

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



MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du diplôme de MAGISTER

En : SCIENCES DE LA NATURE

Spécialité : Biotechnologie et Santé

Par : CHELGHOUM Hayet

Sujet :

Etude de l'activité œdématisante et myotoxique induite par le venin de *Cerastes cerastes* : Caractérisation biochimique et pharmacologique.

Soutenu le 28/06/ 2009 , devant le jury composé de :

M ^{me} TOUIL-BOUKOFFA C., Professeur, USTHB.	Présidente
M ^{me} LARABA-DJEBARI F., Professeur, USTHB.	Directrice de Thèse
M ^{me} HAMMOUDI-TRIKI D., M. conférences, USTHB.	Examinatrice
M ^{me} HAMOULI Z., M. conférences, USTHB.	Examinatrice
M ^{me} OUSSEDIK-OUMEHDI H., M. conférences, USTHB.	Examinatrice

Résumé

Les envenimations ophidiennes constituent un sérieux problème de santé publique dans de nombreux pays dans le monde. En Algérie, les deux espèces répandues sont *Cerastes cerastes* et *Vipera lebetina*. Les morsures de *Cerastes cerastes* se traduisent par de graves perturbations tissulaires et métaboliques qui sont à l'origine de l'œdème, de l'hémorragie et de la nécrose tissulaire caractéristiques d'une envenimation vipérine.

Dans cette étude, les activités oedématisante et myotoxique du venin de *Cerastes cerastes* ont été rapportées. L'évaluation de l'activité enzymatique de la créatine kinase a permis de révéler l'activité myotoxique du venin de *Cerastes cerastes*. L'administration d'une dose subléthale du venin a provoqué une lyse des cellules musculaires (squelettiques et cardiaques) et donc une libération considérable de la créatine kinase dans le sang après 3 heures d'envenimation.

L'étude de l'activité oedématisante du venin de *Cerastes cerastes* a montré que l'œdème plantaire est un phénomène réversible temps- dépendant. Son maximum est atteint au bout de 3 heures d'envenimation. Une libération intense des cytokines pro-inflammatoires au niveau de la patte est observée au bout de 2 heures et qui a persisté jusqu'à 6 heures. Un pic de l'IL10 a été observé à 3 heures. Ces résultats sont en accord avec le phénomène d'apparition de l'œdème plantaire.

Afin de comprendre le mécanisme d'action du venin de *Cerastes cerastes* et de mettre en évidence les voies impliquées dans le phénomène d'apparition de l'œdème plantaire, des prétraitements avec des inhibiteurs spécifiques ont été utilisés. La voie des PLA₂ semblerait être moins impliquée dans le phénomène d'apparition de l'œdème plantaire induit par le venin de *Cerastes cerastes* ainsi que la voie de l'histamine et de la sérotonine. Le venin de *Cerastes cerastes* semble avoir une action sur le système rénine-angiotensine-aldostérone.

Mots clés : œdème, activité myotoxique et *Cerastes cerastes*

Remerciements

J'aimerais en tout premier lieu adresser ma plus sincère gratitude à *الله تعالى*, le tout puissant, le clément, le bienfaiteur, miséricordieux, de nous avoir donné la santé, la force, et la volonté d'achever à terme notre travail.

J'exprime tout particulièrement ma gratitude à Madame LARABA-DJEBARI F., Professeur à la Faculté des Sciences Biologiques, qui m'a fait l'immense honneur de me proposer ce sujet, qui a guidé patiemment mes premiers pas dans le monde fascinant des toxines de venins et qui m'a fait profiter de sa riche expérience. Je la remercie pour le temps et l'énergie qu'elle m'a consacrée lors de la réalisation de cette étude, malgré ses nombreuses responsabilités. Sa rigueur scientifique et ses suggestions m'ont beaucoup apporté. Qu'elle trouve ici l'expression de mon profond respect et de ma sincère reconnaissance.

Je tiens à remercier Madame TOUIL-BOUKOFFA C., Professeur à la Faculté des Sciences Biologiques, pour ses encouragements et ses orientations pendant la graduation et la post-graduation et qui me fait le grand honneur de présider ce jury.

Mes vifs remerciements s'adressent à :

Madame HAMMOUDI-TRIKI D., Maître de conférences à la Faculté des Sciences Biologiques, qui nous a fait bénéficier de ses connaissances et ses compétences. Nous la remercions pour l'honneur qu'elle nous fait en acceptant d'examiner ce travail

Madame OUSSEDIK-OUMEHDI H., Maître de Conférence à la Faculté des Sciences Biologiques, pour son soutien, ses précieux conseils et pour avoir aimablement accepté d'examiner ce travail.

Madame HAMOULI Z., Maître de conférences à la Faculté des Sciences Biologiques, pour l'honneur qu'elle me fait de bien vouloir accepter de juger cette thèse.

Monsieur le Professeur Boufersaoui Abdelkader., Professeur à la Faculté des Sciences Biologiques, qui nous a honorés de sa confiance en nous facilitant l'accès au Laboratoire d'Entomologie et qui a mis à notre disposition l'ensemble du matériel nécessaire à la réalisation de la partie histologique de cette étude.

Sans oublier tous les membres de notre équipe de Biomolécules, Mode d'action, Diagnostic et Immunothérapie, et notre promotion.

Je voudrais remercier nos ingénieurs de laboratoire, Souad et Assia, pour leur patience et leur soutien, ainsi que Soumeya et Amina.

Ma liste ne serait certainement pas complète si je ne remercie pas toute l'équipe du CCU, Eco-In et le Laboratoire de Botanique de la Fac. centrale pour tous les instants de bonheur et pour leur soutien.

Un grand merci à toute personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

DEDICACES

Mon cœur ne cesse de remercier Dieu,

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

Pour m'avoir donné des parents aussi formidables.

Pour m'avoir bien entouré de mes chers frères,

sœurs, beaux-frères et neveux.

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

sincères.

Pour m'avoir prodigué la force

d'aimer et d'être aimée.

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

Hayet

SOMMAIRE

Introduction	1
I.RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE	
I.1. Les serpents venimeux.....	3
I.2. La vipère à cornes <i>Cerastes cerastes</i>	3
I.3. Les venins de serpents	3
I.4. Composition des venins des vipères	5
I.4.1.les enzymes des <i>Viperidae</i>	5
I.4.1.1.Hyaluronidase	5
I.4.1.2.L.amino-acide oxydase	5
I.4.1.3. Les acétylcholinestérases	7
I.4.1.4.Les phospholipases A ₂	7
I.4.1.5.Les protéinases	9
I.4.1.5.1.Les métalloprotéinases	9
I.4.1.5.2.Les sérines protéinases.....	12
I.4.2. Les toxines des venins des <i>Viperidae</i>	14
I.4.2.1. Les α neurotoxines	14
I.4.2.2. Les β neurotoxines	14
I.4.2.3.Les cardiotoxines	14.
I.4.2.4. Les myotoxines	15
I.5. Venin de <i>Cerastes cerastes</i>	15
I.6. Les effets physiopathologiques.....	17
I.6.1. Effet oedématisant.....	17
I.6.2. Effet nécrotique.....	20

I.6.3. Effet hémorragique.....	21
I.6.4. Effet sur l'hémostase	21
II- Matériel et méthodes	
II.1- Matériel	
II.1.1- Matériel biologique	24
II.1.1.1-Le venin de <i>Cerastes cerastes</i>	24
II.1.1.2-Les souris	24
II.1.2- Matériel non biologique	24
II.2. Méthodes	
II.2.1. Mise en évidence de l'activité œdématisante dans le venin de <i>Cerastes cerastes</i>....	25
II.2.2.Caractérisation pharmacologique de l'œdème induit par le venin de <i>Cerastes</i> et sa fraction GF3	25
II.2.3.Dosage des cytokines et d'ICAM-1.....	25
II.2.4.Mise en évidence de l'activité myotoxique par l'évaluation de la créatine kinase .	26
II.2.5. Fractionnement du venin de <i>Cerastes cerastes</i> par chromatographie d'exclusion moléculaire sur Sephadex G75	27
II.2.6.Purification de la GF3 par une chromatographie échangeuse d'anions sur Sephadex DEAE-A-50	27
II.2.7.Effets du venin <i>C. cerastes</i> et ses fractions sur les muscles squelettiques et cardiaque.....	28
III- Résultats et discussion	
III.1.Cinétique de l'œdème plantaire induit par une dose subléthale du venin de <i>Cerastes cerastes</i>.....	29
III.2.Caractérisation pharmacologique de l'œdème induit par le venin de <i>Cerastes cerastes</i>	31

III.3. Etude de l'effet du venin <i>Cerastes cerastes</i> sur la synthèse des cytokines au niveau de la patte après envenimation expérimentale avec une dose sublétalement du venin.....	34
III.4. Dosage de la molécule d'adhésion intercellulaire-1 (l'ICAM-1) dans les pattes des souris envenimées avec une dose sublétalement du venin de <i>Cerastes cerastes</i>.....	38
III.5. Etude de l'activité myotoxique du venin de <i>Cerastes cerastes</i> par l'évaluation de la créatine kinase	38
III.6. Purification de(s) molécule(s) oedématisante(s) à partir du venin de <i>Cerastes cerastes</i>	
III.6.1. Fractionnement du venin de <i>Cerastes cerastes</i> par chromatographie d'exclusion moléculaire sur gel sephadex G75	42
III.6.2. Cinétique de l'œdème plantaire induit par les fractions oedématisantes du venin de <i>Cerastes cerastes</i> (GF1 et GF3)	42
III.6.3. Caractérisation pharmacologique de l'œdème plantaire induit par la fraction oedématisante du venin de <i>Cerastes cerastes</i> (GF3)	42
III.6.4. Dosage des cytokines de l'ICAM-1 dans la patte après injection de la fraction GF3	47
III.6.5. Essai de purification des molécules oedématisantes à partir de la fraction GF3 par chromatographie échangeuse d'anion sur DEAE-Sephadex G50.....	51
III.7. Effet du venin <i>Cerastes cerastes</i> et de ses fractions oedématisantes sur le muscle cardiaque	51
III.8. Effet du venin <i>Cerastes cerastes</i> et de ses fractions oedématisantes sur le muscle squelettique.....	55
DISCUSSION GENERALE.....	57
Conclusion et perspectives.....	63
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	65

Introduction

Introduction

Les envenimations ophidiennes constituent un sérieux problème de santé publique dans de nombreux pays du monde. Plus de 5 millions de cas d'envenimations surviennent chaque année provoquant plus de 100 000 décès. En Afrique, plus de 20 000 décès sont enregistrés et 400 000 de victimes d'envenimation gardent des séquelles fonctionnelles graves et permanentes (Chippaux et *al.*, 1999). En Algérie, deux vipères venimeuses sévissent dans les hauts-plateaux et dans les zones désertiques: *Cerastes cerastes* et *Vipera lebetina*.

Les venins de *Viperidae* constituent une source riche de biomolécules pharmacologiquement actives, agissant avec une grande spécificité sur de nombreuses cibles cellulaires et moléculaires. Ils sont essentiellement composés de peptides, protéines dont certaines sont douées d'activités enzymatiques. Ces molécules provoquent de graves dommages tissulaires, qui débutent au niveau du site de la morsure puis deviennent systémiques. La cause principale des décès par les morsures de serpents est due soit à une coagulation intra vasculaire, soit à un œdème pulmonaire ou à des troubles cardiaques (Laraba- Djebari, 1996).

La connaissance de la composition du venin de ces deux espèces, ainsi que celle des effets provoqués par ses constituants, serait utiles pour une meilleure prise en charge des victimes de morsures.

Dans ce présent travail, nous nous sommes intéressées à l'étude de l'activité oedématisante et myotoxique induite par le venin de la vipère à cornes *Cerastes cerastes*.

Dans un premiers temps, nous avons procédé à l'étude de la cinétique de l'œdème plantaire induit par une dose sublétales de venin de *Cerastes cerastes*, suivie par une caractérisation pharmacologique pour déterminer les voies impliquées dans le phénomène d'apparition de l'œdème. Cette étude a été complétée par un dosage des cytokines impliquées dans la réponse inflammatoire.

Dans un second temps, nous avons étudié l'activité myotoxique induite par le venin de *Cerastes cerastes*. Cette activité a été évaluée par le dosage de l'activité enzymatique de la créatine kinase dans le sang et dans les muscles (squelettique et cardiaque), et complétée par une étude histopathologique.

Ce travail a porté également sur un fractionnement du venin par une chromatographie d'exclusion moléculaire, dans un but de purifier une molécule oedématisante et (ou) myotoxique. La fraction qui nous a intéressés, a été soumise à une chromatographie échangeuse d'anions.

Rappel
bibliographique

I. RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Les serpents venimeux

Les serpents sont des reptiles amniotiques poïkilothermes. Leur taille varie de 12 cm à 10 m. Il existe environ 2500 espèces de serpents dont 540 espèces sont venimeuses.

La denture des serpents permet de les classer en 4 groupes : les Aglyphes, les Opisthogyphes, les Protéroglyphes et les Soléno-glyphes. Les espèces venimeuses appartiennent aux familles du groupe des Protéroglyphes (*Elapidae*, *Hydrophidae*) et des Soléno-glyphes (*Crotalidae*, *Viperidae*).

I.2. La vipère à cornes *Cerastes cerastes*

La vipère à cornes et *Vipera lebetina* sont celles qui posent le plus de problème d'envenimation dans la région qui 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* est largement répandue dans les régions désertiques et dans les hauts plateaux, (Laraba-Djebari, 1996).

Cerastes cerastes appartient à la famille des *Viperidae*, groupe des soléno-glyphes, avec un appareil venimeux performant constitué de crochet sans sillon externe. Au moment de la morsure, le venin s'écoule par le canal du crochet et pénètre dans la plaie (Boué et Chonton, 1974). La taille moyenne de cette vipère varie de 60 cm à 80 cm pour certaines espèces. Sa couleur jaune ambrée, s'harmonisant avec la couleur du sable lui permet d'être invisible durant la journée (Figure 1).

Chez l'homme, la morsure de cette vipère est mortelle, si elle n'est pas soignée immédiatement. Le tableau clinique présente des symptômes généraux graves et avec un œdème envahissant (Laraba-Djebari, 1996).

I.3. Les venins de serpents

Les venins de serpents sont des sécrétions glandulaires exocrines de type salivaire, injectées par un appareil spécialisé formé de un ou plusieurs crochets ayant un nombre, des formes, des positions très variées selon les espèces. Le venin est un mélange complexe de substances bioactives (enzymes et toxines), qui diffèrent par leur structure chimique, poids moléculaire, immunogénicité et activité biologique.



Figure 1 : la vipère à cornes *Cerastes cerastes* (OMS, 2001)

I.4. Composition des venins des serpents

Les substances pharmacologiquement actives des venins sont des polypeptides, des enzymes, des glycoprotéines et des substances de faible masse moléculaire (acides aminés, petits peptides, lipides, nucléosides, carbohydrates et bioamines). Toutes ces substances contribuent aux actions pharmacologiques des venins de serpents (Rivière et Bon, 2000).

I.4.1. Les enzymes des *Viperidae*

Les venins de *Viperidae*, représentent une des sources les plus riches en enzymes dont la majorité sont des hydrolases à l'exception de la L-amino-acide oxydase (Laraba-Djebari, 1996).

I.4.1.1. Hyaluronidase

La hyaluronidase est une enzyme qui catalyse l'hydrolyse des liaisons glycosidiques de certains mucopolysaccharides des tissus conjonctifs tels que l'acide hyaluronique ou le sulfate de chondroïtine (Iwanaga et Suzuki, 1979).

Les hyaluronidases ne sont pas toxiques, leur présence contribue à l'envenimation systémique par accélération de la diffusion du venin dans les tissus de la victime (Pukrittayakammee et *al.*, 1988).

I.4.1.2. L-amino-acide oxydase

Les L-amino-acide oxydases (LAAO) sont des flavoenzymes qui catalysent la désamination oxydative stéréospécifique de son substrat le L-amino acide (Massey et Curti, 1967 ; Curti et *al.*, 1992 ; Zhang et *al.*, 2003). Les LAAO des venins de serpents sont des enzymes homodimériques qui utilisent le FAD (Flavine Adénine Dinucléotide) ou le FMN (Flavine Mononucléotide) comme cofacteurs, avec une masse moléculaire qui varie de 120 à 150 kDa, mesurée dans des conditions non- dénaturantes et de 55 à 66 kDa pour la forme monomérique, leurs pH isoélectrique varie de 4,4 à 8,12 (Samel et *al.*, 2006 ; Souza et *al.*, 1999 ; Toyama et *al.*, 2006). Les LAAO sont impliquées dans plusieurs processus biologiques et pharmacologiques tels que l'induction de l'apoptose (Torii et *al.*, 1997 ; Ande et *al.*, 2008), la cytotoxicité (Ahn et *al.*, 1997), l'agrégation plaquettaire (Li et *al.*, 1994), l'hémorragie (Souza et *al.*, 1999), l'hémolyse (Abe et *al.*, 1998) et l'œdème (Ticli, 2006) (Figure2).

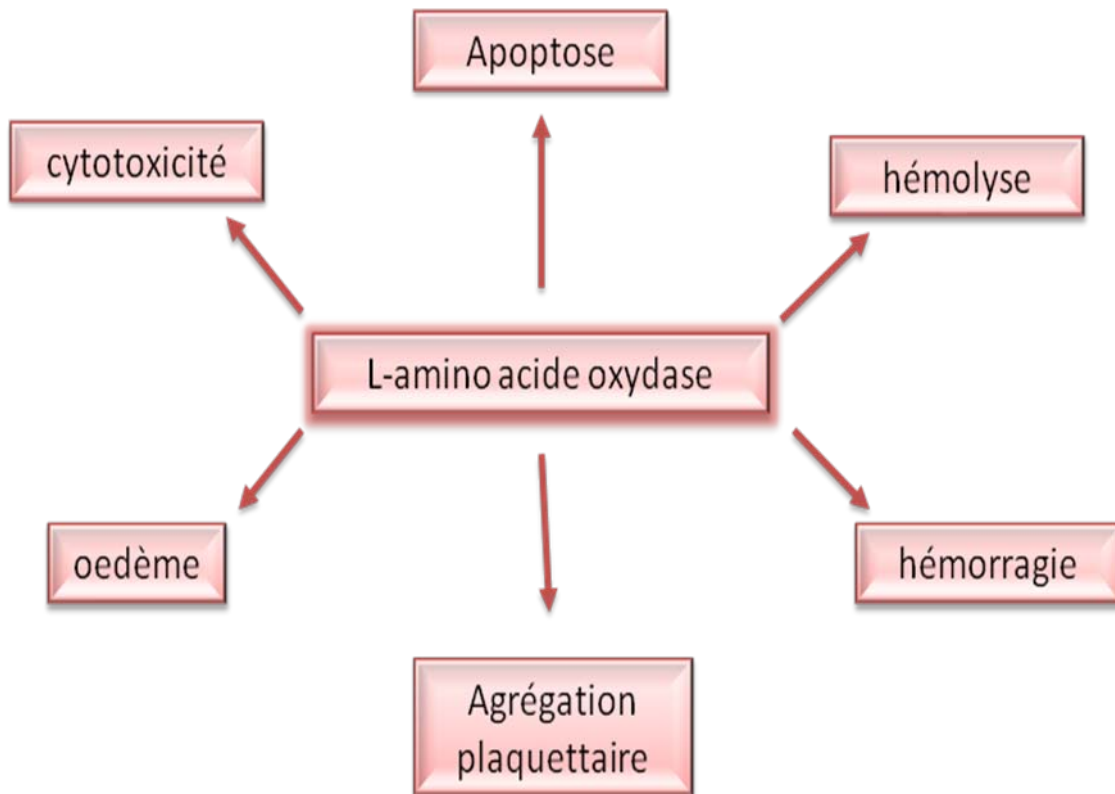


Figure 2: Schéma représentant les différentes activités des L-amino acide oxydase de serpents (Li et *al.*, 1994 ; Ahn et *al.*, 1997 ; Torii et *al.*, 1997 ; Souza et *al.*, 1999 ; Ticli, 2006 ; Ande et *al.*, 2008).

I.4.1.3. Les acétylcholinestérases

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

I.4.1.4. Les phospholipases A₂

Les phospholipases A₂ des venins de serpents présentent une masse moléculaire qui varie de 13 à 18 kDa. Elles hydrolysent les phospholipides spécifiquement en position sn2 les diacyl-sn-3phosphoglycérides et libèrent des lysophospholipides ainsi que des acides gras tel que l'acide arachidonique et lysophospholipides (Denis, 1994). L'acide arachidonique libéré peut jouer le rôle d'un second messager (Moreno, 1993) ou un précurseur des eicosanoïdes qui sont des médiateurs important dans l'inflammation et la transduction du signal. Alors que les lysophospholipides jouent un rôle important dans la signalisation cellulaire, le remodelage des phospholipides et la perturbation des membranes (Jensen et al., 2005).

Les venins de serpents, d'abeilles et le pancréas des mammifères constituent la source la plus importante de PLA₂ (Nishida et al., 1985). En fonction de leur source, leur masse moléculaire, leur homologie de séquence, le nombre de ponts disulfures et leurs effets pathologiques, Les PLA₂ des venins sont réparties en trois groupes :

- Les PLA₂ du groupe I : ont été isolées à partir des venins des *Elapidae* et des *Hydrophidae*
- Les PLA₂ du groupe II : ont été isolées à partir des venins des *Crotalidae*.
- Les PLA₂ du groupe III : ont été isolées à partir des venins des abeilles.

Les PLA₂ du groupe II sont subdivisées en deux sous groupes majeurs :

- les PLA₂ Asp 49 possédant un résidu Aspartate en position 49 et ayant une forte activité catalytique.
- les PLA₂ Lys 49 avec un résidu lysine en position 49 et ayant une faible ou sans activité catalytique (Ownby et al., 1999, Câmara et al., 2003).

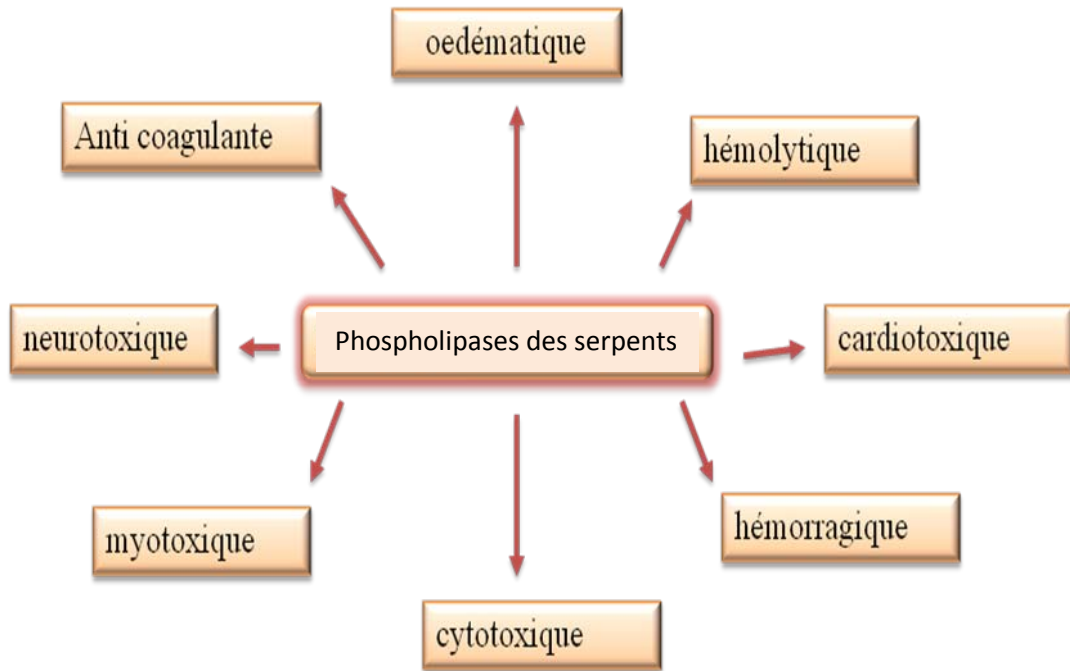


Figure 3: Schéma représentant les différentes activités des phospholipases A₂ de serpents (Kini et Evans, 1989; Harris et Franson, 1991; Ouyang et Kaminski, 1999; Hawgood, 2002; Dong et *al.*, 2003 ; Teixeira et *al.*, 2003).

