propriétés antigéniques (Clissa et *al.*, 1999). Lorsque les venins détoxifiés sont administrés à des animaux, ils permettent d'améliorer la qualité de l'immun-sérum produit et de prolonger la vie des animaux immunisés (Nascimento et *al.*, 1996). L'irradiation gamma a été appliquée, avec succès, pour neutraliser notamment les venins de *Bothrops jararaca*, *Crotalus durissus terrificus* et *Naja naja*, ainsi que sur des toxines purifiées telles que la crotoxine et la crotamine du venin de *Crotalus durissus terrificus* (Tableau III).

II.6.1. Les rayons gamma :

Les rayons gamma sont des rayonnements électromagnétiques émis par certains radio-isotopes tels que le Cobalt 60 (^{60}Co) et le Césium 137 (^{137}Cs).

La réaction nucléaire permettant l'émission de rayons gamma est la suivante :



Les isotopes radioactifs comme le ^{60}Co sont utilisés en médecine comme moyen de diagnostic et de traitement mais également dans le traitement des eaux usées où ils transforment les

polluants résistants en une forme plus facilement dégradable et dans les technologies alimentaires comme méthode permettant de réduire les allergies au lait (Lee et al, 2001).

II.6.2.1. Action directe des rayons gamma

Les molécules excitées et ionisées présentent un excédent d'énergie et sont instables. Cet excédent d'énergie peut être expulsé :

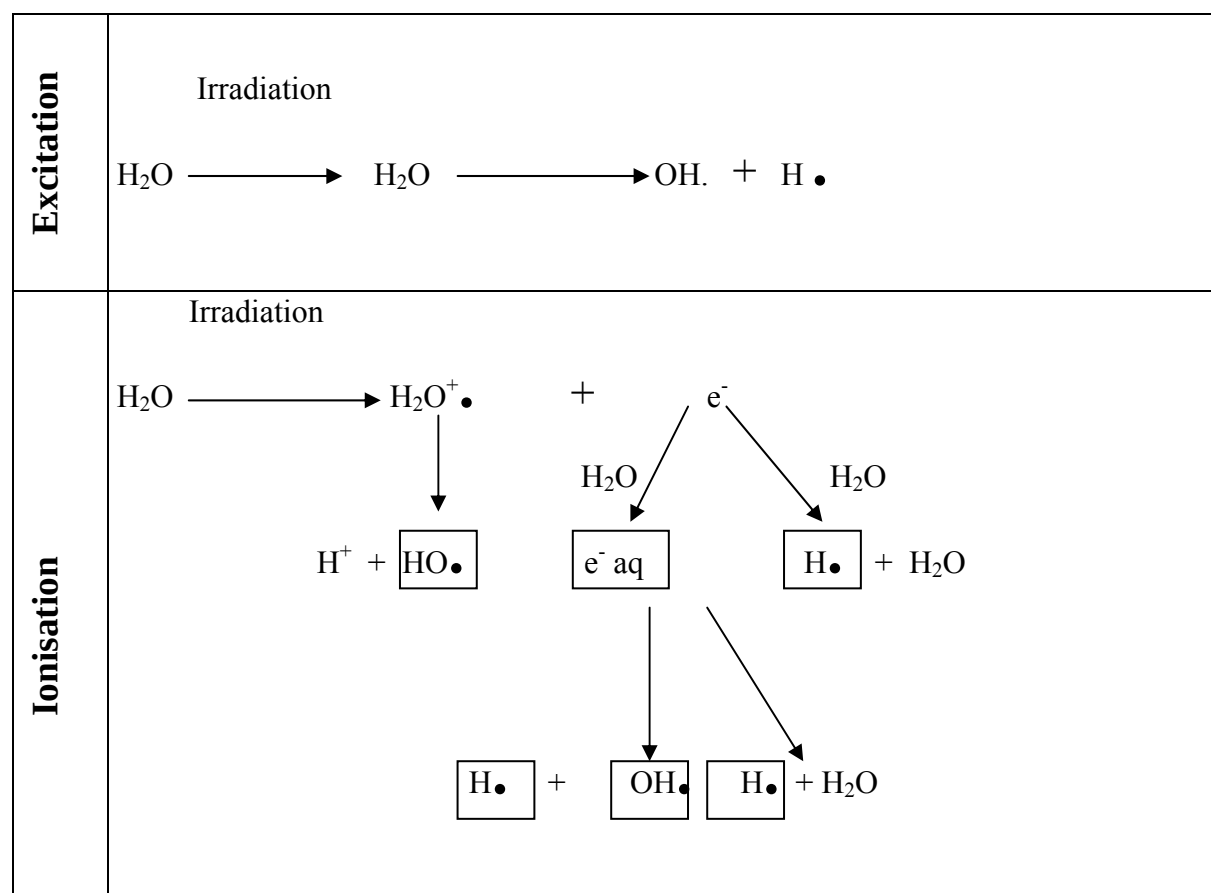
- par émission de photons (fluorescence) avec retour à l'état initial.
- par rupture d'une liaison de covalence et scission de la molécule en deux radicaux.

Le type de lésion dépend souvent de la structure de la molécule. Dans le cas de polymères organiques, par exemple, les chaînes peuvent subir une coupure (dégradation) ou une réticulation (polymérisation ou pontage).

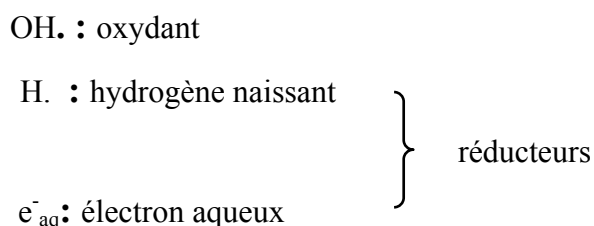
II.6.2.2. Action indirecte des rayons gamma

a- Radiolyse de l'eau

La radiolyse de l'eau est le résultat de l'action directe des rayonnements sur les molécules d'eau. Elle est résumée dans le schéma suivant :



La radiolyse de l'eau conduit au total à la formation de radicaux très réactifs :

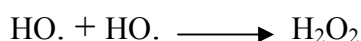


Lorsque l'électron est suffisamment ralenti, il est piégé par les molécules polaires d'eau et prend le nom d'électron solvaté ou aqueux.

b- Devenir des radicaux formés

Les radicaux formés subissent une réaction de recombinaison ou réagissent avec les solutés :

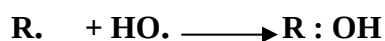
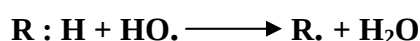
- La recombinaison: les radicaux peuvent se recombiner entre eux pour former des molécules en particulier l'eau oxygénée par la réaction



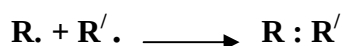
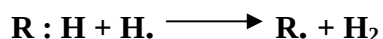
- la capture par les solutés : au cours du temps, les radicaux diffusent, leur probabilité de recombinaison diminue et ils peuvent agir sur les molécules de solutés entraînant leur modification chimique.

Par exemple pour une molécule organique **R : H** les changements observés sont :

- Hydroxylation par les radicaux **HO.**



- Déshydrogénation et composés d'addition par les radicaux **H.**



- L'e⁻_{aq} produit des ruptures de doubles liaisons avec formation de composés d'addition (Dutreix et al, 1973).

II.6.2. Effet des rayons gamma sur les molécules biologiques

L'effet des rayons gamma sur les systèmes biologiques est essentiellement dû à la molécule d'eau, car c'est la molécule la plus abondante dans les organismes vivants.

Le rayonnement peut avoir une action directe sur les molécules de soluté provoquant des modifications au niveau de ces molécules, ainsi qu'une action indirecte due à l'interaction des solutés avec les produits de la radiolyse de l'eau (Figure 9). Cette action indirecte est responsable de 99,9% des dommages causés aux protéines (Kempner 2002). Les radicaux libres issus de la radiolyse réagissent avec certains groupements protéiques radiosensibles tels que les groupements soufrés de la cystéine, provoquant principalement des altérations oxydatives (Bugota et Dancewicz, 1983; Wales et Kussel, 1992). Les groupements thiols peuvent être à l'origine de la formation de nouveaux ponts disulfures entre différentes protéines, formant ainsi des agrégats de haut poids moléculaire (Schessler et Freundl, 1983). Les radicaux libres induisent également des réactions de désamination ainsi que l'hydrolyse des ponts disulfures (Schessler et Davies, 1983). L'association de deux groupements aromatiques tels que l'association de deux unités de tyrosine peut conduire à la formation du dérivé 2, 2'-didhydroxibiphérine qui intervient dans la polymérisation intermoléculaire des protéines entraînant la formation d'agrégats (Bugota et Dancewicz, 1983).

II.6.3. Irradiation gamma des venins de serpents

L'irradiation gamma a été appliquée pour atténuer les venins de plusieurs serpents. L'irradiation a été effectuée sur le venin brut ou sur des toxines purifiées à partir de ces venins. Salafranca et al (1972) ont rapporté que le toxoid obtenu après irradiation gamma du venin de *Naja naja philippinesis* est plus immunogène que le venin natif. Hati et al (1990) ont rapporté une diminution des activités phosphodiesterase, protéolytique et hyaluronidase des venins irradiés de *Vipera russelli*. L'irradiation gamma de la crotoxine du venin de *Crotalus durissus terrificus* à la dose de 2 kGy conduit à une agrégation ainsi qu'à une hydrolyse des protéines sous l'effet des radicaux libres. Les agrégats, formés à l'issue de l'irradiation gamma de la crotoxine, présentent une réduction de l'activité myotoxique, sont dépourvus de l'activité PLA₂ et sont non toxiques. Souza-Filho et al (1992) ont rapporté que la dose de 2 kGy de rayons gamma rompt 6 ponts disulfures de la crotoxine. Des anticorps monoclonaux produits contre la crotoxine native et qui reconnaissent des épitopes conformationnels, gardent la capacité de reconnaître la crotoxine irradiée, suggérant une bonne conservation de la structure tridimensionnelle de la crotoxine irradiée. Les animaux immunisés avec la crotoxine irradiée ont survécu à une injection de 15 DL₅₀ de crotoxine native (Nascimento et

al., 1996). Moreira et *al* (1997) ont montré que l'irradiation gamma de la crotoxine réduit de façon significative les propriétés anxiogéniques qu'induit la crotoxine native, par rupture de la transmission au niveau de la jonction neuromusculaire. L'irradiation gamma de la crotoxine semble induire des altérations structurales, lui faisant perdre la capacité de se fixer sur des récepteurs situés sur la jonction neuromusculaire. Les travaux de Cardi et *al* (1998a,b) ont quant à eux montré que comparativement à la crotoxine native, la crotoxine irradiée à 2 kGy est rapidement phagocytée par les macrophages, améliorant ainsi ses propriétés immunologiques. Gallacci et *al* (2000) ont établi une corrélation entre la détoxification de la crotoxine et la perte de son activité PLA₂. Clissa et *al* (1999) ont utilisé des doses de 2, 3, 5 et 10 kGy de rayons gamma lors de l'irradiation du venin de *Crotalus durissus terrificus*. Ces auteurs ont rapporté que les venins irradiés à 2 et 3 kGy sont respectivement 2,7 et 13,5 fois moins toxiques que le venin natif, alors que les venins irradiés à 5 et 10 kGy sont 100 fois moins toxiques. Tous ces venins sont immunogènes et les anticorps produits reconnaissent les composants du venin natif. Cependant, seul le venin irradié à 2 kGy présente une amélioration des propriétés immunologiques. Boni-Mitake et *al* (2001) ont irradié au ⁶⁰Co la crotamine, qui est une toxine basique isolée du venin de *Crotalus durissus terrificus* et qui induit des spasmes paralytiques du muscle squelettique. Ces auteurs ont observé une modification du comportement électrophorétique de la toxine irradiée, suggérant une altération structurale. Ils ont aussi constaté une réduction de 48,3% de sa toxicité. Souza et *al* (2002) ont rapporté que l'irradiation gamma du venin de *Bothrops jararacussu* à la dose de 2 kGy abolie son activité neurotoxique et myotoxique au niveau de la jonction neuromusculaire. A la lumière de ces travaux, l'irradiation gamma semble offrir la possibilité de détoxifier les venins tout en préservant leurs propriétés immunologiques.

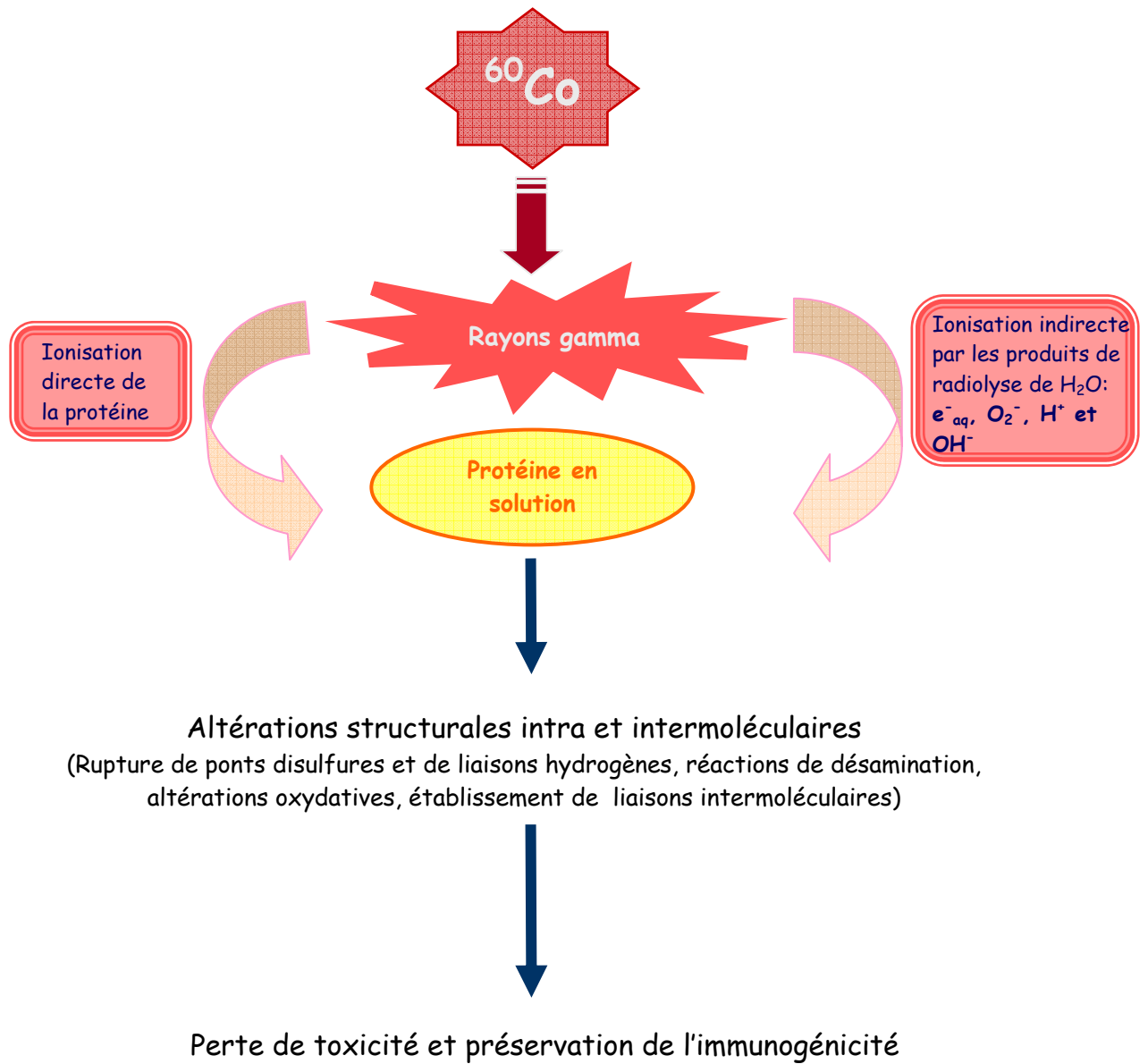


Figure 9 : Effets des rayons gamma sur les protéines en solution (Nascimento et *al*, 1996 ; Clissa et *al*, 1999 ; Kempner 2002)

Tableau II : Les principaux agents chimiques et physiques de détoxification des venins

Agents utilisés		Origine du venin	Résultats obtenus	Références
Agents chimiques	Phosphate d'aluminium	<i>Vipera russelli</i>	- Neutralisation de 4DL ₅₀ du venin par 100µl de sérum de lapins immunisés par le venin détoxifié.	Hati et al, 1990
	Carboxy méthyle cellulose	<i>Vipera palestinae</i>	- Augmentation de l'immunogénicité par une combinaison au Carboxy Methyl Cellulose.	Golblum et al, 1966
	Iodation	<i>Bothrops jararaca</i>	- Modification des groupements Phenyl et Imidazole des composants du venin - Des activités d'altérations observées, expliquant une inhibition incomplète de l'activité enzymatique.	Bicalho et al, 1990
	Formaldéhyde	<i>Trimeresurus flavoviridis</i>	- Atténuation lente du venin en milieu acide et rapide en milieu alcalin avec perte des propriétés antigéniques.	Kondo et al, 1972
Agents physiques	Rayons X	<i>Ancistrodon piscivorus</i>	- Inactivation des toxines hémorragiques et nécrosantes - Inactivation de l'activité phospholipasique de 95 à 100% - Différences structurales des composants du venin natif et irradié. - Réduction de la létalité à 20%.	Flowers, 1963 Flowers, 1966
	Photo-oxydation en présence de bleu de méthylène	<i>Bothrops atrox asper</i> <i>Crotalus durissus durissus</i>	- Altération des acides aminés sensibles à la photo-oxydation et qui sont impliqués dans la toxicité et l'immunogénicité. - Le degré de la photo-oxydation poussé dénature en partie les protéines et donc perte de l'immunogénicité.	Kocholaty et al, 1968

Tableau III: Effets de l'irradiation gamma sur les venins de serpents.

Agents utilisés		Origine du venin	Résultats obtenus	Références
Agents physiques	Rayons γ	<i>Bothrops jararaca</i>	-Les propriétés antigéniques sont les plus radiorésistantes.	Guarnieri et al, 1990
		<i>Naja naja</i>	-Augmentation de l'immunogénicité.	
			-Toxicité réduite, propriétés antigéniques préservées avec un titre en anticorps élevé.	Hati et al, 1990 Murata et al, 1990
		<i>Crotalus durissus terrificus</i>	-Suite à l'irradiation de la crotoxine : ▪ Production d'agrégats dépourvus d'activités phospholipasique, conservant les propriétés antigéniques et immunogéniques de la crotoxine.	Nascimento et al, 1996
			▪ La crotoxine irradiée n'induit pas des troubles du comportement contrairement à la crotoxine native considérée comme un composant anxiogénique.	Moreira et al, 1997
			▪ Des altérations structurales oxydatives conduisant la crotoxine irradiée vers les macrophages menant à une meilleure réponse immunitaire.	Cardi et al, 1998
			▪ Toxicité réduite et immunogénicité améliorée.	Clissa et al, 1999
			▪ La perte de l'activité enzymatique de la PLA ₂ est liée à la détoxification de la crotoxine.	Gallacci et al, 2000
			▪ La toxicité est réduite à 48,3%.	
			▪ Différences structurales entre la Crotoxine native et irradiée.	Spencer et al, 2001

II.7. Réponse inflammatoire

L'inflammation est un ensemble complexe de réactions cellulaires et humorales qui participent à la défense de l'organisme face à une agression. Elle peut relever de nombreuses causes : infectieuse (bactérienne, virale, parasitaire), tumorales et traumatiques (brûlure). Une réaction inflammatoire comporte une dilatation des vaisseaux à l'origine d'une infiltration séreuse des tissus (œdème) puis une migration des leucocytes de la microcirculation par diapédèse pour s'accumuler au niveau de foyer inflammatoire, suivie d'une phagocytose par des cellules compétentes et enfin un processus de résorption ou de cicatrisation (Genetet 2002).

La fonction première de la réponse inflammatoire est d'éliminer ou d'isoler l'agent agresseur du reste de l'organisme et de permettre le plus rapidement possible la réparation des tissus. Les cellules impliquées dans l'inflammation sont les polynucléaires neutrophiles, les monocytes, les macrophages, les lymphocytes, les mastocytes et les plaquettes sanguines. Ces cellules libèrent de nombreux médiateurs : histamine, sérotonine, prostaglandines, leucotriènes, PAF (platelet activating factor), cytokines : IL-1, IL-6, TNF- α , interférons et radicaux libres oxygénés. Certaines cytokines jouent un rôle important dans l'orchestration des mécanismes qui contribuent à la mise en place d'une réponse inflammatoire. Il s'agit notamment de l'IL-1, l'IL-6 et du TNF- α .

II.7.1. L'histamine et la sérotonine

L'histamine et la sérotonine sont des médiateurs vasoactifs. Ils sont libérés par les mastocytes, les granulocytes basophiles et les plaquettes sanguines. L'histamine est stockée dans les mastocytes sous forme de complexe avec les mucopolysaccharides (glucosaminoglycannes). Elle a divers effets incluant la dilatation locale des petits vaisseaux, la dilatation généralisée des artérioles, l'augmentation de la perméabilité capillaire par contraction des cellules endothéliales de même qu'elle a une action sur le chimiotactisme des éosinophiles et un effet inhibiteur sur la fonction des lymphocytes T. Un certain nombre de cellules ont des récepteurs pour l'histamine. Ces récepteurs sont de trois types : les récepteurs H1 sont responsables d'effets vasculaires aigus, de la contraction des muscles lisses (l'histamine agit comme un spasmogène) et de la stimulation du chimiotactisme des éosinophiles. Les récepteurs H2 ont des effets anti-inflammatoires en inhibant le chimiotactisme des éosinophiles mais induisent la vasodilatation. Les récepteurs H3 sont responsables du contrôle de la libération de l'histamine par les différentes cellules sécrétrices.

La sérotonine est responsable de l'augmentation de la perméabilité capillaire et de la contraction des muscles lisses. Elle est stockée dans les cellules gastro-intestinales, au niveau du système nerveux central et dans les granules denses des plaquettes sanguines.

II.7.2. Les médiateurs lipidiques

Les constituants majeurs des membranes plasmiques sont les phospholipides. Les phospholipases cellulaires et principalement les PLA₂ et PLC sont activées durant le processus inflammatoire et dégradent les phospholipides en acide arachidonique et lysophospholipides. L'acide arachidonique a une courte demi-vie et est rapidement métabolisé par deux voies : la voie de la cyclo-oxygénase et la voie de la lipoxygénase. La voie de la cyclo-oxygénase produit les prostaglandines, les prostacyclines et les thromboxanes. La voie de la lipoxygénase produit les lipoxines et les leucotriènes (Figure 10).

Les prostaglandines représentent une famille de lipides solubles hormone-like, produits par différentes cellules. Les macrophages et les monocytes produisent les PGE₂ et les PGF_{2α}, les neutrophiles produisent les PGE₂ et les mastocytes les PGD₂. Les prostaglandines, à l'exemple de l'histamine, n'existent pas à l'état libre dans les tissus, mais sont synthétisées à l'issue d'une induction. Les PGE₂ sont pyrogéniques et augmentent la perméabilité vasculaire. Les thromboxanes (TXA₂) sont produits par les monocytes, les macrophages et les plaquettes sanguines. Elles induisent l'agrégation plaquettaire et sont vasoconstrictrices, alors que les prostacyclines (PGI₂) sont vasodilatatrices. Les eicosanoïdes sont de puissants activateurs de l'adénylcyclase.

Les leucotriènes (LTB₄) et l'acide 5-hydroxy-eicosatétraénoïque (5-HETE) affectent la migration et le chimiotactisme de nombreuses cellules et notamment des neutrophiles. Les leucotriènes sont produits par les monocytes et les macrophages, ont une action spasmogénique et induisent la contraction des muscles lisses. Les lipoxines sont vasodilatatrices, bloquent le chimiotactisme des neutrophiles et sont cytotoxiques sur les cellules NK. Les plaquettes sanguines libèrent aussi un médiateur lipidique, le platelet activating factor (PAF) qui induit l'agrégation des plaquettes de même qu'il présente une action chimiotactique sur les phagocytes, stimule la libération d'oxygène réactif par les enzymes lysosomiales des neutrophiles, éosinophiles et macrophages et augmente l'adhérence des leucocytes aux cellules endothéliales (Weil et *al.*, 1983 ; Genetet et *al.*, 1993 ; Parham 2003).

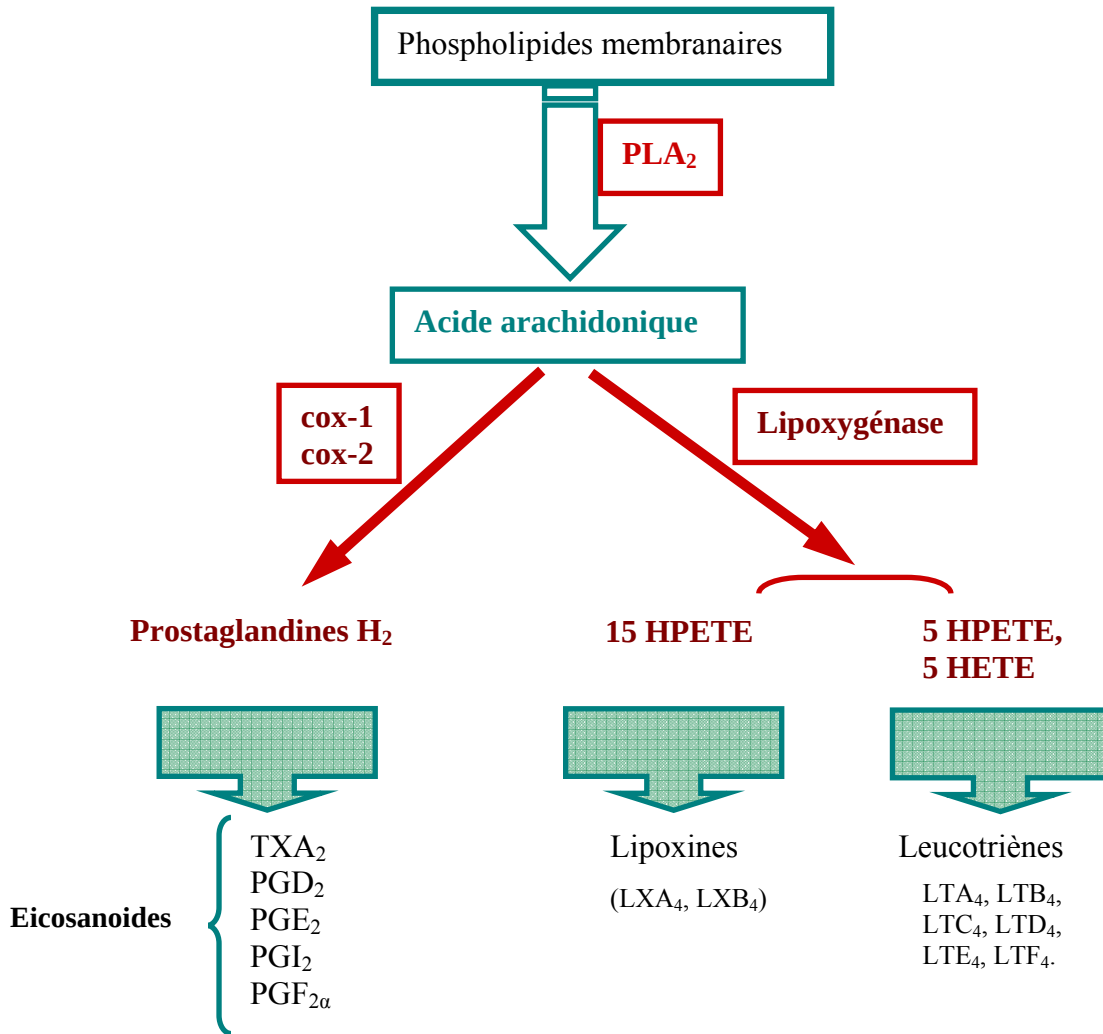


Figure 10 : Médiateurs lipidiques issus du métabolisme de l'acide arachidonique par la voie de la cyclo-oxygénase et de la lipoxygénase (Genetet 1993 ; Parham 2003).

cox : cyclo-oxygénase, HPETE: acide hydroperoxy-eicosatétraénoïque; HETE: acide hydroxy-eicosatétraénoïque, TX : thromboxanes, PG : prostaglandines, LX : lipoxines, LT : leucotriènes.

II.7.2. Cytokines pro-inflammatoires et fonctions effectrices

L'IL-1 et le TNF- α jouent un rôle central dans la réaction inflammatoire, car l'administration de leurs antagonistes comme l'IL-1ra (récepteur antagoniste de l'IL-1), le fragment soluble de récepteur de l'IL-1, l'anticorps monoclonal anti-TNF- α ou le récepteur soluble du TNF bloque les réponses aiguës et chroniques de la réaction inflammatoire dans différents modèles animaux. Certains de ces antagonistes sont utilisés pour le traitement de certaines pathologies inflammatoires à l'exemple de l'arthrite rhumatoïde. La régulation positive de la réaction inflammatoire est également le résultat de l'effet des cytokines IL-11, IFN- α , IFN- β et des chimiokines. Par ailleurs, les cytokines anti-inflammatoires (IL-4, IL-10 et IL-13) sont responsables de la régulation négative de la réaction inflammatoire car elles sont capables de supprimer la production des cytokines pro-inflammatoires. Ainsi, l'IL-10 est capable de protéger les souris du choc endotoxique, une réaction inflammatoire létale, sous le contrôle du TNF- α et de l'IL-1. La production du TNF- α , de l'IL-1 et de l'IL-6 est aussi inhibée par le TGF- β (transforming growth factor β). Cependant, le TGF- β a lui-même des effets pro-inflammatoires tel que l'effet chimioattractant sur les neutrophiles et les lymphocytes T (Tableau IV).

II.7.3. Autres médiateurs de l'inflammation

Certains composants du complément jouent un rôle important dans le processus inflammatoire. Les fragments C3a, C4a et C5a augmentent la perméabilité vasculaire, induisent la contraction des muscles lisses et provoquent la dégranulation des mastocytes et des basophiles. Le C5a stimule la production des prostaglandines et des leucotriènes à partir de l'acide arachidonique et stimule le chimiotactisme des neutrophiles. Le système du complément est aussi activé après lésion tissulaire ayant engendré des conditions ischémiques. Le métabolisme hépatique est aussi profondément modifié lors d'un processus inflammatoire. En effet, en réponse à un stimulus inflammatoire, le foie synthétise les protéines de la phase aiguë (APP : acute phase proteins) telles que la protéine C-réactive, qui intervient dans la défense immunitaire non spécifique en agissant comme une opsonine pour les bactéries, parasites et complexes immuns de même qu'elle peut activer la voie classique du complément.

