

N° d'ordre : 07/2001 - M / S. N
Date de soutenance : 12 Novembre 2001

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

جامعة العلوم والتكنولوجيا هواري بومدين
Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene (USTHB)

كلية علوم الطبيعة
Faculté des Sciences Biologiques (FSB)

THESE

En vue de l'obtention du diplôme de Magister
en Biochimie – Immunologie

Thème

**Caractérisation biologique et biochimique des activités
hémorragique et myonécrotique du venin de *Vipera lebetina***

Soutenue le : 12/11/2001

Présentée par : M^{lle} HAMZA Loubna

Devant le jury composé de :

- M ^{me} KHAMMAR Farida	Professeur	(USTHB)	Président
- M ^{me} LARABA-DJEBARI Fatima	Maitre de Conférence	(USTHB)	Rapporteur
- M ^r AYAD Ghazi	Professeur	(USTHB)	Examineur
- M ^{me} DJERDJOURI Bahia	Maitre de Conférence	(USTHB)	Examineur
- M ^{me} TOUIL-BOUKOFFA Chafia	Maitre de Conférence	(USTHB)	Examineur
- M ^r BOUKHROUFA Fayçal	Chargé de Cours	(USTHB)	Examineur

DEDICACE

Au nom de Dieu le très miséricordieux, le tout miséricordieux à qui je dois beaucoup, à qui je dois tout.

A Maman, avec tout mon amour, ma gratitude et mon éternel reconnaissance.

A Najoua, mon amie, ma confidente trop tôt disparue.

A tous ceux que j'aime.

Loubna

Remerciements

Qu'il nous soit permis de réunir ici dans une même pensée reconnaissante tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce mémoire. Nous tenons à remercier particulièrement :

- Madame le Docteur Laraba-Djebari Fatima., Maître de Conférence à la Faculté des Sciences Biologiques, qui nous a fait l'immense honneur de nous proposer ce sujet, qui a guidé patiemment nos premiers pas dans le monde fascinant des toxines de venins et qui nous a fait profiter de sa riche expérience. Nous la remercions pour le temps et l'énergie qu'elle nous a consacrée lors de la réalisation de cette étude, malgré ses nombreuses responsabilités. Sa rigueur scientifique et ses suggestions nous ont beaucoup apporté. Qu'elle trouve ici l'expression de notre profond respect et de notre reconnaissance.
- Madame le Professeur Khammar Farida., Professeur à la Faculté des Sciences Biologiques, pour l'honneur qu'elle nous fait en acceptant de présider ce jury.
- Monsieur le Professeur Ayad Ghazi., Professeur à la Faculté des Sciences Biologiques, qui nous a beaucoup appris durant l'année théorique. Nous le remercions pour l'honneur qu'il nous fait en acceptant d'examiner ce travail.
- Madame Le Docteur Djerdjouri Bahia., Maître de Conférence à la Faculté des Sciences Biologiques, qui nous a fait bénéficier de ses connaissances sur la signalisation cellulaire. Nous la remercions pour l'honneur qu'elle nous fait en acceptant d'examiner ce travail.
- Madame le Docteur Touil-Boukoffa., Maître de Conférence à la Faculté des Sciences Biologiques, qui nous a suivis durant tout notre *cursus*. Ses nombreux encouragements nous ont beaucoup aidés. Nous la remercions pour l'honneur qu'elle nous fait en acceptant d'examiner ce travail.
- Monsieur le Docteur Boukhroufa Fayçal, Chargé de Cours à la Faculté des Sciences Biologiques, pour nous avoir initiés aux techniques histologiques. Nous lui sommes reconnaissants de nous avoir fait profiter de ses compétences dans ce domaine. Nous le remercions pour l'honneur qu'il nous fait en acceptant d'examiner ce travail.
- Monsieur le Professeur Bakour Rabah., Professeur à la Faculté des Sciences Biologiques. Nous avons eu l'honneur et le privilège de travailler à ses côtés, nous le remercions pour nous avoir permis de réaliser cette étape de notre *cursus* universitaire et pour la patience et la compréhension qu'il a témoignée à notre égard durant toutes ces années.
- Madame le Professeur Seridji Rabia., Doyen de la Faculté des Sciences Biologiques. Nous tenons à lui exprimer toute notre reconnaissance pour son aide, sa compréhension et ses encouragements.
- 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.

- Madame le Professeur Gernigon Thérèse., Professeur à la Faculté des Sciences Biologiques, pour sa disponibilité et ses conseils.
- Madame Hammoudi-Triki –Yamani Djalila et Madame Belkhodja Razika pour nous avoir soutenus et encouragé.
- Mademoiselle Messai Yamina, Madame Benhassine Traki, Madame Moulahoum Anissa, Madame Gacem Fatiha, Madame Métiaz Farida, Monsieur Cherbal Farid et Monsieur Abderhmani Ahmed pour leurs encouragements et leur amitié.
- Madame Khédis Leila, Madame Boukhroufa Mouna, Mademoiselle Boudraa Faiza, et Mademoiselle Benzitouni Amel pour leur soutien technique et leur amitié.
- Toute l'équipe du Laboratoire de Biochimie-Immunologie de la Faculté des Sciences Biologiques (USTHB), du Laboratoire de Recherche et de développement sur les Venins et du Service des Sérums Thérapeutiques (Institut Pasteur d'Algérie).
- Mademoiselle Mekkouï Ilham et Mademoiselle Bensalem Sonia qui nous ont aidés lors de notre initiation à la recherche bibliographique sur internet.
- Toute l'équipe de la Bibliothèque de la Faculté des Sciences Biologiques (USTHB) et de l'Institut Pasteur d'Algérie, plus particulièrement Mademoiselle Bensalem Chiraz.
- Toutes les filles de la première promotion de Magister Biochimie-Immunologie et plus particulièrement Madame Merrah Sassia avec laquelle nous avons tant partagé.
- Toutes nos collègues de la Faculté des Sciences Biologiques.

Résumé

Les envenimations dues aux morsures de serpents, constituent un problème de santé publique important dans le monde. Le nombre annuel de morsures est estimé à 5 millions de cas qui entraîneraient près de 200 000 décès.

En Algérie, les envenimations par morsures de serpents sont principalement due à deux espèces de *Viperidae* (*Vipera lebetina* et *Cerastes cerastes*). Le nombre d'envenimations par ces serpents est cependant mal connu, cela tient essentiellement à la difficulté de recueil des informations épidémiologiques.

Les venins de serpents sont des mélanges complexes de protéines, parmi lesquelles se trouvent de nombreuses enzymes. Les composants des venins provoquent de graves perturbations des systèmes biologiques de l'organisme. Ces perturbations sont à l'origine des nombreuses manifestations cliniques observées lors d'une envenimation (douleur, ecchymoses, œdème, hémorragie, nécrose des tissus, troubles neurologiques, rénaux et pulmonaires).

L'hémorragie, la myonécrose et l'œdème sont les symptômes les plus caractéristiques d'une envenimation vipérine. Ces symptômes représentent un sérieux problème pour les cliniciens, en effet, ces effets physiopathologiques ne sont presque pas neutralisés par les différentes préparations d'immun-sérums thérapeutiques.

La pathogénèse de ces symptômes a été souvent attribuée à l'action de protéases, de phospholipase et de molécules appelées hémorragines et myotoxines présentes dans les venins de serpents.

L'étude de l'activité hémorragique, myonécrotique et oedématisante effectuée sur le venin de *Vipera lebetina* montre que ce dernier est doué d'une importante activité hémorragique avec un effet dose-réponse. La dose minimale hémorragique (DMH) est estimée à 0,2 µg. Cette activité est partiellement neutralisée par un immun-sérum anti-vipérin.

Le venin de *Vipera lebetina* est également doué d'une activité oedématisante dose-dépendante, avec une dose minimale oedématisante évaluée à 8 µg.

L'étude histologique des effets physiopathologiques du venin de *Vipera lebetina*, après une envenimation expérimentale de la souris, a révélé que l'hémorragie se produit dès les premières minutes qui suivent l'injection du venin.

Cette étude a révélé également la présence dans ce venin d'une activité myonécrotique. En effet c'est à partir de 15 minutes après l'envenimation de la souris qu'un effet myonécrotique apparaît. Cet effet qui évolue vers une myolyse du tissu musculaire au bout de 24 heures, semble être associé à la présence d'une activité phospholipasique dans le venin de *Vipera lebetina*.

La purification des molécules responsables de l'activité hémorragique du venin de *Vipera lebetina*, par différentes techniques chromatographiques, a permis de montrer que cette activité semble être liée à la présence d'au moins trois protéines partiellement purifiées et ayant des masses moléculaires respectivement de 39 810, 67 000 et 100 000 Da. Ces molécules ont été caractérisées comme étant des métallo-protéinases. En effet, l'activité hémorragique et protéolytique de ces molécules a été totalement inhibée par l'EDTA (10 mM).

Abstract

Hemorrhage, myonecrosis and edema are the most characteristic symptoms associated with viperid snake bite. These effects still represent a serious clinical problem, since their neutralization by antivenom is difficult to achieve.

The pathogenesis of these symptoms has been ascribed to the effects of proteases, phospholipase, hemorrhagic and myonecrotic factors present in the venom.

In the present study, we have evaluated the hemorrhagic, myonecrotic and edematic activities of *Vipera lebetina* venom, and we have tried to purify and characterize the hemorrhagic factor(s) of this venom.

Our results indicated that *Vipera lebetina* venom had strong hemorrhagic activity, with a minimum hemorrhagic dose of 0,2 µg. This activity was partially neutralized by antivenom. *Vipera lebetina* venom also induced a dose-dependant edema with a minimum edematic dose evaluated at 8 µg.

Histological observations of the muscle tissue after intramuscular injection into mice of *Vipera lebetina* venom showed that severe hemorrhage appeared within the first minutes after injection. Muscle necrosis started 15 minutes after envenomation, followed by muscular fiber myolysis after 24 hours. It seems that the myonecrotic effect of *Vipera lebetina* venom was associated with phospholipase activity.

Three hemorrhagic components were partially isolated from the venom of *Vipera lebetina* and have molecular weights about 39,810, 67,000 et 100,000 Da respectively. Both hemorrhagic and proteolytic activities were inhibited when these components were treated by EDTA (10 mM), suggesting that the hemorrhagins of *Vipera lebetina* venom were metalloproteinases.

INTRODUCTION :

Les venins de serpents sont des mélanges complexes de protéines pharmacologiquement actives (Berger et Bhatti., 1989 ; Kini et Evans., 1990 ; Markland., 1997). Chacune de ces protéines peut intervenir seule ou en synergie avec d'autres composants du venin pour provoquer de graves perturbations des systèmes biologiques de l'organisme. Ces perturbations sont à l'origine de l'œdème, des troubles hématologiques, neurologiques, rénaux, pulmonaires et de la nécrose tissulaire caractéristiques d'une envenimation ophidienne (Nelson., 1989 ; Smith et Figge., 1991 ; Warrel., 1993 ; Stocker., 1999).

L'hémorragie, la myonécrose et l'œdème sont les principaux symptômes associés à une envenimation vipérine (Mebs., 1986 ; Jia et coll., 1997).

Ces symptômes représentent un sérieux problème clinique. Très souvent, ils ne sont presque pas neutralisés par les différentes préparations d'immun-sérums (Mandelbaum et Assakura., 1988 ; Léon et coll., 2000).

Après une envenimation par morsure de serpents, l'hémorragie débute au niveau du site de morsure et continue à s'étendre autour de la région lésée et dans les organes distants tels que le cœur, le foie, le poumon, les intestins et le cerveau (Rucavado et coll., 1995 ; Gold et Wingert., 1994 ; Hati et coll., 1999).

L'activité hémorragique des venins de serpents est principalement due à l'action d'un ensemble de molécules appelées " hémorragines ", dont la plupart ont été caractérisées comme étant des zinc-métallo-protéinases de 22 à 100 kDa (Hutton et Warrel., 1993 ; Bjarnason et Fox., 1994 ; Matsui et coll., 2000). L'activité hémorragique de ces molécules semble principalement être liée à leur capacité à dégrader les composants protéiques de la lame basale qui entoure les capillaires. Cette dégradation a pour conséquence une fragilisation de la paroi des capillaires sanguins et donc une extravasation massive de sang (Bjarnason et Fox., 1994 ; Marsh., 1994).

La myonécrose induite par les venins est également considérée comme une conséquence grave de l'envenimation vipérine (Gowda et Middlebrook., 1993). Lorsque la myonécrose apparaît, les tissus sont tellement altérés que la gangrène ne tarde pas à s'installer et à favoriser l'apparition des infections. Ce type de complication peut être à l'origine d'amputation et d'invalidités définitives (Kerrigan., 1991 ; Gowda et Middlebrook., 1993).

Les molécules responsables de l'effet myonécrotique des venins de serpents sont les myotoxines (Cintra et coll., 1993 ; Gutiérrez et Lomonte., 1995 ; Escarso et coll., 2000). Ces myotoxines sont de deux types, il peut s'agir soit des peptides myotoxiques dépourvus d'activité enzymatique soit des phospholipases de type A₂ myotoxiques (Gutiérrez et Lomonte., 1995).