En plus de l'activité enzymatique, les PLA₂ possèdent d'autres activités biologiques telles que l'activité anticoagulante, hémolytique, neurotoxique, myotoxique et oedémateuse, hémorragique, cytolytique, cardiotoxique, antiplaquettaire, des effets presynaptiques et musculotropique (Kini et Evans, 1989; Harris et Franson, 1991; Ouyang et Kaminski, 1999; Hawgood, 2002; Dong et al., 2003 ; Teixeira et al., 2003) (figure3).

I.4.1.5. Les protéinases

Les protéinases des venins de serpents représentent un groupe hétérogène de protéines enzymatiques de masse moléculaire variable de 15 à 380 kDa (Wisner et Bon, 2002). Certaines protéases exercent des effets activateurs ou inhibiteurs sur les mécanismes hémostatiques (Alexandre et al., 1988). D'autres agissent de manière non spécifique en hydrolysant les protéines de la matrice extracellulaire (fibronectine, le collagène et la laminine), (Labib et al., 1981). Ces enzymes exercent également des activités arginine hydrolase et amidase (Laraba et al., 1992). Parmi les protéinases, nous distinguons les métalloprotéinases et les sérines protéinases.

I.4.1.5.1. Les métalloprotéinases

De nombreuses enzymes protéolytiques des venins sont des métalloprotéinases qui n'exercent leur action catalytique qu'en présence d'un ion métallique, le plus souvent le Zinc (Bjarnason et Tu, 1978). Les métalloprotéinases à Zinc ont pour principale cible, la membrane basale de l'endothélium cellulaire (Marsh, 1994), qui est à l'origine du syndrome hémorragique. Ce dernier se manifeste localement et s'étend de manière systémique contribuant au choc cardiovasculaire caractéristique des envenimations sévères (Franceschi et al., 2000). Les métalloprotéinases sont également capables de dégrader plusieurs constituants de la matrice extracellulaire (collagène, protéoglycannes, fibronectine et laminine...), elles sont donc impliquées dans la pathogénèse de la nécrose tissulaire (Wang et Huang, 2002) (Figure 4).

Les métalloprotéinases des venins peuvent induire un effet oedémateux et libérer des cytokines inflammatoires telles que le TNF α , lorsqu'elles sont injectées dans le tissu musculaire ou incubées avec des macrophages *in vitro* (Gutierrez et Rucavado, 2000). Selon leur organisation structurale et leurs masses moléculaires, les métalloprotéinases des venins peuvent être divisées en quatre classes (Figure 5) :

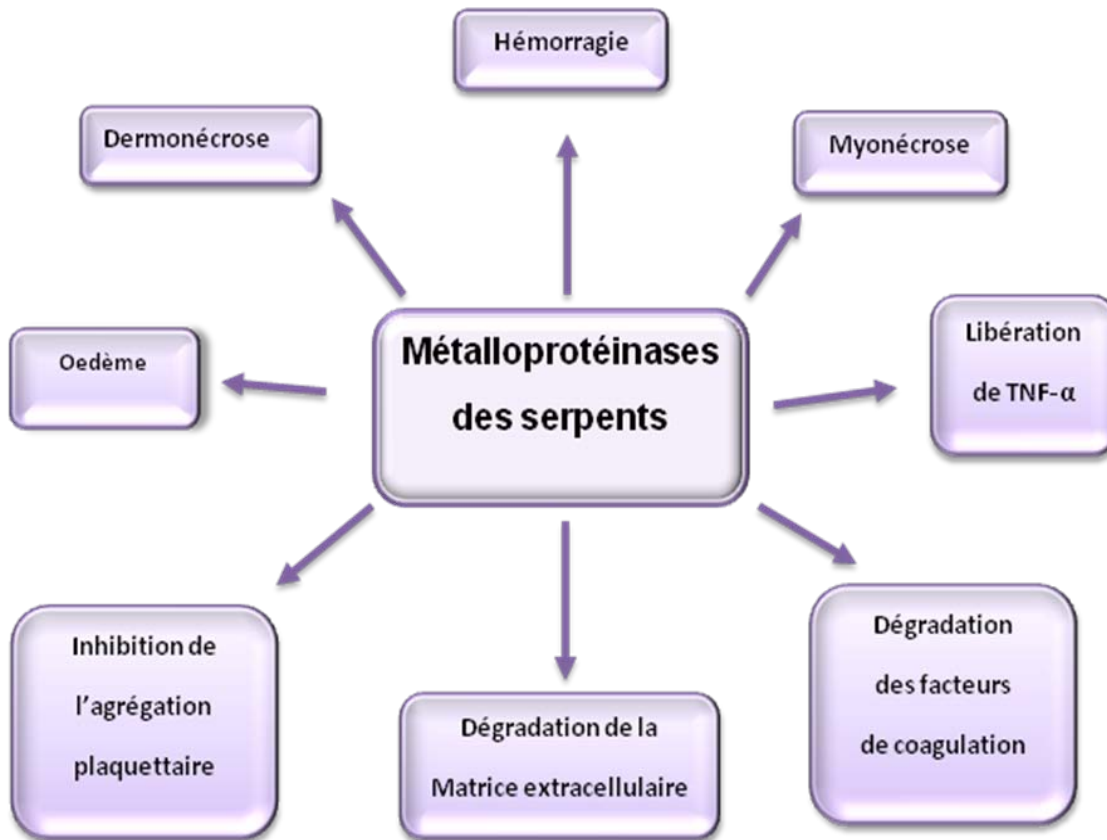


Figure 4: Rôle des métalloprotéinases de venins de serpents dans la pathogenèse de l'altération tissulaire après envenimation (Gutiérrez et Rucavado, 2000).

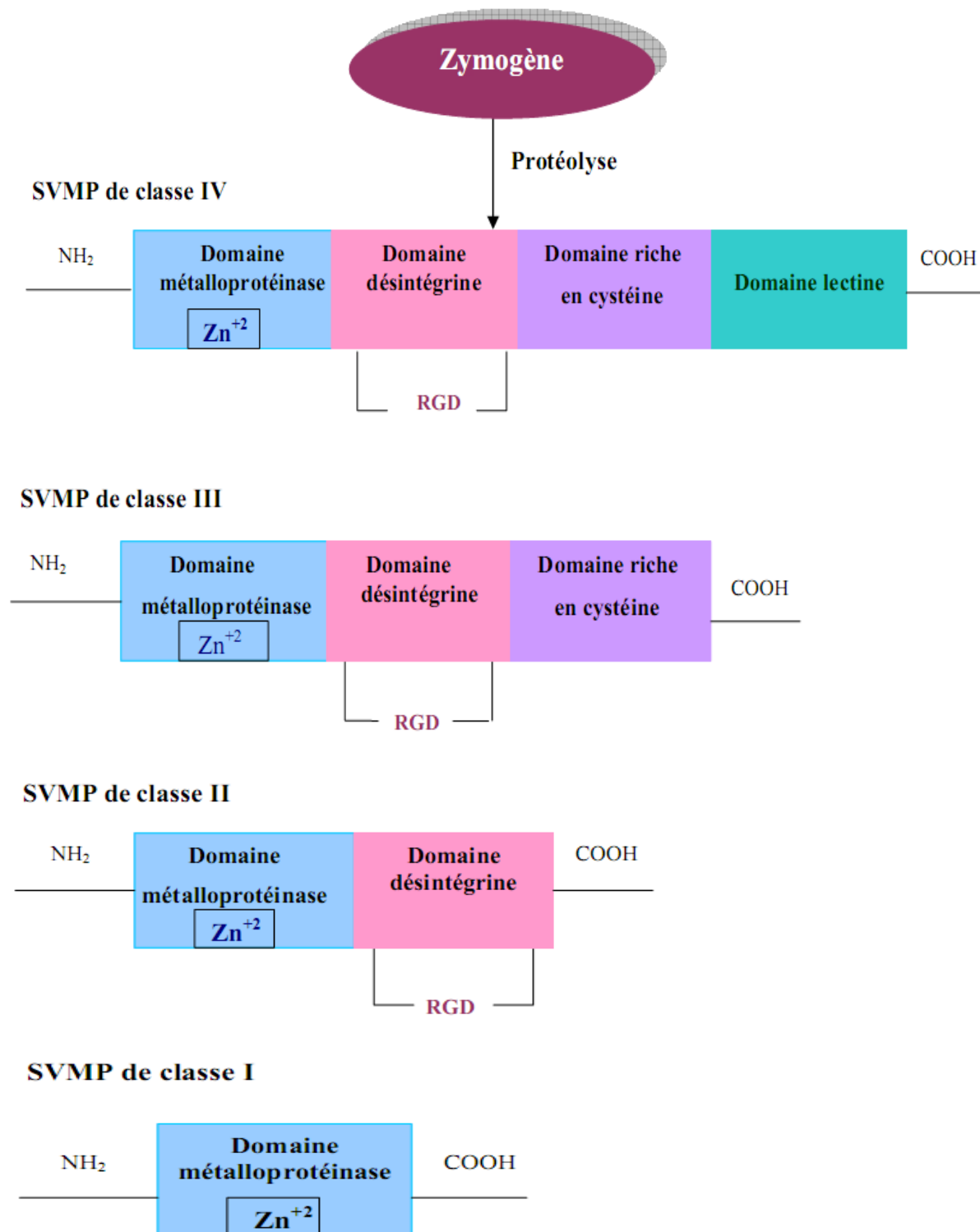


Figure 5 : Organisation structurale des différentes classes de métalloprotéinases de serpents (SVMP) (Kini et Evans, 1992).

-SVMP (snake venom metalloproteinases) de classe I :

Le poids moléculaire des métalloprotéinases de cette classe varie de 20 à 30 kDa. Elles sont constituées d'un domaine simple de métalloprotéinase constitué de 200 résidus d'acides aminés et qui contient un site de liaison pour un ion métallique et un site catalytique pour l'activité métalloprotéinase (Kini et Evans, 1992).

-SVMP de classe II :

Cette classe comprend les métalloprotéinases de poids moléculaire compris entre 30 et 60 kDa, elles possèdent, en plus du domaine métalloprotéinase, un domaine désintégrine du côté carboxyl-terminal. Le domaine désintégrine possède la séquence Arg-Glu-Ser (RGD), cette séquence détermine l'interaction de ce domaine avec les intégrines et augmente sa capacité à inhiber l'agrégation plaquettaire (Kini et Evans, 1992).

-SVMP de classe III

SVMP de classe III sont les hémorragines les plus puissantes avec une masse moléculaire variant entre 60 et 90 kDa. Elles possèdent un domaine métalloprotéinase, un domaine désintégrine et une extrémité C-terminale riche en Cystéine (Jia et *al.*, 1996). 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 IV

Cette classe des métalloprotéinases diffère structurellement de la précédente classe par l'existence d'un domaine de type lectine lié aux deux chaînes polypeptidiques des métalloprotéinases par des ponts dissulfures. La masse moléculaire de cette classe est supérieure à 90 kDa (Zhang et *al.*, 1994).

I.4.1.5.2. Les sérines protéinases

Les sérines protéinases interviennent à différentes étapes de l'hémostase (Figure 6) : Dans la coagulation et l'agrégation des plaquettes (Ouyang et *al.*, 1992), la fibrinolyse de la fibrine (Samel et *al.*, 2002), l'activation du facteur X et V, de la protéine C et du plasminogène (Laraba-Djebari et *al.*, 1995).

Les sérines protéinases des venins sont des enzymes qui ne sont pas toxiques par elles mêmes, mais lorsqu'elles sont associées à d'autres protéines du venin, elles peuvent rompre



Figure 6: 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).

l'équilibre hémostatique de la proie (Braud et *al.*, 2000). Ce groupe d'enzymes est caractérisé par la conservation de la triade catalytique « Ser₁₉₅, His₅₇, Asp₁₀₂ ».

I.4.2. Les toxines des venins des serpents

Les toxines des venins de serpents sont des polypeptides ou des protéines constituées de 30 à 130 résidus d'acides aminés, disposés en une seule chaîne dont les coudes sont maintenus par 4 à 5 ponts disulfures (Ménez, 1993, Harris, 1997).

Elles sont regroupées en plusieurs catégories selon leur constitution chimique ou leur action pharmacologique.

I.4.2.1. Les α neurotoxines

Les α neurotoxines sont caractéristiques des venins d' *Elapidae* et d'*Hydrophidae* (Ménez, 1993 ; Laraba-Djebari, 1996).

Elles se fixent sélectivement sur les récepteurs post-synaptiques de l'acétylcholine et provoquent un arrêt de la transmission neuromusculaire qui est suivi d'une paralysie des muscles et en particulier du diaphragme. Cette action paralysante est due à l'action de ces toxines sur les membranes des terminaisons axonales qui perdent leur capacité à libérer l'acétylcholine dans les fente synaptique (Ménez, 1995 ; Harris, 1997 ; Dixon et Harris, 1999).

I.4.2.2. Les β neurotoxines

Les β neurotoxines sont des PLA₂ basiques de toxicité trop élevée. Elles sont présentes dans les venins des serpents d'*Elapidae* et d'*Hydrophidae* (Ménez, 1993).

Ces toxines sont constituées de 120 à 130 résidus d'acides aminés, reliés par 6 à 7 ponts disulfures (Harris, 1997). Elles ont une action prés-synaptique en empêchant l'acétylcholine de se fixer sur son récepteur nicotinique.

I.4.2.3. Les cardiotoxines

Les cardiotoxines ou cytotoxines présentent des homologies avec les α neurotoxines, sans être neurotoxiques (Harris, 1997). Elles sont présentes dans les venins d'*Elapidae* et *Crotalidae*.

Elles peuvent dépolariser les muscles cardiaque, squelettique et lisse. Ces muscles restent contractés et peuvent dépolariser les cellules nerveuses ce qui conduit à une perte de l'excitabilité (Kini et Evans, 1989). Elles affectent l'intégrité et la perméabilité des membranes cellulaires (Laraba-Djebari, 1996).

I.4.2.4. Les myotoxines

Les myotoxines sont des polypeptides basiques isolés à partir des venins de *Viperidae* et *Crotalidae*, dépourvus d'activité enzymatique. Ils ne présentent qu'une activité myotoxique, certaines possèdent une activité enzymatique phospholipasique. L'activité myotoxique semble être liée à la présence de deux séquences peptidiques qui se suivent à l'extrémité C-terminale de ces molécules (Ownby et Colberg, 1988 ; Lomonte et *al.*, 1990). La première séquence est riche en acides aminés cationiques. La deuxième séquence est riche en acides aminés hydrophobes. Les deux séquences sont reliées par quatre ponts disulfures (Kini et Iwanaga, 1986 ; Angulo et *al.*, 2001).

Les PLA₂ myotoxiques possèdent des résidus très conservés au niveau du site actif (His₄₈, Asp₄₉, Tyr₅₂ et Asp₉₉). Le résidu Asp₄₉ se lie au Calcium. Ce dernier est un cofacteur essentiel à l'activité phospholipasique mais il n'est pas indispensable pour l'activité myotoxique des PLA₂ myotoxiques. La substitution de l'Aspartate en position 49 en lysine empêche la fixation du Calcium d'où la perte de l'activité phospholipasique tout en conservant l'activité myotoxique (Lomonte et *al.* ; 2003).

Les myotoxines provoquent des nécroses au niveau des régions mordues et des œdèmes. La lyse de nombreux types cellulaires (musculaires, neuronales, macrophages et fibroblastes) (Bruses et *al.*, 1973) et une augmentation de la perméabilité de la membrane du sarcolemme sont également observées (Chang et Tseng, 1978).

I.5. Venin de *Cerastes cerastes*

Le venin de *C. cerastes* se présente, sous forme d'un liquide de consistance visqueuse et d'une coloration le plus souvent jaune ombrée. Cette couleur est due à la présence d'une flavoprotéine la L-amino-acide-oxydase. Sa viscosité varie de 1,5 à 2,5, son pH varie entre 5,5 et 7 (Chippaux et *al.*, 1999).

Le venin de *Cerastes cerastes* est doué d'activités biologiques diverses (hémolytique, hémorragique, coagulante, anti-coagulante, œdématisante, myotoxique et dermonécrotique) (Laraba-Djebari, 1984).

A partir du venin de *Cerastes cerastes*, plusieurs molécules ont été isolées et caractérisées parmi lesquelles :

- Une hyaluronidase présentant une masse moléculaire de 75 kDa (Labib et *al.*, 1979)
- Une PLA₂ de masse moléculaire de 14,5 kDa qui hydrolyse la lécithine (Laraba-Djebari et *al.*, 1992).
- RP34: qui est une sérine-protéinase de type thrombine, constituée de deux sous unités de 48,5 kDa chacune. Elle possède les activités caséinolytique, arginine estérase et amidase (Laraba-Djebari et *al.*, 1992).
- Afaâcytine: qui est une sérine-protéinase de type thrombine, constituée de deux sous unités α et β , de masse moléculaire 40 kDa et présente les propriétés de 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: 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 les chaînes α et β du fibrinogène (El -Asmar et *al.*, 1986).
- Cerastocytine: une sérine-protéase de type thrombine ayant une activité amidolytique avec une masse moléculaire de 38 kDa. Cette protéine permet l'agrégation des plaquettes ainsi que l'activation du facteur XIII (Marrakchi et *al.*, 1997).
- Cerastotine: 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).
- Deux PLA₂ glycosylés non toxiques CC-PLA₂-1 et CC-PLA₂-2 de masse moléculaire respectivement de 13 737,52 et 13 705,63 Da ont été isolées à partir du venin de *C. cerastes* de Tunisie. Ces deux molécules ont la capacité d'inhiber l'adhésion et la migration des cellules cancéreuses (Zouari- Kessentini et *al.*, 2009)

I.6. Les effets physiopathologiques

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 (Laraba-Djebari, 1996).

Les venins de *Viperidae* et *Crotalidae* induisent des effets physiopathologiques caractérisées par l'hémorragie, la nécrose, l'œdème, des effets systémiques telles que la coagulopathie, La néphrotoxicité et les altérations hémodynamiques (Warrel, 1995, 1996).

I.6.1. Effet oedématisque

Le terme d'œdème désigne toute accumulation anormale de liquide dans un compartiment de l'organisme entraînant un gonflement (Colombe et Massot, 2000). Il peut s'observer dans des organes internes ou dans les tissus superficiels, traduisant la défaillance des mécanismes de maintien de l'homéostasie (Ross et Wilson, 2003).

Un œdème est une accumulation de liquide dans l'espace extracellulaire, qui est composé de deux compartiments: le volume plasmatique et le volume interstitiel (Colombe et Massot, 2000). Le milieu extracellulaire est constitué d'une solution dont la pression osmotique est liée à la concentration du sodium qui est majoritaire (95%).

Le volume interstitiel est régulé par des phénomènes passifs constitués par des échanges d'eau et de solutés avec le volume plasmatique à travers la paroi capillaire et le drainage lymphatique. Ces échanges trans-capillaires obéissent aux règles de la diffusion des solutés en fonction des gradients de concentration et de la filtration convective des fluides, gradients de pression oncotique et hydrostatique modélisés par la loi de Starling (Figure 7) :

$$Q = P.S [(P_c - P_i) - \sigma (\pi_c - \pi_i)]$$

Q : Le flux du liquide.

P : La perméabilité de la membrane.

S : La surface d'échange.

P_c : La pression capillaire.

P_i : La pression interstitielle.

σ : Le coefficient de réflexion (dépend de la membrane et de la molécule).

π_c : La pression oncotique capillaire.

π_i : La pression oncotique interstitielle.

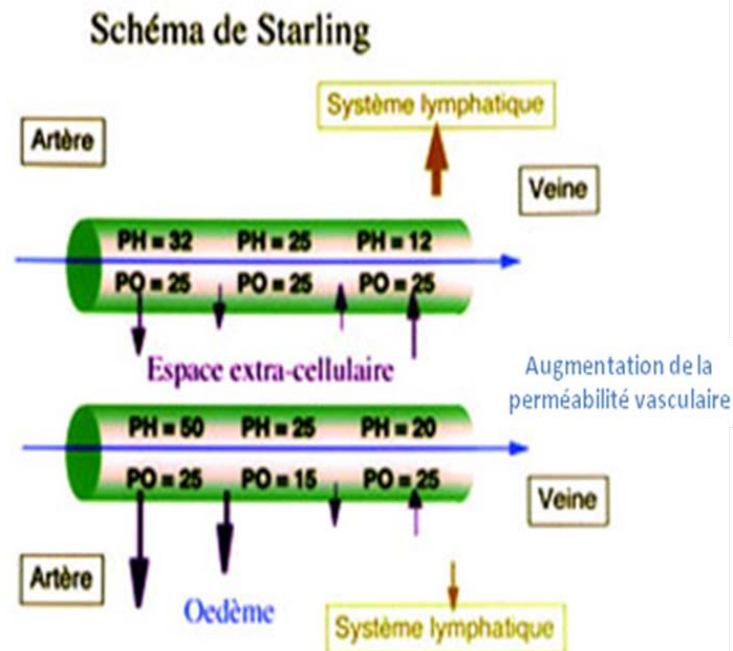


Figure 7 : Mécanisme de formation de l'œdème (Cabanne et Bonenfant, 1980).

En haut : la situation normale. La pression artériolaire (PH : pression hydrostatique) qui tend à faire sortir les liquides du vaisseau vers le tissu est supérieure à la pression oncotique (PO), développée par les protéines sanguines, qui tend à faire entrer les liquides dans la lumière du vaisseau (à gauche). Cette situation est inversée dans le segment veineux (à droite). L'équilibre est obtenu, les échanges sont effectués sans excès de liquide dans le tissu.

En bas, les conditions pathologiques susceptibles d'entraîner un œdème : augmentation de la pression hydrostatique artériolaire ou veineuse, diminution de la PO (hypoprotéinémie), obstacle au retour lymphatique. Ces diverses conditions conduisent à un déséquilibre en faveur de la sortie des liquides de la lumière du vaisseau vers le tissu : œdème tissulaire.

A l'équilibre, les flux dus à chacune des différences de pression s'annulent et la résultante est nulle. Une modification de chaque variable change la répartition des liquides entre le compartiment vasculaire et interstitiel. Une augmentation de la perméabilité capillaire (ex: inflammation), une diminution de la pression oncotique (ex: hypoalbuminémie) ou une augmentation de la pression hydrostatique (ex: insuffisance veineuse), favorisera l'accumulation de liquide dans l'espace interstitiel et la formation d'œdème (Cabanne et Bonenfant, 1980).

Le système lymphatique récupère l'eau qui transsude des capillaires pour la renvoyer dans la circulation systémique (jusqu'à 8 litres par jour) et il faut que ce système soit saturé pour que les œdèmes deviennent apparents. Un dysfonctionnement du système lymphatique peut également entraîner la formation d'œdème, mais ceux-ci auront un aspect différent en raison d'une plus forte teneur en protéines et de l'absence de drainage (Sophie de Seigneux et *al.*, 2003).

Les venins de serpents provoquent une augmentation de la perméabilité capillaire qui pourrait être liée à une action combinée de la PLA2, de myotoxines, de protéases et de facteurs hémorragiques contenus dans les venins des serpents. Dans les formes sévères, l'œdème devient extensif et s'accompagne d'hémorragies intenses (De Araujo et *al.*, 2000).