Tableau IV : Cytokines impliquées dans la réaction inflammatoire (Genetet 1993, Parham 2003).

Effets	Cytokines
Cytokines pro-inflammatoires	
▪Pyrogènes endogènes	IL-1, IL-6, TNF- α
▪Control positif de la réaction inflammatoire	IL-1, IL-6, TNF- α , IFN- α , IFN- β , chimiokines
▪Stimulation de la phase aigue de la réaction inflammatoire	IL-1, IL-6, TNF- α , IFN- γ , IL-11, TGF- β , LIF, OSM, CNTF
▪Cytokines chimioattractantes	IL-8, PF-4, PBP, NAP-2, β -TG, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, MCP-2, MCP-3, RANTES
▪Stimulation des cytokines pro-inflammatoires	IL-12
Cytokines anti-inflammatoires	
▪Inhibition de la production des cytokines pro-inflammatoires	IL-4, IL-10, IL-13

TGF- β : transforming growth factor- β , LIF: leukemia inhibitory factor, OSM: oncostatin, CNTF: ciliary neutrophilic factor, PF-4: platelet factor-4, PBP: platelet basic protein, NAP: neutrophil activating protein, β -TG : β -thromboglobulin, MIP: macrophage inflammatory protein, MCP: monocyte chemoattractant protein, RANTES: regulated upon activation normal T expressed and presumably secreted chemokine.

II.8. Les anti-inflammatoires

Les anti-inflammatoires sont des substances chimiques qui réduisent ou suppriment le processus inflammatoire.

Les anti-inflammatoires stéroïdiens sont représentés par les glucocorticoïdes, appelés aussi cortisoniques car ils engendrent le cortisol et ses dérivés. La majorité des modes d'action des glucocorticoïdes passent par des récepteurs nucléaires spécifiques qui modulent l'expression d'un nombre considérable de gènes impliqués dans l'inflammation telle que l'inhibition de la phospholipase A₂, ce qui interrompt la libération de l'acide arachidonique à partir des phospholipides des membranes cellulaires et ainsi la synthèse des prostaglandines et des leucotriènes (Giroud et *al.*, 1988; Berenbaum 2004). Ils inhibent également la synthétase de l'oxyde nitrique et la synthèse de plusieurs cytokines (Tableau V). Les glucocorticoïdes diffusent à travers la membrane plasmique et se lient à des récepteurs spécifiques dans le cytoplasme. Avant de se lier aux stéroïdes, ces récepteurs sont associés à un polypeptide cytoplasmique appelé Hsp 90 (Heat-shock protein de PM 90 kDa). Lorsque les stéroïdes se fixent au récepteur, ce dernier change de conformation et se dissocie de la Hsp, puis pénètre dans le noyau où le complexe récepteur-stéroïde se fixe de façon sélective sur certains gènes dont il active la transcription. Le mode d'action anti-inflammatoire des corticostéroïdes repose sur un mécanisme d'inhibition de la fonction NFκB, un facteur de transcription capital pour l'activation cellulaire et la production de cytokines au cours de la réponse immunitaire. Dans les cellules au repos, NFκB est retenu dans le cytoplasme par son association à la protéine IκBα. Après activation de la cellule, la protéine IκBα est phosphorylée ce qui conduit à la libération du NFκB et son transfert vers le noyau, où il induit la transcription de gènes de cytokines. Les corticostéroïdes augmentent la production de la protéine IκBα et empêchent le facteur NFκB d'atteindre le noyau (Parham 2003).

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens se caractérisent par l'absence d'une structure chimique stéroïdienne contrairement aux glucocorticoïdes. Ce sont des acides faibles qui agissent par inhibition de la cyclo-oxygénase. Ils possèdent des propriétés anti-inflammatoires mais aussi antalgiques et antipyrétiques (Berenbaum 2004).

Dans une visée thérapeutique, nous avons utilisé trois anti-inflammatoires, la dexaméthasone qui est un corticostéroïde et deux anti-inflammatoires non stéroïdiens, l'indométacine, un inhibiteur de la cyclo-oxygénase et la pentoxifylline, un inhibiteur de la synthèse du TNF-α (Figure 11). Le TNF-α est une cytokine cytotoxique, largement impliquée dans les processus de destruction des tissus à la suite d'une réaction inflammatoire (Tableau VI).

Tableau V : Effets des corticoïdes (Parham 2003)

Activité	Effet
Réduction de la libération des cytokines IL-1, TNF- α , GM-CSF, IL-3, IL-4, IL-5, IL-8	Diminution de l'inflammation causée par les cytokines
Inhibition de la PLA ₂ et de la cyclo-oxygénase Activation de la lipocortine-1	Inhibition de la synthèse des prostaglandines et des leucotriènes
Réduction de l'expression des molécules d'adhérence	Migration réduite des leucocytes en dehors des vaisseaux
Induction d'endonucléases	Induction de l'apoptose des lymphocytes et des éosinophiles
Inhibition de la synthétase de l'oxyde nitrique (iNOS)	Réduction de la libération du NO

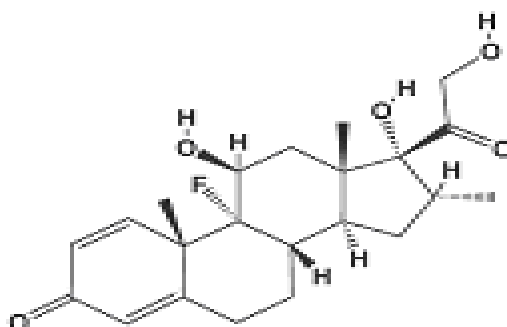
Tableau VI : Propriétés du TNF- α (Parham 2003)

Origine dans le système immunitaire : macrophages, mastocytes, lymphocytes

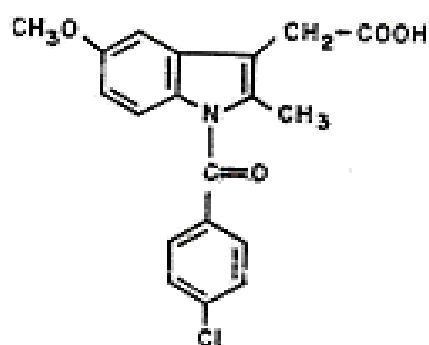
Cibles principales : macrophages, granulocytes, autres cellules

Effets principaux : ▪ Activation des macrophages, granulocytes et cellules
cytotoxiques

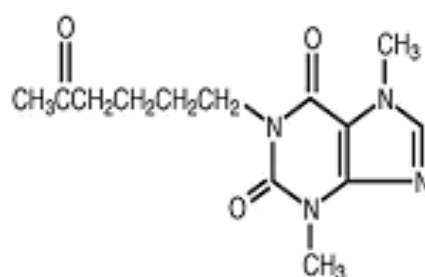
- Adhérence leucocytes/cellules endothéliales
 - Cachexie
 - Fièvre
 - Induction des protéines de la phase aiguë
 - Stimulation de l'angiogenèse
 - Augmentation de l'expression du CMH de classe 1
-



Dexaméthasone



Indométacine



Pentoxifylline

Figure 11: structure chimique des anti-inflammatoires utilisés dans les tests d'inhibition de l'activité dermonécrotique du venin de *Cerastes cerastes*.

Matériel & Méthodes

III- Matériel et méthodes

III.1.1. Matériel biologique

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

III.1.2. Animaux

Souris : les souris utilisées sont des souris *NMRI*, de masse corporelle de 20 ± 2 g, provenant d'un élevage de l'IPA.

Lapins : ce sont des lapins Albinos de masse corporelle 2.5 à 3 kg. Ils sont issus d'un élevage de l'animalerie de l'IPA.

III.1.3. Matériel non biologique

III.1.3.1 Produits chimiques

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

Merck : Acétate d'ammonium (AcNH_4), acide trichloro-acétique (TCA), bleu de bromophénol, Caséine, di-hydrogène-phosphate mono-potassique (KH_2PO_4), hydrogène-phosphate di-potassique (K_2HPO_4), Tris (hydroxy-méthyl-amino-méthane), Bleu de Coomassie G 250, .

Pharmacia : Carbonate de sodium, glycérol.

Pharmacia Biotech : Acrylamide.

Prolabo : Acide acétique, acide chlorhydrique, soude, citrate trisodique.

Sigma : Acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA), chlorure de calcium (CaCl_2), chlorure de potassium (KCl), chlorure de sodium (NaCl), chlorure de zinc (ZnCl_2), N_α -Benzoyl-L-Arginine Ethyl Ester Hydrochloride (BAEE), N_α -CBZ_L-Arginine-p-Nitroanilide Hydrochloride (CBZ), polyéthylène glycol (PEG), sodium dodécyl sulfate (SDS), Adjuvant complet de Freund, Adjuvant incomplet de Freund, Conjugué anti IgG de lapin , α 4-Chloro 1-

naphtol, Nitrate d'argent, O-Phénylène Diamine (OPD), Sérum Albumine Bovine, Tween20, ABTS (Acide 2,2'-Azino-Di (3-Ethyl) Benzothiazolinéi-6-Sulfonique).

Panréac : Formaldéhyde, Ethanol, Toluène, Paraffine, alun de fer, PMSF, Bleu de bromophénol.

Rhône-Poulenc : Baume de Canada, Hématoxyline, Eosine.

Riedel de Häen : Xylène.

Beckman : Rouge Ponceau.

Saidal : Indométacine.

Unimed : Dexaméthasone.

Mepha : Pentoxifylline.

III.2. Méthodes

III.2.1. Irradiation gamma du venin

Le venin (1 mg/ml) est dissout dans NaCl 0,15 M dans des tubes en verre et soumis à une irradiation gamma au ^{60}Co , à un débit de dose de 4,25 Gy/min, en présence d'oxygène atmosphérique. Deux doses (1 et 2 kGy) ont été appliquées, donnant lieu à deux échantillons de venins irradiés (Cc_1 et Cc_2). L'irradiation a été effectuée au Centre de Recherche Nucléaire d'Alger (CRNA) dans le Département des Techniques d'Irradiation. Le venin est centrifugé à 1000 g pendant 30 min et le surnageant est gardé à -20°C . Le dosage des protéines est effectué selon la méthode de Bradford (1976).

III.2.2. Implications de l'irradiation gamma sur les propriétés biochimiques du venin de *Cerastes cerastes*

III.2.2.1. Analyse du comportement électrophorétique du venin natif et des venins irradiés par SDS-PAGE

Les échantillons de venin natif et de venins irradiés sont analysés sur un gel d'acrylamide (20%) en présence de SDS selon la méthode de Laemmli (1970), utilisant le Phast-system (Pharmacia Co., Uppsala, Suède). Les échantillons de venins (10 ng) dans du tampon Tris-HCl 10 mM, pH 8, contenant 2% de SDS, 10% de glycérol et 0.01% de bleu de bromophénol sont portés à ébullition pendant 10 min et déposés sur le gel de polyacrylamide. Après migration, les bandes protéiques sont fixées avec une solution de glutaraldéhyde à 5% puis colorées au nitrate d'argent à 0.4%.

Les marqueurs de poids moléculaire utilisés sont : l' α lactalbumine 14.4 kDa, Soybean trypsin inhibitor 20.1 kDa, l'anhydrase carbonique 30 kDa, l'ovalbumine 43 kDa, la BSA 67 kDa et la phosphorylase b 94 kDa (Pharmacia Co., Uppsala, Sweden).

III.2.2.2. Détermination des activités enzymatiques avant et après irradiation gamma

III.2.2.2.1. Détermination de l'activité arginine ester hydrolase

L'activité arginine ester hydrolase est déterminée selon la méthode de Nishikata (1984), en utilisant un substrat synthétique le benzoyl arginine ethyl ester hydrochloride (BAEE).

III.2.2.2.1.1. Détermination de l'activité arginine ester hydrolase en fonction de la concentration du venin

Les échantillons de venins natif et irradiés à des concentrations croissantes allant de 0 à 0,13 UDO sont ajoutés à 200 μ l de BAEE à $6,6 \cdot 10^{-4}$ M dissout dans du tampon Tris-HCl 0,04 M, pH 8 contenant du CaCl_2 0,01M. Après incubation pendant 30 min à 37°C, la densité optique du milieu réactionnel est mesurée à 253 nm.

III.2.2.2.1.2. Détermination de l'activité arginine ester hydrolase en fonction de la concentration du substrat

Les échantillons de venins (0,1 UDO) sont ajoutés à une gamme de concentrations croissantes de substrat BAEE allant de 0 à $9,9 \cdot 10^{-5}$ dans du tampon Tris-HCl 0,04 M, CaCl_2 0,01M, pH 8. Le mélange réactionnel est incubé pendant 30 min à 37°C et la densité optique est mesurée à 253 nm.

III.2.2.2.2. Détermination de l'activité amidolytique

L'activité amidolytique est déterminée selon la méthode de Stocker *et al* (1986), en utilisant un substrat synthétique spécifique de l'activité thrombine-like : le *N* α -CBZ-arginine-p-nitroanilide hydrochloride (CBZ).

III.2.2.2.2.1. Détermination de l'activité amidolytique en fonction de la concentration du venin

Les échantillons de venins utilisés à doses croissantes (0 à 0,13 UDO) sont préalablement incubées pendant 10 min à 37°C dans du tampon Tris-HCl 0,01M, pH 8,7, contenant du NaCl

0,1M et du PEG 0,1% (P/V). Un volume de 50 μ l de CBZ à $92,95 \cdot 10^{-2}$ mg/ ml est ajouté à chaque échantillon de venin. Après une incubation de 15 min à 37°C, la lecture de la densité optique du milieu réactionnel est effectuée à 405 nm.

III.2.2.2.2. Détermination de l'activité amidolytique en fonction de la concentration du substrat

Cette activité est déterminée en maintenant constante la concentration du venin à 0,1 UDO, préalablement incubé dans du tampon Tris-HCl 0,01M, pH 8,7, contenant du NaCl 0,1 M et du PEG 0,1% (P/V), pendant 10 min à 37°C. Des concentrations croissantes de substrat spécifique à la thrombine, allant de 4,64 à $92,95 \cdot 10^{-2}$ mg/ ml, sont ensuite ajoutées aux venins et incubées 15 min à 37°C. La densité optique du mélange réactionnel est mesurée à 405 nm.

III.2.2.2.3. Détermination de l'activité caséinolytique

L'activité caséinolytique est déterminée selon la méthode de Kunitz (1947) modifiée par Van Der Watt et Joubert (1971), en utilisant comme substrat la caséine.

III.2.2.2.3.1. Détermination de l'activité caséinolytique en fonction de la concentration du venin

Les échantillons de venins natif et irradiés à des concentrations croissantes (0 à 0,13 UDO) sont additionnées à 1,9 ml de caséine à 1%, préalablement incubée pendant 10 min à 37°C. Après incubation du mélange réactionnel pendant 25 min à 37°C, un volume de 3 ml de TCA à 5% est ajouté au mélange afin d'arrêter la réaction enzymatique. Ces mélanges réactionnels sont ensuite centrifugés à 1000 g pendant 20 min et la densité optique du surnagent est mesurée à 280 nm.

III.2.2.2.3.2. Détermination de l'activité caséinolytique en fonction de la concentration du substrat

Après incubation d'une gamme de concentrations croissantes de caséine (0,5 à 9,5 mg/ ml) pendant 10 min à 37°C, les échantillons de venins à 0,1 UDO dans du tampon Tris-HCl 0,2 M, pH 7,2 sont rajoutés et le mélange réactionnel est incubé pendant 20 min à 37°C. La réaction est arrêtée par addition de TCA 5%. Après centrifugation à 1000 g pendant 20 min, la densité optique du surnagent est mesurée à 280 nm.

III.2. 2.2.4. Détermination de l'activité coagulante

Cette activité est déterminée selon la méthode de Quick 1935, par extrapolation sur une courbe standard exprimant la coagulation du fibrinogène en fonction de la quantité de thrombine additionné.

Après incubation de 500 µl de fibrinogène (0,3%) pendant 5 min à 37°C dans du tampon PBS 0,1 M, pH 7,4, des concentrations croissantes de thrombine sont ajoutées aux tubes. Le temps de coagulation est mesuré dès l'addition de la thrombine.

L'activité coagulante du venin est mise en évidence par l'addition des échantillons de venin natif ou de venins irradiés (21,6 UDO) à 500 µl de fibrinogène (0,3%) pré-incubé 5 min à 37°C. Le temps d'apparition du caillot est mesuré.

III.2.2.2.5. Détermination de l'activité phospholipasique

Cette activité est mise en évidence en utilisant la méthode de Cesari et Boquet (1935) modifiée par Laraba-Djebari et Martin-Eauclaire (1990). Elle repose sur l'hémolyse indirecte des globules rouges.

Les échantillons de venin natif et de venins irradiés à 0,1 UDO, dans un tampon Phosphate 0,13M, pH 7, sont mis en présence de lécithine à 1%. Après incubation pendant 1 heure à 37°C, un volume de 1 ml globules rouges dilués au 1/20 est ajouté puis incubé pendant 30 min à 4°C. L'hémolyse des globules rouges est observée après centrifugation des mélanges à 1000 g pendant 15 min.

III.2.3. Implications de l'irradiation gamma sur les activités biologiques du venin de *Cerastes cerastes*

III.2.3.1. Evaluation de la toxicité résiduelle après irradiation gamma du venin

L'évaluation de l'effet de l'irradiation gamma sur la toxicité, est réalisée en injectant à des souris (20 ± 2 g de masse corporelle) par voie intra péritonéale, des doses croissantes de venin irradié (3 à 10 DL50). Le développement de signes pathologiques ou de mortalité est observé pendant 48 heures.

III.2.3.2. Evaluation de l'activité hémorragique du venin natif et des venins irradiés

L'activité hémorragique est déterminée selon la méthode de Kondo *et al* (1960). Des lots de 4 souris reçoivent par voie intradermique (i.d.) des injections de doses croissantes des

venins, natifs et irradiés, allant de 5 à 320 µg, à raison de 100 µl/souris. Le lot de souris témoins reçoivent 100 µl de NaCl 0,15 M. Les souris sont sacrifiées deux heures après l'injection, la peau présentant un halo hémorragique est prélevée et les diamètres perpendiculaires les plus longs sont mesurés.

La dose minimale hémorragique (DMH) est définie comme étant la dose de venin qui injectée par voie i.d. induit une lésion hémorragique de 10 mm de diamètre sur la surface interne de la peau de souris (Gutiérrez *et al* ; 1980, OMS ; 1983). La DMH du venin de *Cerastes cerastes* est déterminée par extrapolation sur une courbe donnant le logarithme du diamètre moyen du halo hémorragique en fonction de la dose de venin injectée.

III.2.3.3. Détermination de l'activité dermonécrotique du venin de *Cerastes cerastes* avant et après irradiation gamma

III.2.3.3.1. Mise en évidence d'une activité dermonécrotique du venin natif : test macroscopique

La détermination de l'activité dermonécrotique est effectuée selon la méthode de Theakston et Reid (1983). Des doses de venin allant de 10 à 40 µg sont injectées par voie i.d. sur la peau dorsale à des lots de 4 souris. Les souris sont sacrifiées après 72 heures, la peau dorsale est prélevée et les diamètres de la lésion nécrotique sont mesurés.

III.2.3.3.1.1. Estimation de la dose minimale nécrotique (DMN)

La DMN est définie comme étant la plus petite quantité de venin, qui injectée par voie i.d. entraîne une lésion nécrotique de 5 mm de diamètre sur la surface interne de la peau de l'animal (Theakston et Reid 1983). Elle est déterminée par extrapolation sur une courbe donnant le logarithme du diamètre moyen de la lésion nécrotique en fonction de la dose de venin injectée.

III.2.3.3.2. Mise en évidence d'une activité dermonécrotique du venin natif : approche histologique

Cette étude est réalisée en injectant à un lot de 4 souris, par voie i.d. une dose sublétales de venin natif (30 µg/20 g de masse corporelle de souris). La peau dorsale est prélevée après 72 heures, le spot nécrotique est découpé en vue de l'étude histologique. Les pièces de peau sont fixées dans du formaldéhyde à 4%, pendant 48 heures puis déshydratées dans des bains

croissants d'éthanol. Après inclusion dans de la paraffine puis réhydratation dans des bains décroissants d'alcool, des coupes de 5 μ m d'épaisseur sont colorées à l'éosine-hématoxyline.

III.2.3.3.3. Effets de quelques inhibiteurs sur l'activité dermonécrotique du venin de *Cerastes cerastes*

Le but de cette étude est de déterminer l'effet de deux inhibiteurs protéasiques sur l'activité dermonécrotique du venin de *Cerastes cerastes*: le Na₂EDTA qui inhibe les métalloprotéinases et le PMSF qui agit sur les sérine protéinases.

Les échantillons de venin natif (30 μ g/20 g de masse corporelle de souris) sont incubée pendant 1 heure à 37°C avec différentes concentrations d'inhibiteurs (Na₂EDTA : 5, 20, 40 mM, PMSF : 0,1, 0,3 et 0,5 mM). Des volumes de 100 μ l de ces solutions sont injectés par voie i.d. à des lots de 4 souris. Les lots témoins reçoivent 30 μ g de venin seul, l'inhibiteur seul, ou 100 μ l de NaCl 0,15 M. Les souris sont sacrifiées après 72 heures, la peau dorsale est prélevée et les diamètres de la lésion nécrotique sont mesurés.

III.2.3.3.4. Effet de quelques anti-inflammatoires sur l'activité dermonécrotique du venin de *Cerastes cerastes*

Afin d'examiner l'implication d'une réponse inflammatoire lors de la dermonécrose, l'effet de quelques anti-inflammatoires, agissant à différents niveaux lors de processus inflammatoires, est testé. Des lots de 4 souris (20 ± 2 g) reçoivent par voie i.p. un volume de 100 μ l d'une solution contenant des doses croissantes de dexaméthasone ($2,54 \cdot 10^{-5}$, $5,09 \cdot 10^{-5}$, $10,19 \cdot 10^{-5}$ et $15,28 \cdot 10^{-5}$ M), de pentoxifylline ($0,5 \cdot 10^{-3}$, $2,5 \cdot 10^{-3}$, $2,9 \cdot 10^{-3}$ et $3,5 \cdot 10^{-3}$ M) ou d'indométacine ($0,7 \cdot 10^{-3}$, $1,67 \cdot 10^{-3}$, $2,78 \cdot 10^{-3}$, $3,48 \cdot 10^{-3}$ M). Après 30 min, ces souris reçoivent une injection dorsale d'un volume de 100 μ l d'une solution contenant 30 μ g du venin de *Cerastes cerastes*. Le traitement anti-inflammatoire est renouvelé après 36 heures d'envenimation afin de maintenir l'inhibition de la libération des cytokines. Les souris sont sacrifiées après 72 heures, la peau dorsale est prélevée et les diamètres de la lésion nécrotique sont mesurés.

III.2.3.3.5. Evaluation de l'activité dermonécrotique des venins irradiés

L'activité dermonécrotique des venins irradiés à 1 et 2 kGy est déterminée en injectant à des lots de 4 souris par voie i.d. une dose de 96 µg de venin irradié. Les peaux dorsales de souris sont prélevées, après 72 h, afin d'évaluer les effets nécrotiques des venins.

III.2.4. Implications de l'irradiation gamma sur les propriétés immunologiques du venin de *Cerastes cerastes*

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

III.2.4.1. Préparation des immun-sérums

Afin de préparer l'immun-sérum anti-venin natif, deux lapins reçoivent six injections par voie sous cutanée (s.c.) de venin natif (Cc_n). Les doses injectées sont 150, 200, 250, 300, 350 et 400 µg de venin dissout dans du NaCl 0,15 M, respectivement aux jours : 1, 8, 15, 22, 29 et 36.

Pour la préparation des anti-venins irradiés, les lapins (deux lapins/échantillon de venin) reçoivent des injections s.c. de 500, 700, 800, 900, 950 et 1000 µg de venin irradié (Cc_{i1} ou Cc_{i2}), selon le même calendrier.

L'adjuvant complet de Freund est utilisé pour la première immunisation alors que l'adjuvant incomplet de Freund est utilisé pour la deuxième et troisième injection. Les lapins sont sacrifiés au bout du 40^{ème} jour d'immunisation. Les immun-sérums sont récupérés, aliquotés et conservés à -20°C

III.2.4.1.1. Détermination des titres anticorps des immun-sérums par ELISA simple

La microplaque est sensibilisée avec le venin natif à 5 µg/ml dissout dans du tampon carbonate 0,1 M pH 9,6 et est incubée pendant une 1 heure à 37°C puis une nuit à +4°C. Après saturation des sites non spécifiques, pendant 2 heures à 37°C, avec de la BSA à 3% dans du PBS 0,1 M pH 7,4, des dilutions de 1/2 en 1/2 des anti-venin natif (anti- Cc_n) et anti-venins irradiés (anti- Cc_{i1} et anti- Cc_{i2}) sont effectuées dans du tampon PBS 0,1 M pH 7,4. La réaction est incubée pendant 1 heure à 37°C puis une nuit à + 4°C.

Après une série de lavages avec du PBS-Tween 20 à 0,05%, le conjugué anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase (Sigma St Louis, Missouri, USA) est déposé dans tous les puits et la microplaque est incubée pendant une 90 min à 37°C. La réaction enzymatique se développe à l'obscurité à température ambiante pendant 10 minutes, après addition du substrat (10 mg ABTS dans 10ml de tampon citrate pH 5 + 100 µl d'H₂O₂ à 30%) puis est arrêtée avec le H₂SO₄ 2N. La densité optique est mesurée à 405 nm à l'aide d'un lecteur ELISA (Sanofi-Pasteur).

III.2.4.1.2. Détermination de l'immunoréactivité des immun-sérums par western-blot

Le venin natif soumis à une électrophorèse sur un gel à 20% de polyacrylamide est transféré sur une feuille de Nitrocellulose 0.45 µm (NC) sur Phast System (Pharmacia Co., Uppsala, Suède). La feuille de NC est coupée en bandelettes. Chaque bandelette est incubée, après saturation, avec l'un des immun-sérums de lapin produit contre le venin natif ou les venins irradiés, dilués au 1:100 dans du lait écrémé à 5% dans du PBS, pendant 1 heure à température ambiante. Après une série de lavages dans du PBS-0.1% Tween 20, les bandelettes sont incubées pendant 1 heure à température ambiante avec le conjugué anti- IgG de lapin (Sigma St Louis, Missouri, USA). Après un dernier cycle de lavages, les blots sont incubés à l'ombre et à température ambiante, en présence du substrat contenant de l'α-Chloronaphtol. Un lavage extensif des blots est effectué à l'eau distillée afin d'arrêter la réaction enzymatique.

III.2.4.2. Etude de la capacité neutralisante des anti-venins natif et irradiés de *Cerastes cerastes*

III.2.4.2.1. Evaluation de la toxicité résiduelle en présence d'immunothérapie

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

Les échantillons de venin natif à des doses allant de 2 à 9 DL₅₀ sont mélangées avec des volumes de 100, 125 et 150 µl de différentes préparations d'immun-sérums expérimentaux anti-venin natif et anti-venins irradiés (anti-Cc₁1 et anti-Cc₂2) et les solutions obtenues sont incubées 1 heure à 37°C. Des lots de 4 souris reçoivent des injections i.p. de ces mélanges (100 µl/souris). Les souris témoins reçoivent un mélange de sérum normal de lapin et de venin natif. Le développement de signes pathologiques ou de mortalité est observé pendant les 48 heures suivant l'injection.

III.2.4.2.2. Evaluation de l'activité hémorragique résiduelle en présence d'immunothérapie

Afin d'évaluer la capacité neutralisante des immun-sérums sur l'activité hémorragique du venin de *Cerastes cerastes*, des échantillons de venin natif allant de 5 à 320 µg/20 g de masse corporelle de souris sont mélangées à 150 µl d'immun-sérum de lapin anti-venin natif ou anti-venins irradiés. Après incubation 1 heure à 37°C, des lots de 4 souris reçoivent des injections i.d. des mélanges obtenus. Les souris témoins reçoivent une injection d'un mélange de venin natif et de sérum normal de lapin. Les souris sont sacrifiées après 2 heures et la peau dorsale prélevée en vue de mesurer les diamètres perpendiculaires, les plus longs, de la lésion hémorragique.

III.2.4.2.3. Evaluation de l'activité dermonécrotique résiduelle en présence d'immunothérapie

La capacité neutralisante des immun-sérums sur l'activité dermonécrotique est évaluée par un test in vivo effectué chez la souris. Les immun-sérums expérimentaux de lapins produits contre le venin natif et les venins irradiés (100, 150 et 200 µl) sont incubés en présence de 40 µg de venin natif pendant 90 minutes à 37°C. Des lots de 4 souris reçoivent une injection i.d. de 100 µl de la solution résultante. Les souris sont sacrifiées après 72 heures et la peau dorsale est prélevée afin d'évaluer l'action nécrotique du venin.

Résultats & Discussion

IV- Résultats et discussion

Les venins de *Viperidae* sont des mélanges complexes de molécules toxiques et non toxiques. Ces substances induisent des lésions au niveau du site de la morsure, mais également des effets toxiques systémiques pouvant être létaux. L'immunothérapie reste le seul traitement efficace des envenimations ophidiennes. Les anti-venins utilisés sont constitués de fragments $F(ab')_2$ produits après hyperimmunisation de chevaux. Ces animaux subissent alors les effets toxiques du venin, ce qui conduit à une altération de l'état physique général. L'état physique de l'animal producteur peut diminuer l'efficacité du système immunitaire entraînant ainsi une réduction de la qualité des anti-venins produits.

Le venin utilisé dans cette étude est celui de *Cerastes cerastes*, il présente une toxicité élevée avec une DL_{50} de 48 $\mu\text{g}/20\text{ g}$ de masse corporelle de souris. Ce venin provoque de l'œdème, de l'hémorragie, de même qu'il présente des activités toxiques sur le muscle squelettique, les tissus myocardique, hépatique et néphrotique (Abib 2002 ; Abib et Laraba-Djebari., 2003 ; Chérifi 2004).