Les myotoxines se lient à la membrane plasmique des cellules musculaires et altèrent sa perméabilité et son intégrité (Arroyo et coll., 1987 ; Dixon et Harris., 1996 ; Lomonte et coll., 1999a ; Falconi et coll., 2000).

L'altération du tissu musculaire peut être également le résultat des conditions ischémiques induites par les hémorragines présentes dans les venins de serpents (Escarso et coll., 2000 ; Gutiérrez et Rucavado., 2000).

L'œdème peut être associé à une activité hémorragique et/ou myonécrotique. Il est le résultat d'une augmentation de la perméabilité capillaire.

L'œdème a des étiologies multiples, en effet plusieurs composants différents des venins de serpents ont le pouvoir d'augmenter la perméabilité capillaire (hémorragines, myotoxines, phospholipase A₂ et kininogénases) (Lioret et Moreno., 1993 ; Barros et coll., 1994 ; Chaves et coll., 1998).

La sévérité des perturbations physiopathologiques observées lors d'une envenimation vipérine reflète souvent l'action synergique des molécules hémorragiques, myotoxiques et oedématisantes (Borkow et coll., 1994).

Vipera lebetina est une vipère, très largement répandue en Algérie. Elle est considérée comme étant l'un des serpents les plus redoutables. Sa morsure est toujours très grave et souvent mortelle.

La caractérisation de l'activité hémorragique, myonécrotique et oedématisante dans le venin de cette vipère a fait l'objet de cette étude. A cet effet, nous avons entrepris par des tests macroscopiques, histologiques et biochimiques de :

- Rechercher et d'évaluer l'activité hémorragique, myonécrotique et oedématisante du venin de *Vipera lebetina*.
- De tester la capacité d'un immun-sérum bivalent à neutraliser l'effet hémorragique.
- De purifier et de caractériser le ou les facteurs hémorragiques présents dans le venin de *Vipera lebetina*.

I. Généralités

I.1 Les serpents :

Les serpents venimeux ont de tout temps fasciné les peuples et les hommes de sciences. Ces animaux ont le pouvoir de provoquer la mort avec une simple piqure, suscitant non seulement l'appréhension et la crainte, mais également le respect et la fascination.

Les serpents sont des animaux poïkilothermes, réparties sur la presque totalité du globe terrestre. Ils évoluent aussi bien sur le sol, dans les arbres, dans l'eau, qu'enfouis dans le sable (Kunkel et coll., 1984).

I.1.1 Classification et répartition géographique :

Les serpents ou ophidiens appartiennent à l'embranchement des vertébrés, classe des reptiles, sous classe des diapsides, ordre des squamates (Platel., 1991).

Le nombre d'espèces de serpents est estimé à 2500, parmi lesquelles 700 espèces sont venimeuses et représentent ainsi un réel danger pour l'homme (Cogger et Zweifel., 1993 ; Thireau., 1995).

L'appareil venimeux des serpents est constitué par des glandes sécrétrices de venin et des crochets qui permettent son injection.

En fonction de leur appareil venimeux, ces serpents ont été divisés en trois groupes : les opisthognathes, les proterognathes et les solénognathes (Bellairs., 1971 ; Kochva., 1987 ; Coppola et Hogan., 1994).

- Les opisthognathes :

Les opisthognathes se rencontrent chez les *Colubridae*. Ces serpents ont des crochets situés très en arrière sur le maxillaire, ils sont de ce fait peu dangereux pour l'homme (Grassé., 1976 ; Kunkel et coll., 1984 ; Meier et Stocker., 1991).

- Les proterognathes :

Les proterognathes comprennent les *Elapidae* terrestres et les *Hydrophiidae* marins. Leurs crochets venimeux sont situés en avant du maxillaire et sont quasiment immobiles (Grassé., 1976 ; Kunkel et coll., 1984 ; Meier et Stocker., 1991).

- Les solénognathes :

Les solénognathes sont repartis en deux familles : les *Viperinae* et les *Crotalinae*. Leurs crochets venimeux sont mobiles sur le maxillaire. Au repos du serpent, ces crochets sont repliés vers l'arrière, alors que lors de la morsure, ils peuvent se retrouver jusqu'à la verticale (Grassé., 1976 ; Kunkel et coll., 1984 ; Meier et Stocker., 1991).

Les serpents les plus redoutables appartiennent aux proterognathes et aux solénognathes (tableau I).

Tableau I : Classification des serpents venimeux.

La taille des serpents venimeux est très variable. A l'âge adulte de nombreuses espèces atteignent la taille de 40 à 50 cm, alors que d'autres atteignent des tailles de l'ordre de 5 mètres (cobra royal). Les vipères et les crotales ont une stature assez trapue, leur taille n'excède pas les 3 mètres. Les *Elapidae* et les *Colubridae* ont des corps plus fins et des tailles moyennes légèrement plus grandes que celles des *Viperidae* (Ernest et Zug., 1999).

A l'exception des régions polaires et de quelques îles où ne vit aucun serpent, les cinq continents possèdent une faune ophidienne venimeuse variée (tableau I).

En Afrique, en Asie et en Amérique, plus de 150 espèces sont réparties entre les *Viperidae*, les *Elapidae* et les *Hydrophiidae*. Les *Viperidae* prédominent en Europe, quant aux serpents venimeux d'Australie, ils appartiennent exclusivement à la famille des *Elapidae* (Boquet., 1970 ; Chippaux., 1998 ; Ernest et Zug., 1999).

Le Maghreb est caractérisé par la présence de quatre espèces venimeuses : *Vipera lebetina*, *Cerastes cerastes*, *Cerastes vipera* et *Naja haje haje*. En Algérie, les serpents les plus répandues sont les vipères *Vipera lebetina* et *Cerastes cerastes*.

I.1.2 Les *Viperidae* :

Les *Viperidae* (vipères et crotales) ont une tête large et triangulaire, un corps trapu terminé par une queue courte. Ils sont dotés d'un appareil venimeux très efficace, permettant une injection très profonde du venin (Bellairs., 1971 ; Grassé., 1976 ; Ernest et Zug., 1999).

Ces serpents hautement venimeux vivent dans les endroits pierreux ou les broussailles et se nourrissent surtout de rongeurs et de petits oiseaux qu'ils tuent à l'aide de leur venin. Ils sont plutôt nocturnes (Bellairs., 1971 ; Grassé., 1976 ; Ernest et Zug., 1999).

Les morsures de *Viperidae* sont responsables d'environ 90 % des envenimations par morsures de serpents observées en Afrique (Chippaux et coll., 1999). A chaque morsure, la vipère injecte à peine 10 % du contenu des glandes à venin. Elle reste donc dangereuse même après avoir déjà mordu (Ernest et Zug., 1999).

La morsure est douloureuse et l'œdème apparaît presque immédiatement. La corrélation existant entre l'œdème et les principaux signes généraux de l'envenimation a permis de classer les morsures des *Viperidae* en quatre grades de gravité croissante (tableau II) ; (Audebert., 1993 ; Choumet et coll., 1996).

L'apparition de saignements diffus au niveau de la morsure, de la sphère ORL, rénale et digestive traduisent une perturbation de la coagulation sanguine et/ou du système vasculaire. Une nécrose locale apparaît secondairement. Elle peut être localisée et conduit parfois à une amputation limitée ou au contraire extensive (Dreisbach., 1983 ; Thireau., 1995).

Tableau II : Gradation clinique de l'envenimation par les venins des *Viperidae* (Dreisbach., 1983 ; Audebert et coll., 1994 ; Choumet et coll., 1996).

Grade	Nom	Signes
0	Pas d'envenimation	Traces de crochets, pas d'œdème, aucune manifestation locale ou systémique durant les 12 premières heures suivant la morsure.
1	Envenimation minimale	Oedème autour de la morsure, pas de symptômes systémiques après 12 heures d'observation.
2	Envenimation modérée	Oedème régional impliquant une grande partie du membre mordue, apparition d'ecchymoses qui sont limitées à la zone de l'œdème, douleur forte et étendue, hypotension modérée sans état de choc, vertiges, vomissements et diarrhées.
3	Envenimation sévère	Oedème extensif au-delà du membre, les ecchymoses peuvent être généralisées, apparition des cloques et de la nécrose au niveau des tissus cutanés, hypotension prolongée avec douleur aiguë. Les manifestations systémiques commencent souvent dans les 15 premières minutes suivant la morsure (asthénie, nausées, vomissements, vertiges, pâleur, transpiration, peau moite et froide, pouls rapide, saignement, engourdissement ou fourmillement des lèvres ou du visage, crampes musculaires douloureuses, convulsions et coma). Le décès peut survenir.

I.1.3 *Vipera lebetina* :

Vipera lebetina est considéré comme étant l'un des serpents venimeux les plus dangereux. La gravité de ses morsures et la rapidité avec laquelle les symptômes très alarmants se développent en évoluant souvent vers la mort lui attribue le nom de " Vipère minute ".

Cette vipère à une forme courte et massive. Sa taille atteint en moyenne 96 cm pour les mâles et 1 m 35 pour les femelles.

Vipera lebetina à une activité crépusculaire et nocturne, c'est pourquoi la plupart des morsures de l'homme surviennent pendant la nuit. Sa répartition géographique s'étend de la côte atlantique du Maroc, jusqu'en Asie centrale (tableau III).

En Algérie, elle est très abondante dans la région oranaise (vipère d'arzew), les hauts plateaux, les régions accidentées du tell et les régions pré-sahariennes.

Un œdème se forme aussitôt après une morsure par *Vipera lebetina*. La souffrance à ce stade est encore relativement faible. Au cours de la première heure, l'œdème augmente et remonte le long des membres, avec apparition de vertiges. Les douleurs deviennent de plus en plus vives, elles ne sont plus localisées au niveau de la morsure, mais gagnent les membres, les muscles et les articulations. La conscience du blessé est diminuée, la tension artérielle s'abaisse. Les pulsations cardiaques deviennent de moins en moins perceptibles. L'œdème s'étend et gagne le tronc et l'abdomen. Des syncopes surviennent suivi d'un coma et du décès de la victime (Balozet., 1957).

Il s'écoule entre la morsure par *Vipera lebetina* et le décès de la victime de 3 ou 4 heures, jusqu'à 48 heures. Au delà, les blessés ont de grandes chances de survivre, leur guérison peut pourtant être lente (Balozet., 1957).

I.2 Les venins de serpents :

Les venins de serpents se présentent sous un aspect visqueux, incolore ou jaunâtre. Leur teneur en eau est de 70 à 82 % et leur pH varie entre 5,5 à 7.

La quantité de venin extraite des glandes varie suivant la taille et l'état physiologique du serpent. Elle se situe entre 15 et 800 mg par serpent.

La quantité de venin sec obtenue par *Vipera lebetina* est de 12 à 150 mg (Boquet., 1970 ; Grassé., 1976 ; Ernest et Zug., 1999).

I.2.1 Les principaux composés des venins de serpents :

Les composants des venins sont doués de propriétés biologiques diverses. Ces composants sont utilisés par le serpent pour la capture, pour l'immobilisation et pour la digestion des proies. Ils peuvent également être utilisés dans les réactions de défense et d'attaque (Harris., 1989 ; Laraba-Djebari et coll., 1992 ; Fry., 1999).

TABLEAU III : Les différentes sous espèces de *Vipera lebetina* (Balozet., 1957 ; Bücherl et coll., 1968 ; Gruber., 1992).

Sous - espèce	Répartition géographique
<i>Vipera lebetina deserti</i>	Algérie, Tunisie, Libye.
<i>Vipera lebetina euphratica</i>	Les vallées d'Euphrate, Irak.
<i>Vipera lebetina lebetina</i>	Archipel grec et Chypre.
<i>Vipera lebetina mauritanica</i>	Algérie, Tunisie, Maroc.
<i>Vipera lebetina obtusa</i>	Arménie, Liban, Iran, Irak, Syrie, Montagnes Caucase, Ouest du Pakistan.
<i>Vipera lebetina raddei</i>	Régions sud Caucasienne.
<i>Vipera lebetina schweizeri</i>	Grèce.
<i>Vipera lebetina turanica</i>	Turquie, Ouzbékistan, Afghanistan, Nord-Est de l'Iran, Kashmir, Nord-Ouest du Pakistan.
<i>Vipera lebetina xanthina</i>	Asie Mineur et Asie Central.

I.2.1.1 Les Toxines :

Les toxines des venins de serpents peuvent agir seules ou en association avec d'autres constituants du venin pour perturber le fonctionnement du système nerveux, des muscles et du système cardio-vasculaire (Tan et Armugan., 1990 ; Thireau., 1995).