L'effet œdémateux est principalement attribué aux PLA2 capables de dégrader les phospholipides membranaires. Cette hydrolyse conduit à la libération de précurseurs de la biosynthèse des prostaglandines et des leucotriènes. Ces molécules induisent l'augmentation de la perméabilité capillaire (Chaves et *al.*, 1995 ; Gutiérrez et Lomonte, 1995).

Les médiateurs libérés par les mastocytes telles que l'histamine, la sérotonine, lors de l'envenimation par les venins de *Viperidae*, sont impliqués dans l'induction de l'œdème local (Bonta et *al.*, 1979 ; Ohsaka, 1979).

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

Le système rénine-angiotensine-aldostérone est responsable de la régulation de la rétention de sel et l'eau, et donc la régulation de la pression artérielle. Une hyper activation de ce système provoque une rétention anormale d'eau dans les tissus (œdème) et une hypertension artérielle qui est un risque majeur pour entraîner un œdème pulmonaire aigue

(OPA). Il semble que ce système soit impliqué dans la formation de l'œdème plantaire induit par le venin de *Bothrops lancealus* (De Faria et al., 2001).

I.6.2. Effet nécrotique

Les venins des serpents provoquent des troubles cardiovasculaires, digestifs, respiratoires, rénaux et hépatiques (Boquet, 1970 ; Mebs et Panohozer, 1982 ; Rahmy et al., 1995), qui sont caractérisés par des hémorragies, des œdèmes et des nécroses tissulaires.

Les venins de serpents renferment de nombreuses enzymes aux spécificités très variées, les protéinases, les arginines-ester-hydrolases et des phospholipases (Oshima et al., 1969). Ces enzymes agissent sur les plaquettes et l'endothélium des vaisseaux et provoquent une nécrose tissulaire. Les enzymes protéolytiques peuvent être responsables de la nécrose des fibres musculaires (myonécrose), pouvant entraîner l'infirmité permanente d'un membre ou mener à l'amputation (Ownhy et Colberg, 1988 ; Guitierrez et Lomonte, 1995).

La myonécrose provoquée lors d'une morsure de serpent est un phénomène très complexe qui peut résulter, soit de l'action directe des myotoxines sur la membrane plasmique des cellules musculaires, soit des conditions ischémiques induites par les métalloprotéinases hémorragiques (Andrio- Escarso et al., 2000).

Différents types de myonécroses ont été identifiées sur la base morphologique des cellules endommagées.

- Une nécrose myolytique

C'est un type de nécrose dans lequel les cellules sont lysées et apparaissent très acidophiles et la taille du noyau est très réduite, ce type de nécrose n'est pas accompagné par une hémorragie (Ownhy et Colberg, 1988).

- Une nécrose coagulative

Dans ce cas, les cellules endommagées ont une apparence hyaline amorphe accompagnée d'une hémorragie (Ownhy et Colberg, 1988).

- Une nécrose mixte

Dans ce cas, la nécrose associe une lyse cellulaire et une hémorragie. De nombreux venins de serpents d'Afrique induisent à la fois un syndrome hémorragique et nécrosant (Kouyoumandjian et *al.*, 1986).

I.6.3. Effet hémorragique

L'hémorragie résulte de la rupture des vaisseaux sanguins. Il existe deux manières par lesquelles une hémorragie peut se traduire, soit une hémorragie par diapédèse où les jonctions intercellulaires des cellules endothéliales des capillaires s'écartent permettant ainsi au sang de s'échapper vers l'espace du tissu conjonctif, soit une hémorragie où les cellules endothéliales des capillaires subissent une lyse, conduisant à l'apparition de larges vides intracellulaires à travers lesquels le sang s'échappe. Cette voie est considérée comme étant le processus réel qui s'établit *in vivo*.

L'hémorragie est induite par les métalloprotéinases qui dégradent les protéines de la membrane basale des vaisseaux sanguins. Elle peut être également provoquée par les PLA2 myotoxiques qui hydrolysent les phospholipides membranaires, induisant une lyse des cellules endothéliales (Ownby et *al.*, 1990 ; Bjarmason et Fox, 1994).

I.6.4. Effet sur l'hémostase

Les venins de serpents contiennent de nombreux composants qui affectent l'hémostase en causant des changements dans la coagulation du sang et dans le fonctionnement des plaquettes. La majorité de ces composants ont des propriétés coagulantes (telles que la conversion du fibrinogène en fibrine, l'activation de la prothrombine ou du facteur X), ils induisent la diminution des facteurs de coagulation et rendent le sang incoagulable (Kamiguti et *al.*, 1996). La non-coagulation du sang est causée par la défibrination résultant de la diminution des composants du système hémostatique (Warrel, 1989).

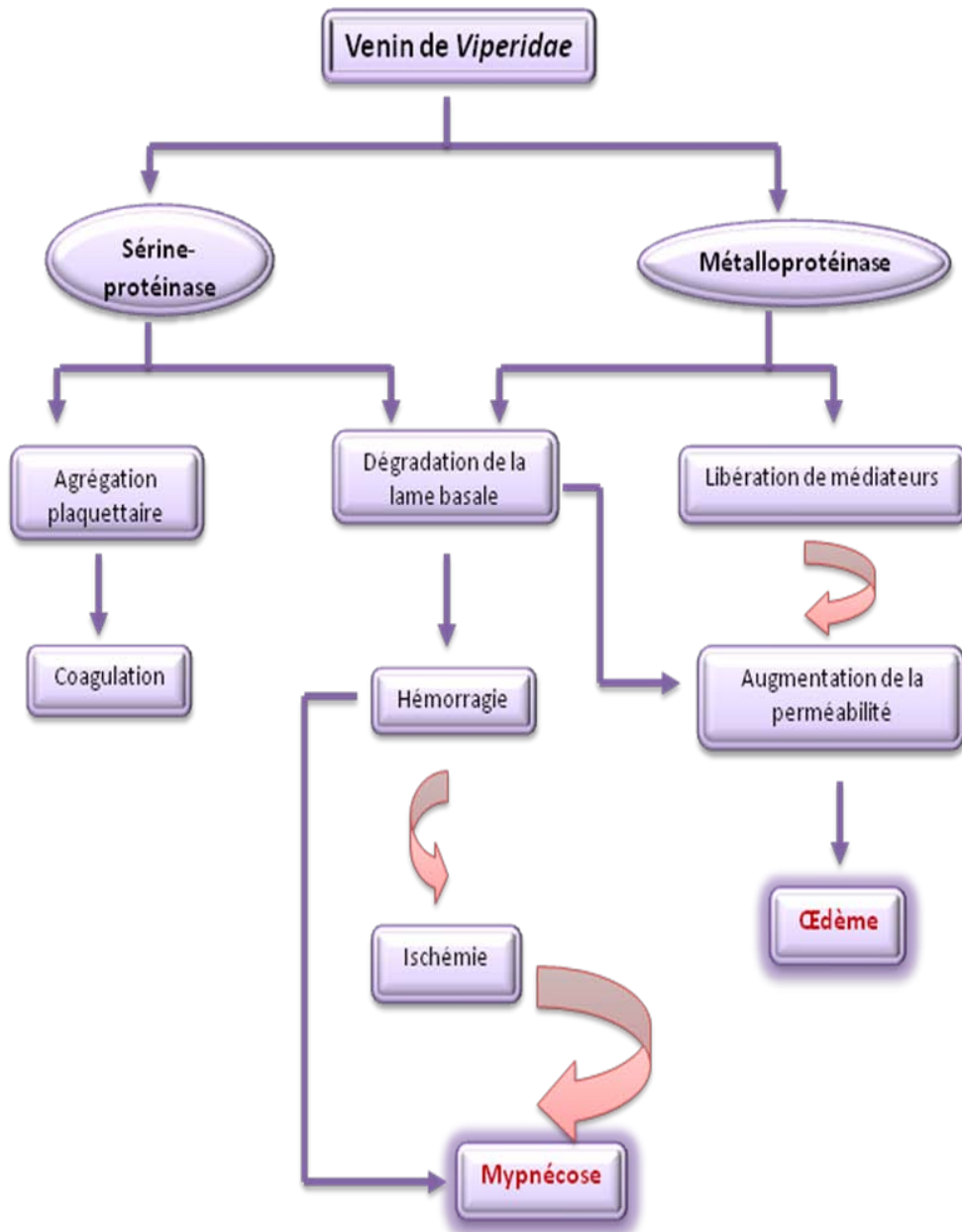


Figure 8 : Effets physiopathologiques provoqués par les métalloprotéinases et les sérine-protéinases des venins de serpents.

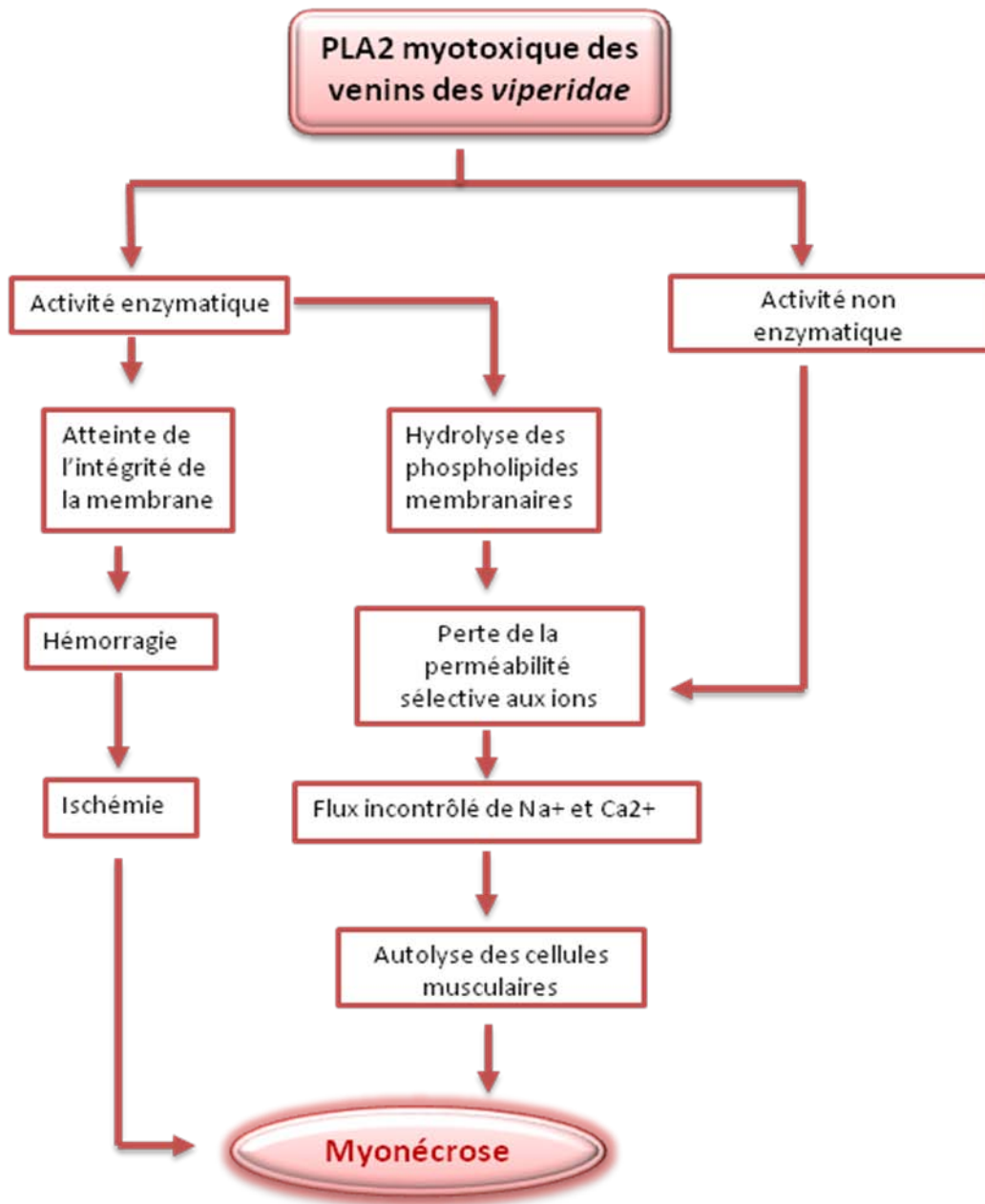


Figure 9 : Principaux mécanismes d'action intervenant dans la myotoxicité induite par les PLA₂ (Kini et Evans, 1989)

Matériel

Et

Méthodes

II- Matériel et méthodes

II.1- Matériel

II.1.1- Matériel biologique

II.1.1.1-Le venin de *Cerastes cerastes*

Le venin de la vipère à corne *Cerastes cerastes* se présente sous forme lyophilisée de couleur jaune, nous a été fourni par le Laboratoire de Recherche et de Développement sur les Venins de l'Institut Pasteur d'Algérie.

II.1.1.2-Les souris

Les souris NMRI (20 ± 2 g), utilisées, proviennent d'un élevage de l'annexe de l'Institut Pasteur d'Algérie (Kouba).

II.1.2- Matériel non biologique

Les produits chimiques utilisés proviennent du Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire de la Faculté des Sciences Biologiques (Université de la Science et de la Technologie Houari Boumediene) et du Laboratoire de Recherche et de Développement sur les Venins de l'Institut Pasteur d'Algérie. Ces produits proviennent de différentes firmes :

Merck : Acétate d'ammonium, di-hydrogène-phosphate mono-potassique, hydrogène-phosphate di-potassique, Tris (hydroxy-méthyl-amino-méthane).

Prolabo : Acide acétique, acide chlorhydrique, soude.

Sigma : Acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA), chlorure de sodium (NaCl),

Panréac : Formaldéhyde, Ethanol, Paraffine, alun de fer.

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

Riedel de Häen : Xylène.

Pharmacia-fine-chemicals : Sephadex G75, Sephadex A50.

Novartis, Pharmal et Cofarme. cyproheptadine, prométhazine (Phenergan), captopril, celecoxib, et dexaméthasone.

Randox: Kit de dosage de la Créatine Kinase.

Amersham biosciences, Mousse Biotrak ELISA system : Kit de dosage des cytokines.

II.2. Méthodes

II.2.1. Mise en évidence de l'activité œdématisante dans le venin de *Cerastes cerastes*

Afin de mettre en évidence l'activité œdématisante dans le venin de *Cerastes cerastes*, des lots de 4 souris ont été injectées par voie intraplantaire au niveau de la patte droite (patte envenimée) avec une dose de 20 µg /100 µl /souris du venin de *Cerastes cerastes*. La patte gauche (patte témoin) est injectée avec un même volume de NaCl 0,9%. Après différents temps d'envenimation (30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 24 h), les souris ont été sacrifiées et leurs pattes sont pesées pour la détermination du pourcentage d'œdème à l'aide de la formule suivante :

$$\% \text{ d'œdème} = [(patte \text{ envenimée} - patte \text{ témoin})/patte \text{ témoin}].100\%$$

II.2.2. Caractérisation pharmacologique et biochimique de l'œdème induit par le venin de *C. cerastes* et sa fraction GF3

Dans le but de déterminer les différentes voies impliquées dans le mécanisme d'apparition de l'œdème induit par le venin de *Cerastes cerastes* et purifier les molécules responsables de l'induction de chaque voie, nous avons utilisé comme inhibiteurs spécifiques la Dexamthasone (0,2 mg/Kg, I.m.), le Celecoxib (10 mg/Kg, I.p.), la Cyproheptadine (6 mg/Kg, I.p.), la Prométhazine : le Phenergan (10 mg/Kg, I.m.), le Captopril (15 mg/Kg, I.m.), et EDTA (5 µg/µg de venin).

Des lots de 4 souris ont été injectés préalablement avec les inhibiteurs puis avec le venin ou sa fraction GF3 au niveau de la patte droite. La patte gauche est injectée avec 100µl de NaCl 0,9%. Après 3 heures d'envenimation, les animaux ont été sacrifiés et les pattes ont été coupées au niveau des jonctions pour la détermination du pourcentage d'œdème.

II.2.3. Dosage des cytokines et des ICAM-1

Pour mieux comprendre le mécanisme d'induction de l'œdème plantaire après envenimation expérimentale avec le venin de *Cerastes cerastes* et sa fraction GF3, le dosage des cytokines au niveau du foyer œdémateux sera nécessaire.

Les souris ont été injectées au niveau de la patte droite avec une dose de 20µg/20 g de souris de venin ou de sa fraction GF3. Les animaux sont sacrifiés à différents temps

d'envenimation (30 min, 2 h, 3 h, 6 h, 24 h). Les pattes sont pesées puis homogénéisées. Après une centrifugation modérée (3000trs/min pendant 20 min), les surnageants sont utilisés pour le dosage des ICAM-1 et des cytokines (IL1- β , IL4, IL5, IL6, IL10, IL12, TNF α , IFN γ) à l'aide de Kit ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) spécifiques à chaque cytokine.

Dans chaque puits des microplaques de KIT spécifiques à chaque cytokine, il est ajouté 50 μ l du réactif spécifique de la plaque et 50 μ l de l'échantillon des surnageants/puits. L'incubation du mélange à température ambiante pendant 3 heures est suivie par trois lavages successifs avec le tampon de lavage (sauf pour l'IFN γ où il ne se fait aucun lavage).

Après addition de 100 μ l/puits de l'anticorps anti-cytokine conjugué à la biotine, la plaque est incubée à température ambiante pendant une heure.

Après lavage, 100 μ l de la solution du conjugué de streptavidine-HRP sont ajoutés puis incubés à température ambiante pendant 30 minutes et une nouvelle série de lavages est effectuée.

La réaction immuno-enzymatique est développée à l'obscurité et à température ambiante pendant 30 minutes après addition de 100 μ l/puits du substrat de TMB.

La réaction est ensuite arrêtée par addition d'une solution d'arrêt (acide sulfurique 0,18 M) à raison de 100 μ l par puits suivie d'une lecture de l'absorbance à 450 nm.

II.2.4. Mise en évidence de l'activité myotoxique par évaluation de la créatine kinase

Parallèlement à l'étude histologique, un test de l'activité enzymatique de la créatine kinase est réalisé sur des échantillons sériques et musculaires (cœur et muscle squelettique).

Des lots de 4 souris ont été injectés avec une dose de 20μ g de venin ou une dose équivalente de ses fractions par souris par voie intramusculaire au niveau de la patte droite. Les animaux ont été sacrifiés après différents temps d'envenimation (30 min, 3 h, 6 h et 24 h). Le sang a été prélevé et centrifugé pendant 5 min à 10 000 trs/min. Des fragments du muscle squelettique de la patte droite et le cœur sont homogénéisés et les surnageants sont utilisés pour le dosage de la créatine kinase.

Un volume de 1 ml de réactif est mélangé avec 40 μ l de l'échantillon puis incubé trois minutes à la température ambiante. La lecture de la densité optique est effectuée à 340 nm

après la 3^{ème}, 4^{ème}, 5^{ème} et la 6^{ème} minute de la réaction. La variation moyenne de la DO/min est déterminée. L'activité en UI/L est calculée en multipliant la DO/min par un facteur de correction égal à 4127.

II.2.5. Fractionnement du venin de *Cerastes cerastes* par chromatographie d'exclusion moléculaire sur Sephadex G75

La filtration moléculaire est une méthode de séparation des molécules en fonction de leur taille selon qu'elles pénètrent ou non dans les mailles d'un gel. Les molécules dont la taille est supérieure à celle des plus gros pores ne peuvent y pénétrer, et elles seront éluées en premier. Les molécules plus petites pénètrent dans les mailles du gel ou elles sont incluses plus ou moins longtemps selon leur taille. Elles le quittent dans l'ordre inverse de leurs masses moléculaires.

Le gel utilisé est le Sephadex G75, les masses moléculaires limites entre lesquelles la séparation est réalisable sont de 3000 à 70 000. Ce gel (100 g) est préalablement gonflé avec le tampon Acétate d'Ammonium 0,1 M pH 8,5, coulé dans une colonne de chromatographie puis équilibré avec le même tampon.

L'échantillon qui correspond à 500 mg du venin de *Cerastes cerastes* est déposé à la surface du gel. L'élution a été faite à l'aide du tampon Acétate d'Ammonium 0,1 M pH 8,5, avec un débit de 18 ml/h. la lecture de la densité optique se fait à 280 nm. Une cinétique de l'œdème plantaire est déterminée pour les fractions qui ont révélé une activité oedématisante.

II.2.6. Purification de la GF3 par une chromatographie échangeuse d'anions sur Sephadex DEAE-A-50

La fraction GF3 issue de la filtration moléculaire est soumise à une seconde étape de purification en utilisant un échangeur anionique le Sephadex DEAE-A-50.

Le gel est gonflé, dégazé et équilibré avec le tampon Acétate d'Ammonium 0,1 M ; pH 8,5, puis coulé dans une colonne de (1,5 x 40 cm).

Une première élution est faite à l'aide d'un tampon Acétate d'Ammonium (0,1 M, pH 8,5) suivie d'une élution par un gradient de force ionique allant de 0,1 M à 0,5 M (pH 8,5) puis avec les tampons 1 M et 2 M.

La lecture des DO des éluats est effectuée à 280 nm et les fractions obtenues sont soumises aux tests des activités oedématisante et myotoxique.

II.2.7. Effets du venin de *C. cerastes* et ses fractions moléculaires sur les muscles squelettique et cardiaque

Les altérations musculaires causées par le venin natif de *C. Cerastes* et la comparaison de ces effets avec ceux causés par les fractions obtenues après fractionnement du venin ont été évaluées par une étude histologique du muscle squelettique et cardiaque.

Une dose de 20 µg/souris du venin ou de ses fractions a été injectée aux souris par voie intramusculaire dans la patte droite. Le sacrifice a été réalisé après 3 h d'envenimation. Le muscle squelettique et le cœur ont été prélevés puis fixés dans du formol tamponné pendant 24 heures. Après l'étape de fixation, les prélèvements ont été déshydratés avec trois bains d'alcool de degré croissant (70°, 90°, 100°) suivis de deux bains de xylène.

Les pièces déshydratées doivent passer par deux bains de paraffine avant la confection des blocs afin de leur donner la consistance ferme nécessaire à la coupe.

Le bloc de paraffine contenant le fragment tissulaire est coupé en couches minces d'une épaisseur de 7 µm. Ces dernières sont étalées sur des lames en verre à l'aide d'une solution de gélatine 0,4%.

Après déparaffinage par deux bains de xylène, les coupes sont hydratées en passant dans trois bains d'alcool décroissant (100°, 90°, 70°) puis colorées avec l'hématoxyline pendant 1 min 30 sec et 10 sec avec l'éosine. La coloration est suivie par une deuxième étape de déshydratation. Les lames sont observées au microscope photonique après montage avec le baume de Canada.

Résultats
Et
discussion

III- Résultats et discussion

III.1. Cinétique de l'œdème plantaire induit par une dose sublétalement du venin de *Cerastes cerastes*

L'activité oedématisante est mesurée selon la méthode de Yamakawa et al (1976). Les souris ont été injectées par voie sous-cutanée dans la plante du pied avec une dose sublétalement du venin. Après sacrifice, les pattes sont coupées et pesées. Le pourcentage d'œdème est représenté par l'augmentation du poids des pattes envenimées par rapport aux pattes témoins (injectées avec un même volume de NaCl 0,9%). L'activité oedématisante devient significative si le pourcentage d'augmentation du poids dépasse 30% (Lomonte, 1985).

L'activité oedématisante du venin de *Cerastes cerastes* a été mise en évidence par Boukhalifa-Abib- et Laraba-Djebari (2003). L'œdème plantaire induit par le venin de *Cerastes cerastes* est un phénomène dose-dépendant avec une dose minimale oedématisante (DMO) estimée à $1,4 \mu\text{g} / 20 \pm 2 \text{ g}$ de souris.