L'immunothérapie est le seul traitement efficace de l'envenimation ophidienne. Lors de la préparation des anti-venins, les animaux producteurs subissent les effets létaux des composants du venin, réduisant ainsi l'efficacité de leur système immunitaire à produire des anticorps hautement neutralisants.

Afin d'atténuer le venin de *Cerastes cerastes*, celui ci est soumis à une irradiation gamma au ^{60}Co . Deux doses de radiations ont été utilisées : 1 kGy (Cc₁) et 2 kGy (Cc₂), avec un débit de dose de 4,25 Gy/min.

IV.1. Effet de l'irradiation gamma sur les propriétés biochimiques des venins irradiés

La caractérisation biochimique des venins irradiés a porté sur l'étude de l'influence des radiations ionisantes gamma sur les activités enzymatiques et sur le comportement électrophorétique des protéines du venin.

IV.1.1. Effet de l'irradiation gamma sur le comportement électrophorétique du venin de *Cerastes cerastes*

Afin d'examiner les effets de l'irradiation gamma sur les propriétés biochimiques des venins irradiés de *Cerastes cerastes*, les différents échantillons ont été soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

L'analyse électrophorétique par SDS-PAGE montre un profil totalement modifié pour les venins irradiés comparativement au venin natif (Figure 12). Le venin natif présente 9

bandes polypeptidiques ayant des masses moléculaires allant de 174 ; 105 ; 95,5 ; 94 ; 70 ; 67 ; 57,54 ; 43 à 14,5 kDa. Les venins irradiés quant à eux présentent une nette diminution du nombre de bandes polypeptidiques. En effet le venin irradié à 1 kGy présente 4 bandes de 105 ; 94 ; 43 et 14,5 kDa, alors que celui irradié avec une dose de 2 kGy présente uniquement 2 bandes électrophorétiques de 105 et 14,5 kDa. Ces venins irradiés montrent également un « smir » qui pourrait provenir d'une dégradation polypeptidique. Certaines bandes sont restées au point de dépôt des échantillons ce qui serait le résultat d'une agrégation des protéines sous l'effet de l'irradiation gamma et qui provoquerait une élévation de la masse moléculaire, ce qui empêcherait ces molécules de traverser les mailles du gel de polyacrylamide. Les travaux de Abib (2002) et de Heffar et Laraba (2003) montrent aussi une modification du profil électrophorétique des protéines des venins de *Cerastes cerastes* et *Vipera lebetina* après irradiation gamma. Les radiations gamma semblent agir sur la solubilité des peptides et des protéines. Spencer (1996) a montré que l'irradiation du venin de *Bothrops jararacussu* induit une modification des profils électrophorétiques et chromatographiques, suggérant l'apparition de nouvelles espèces moléculaires. Ces espèces moléculaires seraient des agrégats solubles ou insolubles de protéines du venin et/ou des complexes covalents de fragments de protéines formés sous l'effet des radicaux libres. L'irradiation gamma du venin de *Crotalus durissus terrificus* a conduit également à la formation d'agrégats solubles et non solubles (Clissa et al., 1999). Il a été également rapporté une réduction du nombre de bandes polypeptidiques lors de l'analyse électrophorétique des protéines myofibrillaires et sarcoplasmiques de bovin irradiées au ^{60}Co (Lee et al., 2000).

IV.1.2. Evaluation des activités enzymatiques du venin natif et des venins irradiés

IV.1.2.1. Détermination des activités protéolytiques

L'étude des activités protéolytiques est réalisée sur des substrats naturels (caséine) ou synthétiques (BAEE ou CBZ). La détermination des paramètres cinétiques est effectuée en maintenant constante la concentration du venin et variable celle du substrat. L'allure des courbes obtenus pour les trois activités protéolytiques testées (arginine ester hydrolase, amidolytique et amidolytique) montre qu'il s'agit de cinétiques michaeliennes (Figures 2A, 3A et 4A).

Le BAEE est un substrat synthétique hydrolysé par les protéinases de venin ayant une activité arginine ester hydrolase. Le venin natif de *Cerastes cerastes* présente une activité protéolytique sur le BAEE avec une vitesse maximale ($V_{\max}$) de $1,29 \cdot 10^{-2}$ DO/min et une

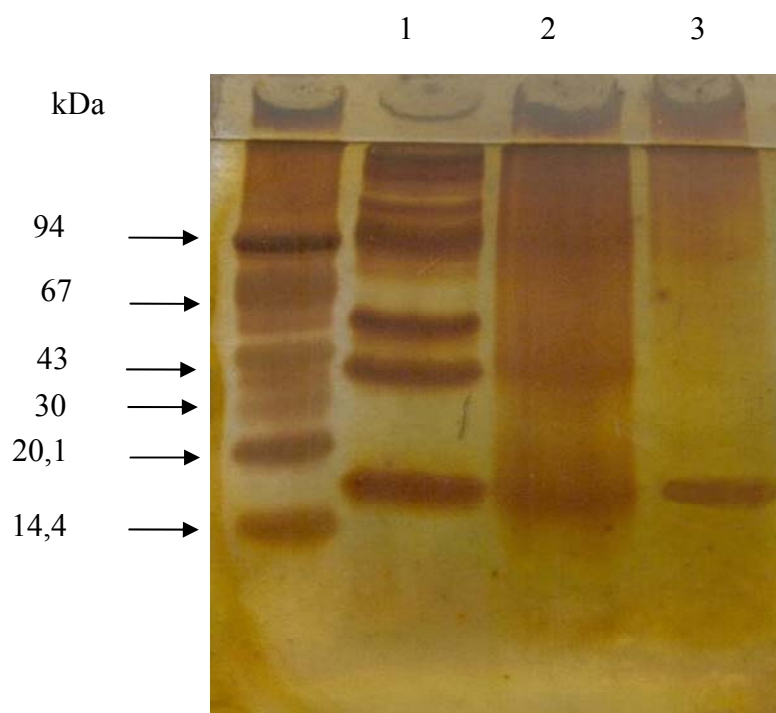


Figure 12: Analyse électrophorétique du venin natif de *Cerastes cerastes* (piste 1) et des venins irradiés à 1 kGy (piste 2) et à 2 kGy (piste 3) sur gel de polyacrylamide à 20% en présence de SDS. Les marqueurs de poids moléculaires sont la phosphorylase b 94 kDa, la sérum albumine bovine 67 kDa, l'ovalbumin 43 kDa, l'anhydrase carbonique 30 kDa, soybean trypsin inhibitor 20,1 kDa et l' α lactalbumin 14,4 kDa.

valeur de la constante de Mickaelis-Menten (k_M) de $0,2 \cdot 10^{-4}M$ (Tableau VII). Les venins irradiés à 1 et 2 kGy montrent une réduction de la vitesse maximale ($1,11 \cdot 10^{-2}$ et $0,9 \cdot 10^{-2}$ DO/min) et une augmentation de la constante k_M ($0,27 \cdot 10^{-4}$ et $0,32 \cdot 10^{-4}M$) respectivement, ce qui indique une réduction de l'activité arginine ester hydrolase de ces venins. La réduction de cette activité est fonction de la dose d'irradiation reçue par le venin. Cette diminution est d'autant plus importante que la dose d'irradiation est plus élevée (Figure 13).

Le venin irradié à 2 kGy présente des paramètres cinétiques inférieurs à ceux du venin irradié à 1 kGy (Tableau VII). Les résultats obtenus semblent indiquer une diminution de l'affinité de l'enzyme pour son substrat du fait de l'augmentation du k_M . L'activité catalytique (V_{max}/k_M) de l'enzyme subit une réduction de 36,28 et 44% pour respectivement les venins irradiés à 1 et 2 kGy, comparativement au venin natif. Ces résultats suggèrent une altération structurale de l'enzyme sous l'effet des rayons gamma à l'origine d'une inactivation partielle de l'enzyme.

Tableau VII : Paramètres cinétiques des activités enzymatiques du venin natif et des venins irradiés de *Cerastes cerastes*.

Paramètres cinétiques	Activités enzymatiques								
	Arginine ester hydrolase			Amidolytique			Caséinolytique		
	Cc_n	Cc_{i1}	Cc_{i2}	Cc_n	Cc_{i1}	Cc_{i2}	Cc_n	Cc_{i1}	Cc_{i2}
V_{max}	1,29	1,11	0,9	1,66	1,25	0,47	5,5	4,2	3,8
k_M	0,2	0,27	0,32	2	2,63	3,33	0,6	0,7	0,74
V_{max}/k_M	6,45	4,11	2,81	0,83	0,47	0,14	9,16	6,0	5,13
Pourcentage d'activité	100	63.72	43.56	100	56.6	16.86	100	65.50	56.00

Les valeurs de la V_{max} sont données en 10^{-2} DO/min et les valeurs de k_M en 10^{-4} M, 10^{-2} mg/ml et en mg/ml pour respectivement les activités arginine ester hydrolase, amidolytique et caséinolytique.

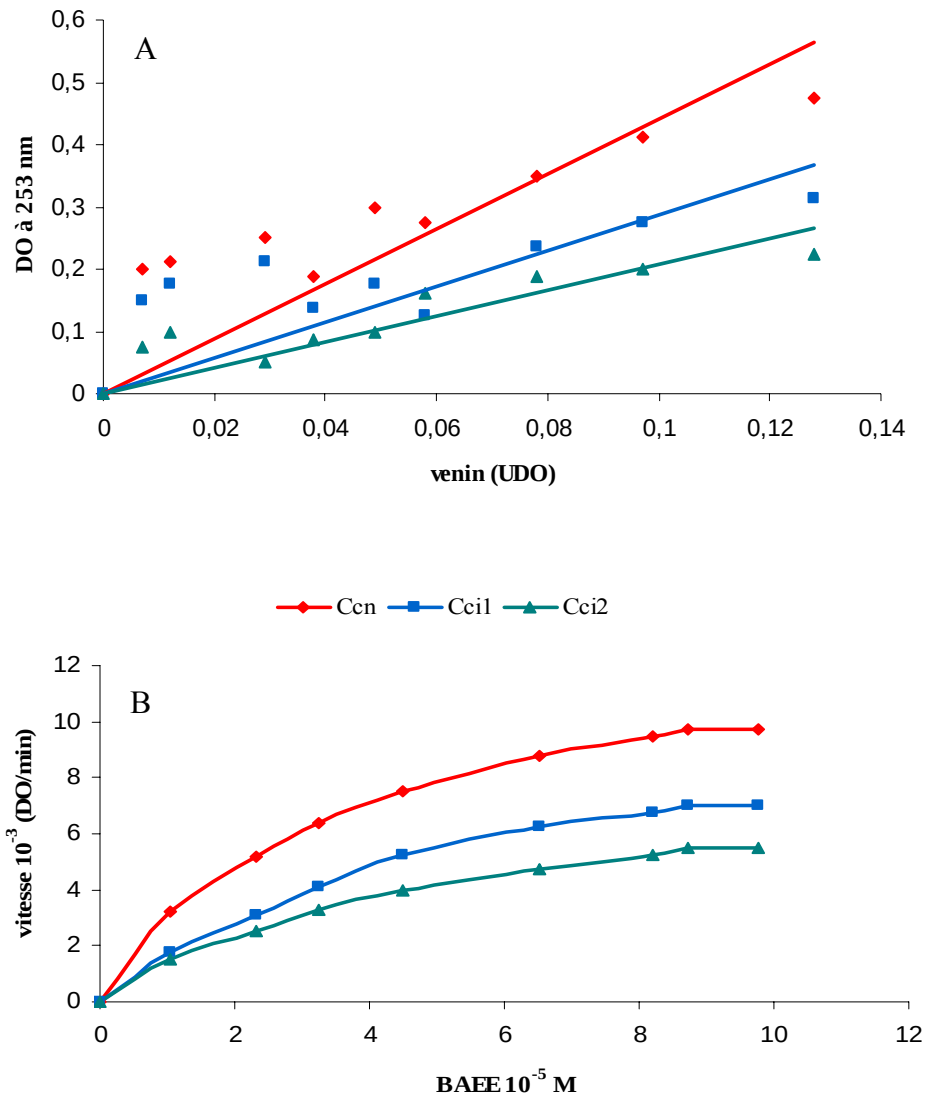


Figure 13 : Détermination de l'activité arginine ester hydrolase du venin natif et des venins irradiés de *Cerastes cerastes* en utilisant un substrat synthétique le benzoyl arginine ethyl ester hydrochloride (BAEE). **A** : Activité arginine ester hydrolase en fonction de la concentration des venins natif et irradiés. **B** : Variation de la vitesse de la réaction des venins natif et irradiés en fonction de la concentration du BAEE. Ccn : venin natif, Cci1 : venin irradié à 1 kGy, Cci2 : venin irradié à 2 kGy.

Le CBZ est un substrat synthétique hydrolysé par les enzymes protéolytiques ayant une activité amidolytique. Les protéinases du venin natif de *Cerastes cerastes* hydrolysent ce substrat avec des paramètres cinétiques de $1,66 \cdot 10^{-4} \text{M}$ pour la $V_{\max}$ et de $2 \cdot 10^{-2} \text{ mg/m}$ pour le k_M . Les venins irradiés présentent une diminution de l'activité amidolytique caractérisée par une réduction de la $V_{\max}$ et une augmentation du k_M indiquant une diminution de l'affinité de l'enzyme pour son substrat (Tableau VII). La réduction de cette activité est fonction de la dose de rayonnements absorbés par les venins (Figure 14).

La caséine est hydrolysée par les protéinases de venin ayant une activité caséinolytique. Les enzymes du venin hydrolysent ce substrat naturel avec une vitesse maximale de $5,5 \cdot 10^{-2} \text{ DO/min}$ et une constante de Mickaelis-Menten de $0,6 \text{ mg/ml}$. Cette activité présente, également, une diminution dépendante de la dose d'irradiation à laquelle ont été soumis les échantillons de venins de *Cerastes cerastes* (Figure 15).

La réduction des paramètres cinétiques (vitesse maximale et constante d'affinité) des activités protéolytiques du venin de *Cerastes cerastes* semblent indiquer que l'irradiation gamma provoque des altérations structurales des enzymes. Ces altérations structurales, sous l'effet des radicaux libres, pourraient toucher le site actif entraînant une baisse de l'affinité de l'enzyme pour son substrat ou alors toucher la structure tridimensionnelle de l'enzyme, par rupture de ponts disulfures ou des liaisons hydrogène entraînant son inactivation partielle.

IV.1.2.2. Détermination de l'activité coagulante

L'activité coagulante du venin de *Cerastes cerastes*, exprimée en NIH/ml, a été testée sur le fibrinogène. Le venin de *Cerastes cerastes* présente une activité coagulante de $0,42 \text{ NIH/ml}$. Les venins irradiés à 1 et 2 kGy présentent une activité coagulante de $0,33$ et $0,19 \text{ NIH/ml}$, soit une réduction de 21,43 et 54,77 % respectivement (Tableau VIII). Les radicaux libres issus de l'hydrolyse de l'eau lors du processus de l'irradiation gamma semblent être à l'origine d'altérations structurales touchant les enzymes thrombine-like responsables de l'activité coagulante de venin de *Cerastes cerastes*.

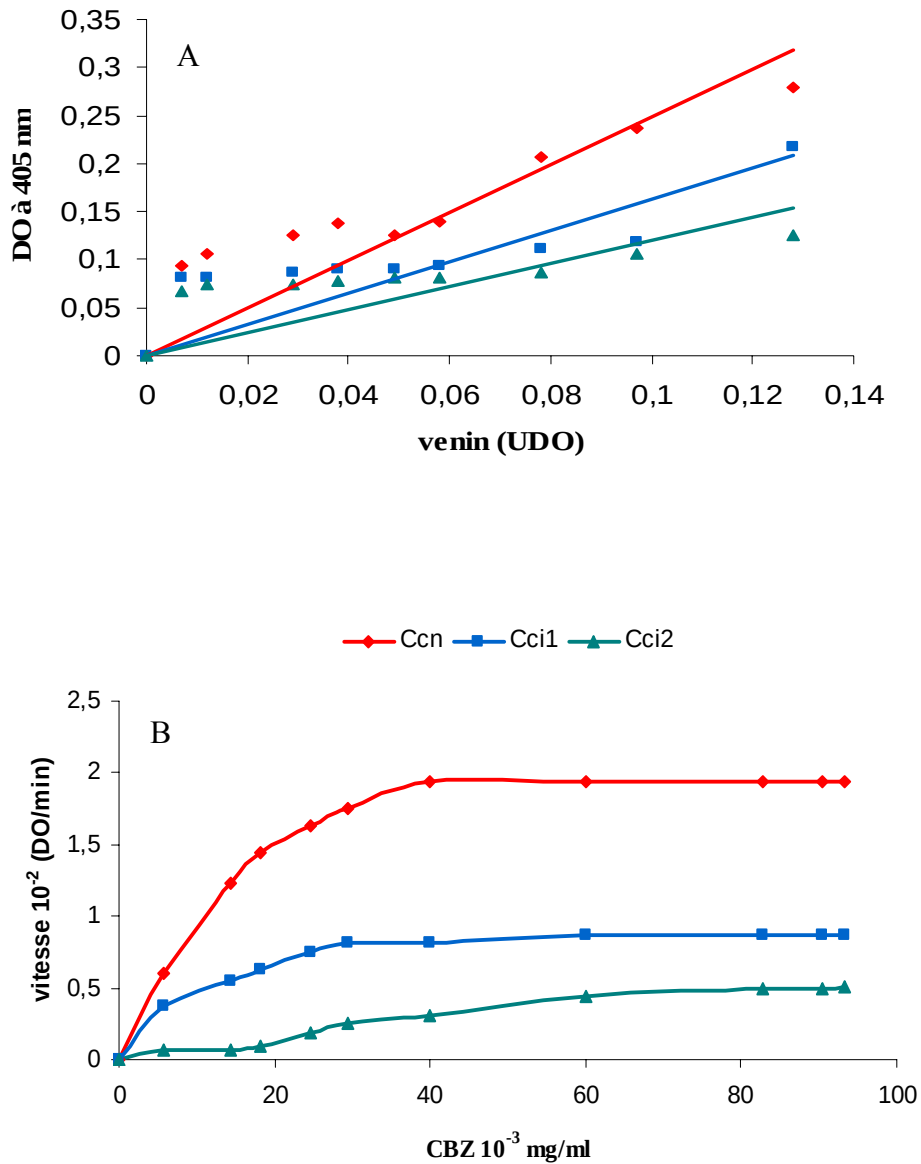


Figure 14 : Détermination de l'activité amidolytique du venin natif et des venins irradiés de *Cerastes cerastes* en utilisant un substrat synthétique le $N\alpha$ -CBZ-arginine-p-nitroanilide hydrochloride (CBZ). **A :** Activité amidolytique en fonction de la concentration des venins natif et irradiés. **B :** Variation de la vitesse de la réaction des venins natif (Ccn) et irradiés (Cci1 et Cci2) en fonction de la concentration du CBZ. Ccn : venin natif, Cci1 : venin irradié à 1 kGy, Cci2 : venin irradié à 2 kGy.

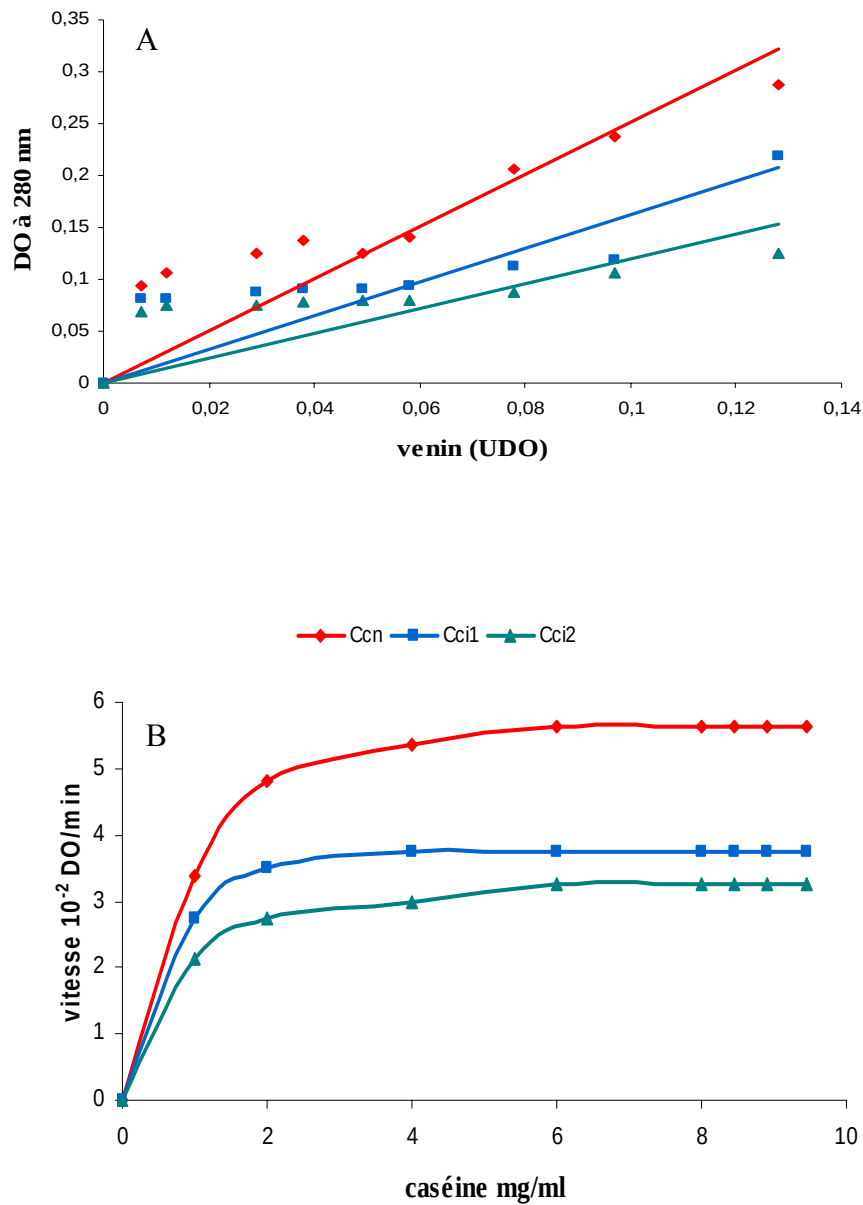


Figure 15: Détermination de l'activité caséinolytique du venin natif et des venins irradiés de *Cerastes cerastes* en utilisant un substrat naturel la caséine. **A** : Activité caséinolytique en fonction de la concentration des venins natif et irradiés. **B** : Variation de la vitesse de la réaction des venins natif et irradiés en fonction de la concentration de la caséine. Ccn : venin natif, Cci1 : venin irradié à 1 kGy, Cci2 : venin irradié à 2 kGy.

IV.1.2.3. Détermination de l'activité phospholipasique

L'analyse des différents échantillons de venin natif et de venins irradiés montrent une même activité phospholipasique. Cette activité ne subit aucune réduction sous l'effet des radiations ionisantes gamma. Les résultats obtenus semblent indiquer que les rayonnements gamma n'ont pas affecté l'intégrité structurale de cette enzyme. L'activité phospholipasique de *Cerastes cerastes* semble radio-résistante aux doses appliquées. Les travaux de Hati et al (1990) rapportent que l'activité phospholipasique du venin de la vipère *Vipera russelli* n'est influencée par les rayons gamma qu'à partir d'une dose élevée de 3 kGy. Cependant, les travaux de Heffar et Laraba-Djebari (2003) montrent que la l'activité phospholipasique du venin de *Vipera lebetina* est radiosensible aux doses de 1 et 2 kGy de rayons gamma.

Il semblerait, par ailleurs, que le débit de dose lors du processus de l'irradiation est un paramètre qui peut intervenir dans le degré d'inactivation des enzymes. L'irradiation gamma du venin de *Cerastes cerastes* à un débit de dose de 8 Gy/min ne produit pas les mêmes effets. En effet, les travaux de Abib (2002) ont montré que l'activité phospholipasique est radiosensible à une dose d'irradiation de 2 kGy. Ces résultats sont confortés par les travaux de Murata et al (1990) qui montrent que le débit de dose influence le degrés de détoxification. L'irradiation du venin de *Crotalus durissus terrificus* à une dose de 2 kGy avec un débit de 391 Gy/heure réduit de 2,7 fois sa toxicité, alors qu'un débit de 900 Gy/heure réduit sa toxicité d'un facteur de 5. Ces résultats semblent indiquer qu'à dose d'irradiation égale, plus le débit d'irradiation est élevé, plus importante est la détoxification.

Tableau VIII : Activité coagulante du venin natif et des venins irradiés de *Cerastes cerastes*.

Echantillon	Activité coagulante (NIH/ml)
Venin natif	0,42
Venin irradié à 1 kGy	0,33
Venin irradié à 2 kGy	0,19

IV.2. Effets de l'irradiation gamma sur les activités biologiques

IV.2.1. Toxicité résiduelle des venins irradiés

L'évaluation de la toxicité résiduelle des venins irradiés a été effectuée en injectant, à des souris, des doses de venin allant de 2 à 10 DL₅₀. Les résultats obtenus montrent que les venins irradiés ne provoquent aucune mortalité au bout de 48 heures d'observation, alors que l'injection de 2 DL₅₀ de venin natif tue la totalité des souris du lot. Ceci montre que l'irradiation gamma a abolie complètement l'activité toxique du venin de *Cerastes cerastes*.

Cette détoxification serait le résultat de l'effet des rayons gamma sur les composants toxiques du venin qui subissent des altérations structurales leur faisant perdre leurs activités toxiques. Ce résultat est en accord avec la caractérisation biochimique du venin irradié de *Cerastes cerastes* qui a montré une modification du comportement électrophorétique pouvant être le résultat de modifications structurales au sein des protéines du venin. L'irradiation gamma serait à l'origine d'altérations structurales conduisant ainsi à une perte d'activité enzymatique ou biologique et qui semblent affecter directement la toxicité du venin de *Cerastes cerastes*. L'altération de la structure native peut induire une baisse d'activité enzymatique (Heffar et Laraba-Djebari, 2003) ou une perte de reconnaissance des toxines vis-à-vis des cellules cibles (Spencer 1996, Spencer et al., 1997, Gallacci et al., 1998, Souza et al., 2002). Gallacci et al (2000) ont quant à eux établie une corrélation directe entre la perte de l'activité phospholipase A₂ de la crotoxine irradiée du venin de *Crotalus durissus terrificus* et sa détoxification.

D'autre part, la perte de toxicité pourrait être attribuée à une perte de reconnaissance des toxines pour leurs cibles cellulaires ou moléculaires (Gallacci et al., 1998). Ainsi, les travaux de Spencer 1996 et Spencer et al (1997) ont montré que l'irradiation gamma réduit l'effet paralysant et l'effet myotoxique du venin de *Bothrops jararacussu*. Les travaux de Abib et Laraba-Djebari (2003) ont aussi montré que l'irradiation gamma du venin de *Cerastes cerastes* induit une réduction considérable de la toxicité du venin sur le foie, le cœur et le poumon. Les travaux de Heffar et Laraba-Djebari (2003) portant sur le venin irradié de *Vipera lebetina* ont également montré une perte de toxicité sur les tissus musculaire, cardiaque, hépatique, pulmonaire et sur le rein.

IV.2.2. Activité hémorragique résiduelle des venins irradiés

La détermination de l'activité hémorragique des venins natif et irradiés est effectuée selon la méthode de Kondo et al (1960). Les résultats obtenus montrent que le venin natif de

Cerastes cerastes présente une forte activité hémorragique avec une DMH de 3,2 µg/20 g de souris. Les venins irradiés présentent une altération de cette activité. La réduction observée est fonction de la dose d'irradiation à laquelle a été soumis le venin. En effet, le venin irradié à une dose de 1 kGy présente une DMH de 17,06 µg/20 g de souris, alors que le venin irradié à la dose de 2 kGy présente une DMH égale à 780 µg/20 g de souris (Tableau IX). Ces résultats indiquent que les radiations ionisantes ont permis d'abolir l'activité toxique du venin, mais également, d'altérer les molécules responsables de l'activité hémorragique. En effet, il apparaît que le venin irradié à la dose de 2 kGy est 244 fois moins hémorragique que le venin natif. La dose de 2 kGy semble alors la plus indiquée pour neutraliser cette activité hémorragique. L'irradiation gamma a probablement affecté l'intégrité structurale des molécules hémorragiques, les rendant ainsi inactives. Plusieurs composants du venin sont impliqués dans l'activité hémorragique. Cette activité peut être le résultat de l'action des phospholipases, mais aussi des métalloprotéinases hémorragiques. Dans cette étude l'activité phospholipasique du venin de *Cerastes cerastes* semble ne pas être influencée par l'irradiation gamma. Il apparaît donc que l'activité hémorragique du venin de *Cerastes cerastes* est le résultat de l'action conjuguée de différentes molécules et qu'elle soit principalement due à l'action des hémorragines et de métalloprotéinases hémorragiques.

Tableau IX: Evaluation de l'activité hémorragique des venins natif et irradiés de *Cerastes cerastes* (La DMH est la dose minimale de venin induisant un halo hémorragique de 10 mm de diamètre).

Echantillon	DMH (µg/20 g de masse corporelle de souris)
Venin natif	3,2
Venin irradié à 1 kGy	17,06
Venin irradié à 2 kGy	780

IV.2.3. Evaluation de l'activité dermonécrotique des venins natif et irradiés

Le tableau clinique de l'envenimation ophidienne se caractérise par des lésions allant du site de la morsure jusqu'aux organes vitaux de l'organisme. La nécrose qui apparaît au bout de 2 à 4 jours peut conduire à l'ablation du membre mordu, quand cela est nécessaire, occasionnant ainsi des séquelles définitives. Cette partie du travail, a pour but d'abord de mettre en évidence l'activité dermonécrotique dans le venin de *Cerastes cerastes*, de la caractériser et enfin d'examiner l'effet de l'irradiation gamma sur cette activité biologique.

IV.2.3.1. Activité dermonécrotique du venin natif de *Cerastes cerastes*

IV.2.3.1.1. Estimation de la dose minimale nécrotique

L'évaluation de l'activité dermonécrotique du venin de *Cerastes cerastes* est réalisée selon la méthode de Theakston et Reid (1983), par injection aux souris (voie i.d.) de doses croissantes de venin. Le venin de *Cerastes cerastes* montre une activité dermonécrotique au niveau de la face interne de la peau dorsale des souris (Figure 16). L'activité dermonécrotique observée après envenimation se présente sous forme d'un halo noirâtre, rugueux et non translucide lorsque la peau est placée contre une surface lumineuse. Ce spot nécrotique est entouré d'un halo hémorragique.