- Les cardiotoxines :

Les cardiotoxines sont surtout présentes dans les venins des *Elapidae*. Elles sont composées de 60 résidus d'acides aminés réticulés par quatre ponts disulfures. Leur action a pour principale cible le muscle cardiaque, dont l'altération et la nécrose entraîne un arrêt cardiaque. Ces toxines agissent en affectant l'intégrité et la perméabilité des membranes cellulaires (Harvey., 1985 ; Thireau., 1995 ; Laraba-Djebari., 1996).

- Les neurotoxines :

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

Ces toxines sont divisées en deux types : les neurotoxines présynaptiques et postsynaptiques.

- Les neurotoxines présynaptiques :

Les neurotoxines présynaptiques se retrouvent dans les venins des *Elapidae*, des *Hydrophiidae* et des *Viperidae*.

Ces toxines sont douées d'une activité phospholipasique de type A₂. Elles agissent sur les membranes présynaptiques qui perdent leur capacité à libérer dans la fente synaptique l'acetylcholine. Elles provoquent ainsi un arrêt de la transmission neuromusculaire, qui est suivie d'une paralysie des muscles et du diaphragme. La mort survient par arrêt respiratoire (Hamilton et coll., 1980 ; Harris., 1989 ; Dixon et Harris., 1999).

- Les neurotoxines postsynaptiques :

Ces toxines sont présentes dans les venins des *Elapidae* et des *Hydrophiidae*.

Les neurotoxines postsynaptiques sont dépourvues d'activité enzymatique. Elles se fixent de manière stable au niveau du récepteur nicotinique de l'acetylcholine localisé sur la membrane postsynaptique de la jonction neuromusculaire. Il s'ensuit alors une paralysie des muscles squelettiques et du diaphragme. La mort survient par arrêt respiratoire (Gatineau et coll., 1988 ; Harris., 1989 ; Lamthanh et coll., 1993 ; Laraba-Djebari., 1996).

I.2.1.2 Les enzymes :

Les principales cibles des enzymes isolées à partir des venins sont les membranes cellulaires, la paroi vasculaire et les molécules impliquées dans la cascade de coagulation du sang (Zeller., 1977 ; Markland., 1997 ; Stocker., 1998).

- Les protéinases :

Les enzymes protéolytiques des venins sont particulièrement impliquées dans la pathogenèse de la nécrose des tissus et de l'hémorragie (Ramirez et coll., 1990 ; Thireau., 1995). Certaines protéinases agissent de manière non spécifique, alors que d'autres hydrolysent spécifiquement certaines protéines. Certaines de ces protéines peuvent avoir un effet activateur ou inhibiteur puissant sur la coagulation du sang et la fibrinolyse (Ouyang et coll., 1990 ; Markland., 1991 ; Pirkle et Stocker., 1991 ; Zhang et coll., 1995).

Les protéinases des venin de serpents sont généralement classées en fonction de leur structure, en sérine-protéinases et en métallo-protéinases (Markland., 1997 ; Matsui et coll., 2000).

❖ Les sérine-protéinases :

Les sérine-protéinases ont certaines propriétés structurales et biochimiques en commun, particulièrement la conservation chez toutes ces protéines de la triade catalytique " Ser (195), His (57), Asp (102) ". Cette triade représente le principal critère pour la classification des sérine-protéinases (Braud et coll., 2000b).

Les sérine-protéinases des venins de serpents sont approximativement composées de 235 résidus d'acides aminés réticulées par 6 ponts disulfures. Certaines possèdent à la fois une activité fibrinogénolytique et fibrinolytique, alors que d'autres ne possèdent que l'activité fibrinogénolytique. Ces dernières sont connues sous le nom de protéinases de type thrombine (Ouyang et coll., 1992 ; Morgenstern et coll., 1994 ; Laraba-Djebari et coll., 1995 ; Pirkle., 1998 ; Braud et coll., 2000b) (figure 1).

D'autres sérine-protéinases des venins ont en commun leur capacité à libérer la bradykinine à partir du kininogène plasmatique. Ces enzymes sont regroupées sous le nom d'enzymes de type kallikrène (Braud et coll., 2000b).

Certaines protéinases des venins de *Vipera russelii*, de *Crotalus horridus*, de *Bothrops jararaca* et de *Trimeresurus stejnegeri* capables d'activer le facteur V ou le plasminogène ou les plaquettes ont été également caractérisées comme étant des sérine-protéinases (Tokunaga et coll., 1988 ; Hutton et Warrel., 1993 ; Serrano et coll., 1995 ; Meier., 1998 ; Braud et coll., 2000a) (figure 1).

❖ Les métallo-protéinases :

En plus des sérine-protéinases, les venins de serpents contiennent une variété de métallo-protéinases. Ces dernières peuvent être à l'origine d'une hémorragie sévère grâce à leur capacité à inhiber l'agrégation des plaquettes et/ou à dégrader les composants de la lame basale des capillaires (Marsh., 1994 ; Perez et Sanchez., 1999 ; Gutiérrez et Rucavado., 2000).

Ces enzymes sont également impliquées dans la pathogenèse de la myonécrose, des dommages cutanés et de l'œdème (Mackessy., 1996 ; Rucavado et coll., 1998) (figure 1).

Figure 1 : Schéma récapitulatif des principales activités protéasiques des venins de serpents.

Les métallo-protéinases des venins peuvent être douées d'une activité fibrino(géno)lytique, mais la plupart de ces enzymes sont fibrinolytiques (Markland., 1997, 1998).

- Les hyaluronidases :

Les hyaluronidases hydrolysent les liaisons glycosidiques de certains mucopolysaccharides tels que l'acide hyaluronique. Ces enzymes augmentent la perméabilité des tissus, permettant ainsi au venin de diffuser rapidement dans l'organisme (Belairs., 1976 ; Laraba-Djebari., 1996 ; Ernest et Zug., 1999).

- Les L - amino - acide oxydases :

Les venins de serpents possèdent une activité L-amino-acide oxydase qui permet de détacher un groupement amine à partir des acides aminés et les transforment en acides α -cétoniques. Ces enzymes contiennent un groupement prosthétique, le FAD responsable de la coloration jaune des venins.

Les enzymes douées d'une activité L-amino-acide-oxydase sont généralement associées à une fonction digestive (Boquet., 1970 ; Laraba-Djebari., 1996 ; Stocker., 1998).

- Les phospholipases de type A₂ (PLA₂) :

Les Phospholipases A₂ (E.C. 3.1.1.4) hydrolysent spécifiquement la liaison ester en position 2 des glycérophospholipides, libérant ainsi des acides gras et des lysophospholipides (Yuan et coll., 1995 ; Gelb et coll., 2000).

Les PLA₂ sont des enzymes ubiquitaires, présentes aussi bien dans les venins de serpents, que dans certains venins de scorpions, d'abeilles et de lézards, ainsi que dans les sécrétions pancréatiques des mammifères (Béreziat., 1992 ; Dennis., 1994).

Les PLA₂ des venins ont un poids moléculaire de 13 à 18 kDa, et nécessitent du calcium pour leurs activités. Ces enzymes ont été divisées en quatre groupes, en fonction de leur séquence primaire et de la position de leurs ponts disulfures (tableau IV) ; (Davidson et Dennis., 1990 ; Tischfield., 1997 ; Lomonte et coll., 1999a ; Faure., 2000 ; Valentin et Lambeau., 2000).

Le groupe I est constitué par les PLA₂ des venins des *Elapidae* et des *Hydrophiidae*, alors que le groupe II est constitué par les PLA₂ des venins des *Viperidae* (*viperinae* et *crotalinae*).

La structure des PLA₂ du groupe I et II est très similaire. Les molécules de PLA₂ du groupe I sont constituées de 120 résidus d'acides aminés stabilisés par 7 ponts disulfures, tandis que les PLA₂ appartenant au groupe II sont constituées de 125 résidus d'acides aminés et possèdent à l'extrémité C-terminale une extension de 5 à 7 résidus d'acides aminés.

Les PLA₂ du groupe II sont réticulées par 7 ponts disulfures dont 6 sont conservés chez les PLA₂ du groupe I (Renetseder et coll., 1985 ; Nicolas et coll., 1997 ; Tischfield., 1997 ; Valentin et Lambeau., 2000).

Le groupe III des PLA₂ est constitué par les PLA₂ des venins d'abeilles, de lézards et de scorpions. Ces molécules sont constituées par 135 résidus d'acides aminés réticulés par 5 ponts disulfures. Le degré d'homologie entre les PLA₂ du groupe III et les PLA₂ du groupe I et II est très faible, à l'exception du site de fixation du calcium et du site actif qui sont hautement conservés (Scot et coll., 1990 ; Zamudio et coll., 1997 ; Krizaj et Gubensek., 2000).

Le groupe IV est constitué uniquement de la PLA₂ isolée à partir du venin de *Conus magus*. Cette enzyme nommée " conodipine M " présente un poids moléculaire de 13,6 kDa et comprend deux chaînes polypeptidiques de 77 et 42 résidus d'acides aminés respectivement. Ces deux chaînes polypeptidiques sont reliées entre elles par 6 ponts disulfures (tableau IV).

La conodipine M ne présente aucune homologie de séquence avec les autres PLA₂ (Mc Intosh et coll., 1995 ; Valentin et Lambeau., 2000).

Les PLA₂ des venins de serpents possèdent en commun une séquence protéique constituée d'environ 120 résidus d'acides aminés. Cette séquence protéique est généralement douée d'une activité phospholipasique de type A₂.

Certaines PLA₂ des venins ne sont constituées que de cette séquence de 120 résidus d'acides aminés comme la notexine du venin de *Notechis scutatus scutatus* et l'ammodytoxine du venin de *Vipera ammodytes*.

D'autres PLA₂, au contraire, s'associent à une ou plusieurs protéines pour induire leurs effets pathologiques. C'est le cas de la β -bungarotoxine isolée à partir du venin de *Bungarus multicinctus*, dont la séquence de base de 120 résidus d'acides aminés est reliée par un pont disulfure à une protéine de 59 résidus d'acides aminés et de la taïpoxine du venin d'*Oxyuranus scutellatus*. Cette dernière est formée par la séquence protéique de 120 résidus d'acides aminés et de deux sous-unités ressemblant chacune à une PLA₂ (Kini et Iwanaga., 1986a ; Thireau., 1995).

Le rôle de ces protéines complémentaires n'est pas établie. Leur association à la séquence de base de 120 résidus d'acides aminés pourrait permettre d'augmenter la stabilité de la PLA₂ et de l'orienter vers des cibles spécifiques (Simon et coll., 1980 ; Kini et Iwanaga., 1986a ; Kouyoumdjian et coll., 1986 ; Thireau., 1995 ; Valentin et Lambeau., 2000).

Les PLA₂ des venins de serpents induisent divers effets biologiques :

- Certaines PLA₂ agissent sur les terminaisons nerveuses qui perdent alors leur capacité à libérer leur neuromédiateur, l'acétylcholine (PLA₂ présynaptiques) (Tsai et coll., 1987 ; Lambeau et coll., 1994 ; Krizaj et Gubensek., 2000).

- D'autres se caractérisent par une activité myotoxique, c'est le cas de la notexine et de la caudoxine isolée à partir du venin de *Bitis gabonica* (Kini et Iwanaga., 1986b ; Escarso et coll., 2000).

- Certaines PLA₂ peuvent avoir un effet cytolytique sur les hématies, un effet oedématisant, cardiotoxique et anticoagulant (Prigent-Dachary et coll., 1980 ; Yang et coll., 1981 ; Arni et Ward., 1996 ; Lambeau et coll., 1996 ; Ward et coll., 1998).

Tableau IV : Classification des PLA₂ des venins de serpents.

I.2.2 Les myotoxines :

La myonécrose consécutive à une morsure de serpent est un phénomène complexe. Elle peut être la conséquence de l'action directe de facteurs spécifiques appelés " myotoxines " ou être le résultat des conditions ischémiques provoquées par les hémorragines des venins de serpents (Lomonte et coll., 1985 ; Boer-Lima et coll., 1999). La nécrose du tissu musculaire a également été attribuée à l'action des cardiotoxines des venins (Mebs., 1986).

Les myotoxines sont particulièrement présentes dans les venins des *Viperidae*. Elles peuvent provoquer de graves lésions du tissu musculaire (Cintra et coll., 1993).

I.2.2.1 Classification des myotoxines :

Les myotoxines sont divisées en deux groupes. Le premier groupe comprend les peptides myotoxiques, alors que le second est formé par les PLA₂ myotoxiques (Mebs et Samejima., 1986 ; Cintra et coll., 1993).

- Les peptides myotoxiques :

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

L'activité des peptides myotoxiques telles que la crotamine du venin de *Crotalus durissus terrificus* et de la myotoxine-a du venin de *Crotalus viridis viridis* semble être liée à la présence à l'extrémité C-terminale de ces molécules de deux séquences peptidiques qui se suivent. La première séquence cationique est riche en acides aminés chargés positivement. La deuxième séquence est riche en acides aminés hydrophobes. Les séquences cationique et hydrophobe sont reliées par trois à quatre ponts disulfures (Kini et Iwanaga., 1986b ; Selistre de Araujo et coll., 1996 ; Lomonte et coll., 1999a ; Angulo et coll., 2001).