La DMO de *Cerastes cerastes* ($1,4 \mu\text{g}$) est faible comparée aux DMO des autres venins tels que celui de *Vipera russelli* ($5 \mu\text{g}$), *Lachesis muta stenophys* ($5 \mu\text{g}$), *Crotalus durissus durissus* ($11 \mu\text{g}$) (Lomonte, 1985), *Trimersurus mucrosquamatus* ($2 \mu\text{g}$) (Chen et al., 1984 ; Selistre et al., 1990) et plus importante que d'autres tels que *Vipera lebetina* ($0,8 \mu\text{g}$) et *Bothrops jararaca* ($0,75 \mu\text{g}$) et *Lachesis muta rhombata* (10 ng/g) (De Moura et al., 1998).

La cinétique de l'œdème plantaire induit par le venin de *Cerastes cerastes* montre une apparition rapide de l'œdème plantaire après quelques minutes d'envenimation (30 min ; 63,37%) et un pic après 3 heures (98,03%) suivie par une diminution progressive jusqu'au retour la normale après 48 heures (20,5%) (Figure 10).

Cette cinétique de l'œdème plantaire est similaire à celle des autres venins, elle en diffère par le temps d'apparition du pic. Le maximum d'activité oedématisante du venin de *Vipera lebetina* est obtenu après 2 heures d'envenimation (Amrane, 2002), celui de *Bothrops asper* après 1 heure, *Bothrops jararaca* après 30 min (Olivo et al., 2007), *Bothrops lanceolatus* après 15 min (De Faria L. et al., 2001), *Loxosceles gaucho* après 2 h (Domingos et al., 2003), *Thalassophryne nattereri* après 2 h (Lima et al., 2003).

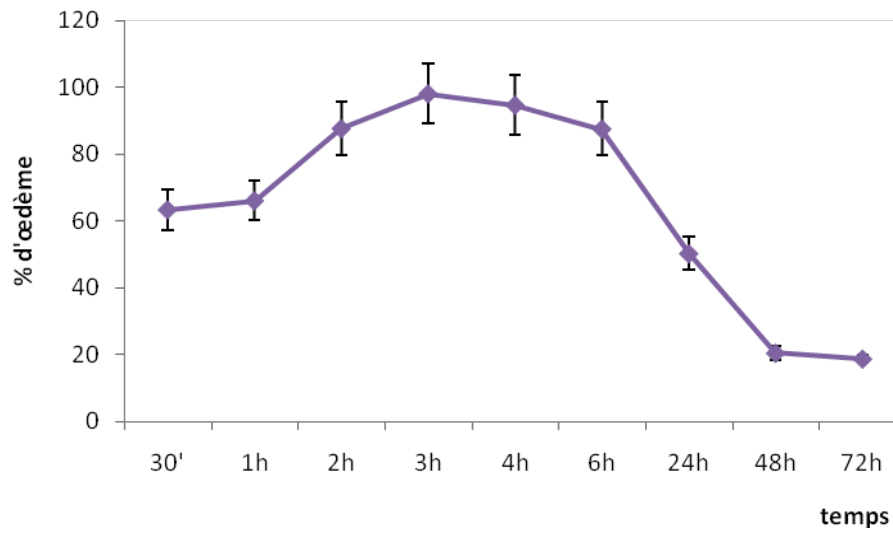


Figure 10 : Cinétique de l'œdème plantaire induit par une dose sub létale du venin de *Cerastes cerastes*.

Cette différence dans la cinétique d'apparition d'œdème pourrait être due aux différents mécanismes et molécules responsables de la pathogenèse de cet effet.

L'œdème plantaire induit par une dose sub létale du venin de *Cerastes cerastes* disparaît après 48 h d'envenimation. Pour une dose de 0,75 µg/patte du venin de *Bothrops jararaca* et 2,5 µg/patte du venin de *Bothrops asper* (Olivo et al., 2007) et 0,15 µg/patte du venin de *Loxosceles gaucho* (Domingos et al., 2003), l'œdème disparaît après 24 h d'envenimation. Alors que pour une dose de 3 µg/patte du venin de *Thalassophryne nattereri* l'œdème disparaît après 48 h d'envenimation (Lima et al., 2003).

L'œdème se produit pour réduire et diluer le venin puis se limite de lui-même. Plus la concentration du venin est élevée plus l'œdème sera intense et plus sa résorption est lente (Lomonte, 1985).

III.2. Caractérisation pharmacologique et biochimique de l'œdème induit par le venin de *Cerastes cerastes*

Afin de comprendre le mécanisme d'action du venin de *Cerastes cerastes* et de mettre en évidence les voies impliquées dans le phénomène d'apparition de cet œdème, des prétraitements avec des inhibiteurs spécifiques ont été utilisés tels que la dexaméthasone ; inhibiteur de la voie des PLA2, le celecoxib ; inhibiteur spécifique de la COX2, la cyproheptadine ; antagoniste des récepteurs H1d'histamine et 5HT2 de la sérotonine, la prométhazine (phenergan) ; antagoniste des récepteurs H1d'histamine, le captopril ; inhibiteur de l'enzyme de conversion d'angiotensine I en II, EDTA ; chélateur des métalloprotéinases (Figure 11) .

L'administration du cyproheptadine (6 mg/Kg de souris, 15 min avant l'envenimation) et de la prométhazine (10 mg/Kg de souris, 30 min avant l'envenimation), inhibe partiellement l'œdème plantaire provoqué par le venin de *Cerastes cerastes* (31% et 34% respectivement).

Des études ont montré que les PLA2 des venins de serpents sont capables d'activer les mastocytes *in vivo* (Cirino et al., 1989 ; Wang et Teng, 1990 ; Moreno et al., 1992) et *in vitro* (Lau et Roche, 1997 ; Landucci et al., 1998,2000; Castro et al., 2000) .

Il semblerait que la sérotonine et l'histamine soient libérées lors de l'envenimation par le venin de *Cerastes cerastes* après dégranulation des mastocytes.

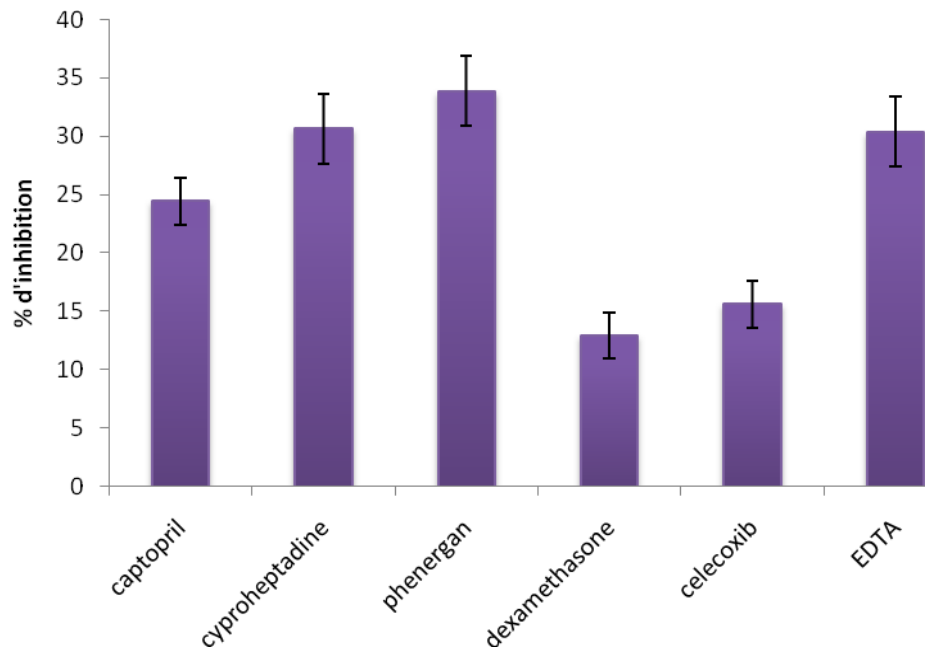


Figure 11 : Caractérisation pharmacologique et biochimique de l'œdème induit par le venin de *Cerastes cerastes*

Ces médiateurs vasoactifs, l'histamine et la sérotonine, agissent sur leurs récepteurs (H1, H2 et 5-HT2) au niveau des capillaires, en provoquant une augmentation de la perméabilité vasculaire.

Il est bien connu que les agents dérivant des mastocytes (l'histamine et la sérotonine) sont potentiellement capables de stimuler le nerf sensoriel pour libérer la substance P (Saria et *al.*, 1984, Câmara et *al.*, 2003) et par conséquent l'amplification de la réponse inflammatoire (Steinhoff et *al.*, 2000).

L'EDTA a provoqué une inhibition de 30% de l'action du venin de *Cerastes cerastes* dans l'induction de l'œdème plantaire. Cela indique que les métalloprotéinases du venin de *Cerastes cerastes* sont impliquées dans l'induction de l'œdème plantaire. L'inhibition de l'activité catalytique de BaP1, une métalloprotéine isolée à partir du venin de *Bothrops asper*, avec l'EDTA a provoqué une inhibition la libération des cytokines pro inflammatoires (l'IL-1 et le TNF α) et la migration leucocytaire vers le site d'injection de BaP1, et par conséquence l'inhibition de l'inflammation (Maria Fernandes et *al.*, 2007).

Il semble que le venin de *Cerastes cerastes* présente une action directe et/ou indirecte sur le système rénine-angiotensine-aldostérone et que la voie des angiotensines est aussi impliquée dans le phénomène d'induction de l'œdème plantaire par le venin de *Cerastes cerastes*, qui est inhibé à 25% après administration du captopril.

Le système rénine-angiotensine-aldostérone est responsable de la régulation de la rétention de sel et l'eau, et donc la régulation de la pression artérielle. Une hyper activation de ce système provoque une rétention anormale d'eau dans les tissus (œdème) et une hypertension artérielle qui est un risque majeur pour entraîner un œdème pulmonaire aigue (OPA).

L'inhibition de l'enzyme de conversion des angiotensines par le captopril implique l'inhibition du système rénine-angiotensine-aldostérone et donc une élimination d'eau par le rein et une diminution de l'œdème.

L'œdème plantaire induit par le venin de *Bothrops lancealus* a été également inhibé par le captopril (42%) (De Faria et *al.*, 2001).

Un prétraitement avec la dexaméthasone (0,2 mg/Kg de souris) deux heures avant l'envenimation provoque une faible inhibition (13%) de l'œdème plantaire induit par une dose

sublétale du venin de *Cerastes cerastes*. Il semble que la voie des PLA2 soit moins impliquée dans le phénomène d'apparition de l'œdème induit par le venin de *Cerastes cerastes*. Ce résultat a été confirmé par l'utilisation de celecoxib (10 mg/Kg de souris, 1 h avant l'envenimation) qui a inhibé l'œdème à un pourcentage de 15%.

Par ailleurs, la dexaméthasone a fortement inhibé la dermonécrose induite par le même venin (Oussedik-Oumehdi, 2007). Elle a également inhibé l'œdème plantaire induit par d'autres venins de serpents tels que *Bothrops insularis* (Barboda et al., 2003) et *Bothrops lanceolatus* (De Faria et al., 2001).

III.3. Etude de l'effet du venin *Cerastes cerastes* sur la synthèse des cytokines au niveau de la patte après envenimation expérimentale avec une dose sublétale du venin

L'envenimation expérimentale des souris par voie intraplantaire avec une dose sublétale (20 µg/20 ± 2 g) du venin de *Cerastes cerastes* induit un œdème plantaire réversible temps-dépendant, corrélé avec la synthèse des cytokines pro- et anti-inflammatoires.

Le venin de *Cerastes cerastes* a provoqué une augmentation rapide et précoce (après 2 h d'envenimation) des cytokines pro-inflammatoires (l'IL1-β, l'IL6 et le TNFα) au niveau de la patte. Le taux de ces cytokines reste élevé jusqu'à 6 h, puis il diminue progressivement avec une diminution considérable après 24 h atteignant un taux semblable à celui obtenu dans les pattes témoins (Figure 12).

Les travaux réalisés par notre équipe sur le dosage sérique des cytokines proinflammatoire après injection des souris par voie sous cutanée avec une dose sublétale du venin *Vipera lebetina*, montre que la production des cytokines pro-inflammatoires suit une cinétique biphasique par l'apparition de deux pics, le premier après 3 h d'envenimation et le deuxième après 24 h (Chaou, 2006).

Des résultats similaires ont été obtenus par Vera et collaborateurs (2000), après injection par voie intra-péritonéale d'une DL50 du venin de *Bothrops asper* qui a induit l'apparition de deux pics à 4 h et 18 h.

L'IL1-β, l'IL6 et le TNFα sont impliqués dans la migration leucocytaire (Zuliani et al., 2005). Ces trois cytokines sont considérées comme étant des marqueurs de gravité de l'envenimation.

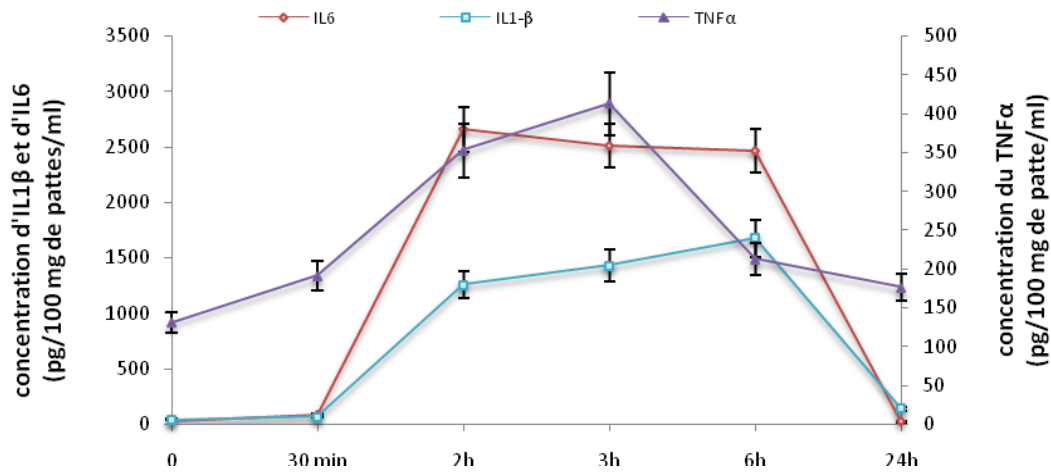


Figure 12 : Cinétique des cytokines pro-inflammatoires dans l'homogénat des pattes des souris après injection d'une dose sublétales du venin de *Cerastes cerastes*.

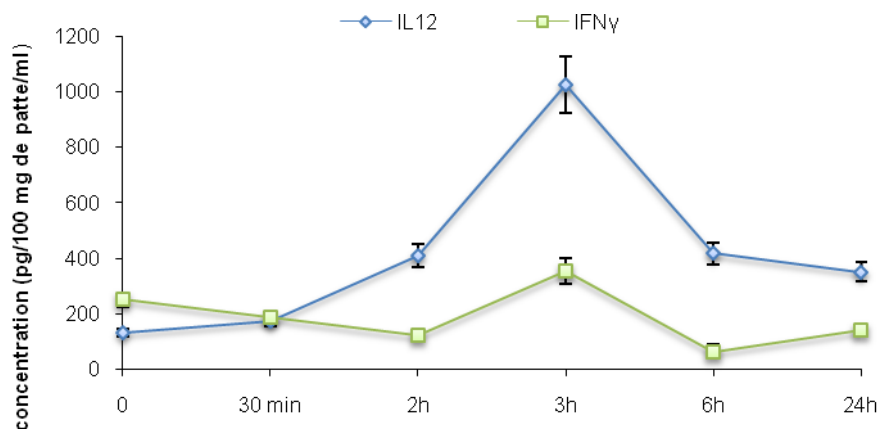


Figure 13: Cinétique des cytokines de la voie Th1 dans l'homogénat des pattes des souris après injection d'une dose sublétales du venin de *Cerastes cerastes*.

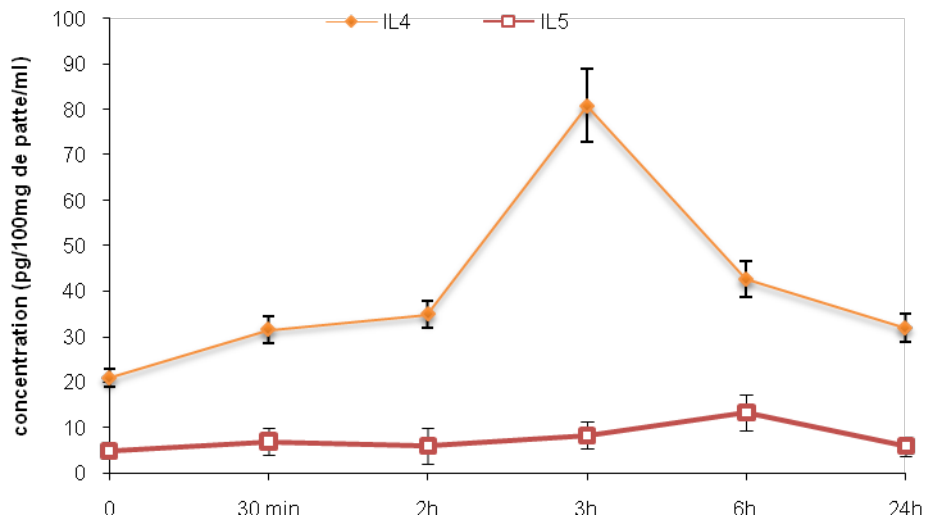


Figure 14: Cinétique des cytokines de la voie Th2 dans l'homogénat des pattes des souris après injection d'une dose sublétalement du venin de *Cerastes cerastes*.

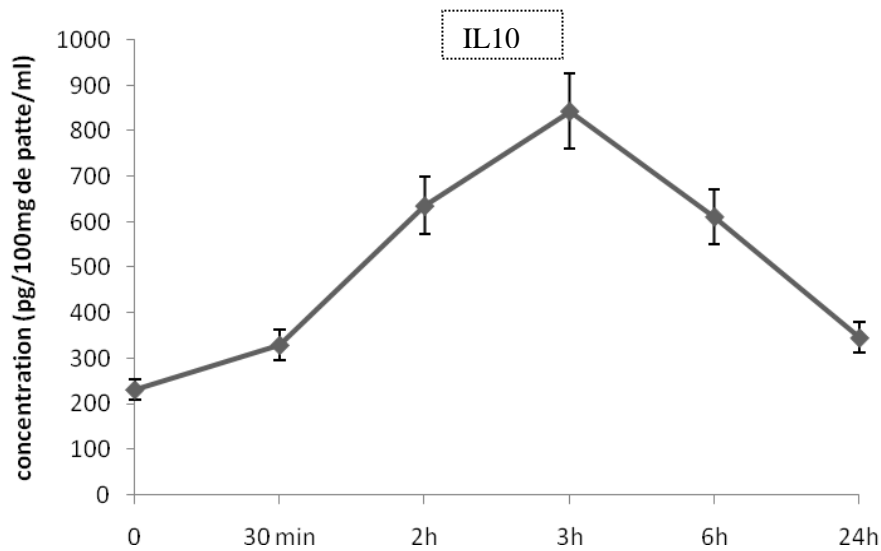


Figure 15: Cinétique de la cytokine immuno-régulatrice l'IL10 dans l'homogénat des pattes des souris après injection d'une dose sublétalement du venin de *Cerastes cerastes*.

L'élévation de leurs taux sériques est souvent corrélée avec la sévérité de l'envenimation (Sofer et al., 1996 ; Fukuhara et al., 2003).

Le dosage d'IL1- β et du TNF α dans la cavité péritonéale des souris envenimées avec 0,1 mg/Kg d'une métalloprotéinase BaP1 isolée à partir du venin de *Bothrops asper*, montre l'apparition d'un pic après 1 h 30 min d'envenimation pour l'IL1- β et après 6 h pour le TNF α (Maria Fernandes et al., 2006).

Les cytokines semblent donc jouer un rôle important dans les réactions inflammatoires locales observées lors des envenimations vipérines (Chaves et al., 2005).

Parallèlement à la production des cytokines pro-inflammatoires, le venin de *Cerastes cerastes* induit également la synthèse des cytokines de la voie Th1 (l'IL12 et l'IFN γ). Les résultats obtenus ont montré l'apparition d'un pic après 3 h d'envenimation aussi bien pour l'IL12 que pour l'IFN γ (Figure 13). Ceci explique leur intervention précoce dans le processus inflammatoire par activation de la différenciation des cellules Th0 en Th1.

Le dosage des cytokines de la voie Th2 au niveau de la patte des souris envenimées par une dose sublétales du venin de *Cerastes cerastes* montre une légère augmentation du taux d'IL5 après 6 h et de l'IL4 après 3 h d'envenimation. Il semble que ces deux cytokines de la voie Th2 ne soient pas impliquées dans le phénomène d'apparition de l'œdème avant 24 h d'envenimation (Figure 14).

Par contre, une augmentation de la cytokine de la voie Treg (l'IL10) est cependant observée au niveau de la patte entre 2 h et 6 h avec un pic à 3 h après une envenimation avec le venin de *Cerastes cerastes* (Figure 15).

Le venin considéré comme un antigène protéique, est capté par des cellules spécialisées (CPA), ingéré puis dégradé en peptides dans les lysosomes. Ces derniers s'associent aux molécules du complexe d'histocompatibilité de la classe II. Le complexe ainsi formé est exposé sur la membrane des CPA, puis il est reconnu par le récepteur du lymphocyte TCD4⁺ de type Th1. Ainsi activées, les cellules T produisent l'IL12 et l'IFN γ qui vont stimuler à leur tour la production des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL1- β , l'IL6 et le TNF α . La libération des cytokines anti inflammatoires telle l'IL10, inhibe la production des cytokines pro-inflammatoires et celles de la voie Th1. Ce qui explique probablement la réversibilité de l'activité œdématisante.

III.4. Dosage de la molécule d'adhésion intercellulaire-1 (l'ICAM-1) au niveau des pattes de souris envenimées avec une dose sub létale du venin de *Cerastes cerastes*

L'ICAM-1 (molécule d'adhésion intercellulaire-1) appartient à la superfamille des immunoglobulines (Ig) car possédant cinq domaine "Ig-like" et dont l'expression cellulaire est ubiquitaire, elle est très fortement inductible sur les cellules endothéliales dans un site d'inflammation. Elle intervient dans la circulation spécifique des cellules dans ces sites.

Dans cette étude, le dosage de l'ICAM-1 a été effectué dans les mêmes échantillons utilisés pour le dosage des cytokines. Les résultats obtenus ont montré que le taux d'ICAM-1 au niveau de la patte augmente progressivement après l'envenimation des souris avec le venin de *Cerastes cerastes* (Figure 16).

Au cours d'une réaction inflammatoire, l'altération des parois vasculaires entraîne l'apparition de nouveaux récepteurs des cellules endothéliales comme ELAM-1 (endothelial leukocyte adhesion molecule-1), VCAM (vascular cell adhesion molecule-1) et ICAM-1, ce qui accentue le phénomène d'extravasation et de migration des cellules et des protéines plasmatiques dans les sites d'inflammation.

L'induction de l'ICAM-1 au niveau du site d'injection avec le venin de *Cerastes cerastes*, est le résultat de la destruction des parois vasculaires par les molécules du venin de *Cerastes cerastes*. Il semble donc que l'ICAM-1 joue un rôle important dans le recrutement des leucocytes vers le foyer œdémateux.

III.5. Etude de l'activité myotoxique du venin de *Cerastes cerastes* par l'évaluation de la créatine kinase

L'effet du venin de *Cerastes cerastes* sur le métabolisme musculaire a été évalué par le dosage de l'activité enzymatique de la créatine kinase (CK) dans le sang et dans les tissus musculaires (cardiaque et squelettique). Ceci reflète l'état cellulaire dans les cas pathologiques telle que la myonécrose.

L'activité enzymatique de la CK a été dosée dans le sérum et les surnageants des muscles cardiaque et squelettique après différents temps d'envenimation (30 min, 3 h, 6 h et 24 h) (Figure 17).