L'activité dermonécrotique du venin de *Cerastes cerastes* est dépendante de la dose de venin injecté (Figure 17). La DMN, estimée selon la méthode de Theakston et Reid (1983) est égale à 19 µg/20 g de masse corporelle de souris (Figure 18).

Le venin de la vipère *Cerastes cerastes*, comme de nombreux venins de *Viperidae*, induit un syndrome nécrosant qui peut s'expliquer, d'une part par l'action des métalloprotéinases qui dégradent les composants de la matrice extracellulaire, des phospholipases A₂ qui induisent une lyse cellulaire suite à l'hydrolyse des phospholipides membranaires mais aussi par l'action des hémorragines qui créent des conditions ischémiques au niveau du site de l'envenimation.

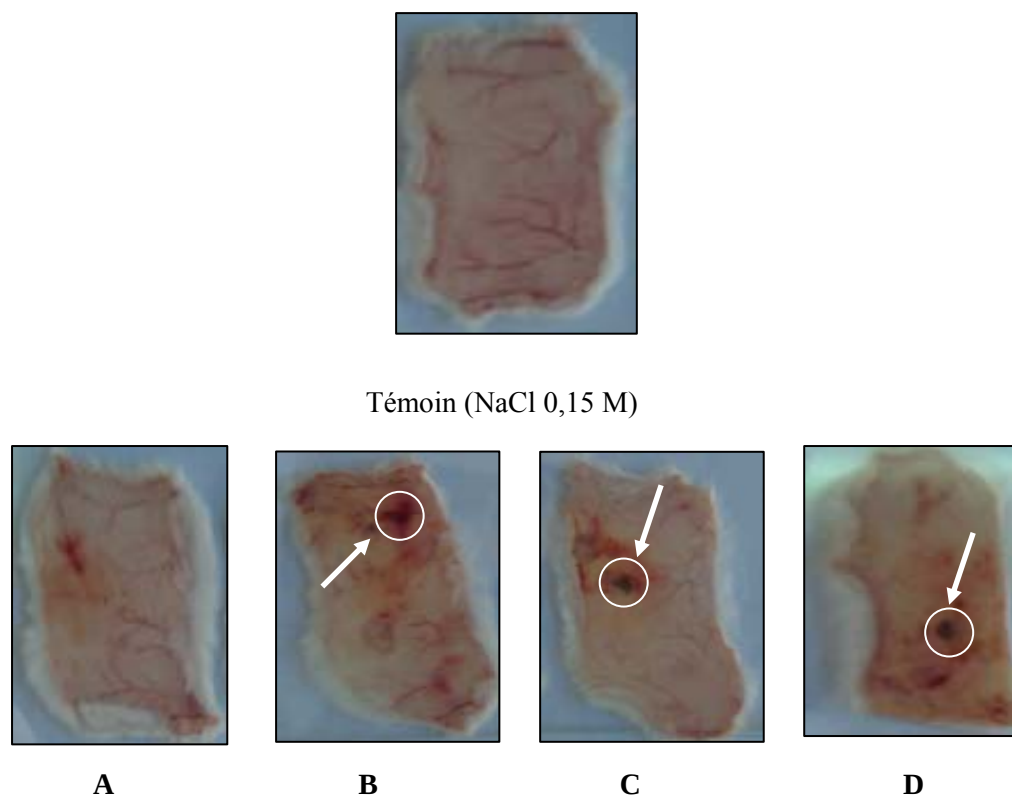


Figure 16 : Activité dermonécrotique après injection par voie intradermique (i.d.) du venin de *Cerastes cerastes*.

A – 10 µg de venin

B – 20 µg de venin

C – 30 µg de venin

D – 40 µg de venin

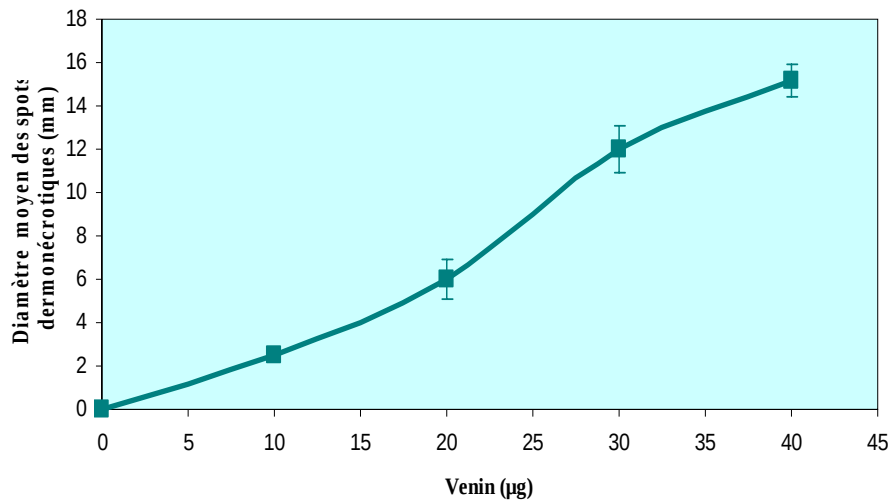


Figure 17 : Détermination de l'activité dermonécrotique du venin de *Cerastes cerastes* : Variation du diamètre moyen du spot nécrotique en fonction de la dose de venin injectée.

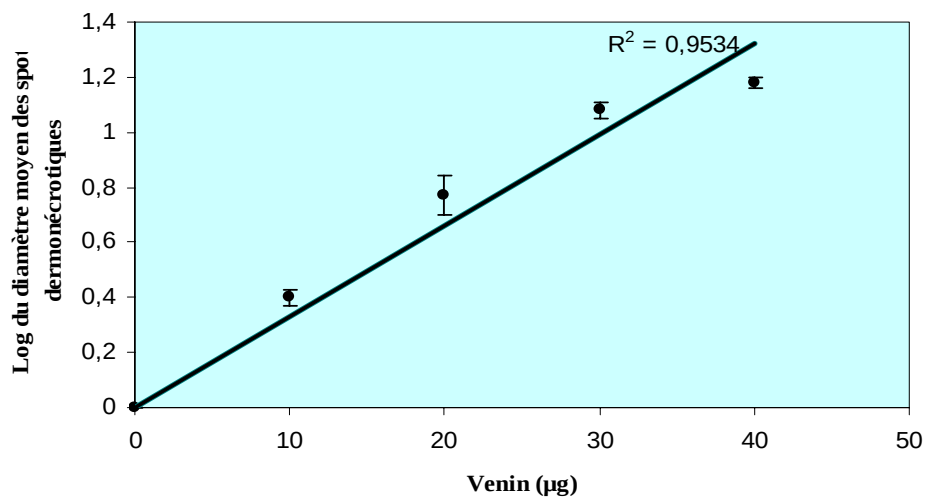


Figure 18 : Détermination de l'activité dermonécrotique du venin de *Cerastes cerastes* : Variation du logarithme du diamètre moyen de la lésion nécrotique en fonction de la dose de venin injectée.

IV.2.3.1.2. Etude histopathologique de l'activité dermonécrotique du venin natif de *Cerastes cerastes*

Afin d'observer les altérations structurales provoquées par le venin de *Cerastes cerastes*, une étude histologique des peaux de souris envenimées a été entreprise.

L'injection du venin de *Cerastes cerastes* par voie i.d. aux souris a induit la formation de lésions nécrotiques sur la surface interne de la peau dorsale, visibles à l'œil nu. L'observation microscopique de la peau des souris témoins (témoin NaCl 0,15 M) montre une structure normale constituée d'un épiderme mince contenant des mélanocytes, recouvert d'une couche lâche de kératine et d'un derme bien organisé et vascularisé avec une zone papillaire et réticulaire bien distinctes. Les coupes histologiques de la peau des souris envenimées montrent un aspect complètement désorganisé avec de profondes altérations structurales.

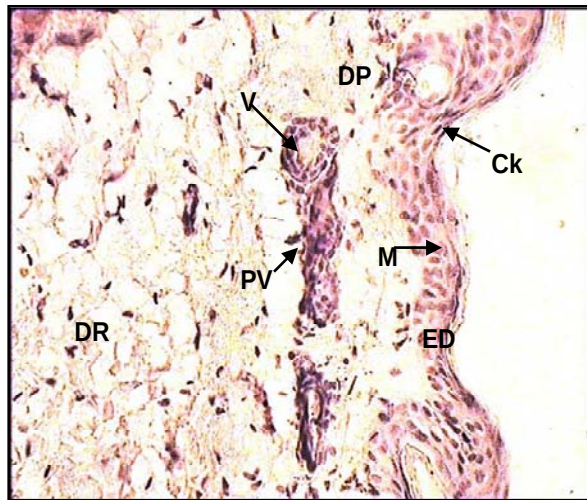
En effet les coupes histologiques montrent un épaissement et un brunissement de l'épiderme, qui serait dû notamment à une infiltration par les mélanocytes. L'épiderme présente également des zones de rupture avec une structure nécrotique.

L'œdème apparaît au niveau du derme et de la jonction épidermo-dermique. Des aires hémorragiques sont également observées au niveau du derme, ainsi qu'une congestion des vaisseaux. Il est aussi observé une rupture des follicules pileux. Les polynucléaires et les macrophages sont également présents au niveau des régions altérées, indiquant une infiltration inflammatoire (Figure 19).

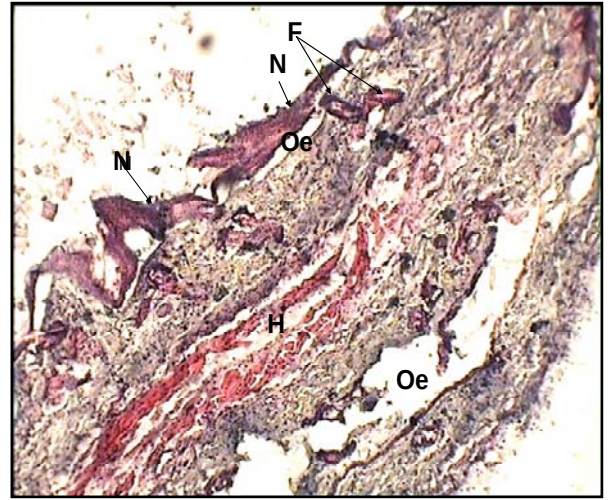
Les altérations histologiques induites au niveau de la peau des souris envenimées, sont semblables à celles décrites par Peichoto et al (2004) pour la salive du cobra *Philodryas patagoniensis*. Ces auteurs rapportent la présence au niveau de la face interne des peaux de souris de lésions dermonécrotiques entourées d'un halo hémorragique. L'étude histologique de ces lésions a montré une désintégration complète de l'épiderme alors que l'hémorragie, la nécrose ainsi qu'une infiltration inflammatoire ont été observés au niveau du derme.

IV.2.3.1.3. Effet de deux anti-protéasiques sur l'activité dermonécrotique

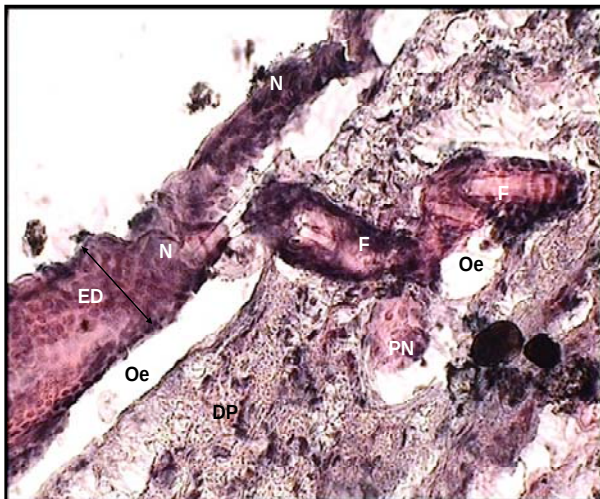
L'activité dermonécrotique des venins de *Viperidae* est le résultat de l'action de différents composants du venin touchant principalement l'intégrité des tissus et des cellules. Les molécules qui y sont impliquées sont essentiellement des protéinases et des phospholipases (Kamiguti et al., 1996 ; Gutiérrez et Rucavado, 2000). En vue d'analyser la classe des molécules impliquées dans l'activité dermonécrotique du venin de *Cerastes cerastes*, des inhibiteurs protéasiques ont été utilisés. Le Na₂EDTA, un chélateur de métaux,



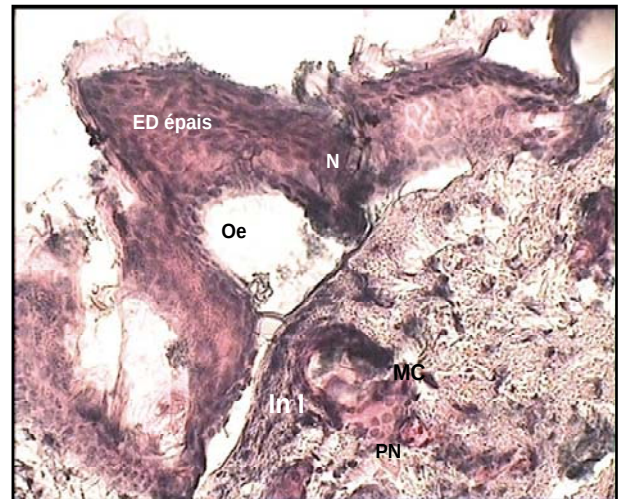
Témoin NaCl 0,15 M
G X 400



Peau de souris envenimée
G X 100



Peau de souris envenimée
G X 400



Peau de souris envenimée
G X 400

Figure 19: Activité dermonécrotique 3 jours après injection du venin de *Cerastes cerastes*. La coloration des coupes est effectuée avec de l'hématoxyline-éosine.

Ck : Couche kératinisée. **DP :** Derme papillaire. **DR :** Derme réticulaire. **ED :** Epiderme. **F :** Follicule pileux. **H :** Hémorragie. **In I :** Infiltration inflammatoire. **M :** Mélanocytes. **Mc :** Macrophage. **N :** Nécrose. **Oe :** Œdème. **PN :** Polynuclée. **PV :** Plexus vasculaire. **V :** Vaisseau sanguin.

inhibe les métalloprotéinases et le PMSF, inhibiteur agissant sur les sérine protéinases.

IV.2.3.1.3. 1. Effet du Na₂EDTA sur l'activité dermonécrotique du venin de *Cerastes cerastes*

Afin d'examiner l'effet du Na₂EDTA sur l'activité dermonécrotique, des mélanges de ce chélateur avec le venin natif de *Cerastes cerastes* ont été injectés aux souris par voie intradermique.

Les résultats obtenus montrent une nette régression de l'activité dermonécrotique et hémorragique du venin de la vipère en fonction de la concentration de Na₂EDTA, avec une réduction de plus de 80% à partir de 5 mM de cet inhibiteur. Le Na₂EDTA permet d'éliminer complètement l'activité dermonécrotique du venin de *Cerastes cerastes* à la concentration de 40 mM. Ces résultats semblent indiquer une forte implication des métalloprotéinases du venin de *Cerastes cerastes* dans cette activité biologique (Figures 20 et 21). Ces résultats sont en accord avec les travaux de Rucavado et al (2000) montrant une inhibition de l'activité dermonécrotique du venin de *Bothrops asper* par le CaNa₂EDTA. Watanabe et al (2003) ont également montré que la métalloprotéinase BaP1 du venin de *Bothrops asper* exerce plusieurs activités provoquant l'hémorragie, la nécrose tissulaire, l'altération des mécanismes hémostatiques, et cela notamment en inhibant l'agrégation plaquettaire induite par le collagène, entraînant de nombreux dommages tissulaires. Peichoto et al (2004) ont rapporté que l'activité dermonécrotique provoquée par la salive du cobra *Philodryas patagoniensis* est complètement inhibée en présence du Na₂EDTA ce qui suggère que cette activité biologique dépend des métalloprotéinases.

IV.2.3.1.3. 2. Effet du PMSF sur l'activité dermonécrotique du venin de *Cerastes cerastes*

Afin d'examiner l'implication des sérine protéinases dans la dermonécrose, des mélanges de venin natif et de cet inhibiteur ont été injectés par voie intradermique à des souris. Les résultats obtenus montrent que le PMSF induit une réduction partielle de l'activité dermonécrotique. Cette réduction est de 70 % à la concentration de 0,5 mM de PMSF avec persistance de l'activité hémorragique (Figures 22 et 23). Il est à noter que le PMSF est lui-même hémorragique tel qu'il est constatée sur les prélèvements de peaux de souris du lot de témoins PMSF. Les résultats obtenus semblent indiquer une participation de certaines sérine protéinases dans l'activité dermonécrotique du venin de *Cerastes cerastes*. Certaines sérines protéinases ont une activité thrombine-like et agissent sur l'agrégation des plaquettes (El Asmar et al, 1995) et provoquent la fibrinolyse de la fibrine (Samel et al, 2002). Elles peuvent

être β fibrinogénase, activatrices du facteur V, de la protéine C et du plasminogène. En perturbant les mécanismes hémostatiques, elles peuvent être à l'origine de conditions ischémiques au sein des tissus lésés et entraîner la nécrose.

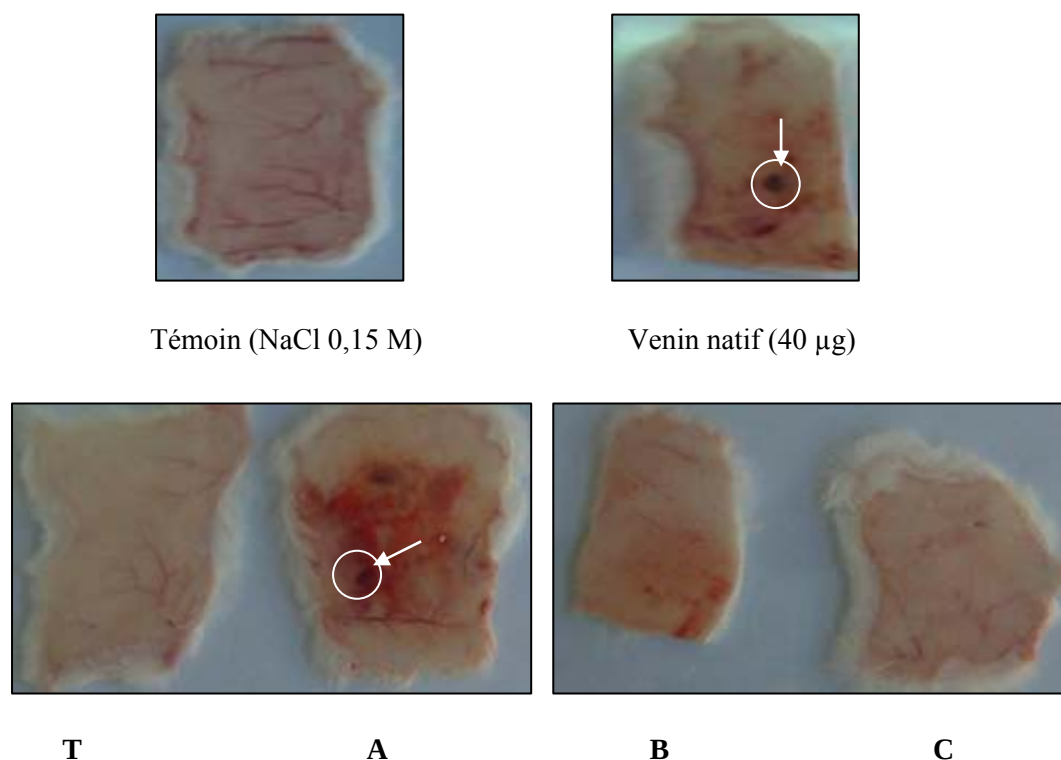


Figure 20 : Activité dermonécrotique du venin (40 µg) en présence de différentes concentrations de Na_2EDTA .

T - Témoin Na_2EDTA

A - 5 mM Na_2EDTA

B - 20 mM Na_2EDTA

C - 40 mM Na_2EDTA

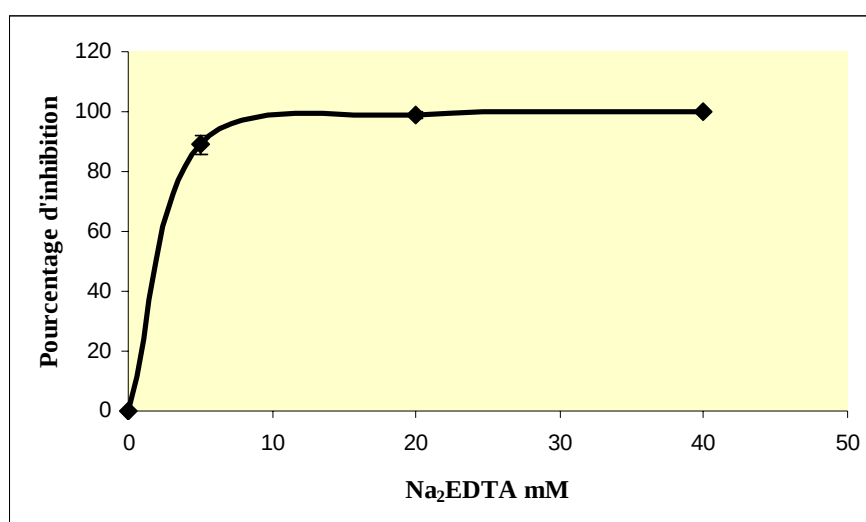


Figure 21: Effet du Na_2EDTA sur l'activité dermonécrotique du venin de *Cerastes cerastes*.

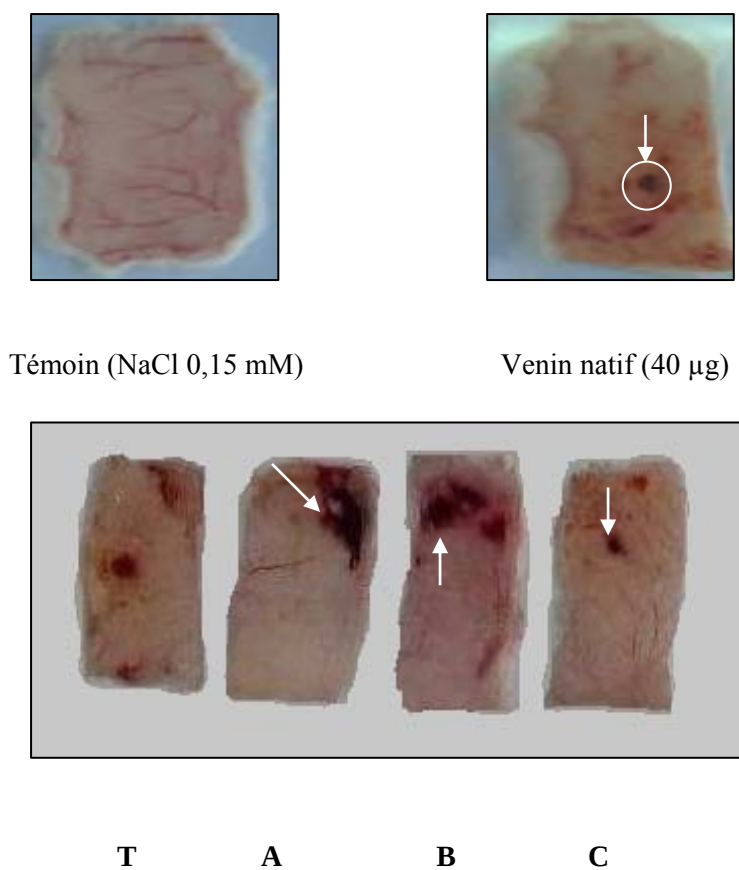


Figure 22 : Activité dermonécrotique du venin (40 µg) en présence de différentes concentrations de PMSF.

T - Témoin PMSF

A - 0,1 mM PMSF

B - 0,3 mM PMSF

C - 0,5 mM PMSF

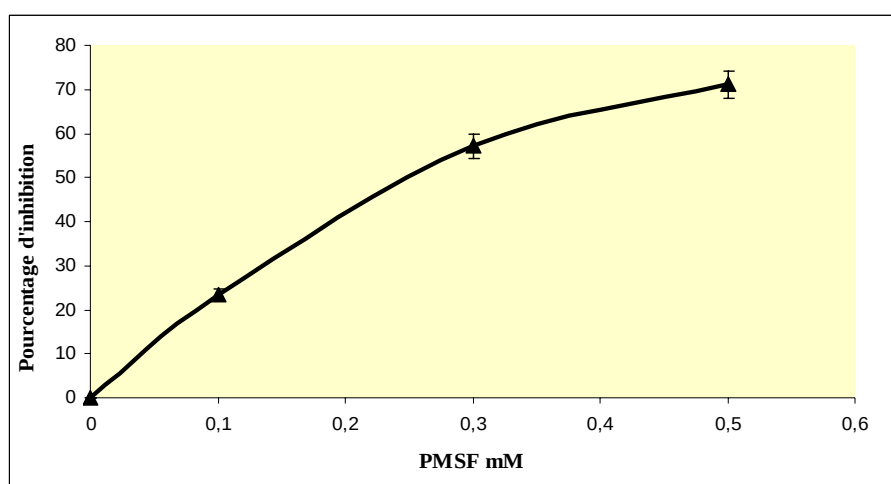


Figure 23: Effet du PMSF sur l'activité dermonécrotique du venin de *Cerastes cerastes*.

IV.2.3.1.4. Effet des anti-inflammatoires sur l'activité dermonécrotique du venin de *Cerastes cerastes*

La destruction des tissus avoisinants le site de la morsure par les *Viperidae* s'installe au bout de quelques heures d'envenimation aboutissant à une nécrose tissulaire. Cette nécrose évolue souvent en gangrène nécessitant l'ablation du membre mordu. En effet, si l'immunothérapie est efficace pour neutraliser les effets toxiques systémiques du venin, elle se révèle, en revanche, inefficace à neutraliser la nécrose des tissus (Gutiérrez et *al.*, 1989 ; León et *al.*, 1997 ; León et *al.*, 2000). Dans la perspective d'une meilleure prise en charge des victimes, dans le but d'associer un traitement anti-inflammatoire efficace à l'immunothérapie, nous avons testé l'effet de quelques anti-inflammatoires sur l'activité dermonécrotique du venin de *Cerastes cerastes*.

IV.2.3.1.4. 1. Effet de la dexaméthasone sur l'activité dermonécrotique du venin de *Cerastes cerastes*

La dexaméthasone est un glucocorticoïde qui appartient à la classe des anti-inflammatoires stéroïdiens. Il s'agit d'un inhibiteur de la phospholipase A₂, bloquant ainsi la libération de l'acide arachidonique à partir des phospholipides membranaires et par conséquent la synthèse des prostaglandines, des leucotriènes, des thromboxanes et du PAF (Giroud 1988; Berenbaum., 2004).

Une injection de la dexaméthasone est effectuée par voie i.p. aux souris préalablement à l'envenimation. L'injection de l'anti-inflammatoire est renouvelée après 36 heures et cela afin de maintenir l'inhibition sur la réaction inflammatoire. Les résultats obtenus montrent une réduction de l'activité dermonécrotique du venin de *Cerastes cerastes* en présence de la dexaméthasone. Cette réduction est fonction de la dose de la dexaméthasone injectée aux souris (Figure 24). La dexaméthasone est un inhibiteur spécifique de la PLA₂, empêchant la libération de l'acide arachidonique, elle semble ainsi inhiber la voie de la lipoxigénase et de la cyclo-oxygénase. En effet, la dexaméthasone affecte la biosynthèse des eicosanoides (produits de la voie de la cyclo-oxygénase, Cox-2 inducible) qui agissent sur la phagocytose des macrophages et sur la migration des cellules inflammatoires et empêche aussi la synthèse des produits de la voie de la lipoxigénase qui eux affectent l'adhésion et le chimiotactisme des neutrophiles (Levine 1988 ; O'Sullivan et *al.*, 1992).

L'action anti-inflammatoire des glucocorticoïdes est le résultat de plusieurs mécanismes dont la modulation de la balance Th1/Th2 par le biais du contrôle de la

synthèse des cytokines (Wilckens et Rijk, 1997). Cette modulation est complexe et dépend du statut des lymphocytes T. Ainsi, il a été montré que les glucocorticoïdes induisent une réponse de type Th2 avec synthèse de l'IL-4 et de l'IL-10 et suppression de l'IL-5 et de l'IFN- γ chez les lymphocytes T naïfs, alors qu'ils induisent une réponse de type Th1 avec suppression de l'IL-4, IL-5 et IL-10 chez des lymphocytes T mémoires (Brinkmann et Kristofic, 1995). Des travaux ont aussi montré que la dexaméthasone est capable d'induire un effet anti-inflammatoire tout en favorisant une réponse de type Th1 avec synthèse d'IFN- γ (cytokine pro-inflammatoire) et suppression de l'IL-10 (cytokine anti-inflammatoire) chez des souris ayant développé une arthrite après avoir subi des injections de collagène bovin de type II (Kang et *al.*, 2000). L'effet anti-inflammatoire de la dexaméthasone semble être le résultat des autres activités des glucocorticoïdes tel que l'inhibition de la PLA₂, de la cyclo-oxygénase 2 et des gènes de la synthétase de l'oxyde nitrique (iNOS) aboutissant à une réduction des prostanoïdes, du PAF et de NO, dont les effets anti-inflammatoires semblent supérieurs à ceux de l'IFN- γ produit (Boumpas et *al.*, 1993). Ainsi, cet anti-inflammatoire semble être capable de réduire de façon efficace le processus inflammatoire engendré par le venin de *Cerastes cerastes* et conduit alors à neutraliser l'activité dermonécrotique.

IV.2.3.1.4. 2. Effet de la pentoxifylline sur l'activité dermonécrotique du venin de *Cerastes cerastes*

La pentoxifylline, qui est un dérivé de méthyl-xanthine, est un analogue structural de la théophylline. Appartenant à la classe des anti-inflammatoires non stéroïdiens, elle inhibe la synthèse du TNF- α par les monocytes et les macrophages et inhibe également de façon non spécifique la phosphodiesterase (Chaves et *al.*, 2005).

Le TNF- α stimule lui-même la synthèse d'IL-1 et d'IL-6 (Chaves et *al.*, 2005). L'IL-1 et le TNF- α sont les cytokines clés de la réaction inflammatoire, ils sont à l'origine de l'IL-8 et de la macrophage chemo-attractant protein-1 (MCP-1) qui attirent les neutrophiles et les mastocytes vers le foyer inflammatoire (Genetet 2002).