Il semblerait donc que ces deux séquences soient indispensables à l'expression de l'activité myotoxique de ces peptides (Kini et Iwanaga., 1986b ; Alape-Giron et coll., 1999).

- Les PLA₂ myotoxiques :

Les PLA₂ myotoxiques sont les principaux facteurs responsables de la myotoxicité des venins de serpents. Ces myotoxines peuvent être douées d'une activité phospholipasique ou en être dépourvues (Kini et Iwanaga., 1986b ; Johnson et Ownby., 1993 ; Fuly et coll., 2000).

Les Phospholipases A₂ myotoxiques possèdent au niveau du site actif des résidus très conservés (His 48, Asp 49, Tyr 52 et Asp 99). Le résidu Asp 49 se lie au calcium, qui est un cofacteur essentiel à l'activité de la PLA₂ (Ward et coll., 1998). C'est le cas de la bothropstoxine II du venin de *Bothrops jararacussu* (Homs-Brandeburgo et coll., 1988), de la myotoxine PRA-1 du venin de *Bothrops pradoi* (Moura et coll., 1991), de la myotoxine I du venin de *Bothrops godmani* (Diaz et coll., 1992) et de la myotoxine LM-PLA₂ isolée à partir du venin de *Lachesis muta* (Fuly et coll., 2000).

Les PLA₂ myotoxiques dépourvues d'activité phospholipasique, après substitution de leur résidu Asp 49, possèdent les mêmes résidus du site actif (His 48, Tyr 52, et Asp 99). Le résidu Asp 49 des ces molécules est substitué soit par :

- Une lysine (His 48, Lys 49, Tyr 52, Asp 99) dans la plupart des cas. C'est le cas des myotoxines I et II isolées à partir du venin de *Bothrops moojeni* (Lomonte et coll., 1990), de la myotoxine II du venin de *Bothrops asper* (Lomonte et coll., 1994b) et de la myotoxine I du venin de *Bothrops schlegelii* (Angulo et coll., 1997).

- Une serine (His 48, Ser 49, Tyr 52, Asp 99), c'est le cas de l'ammodytine L isolée à partir du venin de *Vipera ammodytes* (Krizaj et coll., 1991 ; Incerpi et coll., 1995).

Cette substitution de l'aspartate 49 par une lysine ou une serine empêche la fixation du calcium, qui se traduit par une perte de l'activité phospholipasique. Ce type de PLA₂ conserve cependant leur activité myotoxique (Lomonte et coll., 1990 ; Francis et coll., 1991 ; Ward et coll., 1998 ; Angulo et coll., 2001).

L'apparition des dommages musculaires même en l'absence de l'activité phospholipasique montre d'une part, que le domaine catalytique de la PLA₂ est séparé des domaines responsables de ces autres activités biologiques, notamment de son activité myotoxique, et d'autre part que les lysine 49 ou serine 49 Phospholipase A₂ myotoxiques perturbent le tissu musculaire par un mécanisme indépendant de l'hydrolyse enzymatique des phospholipides membranaires (Condrea et coll., 1981 ; Babu et Gowda., 1991 ; Lomonte et coll., 1994d, 1999a ; Fuly et coll., 2000).

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

- La caudoxine douée à la fois de propriétés myotoxiques et présynaptiques possède les deux séquences cationique et hydrophobe (Kini et Iwanaga., 1986b).

- La taïpoxine fortement présynaptique mais faiblement myotoxique ne contient que quelques résidus chargés positivement dans la séquence cationique, ce qui expliquerait sa faible myotoxicité (Kini et Iwanaga., 1986b).

- La β-bungarotoxine, toxine présynaptique et non myotoxique ne possède pas le site cationique, d'où l'absence de toute activité myotoxique (Kini et Iwanaga., 1986b).

Par ailleurs, la comparaison entre la séquence primaire des peptides myotoxiques et des PLA₂ myotoxiques montre que la région formée par la combinaison de résidus d'acides aminés cationiques et hydrophobes se retrouvent dans les deux types de myotoxines (Kini et Iwanaga., 1986b). La présence de ces séquences semble donc être une caractéristique structurale commune des molécules douées d'une activité myotoxique (Bilwes et coll., 1994 ; Chien et coll., 1994 ; Lomonte et coll., 1999b; Angulo et coll., 2001).

I.2.2.2 Mode d'action des myotoxines :

Le mécanisme moléculaire par lequel les myotoxines provoquent l'altération du tissu musculaire n'est pas encore totalement élucidé. Il semble que ces toxines affectent principalement la membrane plasmique des cellules musculaires. Dans un premier temps, les myotoxines se lient à cette membrane par le biais de leur séquence cationique (Gopalakrishnakone et coll., 1984 ; Arroyo et coll., 1987 ; Bruses et coll., 1993 ; Lomonte et coll., 1994b ; Falconi et coll., 2000) (figures 2a et 2b).

Les molécules qui permettent la liaison des myotoxines sur la membrane plasmique n'ont pas été clairement identifiées. Ces molécules pourraient être des protéines membranaires jouant le rôle de récepteur pour les myotoxines ou des groupements chargés négativement qui se trouveraient au niveau de la membrane des cellules musculaires. Ces groupements semblent être les ions phosphate appartenant aux phospholipides membranaires (Kini et Evans., 1989 ; Gutiérrez et Lomonte., 1995 ; Falconi et coll., 2000).

Dans tous les cas, la fixation des myotoxines sur la membrane plasmique des cellules musculaires fait intervenir des interactions entre les charges positives de la séquence cationique et des groupements chargés négativement situés sur la membrane plasmique (Gutiérrez et Lomonte., 1995 ; Falconi et coll., 2000).

Après cette étape de fixation, les myotoxines s'insèrent dans la bicouche lipidique grâce à la séquence hydrophobe qui vient immédiatement après la séquence cationique. Cette insertion de la séquence hydrophobe déstabilise la membrane et provoque une perturbation de la perméabilité membranaire aux ions et aux macromolécules. Cette perturbation serait à l'origine d'une série d'événements pouvant mener à la nécrose et à la mort cellulaire (Gutiérrez et Lomonte., 1995 ; Ruffini et coll., 1996 ; Boer-Lima et coll., 1999 ; Falconi et coll., 2000).

Gowda et Middlebrook (1993), ont montré que la PLA₂ myotoxique du venin de *Naja nigricollis* altère le transport de la thymidine et des acides aminés à travers la membrane cellulaire. Cette altération a pour conséquence un retard dans la synthèse de l'ADN et des protéines respectivement.

La perturbation de la perméabilité membranaire provoque également un flux important de calcium à travers la membrane. Ce flux serait responsable de l'hypercontraction des myofilaments et de la lyse des fibres musculaires par activation des protéases calcium-dépendante (Diaz et coll., 1991 ; Angulo et coll., 1997 ; Boer-Lima et coll., 1999 ; Harris et coll., 2000).

Un autre mécanisme a été également proposé pour expliquer l'altération du tissu musculaire induit par les PLA₂ myotoxiques. Dans ce mécanisme, ces myotoxines pénétreraient dans les cellules musculaires par un phénomène d'endocytose probablement grâce à des récepteurs membranaires présents à la surface des cellules musculaires. Les PLA₂ myotoxiques seraient ensuite libérées dans le cytosol. Ces toxines seraient ainsi capables d'atteindre et d'altérer la membrane des mitochondries et du réticulum sarcoplasmique des cellules musculaires (Nicolas et coll., 1995 ; Zvaritch et coll., 1996 ; Harris et coll., 2000) (figures 2a et 2b).

Figure 2 a : Mécanisme d'actions des myotoxines.

Figure 2b : Mécanisme d'actions des myotoxines

I.2.3 Les hémorragines :

Les venins de serpents sont souvent à l'origine d'une perturbation de l'agrégation des plaquettes, de la coagulation et d'une hémorragie qui peuvent avoir des conséquences fatales (Stocker et Meier., 1989 ; Huang et coll., 1991 ; Laraba-Djebari et coll., 1992 ; Markland., 1998).

L'hémorragie est essentiellement le résultat de l'action de protéines présentes dans les venins et regroupées sous le nom d' " hémorragines " (Bjarnason et Fox., 1988-1989 ; Hutton et Warrel., 1993 ; Hati et coll., 1999).

L'action de ces hémorragines peut être juste limitée au site de morsure ou être très répandue dans l'organisme. Ces molécules peuvent, en effet, atteindre progressivement l'ensemble du membre mordu et les organes tels que le cœur, le foie, le poumon, les intestins et le cerveau (Kamiguti et coll., 1991 ; Hati et coll., 1999 ; Salvini et coll., 2001).

L'hémorragie induite par ces molécules peut être responsable à elle seule de l'action toxique du venin. Même lorsqu'elle n'est pas assez sévère pour provoquer la mort, l'hémorragie peut mener à des lésions prolongées ou définitives des extrémités mordues, allant parfois à l'amputation (Shimokawa et coll., 1997 ; Hati et coll., 1999).

Les hémorragines agissent sur les cellules endothéliales et la lame basale des capillaires provoquant ainsi une extravasation massive du sang en dehors des vaisseaux sanguins (Baramova et coll., 1989 ; Nikai et coll., 2000 ; Salvini et coll., 2001).

Les hémorragines peuvent également induire d'autres effets tels que la myonécrose, l'inhibition de l'agrégation des plaquettes et la fibrino(géno)lyse. Elles jouent également un rôle dans le développement des chocs cardiovasculaires (Marsh., 1994 ; Markland., 1998).

De nombreuses molécules hémorragiques, isolées à partir des venins de serpents, ont été caractérisées comme étant des zinc-métallo-protéinases de 22 à 100 kDa. Certaines hémorragines peuvent également contenir un ion calcium. Ces molécules sont synthétisées sous la forme de précurseurs inactifs ou zymogènes (Gomis-Ruth et coll., 1993 ; Matsui et coll., 2000).

Les hémorragines sont caractérisées par la présence d'une séquence de base. Cette séquence est constituée d'un peptide signal, d'une pro-séquence et d'un domaine protéinase remarquablement conservé (Paine et coll., 1992 ; Takeya et coll., 1993 ; Markland., 1997,1998 ; Shimokawa et coll., 1996,1998 ; Matsui et coll., 2000 ; Tsai et coll., 2000) (figure 3).

L'association de l'extrémité C-terminale du domaine protéinase avec d'autres sous-unités protéiques a pour conséquence une augmentation de leur pouvoir hémorragique (Hite et coll., 1992,1994 ; Bjarnason et Fox., 1994 ; Hati et coll., 1999).

I.2.3.1 Classification des hémorragines :

En fonction de leurs structures et de leur poids moléculaire, les hémorragines ont été classées en quatre groupes (Bjarnason et Fox., 1994 ; Hati et coll., 1999) (tableau V).

- Hémorragines de classe I :

Les hémorragines de classe I ont un poids moléculaire de 20 à 30 kDa. Elles sont constituées d'un peptide signal, d'une pro-séquence et d'un domaine protéinase.

Selon le pouvoir hémorragique, cette classe a été subdivisée en 2 sous-classes : I-A hautement hémorragique et I-B faiblement hémorragique (Bjarnason et Fox., 1994 ; Jia et coll., 1997 ; Shimokawa et coll., 1997,1998 ; Nikai et coll., 2000).

- Hémorragines de classe II :

Les hémorragines de classe II sont des protéines de 30 à 60 kDa. Ces protéines sont formées du peptide signal, de la pro-séquence et du domaine protéinase auquel s'est associé un domaine de type désintégrine.

Une séquence de 21 acides aminés sépare le domaine protéinase du domaine de type désintégrine, c'est la région " spacer " (Bjarnason et Fox., 1994 ; Jia et coll., 1997 ; Shimokawa et coll., 1997,1998 ; Nikai et coll., 2000).

- Hémorragines de classe III :

Ces hémorragines ont un poids moléculaire de 60 à 90 kDa et sont composées du peptide signal, de la pro-séquence, du domaine protéinase, du domaine de type désintégrine et d'un domaine riche en cystéine.

La région " spacer " des hémorragines de classe III possède un résidu cystéine invariable en position 11 qui est absent de la région " spacer " des protéines de classe II. Ce résidu formerait un pont disulfure avec un résidu cystéine du domaine de type désintégrine ou du domaine riche en cystéine.

Les hémorragines de classe III sont les plus toxiques, leur activité hémorragique est 25 fois plus importante que celle des protéines de classe I (Bjarnason et Fox., 1994 ; Jia et coll., 1997 ; Shimokawa et coll., 1997,1998 ; Nikai et coll., 2000).

- Hémorragines de classe IV :

Ces protéines ont un poids moléculaire supérieur ou égal à 100 kDa. Leur séquence comprend un peptide signal, une pro-séquence, un domaine protéinase, un domaine de type désintégrine, un domaine riche en cystéine et un domaine de type lectine (Bjarnason et Fox., 1994 ; Jia et coll., 1997 ; Shimokawa et coll., 1997,1998 ; Nikai et coll., 2000).