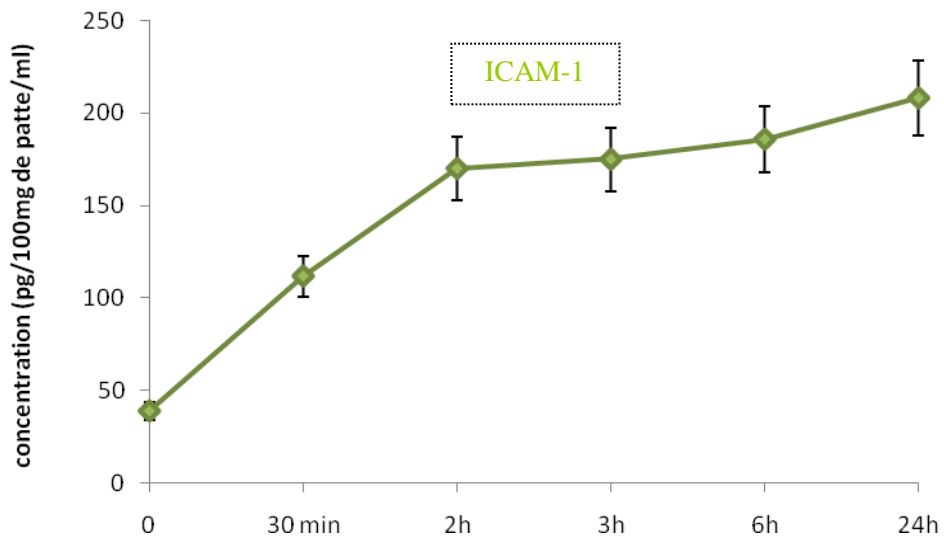


Figure 16 : Cinétique d'ICAM-1 dans l'homogénat des pattes des souris après injection d'une dose sublétales du venin de *Cerastes cerastes*.

La cinétique de la variation du taux de l'activité enzymatique de la CK dans le muscle squelettique montre une diminution progressive du taux de la CK dans le muscle squelettique jusqu'à 3 h d'envenimation où on observe un maximum de variation estimé à 41%. Ce taux re-augmente après 24 h avec une variation de 8%.

La variation de la CK dans le myocarde suit la même cinétique que celle du muscle squelettique mais avec un maximum de diminution de l'activité observé après 6 h d'envenimation (62%).

Le dosage sérique de la CK montre une augmentation considérable du taux sérique de la CK avec un pic à 3 h (226%) puis une diminution progressive jusqu'à 24 h (126%).

La libération de la CK dans le sang pourrait être due aux lésions membranaires provoquées par l'action des molécules de type PLA2 existants dans le venin (Boulanger., 1989 ; D'Bismut., 1990; Matsuki et *al.*, 1991)

Les lésions des cellules du myocarde pourraient être la conséquence d'une congestion veineuse sévère suivie par un dysfonctionnement valvaire (Kitagawa *et al.*, 1991).

La diminution de l'activité enzymatique de la CK dans le muscle squelettique et cardiaque après une envenimation par une dose sub létale du venin de *Cerastes cerastes* est en accord avec les résultats obtenus avec le venin de *Vipera lebetina* (Amrane, 2002), *Bothrops asper* (Guitierrez et *al.*, 1980 ; Lomonte et *al.*, 1985 ; Melo et Kurtz., 1988) et le venin de *Bothrops jararacussu* (Melo et Kurtz., 1988).

III.6. Purification de(s) molécule(s) oedématique(s) à partir du venin de *Cerastes cerastes*

Le venin de la vipère à cornes *Cerastes cerastes* est un mélange complexe de substances biologiquement actives, responsables des effets néfastes du venin.

Le venin de *Cerastes cerastes* a été soumis à une série d'étapes chromatographiques, afin de purifier une molécule oedématique. Après chaque étape chromatographique, les fractions obtenues ont été soumises aux tests de l'activité oedématique et myotoxique.

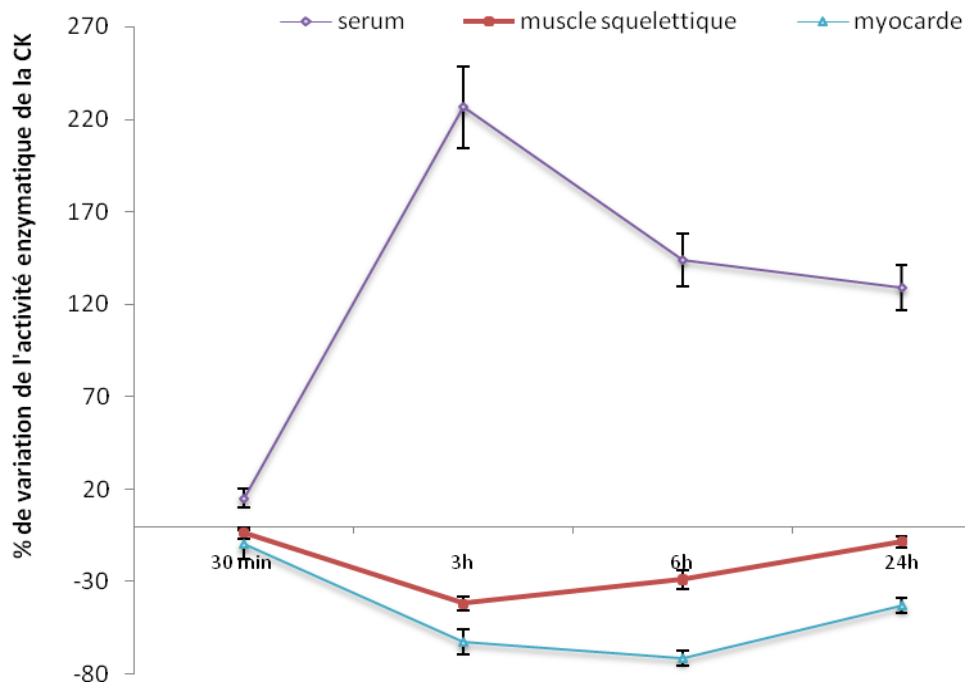


Figure 17 : Cinétique de la variation de l'activité enzymatique de la CK après envenimation des souris avec une dose sublétales du venin de *Cerastes cerastes*.

III.6.1. Fractionnement du venin de *Cerastes cerastes* par chromatographie d'exclusion moléculaire sur Sephadex G75

Le venin de *Cerastes cerastes* a été fractionné par une chromatographie d'exclusion moléculaire sur Sephadex G75. Le tampon utilisé est l'acétate d'ammonium 0,1 M ; pH 8,5. Le débit d'élution était de 18 ml/h. La lecture de la densité optique de chaque tube a permis de tracer le profil chromatographique.

Le profil chromatographique du fractionnement du venin de *Cerastes cerastes* révèle l'apparition de trois fractions GF1, GF2 et GF3 (Figure 18).

La fraction GF1 est douée d'une forte activité oedématisante faiblement myotoxique et associée à une activité hémorragique. La fraction GF2 est dépourvue des deux activités oedématisante et myotoxique. La fraction GF3 présente, quant à elle, une forte activité oedématisante et myotoxique et ne présente aucune activité hémorragique (Figures 19 et 20).

III.6.2. Cinétique de l'œdème plantaire induit par les fractions oedématisantes du venin de *Cerastes cerastes* (GF1 et GF3)

La cinétique de l'œdème plantaire induit par les fractions oedématisantes GF1 et GF3 issues de la filtration moléculaire du venin de *Cerastes cerastes* montre que la fraction GF3 suit la même cinétique que le venin avec un pic à 3 h et l'œdème disparaît après 24 h d'envenimation (Figure 21).

La fraction GF1 induit cependant un œdème plantaire qui persiste après 24 h d'envenimation qui est accompagné par une importante activité hémorragique.

III.6.3. Caractérisation pharmacologique de l'œdème plantaire induit par la fraction oedématisante du venin de *Cerastes cerastes* (GF3)

La fraction GF3 du venin de *Cerastes cerastes* semble être celle d'intérêt, du fait que sa cinétique ressemble à celle du venin natif et qu'elle n'est pas douée d'une activité hémorragique.

L'œdème induit par la fraction GF3 du venin de *Cerastes cerastes* a été soumis à une caractérisation pharmacologique par des pré-traitements avec les mêmes inhibiteurs utilisés pour le venin natif (Figure 22).

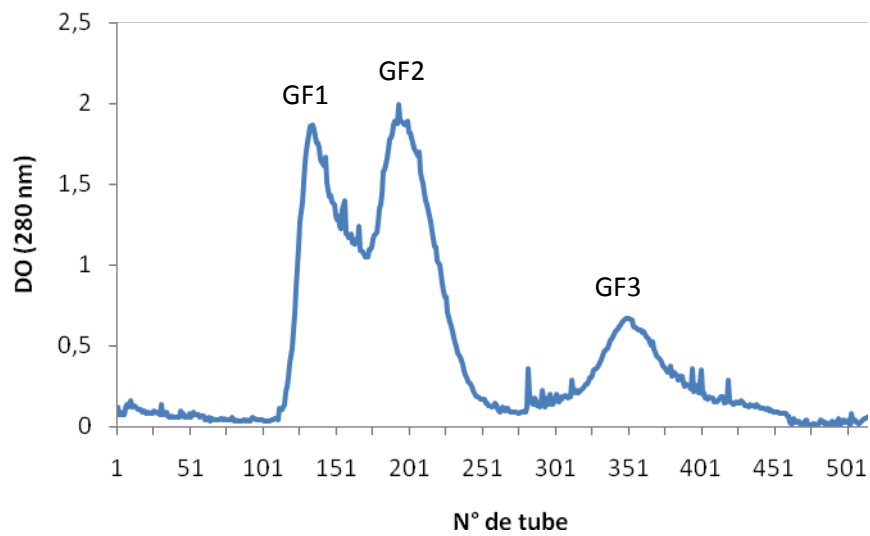


Figure 18 : Profil chromatographique obtenu après filtration moléculaire du venin de *Cerastes cerastes* sur Sephadex G75, tampon d'acetate d'ammonium 0.1 M, pH 8,5, avec un débit de 18 ml/h.

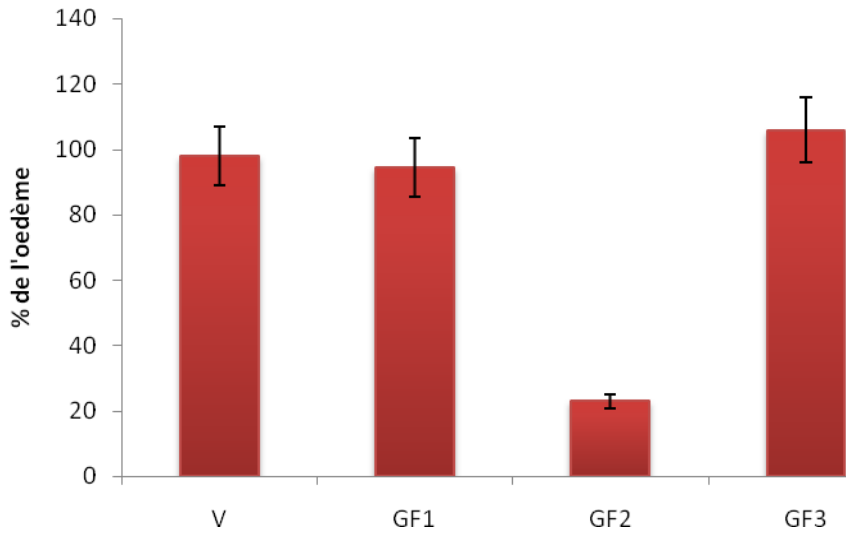


Figure 19 : Détermination de l'activité oedématisante dans les fractions issues de la filtration moléculaire du venin de *Cerastes cerastes*

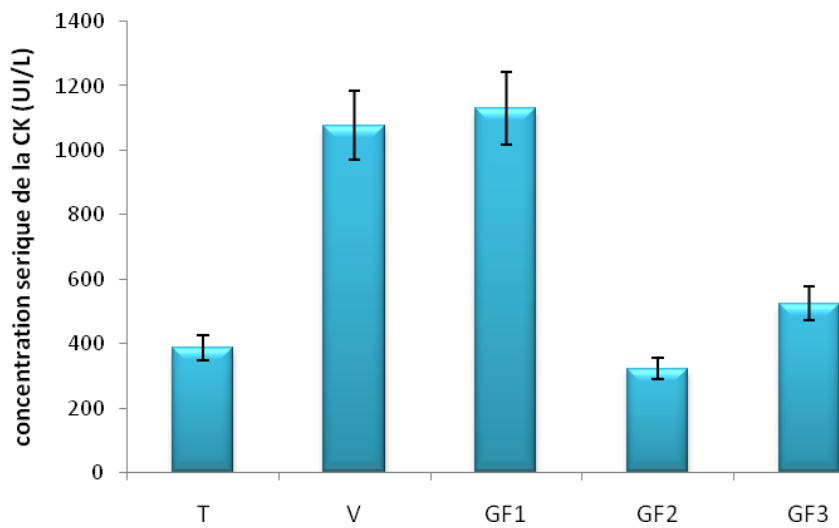


Figure 20 : Détermination de l'activité myotoxique par l'évaluation de l'activité enzymatique de la CK dans les fractions issues de la filtration moléculaire du venin de *Cerastes cerastes*

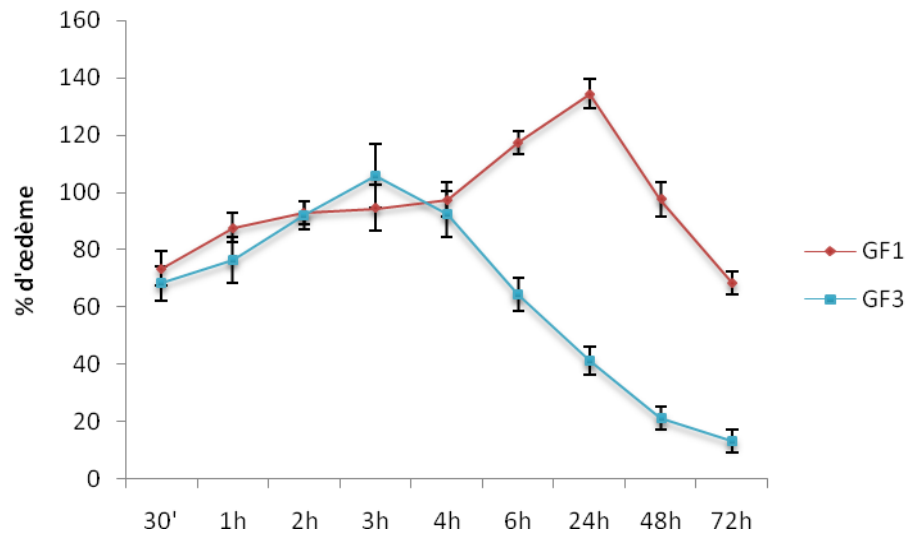


Figure 21 : Cinétique de l'œdème plantaire induit par les fractions oedématisées (GF1 et GF3), issues de la filtration moléculaire du venin de *Cerastes cerastes*

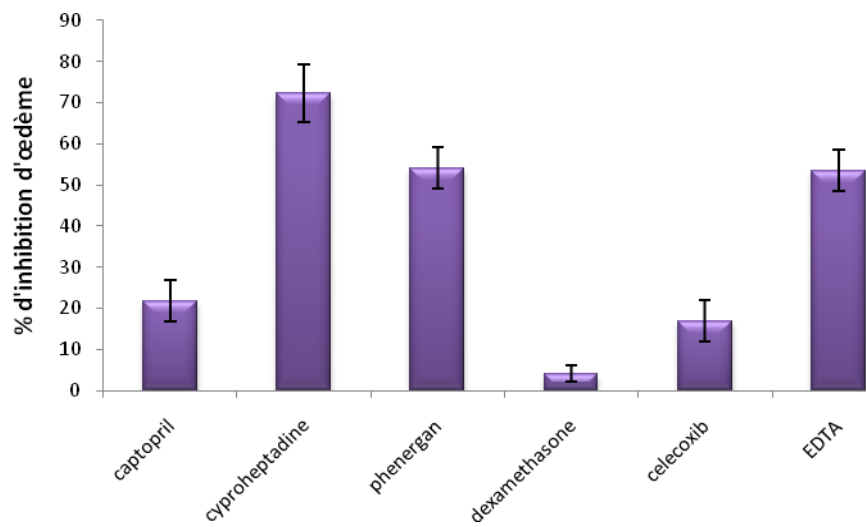


Figure 22 : Caractérisation pharmacologique et biochimique de l'œdème plantaire induit par la fraction oedématisante (GF3) du venin de *Cerastes cerastes*

Un pré-traitement avec cyproheptadine et prométhazine inhibe fortement l'œdème plantaire induit par la fraction GF3 à 72% et 54% respectivement, 53% avec l'EDTA, 25% avec le captopril et 17% avec celecoxib alors que dexaméthasone n'avait aucun effet inhibiteur (4%).

Il semble que la fraction GF3 induit un œdème sérotonine- et histamine-dépendant. Elle agit sur le système angiotensinII - aldostérone. Les molécules responsables de l'œdème induit par la fraction GF3 semblent être des métalloprotéinases.

III.6.4. Dosage des cytokines et de l'ICAM-1 dans la patte après injection de la fraction GF3

Le dosage des cytokines au niveau de la patte après injection de la fraction GF3 issue de la chromatographie d'exclusion moléculaire du venin de *C. cerastes*, a montré l'apparition d'un pic après 3 h d'envenimation pour les cytokines pro-inflammatoires l'IL6 et le TNF α avec un taux de TNF α beaucoup plus important que celui obtenu avec le venin natif. La production d'IL1 β était importante entre 2 h et 6 h d'envenimation (Figure 23).

Le taux maximum des cytokines de la voie Th1 (l'IL12 et l'IFN γ) est observé après 3 h d'envenimation (Figure 24) celui de l'IL4 est atteint après 2 h alors qu'avec le venin nous avons obtenu un pic à 3 h. Par ailleurs, la cinétique d'IL5 après injection de fraction GF3 semble être similaire à celle du venin natif avec un léger pic à 6 h d'envenimation (Figure 25).

La synthèse d'IL10 dans la patte après induction de l'œdème avec une dose de 0,02 UDO de la fraction GF3 suit une cinétique bi-phasique, le premier pic est observé à 3 h et le deuxième à 24 h (Figure 26).

L'ICAM-1 est induite après injection de la GF3 au niveau de la patte et présente un pic à 6 h d'envenimation avec une diminution après 24 h (Figure 27) alors que pour le venin l'augmentation persiste au-delà de 24 h d'envenimation. Ces résultats sont corrélés avec la cinétique d'apparition de l'œdème plantaire ou il apparaît que l'œdème disparaît avec la diminution du taux des ICAM-1 au niveau du site d'injection du venin de *C. cerastes* (après 48 h) ou de sa fraction oedématisée, GF3 (après 24 h d'envenimation).

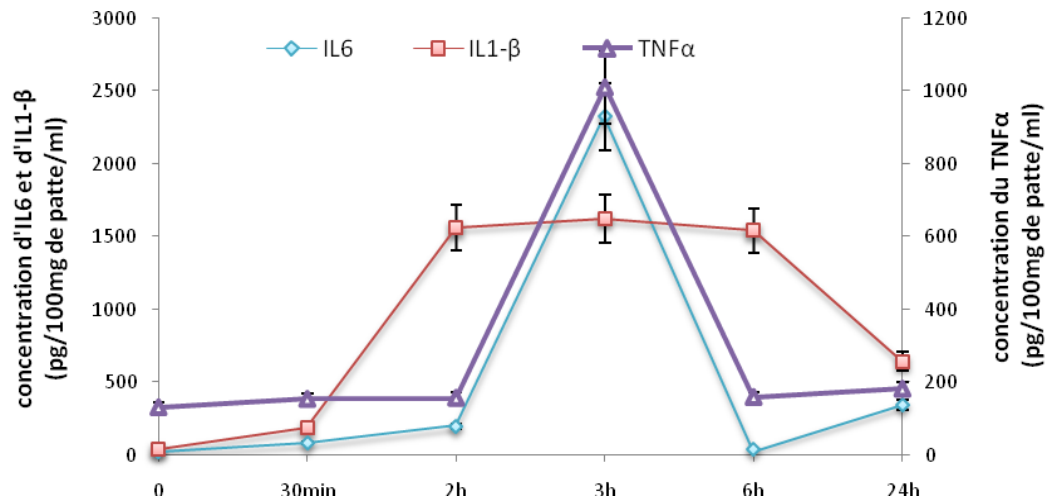


Figure 23 : Cinétique des cytokines pro-inflammatoires dans l'homogénat des pattes des souris après injection d'une dose sublétales de la fraction GF3 du venin de *Cerastes cerastes*.

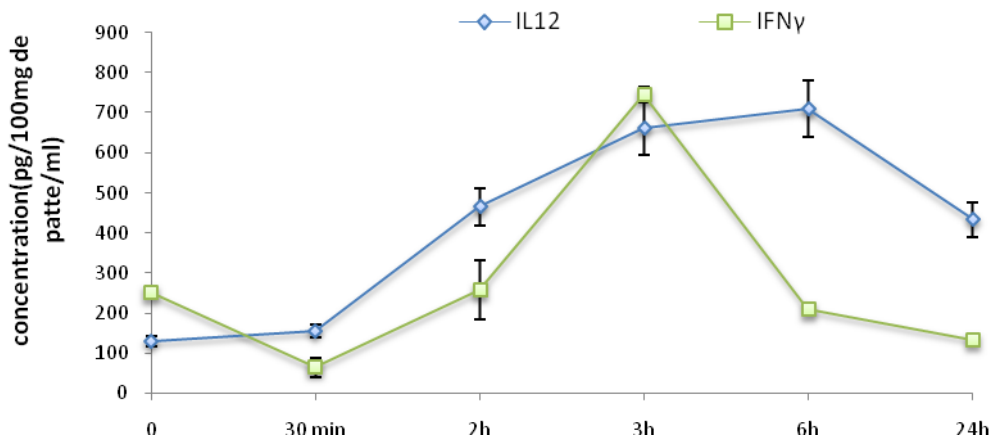


Figure 24: Cinétique des cytokines de la voie Th1 dans l'homogénat des pattes des souris après injection d'une dose sublétales de la fraction GF3 du venin de *Cerastes cerastes*.

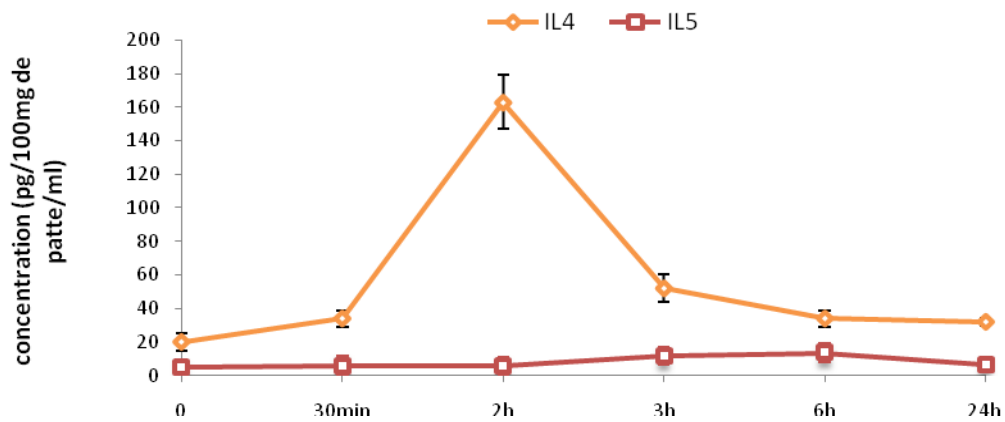


Figure 25: Cinétique des cytokines de la voie Th2 dans l'homogénat des pattes des souris après injection d'une dose sublétales de la fraction GF3 du venin de *Cerastes cerastes*.