L'activité dermonécrotique du venin de *Cerastes cerastes* est testée en présence d'un traitement des souris avec cet anti-inflammatoire 30 min avant et 36 heures après l'envenimation. Les résultats obtenus montrent une réduction de cette activité biologique. La réduction observée est fonction de la dose de pentoxifylline administrée (Figure 25). La réduction de l'activité dermonécrotique du venin est inférieure à celle obtenue lors de l'administration de la dexaméthasone. Il est observé par ailleurs la persistance de halos

hémorragiques au niveau des peaux de souris traitées à la pentoxifylline. Les activités dermonécrotique et hémorragique observées après traitement à la pentoxifylline sont probablement dues à l'activité entre autres des métalloprotéinases et des phospholipases du venin qui ne sont pas affectées par ce traitement.

IV.2.3.1.4. 3. Effet de l'indométacine sur l'activité dermonécrotique du venin de *Cerastes cerastes*

L'indométacine est un dérivé acéto-indolique appartenant à la classe des anti-inflammatoires non stéroïdiens. Selon une classification basée sur la sélectivité de l'effet inhibiteur des anti-inflammatoires sur les iso-enzymes de la cyclo-oxygénase, l'indométacine est classée avec les inhibiteurs non sélectifs, qui inhibent la Cox-1 et la Cox-2, induisant la transformation de l'acide arachidonique en prostaglandines. La Cox-1 ubiquitaire est à l'origine de la synthèse des prostaglandines physiologiques dans la plupart des tissus, la Cox-2 n'est exprimée qu'en situation de stress comme par exemple lors d'une réaction inflammatoire (Berenbaum., 2004).

L'évaluation de l'effet d'un traitement par l'indométacine est effectuée en injectant à des souris cet anti-inflammatoire 30 min avant et 36 heures après l'envenimation. Les résultats obtenus montrent une réduction partielle de l'activité dermonécrotique du venin de *Cerastes cerastes* (Figure 26). Il est à noter que les prélèvements de peaux de souris montrent une absence totale de l'activité hémorragique. Avec l'administration de l'indométacine qui est un inhibiteur non sélectif des cyclo-oxygénases, le métabolisme de l'acide arachidonique est dévié vers la voie des lipoxygénases aboutissant ainsi à une synthèse importante d'agents chimioattractants tels que les leucotriènes, responsables de l'infiltration leucocytaire où les polymorphonucléaires constituent la première population de cellules qui migrent vers le foyer inflammatoire ce qui peut expliquer en partie la persistance de l'activité dermonécrotique du venin de *Cerastes cerastes*.

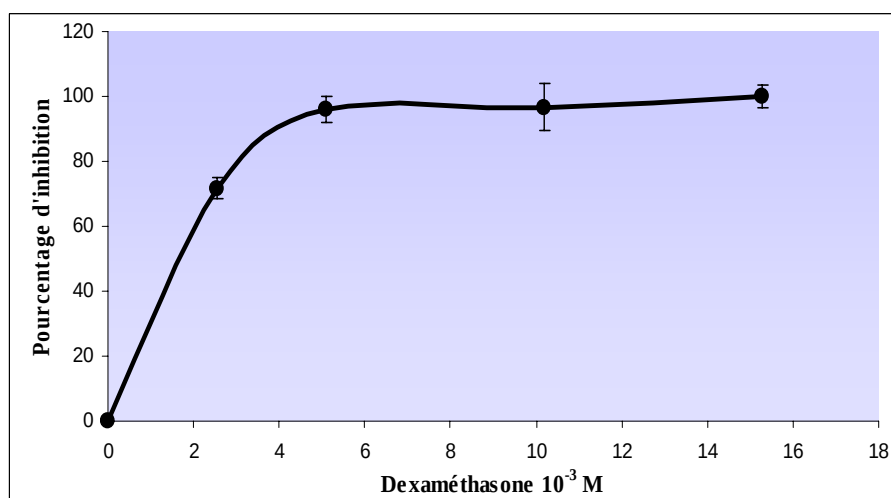


Figure 24 : Effet de la dexaméthasone sur l'activité dermonécrotique du venin de *Cerastes cerastes*.

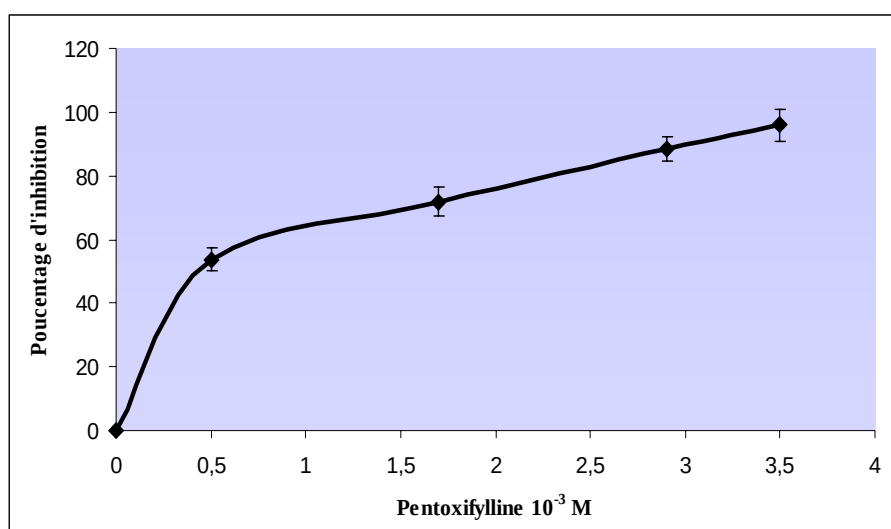


Figure 25 : Effet de la pentoxifylline sur l'activité dermonécrotique du venin de *Cerastes cerastes*.

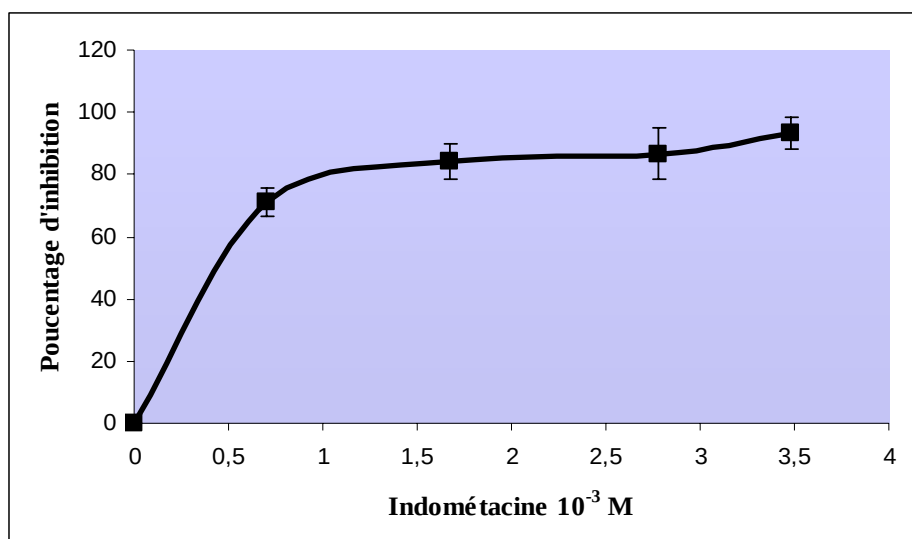


Figure 26 : Effet de l'indométacine sur l'activité dermonécrotique du venin de *Cerastes cerastes*.

IV.2.3.2. Activité dermonécrotique des venins irradiés

L'évaluation de l'effet des rayons gamma sur l'activité dermonécrotique des venins irradiés de *Cerastes cerastes* est effectuée en injectant par voie i.d. une dose de venin égale à 96 µg/20 g de masse corporelle de souris (soit l'équivalent de 2 DL₅₀). L'observation de la face dorsale des souris, au bout de 72 heures, ne révèle aucune lésion nécrotique (Figure 27).

Dans le but d'une analyse plus fine, une étude histologique est effectuée au niveau du site de l'injection des venins irradiés. Les résultats obtenus montrent que le venin irradié à 1 kGy induit une légère hémorragie et un faible œdème au niveau du derme. Les coupes histologiques des peaux de souris ayant subi une injection de venin irradié à 2 kGy, montrent un aspect structural comparable à celui du témoin, ne présentant pas d'altérations structurales (Figure 28). Les résultats obtenus semblent suggérer une inactivation des métalloprotéinases et des hémorragines sous l'effet des radicaux libres issus de la radiolyse de l'eau.

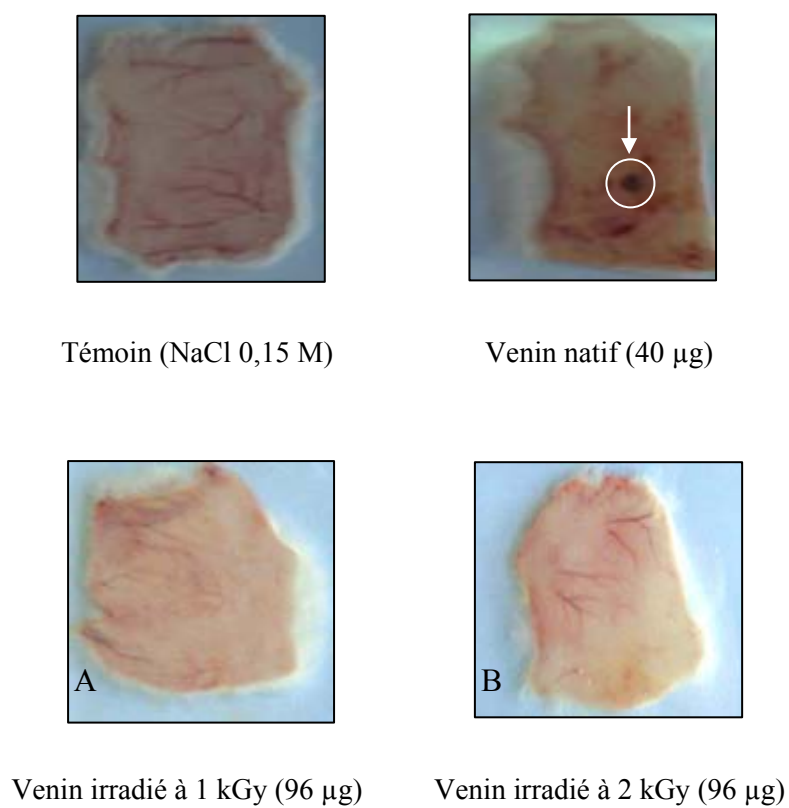


Figure 27 : Aspect de la face interne de la peau de souris après injection intradermique (i.d.) de venin irradié à 1 kGy (A) et 2 kGy (B).

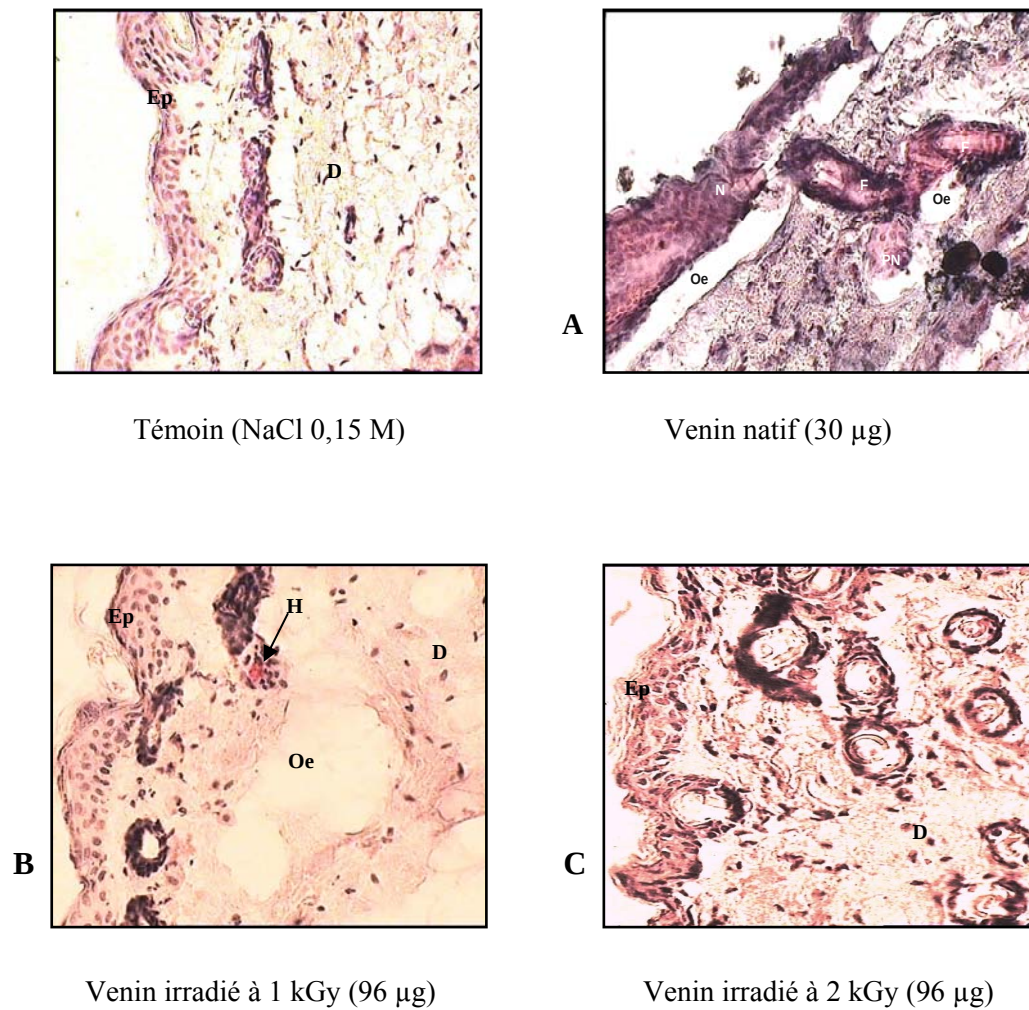


Figure 28 : Coupes histologiques de la peau de souris 72 heures après injection de 30 µg/20 g de souris de venin natif de *Cerastes cerastes* (A) et de 96 µg/20 g de souris de venins irradiés à 1 kGy (B) et 2 kGy (C). La coloration des coupes est effectuée avec de l'hématoxyline-éosine, G X 400. D: derme, Ep: épiderme, F: follicule pileux, H: hémorragie, Oe: œdème, PN: polymorphonucléaires.

IV.3. Implications de l'irradiation gamma sur les propriétés immunogènes et antigéniques du venin *Cerastes cerastes*

IV.3.1. Titres anticorps des immun-sérums

Les antisérums expérimentaux anti-venin natif et anti-venins irradiés à 1 et 2 kGy ont été préparés par immunisation de lapins. La titration des différents immun-sérums est effectuée par la technique ELISA. A cet effet la microplaque est sensibilisée avec le venin natif. Les résultats montrent que l'immun-sérum anti venin natif présente un titre anticorps d'environ 10^6 . L'anti-venin irradié à 1 kGy présente un même titre anticorps, alors que l'immun-sérum dirigé contre le venin irradié à 2 kGy présente un titre anticorps de 2×10^6 (Figure 29). Ces résultats indiquent que d'une part l'irradiation gamma du venin a préservé le pouvoir immunogène des molécules antigéniques du venin et que d'autre part elle a conservé leur antigénicité, du fait que les anticorps dirigés contre les venins irradiés soient capables de reconnaître les antigènes natifs du venin. La dose d'irradiation gamma de 2 kGy semble améliorer l'immunogénicité des protéines antigéniques du venin. Hati et al (1990) et Nascimento et al (1996) ont également montré que l'irradiation gamma du venin de *Vipera russelli* et de la crotoxine du venin de *Crotalus durissus terrificus* maintient leur pouvoir immunogène ainsi que leurs propriétés antigéniques. Il apparaît que l'irradiation gamma provoque des modifications structurales entraînant une perte des activités toxiques mais préserve la structure des déterminants antigéniques des protéines du venin.

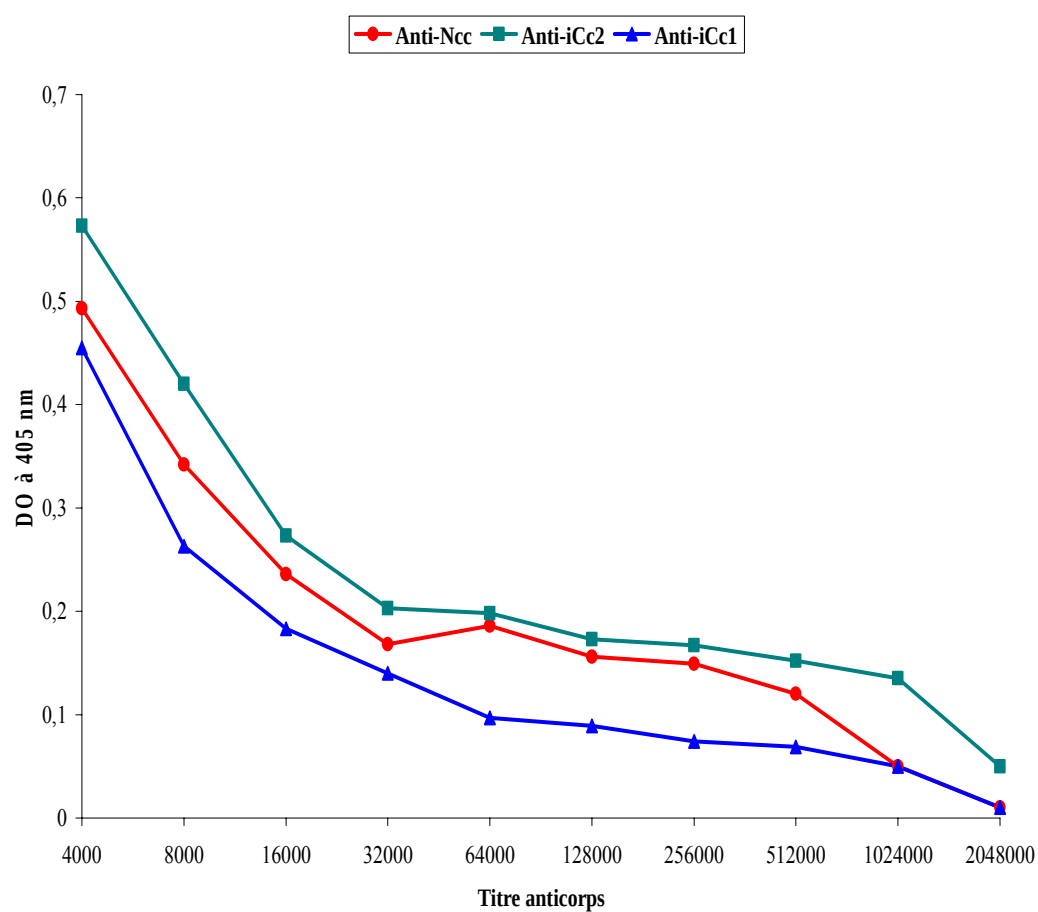


Figure 29: Détermination des titres anticorps des immun-sérums produits contre le venin natif et les venins irradiés. La microplaque ELISA est sensibilisée avec le venin natif de *Cerastes cerastes*.

IV.3.3. Immunoréactivité des immun-sérums en présence du venin natif

Le western-blot est réalisé en faisant migrer le venin non irradié de *Cerastes cerastes*, l'immunodétection est effectuée avec les immun-sérums expérimentaux anti-venin natif et anti-venin irradiés. Les résultats de l'analyse montrent que les immun-sérums produits contre les venins irradiés sont capables de reconnaître la totalité des bandes polypeptidiques du venin natif de la même manière que l'anti-venin natif (Figure 30). Ces résultats viennent confirmer les résultats de l'ELISA, à savoir que les anticorps dirigés contre les protéines irradiées sont capables de reconnaître les protéines du venin natif, ce qui atteste d'une conservation des propriétés immunogènes et antigéniques des molécules irradiées au ^{60}Co . Il semblerait que l'irradiation gamma a provoqué une diminution significative la toxicité du venin, avec préservation des propriétés immunogéniques. Les déterminants antigéniques des venins irradiés semblent avoir été conservés, en effet les anticorps produits par ces venins sont capables de reconnaître les antigènes du venin natif. Les travaux de Nascimento et al (1996) ont montré que des anticorps monoclonaux dirigés contre la crotoxine du venin de *Crotalus durissus terrificus* ont la même capacité de reconnaître la crotoxine native et irradiée à 2 kGy, alors qu'ils se sont révélés incapable de reconnaître les sous unités de la crotoxine native après réduction des ponts disulfures. Il apparaît ainsi que l'irradiation gamma maintient les structures secondaires et tertiaires des protéines irradiées.

IV.4. Capacité neutralisante des anti-venins natif et irradiés

IV.4.1. Toxicité résiduelle du venin natif en présence d'immunothérapie

L'évaluation de la capacité neutralisante des anti-venins natif et irradiés est effectuée par des tests de séroneutralisation. Ces tests sont réalisés par incubation de doses de venin natif allant de 2 à 9 DL_{50} avec les différents échantillons d'immun-sérums et ensuite injection des mélanges obtenus par voie i.p. aux souris. Les résultats obtenus montrent que les immun-sérums produits contre les venins irradiés sont capables de neutraliser l'activité toxique globale du venin natif. L'immun-sérum anti-venin irradié à 2 kGy semble le plus efficace à neutraliser la toxicité du venin natif comparativement aux antisérums anti-venins natif et irradié à 1 kGy (Figure 31). En effet, les immun-sérums anti- Cc_n et anti- Cc_1 neutralisent respectivement jusqu'à 6 et 5 DL_{50} de venin natif, alors que l'immun-sérum anti- Cc_2 est capable de neutraliser jusqu'à 8 DL_{50} (Figure 32). Heffar et Laraba-Djebari (2003) ont également montré que le venin irradié à 2 kGy de *Vipera lebetina* induit la synthèse

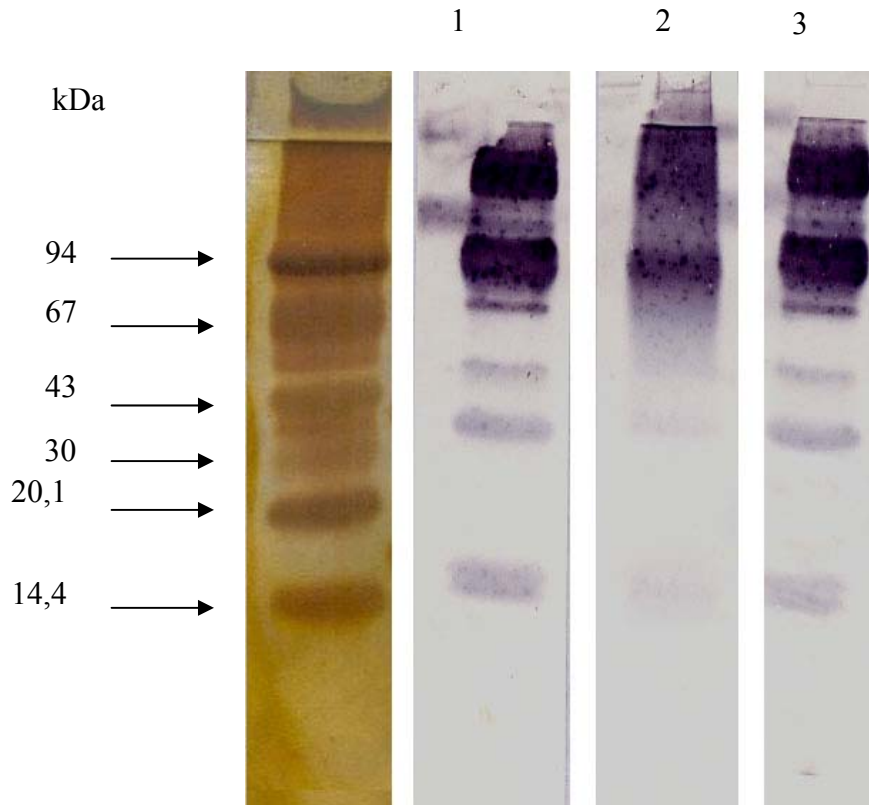


Figure 30: Immunoréactivité des immun-sérums expérimentaux avec le venin natif de *Cerastes cerastes*. Après électrophorèse du venin natif puis transfert sur nitrocellulose, l'immunodétection est effectuée avec l'anti-venin natif (piste 1), l'anti-venin irradié à 1 kGy (piste 2) et l'anti-venin irradié à 2 kGy (piste 3). Les marqueurs de poids moléculaire sont la phosphorylase b 94 kDa, la sérum albumine bovine 67 kDa, l'ovalbumin 43 kDa, l'anhydrase carbonique 30 kDa, soybean trypsin inhibitor 20,1 kDa et l' α lactalbumin 14,4 kDa.

ayant de meilleures capacités neutralisantes que les immun-sérums anti-venin natif et anti-venin irradié à 1 kGy. Ces résultats semblent indiquer que les composants toxiques des venins irradiés ont induit la synthèse d'anticorps capables de reconnaître et de neutraliser ces mêmes composants à l'état natif. L'irradiation gamma semble améliorer les propriétés immunologiques du venin irradié à 2 kGy. L'amélioration des propriétés immunologiques semble être liée à la formation des agrégats sous l'effet des radicaux libres lors du processus de l'irradiation gamma (Nascimento et al., 1996). Cependant cette amélioration du pouvoir immunogène est également observée en l'absence de l'agrégation des protéines. Ainsi, Pinho et al (1995) ont rapporté une amélioration du pouvoir immunogène de la protéine recombinante « heat-shock protein » du *Mycobacterium leprea*, en absence d'agrégation. L'amélioration des propriétés immunogènes est également attribuée aux altérations oxydatives des protéines irradiées. Il semblerait que les macrophages scavenger phagocytent préférentiellement les molécules oxydées ou portant des charges négatives, entraînant une meilleure présentation des antigènes (Goldstein et al., 1979 ; Cardi et al., 1998 b).

IV.4.2. Activité hémorragique résiduelle du venin natif en présence d'immunothérapie

L'évaluation de la capacité neutralisante des anti-venins natif et irradiés à 1 et 2 kGy est effectuée par des tests de séroneutralisation de l'activité hémorragique. Ces tests sont réalisés par injection i.d. d'un mélange constitué de doses croissantes de venin natif incubées avec 150 µl d'immun-sérum. Les résultats obtenus montrent que les différents immun-sérums anti-venins natifs et irradiés sont capables de neutraliser cette activité biologique avec quasiment la même efficacité. En effet, ces antisérums neutralisent l'équivalent de 6 DMH, soit une dose de venin égale à 19,2 µg/20 g de masse corporelle de souris (Figure 33). Il est à noter que le venin de *Cerastes cerastes* natif présente une DMH de 3,2 µg/20 g de souris alors que le venin irradié à 2 kGy présente une DMH de 780 µg/20 g de souris, soit une diminution d'un facteur de 240. Le venin irradié à 2 kGy est, cependant, capable d'induire la synthèse d'anticorps ayant la même efficacité que les autres anticorps anti-venins natifs et irradiés à 1 kGy. Il semblerait ainsi que l'irradiation gamma à 2 kGy a provoqué de profondes altérations structurales des molécules responsables de l'activité hémorragique leur faisant perdre cette activité biologique et qu'en parallèle elle a préservé les épitopes de ces molécules dans un état structural proche de celui des épitopes natifs.

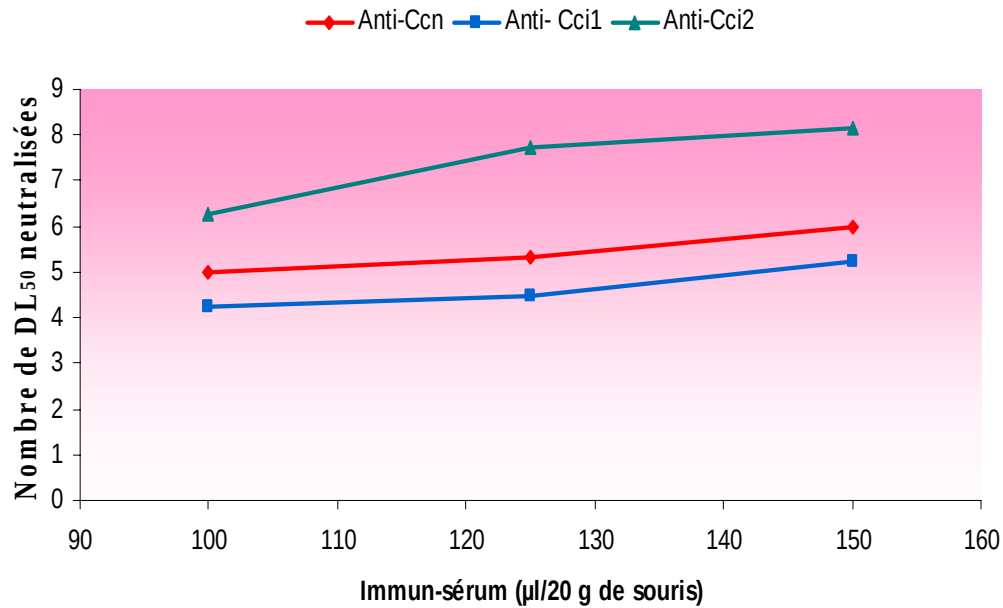


Figure 31: Neutralisation de la toxicité du venin natif de *Cerastes cerastes* par les immun-sérums anti-venin natif (anti-Ccn) et anti-venins irradiés à 1 kGy (anti-Cci1) et à 2kGy (anti-Cci2). Les antisérums (100, 125 et 150 µl) sont incubés avec des multiples de DL₅₀ de venin natif (2 à 9 DL₅₀) et injectés par voie i.p. aux souris.