TABLEAU V : Classification des hémorragines (Bjarnason et Fox., 1994 ; Jia et coll., 1997 ; Shimokawa et coll., 1997,1998 ; Hati et coll., 1999 ; Matsui et coll., 2000 ; Nikai et coll., 2000).

CLASSE	STRUCTURES
CLASSE I (20 à 30 kDa)	Peptide signal - Pro-séquence - Domaine protéinase.
CLASSE II (30 à 60 kDa)	Peptide signal - Pro-séquence - Domaine protéinase - Domaine de type désintégrine.
CLASSE III (60 à 90 kDa)	Peptide signal - Pro-séquence - Domaine protéinase - Domaine de type désintégrine - Domaine riche en cystéines.
CLASSE IV (≥ à 100 kDa)	Peptide signal - Pro-séquence - Domaine protéinase - Domaine type désintégrine - Domaine riche en cystéines - Domaine de type lectine.

I.2.3.2 Structure des hémorragines :

- Le peptide signal (pré-séquence) :

Les toxines hémorragiques possèdent une séquence signal ou pré-séquence de 18 résidus d'acides aminés hautement conservée. Ce peptide est libéré de la pro-séquence par un clivage entre la glycine 18 et la sérine 19 (Van Heijne., 1990 ; Hite et coll., 1992 ; Bjarnason et Fox., 1994 ; Hati et coll., 1999) (figure 3).

- La pro-séquence :

La pro-séquence est constituée de 169 à 210 résidus d'acides aminés. Elle est caractérisée par la présence d'une séquence consensus PKMCGVT située à l'extrémité N-terminale du domaine protéinase (Grams et coll., 1993 ; Hite et coll., 1994 ; Shimokawa et coll., 1996) (figure 3).

Cette séquence peut inhiber l'activité protéolytique de l'enzyme grâce à l'interaction de son résidu cystéine avec l'ion zinc du site actif, empêchant ainsi l'accès du substrat. L'hémorragine n'est active, qu'après élimination protéolytique du résidu cystéine de la pro-séquence (Shimokawa et coll., 1996 ; Markland., 1997 ; Matsui et coll., 2000).

- Le domaine protéinase :

C'est un domaine de 200 résidus d'acides aminés stabilisés par trois ou quatre ponts disulfures. Le domaine protéinase contient une séquence consensus $H_{142}EXXH_{146}XXGXXH_{152}$ conservée dans la séquence de toutes les métalloprotéinases des venins (Hite et coll., 1994 ; Hati et coll., 1999 ; Gutiérrez et Rucavado., 2000 ; Matsui et coll., 2000) (figure 3).

Les résidus histidines en position 142, 146 et 152 de cette séquence consensus sont absolument indispensables. En effet, ces trois histidines et une molécule d'eau sont les ligands de l'ion zinc du site actif (Bjarnason et Fox., 1994 ; Iha et coll., 1995 ; Jia et coll., 1996).

- Le domaine de type désintégrine :

Les désintégrines sont une famille de peptides de faible masse moléculaire (4 à 8 kDa), riches en cystéines (8 à 14 résidus). Elles possèdent toute la séquence consensus RGD qui leur permet de se fixer au complexe GPIIb/IIIa et d'inhiber ainsi l'agrégation des plaquettes (Scarborough et coll., 1993 ; Marsh et Fyffe., 1996 ; Marcinkiewicz et coll., 1997 ; Huang., 1998).

Les hémorragines appartenant aux classes III et IV possèdent un domaine qui a une homologie structurale avec les désintégrines des venins de serpents. Ce domaine diffère cependant des désintégrines par deux aspects, d'où l'appellation de domaine de type désintégrine. Ce domaine ne possède pas, d'une part, la séquence RGD, qui est remplacée par une séquence XXCD (surtout par la séquence SECD) et d'autre part, ce domaine possède deux résidus cystéines supplémentaires (Paine et coll., 1992 ; Takeya et coll., 1992 ; Jia et coll., 1997, Matsui et coll., 2000). Selon Jia et coll., (1997) un de ces résidus formerait un pont

disulfure avec l'extrémité amino-terminale de la région " spacer ". Cette région lie le domaine de type désintégrine avec le domaine protéinase. L'autre résidu de cystéine formerait un pont disulfure avec le domaine riche en cystéine.

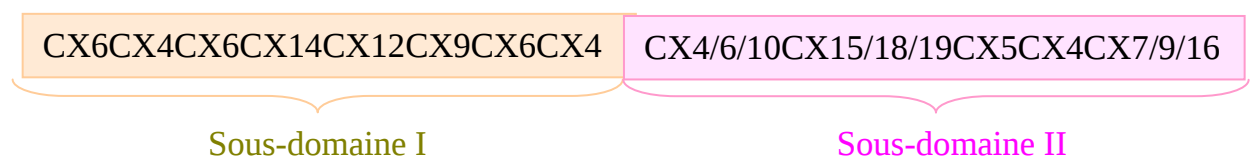
Le domaine de type désintégrine pourrait avoir plusieurs rôles :

- Il amplifieraient l'action des hémostatiques en affectant l'agrégation des plaquettes (Takeya et coll., 1992 ; Hutton et Warrel., 1993 ; Scarborough et coll., 1993 ; Jeon et Kim., 1999).

- Il permettrait l'attachement des hémostatiques sur des sites d'action particulier (cellules endothéliales ou plaquettes) (Kamiguti et coll., 1998 ; Hati et coll., 1999 ; Jia et coll., 2000 ; Matsui et coll., 2000).

- Le domaine riche en cystéine :

Ce domaine à une séquence caractéristique qui peut être divisée en deux sous-domaines. Le premier sous-domaine est hautement conservé (I), alors que le second est variable (II):



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

- Le domaine de type lectine :

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

Il semble que le domaine de type lectine interviendrait en ciblant les hémostatiques vers les protéines impliquées dans les mécanismes de l'hémostase (Polgar et coll., 1997 ; Braud et coll., 2000b) (figure 3).

Figure 3 : Structure schématique des hémorragines des venins de serpents.

I.2.3.3 Mécanisme d'action des hémorragines :

Les hémorragines des venins de serpents ont pour cible principale les capillaires sanguins. Le mécanisme par lequel ces toxines affectent les capillaires serait lié à leur pouvoir protéolytique qui leur permet de dégrader les composants protéiques de la lame basale qui entoure les capillaires (Bjarnason et Fox., 1994 ; Hati et coll., 1999).

Pour induire une hémorragie fatale, les molécules hémorragiques doivent agir vite sur les composants protéiques responsables du maintien de l'intégrité de la lame basale tels que le collagène de type IV, la laminine et la fibronectine (Markland., 1997 ; Hati et coll., 1999). La dégradation de ces protéines par les hémorragines provoque une perte de la stabilité et de l'intégrité des vaisseaux sanguins avec pour conséquence une fuite de sang dans les tissus environnants (Maruyama et coll., 1992 ; Moreira et coll., 1994 ; Markland., 1997) (figure 4).

Parmi les hémorragines capables d'hydrolyser le collagène de type IV, la fibronectine et la laminine de la lame basale il y a les toxines BaH1, BaH4 et BaP1 isolées à partir du venin de *Bothrops asper* et l'hémorragine LHF-II isolée à partir du venin de *Lachesis muta muta* (Lomonte et coll., 1994a ; Franceschi et coll., 2000).

Une action cytotoxique directe des hémorragines sur les cellules endothéliales a également été décrite comme un mécanisme probable pouvant être à l'origine de l'hémorragie (Hutton et Warrel., 1993 ; Bjarnason et Fox., 1994 ; Hati et coll., 1999).

En affectant les cellules endothéliales, les hémorragines provoquent une perturbation de la perméabilité des capillaires avec apparition d'une hémorragie (Ownby et Geren., 1987 ; Obrig et coll., 1993). Dans ce cas l'hémorragie peut se produire selon deux mécanismes :

- Un mécanisme par diapédèse dans lequel les jonctions entre les cellules endothéliales s'élargissent avec formation de vide entre les cellules. Les cellules endothéliales deviennent ainsi perméables au sang qui s'échappe vers l'espace du tissu conjonctif (érythrodiapédèse). Dans ce cas, ces cellules restent intactes (Hati et coll., 1999) (figure 4).

- Un mécanisme où l'hémorragie se produit à travers les cellules endothéliales après perturbation de leur membrane plasmique et de leur intégrité cellulaire. Des études de microscopie électronique ont révélé que dans ce mécanisme les mitochondries des cellules endothéliales sont gonflées, mais que les jonctions intercellulaires restent intactes. Dans ce mécanisme, l'hémorragie se produit à la suite d'une rupture de la membrane plasmique des cellules endothéliales qui laisse passer ainsi le sang à travers les cellules endommagées vers le tissu environnant (Anderson et Ownby., 1997 ; Hati et coll., 1999) (figure 4).

Les mécanismes moléculaires à l'origine de ces deux types de phénomènes sont encore inconnus. Selon Hati et collaborateurs (1999), c'est l'activité protéolytique des hémorragines qui en est la principale cause. Cette activité perturbe l'assemblage et l'organisation des protéines membranaires ayant pour résultat une perturbation ou une lyse des cellules endothéliales.

Les toxines hémorragiques isolées à partir des venins semblent avoir un mécanisme d'action différent sur les cellules endothéliales. C'est ainsi que les toxines hémorragiques

HR-1, HR-2a, HR-2b isolées à partir du venin de *Trimeresurus flavoviridis* provoquent une hémorragie par érythrodiapédèse (Hati et coll., 1999). Alors que les hémorragines ACL-1 isolée à partir du venin d'*Agkistrodon contortrix laticinctus*, la bilitoxine isolée à partir du venin d'*Agkistrodon bilineatus bilineatus*, l'atrollysine a isolée à partir du venin de *Crotalus atrox* et la protéinase H isolée à partir du venin de *Crotalus adamenteus* provoquent une hémorragie à la suite d'une lyse des cellules endothéliales (Johnson et Ownby., 1993 ; Obrig et coll., 1993).

Lomonte et coll., (1994a) et Rucavado et coll., (1995) suggèrent que la dégénérescence *in vivo* des cellules endothéliales pourrait être une conséquence indirecte de l'action des hémorragines sur la lame basale plutôt que le résultat d'une action cytotoxique directe des hémorragines sur ces cellules.

Ces auteurs se basant sur l'étude des hémorragines BaH1 (Lomonte et coll., 1994a) et Bap1 (Rucavado et coll., 1995), isolées à partir du venin de *Bothrops asper*, ont montré que ces toxines malgré leur action hémorragique très puissante (*in vivo*) et leur capacité à dégrader le collagène de type IV, la laminine et la fibronectine n'avaient aucune action cytotoxique directe sur les cellules endothéliales en culture.

Selon ces auteurs, l'hydrolyse des composants protéiques de la lame basale par les hémorragines entraîneraient une perturbation des cellules endothéliales, ayant pour effet des modifications morphologiques et fonctionnelles de ces cellules.

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

- L'action des hémorragines sur le caillot de fibrine (activité fibrinolytique) (Hutton et Warrel.,1993 ; Bjarnason et Fox.,1994 ; Hati et coll., 1999).

- L'inhibition de l'agrégation des plaquettes grâce au domaine de type désintégrine des hémorragines (Hutton et Warrel.,1993 ; Shimokawa et coll, 1997, 1998).

- L'action des composants non hémorragiques des venins de serpents, tels que les molécules fibrinolytiques qui rendent le sang incoagulable, les molécules qui activent le plasminogène, ainsi que les composants qui inhibent l'agrégation des plaquettes et qui provoquent ainsi une perturbation de la coagulation du sang (Willis et Tu., 1988 ; Bjarnason et Fox., 1994 ; Markland., 1997 ; Ramirez et coll., 1999).

Figure 4 : Représentation schématique des différents mécanismes d'action des hémorragines.

I.3 Activité oedématisante des venins de serpents :

La formation d'un œdème local est un des effets provoqués par les venins de serpents. Il est le résultat d'une augmentation de la perméabilité des capillaires sanguins, qui a pour conséquence une fuite du contenu intravasculaire vers les espaces interstitiels. Cette augmentation de la perméabilité capillaire pourrait être liée à une action combinée de la PLA₂, des myotoxines, des protéases et des facteurs hémorragiques des venins de serpents (Chiu et coll., 1989 ; Detrait et Jacob., 1990 ; Tan et coll., 1991 ; Ho et coll., 1993 ; Lioret et Moreno., 1993 ; Chaves et coll., 1995,1998 ; Landucci et coll., 1998 ; De Faria et coll., 2001) (figure 5).