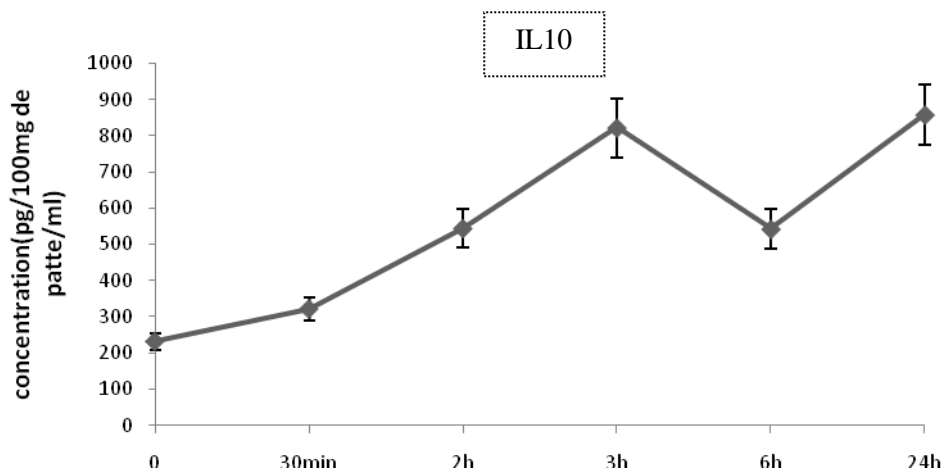


Figure 26 : Cinétique de la cytokine immuno-régulatrice dans l'homogénat des pattes des souris après injection d'une dose sublétales de la fraction GF3 du venin de *Cerastes cerastes*.

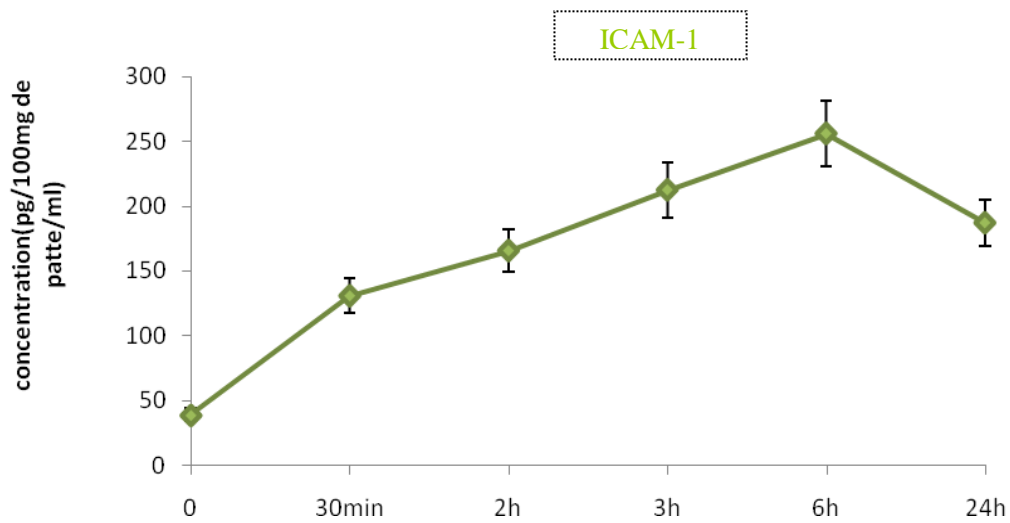


Figure 27 : Cinétique d'ICAM-1 dans l'homogénat des pattes des souris après injection d'une dose sublétales de la fraction GF3 du venin de *Cerastes cerastes*.

III.6.5. Essai de purification des molécules oedématisées à partir de la fraction GF3 par chromatographie échangeuse d'anion sur DEAE-Sephadex G50

La fraction oedématisée et myotoxique la GF3 a été soumise à une deuxième étape chromatographique échangeuse d'anions. Le profil chromatographique de la fraction GF3 sur DEAE-Sephadex G50 révèle 3 pics (D1, D2 et D3) (Figure 28).

Le premier pic majoritaire (D1) a été élué à 0,1 M alors que le deuxième pic (D2) est élué à 1 M et le troisième pic (D3) à 2 M d'acétate d'ammonium.

Les fractions D1 et D3 sont douées des deux activités biologiques d'intérêt, l'activité oedématisée et myotoxique. Cependant, la fraction D2 ne semble être douée que de l'activité myotoxique (Figures 29 et 30). La fraction D3 semble être très toxique, elle provoque la mort des souris à une dose de $0,02 \text{ UDO}_{(280 \text{ nm})}/20 \pm 2 \text{ g}$ de souris (dose sublétales du venin). Les résultats cités précédemment ont été obtenus pour une dose de $0,01 \text{ UDO}_{(280 \text{ nm})}/20 \text{ g}$ de souris.

III.7. Effet du venin *Cerastes cerastes* et de ses fractions oedématisées sur le muscle cardiaque

L'analyse des coupes histologiques du myocarde de souris témoins ayant reçu une injection de NaCl 0,9 %, révèle un tissu myocardique constitué de fibres myocardiques parallèles, serrées, à striations longitudinales renfermant des noyaux périphériques, allongés et de tailles variables (Figure 31 A).

Le cœur est la pompe à sang dans l'organisme, donc le venin diffuserait obligatoirement et facilement, en passant à travers cet organe, en induisant ainsi, des lésions au niveau du myocarde.

Après 3 heures d'envenimation avec une dose sublétales du venin de *Cerastes cerastes*, les coupes histologiques du myocarde montrent des modifications morphologiques importantes. L'apparition d'œdème interstitiel très étendu séparant les fibres myocardiques (Figure 31 B). Une disparition de certains noyaux est également observée. Les fibres myocardiques apparaissent nécrotiques dans certaines régions. Des altérations similaires mais nettement plus intenses sont observées avec les fractions oedématisées GF3 et la D3 (Figures 31 C, D).

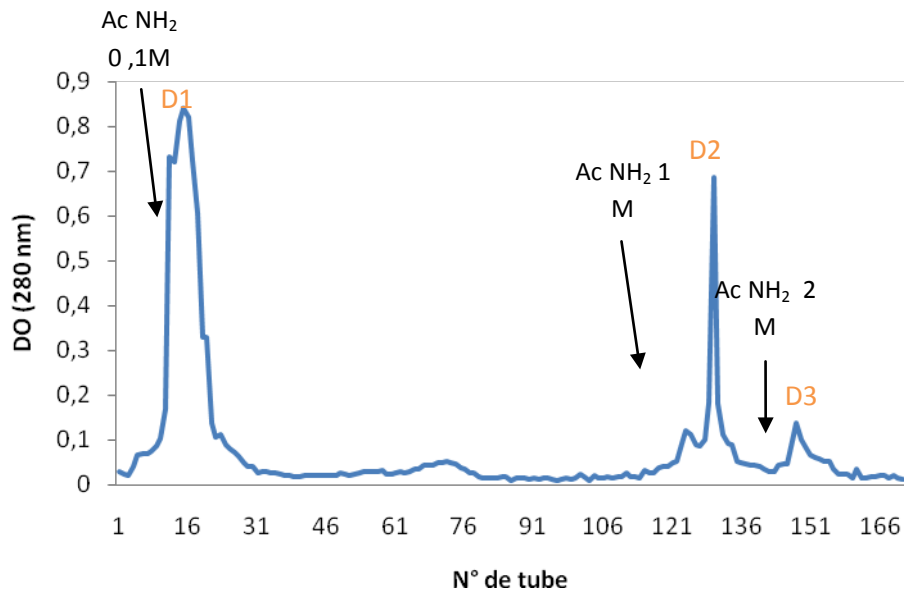


Figure 28 : Profil chromatographique de la fraction GF3 sur un échangeur d'anions DEAE-Sephadex A50, utilisant un tampon d'acétate d'ammonium 0,1 M, 1 M , 2 M , pH8,5, avec un débit de 18 ml/h.

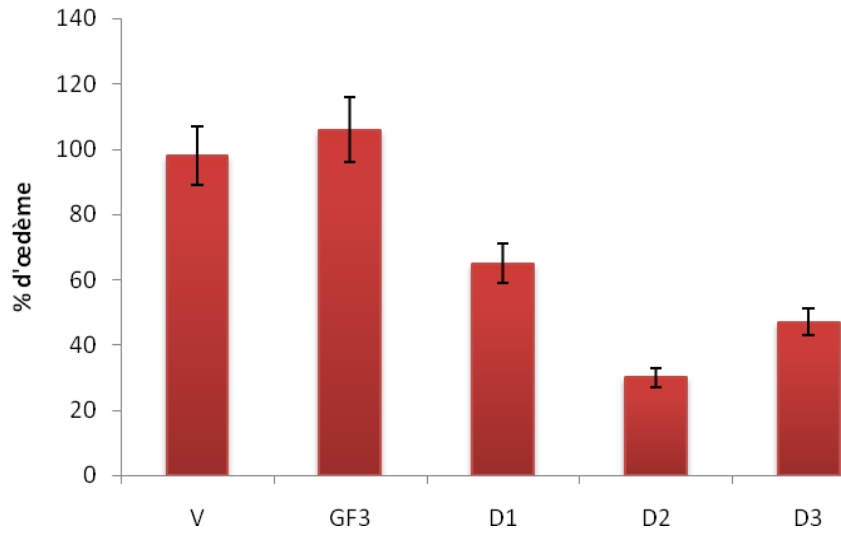


Figure 29 : Activité oedématisante des fractions issues de l'échangeuse d'anions de la fraction GF3

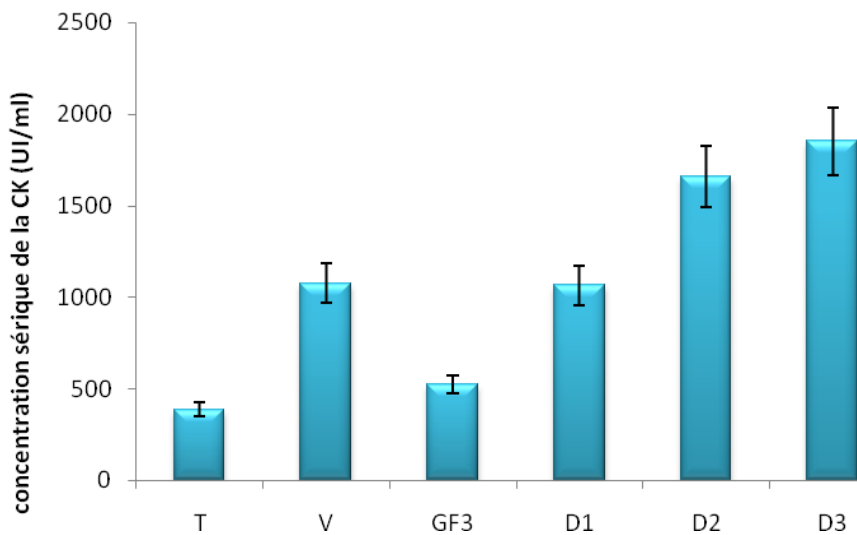


Figure 30 : Activité myotoxique des fractions issues de l'échangeuse d'anions de la fraction GF3

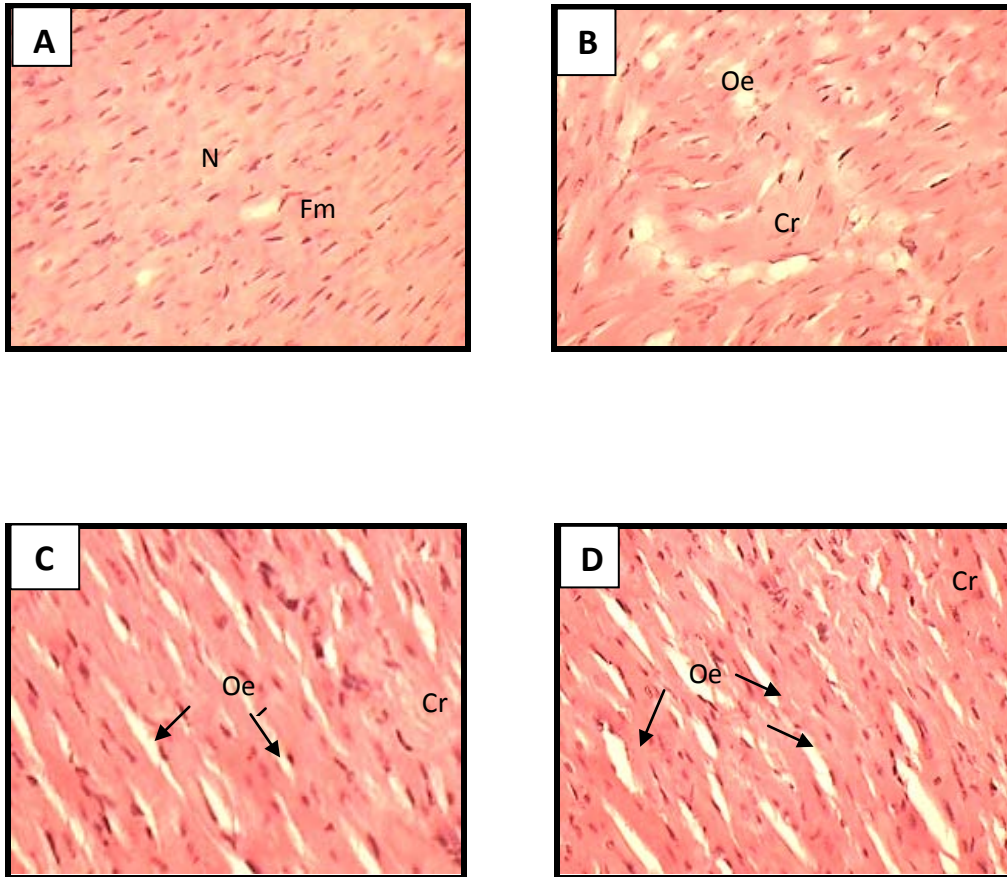


Figure 31: Effets du venin de *C. cerastes* (B) et de ses fractions moléculaires GF3 (C) et D3 (D) sur le tissu musculaire cardiaque des souris, après 3 heures d'envenimation, (A) cœur témoin. (Coloration topographique : Hématoxyline –Eosine, grossissement : 40 x 10).

N : noyau ; Fm : fibre musculaire ; Oe : œdème ; Cr : caryolyse.

Ces résultats semblent être en parfait accord avec ceux obtenus avec le venin de *Vipera lebetina* (Amrane, 2002), *Crotalus atrox* (Huang et Perez., 1982), *Trimeresurus flavoviridis* (Queiroz et al., 1984), le taux des myotoxines dans le venin et leur action, si elle est directe ou indirecte, sont à l'origine du taux de sévérité des altérations tissulaires et leur temps d'apparition (Queiroz et al., 1984; Melo et Kurtz., 1988).

Le ventricule gauche est le tissu le plus lésé. Ce phénomène serait dû à l'épaisseur relativement mince de la paroi de ventricule droit (Ruckebush, 1981), qui est suffisamment nourris par le sang. Il serait également dû aux exigences métaboliques de ventricule droit qui sont moindres que celles de ventricule gauche (Nakamura, 1986).

III.8. Effet du venin *Cerastes cerastes* et de ses fractions oedématisées sur le muscle squelettique

L'analyse des coupes histologiques du muscle squelettique des souris témoins ayant reçu une injection de NaCl 0,9%, montre que le tissu squelettique témoin est formé par plusieurs fibres musculaires regroupées en faisceaux, de forme et de taille homogène (Figure 32 A).

L'effet d'une dose sublétales du venin de *C. cerastes* sur le muscle squelettique des souris, est caractérisé par une forte hémorragie associée à un œdème intercellulaire. Certaines fibres se présentent sous formes atrophiées et certaines présentent des pâleurs partielles au niveau du cytoplasme. Une dose de 20 µg du venin natif de *C. cerastes* induit une hétérogénéité du volume cellulaire avec parfois une perte du contour cellulaire (Figure 32 B).

L'administration de la fraction GF3 induit une hémorragie et un œdème plus intenses que le venin natif, associés à une infiltration des cellules inflammatoires dans les espaces interstitiels (Figure 32 C). Alors que les effets provoqués par la fraction D3 sur le muscle squelettique de souris, sont moins importants ; caractérisés par un œdème interstitiel, n'est pas associé à l'hémorragie (Figure 32 D).

Les effets du venin natif de *C. cerastes* et ses fractions (GF3 et D3) sur le muscle squelettique, sont similaires à ceux obtenus avec le venin de *Vipera lebetina* (Amrane, 2002), *Bungarus caeruleus* (Alok et al., 1996), *Bothrops jararacussu* (Melo et Kurtz., 1988), *Crotalus atrox* (Huang et Perez., 1982), *Bothrops asper*, *Micrurus nigrocina nigrocina*, *Micrurus nigrocina monsqutensis*, *Micrurus frontalis*, *Micrurus carinicauda* et *Micrurus surinamensis* (Gutiérrez et al., 1980; Lomonte et al., 1985; Rucovado et Lomonte 1996).

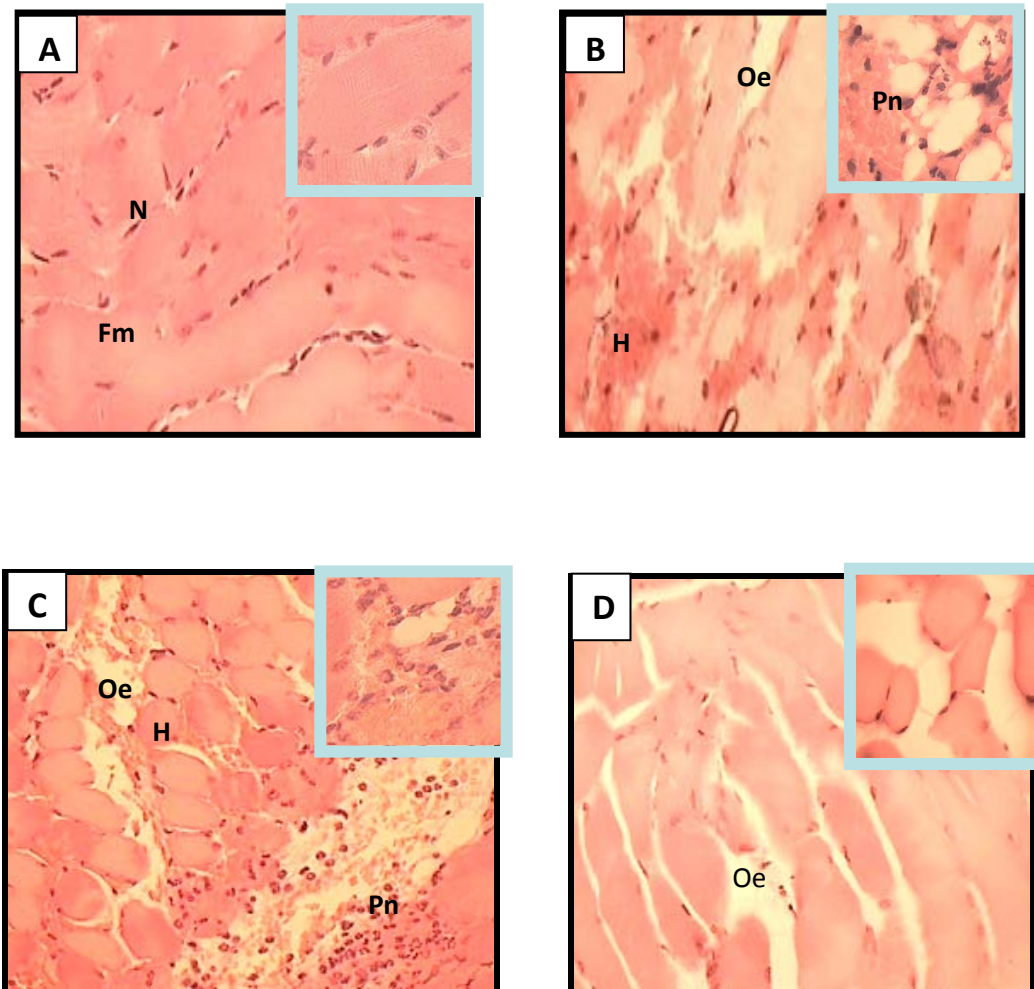


Figure 32 : Effets du venin de *C. cerastes* (B) et de ses fractions GF3 (C) et D3 (D) sur le tissu musculaire squelettique des souris, après 3 heures d'envenimation, (A) muscle squelettique témoin. (Coloration topographique : Hématoxyline Eosine, grossissement : 40 x 10 et 100 x 10).

N : noyau ; Fm : fibre musculaire ; Oe : œdème ; Cr : caryolyse ; H : hémorragie ; Pn : polynucleaire neutrophile.

Discussion
générale

DISCUSSION GENERALE

Les venins de *Viperidae* constituent une source riche en biomolécules pharmacologiquement actives, agissant avec une grande spécificité sur de nombreuses cibles cellulaires et moléculaires.

L'étude de l'activité oedématisante du venin de *C. cerastes* a révélé qu'elle suit une cinétique signal temporel dépendante. Son apparition est rapide et son maximum est atteint après 3 h d'envenimation. Sa D.M.O. est estimée à 1.4 µg (Boukhalfa-Abib et Laraba-Djebari, 2003). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus avec les autres venins de serpents.

L'administration des différents inhibiteurs a permis de montrer que le phénomène d'apparition de l'œdème plantaire induit par le venin de *C. cerastes* implique l'intervention de plusieurs médiateurs tels que les métabolites d'acide arachidonique qui résultent de la voie des PLA₂, la sérotonine et l'histamine. Le venin de *Cerastes cerastes* semble présenter une action directe et/ou indirecte sur le système rénine-angiotensine-aldostérone et que la sérotonine et l'histamine sont libérées lors de l'envenimation par le venin de *Cerastes cerastes* après dégranulation des mastocytes.

La formation d'œdème est une conséquence de la réponse inflammatoire cutanée (Bhargara et al., 1972) et elle est dépendante de la synergie existante entre les médiateurs qui augmentent la perméabilité vasculaire et ceux qui augmentent le flux sanguin (De Faria et al., 2001).

Un niveau élevé de la PLA₂s est détecté dans de nombreuses maladies inflammatoires chez l'humain tels que l'asthme (Bowton et al., 1997), la rhinite allergique (Stadel et al., 1994), le choc septique (Vadas, 1984), et les maladies autoimmunes (Vadas et Pruzanski, 1986). L'augmentation de l'expression des PLA₂s démontre le caractère inflammatoire de ces maladies, qui est partiellement indépendante de leur capacité à mobiliser l'acide arachidonique. L'injection des PLA₂, après inactivation de leur activité enzymatique, induit une infiltration inflammatoire qui n'est pas corrélée avec la génération des prostaglandines (Bomalaski et al., 1991; Teixeira et al., 2003).

L'induction de l'extravasation plasmatique par la substance P est le résultat de l'action de ce peptide sur l'endothélium des capillaires (récepteur NK1 des tachykinines) et sur le release de l'histamine et de la sérotonine après dégranulation des mastocytes. L'activation des mastocytes est une étape intermédiaire dans les réponses neurogéniques médiées par le nerf sensoriel (Foreman et *al.*, 1983; Câmara et *al.*, 2003).

La substance P et les agonistes du récepteur NK1 provoquent via les récepteurs des tachykinines, une réponse vasoactive sur les capillaires. La substance P est un médiateur puissant qui augmente la perméabilité vasculaire et par conséquent la formation de l'œdème (Brain, 1996; Câmara et *al.*, 2003).