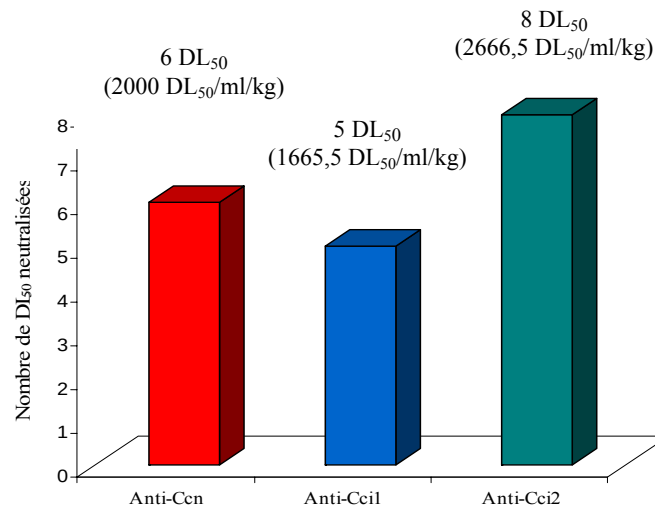


Figure 32 : Nombre de DL₅₀ de venin natif de *Cerastes cerastes* neutralisées par un volume de 150 µl immun-sérums anti-venin natif (anti-Ccn) et anti-venins irradiés à 1 kGy (anti-Cci1) et à 2kGy (anti-Cci2).

IV.4.3. Activité dermonécrotique résiduelle du venin natif en présence d'immunothérapie

La neutralisation de la dermonécrose est effectuée en incubant les différents antisérums avec 40 µg de venin natif et injection du mélange par voie i.d. à des souris. Les résultats obtenus montrent un aspect sain des peaux de souris, comparable à celui des témoins NaCl. Il apparaît donc que tous les anti-venins natif et irradiés utilisés sont capables de neutraliser cette activité biologique du venin de *Cerastes cerastes* (Figure 34). Il est à noter que les venins irradiés présentent une réduction considérable de l'activité dermonécrotique voir même une absence totale de cette activité dans le venin irradié à 2 kGy, tel confirmé par l'étude histopathologique. Ce qui indique une inactivation notamment des métalloprotéinases sous l'effet des rayons gamma.

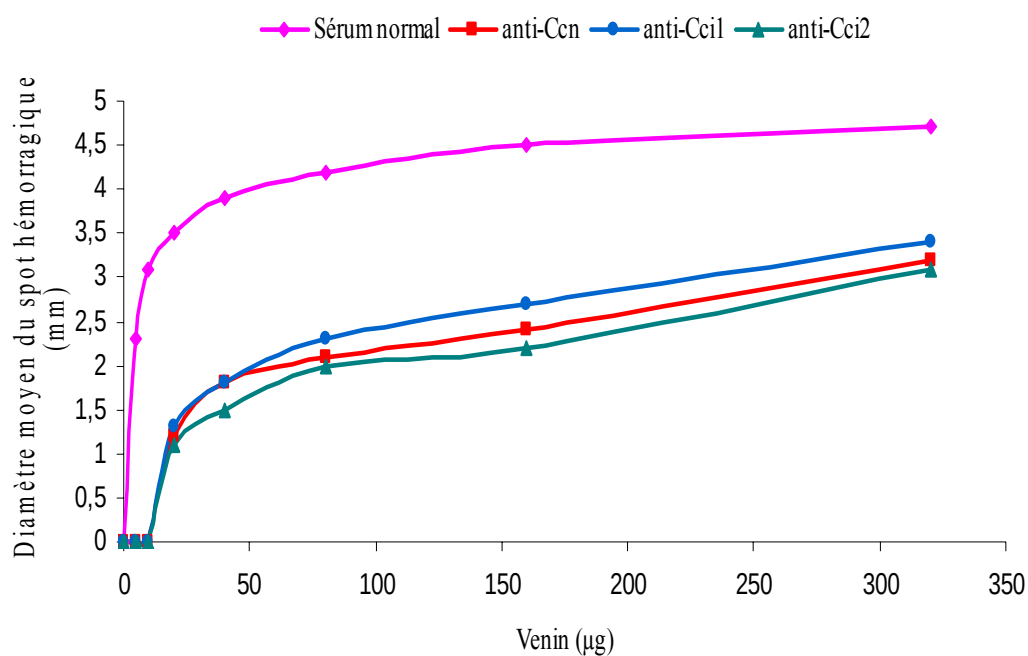


Figure 33 : Neutralisation de l'activité hémorragique du venin natif de *Cerastes cerastes* par les immun-sérums anti-venin natif (anti-*Ccn*) et anti-venins irradiés à 1 kGy (anti-*Cci1*) et à 2kGy (anti-*Cci2*).

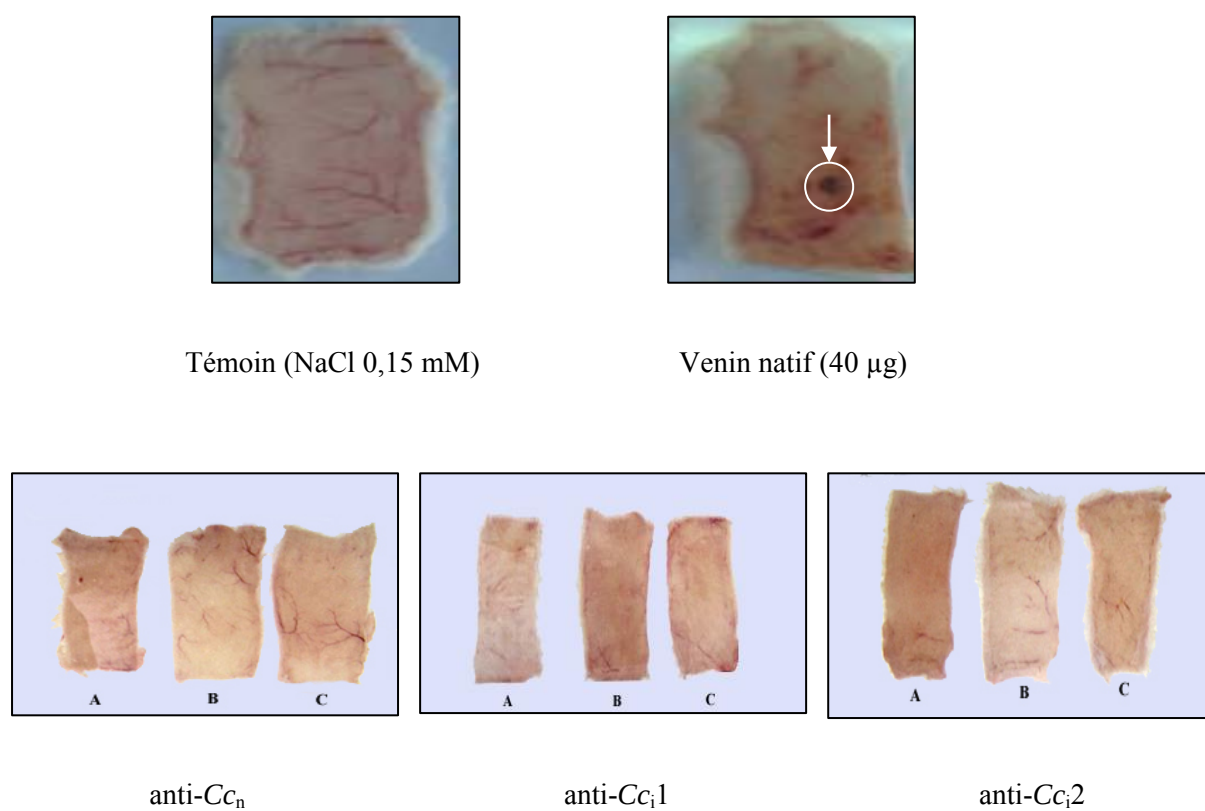


Figure 34 : Activité dermonécrotique du venin natif de *Cerastes cerastes* (40 µg) après neutralisation avec (A) 100 µl, (B) 150 µl et (C) 200 µl d'immun-sérum anti-venin natif (anti- Cc_n) et anti-venins irradiés à 1 kGy (anti- Cc_i1) et à 2kGy (anti- Cc_i2).

Discussion générale

V. Discussion générale

L'envenimation ophidienne se caractérise par des lésions locales au niveau du site de la morsure mais aussi par des atteintes systémiques pouvant avoir de graves conséquences sur la santé de la victime. Les lésions locales peuvent évoluer en nécrose puis en gangrène nécessitant souvent l'amputation du membre atteint. La diffusion du venin dans l'organisme provoque des lésions systémiques pouvant atteindre les organes vitaux tels que le cœur, le poumon, le foie et les reins.

Les venins de *Viperidae* sont constitués d'un mélange complexe de peptides et de protéines toxiques et non toxiques. Ces venins sont caractérisés par une forte activité hémorragique dont sont responsables notamment les hémorragines et les phospholipases A₂. Certains constituants du venin sont capables d'interférer dans les mécanismes hémostatiques et de créer des conditions ischémiques aggravant l'envenimation. Les métalloprotéinases et les phospholipases A₂ agissent sur le muscle myocardique (Moreno et Gutiérrez, 1988 ; Valentin et Lambeau, 2000). Les protéinases, les hyaluronidases, les estérases et les phospholipases A₂ sont responsables de l'augmentation de la perméabilité capillaire conduisant à l'œdème pulmonaire (Bjarnason et Tu, 1978 ; Chui et *al.*, 1989). Les phospholipases A₂ sont à l'origine de la libération de médiateurs lipidiques de l'inflammation tels que le PAF, les leucotriènes et les prostaglandines selon un mécanisme impliquant l'acide arachidonique issu de l'hydrolyse des phospholipides. Les phospholipases A₂ et les protéinases sont aussi impliquées dans les lésions pouvant toucher le cortex rénal (Boer-Lima et *al.*, 1999). Toutes ces activités des venins de *Viperidae* conduisent souvent à un tableau clinique alarmant où l'immunothérapie constitue le seul traitement efficace de l'envenimation.

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

Les travaux effectués dans cette étude ont porté, d'une part, sur la caractérisation des propriétés biochimiques, biologiques et immunologiques des venins irradiés. D'autre part, cette étude a porté sur l'examen de l'apport de l'irradiation gamma dans l'amélioration des propriétés immunogènes des venins irradiés pour la préparation d'immun-sérums.

Les rayons gamma provoquent la radiolyse des molécules d'eau produisant des radicaux libres. Ces radicaux réagissent avec les macromolécules, c'est l'effet indirect de l'irradiation gamma. L'effet indirect des rayonnements gamma est à l'origine de 99,9% des altérations structurales occasionnées aux protéines (Kempner 2002). Les radicaux libres modifient les activités biologiques des peptides et des protéines en interagissant avec certains groupements induisant principalement des altérations oxydatives (Bugota et Dancewicz, 1983; Wales et Kussel, 1992). Ces altérations oxydatives affectent les atomes de carbone et de soufre présents dans la structure des acides aminés tels que la cystéine. Les radicaux libres induisent également des réactions de désamination et de rupture des ponts disulfures (Schessler et Davies, 1983). Les groupements thiols peuvent être à l'origine de la formation de nouveaux ponts disulfures entre différentes protéines, formant ainsi des agrégats de haut poids moléculaire (Schessler et Freundl, 1983). L'irradiation gamma peut aussi être à l'origine de liaisons intermoléculaires entre des peptides ou des protéines telles que les liaisons qui peuvent s'établir entre deux groupements aromatiques permettant l'association de deux unités de tyrosine qui conduisent à la formation du dérivé 2, 2'-didhydroxibiphérine qui constitue une voie de cross-linking protéique (Bugota et Dancewicz, 1983).

L'analyse du comportement électrophorétique des venins irradiés de *Cerastes cerastes* montre une modification drastique du profil électrophorétique. Une disparition de bandes polypeptidiques ainsi qu'un « smir » sont observés sur le profil électrophorétique. Ces observations confirment une baisse de solubilité ainsi qu'une dégradation des protéines sous l'effet des rayonnements gamma. Ces résultats sont en accord avec les travaux rapportés par sur des venins irradiés (*Bothrops jararacussu*, de *Crotalus durissus* et de *Vipera lebetina*) et sur les protéines myofibrillaires et sarcoplasmiques de bovin irradiées au ⁶⁰Co. Ces travaux ont montré une modification du comportement électrophorétique des protéines résultant essentiellement d'une dégradation protéique et de la formation d'agrégats (Spencer 1996 ; Clissa et al., 1999a ; Lee et al., 2000 et Heffar et Laraba-Djebari, 2003). Les radicaux libres libérés lors de ce processus peuvent altérer la structure des protéines en agissant également sur les ponts disulfures. Les travaux de Souza-Filho et al (1992) ont rapporté que l'irradiation

gamma, à la dose de 2 kGy, de la crotoxine, toxine isolée à partir du venin de *Crotalus durissus terrificus*, et présentant une activité phospholipase A₂, conduit à la rupture de 6 ponts disulfures. Cette rupture affecte l'activité phospholipasique de cette toxine, cependant, cet effet ne semble pas altérer la structure tridimensionnelle des épitopes conformationnels puisque ceux ci sont toujours reconnus par des anticorps monoclonaux spécifiques d'épitopes conformationnels de la crotoxine native.

L'irradiation gamma du venin de *Cerastes cerastes* aux doses de 1 et 2 kGy a montré que la toxicité est atténuée jusqu'à 10 DL₅₀. Cette perte de la toxicité peut être attribuée à des altérations structurales des composants toxiques du venin. Ces résultats sont en accord avec d'autres travaux qui montrent que l'irradiation gamma des venins, permet la préservation et l'amélioration des propriétés immunologiques de leurs composants antigéniques tout en diminuant leur toxicité (Baride et al., 1980 ; Hati et al., 1990 ; Murata et al., 1990 ; Souza-Filho et al., 1992 ; Mandal et al. 1993 ; Rogero et Nascimento, 1995 ; Nascimento et al., 1996 ; Clissa et al., 1999 ; Ciernik et al., 1999). Cette perte de toxicité peut être corrélée à la diminution des activités enzymatiques du venin. Dans cette étude, les résultats obtenus montrent que les venins irradiés de *Cerastes cerastes* à 1 et 2 kGy présentent une diminution considérable des activités protéolytiques et coagulante. Cette diminution est dépendante de la dose de rayons gamma reçue par les venins. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Hati et al (1990) montrant une réduction des activités protéolytiques, phosphodiésterase et hyaluronidase du venin de *Vipera russelli* soumis à une irradiation gamma. Les métalloprotéinases de venins de *Viperidae* sont connues pour leur activité hydrolytique sur la lame basale des vaisseaux sanguins et sur les composants de la matrice cellulaire, l'inactivation de ces enzymes peut affecter directement l'activité toxique du venin. L'inactivation des sérine protéinases agissant sur l'hémostase, peut aussi contribuer à la détoxification. Les travaux de Sanner et Pihl (1969) ont montré que l'inactivation des enzymes sous l'effet de l'irradiation peut conduire à une altération de la structure générale de l'enzyme (structures II, III et IV) lui faisant perdre sa configuration native ou à une altération au niveau du site actif.

L'étude de l'activité phospholipasique des venins irradiés de *Cerastes cerastes* (1 et 2 kGy) a montré que cette activité est radio-résistante. Ces résultats sont en accord avec les résultats de Hati et al (1990) qui montrent que l'activité PLA₂ du venin de la vipère *Vipera russelli* n'est pas altérée par l'irradiation gamma à la dose de 3 kGy. Bien que, les travaux de Heffar et Laraba-Djebari (2003) montrent que cette activité du venin de *Vipera lebetina* est

plutôt radiosensible aux mêmes doses. L'étude réalisée par Abib en 2002, montre que l'activité phospholipasique de *Cerastes cerastes* est sensible à l'irradiation gamma à la dose de 2 kGy. Cette différence de sensibilité de la phospholipase de *Cerastes cerastes* à l'irradiation gamma pourrait être attribuée au débit de dose utilisé lors du processus de l'irradiation. Le débit de dose utilisé dans notre étude est de 4,25 Gy/min, alors que celui utilisé dans les travaux de Abib (2002) est de 8 Gy/min. A dose d'irradiation égale, les altérations induites sur les protéines semblent avoir un caractère dose-réponse avec le débit de l'irradiation. En effet, les travaux de Murata et al (1990) ont montré que l'irradiation gamma du venin de *Crotalus durissus terrificus* à une dose de 2 kGy aux débits de doses de 391 Gy/heure (6,51 Gy/min) et de 900 Gy/heure (15 Gy/min), réduit sa toxicité d'un facteur de 2,7 et 5 respectivement.

Les venins de *Viperidae* sont très hémorragiques. L'hémorragie est d'abord locale au niveau du site la morsure, puis devient systémique s'étendant vers les différents organes après diffusion du venin. Dans cette étude, l'activité hémorragique du venin de *Cerastes cerastes* présente avec une DMH de 3,2 µg/20 g de souris. L'irradiation gamma diminue de façon considérable cette activité biologique. Les venins de *Cerastes cerastes* irradiés à 1 et 2 kGy présentent, respectivement, une diminution de l'activité hémorragique d'un facteur de 6 et 240. L'irradiation gamma, principalement à la dose de 2 kGy, semble être à l'origine d'une inactivation des métalloprotéinases hémorragiques du venin. Les rayons gamma entraînent une réduction des ions métalliques à bas potentiel d'oxydation (Von Sonntag 1987). L'activité protéolytique des métalloprotéinases est Zn^{+2} dépendante (Bjarnason et Fox, 1994 ; Hati et al., 1999), alors que l'activité hémorragique est dépendante de l'activité protéolytique (Bjarnason et al., 1988 ; Bjarnason et Fox, 1994 ; Escalante et al., 2000). Une altération de la fixation de l'ion Zn^{+2} sous l'effet des rayonnements gamma peut alors inactiver ces enzymes. Les rayonnements gamma peuvent avoir d'autres effets sur les structures II, III et IV par rupture des ponts disulfures et des liaisons hydrogènes, aboutissant ainsi à une inactivation enzymatique.

Parmi les lésions observées lors d'une envenimation ophidienne la nécrose des tissus semble apparaître au bout de 2 à 4 jours. Cette complication est grave et peut même conduire à l'ablation du membre atteint, entraînant ainsi des séquelles définitives (Gutiérrez et Lomonte, 1989 ; Dart et al., 1992 ; Warrell 1995).

Dans cette étude, l'activité dermonécrotique a été mise en évidence dans le venin de *Cerastes cerastes*. Elle présente un caractère dose-réponse et présente une DMN de 19 µg/20 g de souris. L'étude histopathologique de cette activité laisse apparaître de nombreuses altérations tissulaires au niveau de la peau. Il apparaît une destruction de la structure de l'épiderme et des follicules pileux, des zones hémorragiques et œdématisées au niveau du derme, de l'œdème dans la jonction épidermo-dermique entraînant un détachement de l'épiderme ainsi qu'une infiltration inflammatoire. L'utilisation d'un chélateur tel que le Na₂EDTA, inhibe l'activité dermonécrotique du venin de *Cerastes cerastes*, confirmant, ainsi, l'implication des métalloprotéinases dans ce processus. L'inhibition de l'activité dermonécrotique du venin de *Bothrops asper*, avec le CaNa₂EDTA a aussi été rapportée par Rucavado et al (2000), montrant ainsi le rôle des métalloprotéinases dans la pathogénèse de la dermonécrose. Ces auteurs ont montré que l'injection locale de ce chélateur ou du Batimastat, inhibiteur peptidomimétique des métalloprotéinases (qui présente une structure proche du site de clivage du collagène), abolie complètement les activités hémorragiques et dermonécrotiques du venin de *Bothrops asper*. Ces inhibiteurs inhibent de façon partielle l'effet œdématisé, mais n'ont cependant aucun effet sur l'activité phospholipasique A₂. Ces deux inhibiteurs utilisés après envenimation, ne permettent qu'une réduction partielle des altérations tissulaires, probablement en raison du développement rapide des lésions. Ces résultats suggèrent qu'un traitement rapide avec ces inhibiteurs serait recommandé pour neutraliser les enzymes avant leur diffusion et répartition dans les compartiments tissulaires. Par ailleurs, une injection locale des inhibiteurs peut avoir un autre avantage. En effet, lors d'une envenimation, des dépôts de venin sont toujours présents au niveau du site de la morsure et cela notamment en raison de la rupture des vaisseaux sanguins et de la nécrose. Ces sites nécrotiques sont inaccessibles par les anticorps circulants lorsque l'immunothérapie est mise en place. La diffusion tardive des constituants du venin peut engendrer des dommages tissulaires tardifs. De ce fait, l'administration *in situ* d'inhibiteurs de forte diffusibilité (tel que le Na₂EDTA) pourrait neutraliser les composants toxiques du venin, les empêchant d'être à l'origine de lésions tardives (Rucavado et al., 2000).

L'utilisation d'un inhibiteur de sérine protéinases (le PMSF) provoque, mais à un moindre degré, une inhibition de l'activité dermonécrotique, ceci confirme l'implication de certaines sérine-protéinases dans les dommages tissulaires induits. Les métalloprotéinases ciblent essentiellement les vaisseaux sanguins qu'elles détruisent, créant ainsi des conditions ischémiques conduisant à la nécrose tissulaire par défaut d'apport sanguin nécessaire au

processus de la réparation des tissus. Ces enzymes sont également à l'origine d'une réponse inflammatoire locale, induisant la contraction des cellules endothéliales ce qui entraîne un élargissement des jonctions intercellulaires. En effet, les travaux de Malucelli et Mariano, (1980) et de Goncalves et Mariano (2000) ont montré que l'extravasation du sang se fait simultanément à une réponse inflammatoire.

Les phospholipases A₂ des venins de serpents, jouent également un rôle dans la pathogénèse de la dermonécrose. En hydrolysant les phospholipides membranaires, elles induisent une extravasation du sang par hémolyse et une réponse inflammatoire. Cette réponse est déclenchée notamment par la libération de l'acide arachidonique conduisant à l'activation des voies de la lipoxigénase et de la cyclo-oxygénase. En effet, les travaux de Lloret et Moreno (1993) et Zuliani et *al* (2005) ont montré que les PLA₂ de serpents ont des activités pro-inflammatoires. C'est le cas de la promutoxine, une PLA₂ isolée du venin de *Protobothrops mucrosquamatus* qui induit la synthèse des cytokines IL-12, TNF- α , IL-6 IL-1 β , IL-2, TNF- α et IL-6.

Les sérines protéinases peuvent intervenir dans les dommages tissulaires induits par les venins de *Viperidae* en interférant notamment dans les mécanismes hémostatiques (El Asmar et *al*, 1995 ; Laraba-Djebari et *al.*, 1995 ; Morita 1998 ; Koh et *al*, 2001 ; Samel et *al*, 2002). En empêchant le sang de coaguler correctement, elles favorisent l'hémorragie qui conduit à l'installation de conditions ischémiques provoquant la nécrose tissulaire.

Le traitement des envenimations ophidiennes repose essentiellement sur l'utilisation de l'immunothérapie. Ce traitement s'avère souvent inefficace à traiter les dommages tissulaires induits par les composants du venin (Gutiérrez et *al.*, 1989 ; León et *al.*, 1997 ; León et *al.*, 2000). Dans cette étude, l'efficacité d'un traitement anti-inflammatoire, a été testé chez le murin en utilisant trois anti-inflammatoires, un glucocorticoïde (la dexaméthasone), un anti-inflammatoire non stéroïdien (l'indométacine) et un inhibiteur de la synthèse du TNF- α (la pentoxifylline).

Les résultats obtenus montrent que l'utilisation de la dexaméthasone et de l'indométacine entraîne une diminution de l'activité dermonécrotique après envenimation avec le venin de *Cerastes cerastes*. Ceci confirme l'activation des processus inflammatoires induite par la dermonécrose empruntant les voies de la lipoxigénase et de la cyclo-oxygénase.

Une meilleure inhibition de l'activité dermonécrotique a été obtenue avec la dexaméthasone, qui semble agir selon divers mécanismes anti-inflammatoires. Elle empêche la libération des prostaglandines et des leucotriènes, qui sont de puissants médiateurs de l'inflammation en inhibant la voie de la cyclo-oxygénase et la voie de la lipoxygénase. Ces médiateurs lipidiques (prostaglandines et leucotriènes) augmentent la perméabilité capillaire, l'adhérence leucocytes/cellules endothéliales induisant ainsi l'agrégation des plaquettes et la libération du PAF. Ce médiateur stimule le chimiotactisme des phagocytes et la libération d'oxygène réactif à partir des macrophages, des neutrophiles et des éosinophiles (Weil et *al.*, 1983 ; Genetet et *al.*, 1993 ; Parham 2003).

Les travaux de Costa et *al* (2001) ont rapporté que l'effet anti-inflammatoire de la dexaméthasone se ferait par l'inhibition de la synthèse de l'IL-1 et le TNF- α . Elle réduit également l'expression des molécules d'adhérence et inhibe l'activité de la synthétase de l'oxyde nitrique (iNOS) (Parham 2003). Par son effet anti-inflammatoire, la dexaméthasone induit l'expression du récepteur soluble de l'IL-1 (Costa et *al.*, 2001).

L'utilisation de l'indométacine réduit de façon partielle l'activité dermonécrotique du venin de *Cerastes cerastes*. L'indométacine est un inhibiteur de la cyclo-oxygénase. Elle inhibe la libération des prostaglandines et des thromboxanes mais n'empêche pas la formation des leucotriènes (produits de la voie lipoxygénase) ce qui peut expliquer en partie la persistance de l'activité dermonécrotique du venin.

L'utilisation de la pentoxifylline, un inhibiteur de la synthèse du TNF α , provoque une diminution de l'activité dermonécrotique. Le TNF- α est une cytokine qui est souvent impliquée dans les dommages tissulaires (Szold et *al.*, 2001, 2003). Les travaux de Barraviera et *al* (1995) ont montré que le sang de victimes envenimées par *Crotalus durissus terrificus* présente une élévation du taux de l'IL-6 et de l'IL-8, alors qu'aucune élévation du TNF- α n'est observée. Ces auteurs suggèrent une libération locale de cette cytokine, expliquant en partie les dommages tissulaires observés dans les envenimations ophidiennes. Les travaux de Moura-da Silva et *al* (1996) ont montré que les métalloprotéinases de venins de serpents induisent l'activation du précurseur du TNF- α , entraînant les lésions nécrotiques survenant lors de l'envenimation. Les travaux de Chaves et *al* (2005) ont aussi montré que le TNF- α , agit en synergie avec les métalloprotéinases et seraient responsables de la myotoxicité et de la dermonécrose.

La réaction inflammatoire est souvent décrite par plusieurs auteurs comme omniprésente dans l'envenimation ophidienne. Les travaux de Petricevich et *al* (2000) ont rapporté que l'injection chez le modèle murin, d'une DL₅₀ de venin de *Bothrops jararaca*, par voie i.p. conduit à une envenimation sévère. Cette envenimation est caractérisée par une élévation du taux des cytokines TNF- α , IL-1, IFN- γ et IL-6 ainsi que d'une libération accrue de NO. Ces cytokines et le NO semblent jouer un rôle considérable dans la pathogénèse de l'envenimation systémique observée. Ces auteurs rapportent que l'injection par voie s.c. du venin de *Bothrops asper* ne produit aucune élévation du taux d'expression de ces cytokines, alors que la même injection de venin dans la patte du murin ne produit que des dommages tissulaires locaux. Il semblerait qu'il y'ait un lien direct entre un taux élevé de TNF- α et la sévérité de l'envenimation. Ainsi, une corrélation directe a été établie entre le taux de TNF- α et le taux de mortalité dans le choc endotoxique et dans l'envenimation par piqûre de l'araignée *Loxosceles intermedia* (Debets et *al.*, 1989 ; Mozes et *al.*, 1991 ; Tambourgi et *al.*, 1998). Les travaux de Zamuner et *al* (2005) ont également montré que le venin de *Bothrops asper* induit une augmentation significative du taux de l'IL-6, du TNF- α , des eicosanoides LTB₄ et TXA₂, alors qu'aucune élévation du taux de l'IL-1 n'a été observée. Ce venin induit également l'expression des molécules d'adhésion (L-selectine, LFA, ICAM-1, PECAM-1 et β_2 integrines) nécessaires au recrutement des neutrophiles. Ces auteurs ont montré que la libération des cytokines et des eicosanoides s'effectue essentiellement au niveau du site de l'injection du venin, amplifiant ainsi le processus inflammatoire qui est notamment à l'origine des dommages tissulaires observés. Les travaux de Barraveira et *al* (1995) ont montré chez les victimes envenimées par le genre *Bothrops* et *Crotalus durissus terrificus*, une élévation significative du taux des protéines de la phase aigue (APP) ainsi qu'une augmentation du taux de l'IL-6 et de l'IL-8. Aucune élévation de TNF- α et d'IL-1 n'a été observée. Ces auteurs ont suggéré une production locale, de ces deux cytokines, au niveau du site de la morsure, expliquant ainsi les lésions induites.

Le TNF- α est responsable de l'hypotension, de l'acidose métabolique, d'hémorragies gastriques et pancréatiques et de la nécrose néphrotique (Beutler et Cerami, 1988). Les travaux de Moura-da Silva et *al* (1996) ont montré l'implication directe de cette cytokine dans la pathogénèse des dommages tissulaires survenant lors de l'envenimation ophidienne. L'IL-1 module l'inflammation et la fièvre et induit l'expression des molécules d'adhésion (Movat et *al.*, 1987 ; Dinarello 1991). L'IL-6 est un médiateur majeur de l'inflammation (Houssiau et *al.*, 1988). Elle induit notamment la synthèse des protéines de la phase aigue à partir des

hépatocytes (Lewis et *al.*, 1992). L'IFN- γ joue un rôle important dans les phases précoces des réponses immunitaires et dans la modulation positive des macrophages (Ding et *al.*, 1988 ; Mosmann et Coffman, 1989 ; Kamijo et *al.*, 1994). L'IL-10 exerce un effet régulateur en modulant négativement la réponse immunitaire et la réaction inflammatoire (Bogdan et *al.*, 1991 ; Fiorentino et *al.*, 1992). Cette cytokine agit sur les macrophages et les monocytes dont elle inhibe la synthèse de TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 et G-CSF (Moore et *al.*, 1993). Les cytokines IL-1, IFN- γ et TNF- α sont capables d'induire l'expression de la synthétase de l'oxyde nitrique. Une élévation du taux de ces médiateurs est donc responsable d'une libération du NO. Le NO peut participer à la pathogénèse de l'envenimation systémique selon deux mécanismes. Il peut générer les peroxynitrites ainsi que des radicaux hydroxyls en réagissant avec l'anion superoxyde et d'autre part être à l'origine de l'hypotension en raison de ses propriétés vasodilatatrices (Radi et *al.*, 1991 ; Hogg et *al.*, 1992).