L'œdème induit par la PLA₂ a été attribué à la capacité de cette molécule à hydrolyser les phospholipides membranaires qui conduit à la libération de l'acide arachidonique nécessaire à la formation des prostaglandines et des leucotriènes, ainsi que le dérivé lyso-PAF nécessaire à la synthèse du " Platelet Activating Factor " (PAF). Ces composés libérés possèdent des effets pharmacologiques divers parmi lesquels la capacité d'augmenter la perméabilité capillaire. Ils pourraient ainsi être à l'origine de la formation d'un œdème local (Chiu et coll., 1989 ; Miller et Tu., 1989 ; Huang., 1984 ; Tan et coll., 1991 ; Ho et coll., 1993 ; Lioret et Moreno., 1993 ; Chaves et coll., 1995,1998 ; Landucci et coll., 1998) (figure 5).

Le pouvoir oedématisant des myotoxines des venins serait essentiellement lié à leur capacité d'hydrolyser les phospholipides des membranes cellulaires avec libération des précurseurs pour la synthèse des eicosanoïdes et du PAF (Gutiérrez et Lomonte., 1995 ; Chaves et coll., 1998).

Les protéases et les hémorragines des venins peuvent également participer à la formation de l'œdème. C'est ainsi que les protéases de venins douées d'une activité kininogénase (enzyme de type kallikréine) seraient capables de libérer les kinines à partir de leur précurseur plasmatique inactif le kininogène. Ces protéases possèdent généralement une activité arginine-ester-hydrolase (Huang., 1984 ; Hutton et Warrel., 1993 ; Shimokawa et Takahashi., 1995 ; De Faria et coll., 2001).

Les kinines sont des peptides vasoactifs très puissants, capables d'augmenter la perméabilité des capillaires, d'activer la PLA₂ avec libération de prostaglandines et d'induire une sensation douloureuse. Les deux kinines principales sont la bradykinine et la lysyl-bradykinine (Huang., 1984 ; Komori et Sugihara., 1990).

L'implication des hémorragines, dans la formation de l'œdème serait liée à leur capacité d'altérer la paroi des capillaires sanguins, laissant passer ainsi les érythrocytes et les protéines plasmatiques normalement retenues dans les vaisseaux (Hutton et Warrel., 1993 ; Acosta de Pérez et coll., 1996) (figure 5).

Figure 5 : Schéma récapitulatif des mécanismes susceptibles d'être à l'origine de l'activité oedématisante des venins de serpents.

I.4 Effet du venin des serpents sur le muscle squelettique :

I.4.1 Rappel histologique:

Le muscle squelettique est constitué par un ensemble de cellules très allongées ou fibres musculaires striés. Chaque fibre est limitée par une membrane périphérique, le sarcolemme, sous lequel se trouvent les noyaux.

Le sarcolemme est constitué par la membrane plasmique de la cellule musculaire. Cette membrane est recouverte par une fine lame basale extracellulaire qui est en contact avec la fine couche de tissu conjonctif des espaces interfibrillaires.

Les noyaux de la fibre musculaire sont nombreux, il y a plusieurs centaines par fibre. Ces noyaux sont ovoïdes et sont orientés dans le sens de la longueur de la fibre (Chevremont., 1979 ; Leeson et Leeson., 1980 ; Mouriquand., 1982 ; Elias et coll., 1984 ; Stevens et Lowen., 1993 ; Stryer., 1997).

Le cytoplasme ou sarcoplasme est occupé par le constituant essentiel de la cellule musculaire striée, les myofibrilles. Il contient également du glycogène, de la myoglobine et les organites habituels d'une cellule.

Le sarcoplasme est reparti sur toute la longueur de la fibre musculaire, mais il est plus abondant sous le sarcolemme autour des noyaux. Il contient de l'eau, des sels minéraux (Ca, K, Mg, Na, Fe), des glucides sous forme de glucose ou d'abondantes granulations de glycogène réparties entre les myofibrilles ainsi que des lipides.

Le sarcoplasme contient également de la myoglobine qui est responsable de la coloration rouge du muscle. C'est une chromoprotéine voisine de l'hémoglobine capable de se combiner de manière réversible à l'O₂ et au CO₂. Les mitochondries ou sarcosomes sont en grand nombre, elles sont groupées parallèlement à l'axe des fibres, entre les myofibrilles et à la périphérie sous le sarcolemme. De petits complexes de Golgi sont situés le plus souvent aux pôles nucléaires. Le réticulum sarcoplasmique comprend un système étendu et continu de sarcotubules longitudinaux qui entourent les myofibrilles.

Les myofibrilles sont les structures contractiles des fibres musculaires, elles s'étendent d'une extrémité à l'autre de la fibre et sont groupées en faisceaux séparés par le sarcoplasme. Ces myofibrilles présentent sur toute leur longueur une alternance de bandes sombres et claires appelées respectivement bande A et I.

Les myofibrilles sont responsables de la striation longitudinale des fibres musculaires, tandis que l'alternance de leurs bandes claires et sombres est responsable de la striation transversale. La bande I, la plus claire est divisée en deux par une strie dense, la strie Z, alors que la bande sombre A contient en son milieu une bande plus claire, la bande H qui est elle-même traversée par une strie sombre, la strie M. La portion de myofibrille comprise entre deux stries Z constitue le sarcomère (figure 6).

Figure 6 : Organisation du muscle strié squelettique.

Les myofibrilles sont composées de myofilaments plus minces orientés longitudinalement. Il existe deux types de myofilaments : Les filaments épais de myosine qui sont disposés sur toute la longueur de la bande A et les filaments fins d'actine.

Les filaments fins d'actine s'étendent de part et d'autre de la strie Z sur toute la longueur de la bande I. Ils pénètrent dans la bande A entre les filaments épais, en se disposant parallèlement à eux, mais ils n'atteignent pas la strie M. (Chevremont., 1979 ; Leeson et Leeson., 1980 ; Mouriquand., 1982 ; Elias et coll., 1984 ; Stevens et Lowen., 1993 ; Stryer., 1997) (figure 6).

Le muscle strié est richement vascularisé. Plusieurs artères abordent le muscle en divers points de sa surface pour lui fournir l'oxygène et les métabolites. Ces artères se ramifient à l'intérieur du tissu musculaire en un réseau de capillaires dont la plupart sont disposées longitudinalement le long des fibres.

Les capillaires sont des vaisseaux sanguins de petit calibre qui permettent les échanges entre le sang et les tissus. La paroi du capillaire est essentiellement constituée d'une couche de cellules endothéliales, doublée d'une lame basale (Maillet et Chiarasini., 1981) (figure 7).

La cellule endothéliale est de forme polygonale, allongée et très plate. Le noyau, ellipsoïde et proéminent, occupe le centre de la cellule et fait saillie dans la lumière du vaisseau.

Les cellules endothéliales possèdent tous les organites cytoplasmiques classiques : appareil de Golgi, mitochondries, réticulum endoplasmique et ribosomes (Reinharez., 1984).

I.4.2 Classification de la myonécrose induite par les venins de serpents :

Les venins de serpents peuvent être à l'origine d'altérations importantes du tissu musculaire. Ces altérations sont très variées. Elles associent différents phénomènes tels que l'hémorragie, l'hypercontraction des myofibrilles, une lyse du matériel nucléaire, ainsi qu'une hypertrophie ou une atrophie des cellules musculaires (Gutiérrez et coll., 1995b). Ces manifestations physiopathologiques peuvent être à l'origine d'un processus dégénératif et myolytique sévère du tissu musculaire (Mebs et coll., 1983).

Selon Ownby et Colberg (1988), la myonécrose induite par les venins de serpents peut être classé en trois types :

- le premier type de nécrose tissulaire est une nécrose de coagulation où le contour des cellules musculaires reste parfaitement limité, bien que tous les éléments constitutifs de la cellule soient morts.

- Le deuxième type de nécrose provoquée par les venins de serpents est caractérisée par une myolyse du tissu musculaire.

- Le troisième type est une nécrose mixte, caractérisée par la présence d'une nécrose de coagulation et d'une myolyse du tissu musculaire.

Figure 7 : Aspect schématique d'un capillaire sanguin.

I.5 le venin de *Vipera lebetina* :

Le venin de *Vipera lebetina* contient une activité protéolytique très importante (Siigur et coll., 1991). Ce venin renferme des enzymes coagulantes et anticoagulantes parmi lesquelles un activateur du facteur X et des enzymes α (β) fibrino(géno)lytiques (Siigur et coll., 1996).

Une métalloprotéinase fibrino(géno)lytique nommée “ lébétase ” a été isolée du venin de *Vipera lebetina* provenant d'Ouzbékistan. Cette enzyme de 23,7 kDa clive la chaîne α et plus lentement la chaîne β du fibrinogène (Siigur et coll., 1996).

Par ailleurs, deux peptides (lébétine 1 et 2) ont été purifiés à partir du venin de *Vipera lebetina* répandue dans le centre et le nord de la tunisie. Les lébétines 1 et 2 sont des peptides de mase moléculaire inférieure à 7 kDa. Ces peptides sont capables d'inhiber l'agrégation des plaquettes (Marrakchi et coll., 1994 ; El Ayeb et coll., 1999).

II. MATERIELS ET METHODES :

II.1 Matériels :

II.1.1 Matériels biologiques :

II.1.1.1 Le venin :

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

II.1.1.2 Le sérum-antivenimeux :

Le sérum-antivenimeux utilisé dans cette étude est un sérum anti-vipérin constitué de fragment F(ab')₂. Il s'agit d'un immun-sérum bivalent commercialisé par l'Institut Pasteur d'Algérie et dirigé à la fois contre le venin de *Vipera lebetina* et celui de *Cerastes cerastes*. Cet immun-sérum (lot N°2305), nous a été fourni par le Laboratoire de Recherche et de Développement sur les Venins de l'Institut Pasteur d'Algérie.

II.1.1.3 Les souris :

Des souris mâles (Swiss) (20 à 30 g) nous ont été fournies par l'Institut Pasteur d'Algérie – Annexe de Kouba.

II.1.1.4 Les globules rouges :

Les globules rouges ont été obtenus à partir de sang de cheval prélevé sur citrate trisodique 0,13 M.

II.1.2 Matériels non biologiques :

II.1.2.1 Produits chimiques :

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

Ces produits proviennent de différentes firmes :

*** Produits Fluka :** Bleu de toluidine, erythrosine, orange G, baume de canada, toluène.

*** Produit Gifrer – Barbezat :** Formol.

*** Produits Merck :** Acétate d'ammonium (AcNH₄), acide trichloro-acétique (TCA), bleu de bromophénol, caséine, éthanol, paraffine à 58°C, di-hydrogéo-phosphate de potassium (KH₂PO₄), di-potassium

hydrogène-phosphate (K_2HPO_4), Tris (hydroxyméthyl-amino-méthane).

*** Produits Pharmacia :** Carbonate de sodium, formaldéhyde, glutaraldéhyde, glycérol, nitrate d'argent, Sephadex G-75, CM Sephadex C-50, DEAE Sephadex A-50, Benzamidine Sepharose 6-B.

*** Produits Prolabo :** Acide acétique, acide chlorhydrique, soude.

*** Produits Sigma :** Acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA), chlorure de calcium ($CaCl_2$), chlorure de potassium (KCl), chlorure de sodium (NaCl), chlorure de zinc ($ZnCl_2$), N_α -Benzoyl-L-Arginine Ethyl Ester Hydrochloride (BAEE), N_α -CBZ_L-Arginine-p-Nitroanilide Hydrochloride (CBZ), polyéthylène glycol (PEG), sodium dodecyl sulfate (SDS), réactif créatine kinase (ADP, AMP, créatine phosphate, EDTA, glucokinase, D-glucose, glucose- 6-phosphate déshydrogénase (G-6-PD), Mg^{2++} , NADP).

II.1.2.2 Appareillages :

* Agitateur magnétique	Ikamag
* Appareil à gradient	Pharmacia Fine Chemicals
* Appareil d'électrophorèse " Phast system "	Pharmacia
* Balance	Sartorius
* Bain – Marie thermostaté	Gerhardt Bioblock
* Centrifugeuse réfrigérée	Beckman
* Collecteur de fractions	LKB
* Colonnes chromatographiques :	
(5,5 × 50 cm)	Pharmacia Fine Chemicals
(2,5 × 20 cm)	Whatman
(1,6 × 26 cm)	Whatman
(1,6 × 7,6 cm)	Pharmacia Fine Chemicals
* Etuves	Heraeus
* Lyophilisateur	Bioblock
* Membrane de dialyse	Spectra/pore
* Micropipettes	Kartell
* Microtome	Minot
* Microscope photonique	American optical
* pH mètre	Orchidis
* Photomicroscope	Leitz
* Pompe à vide	Orchidis
* Spectrophotomètre	Perkin Elmer
* Vortex	Prolabo.

II.2 Méthodes :

L'étude portant sur les perturbations physiopathologiques observées lors d'une envenimation vipérine, a été abordée par la caractérisation des activités enzymatiques et biologiques du venin de *Vipera lebetina*.

II.2.1 Caractérisation des activités enzymatiques du venin de *Vipera lebetina* :

II.2.1.1 Activité protéolytique :

L'activité protéolytique du venin de *Vipera lebetina* a été déterminée par la méthode de Kunitz (1947) modifiée par Van Der Walt et Joubert (1971) en utilisant une solution de caséine comme substrat.