Il semble que, dans le syndrome de l'envenimation avec le venin de *C. cerastes*, la dégranulation des mastocytes, serait médiée par la substance P. Ces résultats sont confortés par l'inhibition de l'œdème après administration de la cyproheptadine. De plus, les agents dérivant des mastocytes (l'histamine, la sérotonine et la tryptase) sont capables de stimuler le nerf sensoriel et provoquer la libération de la substance P (Saria et *al.* 1984), ce qui amplifie la réponse inflammatoire (Steinhoff et *al.*, 2000).

L'étude du processus inflammatoire, après envenimation expérimentale par le venin de *C. cerastes* et sa fraction oedématisante la GF3, a permis de constater une augmentation importante des cytokines pro- et anti-inflammatoires au niveau de la patte des souris. Les taux du TNF α , de l'IL1 β et de l'IL6 augmentent avec un maximum observé à 3 h. Ces cytokines semblent jouer un rôle important dans les réactions inflammatoires locales observées lors des envenimations vipérines (Chaves et *al.*, 2005).

Parallèlement à la production des cytokines pro-inflammatoires, le venin de *C. cerastes* a induit également la libération de diverses cytokines dont : l'IL12, IFN γ , IL4 et l'IL10, qui inhibent la production des cytokines pro-inflammatoires et des médiateurs de l'inflammation tels que les prostaglandines, l'oxyde nitrique et les leukotriènes (Bogdan et *al.*, 1991), réduisant ainsi l'intensité des manifestations pathologiques observées lors des envenimations.

Ces résultats sont en accord avec ceux de Barraviera et ses collaborateurs (1995), qui ont rapporté que le taux maximum de l'IL6 est observé entre 3 h et 6 h de l'envenimation avec le venin de *Bothrops*.

Les mastocytes se trouvent dans presque tous les tissus vascularisés où ils résident habituellement à proximité de vaisseaux sanguins, les nerfs, les cellules musculaires lisses, cellules épithéliales, les glandes productrices de mucus et les follicules pileux. Ils peuvent être particulièrement nombreux dans les sites anatomiques qui sont directement exposés à l'environnement, y compris la peau, les voies respiratoires et le tractus gastro-intestinal (Metcalf et *al.*, 1997 ; Galli et *al.*, 2005).

Lors de l'activation, les mastocytes peuvent libérer un large éventail de produits biologiquement actifs (médiateurs), tels que, l'histamine et la sérotonine, protéoglycane, chymase, tryptase, carboxypeptidase A, les métabolites de l'acide arachidonique via la cyclooxygénase (par exemple, PGD₂) ou de la lipoxygénase (par exemple, LTC₄) et un grand nombre de cytokines, de chimiokines et de facteurs de croissance. Beaucoup de ces produits sont considérés comme des pro- inflammatoires et certains d'autres tels que IL10 et le TGF β sont connus pour leurs propriétés anti-inflammatoires ou immunosuppresseurs (Metcalf et *al.*, 1997 ; Gurish et Austen., 2001 ; Boyce, 2003 ;Galli et *al.*, 2005).

Les travaux réalisés par Galli et Tsai (2008) ont montré que les mastocytes et l'IL10 libérée par ces derniers peuvent limiter sensiblement l'ampleur des réponses de l'hôte contre les agents pathogènes, ainsi que dans de nombreuses maladies inflammatoires.

Les souris déficientes en mastocytes ont été 10 fois plus sensibles que les souris de type sauvage pour les effets létales du venin de la vipère *Atractaspis engaddensis* (Metz et *al.*, 2006).

Dans cette étude, nous avons observé une libération de l'IL10 après envenimation des souris avec une dose sublétales du venin de *C. cerastes*. Ainsi que l'implication de l'histamine et de la sérotonine dans l'induction de l'œdème plantaire. Il semblerait que les mastocytes sont impliqués dans l'induction de l'œdème par la libération des médiateurs vasoactifs (l'histamine et la sérotonine) et ils participent à la résorption de cet œdème si ils sont à l'origine de la libération de l'IL10.

Un taux très élevé de ICAM-1 a été observé au niveau des pattes après envenimation des souris avec le venin de *C. cerastes* et sa fraction GF3. L'augmentation du taux des molécules d'adhésion est associée à l'initiation de la phase de recrutement des leucocytes (Ley, 1996). Les P-sélectines sont impliquées dans l'initiation et le ralentissement du roulement leucocytaire (Robinson et *al.*, 1999).

Cependant, les E-sélectines sont très importantes dans l'arrêt du roulement des leucocytes (Smith et *al.*, 2004). Les intégrines 1 et 2 (VCAM-1 et ICAM-1) sont impliquées dans l'adhésion des leucocytes activés (Ley, 1996).

Les neutrophiles sont rapidement recrutés vers les sites inflammatoires et dominent initialement l'influx leucocytaire (Issekutz et Movat, 1980). Ces cellules libèrent à leur tour des facteurs solubles, qui permettent ensuite le recrutement de la lignée monocyte/macrophage (Ryan et Majno, 1977; Doherty et *al.*; 1988).

La diminution de la CK musculaire pourrait être la conséquence de l'action des PLA₂, qui altèrent la membrane cellulaire, par leur pénétration grâce à leurs acides aminés hydrophobes et basiques. Les PLA₂ myotoxiques agissent sur l'intégrité structurale et fonctionnelle des membranes plasmiques, ce qui entraîne une augmentation de la perméabilité membranaire aux ions et aux macromolécules. L'augmentation du taux de calcium intracellulaire conduit à une hyper-concentration des myofibrilles, à une atteinte des mitochondries ainsi qu'à l'activation de protéinases dépendantes de l'ions calcium et de phospholipase (Harris et Mac Donnell, 1981; Mebs et Samejima, 1986).

De nombreux venins provoquent des altérations tissulaires lorsqu'ils sont injectés au niveau du tissu musculaire. Ces altérations peuvent évoluer à des degrés différents, de l'hémorragie à des événements dégénératifs pouvant atteindre des nécroses sévères (Mebs et *al.*, 1983). Il semblerait que l'effet myotoxique se produise selon deux mécanismes. Le premier serait un mécanisme direct, pouvant impliquer une action cytotoxique directe sur les cellules musculaires (Ownby et *al.*, 1990 ; Gutiérrez et Rucavado, 2000). Le second mécanisme, serait indirect, et correspond à l'ischémie du tissu musculaire, qui est une conséquence de l'hémorragie suite à la destruction des capillaires (Franceschi et *al.*, 2000 ; Gutiérrez et Rucavado , 2000).

Généralement suite à la myonécrose, les cellules musculaires ont la capacité de se régénérer. La régénération musculaire est un phénomène qui débute au bout de 4 jours (Ownby et Colberg, 1988 ; Harris et *al.*, 2000).

La quantification du venin de *C. cerastes* a montré que la quantité du venin décroît du site d'injection en augmentant parallèlement dans le sérum et les différents compartiments tissulaires (Cherifi, 2005). Des études toxico-cinétiques ont révélé que le venin injecté par

voie sous cutanée est largement distribué dans l'organisme, indiquant que les composants du venin diffusent hors du compartiment vasculaire (Rivière et *al.*, 1997).

Le cœur est la pompe à sang dans l'organisme, donc le venin diffuserait obligatoirement et facilement, en passant à travers cet organe, en induisant ainsi, des lésions au niveau du myocarde.

Les résultats histologiques du cœur après envenimation expérimentale avec une dose sublétales du venin de *C. cerastes* par voie intra-musculaire, montrent l'action indirecte du venin, provoquant une désorganisation des fibres myocardiques et une caryolyse. L'œdème survenu au niveau du myocarde peut être la conséquence de l'altération de la perméabilité vasculaire. Cependant, la nécrose myocardique est le résultat d'une ischémie locale. Les mêmes effets sont observés avec les fractions moléculaires du venin.

La comparaison des niveaux de diminution de la CK dans le cœur après une injection du venin de *Vipera lebetina* par voie intra-péritonéale et par voie sous cutanée, montre que l'effet myonécrotique du venin de *Vipera lebetina* au niveau du cœur est légèrement plus élevé en utilisant la voie intra-péritonéale que la voie sous cutanée (Amrane, 2002).

Le ventricule gauche est le tissu le plus lésé. Ces lésions seraient dûs à l'épaisseur relativement mince de la paroi de ventricule droit qui est suffisamment irrigués par le sang ou aux exigences métaboliques de ventricule droit qui sont moindres que celles de ventricule gauche. Il y a moins d'interférences avec la constriction des vaisseaux intra-myocardiques durant la systole dans le ventricule droit que dans le ventricule gauche (Nakamura, 1986).

La myonécrose induite par le venin de *C. cerastes* au niveau de muscle squelettique semble être caractérisée par une hémorragie et un œdème très intenses. La taille des fibres musculaire est également affectée par ce venin. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus avec le venin de *Vipera lebetina* (Amrane, 2002), *Bungarus caeruleus* (Alok et *al.*, 1996) et *Bothrops jararacussu* (Melo et Kurtz., 1988).

Les venins d'*Elapidae* tels que celui de *Pseudechis australis* (Ponja et Gopalakrischnakone., 1996; Gopalakrischnakone., 1996), de la crotoxine isolée à partir du venin de *Crotalus durissus terrificus* (Salvini et *al.*, 2001) et du venin de *Vipera russelli* (Ariaratnam et *al.*, 1999), ont des actions systémiques affectant plusieurs muscles squelettiques.

L'essai de purification d'une molécule oedématisante à partir du venin de *Cerastes cerastes* a montré que l'œdème plantaire est dû à l'action de plusieurs molécules qui agissent en synergie. L'activité oedématisante a été retrouvée dans les fractions GF1 et GF3 issues de la filtration moléculaire et dans les fractions D1 et D3 issues de l'échangeuse d'anions de la fraction oedématisante la GF3. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus avec le venin de *Vipera lebetina* (Amrane, 2002).

Conclusion

Conclusion

Le travail que nous avons réalisé a eu pour objectif d'étudier les activités oedématisante et myotoxique induites par le venin de *Cerastes cerastes*.

La cinétique de l'œdème plantaire induit par le venin de *Cerastes cerastes* montre une apparition rapide de l'œdème plantaire après quelques minutes d'envenimation (30 min) et un pic après 3 heures suivi par une diminution progressive jusqu'au retour à la normale après 48 heures. Ces résultats sont corrélés avec la libération des cytokines au niveau de la patte. Il apparaît une production intense des cytokines pro-inflammatoires entre 2 h à 6 h d'envenimation et un pic de l'IL10 à 3 h.

La voie des PLA₂ semblerait être impliquée dans le phénomène d'apparition de l'œdème induit par le venin de *Cerastes cerastes*. Le venin de *Cerastes cerastes* semble présenter une action directe et/ou indirecte sur le système rénine-angiotensine-aldostérone et que la sérotonine et l'histamine sont libérées lors de l'envenimation par le venin de *Cerastes cerastes* après dégranulation des mastocytes.

Le venin de *Cerastes cerastes* est un mélange complexe de molécules qui ont une action directe et/ou indirecte sur le tissu musculaire (squelettique et cardiaque). La créatine kinase contenue dans les cellules musculaires est libérée dans le sang après lyse cellulaire. Après 24 h d'envenimation, il y a une régénération des cellules et le taux de la CK dans le sang et dans le muscle revient à la normale. L'étude histopathologique des muscles squelettique et cardiaque après envenimation des souris avec le venin de *C. cerastes* et ses fractions moléculaires, montre une atteinte musculaire et confirme les résultats obtenus après le dosage de la créatine kinase.

L'essai de purification d'une molécule oedématisante à partir du venin de *Cerastes cerastes* a montré que l'œdème plantaire est dû à l'action de plusieurs molécules qui ont un effet additif. Il s'agit des molécules hémorragiques qui détruisent la lame basale des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, des molécules qui ont un effet sur le système rénine-angiotensine-aldostérone en accentuant la rétention d'eau dans les tissus ou encore des molécules qui activent le système immunitaire en libérant les cytokines pro-inflammatoires et des médiateurs vasoactifs qui agissent sur leurs récepteurs au niveau des capillaires, en provoquant une augmentation de la perméabilité vasculaire.

En perspective et en continuité avec le travail réalisé, il serait intéressant de :

- Purifier la fraction D3 et de la caractériser.
- Chercher d'autres molécules oedématisantes ou myotoxiques dans les fractions GF1 et GF2.
- Utiliser d'autres inhibiteurs pour la caractérisation de l'œdème plantaire.
- Approfondir l'étude de l'activité myotoxique en utilisant l'immuno-histologie.
- Utiliser l'immunothérapie pour neutraliser l'effet du venin.

*Références
bibliographiques*

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Abe, Y., Shimoyama, Y., Munakata, H., Ito, J., Nagata, N., Ohtsuki, K., 1998. Characterization of an apoptosis-inducing factor in Habu snake venom as a glycyrrhizin (GL)-binding protein potently inhibited by GL in vitro. *Biol. Pharm. Bull.* 21, 924–927.
- Ahn, M.Y., Lee, B.M., Kim, Y.S., 1997. Characterization and cytotoxicity of L-amino acid oxidase from the venom of king cobra (*Ophiophagus hannah*). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29, 911–919.
- Alexander, G., Grothusen, J., Zepeda, H., Schwartzman, R.J., 1988. Gyroxin, a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*, is a thrombin-like enzyme. *Toxicon* 26 (10), 953-960.
- Alok, K. et Gopalakrishnakone, P., 1996. Neurotoxic and myotoxic effects of *Bungarus caeruleus*: pharmacologic and pathologic observation. *Toxicon* 34, 624.
- Amrane, F., 2002. Etude des coagulopathies, de cytotoxicité et des désordres métaboliques provoqués par une envenimation expérimentale avec le venin natif de *Vipera labatina*. Thèse de magister. USTHB. 119p.
- Ande, S.R., Fussi, H., Knauer, H., Murkovic, M., Ghisla, S., Fröhlich, K.U., Macheroux, P., 2008. Induction of apoptosis in yeast by L-amino acid oxidase from the Malayan pit viper *Calloselasma rhodostoma*. *Yeast* 25, 349–357.
- Andrio-Escarso, S. H., Soares, A. M., Rodrigues, V. M., Angulo, Y., Diaz, C., Lomonte, B., Gutierrez, J. M. et Giglio, J. R., 2000. Myotoxic phospholipases A₂ in Bothrops snakes venoms: Effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of Bothrops toxins from *Bothrops jararacussu*. *Biochimie* 82, 755-763.
- Angulo, Y., Nunez, C. E., Lizano, S., Soarez, A. M., Lomonte, B., 2001. Immunochemical properties of the N-terminal helix of myotoxin II, a lysine - 49 phospholipase A₂ from *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon* 39, 879-887.
- Audebert, F., 1993. Analyse clinique et pharmaceutique des envenimations par les vipères européennes. Thèse de doctorat: Toxicologie, VIII (Paris) : 1-23.

B

- Barbora, A.M., Amaral, R.O.D., Teixeira, C.F.P., Hyslop, S., Cogo, J.C., 2003. Pharmacological characterization of mouse hind paw oedema induced by *Bothrops insularis* (Jararaca ilhoa) snake venom. *Toxicon* 42, 515-523.
- 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.
- Bhargara, N., Vargaflig, B. B., Vos, C. J., De Bonta, I. L. et Tijs, J., 1972. Dissociation of edema provoking factor of *Agkistrodon piscivorus* venom from kininogenas. *Vasopeptides chemistry, Pharmacology and pathophysiology*. 141. New york: Plenum.
- Bjarnason, J. B., Tu, A.T., 1978. Hemorrhagic toxins from Western Diamond Rattles snake (*Crotalus astrox*) venom : isolation and characterization of five toxins and the role of Zinc in hemorrhagic toxin. *biochemistry* 17(16), 3395-3404.
- Bjarnason, J.B., Fox, J.W., 1994. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmacol. Therapeut* 62, 325–372.
- Bomalaski, J.S., Lawton, P., Browning, J.L., 1991. Human extracellular recombinant phospholipase A2 induces an inflammatory response in rabbit joints. *J. Immunol.* 146, 3904-3910.
- Bogdan, C., Vodovotz, Y., Nathan, C., 1991. Macrophage deactivation by interleukin 10. *J. Exp. Med.* 174, 1549-1555.
- Bonta I.L., Vargaftiy B.B., Bohm G.M., 1979. Handbook of experimental pharmacology. In: Lee, C.Y., (Ed), snake venoms 52, 629-683.
- 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.
- Boué, H. et Chonton, R., 1974. Zoologie, protocordés et vertébrés. Tome 2. Doin Editeur, Paris, 402p.
- Boulanger, P., Polonovski, J., Biserte, G., Dautrevaux, M., 1989. Abrégé de biochimie médicale. Les constituants des organismes vivants. 2^{ème} Ed. Masson.

- Boukhalifa-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.
- Bowton, D.L., Seeds, M.C., Fasano, M.B., Goldsmith, B., Bass, D.A., 1997. Phospholipase A2 and arachidonate increase in bronchoalveolar lavage fluid after inhaled antigen challenge in asthmatics. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 155, 421–425.
- Boyce JA. , 2003. Mast cells: beyond IgE., *J Allergy Clin Immunol.* 111, 24—32.
- Brain, S.D., 1996. Sensory neuropeptides in the skin. In: Geppetti, P., Holzer, P. (Eds.), *Neurogenic Inflammation*, CRC Press, Boca raton, FL, 229–244.
- Braud, S., Bon, C., Wisner, A., 2000. Snake venom proteins acting on hemostasis. *Biochimie* 82, 851-859.

C

- Cabanne F. et Bonenfant J.L., 1980. *Anatomie pathologique : principes de pathologie générale et spéciale*. Maloine S.A., Editeur , Paris, p.
- Câmara, P.R.S., Esquisatto, L.C.M., Camargo, Ribela, Toyama, Marangoni, Nucci, Antunes, 2003. Inflammatory oedema induced by phospholipase A2 isolated from *Crotatus durissus* sp. In the rat dorsal skin: a role for mast cells and sensory C-fibers. *Toxicon* 41, 823-829.
- Castro, R.C., Landucci, E.C.T., Toyama, M.H., Giglio, J.R., Marangoni, S., De Nucci, G., Antunes, E., 2000. Leucocyte recruitment induced by type II phospholipases A2 into the rat pleural cavity. *Toxicon* 38, 1773–1785.
- Celly, C., Atwal, O. et Mcdonell, W. N., 1999. Histopathologic alterations induced in the lungs of sheep by use of (2 adrenergic receptor agonists. *Am. J. Vet. Res.* 60, 154-161.
- Chang, C.C., Tseng, K.H., 1978. Effect f crotamine, a toxine of South American rattlesnake venom, on the sodium chanel of urine skeletal muscle. *Br.J.Pharmac.* 63, 551-557.
- 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.
- Chaou, N., 2006. Etude des réponses Physiopathologiques, Pharmacologiques et Immunologiques de l'envenimation vipérine chez la souris. Thèse de Magister, HSTHB, Alger. P130.
- Chen, I-J., Chiu, H-F., Huang, H-T. et Teng, C-M., 1984. Edema formation and degranulation of mast cells by *Trimeresurus mucrosquamatus* snake venom. *Toxicon* 22, 17-28.
- 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.
- Cirino, G., Peers, S.H., Wallace, J.L., Flower, R.J., 1989. A study of phospholipaseA2-induced oedema in rat paw. *Eur. J. Pharmacol.* 166, 505–510.
- Colombe Barbara, Christian Massot, 2000. Oedèmes des membres inférieurs, *La revue du praticien*, Vol 57.
- Curti, B., Ronchi, S., Simonetta, P.M., 1992. In: Mueller, F. (Ed.), *D and L-amino acid oxidases. . Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes*. CRC Press, Boca Roton, FL. 3, 69–94.

D

- D’Bismut, D., 1990. *La vie médicale*. Hopital Saint- Michel (Paris). Ed. Flammarion.
- 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.

- De Faria, L., Antunes, E., Bon, C., De Araujo, A.L. 2001. Pharmacological characterization of the rat paw edema induced by *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom. *Toxicon* 39, 825-830.
- De Moura, R. S., Aguiar, A. S., Melgarejo, A. R. et De Carvalho, L., 1998. Pharmacological aspects of mouse hind-paw induced by *Lachesis muta rhombeata* venom. *Toxicon* 36, 771-780.
- Dennis, E.A., 1994. Diversity of group type, regulation, and function of phospholipase A2. *J. Biol. Chem.* 269 (18), 13057-13060.
- Dixon, R.W., Harris, J.B., 1999. Nerve terminal damage by β -bungarotoxin, its clinical significance. *AM. J. Pathol* 154, 447-455.
- Doherty D.E., Downey G.P., Worthen G.S., Hastlett C., Henson P.M., 1988. Monocyte retention and migration in pulmonary inflammation: requirement for neutrophils. *Lab Invest* 59, 200-213.
- Domingos, M.O., Barbaro, K.C., Tynan, W., Penny, J., Lewis, D.J.M., New, R.R.C., 2003. Influence of sphingomyelin and TNF α release on lethality and local inflammatory reaction induced by *Loxosceles gaucho* spider venom in mice. *Toxicon* 42, 471-479.
- Dong, M., Guda, K., Nambiar, P.R., Rezaie, A., Belinsky, G.S., Lambeau, G., Giardina, C., Rosenberg, D.W., 2003. Inverse association between phospholipase A2 and COX-2 expression during mouse colon tumorigenesis. *Carcinogenesis* 24, 307-315.

E

- El- Asmar, M.F., Shaban, E., Hagag, M., Swelam, N., Tu, A., 1986. Coagulant component in *Cerastes cerastes* (Egyptian sand viper) venom *Toxicon* 24 (11/12), 1037-1044.
- El-Ayeb, M., Karoui, H., 1997. Identification des composés toxiques dans les venins de vipères *Cerastes cerastes* et *Vipera lebetina*. *Archs. Inst. Past. Tunis* T 73 (1-2), 93-95

F

- 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
- Foreman, J.C., Jordan, C.C., Oehme, P., Renner, P., 1983. Structure-activity relationships for some substance P-related peptides that cause wheal and flare reactions in human skin. *J. Physiol.* 335, 449–465.
- Fukuhara, Y.D.M., Reis, M.L., Dellalibera-Joviliani, R., Cunha, F.Q.C, et Donadi, E.A., 2003. Increased level of IL-1, IL6, IL8, IL10 and TNF α in patients moderately or severely envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. *Toxicon* 41, 49-55.

G

- Galli SJ, Nakae S, Tsai M., 2005. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol.* 6, 135-42.
- Galli, S.J., Tsai, M., 2008. Mast cells: Versatile regulators of inflammation, tissue remodeling, host defense and homeostasis. *Journal of Dermatological Science.* 49, 7—19.
- Gopalakrishnakone, P., 1996. Toxins and Venoms myotoxicity. *Toxicon* 34, 292.
- Gurish MF, Austen KF., 2001. The diverse roles of mast cells. *J Exp Med;* 194, F1-5.
- Gutiérrez, J. M. et Chaves, F., 1980. Efectos proteolítico, hemorrágico y mionecrótico de los venenos de serpientes costarricenses de los géneros *Bothrops*, *Crotalus* y *Lachesis*. *Toxicon* 18, 315-321.
- Gutiérrez, J. M. et Lomonte, B., 1995. Phospholipases A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon* 33, 1405-1424.
- Gutiérrez, J.M., Rucavado, A., 2000. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie* 82, 841-850.

H

- Harris, J.B., Mac Danell, C.A., 1981. Phospholipase A2 activity of notexin and its role in muscle damage. *Toxicon* 19,13, 419-430.
- Harris, L.K., Franson, R.C., 1991. Coleate-labeled autoclaved yeast: a membranous substrate for measuring phospholipase A2 activity in vitro. *Anal. Biochem.* 193, 191–196.
- Harris, J.B., 1997. Toxic phospholipases in snake venom: an introductory review. (In venomous snake Ecology, Evolution and Snakebite. Edité par Thorpe, R.S., Wuster, W., Malhotra, A. Publié pour The Zoological society of London. Calderon Press. Oxford. 70 ; 235-250.
- Harris, J.B., Grubb, B.D., Maltin, C.A., Dixon, R., 2000. The neurotoxicity of the venom phospholipase A2, Notexin and Taipoxin. *Experimental Neurology.* 161, 517-526.
- Hawgood, B.J., 2002. Professor Chen-Yuan Lee, MD (1915–2001), pharmacologist: snake venom research at the Institute of Pharmacology, National Taiwan University. *Toxicon* 40, 1065–1072.
- Huang, S. Y. et Perez, J. C., 1982. A comparative electron microscopic study of myonecrosis induced by *Crotalus atrox* in gray woodrats and mice. *Toxicon* 20, 443-449.