Parmi les mécanismes par lesquels les venins de serpents induisent la synthèse et la libération des cytokines, figure l'action directe des protéines et des toxines du venin sur les macrophages, les leucocytes circulants et sur les cellules endothéliales. Moura-da-Silva et *al* (1996) ont montré que les métalloproteinases de serpents induisent la libération du TNF- α à partir de son précurseur. Lomonte et *al* (1993) ont rapporté quant à eux que la myotoxine II du venin de *Bothrops asper*, une Lys-49 PLA2 induit une élévation du taux de l'IL-6. D'un autre coté la production des cytokines et du NO peut être la conséquence des effets nécrotiques, œdématisques et hémorragiques se produisant lors d'une envenimation vipérine (Gutiérrez et Lomonte, 1989, 1997).

L'irradiation gamma a provoqué l'abolition de l'activité dermonécrotique du venin de *Cerastes cerastes*. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Ferreira Junior et *al* (2005) montrant que l'irradiation gamma à une dose de 2 kGy abolie l'activité dermonécrotique des venins de *Bothrops jararaca* et de *Bothrops jararacussu*.

Les venins natif et irradiés de *Cerastes cerastes*, ont été utilisés dans des protocoles d'immunisation de lapins, afin de tester leurs capacités neutralisantes sur les activités toxiques du venin natif. La caractérisation immunologique des immun-sérums préparés montre d'une part que les anticorps anti-venins irradiés sont capables de reconnaître les protéines du venin natif. D'autre part, Le titre en anticorps de l'immun-sérum anti-venin irradié à 2 kGy est deux fois plus élevé que celui des immun-sérums anti-venins natif et irradié à 1 kGy.

L'immunoréactivité des différents immun-sérums avec le venin natif de *Cerastes cerastes* a été testée par western-blot. Les résultats obtenus ont montré que les immun-sérums anti-venins irradiés sont capables de reconnaître toutes les bandes protéiques du venin natif, ce qui montre que l'irradiation a tout de même préservé la structure native de la plupart des déterminants antigéniques du venin. Les profils électrophorétiques des venins irradiés montrent une perte de la plupart des bandes polypeptidiques. La reconnaissance des bandes du venin natif par les anticorps dirigés contre les venins irradiés en immunoblot, confirme que l'absence des bandes polypeptidiques des venins irradiés est due à une agrégation protéique, obtenue sous l'effet des rayonnements gamma, réduisant ainsi leur solubilité.

L'étude de la séroneutralisation a montré que les immun-sérums anti-venins natif et irradiés sont capables de neutraliser l'activité toxique du venin de *Cerastes cerastes*. L'anti-venin natif neutralise une dose de venin natif de 5 DL₅₀, alors que les anti-venins irradiés à une dose de 1 et 2 kGy, neutralisent respectivement 4 et 8 DL₅₀. Les résultats montrent une amélioration du pouvoir immunogène des protéines du venin irradié à 2 kGy. La capacité neutralisante des immun-sérums préparés a aussi été testée sur deux activités biologiques du venin de *Cerastes cerastes*, l'activité hémorragique et l'activité dermonécrotique. Les résultats obtenus ont montré que les anti-venins irradiés sont capables de neutraliser l'activité hémorragique jusqu'à 6 DMH. L'estimation de l'activité hémorragique des venins irradiés à 1 et 2 kGy a montré une diminution considérable de cette activité suite à l'irradiation. Le venin irradié à 2 kGy présente quand à lui, une diminution d'un facteur de 240.

Ces résultats confirment bien que l'irradiation gamma des venins provoque des altérations structurales entraînant une perte des activités toxiques mais préserve la structure de leurs déterminants antigéniques. Les résultats obtenus, dans cette étude, ont également montré que l'irradiation gamma abolie complètement l'activité dermonécrotique des venins irradiés. Cependant, ces venins irradiés sont capables d'induire la synthèse d'anticorps qui neutralisent cette activité.

L'amélioration des propriétés immunologique après irradiation gamma serait dû à l'agrégation protéique qui contribue à la formation de molécules de haut poids moléculaire ayant des propriétés plus immunogènes (Nascimento et al., 1996). Cette hypothèse n'est pas suffisante, car une amélioration des propriétés immunogènes a été rapportée sans agrégation protéique importante. En effet, la protéine recombinante « heat shock protein » irradiée au ⁶⁰cobalt du *Mycobacterium leprea* induit une synthèse d'anticorps de capacité neutralisante

supérieure à celle des anticorps induits par la forme native de cette protéine, en absence d'agrégation protéique (Pinho et *al.*, 1995).

L'amélioration des propriétés immunologiques serait également due à une meilleure présentation des antigènes irradiés par les cellules immunocompétentes (macrophages). En effet, l'irradiation gamma entraîne des altérations structurales oxydatives au sein des molécules irradiées. Goldstein et *al* (1979) et Cardi et *al* (1998 b) rapportent que les macrophages « scavenger » phagocytent de façon préférentielle les antigènes oxydés ou portant des charges négatives. Baptista et *al* (2004) rapportent que l'immunisation d'animaux avec l'ovalbumine native entraîne une réponse immunitaire de type Th2, alors que l'immunisation avec l'ovalbumine irradiée entraîne une réponse immunitaire de type Th1. L'activation différentielle des deux types de lymphocytes (Th1 et Th2) peut être expliquée par la différence des cellules présentatrices d'antigène (CPA). En effet, la réponse de type Th2 est obtenue lorsque l'antigène est présenté par les lymphocytes B, alors que la réponse de type Th1 est obtenue quand la présentation de l'antigène se fait par les macrophages (Chang et *al.*, 1990). Les protéines irradiées étant préférentiellement phagocytées par les macrophages portant des récepteurs « scavenger », entraînent un « switch » vers une réponse de type Th1, améliorant ainsi leurs propriétés immunogènes.

L'amélioration des propriétés immunologiques après irradiation à la dose de 2 kGy a été rapportée par Nascimento et *al* (1996) et Cardi et *al* (1998a, b) pour la crotoxine du venin de *Crotalus durissus terrificus*, par Clissa et *al* (1999) pour le venin de *Crotalus durissus terrificus*, par Heffar-Bennacef et Laraba-Djebari (2003) pour le venin de *Vipera lebetina* et dans cette étude pour le venin de *Cerastes cerastes* et serait donc le résultat d'une agrégation protéique mais également d'une meilleure présentation des antigènes par les cellules immunocompétentes. L'irradiation gamma à 2 kGy semble être un outil intéressant pour la préparation d'immun-sérums hautement neutralisants.

Conclusion

VI. Conclusion et perspectives

L'irradiation gamma semble être une méthode efficace de détoxification des venins de serpents. Elle induit des altérations structurales au sein des molécules sous l'effet des radicaux libres engendrés par la radiolyse de l'eau. Elle réduit de façon considérable les activités toxiques et néfastes des composants du venin. Elle permet cependant la préservation des propriétés immunologiques des protéines du venin.

Les venins irradiés de *Cerastes cerastes* présentent des profils électrophorétiques complètement modifiés, ce qui semble être le résultat d'une agrégation protéique conduisant à une baisse de solubilité. Ils présentent une diminution des activités protéolytiques et coagulante. La diminution des activités enzymatiques est dépendante de la dose de rayonnements gamma reçue par les venins. L'activité phospholipase A₂ du venin de *Cersates cerastes* est radio-résistante aux doses et débit d'irradiation appliqués.

Les venins irradiés sont dépourvus de toute toxicité jusqu'à 10 DL₅₀. L'irradiation gamma des venins a induit également une diminution de l'activité hémorragique. Le venin de *Cerastes cerastes* présente une DMH de 3,2 µg/20 g de souris alors que les venins irradiés à 1 et 2 kGy présentent quant à eux respectivement des DMH de 17,06 et 780 µg/20 g de souris.

L'activité dermonécrotique a été mise en évidence dans le venin de ce *Viperidae* par une approche macroscopique et histologique. Cette activité présente un caractère dose-réponse et une DMN de 19 µg/20 g de souris. L'étude histopathologique a révélé de profondes altérations tissulaires au niveau du derme et de l'épiderme ainsi qu'une infiltration inflammatoire. La caractérisation biochimique de cette activité biologique serait liée à l'activité des métalloprotéinases du venin.

L'utilisation des anti-inflammatoires a montré l'implication de la voie de la cyclo-oxygénase et de la voie de la lipoxigénase dans les processus inflammatoires induits lors de l'envenimation. L'activation de ces deux voies serait le résultat de la complexité du venin, dont les différents composants peuvent agir à différents niveaux de la réponse inflammatoire. Ces travaux ont également montré le rôle joué par le TNF-α dans les dommages tissulaires provoqués.

L'irradiation gamma à 2 kGy a abolie l'activité dermonécrotique du venin de *Cerastes cerastes*, suggérant ainsi une altération structurale des composants du venin responsables de cette activité.

L'analyse d'immun-sérums anti-venin natif et anti-venins irradiés par une approche immunologique, a montré que les venins irradiés sont immunogènes. Cependant, l'immun-sérum dirigé contre le venin irradié à 2 kGy a une capacité neutralisante supérieure à celle des autres anti-venins. Tous les immun-sérums préparés sont capables de neutraliser de façon équivalente les activités hémorragique et dermonécrotique du venin.

La dose de 2 kGy semble être optimale car elle permet un bon compromis entre détoxification et conservation des propriétés immunogènes. Les toxoïdes ainsi obtenus semblent optimiser l'induction d'anticorps hautement neutralisant des activités toxiques et biologiques du venin. L'irradiation gamma présente l'avantage de préserver l'immunogénicité sans addition de molécules exogènes au venin, molécules qui peuvent détourner la réponse immunitaire à leur profit, comme cela a été observé pour d'autres méthodes chimiques de détoxification.

En perspective de ce travail, il serait intéressant

- d'approfondir l'étude des mécanismes inflammatoires mis en jeu dans l'activité dermonécrotique et cela dans la perspective de prévenir et de corriger de façon plus efficace les lésions nécrotiques et éviter ainsi les séquelles permanentes survenant après envenimation vipérine.
- de purifier les molécules impliquées dans l'activité dermonécrotique, de les irradier au ⁶⁰cobalt afin de produire des anticorps hautement neutralisants et de tester leur efficacité sur l'activité dermonécrotique du venin de *Cerastes cerastes*.

Références bibliographiques

VII. Références bibliographiques

Abib, H., 2002. Etude biochimique et histopathologique des effets œdématisques hémorragiques et myonécrotiques causés lors d'une envenimation expérimentale avec le venin natif et détoxifié de la vipère à corne *Cerastes cerastes*. Thèse de magister, USTHB, 127 pp.

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

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. Biochem. Biophys., 384, 216-226.

Anderson, S.G., Ownby, C.L., 1997. Pathogenesis of hemorrhage induced by proteinase H from eastern diamondback rattlesnake (*Crotalus adamanteus*) venom. Toxicon, 35, 1291-1300.

Andriani, E. P., 1994. Irradiação da crotoxina em solução aquosa: Influência das principais espécies reativas nas alterações estruturais, biológicas e imunológicas. MSc thesis, IPEN/CNEN/SP, Brazil.

Angulo, Y., Estrada, R., Gutiérrez, J. M., 1997. Clinical and laboratorial alterations in horses during immunization with snake venoms for the production of polyvalent *Crotalinae* antivenom. Toxicon, 35, 81-90

Angulo, Y., Núñez, C. E., Lizano, S., Soares, A. M., Lomonte, B., 2001. Immunochemical properties of the N-terminal helix of myotoxin II, a lysine-49 phospholipase A₂ from *Bothrops asper* snake venom. Toxicon, 39, 877-887.

- Bao, Y. Bu, P. Jin, L. Wang, H. Yang, Q. An, L., 2005.** Purification, characterization and gene cloning of a novel phospholipase A2 from the venom of *Agkistrodon blomhoffii ussurensis*. *Int. J. Biochem. Cell Biol*, **37**, 558-565.
- Baptista, J. A., Spencer, P. J., Aroeira, L. G. S., Casare, M. S., Nascimento, N., 2004.** Effects of gamma rays on the immunogenicity (IgG types) of ovalbumin. *Radiat. Phys. Chem*, **71**, 481-483
- Baramova, E. N., Shannon, J. D., Bjarnason, J. B., Gonias, S. L. Fox, J. W., 1990.** Interaction of hemorrhagic metalloproteinases with human α 2-macroglobulin. *Biochem*, **29**, 1069-1074.
- Baride, M., Jain, S. D., Gaitonde, B. B., 1980.** Biochemical studies on toxoids of venoms of poisonous Indian snakes. *Indian. J. Med. Res*, **72**, 571-576.
- Barraviera, B., Lomonte, B., Tarkowski, A., Hanson, L. A., Meira, D. A., 1995.** Acute-phase reactions, including cytokines in patients bitten by *Bothrops* and *Crotalus* snakes in Brazil. *J. Venom. Anim. Toxins*, **1**, 35-48.
- Bellfleur, J.P., Le Dantec, P., 2005.** Prise en charge hospitalière des morsures de serpent en Afrique. *Manuscrit n° 275*, 2-5.
- Berenbaum, F., 2004.** Prescription et surveillance des anti-inflammatoires stéroïdiens et non stéroïdiens. *La revue du praticien*, **54**, 781-785.
- Beutler, B., Cerami, A., 1988.** Tumor necrosis, cachexia, shock and inflammation : a common mediator. *Ann. Rev. Biochem*, **57**, 505-518.
- Bicalho., Rogerio, X., Orivaldo, A., Luiz, G., Heneine, D., Arios. ,Magalhaes, I. ,Felippe, H., 1990.** The effect of Stepwise iodination on biological properties of *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon*, **28**, 171-179.

Bjarnason, J. B., Hamilton, D., Fox, J. W., 1988. Studies on the mechanism of hemorrhage production by five proteolytic hemorrhagic toxins from *Crotalus atrox* venom. Biol. Chem. Hoppe-Seyler, **369**, 121–129.

Bjarnason, J. B., Hite, L. A., Shannon, J. D., Tapaninaho, S. J., Fox, J. W., 1993. Atrolysin E (hemorrhagic toxin E, E.C.3.4.24.44) and the non-hemorrhagic a-protease-comparative properties and sequence of a cDNA clone encoding atrolysin E. Evidence for signal, zymogen and disintegrin-like structures. Toxicon, **31**, 513.

Bjarnason, J.B., Fox, J.W., 1994. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. Pharmacol. Therapeut, **62**, 325–372.

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

Bogdan, C., Vodovotz, Y., Nathan, C., 1991. Macrophage deactivation by interleukin 10. J. Exp. Med, **174**, 1549-1555.

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

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

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

Boumpas, D.T., Chrousos, G.P., Wilder, R.L., Cupps, T.R., Balow, J.E., 1993. Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates. Ann. Intern. Med, **119**, 1198-1208.

Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilising principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*, **72**, 248-251.

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

Brinkmann, V., Kristofic, C., 1995. Regulation by corticosteroids of Th1 and Th2 cytokine production in human CD4⁺ effector T cells generated from CD45RO⁺ and CD45RO^q subsets. *J.Immunol.* **155**, 3322-3328.

Bugota, G., Dancewicz, A. M., 1983. Radiolytic and enzymatic dimerization of tyrosine residues in insulin ribonuclease, papaine and collagen. *Int. J. Radiat. Biol*, **43**, 249-265.

Butler, J., Land, E. J., Swallow, A. J., 1984. Chemical mechanisms of the effects of highenergy radiation on biological systems. *Radiat. Phys. Chem.* **24**, 273-282.

Butler, J., Honey, B. M., Swallow, A. J., 1987. Radiation chemistry. Annual. Report. Progress. Chemistry. Part C, **83**, 129-175.

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

Cardi, B. A., Andrade, Jr. H. F., Rogero, J. R., Nascimento, N., 1998-a. Differential biodistribution of native and 2 kGy ⁶⁰Co irradiated crotoxin in tissues of CBA/J mice. *Natural Toxins*, **6**, 19-25.

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

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., Theakston, 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. Quarterly Journal of Medicine, **86**, 315–325.

Chang, T., Shea, C. M., Urioste, S., Thompson, R. C., Boom, W. R., Abbas, A. K., 1990. Heterogeneity of helper/inducer T lymphocytes-Responses of IL-2 and IL-4-producing (Th1 and Th2) clones to antigens presented by different accessory cells. J. Immunol, **145**, 2803-2808.

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

Chaves, F., Teixeira, C. F. P., Gutiérrez, J. M., 2005. Role of TNF α , IL-1 β and IL-6 in the local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom : an experimental assessment in mice. Toxicon, **45**, 171-178.

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

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

Ciernick, I. F., Romero, P., Berzofsky, J. A., Carbone, D., 1999. Ionizing radiation enhances immunogenicity of cells expressing a tumor-specific T-cell epitope. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys, **45**, 735-741.

Civello, D. J., Moran, J. B., Geren, C. R., 1983. Substrate specificity of a hemorrhagic proteinase from timber rattlesnake venom. Biochem, **22**, 755-762.

- Clissa, P. B., Nascimento, N., Rogero, J. R., 1999.** Toxicity and immunogenicity of *Crotalus durissus terrificus* venom treated with different doses of gamma rays. *Toxicon*, **37**, 1131-1141.
- Collins, T., 1999.** Acute and chronic inflammation In: Cotran, R.S., Collins, V. (Eds.), *Pathologic Basis of Disease*. Saunders, Philadelphia, 50-88 pp.
- Costa, L. A., Fornari, M. C., Berardi, V. E., Miles, H. A., Diez, R. A., 2001.** In vivo effect of snake phospholipase A₂ (crotoxin + cardiotoxin) on serum IL-1 α , TNF α and IL-1ra level in humans. *Immunol. Lett*, **75**, 135-141.
- Dart, R., McNally, J. T., Spaite, D. W., Gustafson, R., 1992.** The sequelae of pit viper poisoning in the united states. Campbell JA, Brodie ED, eds. *Biology of the pit vipers*. Tyler, TX, Selva, 395-404.
- De Araujo, A. L., Souza, A. O., Cruz-Hofling, M. A., 2000.** *Bothrops lanceatus* (fer de lance) venom induces edema formation and increases vascular permeability in the mouse limb paw. *Toxicon*, **38**, 209-221.
- Debets, J. M., Kampsmeijer, R., Van der Linden, M. P., Buurman, W. A., Van der Linden, C. J., 1989.** Plasma tumor necrosis factor and mortality in critically ill septic patients. *Crit. Care. Med*, **17**, 489-494.
- Dennis, E. A., 1994.** Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A₂. *J. Biol. Chem*, **269**, 13057-13060.
- Dinarello, C. A., 1991.** The proinflammatory cytokines interleukin-1 and tumor necrosis factor and treatment of the septic shock syndrome. *J. Infect. Dis*, **163**, 1177-1183.
- Ding, A., Nathan, C. F., Stuehr, D. J., 1988.** Release of reactive nitrogen intermediates from mouse peritoneal macrophages. *J. Immunol*, **141**, 2407-2412.
- Du, X. Y., Clemetson, K. J., 2002.** Snake venom L-amino acid oxidases. *Toxicon*, **40**, 659-665.

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

Dutreix, J., Desgrez, A., Bok, B., Chevalier, C., 1973. Physique et biophysique : Bases de l'utilisation médicale et biologique des radiations, 2^{ème} édition et Cie, p164-170.

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

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

Escalante, T., Franceschi, A., Rucavado, A., Gutiérrez, J.M., 2000. Effectiveness of batimastat, a synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases, in neutralizing local tissue damage induced by BaP1, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Biochem. Pharmacol*, **60**, 269-274.

Escalante, T., Nuñez, J., Moura da Silva, A. M., Rucavado, A., Theakston, R. D. G., Gutiérrez, J. M., 2003. Pulmonary hemorrhage induced by jararhagin, a metalloproteinase from *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicol. Appl. Pharmacol*, **193**, 17-28.

Estevao-Costa, M. I., Diniz, C. R., Magalhaes, A., Markland, F. S. Sanchez, E. F., 2000. Action of metalloproteinases mutalysin I and II on several components of the hemostatic and fibrinolytic systems. *Thromb. Res*, **99**, 363-376.

Ferreira-Junior, R. S., Nascimento, N., Martinez, J. C., Alves, J. B., Meira, D. A., Barraveira, B., 2005. Immunological assessment of mice hyperimmunized with native and cobalt-60 irradiated *Bothrops* venoms. *J. Venom. Anim. Toxins incl Trop Dis*, **11**, 134-152.

Fiorentino, D. F., Zlotnik, A., Mosmann, T. R., Howard, M., O'Garra, A., 1992. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J. Immunol*, **147**, 3815- 3822.

Flowers , H. H., 1963. The effects of X- Irradiation on the biological activity of Cottonmouth moccasin (*Ancistrodon piscivorus*) venom. *Toxicon*, **1**, 131-136.

Flowers, H. H., 1966. Effects of X-Irradiation on the antigenic character of *Agkistrodon pscivorus* (Cottonmouth moccassin). *Toxicon*, **3**, 301-303.

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

Freitas, T. Y., Frézard, F., 1997. Encapsulation of native crotoxin in liposomes: a safe approach for production of antivenom and vaccination against *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon*, **35**, 91-100.

Fuly, A. L., Soares, A. M., Marcussi, S., Giglio, J. R., Guimaraes, J. A., 2004. Signal transduction pathways involved in the platelet aggregation induced by a D49 phospholipase A₂ isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Biochimie*, **86**, 731-739.

Gallacci, M., Nunes, E. C., Moreira, E. G., Nascimento, N., Rogero, J. R., Vassilieff, V. S., 1998. Reduction of crotoxin-induced neuromuscular blockade by gamma radiation. *Toxicon*, **36**, 941-945.

Gallacci, M., Nascimento, N., Rogero, J. R., Vassilieff, V. S., 2000. Influence of temperature upon effects of crotoxin and gamma-irradiated crotoxin at rat neuromuscular transmission. *Toxicol. Lett*, **114**, 77-80.

Genetet, N., 1993. Immunologie. Editions Médicales internationales, 469 pp.

Genetet, N., 2002. Immunologie. Editions Médicales internationales, (4^{ème} édition), 842pp.

Gentilini, M., 1995. Les serpents. Médecine tropicale. Editions Medecine-Science. Flammarion. 928 pp.

Giroud, J.P., Mathé, G., Meyniel, G., 1988. Pharmacologie clinique bases de la thérapeutique. Edition Expansion scientifique française, (2^{ème} édition), 710-738 pp.

Golblum, N., Devries, A., Moroz, C., 1966. Preparation of an antivenin against *Vipera palestinae* venom with high antineurotoxic potency. *Toxicon*, **4**, 205-208.

Goldstein, J. L., Ho, Y. K., Basu, S. K., Brown, M. S., 1979. Binding site on macrophages that mediate uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proceedings of the National Academy of sciences, USA*, **76**, 333-337.

Goncalves, L. R. C., Mariano, M., 2000. Local haemorrhage induced by *Bothrops jararaca* venom: relationship to neurogenic inflammation. *Mediat. Inflamm*, **9**, 101-107.

Guarnieri, J. M., Cruz, C. M., Murata, Y., Souza Filho, J. M., Nascimento, N., Rogero, J. R., 1990. Attenuation of *Bothrops jararaca* venom by ionizing radiation. *Toxicon*, **28**, 611.

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

Gutiérrez, J. M., Gené, J. A., Rojas, G., Cerdas, L., 1985. Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venoms by a polyvalent antivenom. *Toxicon*, **23**, 887-892.

Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., 1989. Local tissue damage by *Bothrops* snake venoms: a review. *Mem. Inst. Butantan*, **51**, 211-223.

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

Gutiérrez, J. M., Romero, M., Núñez, J., Chaves F., Borkow, G., Ovadia, M., 1995a. Skeletal muscle necrosis and regeneration after injection of BaH1, a hemorrhagic metalloproteinase isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo), *Exp. Mol. Pathol*, **62**, 28-41.

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

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

Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., 1997. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. In: Kini, R. M. (Eds). *Venom phospholipase A₂ enzymes: Structure, function and mechanism*. Wiley, UK, 321-223.

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

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

Hati, R. N., Mandal, M., Hati, A. K., 1990. Active immunisation of rabbit with gamma irradiated Russell's viper venom toxoid. *Toxicon*, **28**, 895-902.

Heffar-Bennacef, N., Laraba-Djebbari, F., 2003. Evaluation of the effect of gamma rays on the venom of *Vipera lebetina* by biochemical study. *Can.J. Physiol. Pharm*, **81**, 1110-1117.

Heneine, L. G. D., Cardoso, V. N., Daniel, J. P., Heneine, I. F., 1986. Detoxification of the T₂ fraction from a scorpion (*Tityus serrulatus*, Lutz and Mello) venom by iodination and some immunogenic properties of derivatives. *Toxicon*, **24**, 501-505.

Hogg, N., Darley-Usmar, V. M., Wilson, M. T., Moncada, S., 1992. Production of hydroxyl radicals from the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide. *Biochem. J*, **281**, 419-424.

Hong, S. Y., Lee, H., You, W. K., Chung, K. H., Kim, D. S., Song, K., 2003. The snake venom disintegrin salmosin induces apoptosis by disassembly of focal adhesions in bovine capillary endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, **302**, 502-508.

- Houssiau, F. A., Devogelaer, J. P., Damme, J., 1988.** Interleukin-6 in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritis. *Arthritis Reum*, **31**, 784-788.
- Jia, L. G., Wang, X. M., Shannon, J. D., Bjarnason, J. B., Fox, J. W., 1997.** Function of disintegrin-like/cysteine-rich domains of atrolysin A. Inhibition of platelet aggregation by recombinant protein and peptide antagonists. *J. Biol. Chem*, **272**, 13094-13102.
- Jia, L. G., Wang, X. M., Shannon, J. D., Bjarnason, J. B., 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.
- Jin, Y., Lu, Q. M., Li, D. S., Wang, W. Y., 2001.** Purification and characterization of jerdofibrase, a serine protease from the venom of *Trimeresurus jerdonii* snake. *Toxicon*, **39**, 1203-1210.
- Johnson, E. K., Ownby, C. L., 1993.** Isolation of a hemorrhagic toxin from the venom of *Agkistrodon contortrix laticinctus* (broadbanded copperhead) and pathogenesis of the hemorrhage induced by the toxin in mice. *Int. J. Biochem*, **25**, 267-278.
- Kamiguti, A. S., Theakston, R. D. G., Desmond, H., Hutton, R. A., 1991.** Systemic haemorrhage in rats induced by a haemorrhagic fraction from *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon*, **29**, 1097-1105.
- Kamiguti, A. S., Rugman, F. P., Theakston, R. D. G., Franca, F. O. S., Ishii, H., Hay, C. R. M., 1992.** The role of venom haemorrhagin in spontaneous bleeding in *Bothrops jararaca* envenoming. *Thromb. Haemost*, **67**, 484-488.
- Kamiguti, A. S., Slupsky, J. R., Zuzel, M., Hay, C. R. M., 1994a.** Properties of fibrinogen cleaved by jararhagin, a metalloproteinase from the venom of *Bothrops jararaca*. *Thromb. Haemost*, **72**, 244-249.

Kamiguti, A.S., Desmond, H.P., Theakston, R.D.G., Hay, C.R.M., Zuzel, M., 1994b. Ineffectiveness of the inhibition of the main haemorrhagic metalloproteinase from venom by its only plasma inhibitor, α_2 -macroglobulin. *Biochim. Biophys. Acta*, **1200**, 307-314.

Kamiguti, A. S., Hay, C. R. M., Zuzel, M., 1996a. Inhibition of collagen-induced platelet aggregation as the result of cleavage of $\alpha_2\beta_1$ -integrin by the snake venom metalloproteinase jararhagin. *Biochem. J*, **320**, 635-641.

Kamiguti, A. S., Hay, C. R. M., Theakston, R. D. G., Zuzel, M., 1996b. Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. *Toxicon*, **34**, 627-642.

Kamiguti, A. S., Gallagher, P., Marcinkiewicz, C., Theaskton, R. D. G., Zuzel, M., Fox, J. W., 2003. Identification of sites in the cysteine-rich domain of the class P-III snake venom metalloproteinases responsible for inhibition of platelet function. *FEBS Lett*, **549**, 129-134.

Kamijo, R., Harada, H., Matsuyama, T., Bosland, M., Gerecitano, J., Shapiro, D., Le, J., Koh, S. I., Kimura, T., Green, S. J., Mak, T. W., Taniguchi, T., Vilcech, J., 1994. Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophages. *Science*, **263**, 1612-1615.

Kanashiro, M.M., De Cassia, M., Escocard, R., Petretski, J.H., Prates, M.V., Alves, E.W., Machado, O.L., Da Silva, W.D., Kipnis, T.L., 2002. Biochemical and biological properties of phospholipases A_2 from *Bothrops atrox* snake venom. *Biochem. Pharmacol*, **64**, 1179-1186.

Kang, I., Lee, W. W., Lee, Y. S., 2000. Modulation of collagen-induced arthritis by IL-4 and dexamethasone: the synergistic effect of IL-4 and dexamethasone on the resolution of CIA. *Immunopharmacol*, **49**, 317-324.

Kempner, E. S., 2002. Effects of high-energy electrons and gamma rays directly on protein molecules. *J. Pharm. Sci*, **91**, 301.

Kini, R. M., Iwanaga, S., 1986. Structure function relationships of phospholipases I: prediction of presynaptic neurotoxicity. *Toxicon*, **24**, 527-541.

Kini, R. M., Evans, H. J., 1992. Structural domains in venom proteins: evidence that metalloproteinases and non enzymatic platelet aggregation inhibitors (disintegrins) from snake venoms are derived by proteolysis from a common precursor. *Toxicon*, **30**, 265-293.

Kocholaty, W. F., Goetz, J. C., Ashley, B. D., Billings, T. A., Ledford, E. B., 1968. Immunogenic response of the venom of fer de Lance , *Bothrops atrox asper* and La Casabella, *Crotalus durissus* following photooxidatif detoxification. *Toxicon*, **5**, 155-158.

Koh, Y.S., Chung, K.H., Kim, D.S., 2001. Biochemical characterization of a thrombin-like enzyme and a fibrinolytic serine protease from snake (*Agkistrodon saxatilis*) venom. *Toxicon*, **39**, 555-560.

Kondo, H., Kondo, S., Ikeezawa, H., Murata, R., Ohsaka, A., 1960. Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of habu snake venom. *Jap. J. Med. Sc. Biol*, **25**, 202-205.

Kondo, H., Kondo, S., Sadahiros, S., Yamauchi, K., Murata, R., 1972. Immunogenicity of purified toxoid of Habu snake (*Trimeresurus flavoviridis*) venom. *Jap. J. Med. Sc. Biol*, **25**, 202-205.