La réaction enzymatique a été effectuée en incubant des solutions de venin à des concentrations croissantes (0 à 0,7 UDO/ml) avec 1,9 ml de caséine 1 % (P/V) dans un tampon Tris-HCl 0,2 M, pH 7,2 pendant 15 min à 37°C. Après incubation, un volume de 3 ml de TCA 5 % (V/V) est ensuite ajouté. Le mélange obtenu est centrifugé à 3000 trs/min pendant 20 min.

L'activité caséinolytique est détectée par la mesure de l'absorbance du surnageant à 280 nm.

II.2.1.2 Activité arginine-ester-hydrolase :

L'activité arginine ester hydrolase a été testée selon la méthode de Nishikata (1984) en utilisant le N_α-Benzoyl-L-Arginine Ethyl Ester Hydrochloride (BAEE) comme substrat.

La réaction enzymatique est réalisée en incubant pendant 30 min à 37°C, un mélange réactionnel de 2 ml contenant un volume de 200 µl de BAEE ($6,6 \times 10^{-4}$ M) et le venin de *Vipera lebetina* à des concentrations croissantes (0 à 0,7 UDO/ml) à raison de 10 µl dans un tampon Tris-HCl 0,04 M contenant du CaCl₂ 0,01 M, pH 8.

L'hydrolyse du substrat est déterminée par la lecture de l'absorbance du mélange à 253 nm.

II.2.1.3 Activité amidolytique ou de type thrombine :

L'activité amidolytique du venin de *Vipera lebetina* a été recherchée en utilisant un substrat chromogénique le N_α-CBZ_L-Arginine-p-Nitroanilide Hydrochloride (CBZ) selon la technique de Stocker et coll., (1986).

Des solutions de venin de concentrations croissantes (0 à 0,7 UDO/ml) sont préincubées pendant 10 min à 37°C, dans un tampon Tris-HCl 0,04 M contenant du NaCl 0,1 M et du PEG 0,1 %, pH 8,7. A ces solutions de venin (10 µl) est ajouté ensuite un volume de 50 µl du substrat chromogénique (CBZ) à raison de $6,6 \times 10^{-4}$ M. Le mélange est ensuite incubé pendant 15 min à 37°C.

L'activité amidolytique est détectée par la mesure de l'absorbance du volume réactionnel à 405 nm.

II.2.1.4 Activité phospholipasique :

La présence de l'activité phospholipasique dans le venin de *Vipera lebetina* a été recherchée par la méthode d'hémolyse indirecte des globules rouges de Cesari et Boquet (1935) modifiée.

- Préparation des globules rouges

Le sang de cheval prélevé sur citrate trisodique 0,13 M est centrifugé à 2000 trs/min pendant 10 min à 4°C. Après élimination du plasma, les globules rouges récupérés subissent trois lavages avec du NaCl (9 ‰) après centrifugation à 3000 trs/min pendant 20 min à 4°C.

- Préparation du substrat

Le substrat utilisé est la lécithine de jaune d'œuf à 1 % dans un tampon phosphate 0,1 M, pH 7. Cette solution est préalablement incubée à 37°C avant utilisation.

- Test d'hémolyse indirecte des globules rouges

Dans une série de tubes contenant un volume de 10 µl de solution de venin de concentrations croissantes (0 à 0,7 UDO/ml) est ajouté un volume de 500 µl de lécithine et 990 µl de tampon phosphate 0,15 M, pH 7. Après incubation de la réaction pendant 1 heure à 37°C, un volume de 10 µl d'une solution de globules rouges diluées au 1/20^{ème} est ensuite rajoutée. La réaction est ensuite incubée pendant 30 min à 4°C, suivie par une centrifugation à 4000 trs/min pendant 15 min.

L'absence ou la présence d'hémolyse est observée à l'œil nu.

II.2.2 Caractérisation des activités biologiques du venin de *Vipera lebetina*

II.2.2.1 Détermination de l'activité hémorragique du venin de *Vipera lebetina* :

L'activité hémorragique a été déterminée par la technique du “ skin test ” de Kondo et coll., (1960) modifiée par Ownby et coll., (1984).

Cette technique macroscopique et semi-quantitative consiste à injecter par voie sous cutanée, au niveau de la peau dorsale de la souris un volume de 0,1 ml de l'échantillon à tester (venin ou éluats chromatographiques). Deux heures après l'injection, les souris sont sacrifiées, leur peau dorsale est prélevée.

La présence d'une activité hémorragique se traduit par l'apparition d'un spot hémorragique sur la surface interne de la peau des souris. Cette activité est estimée en multipliant le diamètre le plus long avec le diamètre le plus long qui lui est perpendiculaire.

- Etude de l'activité hémorragique en fonction des doses de venin

Cette étude a été réalisée après injection au niveau de la peau dorsale de souris (25 à 30 g) d'un volume de 0,1 ml de solutions de venin à des doses croissantes allant de 5, 10, 20, 40, 80, 160 à 320 µg. Chacune de ces doses a été injectée à un lot de 5 souris. Les souris témoins reçoivent un volume identique de NaCl (9%).

Deux heures après l'injection, les souris sont sacrifiées, leur peau dorsale est prélevée. Le diamètre du spot hémorragique pour chaque dose est mesuré.

II.2.2.1.1 Détermination de la Dose Minimale Hémorragique (DMH) du venin de *Vipera lebetina*

La dose minimale hémorragique (DMH) est définie comme étant la dose de venin qui produit un spot hémorragique de 10 mm de diamètre (Kondo et coll., 1960 ; Ownby et coll., 1984).

La DMH du venin a été évaluée en utilisant la méthode de Kondo et coll., (1960) modifiée par Ownby et coll., (1984) en injectant différentes doses de venin et en mesurant pour chaque dose le diamètre du spot hémorragique.

II.2.2.1.2 Neutralisation de l'activité hémorragique du venin de *Vipera lebetina*

L'efficacité d'un immun-sérum à neutraliser l'activité hémorragique du venin de *Vipera lebetina* a été testée selon la méthode de Lomonte et coll., (1996).

La technique consiste à pré-incuber un mélange constitué d'un volume de 0,2 ml d'immun-sérum anti-vipérin et 0,2 ml de doses croissantes de venin pendant 30 min à 37°C. Un volume de 0,1 ml de ce mélange est ensuite injecté par voie sous-cutanée, au niveau de la peau dorsale de souris de 25 à 30 g (5 souris par lot).

L'activité hémorragique est déterminée pour chaque dose, deux heures après l'injection de ce mélange selon la méthode de Kondo et coll., (1960) modifiée par Ownby et coll., (1984).

II.2.2.1.3 Inhibition de l'activité hémorragique par l'EDTA

L'inhibition de l'activité hémorragique du venin de *Vipera lebetina* par l'EDTA a été réalisée selon la méthode de Huang et coll., (1984).

Cette méthode permet de déterminer l'activité hémorragique d'un échantillon (venin ou fractions chromatographiques) deux heures après l'injection d'un mélange constitué d'un volume de 0,2 ml de l'échantillon et de 0,2 ml d'EDTA (10 mM). Ce mélange est préalablement incubé pendant 15 min à 37°C. Après incubation, un volume de 0,1 ml du mélange est injecté par voie sous cutanée, au niveau de la peau dorsale d'un lot de 4 souris (25 à 30 g).

Deux lots de 4 souris chacun sont utilisés comme témoins :

L'un des lots témoins reçoit une injection de 0,1 ml de l'échantillon sans EDTA, l'autre reçoit une injection de 0,1ml de NaCl (9 ‰).

II.2.2.2 Restauration des activités inhibées par l'EDTA

L'essai de reincorporation des ions Zn^{++} et Ca^{++} après action de l'EDTA a été testé selon la méthode de Kurecki et Kress (1985).

Après pré-incubation du venin (0,2 ml) ou des fractions éluées (0,2 ml) pendant 15 min à 37°C avec 0,2 ml d'EDTA (10 mM), le mélange est dialysé contre une solution de $ZnCl_2$ et/ou de $CaCl_2$ (10 mM) toute la nuit. Après dialyse, un volume de 0,1 ml de ce mélange est prélevé et injecté au niveau de la peau dorsale d'un lot de 4 souris (25 à 30 g). L'activité hémorragique est observée deux heures après.

Les activités enzymatiques des échantillons inhibées par l'EDTA ont été recherchées après dialyse contre le $ZnCl_2$ et/ou le $CaCl_2$ (10 mM) pendant 24 h.

II.2.2.3 Détermination de l'activité oedématisante induite par le venin de *Vipera lebetina*

La détermination de l'activité oedématisante du venin de *Vipera lebetina* a été réalisée selon la technique de Gutiérrez et coll., (1990a).

Cette activité a été déterminée par injection à des lots de 4 souris (20 ± 2 g) d'un volume de 100 µl de venin à différentes doses (5, 10, 20, 40, 80, 160, 320 µg). L'injection a été réalisée au niveau de la patte droite des souris. La patte gauche reçoit une injection de 100 µl d'eau physiologique. Après deux heures, les souris sont sacrifiées et leurs deux pattes sont coupées et pesées.

La présence d'une activité oedématisante est révélée par une augmentation du poids de la patte droite envenimée, en comparaison avec celui de la patte gauche témoin.

La dose minimale de venin qui provoque une augmentation du poids de la patte de 30% est définie comme étant la dose minimale oedématisante (DME).

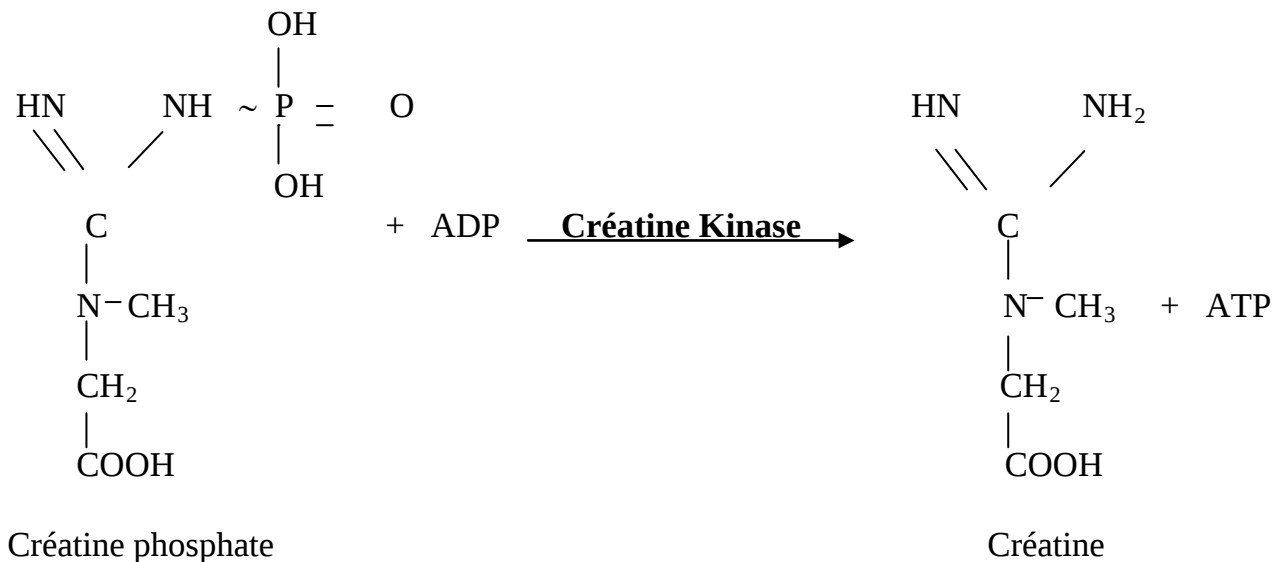
II.2.2.4 Détermination de l'activité myonécrotique du venin de *Vipera lebetina*

L'activité myonécrotique du venin de *Vipera lebetina* a été recherchée par deux méthodes. D'une part par le dosage de la créatine kinase (CK) et d'autre part par l'observation histologique des altérations du muscle squelettique.

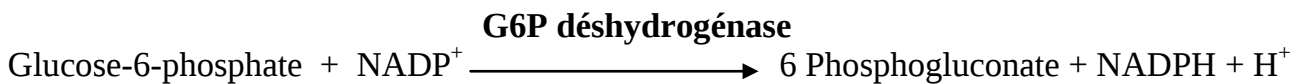
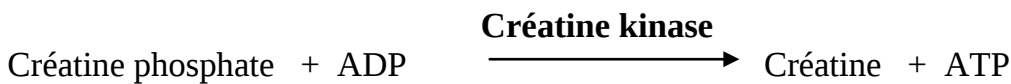
II.2.2.4.1 Dosage de l'activité de la créatine kinase (CK)

La créatine kinase (EC 2.7.3.2) est une enzyme de 80 kDa. Elle est principalement localisée dans le muscle squelettique, le muscle cardiaque et le cerveau. Une lésion de ces tissus induit une libération élevée de créatine kinase dans le sang. Le dosage de l'activité CK sérique est utilisé comme un outil de diagnostic pour détecter une atteinte du tissu musculaire.