I

- Issekutz A. C., Movat H. Z., 1980. The in vivo quantitation and kinetics of rabbit neutrophil leukocyte accumulation in the skin in response to chemotactic agents *Escherichia coli*. *Lab Invest* 42, 310-317.
- Iwanaga S., Suzuki, T., 1979. Enzymes in snake venoms. *Hand. Exp. Pharm.* 52, 61-144.

J

- Jensen, L.B., Burgess, N.K., Gonda, D.D., Spencer, E., Wilson-Ashworth, H.A., Driscoll, E., Vu, M.P., Fairbourn, J.L., Judd, A.M., Bell, J.D., 2005. Mechanisms governing the level

of susceptibility of erythrocyte membranes to secretory phospholipase A2. *Biophys. J.* 88, 2692–2705.

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

K

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

- 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., 1989. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipase A2. *Toxicon* 27 (6), 613-635.

- Kini, R.M., Evans, H.J., 1992. Structural domains in venom proteins: evidence that metalloproteinases and non enzymatic platelet aggregation inhibitors (disintegrins) from snake venoms are derived by proteolysis from a common precursor. *Toxicon* 30 (3), 265-293.

- Kitagawa, H., Kano, M., Sasaki, Y. et Hirano, Y., 1991. Serum creatine kinase activities in dogs with dirofilariasis. *J. Vet. Med. Sci.* 53, 569-575.

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

- Kouyoumdjian, J. A., Harris, J. B. et Johnson, M. A., 1986. Muscle necrosis by the sub-units of crotoxin. *Toxicon* 24, 575-583.

L

- Labib, R. S., Halim, H. Y., Farag, N. W., 1979. Fractionation of *Cerastes cerastes* and *Cerastes vipera* snake venoms by gel filtration and identification of some enzymatic and biological activities. *Toxicon*, 17, 339-343.
- Labib, R.S., Awad, E.R., Faray, N.W., 1981. Proteases of *Cerastes cerastes* (Egyptian sand viper) and *Cerastes vipera* (Sahara sand viper) snakes venoms. *Toxicon* 19, 73-78.
- Landucci, E.C.T., Pereira, M.F., Cintra, A.C.O., 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.
- Landucci, E.C.T., Toyama, M., Marangoni, S., Oliveira, B., Cirino, G., Antunes, E., De Nucci, G., 2000. Effect of crotapotin and heparin on the rat paw oedema induced by different secretory phospholipases A2. *Toxicon* 38, 199–208.
- Laraba-Djebari, F., 1984. Contribution à l'étude structurale et biochimique de la phospholipase A₂ du venin de la vipère *Cerastes cerastes*. Thèse de Magister, USTHB, Alger. 72 p.
- Laraba-Djebari, F., Martin-Eauclaire, M. F., Matchot, P., 1992. A fibrinogen-clotting serine proteinase from *Cerastes cerastes* (Horned viper) venom with arginine-esterase and amidase activities, Purification - characterization and kinetic parameter determination. *Toxicon* 30 (11), 1399-1410.
- Laraba-Djebari, F., Martin-Eauclaire, M. F., Mauco, G., Marchot, P., 1995. Afaacytin, an αβ-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 p.
- Lau, H.Y., Roche, C.M., 1997. Effects of secretory phospholipase A2 enzymes on mast cells of rat, guinea pig and human. *Inflamm. Res.* 46, S19–S20.

- Ley K. 1966 Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in the inflammatory process. *Cardiovasc. Res.* 32, 733-742.
- Li, Z.Y., Yu, T.F., Lian, E.C., 1994. Purification and characterization of L-amino acid oxidase from King cobra (*Ophiophagus hannah*) venom and its effects on human platelet aggregation. *Toxicon* 32, 1348–1358.
- Lima, C., Clissa, B.P., Piran-Soares, A.A., Tanjoni, I., Moura-da-Silva, A.M., Lopes-Ferreira, M., 2003. Characterisation of local inflammatory response induced by halassophryne natteri fish venom in mouse model of tissue injury. *Toxicon*. 42, 499-507.
- Lomonte, B., 1985. Edema activity of *Lachesis muta stenophrys* and *Crotalus durissus durissus* venoms and neutralisation by a polyvalent antivenom. *Toxicon* 23, 173-176.
- Lomonte, B., Gutiérrez, J. M. et Mata, E., 1985. Isolation of an antibody specific to a myotoxin, molecule of *Bothrops asper* snake venom from a polyvalent antivenom. *Toxicon* 23, 807-813
- Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., Furtado, M.F., Otero, R., Rosso, J.P., Vargas, O., Carmona, E., Ravira, M. E., 1990. Isolation of basic myotoxins from *Bothrops maojeni* and *Bothrops atrox* snake venoms. *Toxicon* 28, 1137-1146.
- Lomonte, B., Gutiérrez, J. M., Borkow, J., Ovidia, M., Tarkowski, A., Hanson, L. A., 1994. Activity of hemorrhagic metalloproteinase BaH1 and myotoxin II from *Bothrops asper* venom on capillary endothelial cells in vitro. *Toxicon* 32, 505-510.

M

- Maria Fernandes C. , Zamuner S. R. , Zuliani J.P. , Gutiérrez J. M. et Teixeira C. F. P., 2007. Inflammatory effects of BaP1 a metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* snake venom : leukocyte recruitment and release of cytokines. *Toxicon* 47, 549-559.
- Marsh, N. A., 1994. Snake venom affecting the haemostatic mechanism: a consideration of their mechanism, practical applications and biological significance. *Blood.Coagul. Fibrinolysis* 5, 399-410.

- Marrakchi, N., Barbouche, R., Guermazi, S., Bon, C., El-Ayeb, M., 1997. Procoagulant and platelet- aggregating properties of Cerastocytin from *Cerastes cerastes* venom. *Toxicon* 35 (2), 261-272.
- Massey, V., Curti, B., 1967. On the reaction mechanism of *Crotalus adamanteus* L-amino acid oxidase. *J. Biol. Chem.* 242, 1259–1264.
- Matsuki, N, Tamura, S., Ono, K., Watari, T., Giotsuka, R., Yamanobe, A., Hiraga, A., Kubo, K., Takagi, S., Hasegawa, A. et Suzuki, N., 1991. Exercise-induced phospholipid degradation in the equine skeletal muscle and erythrocyte. *J.Vet.Med. Sci.* 53, 1001-1007.
- Matsui, T., Fujimura, Y., Titani, K., 2000. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. *Biochim. Biophys. Acta*, 1477, 146-156.
- Mebs, D., Ehrenfeld, M. et Samejima, Y., 1983. Local necrotizing effect of snake venoms on skin and muscle: Relationship to serum creatine kinase. *Toxicon* 21, 393-404.
- Mebs, D., Samejima, Y., 1986. Isolation and characterization of myotoxic phospholipases A2 from crotalid venoms. *Toxicon* 24, 3, 161-168.
- Ménez, A., 1993. Structures des toxines des animaux terrestres. *Pour la science* 190, 35-42.
- Menez, A., 1995. Les venins et toxines de serpents (In Goyffon, M., Heurtault, Y. La fonction venimeuse). Edition Masson :p. 200-220.
- Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA., 1997. Mast cells. *Physiol Rev.* 77, 1033-79.
- Metz M, Piliponsky AM, Chen CC, Lammel V, Abrink M, Pejler G., 2006. Mast cells can enhance resistance to snake and honeybee venoms. *Science* 313, 526-30.
- Melo, P. A. et Kurtz, G., 1988. Release of sarcoplasmic enzymes from skeletal muscle by *Bothrops jararacussu* venom: Antagonism by heparin and by the serum of South America marsupials. *Toxicon* 26, 87-95.
- Moreno, J.J., Ferre, X., Ortega, E., Carganico, G., 1992. Phospholipase A2-induced oedema in rat skin and histamine release mast cells. Evidence for involvement of lysophospholipids in the mechanism of action. *Agents Act.* 36, 258–263.
- Moreno, J.J., 1993. Effect of aristolochic acid on arachidonic acid cascade and in vivo models of inflammation. *Immunopharmacology* 26, 1–9.

N

- Nakamura, K., 1986. Focal myocardial necrosis with calcification in two yang chickens. J. Comp. Path. 96, 711-715.
- Nishida, S., Terashima, M., Shimazu, T., Takasoki, C., Tamiya, N., 1985. Isolation and properties of two phospholipases A₂ from the venom of an Australian elapid snake (*Pseudoechis australis*). Toxicon 23, 73-85.

O

- Ohsaka A., 1979. Hemorrhagic, necrotizing and edema-forming effects of snake venoms. In Lee C.Y. (Ed), Handbook of experimental pharmacology. snake venoms, vol. 52. springer, berlin, pp. 480-546.
- Olivo, R. A., Teixeira, C.F.P., Wallace, J. L., Gutiérrez, J. M. et Zamuner, S. R., 2007. Role of cyclogenases in oedema-forming activity of bothropic venoms. Toxicon 49, 670-677.
- Oshima, G., Sato, T. et Suzuki, T., 1969. Proteinase, arginineester hydrolase and a kinin releasing enzyme in snake venoms. Toxicon 7, 229-233.
- Oussedik-Oumehdi, H., 2007. Effet de l'irradiation Gamma sur les propriétés biochimiques et immunologiques du venin de *Cerastes cerastes*: Apport dans l'immunothérapie ophodienne. Thèse de Doctorat d'Etat (USTHB).129p.
- Ownby, C. L. et Colberg, T. R., 1988. Classification of myonécrosis induced by snake venoms: Venoms from *Crotalus viridis viridis*, *Crotalus atrox* and *Naja naja naja*. Toxicon 26, 459-474.
- Ownby, C. L., Nika, T., Imai, K. et Sugihara, H., 1990. Pathogenesis of hemorrhage induced by bilitoxin, a hemorrhagic toxin isolated from the venom of the common cantil (*Agkistrodon bilineatus bilineatus*). Toxicon 28, 837-846.
- Ownbhy C.L., Selistre de Araujo, H.S., White S.P., Fletcher J.E., 1999. Lysine 49 phospholipase A₂ proteins. Toxicon , 411-445.
- 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.

- Ouyang, Y., Kaminski, N.E., 1999. Phospholipase A2 inhibitors pbromophenacyl bromide and arachidonyl trifluoromethyl ketone suppressed interleukin-2 (IL-2) expression in murine primary splenocytes. *Arch. Toxicol.* 73, 1–6.

P

- Ponraj, D. et Gopalakrishnakone, P., 1996. Morphologic characterization of renal damage myoglobinuric after *Pseudechis australis* envenimation. *Toxicon* 34, 317.

- Pukrittayamee, S., Warrell, D.A., Desakorn, V., McMichael, A.J., White, N.J., Bunnag, D., 1988. The hyaluronidase activities of some southeast asian snake venom. *Toxicon* 26 (7), 629-637.

Q

- Quieroz, L. S., Neto, H. S., Simioni, L. et Francechi, J., 1984. Muscle necrosis and regeneration after envenimation by *Bothrops jararacussu* snake venom. *Toxicon* 22, 339-346.

R

- Rahmy, T.R., Ramadan, R.A., Farid, T.M., El-Asmar, M.F., 1995. Renal lesions induced by cobra envenomation. *J. Egypt. Ger. Soc. Zool.* 17, 251-271.

- Rabinovitch, M., De Stefano, M.J., 1973. Macrophage spreading in vitro. I. Inducers of spreading. *Exp. Cell. Res.* 77, 323–334.

- Rivière, G., Coumet, V., Audebert, F., Sabouraud, F., Debray, M., Scherrmann, J.M., Bon, C., 1997. Effect of antivenm pharmacokinetics in experimentally envenomed rabbits: toward an optimization of antivenom therapy. *J.Pharm. Exp. Ther.* 281, N:1-8.

- Rivière, G., Bon, C., 2000. Immunothérapie antivenimeuse vers une approche rationnelle d'un traitement empirique. *Ann. Inst. Pasteur.* 2, 53-68.

- Ruckebus, Y., 1981. *Physiologie, phamacologie thérapeutique animale.* Maloine S.A. Paris. pp. 364-495.

- Rucovado, A. et Lomonte, B., 1996. Neutralization of myonecrosis, hemorrhage and edema induced by *Bothrops asper* snake venom by homologues and heterologous pre-existing antibodies in mice. *Toxicon* 34, 577-587.
- Robinson S.D., Frenette P. S., Rayburn H., Cmmuskey M. Ullman-Cullere M. Wagner D.D. , Hynes R.O. 1999. Multiple, targeted deficiencies in selectins reveal a predominant role for P-selectin in leukocyte recruitment, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96, 11452-11457.
- Ross et Wilson, 2003. Anatomie et physiologie normale et pathologique, édition Maloine, Paris 118, 119 p
- Ryan G.B., Majno G. 1977. Acute inflammation. *Am. J.Pathol.* 86, 185-274.

S

- Samel, M., Subbi, J., Siigur, J., Siigur, E., 2002. Biochemical characterization of fibrinolytic serine proteinases from *Vipera lebetina* snake venom. *Toxicon*, 40, 51-54.
- Samel, M., Vija, H., Ronnholm, G., Siigur, J., Kalkkinen, N., Siigur, E., 2006. Isolation and characterization of an apoptotic and platelet aggregation inhibiting L-amino acid oxidase from *Vipera berus berus* (common viper) venom. *Biochim. Biophys. Acta* 1764, 707–714.
- Salvini, T.F., Belluzzo, S. S., De Aaujo, S. H. S. et Souza, D. H. S., 2001. Regeneration and change of muscle fibre types after injury induced by a hemorrhagic fraction isolated from *Agkistrodon contortrix laticinctus* venom. *Toxicon* 39, 641-649.
- Saria, A., Hua, X., Skofitsch, G., Lundberg, J.M., 1984. Inhibition of compound 48/80-induced vascular protein leakage by pretreatment with capsaicin and a substance P antagonist. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 328, 9–15.
- Selistre, H. S., Queiroz, L. S., Cunha, O. A. B., De Souza, G. E. P. et Giglio, J. R., 1990. Isolation and characterization of hemorrhagic, myonecrotic and edema inducing toxins from *Bothrops insularis* snake venom. *Toxicon* 28, 261-273.
- 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.

- Smith M.L. , Sperandio M. Galkina E.V., Ley K., 2004. Autoperfused mice flow chamber reveals synergistic neutrophil accumulation through P- selectin and E-selectin. *J. Leukoc. Biol.* . 76, 985-993.
- Sofer, S., Gueron, M., White, R.M., Lifshitz, M. et Apte, R.N., 1996. Interleukin 6 release following scorpion sting in children. *Toxicon* 34, 398-392.
- Sophie de Seigneux, Eric Feraille, Pierre-Yves Martin, 2003. Mécanismes extrarénaux de la formation des œdèmes, *Forum Med Suisse* No9, 26février.
- Souza, D.H., Eugenio, L.M., Fletcher, J.E., Jiang, M.S., Garratt, R.C., Oliva, G., Selistre-de-Araujo, H.S., 1999. Isolation and structural characterization of a cytotoxic L-amino acid oxidase from *Agkistrodon contortrix laticinctus* snake venom: preliminary crystallographic data. *Arch. Biochem. Biophys.* 368, 285–290.
- Stadel, J.M., Hoyle, K., Naclerio, R.M., Roshak, A., Chilton, F.H., 1994. Characterization of phospholipase A2 from human nasal lavage. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 11, 108–113.
- Steinhoff, M., Vergnolle, N., Young, S.H., Tognetto, M., Amadesi, S., Ennes, H.S., Trevisani, M., Hollenberg, M.D., Wallace, J.L., Caughey, G.H., Mitchell, S.E., Williams, L.M., Geppetti, P., Mayer, E.A., Bunnett, N.W., 2000. Agonists of proteinaseactivated receptor 2 induce inflammation by a neurogenic mechanism. *Nat. Med.* 6, 151–158.

T

- Teixeira C.F.P., Landucci E.C.T., Antunes E., Chcur M., Cury Y., 2003. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipase A2 . *Toxicon* 42, 947-962.
- 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.
- Ticli, F.K., 2006. Caracterização Estrutural e Funcional da L-aminoácido oxidase do veneno de *Bothrops jararacussu* e avaliação da ação antitumoral, antiparasitária e bactericida. PhD Thesis, Universidade de São Paulo, USP, Brazil.

- Torii, S., Naito, M., Tsuruo, T., 1997. Apoxin I, a novel apoptosis-inducing factor with L-amino acid oxidase activity purified from Western diamondback rattlesnake venom. *J. Biol. Chem.* 272, 9539–9542.
- Toyama, M.H., Toyama, D.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., Fontelles, M.C., 2006. Isolation of a new L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cascavella* venom. *Toxicon* 47, 47–57.

V

- Vadas, P., 1984. Elevated plasma phospholipase A₂ levels: correlation with the hemodynamic and pulmonary changes in Gram-negative septic shock. *J. Lab. Clin. Med.* 104, 873–881.
- Vadas, P., Pruzanski, W., 1986. Role of secretory phospholipases A₂ in the pathobiology of disease. *Lab. Invest.* 55, 391–404.
- 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.
- Vera, L., Gutiérrez, J.M., Denise, V., Teixeira, C.F.P., 2000. Increment in serum cytokine and nitric oxide levels in mice injected with *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicon* 38, 1253-1266.
- Viana, C.F.G., Melo, D.H., Carneiro-Filho, B.A., Michelin, M.A., Brito, G.A.C., Cunha, F.Q., Lima, A.A.M., Rebeiro, R.A., 2002. Pro-inflammatory effects of cholera toxin: role of tumor necrosis factor alpha. *Toxicon* 40, 1487-1494.

W

- Wang, J.P., Teng, C.M., 1990. Comparison of the enzymatic and edema-producing activities of two venom phospholipase A₂ enzymes. *Eur. J. Pharmacol.* 190, 347–354.

- Wang, W.J., Huang, T.F., 2002. Purification and characterization of a novel metalloproteinase, Acurhagin from *Agkistrodon acutus* venom. *Thromb. Haemost* 87, 641-650.
- Warrell, D.A., 1989. Snake venom in science and clinical medicine. I. Russell's viper : biology, venom and treatment of bites. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med Hyg.* 83, 732-740.
- 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.
- Wisner, Bon, C., 2002. Venins et hémostasie. *Toxines et recherche bioledicale*. Edition scientifique et medicale. Elsevier, 321-324.

Y

- Yamakawa, M., Nozaki, M., Hokawa, Z., 1976. Fractionation of *Trimeresurus elegans* venom and lethal hemorrhagic, and edema-forming activities of the fractions. *Plenum press* 1, 97-109

Z

- Zhang, D., Botos, I., Gomis-Ruth, F.X., Doll, R. Blood, C., Njoroge, F.G., Fox, J.W., Bode, W., Meyer, E.F., 1994. Structural interaction of natural and synthetic inhibitors with the venom metalloproteinase, atrolysin C (form d). *Proc. Natl. Acad. Sci* 91, 8447-8451.
- Zhang, Y.I., Wang, J.H., Lee, W.H., Wang, Q., Liv, 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.
- Zuliani, P., Juliana, Cristia, M. Fernandes, Stella, R., Zamuner, José, M., Gutiérrez, Ctarina, F.P., Teixeira, 2005. Inflammatory events induced by Lys-49 and Asp-49 Phospholipases A2 isolated from *Bothrops asper* snake venom : role of catalytic activity. *Toxicon* 45, 335-346.

- 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.

- Zouari-Kessentini R. , Luis J., Karray A., Kallech-Ziri O., Srairi-Abid N., Bazaa A., Loret E., Bezzine S., El Ayeb M., Marrakchi N., 2009. Two purified and characterized phospholipases A2 from *Cerastes cerastes* venom, that inhibit cancerous cell adhesion and migration. *Toxicon* 53, 444-453.

Abstract

The Snake envenomation constitutes a serious public health problem in many countries around the world. In Algeria, the two species widespread are *cerastes cerastes* and *Vipera lebetina*. Bites *cerastes cerastes* result in severe tissue and metabolic disturbances that cause the edema, the bleeding and tissue necrosis characteristics of viperid envenomation.

In this study, the edematic and myotoxic activities of *Cerastes cerastes* venom have been reported. The evaluation of the enzymatic activity of Creatine Kinase was revealed the myotoxic activity of *Cerastes cerastes* venom. Administration of a sublethal dose of venom caused a lysis of muscle cells (skeletal and cardiac) and therefore a considerable release of Creatine Kinase in blood after 3 hours of envenomation.

The study of the edematic activity of *Cerastes cerastes* venom showed that plantar edema is a reversible phenomenon and time-dependant. Its maximum is reached after 3 hours of envenomation. Intense release of pro-inflammatory cytokines in the leg was observed after 2 hours and persisted up to 6 hours. A peak of IL10 was observed at 3 hours. These results are consistent with the phenomenon of appearance of plantar edema.

To understand the mechanism of action of *Cerastes cerastes* venom and to highlight the ways involved in the phenomenon of appearance of plantar edema, pre-treatments with specific inhibitors were used. The way of PLA2 appears to be involved in the phenomenon of appearance of plantar edema induced by the venom of *Cerastes cerastes* and the way of histamine and serotonin. The venom of *Cerastes cerastes* appears to have an effect on the renin-angiotensin-aldosterone system.

Keys words : Edema, Myotoxicity, *Cerastes cerastes*.

ملخص

التسمم الثعباني يمثل مشكلا عويصا في الصحة العمومية في مختلف دول العالم . في الجزائر الأنواع الأكثر شيوعا هي *Vipera libetina* و *Cerastes Cerastes* لدغة هذا الأخير تؤدي إلى اختلالات نسيجية واستقلابية خطيرة والتي تعد مصدرا لظهور الانتفاخ الالتهابي، النزيف والموت النسيجي. في هذه الدراسة تم التطرق الى النشاط الانتفاخي الالتهابي و التسمم العضلي الناجم عن لدغة *Cerastes Cerastes* . تقييم النشاط الإنزيمي ل Creatine Kinase (CK) دل على أن سم هذا الثعبان يحدث تسمما عضليا مؤديا بعد 3 ساعات إلى التحلل الخلوي وتحرر أنزيم CK في المجاري الدموية . برهنت دراسة النشاط الالتهابي على أن سم الثعبان *Cerastes Cerastes* يحدث انتفاخا محليا انعكاسيا مرتبط بالوقت ، يبلغ أقصاه بعد 3 ساعات من التسمم . طرح كثيف لسيتوكينات الالتهابية في النسيج المنتفخ قد لوحظ بعد ساعتين والذي استمر حتى بعد 6 ساعات من التسمم . ذروة السيتوكين IL 10 لوحظت بعد 3 ساعات. هذه النتائج تؤيد توقيت ظهور الانتفاخ المحلي. من اجل فهم معمق لآلية التفاعل أنتسمي لسم *Cerastes Cerastes* و إظهار الطرق المؤدية لإحداث ظاهرة الانتفاخ الالتهابي لقد أجرينا علاجات مسبقة مستعملين مثبطات خاصة. نتائج هذه التجربة أكدت تورط ال PLA2 ، sérotonine و histamine في هذه الظاهرة. هذا السم يمكن أن يكون له أثرا على نشاط نظام rénine-angiotensine-aldostérone .

الكلمات المفتاحية : الانتفاخ، التسمم العضلي، *Cerastes cerastes*