Kornalik, F., 1985. The influence of snake venom enzymes on blood coagulation. *Pharmacol. Ther*, **29**, 353-405.

Kunitz, M., 1947. Cristalline soybean trypsin inhibitor: IIa. General properties. *J. Gen. Physiol*, **30**, 291-310.

Kurecki, T., Kress, L. F., 1985. Purification and partial characterization of the hemorrhagic factor from the venom of *Crotalus adamanteus* (eastern diamondback rattlesnake). *Toxicon*, **23**, 657-668.

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

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.

Lambeau, G., Ancian, P., Barhanin, J., Lazdunski, M., 1994. Cloning and expression of a membrane receptor for secretory phospholipases A₂. *J. Biol. Chem*, **269**, 1575-1578.

Landucci, E. C., De 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 A₂ homologues: dissociation between enzymatic and biological activities. *Eur. J. Pharmacol*, **343**, 257-263.

Laraba-Djebari, F., Martin-Eauclaire, M. F., 1990. Purification and characterisation of phospholipase A₂ from *Cerastes cerastes* (horned viper) snake venom. *Toxicon*, **28**, 637-646.

Laraba-Djebari, F., Martin-Eauclaire, M. F., Marchot, P., 1992. A fibrinogen-clotting serine proteinase from *Cerastes cerastes* (horned viper) venom with arginine-esterase and amidase activities, Purification, characterization and kinetic parameter determination. *Toxicon*, **30**, 1399-1410.

Laraba-Djebari, F., Martin-Eauclaire, M. F., Mauco, G., Marchot, P., 1995. Afaacytin, an $\alpha\beta$ -fibrinogenase from *Cerastes cerastes* (horned viper) venom, activates purified factor X and induced serotonin release from blood platelets. *Eur. J. Biochem*, **233**, 756-765.

Laraba-Djebari, F., 1996. Etude de polypeptides pharmacologiquement actifs isolés à partir des venins de la vipère *Cerastes cerastes* et du scorpion *Androctonus australis hector* : purification, caractérisation biochimique et pharmacologique. Thèse de doctorat d'état, USTHB, 180 pp.

Lee, J. W., Yook, H. S., Lee, K.H., Kim, J. H., Kim, W. J., Byun, M. W., 2000. Conformational changes of myosin by gamma radiation. *Radiat. Phys. Chem*, **58**, 271-277.

León, G., Rojas, G., Lomonte, B., Gutiérrez, J. M., 1997. Immunoglobulin G and F(ab)₂ polyvalent antivenoms do not differ in their ability to neutralize hemorrhage, oedema and myonecrosis induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Toxicon*, **35**, 1627-1637.

León, G., Valverde, J. M., Rojas, G., Lomonte, B., Gutiérrez, J. M., 2000. Comparative study on the ability of IgG and Fab sheep antivenoms to neutralize local hemorrhage, oedema and myonecrosis induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Toxicon*, **38**, 233-244.

Levine, L., 1988. Arachidonate Metabolism in Immunologic Systems. Karger, Basel, 216 pp.

Lewis, E. J., Sedwick, A. D., Hanahoe, T. H.P., 1992. In vivo changes in plasma acute protein levels in the rat induced by slow release of IL-1, IL-6 and TNF. *Mediat. Inflamm*, **1**, 39-44.

Li, Y., Yu, B. Z., Zhu, H., Jain, M., Tsai, D., 1994. Phospholipase A₂ engineering. Structural and functional roles of the highly conserved active site residue aspartate-49. *Biochemistry*, **33**, 14714-14722.

Lloret, S., Moreno, J. J., 1993. Oedema formation and degranulation of mast cells by phospholipase A₂ purified from porcine pancreas and snake venoms. *Toxicon*, **31**, 949-956.

Lomonte, B., Tarkowski, A., Hanson, L. A., 1993. Host response to *Bothrops asper* snake venom: analysis of oedema formation, inflammatory cells and cytokine release in mouse model. *Inflammation*, **17**, 93-105.

Loria, G. D., Rucavado, A., Kamiguti, A. S., Theakston, R. D. G., Fox, J. W., Alape, A., Gutiérrez, J. M., 2003. Characterization of “basparin A”, a prothrombin-activating metalloproteinase, from the venom of the snake *Bothrops asper* that inhibits platelet aggregation and induces defibrination and thrombosis. *Arch. Biochem. Biophys*, **418**, 13-24.

Lu, Q. M., Jin, Y., Wei, J. F., Li, D. S., Zhu, S. W., Wang, W. Y., Xiong, Y. L., 2002a. Characterization and cloning of a novel phospholipase A₂ from the venom of *Trimeresurus jerdonii* snake. *Toxicon*, **40**, 1313-1319.

- Lu, Q. M., Jin, Y., Wei, J. F., Wang, W. Y., Xiong, Y. L., 2002b.** Biochemical and biological properties of *Trimeresurus jerdonii* venom and characterization of a platelet aggregation-inhibiting acidic phospholipase A₂. *J. Nat. Toxins*, **11**, 25-33.
- Malucelli, B. E., Mariano, M., 1980.** The haemorrhagic exudate and its possible relationship to neurogenic inflammation. *J. Pathol*, **130**, 193-200.
- Mandal, M., Hati, R. N., Hati, A. K., 1993.** Neutralization of pathophysiological manifestations of Russell's viper envenoming by antivenom raised against gamma- irradiated toxoid. *Toxicon*, **31**, 213-216.
- 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.
- 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**, 26-272.
- Mashiko, H., Takahashi, H., 1998.** Haemorrhagic factors from snake venoms. II. Structures of haemorrhagic factors and types and mechanisms of haemorrhage. *J. Toxicol-Toxin Reviews*, **17**, 493-512.
- Matsui, T., Fujimura, Y., Titani, K., 2000.** Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. *Biochim. Biophys. Acta*, **1477**, 146-156.
- McKay, D. G., Moroz, C., De Vries, A., Csavossy, I., Cruse, V., 1970.** The action of hemorrhagin and phospholipase derived from *Vipera palestinae* venom on the microcirculation. *Lab. Invest*, **22**, 387-399.
- Mebs, D., 1970.** A comparative study of enzyme activities in snake venoms. *Int. J. Biochem*, **1**, 335-342.
- Mebs, D., 2001.** Toxicity in animals. Trends in evolution? *Toxicon*, **39**, 87-96.

Mion, C., Olive, F., Hernandez, E., Martin, Y.N., Vieillefosse, A.S., Goyffon, M., 2002.

Action des venins sur la coagulation sanguine: diagnostic des syndromes hémorragiques. Bull. Soc. Pathol. Exot, **95**, 132-138.

Moore, K. W., O'Garra, A., de Waal, Malefyt, R., Vieira, P., Mosmann, T. R., 1993.

Interleukin-10. Ann. Rev. Immunol, **11**, 165-190.

Moreira, L., Borkow, G., Ovadia, M., Gutiérrez, J. M., 1994. Pathological changes induced by BaH1, a hemorrhagic proteinase isolated from Bothrops asper (terciopelo) snake venom, on mouse capillary blood vessels. Toxicon, **32**, 977-987.

Moreira, E. C., Nascimento, N., Rosa, G. J., Rogero, J. R., Vassilief, V. S ., 1997. Effect of gamma irradiation on the behavioral properties of crotoxin. Braz. J. Med. Biol. Res, **30**, 245-249.

Morita, T., 1998. Proteases which activate factor X, in: G.S. Bailey (Ed.), Enzymes from Snake Venom. Alaken, Fort Collins, CO, 179-208 pp.

Moroz, C., Goldblun, N., Vries, A. 1963. Preparation of Vipera palestinae antineurotoxin using carboxymethyl cellulose-bound neurotoxin as antigen. Nature, **200**, 697-698.

Mosmann, T. R., Coffman, R. L., 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to differential functional properties. Ann. Rev. Immunol, **7**, 145-173.

Moura-da-Silva A. M., Laing G.D., Paine M.J.I., Dennison J.M.T.J., Politi V., Crampton J.M., Theakston R.D.G., 1996. Processing of pro-tumor necrosis factor- α by venom metalloproteinases: a hypothesis explaining local tissue damage following snake bite, Eur. J. Immunol, **26**, 2000-2005.

Moura-da-Silva, A. M., Linica, A., Della-Casa, M. S., Kamiguti, A. S., Ho, P. L., Crampton, J. M., Theakston, R. D. G., 1999. Jararhagin ECD-containing disintegrin domain: expression in Escherichia coli and inhibition of the plateletcollagen interacion. Arch. Biochem. Biophys, **369**, 295-301.

Moura-da-Silva, A. M., Marcinkiewicz, C., Marcinkiewicz, M., Niewiarowski, S., 2001. Selective recognition of $\alpha 2\beta 1$ integrin by jararhagin, a metalloproteinase/disintegrin from *Bothrops jararaca* venom. *Thromb. Res*, **102**, 153-159.

Movat, H. Z., Cybulski, M. I., Colditz, I. G., Chan, W., Dinarello, C. A., 1987. Acute inflammation in gram-negative infection: endotoxin, interleukin 1, tumor necrosis factor and neutrophils. *Fed. Proc*, **46**, 97-104.

Mozes . T., Bem-Efraim, S., Tak, C. J., Heiligers, J. P., Saxena, P. R., Bonta, I. L., 1991. Serum levels of tumor necrosis factor determine the fatal or nonfatal course of endotoxic shock. *Immunol. Lett*, **27**, 157-162.

Murata, Y., Nishikawa, A. K., Nascimento, N., Higashi, H. G., Dias Da Silva, W., Rogero, J. R., 1990. Gamma radiation reduces the toxic activities of *Crotalus durissus terrificus* venom but does not affect their immunogenic activities. *Toxicon. Res. Commun*, **28**, 617.

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

Nishikata, M., 1984. Trypsin-like protease from soybean seeds: purification and some properties. *J. Biochem*, **95**, 53-61.

Ohsaka, A., Suzuki, K., Ohashi, M., 1975. The spurting of erythrocytes through junctions of the vascular endothelium treated with snake venom. *Microvasc. Res*, **10**, 208-213.

Ohsaka, A., 1979. Hemorrhagic, necrotizing and edema-forming effects of snake venoms. In: Lee, C.Y. (Ed.), *Handbook of Experimental Pharmacology*, vol. 52. Springer-Verlag, Berlin, 480-546 pp.

O'Sullivan, MG., Chilton, F.H., Huggins, E.M. Jr., McCall, C.E., 1992. Lipopolysaccharide priming of alveolar macrophages for enhanced synthesis of prostanoids involves induction of a novel prostaglandin H synthase. *J. Biol. Chem*, **267**, 14547-50.

- Otero, R., Gutiérrez, J., Mesa, M. B., Duque, E., Rodriguez, O., Arango, J. L., Gómez, F., Toro, A., Cano, F., Rodriguez, L. M., Caro, E., Martinez, J., Cornejo, W., Gómez, L. M., Uribe, F. L., Cardenas, S., Nuñez, V., Diaz, A., 2002. Complications of *Bothrops*, *Porthidium*, and *Bothriechis* snakebites in Colombia. A clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a university hospital. *Toxicon*, **40**, 1107-1114.
- Ouyang, C., Teng, C.M., Huang, T.F., 1992. Characterization of snake venom components acting on blood coagulation and platelet function. *Toxicon*, **30**, 945-966.
- Ownby, C. L., Geren, C. R., 1987. Pathogenesis of hemorrhage induced by hemorrhagic proteinase IV from timber rattlesnake (*Crotalus horridus*) venom. *Toxicon*, **25**, 517-526.
- Ownby, C. L., Bjarnason, J. B., Tu, A. T., 1978. Hemorrhagic toxins from rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom. Pathogenesis of hemorrhage induced by three purified toxins. *Am. J. Pathol*, **93**, 201-218.
- Ownby, C. L., Colberg, T. R., Odell, G. V., 1985. Ability of a mixture of antimyotoxin-a serum and polyvalent *Crotalidae* antivenom to neutralize myonecrosis, hemorrhage and lethality induced by prairie rattle snake (*Crotalus viridis viridis*) venom. *Toxicon*, **23**, 317-324.
- Parham, P., 2003. Le système immunitaire. De boeck éditions, 407 pp.
- Peichoto, M.E., Acosta, O., Leiva, L., Teibler, P., Marunak, S., Ruiz, R., 2004. Muscle and skin necrotizing and edema-forming activities of duvernoy gland secretion of the xenodontine colubrid snake *Philodryas patagoniensis* from the north-east of Argentina. *Toxicon* **44**: 589-596.
- Petricevich, V. L., Teixeira, C. F. P., Tambourghi, D. V., Gutiérrez, J. M., 2000. Increments in serum cytokine and nitric oxide levels in mice injected with *Bothrops jararaca* snake venoms. *Toxicon*, **38**, 1253-1266.

Pinho, J. R. R., Cardi, B. A., Andrade, Jr. H. F., Barr P. J., Bathurst, I. C., Vicente, E. J., Schenberg, A. C., 1995. Immunogenic properties of the *M leprae* recombinant 18 kDa antigen purified from *Saccharomyces cerevisiae*; enhancement of delayed-type hypersensitivity after gamma irradiation. *Int. J. Leprosy*, **63**, 381-390.

Queiroz, L. S., Santo Neto, H., Assakura, M. T., Reichl, A. P., Mandelbaum, F. R., 1985. Pathological changes in muscle caused by haemorrhagic and proteolytic factors from *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicon*, **23**, 341–345.

Radi, R., Beckman, J. S., Bush, K. M., Freeman, B. A., 1991. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J. Biol. Chem*, **266**, 4244-4250.

Ramirez, G. A., Fletcher, P. L., Possani, L. D., 1990. Characterization of the venom from *Crotalus molossus nigrescens* gloyd (black tail rattle snake): isolation of two proteases. *Toxicon*, **28**, 285-297.

Reid, A. H., Theakston, R. D. G., 1984. Les morsures de serpents. *Bull. WHO*, **62**, 27-38.

Rogero, J. R., Nascimento, N., 1995. Detoxification of snake venom using ionizing radiation. *J. Venom. Anim. Toxins*, **1**, 7-10.

Rucavado, A., Escalante, T., Franceschi, A., Chaves, F., León, G., Cury, Y., Ovadia, M., Gutiérrez, J. M., 2000. Inhibition of local hemorrhage and dermonecrosis induced by *Bothrops asper* snake venom: Effectiveness of early *in situ* administration of the peptidomimetic metalloproteinase inhibitor Batimastat and the chelating agent CaNa₂EDTA. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, **63**, 313-319.

Salafranca, E. S., 1972. Irradiated cobra (*Naja naja philippinesis*) venom. *Jpn. J. Med. Sci. Biol*, **25**, 206.

Samel, M., Subbi, J., Siigur, J., Siigur, E., 2002. Biochemical characterization of fibrinogenolytic serine proteinases from *Vipera lebetina* snake venom. *Toxicon*, **40**, 51-54.

Sanner, T., Pihl, A., 1969. Enzymological aspect of food irradiation: fundamental aspects of enzyme inactivation by ionizing radiation. IAEA-PL, **281**, 23-36.

Scherrmann, J. M., 2000. Biodynamique de la réaction antigène-anticorps *in vivo*. Bull. Acad. Nale. Med, **184**, 637-649.

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

Schessler, H., Freundl, K., 1983. Reactions of formate and ethanol radicals with bovine serum albumin studied by electrophoresis. Int. J. Radiat. Biol, **44**, 17-29.

Shalka, M., Antoni, F., 1970. Effect of radiation on the biological properties of proteins. Radiation sensitivity of toxins and animal poisons. Ed. Int. Atomic Energy Agency, 1-13.

Siigur, E., Tõnismägi, K., Trummal, K., Samel, M., Vija, H., Subbi, J., Siigur, J., 2001. Factor X activator from *Vipera lebetina* snake venom, molecular characterization and substrate specificity. Biochim. Biophys. Acta, **1568**, 90-98.

Silva, M. B., Schattner, M., Ramos, C. R. R., Junqueira-de-Azevedo, I. L. M., Guarnieri, M. C., Lazzar, M. A., Sampaio, C. A. M., Pozner, R. G., Ventura, J. S., Ho, P. L., Chudzinski-Tavassi, A. M., 2003. A prothrombin activator from *Bothrops erythromelas* (jararaca-da-seca) snake venom: characterization and molecular cloning. Biochem. J, **369**, 129-139.

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

Souza, D. H. F., Iemma, M. R. C., Ferreira, L. L., Faria, J. P., Oliva, M. L. V., Zingali, R. B., Niewiarowski, S., Selistre-de-Araujo, H. S., 2000. The disintegrin-like domain of the snake venom metalloproteinase alternagin inhibits $\alpha 2\beta 1$ integrin-mediated cell adhesion. Arch. Biochem. Biophys, **384**, 341-350.

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

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

Spencer, P. J., 1996. Biochemical and immunological alterations of ^{60}Co irradiated *Bothrops jararacussu* venom. *J. Venom. Anim. Toxins*, **2**, 165.

Spencer, P. J., Nascimento, N., Rogero, J. R., 1997. Effect of ^{60}Co gamma irradiation on the antigenic and immunogenic properties of *Bothrops jararacussu* venom. *J. Venom. Anim. Toxins*, **3**, 240.

Spencer, P.J., 2000. A effect of radiation on the structure of Bothropstoxin-1. *J. Venom. Anim. Toxins*, **6**, 282-291.

Spencer, P.J., Boni-Mitake, M., Costa, H., Vassileiff, V.S., Rogero, J.R., 2001. Effects of ^{60}Co gamma radiation on crotoxin. *Braz. J. Biol. Res*, **34**, 1531-1538.

Stabeli, R.G., Marcussi, S., Carlos, G.B., Pietro, R.C.L.R., Selistre-de-Araujo, H.S., Giglio, J.R., Oliveira, E.B., Soares, A.M., 2004. Platelet aggregation and antibacterial effects of an L-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom. *Bioorg. Med. Chem*, **12**, 2881–2886.

Stiles, B.G., Sexton, F.W., Weinstein, S.A., 1991. Antibacterial effects of different snake venoms: purification and characterization of antibacterial proteins from *Pseudechis australis* (Australian king brown or mulga snake) venom. *Toxicon*, **29**, 1129-1141.

Stocker, K., Fischer, H., Brogli, M., 1986. Chromogenic assay for the prothrombin activator ecarin from the venom of the sawscaled viper (*Echis carinatus*). *Toxicon*, **24**, 81-89.

Suhr, S.M., Kim, D.S., 1996. Identification of the snake venom substance that induces apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, **224**, 134–139.

Sun, L.K., Yoshii, Y., Hyodo, A., Tsurushima, A., Saito, A., Harakuni, T., Li, Y.P., Kariya, K., Nozaki, M., Morine, N., 2003. Apoptotic effect in the glioma cells induced by a specific protein extracted from Okinawa Habu (*Trimeresurus flavoviridis*) venom in relation to oxidative stress. *Toxicol. In Vitro*, **17**, 169–177.

Szold. O., Ben-Abraham. R., Weinbroum. A. A., Engelder. T. E., Ovadia. D., Sorkine. M., Bon. C., Flaison. R., Sorkine. P., 2001. Antagonization of TNF attenuates systemic hemodynamic manifestations of envenomation in a rat model of *Vipera aspis* snakebite. *Intensive Care Med*, **27**, 884-888.

Szold. O., Ben-Abraham. R., Frolkis. I., Sorkine. M., Sorkine. P., 2003. Tumor necrosis factor as a mediator of cardiac toxicity following snake envenomation. *Crit. Care Med.* **31**, 1449-1453.

Takatsuka, H., Sakurai, Y., Yoshioka, A., Kokubo, T., Usami, Y., Suzuki, M., Matsui, T., Titani, K., Yagi, H., Matsumoto, M., Fujimura, Y., 2001. Molecular characterization of L amino acid oxidase from *Agkistrodon halys blomhoffii* with special reference to platelet aggregation. *Biochim. Biophys. Acta*, **1544**, 267-277.

Takeya, H., Oda, K., Miyata, T., Omori-Satoh, T., Iwanaga, S., 1990. The complete amino acid sequence of the high molecular mass hemorrhagic protein HR1B isolated from the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. *J. Biol. Chem*, **265**, 16068-16073.

Tambourgi, D. V., Petricevich, V. L., Magnoli, F. C., Assaf, S. M. L. R., Jancar, S., Diaz da Silva, W., 1998. The endotoxemic-like shock induced by *Loxosceles* spider venom : pathological changes and putative cytokine mediators. *Toxicon*, **34**, 389-392.

Tanjoni, I., Butera, D., Bento, L., Della-Casa, M.S., Marques-Porto, R., Takehara, H.A., Gutie´rrez, J.M., Fernandes, I., Moura-da-Silva, A.M., 2003. Snake venom metalloproteinases: structure/function relationships studies using monoclonal antibodies. *Toxicon*, **42**, 801–808.

Tejason, P., Ottolenghi, A., 1970. The effect of ultra-violet light on the toxicity and the enzymatic and antigenic activities of snake venom. *Toxicon*, **8**, 225-233.

Tempone, A.G., Andrade Jr., H.F., Spencer, P.J., Lourenco, C.O., Rogero, J.R., Nascimento, N., 2001. *Bothrops moojeni* venom kills *Leishmania* spp. with hydrogen peroxide generated by its L-amino acid oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, **280**, 620-624.

Theakston, R. D. G., Reid, H. A., 1983. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. *Bull. WHO*, **61**, 949-956.

Theakston, R. D. G., Kamiguti, A. S., 2002. A list of animals toxins and some other natural products with biological activity. *Toxicon*, **40**, 579-651.

Tõnismägi, K., Samel, M., Trummal, K., Rönholm, G., Siigur, J., Kalkkinen, N., Siigur, E., 2006. L-amino acid oxidase from *Vipera lebetina*: isolation, characterization, effects on platelets and bacteria. *Toxicon*, **48**, 227- 237.

Toyama, M. H., Toyama, D. de O., Passero, L. F. D., Laurenti, M. D., Corbett, C. E., Tomokane, T. Y., Fonseca, F. V., Antunes, E., Joazeiro, P. P., Beriam, L. O. S., Martins, M. A. C., Monteiro, H. S. A., Fonteles, M. C., 2006. Isolation of a new L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cascavella* venom. *Toxicon*, **47**, 47-57.

Tsai, I. H., Wang, Y. M., Chen, Y. H., Tsai, T. S., Tu, M. C., 2004. Venom phospholipases A₂ of bamboo viper (*Trimeresurus stejnegeri*): molecular characterization, geographic variations and evidence of multiple ancestries. *Biochem. J*, **377**, 215-223.

Valentin, E., Lambeau, G., 2000. What can venom phospholipases A₂ tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipases A₂? *Biochimie*, **82**, 815-831.

Van Der Watt, S. J., Joubert, F. J., 1971. Studies on puff adder (*Bitis arietans*) venom. Purification and properties of protease A. *Toxicon*, **9**, 153-161.

Vargaftig, B. B., 1984. Les venins des serpents : de Calmette au développement de nouveaux outils pharmacologique. *Bull Inst Past*, **82**, 41-51.

Von Sonntag, C., 1987. The chemical basis of radiation. Taylor and Francis Eds, 429-439.

Wales, A., Kusel. J. R. 1992. Biochemistry of irradiated parasite vaccines: suggested models for their mode of action. *Parasitology Today*, **8**, 358-363.

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, Florida, 493-594 pp.

Warrell, D. A., 1996. Clinical features of envenoming from snake bites. In: Bon, C., Goyffon, M. (Eds.), *Envenomings and Their Treatments*. Fondation Marcel Mérieux, Lyon, 63-76 pp.

Wei, J. F., Wei, X. L., Chen, Q. Y., Huang, T., Qiao, L. Y., Wang, W. Y., Xiong, Y. L., He, S. H., 2006a. N49 phospholipase A₂, a unique subgroup of snake venom group II phospholipase A₂. *Biochim. Biophys. Acta*, **1760**, 462-471.

Wei, J. F., Li, T., Wei, X. L., Sun, Q. Y., Yang, F.M., Chen, Q. Y., Wang, W.Y., Xiong, Y. L., He, S. H., 2006b. Purification, characterization and cytokine release function of a novel Arg-49 phospholipase A₂ from the venom of *Protobothrops mucrosquamatus*. *Biochimie*, **88**, 1331-1342

Weil, J. H., Bonnet, J., Boulanger, Y., Chambon, P., Gautheron, D., Kedingner, C., Lazdunski, M., Montreuil, J., Patte, J. C., Rebel, G., Wright, M., 1983. *Biochimie générale*. IV Edition Masson, 470 pp.

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

Wilckens, T., De Rijk, R., 1997. Glucocorticoids and immune function: unknown dimensions and new frontiers. *Immunol.Today* **18**, 418-424.

Wu, W.B., Peng, H.C., Huang, T.F., 2003. Disintegrin causes proteolysis of b-catenin and apoptosis of endothelial cells. Involvement of cell-cell and cell-ECM interactions in regulating cell viability. *Exp. Cell. Res*, **286**, 115-127.

Zhang, Y.I., Wang, J.H., Lee, W.H., Wang, Q., Liu, H., Zheng, Y.T., Zhang, Y., 2003. Molecular characterization of *Trimeresurus stejnegeri* venom L-amino acid oxidase with potential anti-HIV activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **309**, 598-604.

Zhou, Q., Dangelmaier, C., Smith, J. B., 1996. The hemorrhagin catrocollastatin inhibits collagen-induced platelet aggregation by binding to collagen via its disintegrin-like domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **219**, 720-726.

Zuliani, J. P. Gutiérrez, J. M. Casais e Silva, L. L. Coccuzzo Sampaio, S. Lomonte, B. Teixeira, C. F. 2005. Activation of cellular functions in macrophages by venom secretory Asp-49 and Lys-49 phospholipases A₂. *Toxicon*, **46**, 523-532.

Absract

In this study, we report biochemical and immunological aspects of ^{60}Co gamma irradiation of *Cerastes cerastes* venom. The toxicity of 1 and 2 kGy irradiated venoms was completely abolished until 10 LD₅₀. Electrophoretic patterns of these toxoids were deeply modified as a result of protein aggregation. Irradiated venoms showed reduced caseinolytic, arginine-esterasic and coagulant activities depending on gamma rays dose. However, phospholipase activity was not modified; suggesting that this enzyme is radio-resistant at applied doses. Hemorrhagic activity was also reduced. This decrease was γ radiation dose dependant. Native *Cerastes cerastes* venom showed an important necrotic effect on mice skin, with a minimum necrotic dose of 19 μg of venom. Biochemical characterization shows that venom metalloproteinases are mostly involved in necrotic activity. The use of anti-inflammatory drugs (dexamethasone and indomethacin) also showed that both cyclooxygenase and lipoxxygenase pathways are involved in dermonecrosis. Pentoxifylline, an inhibitor of TNF- α synthesis produced a mild reduction of dermonecrotic activity of the venom. Skin sample obtained following injection of 1 kGy irradiated venom at a dose of 96 μg / 20 g of mice body mass, showed mild histopathological alterations. No abnormal pathological changes were recorded when mice received the above amount of 2 kGy irradiated venom. Immune sera were raised against native and irradiated venoms in rabbit. Immunological analysis of obtained sera, showed that antibodies elicited to toxoids were able to recognize native venom proteins, as shown in ELISA and western-blot analysis. Rabbit sera anti-2 kGy irradiated venom had a higher antibody titre. Immunoblot analysis showed that immune sera elicited to irradiated venoms were able to recognize all protein bands of native venom. Venom neutralization test assayed by i.p injection of varying amounts of native venom and a fixed amount of immune sera showed that anti-2 kGy irradiated venom was able to neutralize 8 LD₅₀, while anti-sera produced against native venom and 1 kGy irradiated venom neutralized only 6 and 5 LD₅₀ respectively. This indicates that 2 kGy gamma irradiation is a promising tool for venom attenuation, with preserving immunological properties.

Keywords: *Cerastes cerastes*; venom; Gamma irradiation; immunogenicity; antigenicity; hemorrhage;dermonecrosis; metalloproteinases; Pentoxifylline; PLA₂.

Résumé

Dans cette étude, sont rapportés les aspects biochimiques et immunologiques de l'irradiation gamma au ^{60}Co du venin de *Cerastes cerastes*. Deux doses de radiations gamma ont été utilisées : 1 et 2 kGy. La toxicité des venins irradiés a été complètement abolie jusqu'à 10 DL₅₀. Les profils électrophorétiques de ces venins sont totalement modifiés en raison d'une agrégation des protéines. Les venins irradiés présentent une diminution des activités caséinolytique, arginine-ester hydrolase et coagulante dépendant de la dose d'irradiation. Cependant, l'activité phospholipasique n'est pas modifiée; suggérant que cette enzyme est radio-résistante aux doses appliquées. L'activité hémorragique subit également une réduction. Cette réduction est dépendante de la dose d'irradiation. Le venin natif de *Cerastes cerastes* présente une importante activité nécrotique sur la peau de souris, avec une dose minimale nécrotique de 19 µg de venin. La caractérisation biochimique, montre une large implication des métalloprotéinases. L'utilisation des anti-inflammatoires (dexaméthasone et indométacine) a montré que les voies de la cyclo-oxygénase et de la lipoxygénase sont impliquées dans la dermonécrose. La pentoxifylline, un inhibiteur de la synthèse du TNF- α induit une réduction partielle de l'activité dermonécrotique du venin. Les peaux de souris obtenues après injection d'une dose de venin de 96 µg/20 g de masse corporelle de souris montrent de légères altérations histopathologiques. Lorsque les souris reçoivent la même dose de venin irradié à 2 kGy, l'étude histologique ne montre pas de modifications pathologiques. L'analyse par immunoblot montre que les immuns sérums produits contre les venins irradiés sont capables de reconnaître toutes les bandes protéiques du venin natif. Les tests de séroneutralisation effectués par injection i.p à des souris de plusieurs doses de venin avec un volume fixe d'immun sérum montrent que l'immun sérum anti-venin irradié à 2 kGy est capable de neutraliser jusqu'à 8 DL₅₀, alors que les immuns sérums produits contre le venin natif et le venin irradié à 1 kGy neutralisent seulement 6 et 5 DL₅₀ respectivement. Ces résultats montrent que l'irradiation avec une dose de 2 kGy est un outil prometteur pour la détoxification des venins tout en préservant les propriétés immunologiques de leurs constituants.

Mots clefs: *Cerastes cerastes*; venin ; Irradiation gamma ; immunogénicité ; antigénicité ; hémorragie ; dermonécrose ; métalloprotéinases ; Pentoxifylline; PLA₂.