La créatine kinase catalyse la réaction suivante :



Les réactions enzymatiques impliquées dans le dosage de la CK sont les suivantes :



La vitesse d'apparition de NADPH + H⁺ mesuré à 340 nm est proportionnelle à l'activité de la créatine kinase initiale.

Le dosage de la créatine kinase a été réalisé selon la technique de Gutiérrez et coll., (1984).

Après injection du venin de *Vipera lebetina* (100 µg) par voie intra-musculaire à des lots de 5 souris, dans un volume de 0,1 ml, des prélèvements sanguins sont réalisés à différents temps après l'envenimation (5, 15, 30 min, 1, 3, et 24 h). Les souris témoins reçoivent une injection de 0,1 ml de NaCl (9 ‰). Après centrifugation du sang, un échantillon sérique de chaque prélèvement est soumis à un dosage de la créatine kinase. Ce dosage est réalisé à l'aide d'un Kit "Sigma".

La réaction est effectuée de la manière suivante :

Après incubation de 1 ml de réactif CK pendant trois secondes à 30°C, un volume de 0,02 ml de l'échantillon sérique est ajouté et le mélange obtenu est de nouveau incubé pendant 3 min à 30°C.

Après incubation, la densité optique est lue à 340 nm, contre de l'eau distillée. Cette valeur représente l'absorbance initiale (DO initiale).

L'incubation du mélange précédent est ensuite poursuivie à 30°C et la densité optique est mesurée après 120 secondes. La valeur de la DO obtenue représente l'absorbance finale (DO finale).

L'activité CK est déterminée selon l'équation suivante :

$$CK (U/l) = \frac{\Delta A/min \times V_t \times 1000}{6,22 \times I \times V_e}$$

$\Delta A/min$: Variation de la densité optique à 340 nm.

V_t : Volume total (ml)

V_e : Volume de l'essai (ml)

6,22 : Absorption millimolaire de NADPH à 340 nm

I : Trajet optique de la cuve

1000 : Conversion des U/ml en U/l

Par ailleurs, l'évaluation de l'activité myonécrotique des fractions hémorragiques du venin de *Vipera lebetina* a été testée en injectant chaque fraction (100 µg) à des lots de 5 souris. L'activité CK est ensuite déterminée pour chaque fraction, 3 heures après l'injection de celle-ci.

II.2.2.4.2 Méthodes histologiques

L'étude histologique du tissu musculaire de souris envenimées avec le venin de *Vipera lebetina* a été réalisée selon la technique de Queiroz et coll. , (1984).

L'envenimation expérimentale a été effectuée sur 28 souris (20 ± 2 g), réparties en 7 lots. Le venin (100 µg) a été injecté à raison de 0,1 ml, par voie intra-musculaire au niveau de la cuisse des souris. Les souris témoins ont reçu une injection de 0,1ml d'eau physiologique. A des intervalles de temps de 5, 15, 30 min, 1, 3, et 24 h, les souris sont sacrifiées. Un échantillon du muscle de chaque souris est prélevé, il est immergé immédiatement dans le fixateur en vue d'une étude histologique classique.

- Préparation à l'examen histologique

1. Fixation

La fixation permet de conserver les tissus dans un état aussi proche que possible de l'état vivant et de s'opposer à leur putréfaction. Nous avons utilisé comme agent fixateur le formol à 10 %. Ce fixateur permet une bonne conservation des structures cellulaires et sa vitesse de pénétration dans les tissus est assez rapide. La durée de la fixation est de 48 heures à température ambiante.

2. Déshydratation et inclusion dans la paraffine

2.1 Déshydratation

Cette étape prépare l'échantillon à l'inclusion dans la paraffine. Le tissu est progressivement déshydraté par passages successifs dans des solutions d'éthanol de plus en plus concentrés (70 % → 90 % → 100 %) et ceci jusqu'à ce que l'échantillon soit totalement imprégné d'éthanol absolu.

L'éthanol n'étant pas miscible à la paraffine, il est ensuite remplacé par un solvant organique, le toluène qui élimine l'alcool et permet l'imprégnation du tissu par la paraffine (fiche technique n°1)

2.2 Inclusion dans la paraffine

L'inclusion en bloc de paraffine, permet aux tissus d'acquérir la fermeté nécessaire à la préparation de coupes de faible épaisseur.

Après le dernier bain de toluène, le fragment tissulaire est imprégné dans deux bains successifs de paraffine de 1 h et 24 h respectivement. L'échantillon musculaire est ensuite plongé dans la paraffine liquide à 55°C. Cette dernière est d'abord coulée dans un moule formé par les barres de leuckart (fiche technique n°1).

3. Préparation et collages des coupes

Le bloc de paraffine est taillé en forme de trapèze. Les coupes de 7 µm d'épaisseur sont obtenues grâce à un microtome de type " Minot "

Les coupes sont étalées et collées sur des lames de verre au moyen d'une solution d'eau gélatinée à 0,4 %. Elles sont mises à sécher dans une étuve à 45°C.

4. Déparaffinage et hydratation des coupes

La plupart des colorants utilisés en histologie sont aqueux, c'est pourquoi avant toute coloration des lames, les coupes doivent être au préalable débarrassées de la paraffine qui les couvre et ensuite réhydratées.

Les lames sont mises à chauffer sur une platine chauffante avant d'être plongées dans deux bains de toluène pour éliminer totalement la paraffine (déparaffinage). Les lames sont ensuite réhydratées, en utilisant des bains d'alcool de degré décroissant (100 % → 90 % → 70 %) jusqu'au bain final d'eau distillée (fiche technique n°1).

5. Coloration topographique des lames

La coloration des lames a été réalisée selon la méthode de Mann-Dominici. C'est une coloration bichromique faisant agir successivement :

- Un colorant acide : L'erythrosine et l'orange G, qui colore les cytoplasmes acidophiles en rose.
- Un colorant basique : Le bleu de toluidine, qui colore la chromatine, les molécules et les cytoplasmes basophiles en bleu (fiche technique n°2).

6. Déshydratation et montage des lamelles

Les coupes de tissus colorées sont protégées entre lame et lamelle. Cette dernière est collée à l'aide du baume de Canada.

Le baume de Canada est non miscible à l'eau mais miscible au toluène. Il est donc nécessaire avant le montage des lamelles, de déshydrater les coupes colorées en les passant dans des alcools de degré croissant et de les imprégner de toluène au préalable (fiche technique n°3).

Les lames sont ensuite séchées à l'étuve à 45°C pendant 24 h, elles sont ainsi prêtes à l'observation au microscope photonique.

Des photographies des coupes histologiques du tissu musculaire ont été ensuite réalisées avec un photomicroscope sur pellicules de format 135, AGFA 100 ASA.

II.2.3 Purification et caractérisation des molécules hémorragiques du venin de *Vipera lebetina* :

La purification d'une protéine est une étape essentielle pour la compréhension de la relation structure –fonction. Les protéines d'un échantillon peuvent être séparées les unes des autres, sur la base de caractéristiques telles que la taille, la charge et l'affinité de liaison.

II.2.3.1 Fractionnement du venin de *Vipera lebetina* par chromatographie d'exclusion moléculaire sur Sephadex G-75 :

La chromatographie d'exclusion moléculaire permet de séparer les molécules, en fonction de leurs tailles et de leurs masses moléculaires. Les molécules sont éluées dans l'ordre des masses moléculaires décroissantes.

Le gel Sephadex G-75 préalablement gonflé dans un tampon AcNH_4 0,1 M, pH 8,5 est dégazé puis coulé dans une colonne Pharmacia ($5,5 \times 50$ cm).

Une fois la colonne équilibrée, un gramme de venin brut (1300 UDO) de *Vipera lebetina*, dissous dans 5 ml d' AcNH_4 0,1 M, pH 8,5 est déposé à l'extrémité supérieure de la colonne. L'éluion est réalisée par le tampon AcNH_4 0,1 M, pH 8,5 et le débit est maintenu constant à 20 ml/h.

Les éluats de colonne sont récupérés dans un collecteur de fraction à raison de 4 ml/tube. La lecture de l'absorbance est effectuée à 280 nm.

II.2.3.2 Chromatographie par échange d'ions :

Les protéines peuvent être séparées selon leur charge globale par chromatographie échangeuse d'ions. Les échangeurs d'ions sont des macromolécules insolubles, portant des groupements ioniques ayant la propriété d'échanger de façon réversible certains de leurs ions au contact d'autres ions provenant d'une solution.

Le gel Sephadex est souvent utilisé comme support sur lequel sont greffées des fonctions ionisables. Les deux types les plus couramment employés sont :

* Le diethylaminoethyl (DEAE) comme échangeurs d'anions pour la chromatographie échangeuse d'anions sur DEAE Sephadex A-50

* Le carboxymethylcellulose (CM) comme échangeurs de cations pour la chromatographie échangeuse de cations sur CM Sephadex C-50.

Les protéines se fixent sur les gels échangeurs d'ions. Elles sont éluées sélectivement par augmentation progressive de la molarité du tampon et/ou par variation de pH.

II.2.3.2.1 Chromatographie échangeuse de cations sur CM Sephadex C-50 de la fraction F2 :

Le gel CM Sephadex C-50 est mis à gonfler dans un tampon AcNH_4 0,1 M, pH 5. Le gel est ensuite dégazé et coulé dans une colonne Whatman ($2,5 \times 20$ cm).

Un échantillon de 2 ml de la fraction F2 (200 UDO) issue de la filtration moléculaire du venin de *Vipera lebetina* est déposé à la surface du gel.

L'élution est réalisée à 4°C à l'équilibre à l'aide d'un tampon AcNH_4 0,1 M, pH 5, suivie par un gradient linéaire de force ionique allant de 0,1 M à 0,5 M, pH 5. Après le gradient, une élution à l'équilibre est effectuée en utilisant un tampon d' AcNH_4 1 M, pH 5.

Le débit est maintenu constant à 24 ml/h et l'absorbance des éluats de la colonne est mesurée pour chaque tube à 280 nm.

II.2.3.2.2 Chromatographie échangeuse d'anions sur DEAE Sephadex A-50 de la fraction CM1 :

La fraction CM1 issue de la chromatographie échangeuse de cations sur CM Sephadex C-50 est resoumise à une chromatographie échangeuse d'anions sur DEAE Sephadex A-50.

Le gel DEAE Sephadex A-50 préalablement gonflé dans un tampon AcNH_4 0,1 M, pH 8,5 est coulé dans une colonne Whatman ($1,6 \times 26$ cm). La fraction CM1 (50 UDO) est ensuite déposée à la surface du gel.

Après une première élution à l'équilibre avec le tampon AcNH_4 0,1 M, pH 8,5 ; un gradient d' AcNH_4 de 0,1 M à 0,5 M, pH 8,5 est appliqué. L'élution est ensuite poursuivie avec un tampon d' AcNH_4 2 M, pH 8,5. Le débit est de 12 ml/h.

Toutes les étapes d'élutions sont effectuées à 4°C et l'absorbance des éluats de la colonne est mesurée à 280 nm.

II.2.3.3 Chromatographie d'affinité :

La chromatographie d'affinité est basée sur les interactions entre un ligand, lié par covalence à un support inerte qui constitue la phase fixe, et son partenaire d'affinité en solution.

Le ligand lié à l'adsorbant peut être un inhibiteur puissant de la molécule à séparer. Celle-ci se fixe à son inhibiteur, alors que les autres protéines de l'échantillon sont éluées.

La fraction F3 issue de la chromatographie d'exclusion moléculaire du venin brut a été soumise à une purification par chromatographie d'affinité sur gel de Benzamidine Sepharose 6-B.

Le gel Sepharose 6-B est lié à une molécule la P-aminobenzamidine. Cette molécule est un inhibiteur puissant des enzymes douées d'une activité arginine-esterase.

La fraction F3 (150 UDO) est déposée à la surface du gel Sepharose 6-B coulé dans une colonne Pharmacia (1,6 × 7,6 cm). Ce gel est préalablement équilibré par un tampon Tris-HCl 0,05 M - KCl 0,5 M, pH 8.

Une première élution dans les conditions d'équilibre est réalisée pour éliminer les fractions non spécifiques. Elle est suivie par une élution avec un tampon Tris-HCl 0,05 M - KCl 0,5 M - BAEE 0,01 M, pH 8 qui permet d'éluer les protéines douées d'une activité arginine ester hydrolase.

Le débit est maintenu constant à 5 ml/h et la lecture de l'absorbance des éluats chromatographiques est effectuée à 280 nm.

II.2.4 Caractérisation des fractions hémorragiques du venin de *Vipera lebetina* par électrophorèse sur gel de polyacrylamide :

L'électrophorèse est une méthode d'analyse basée sur la migration différentielle de particules, chargées électriquement, sous l'influence d'un champ électrique.

En présence d'un agent dénaturant, le sulfate dodecyl de sodium (SDS), les protéines prennent une charge négative qui leur fait migrer vers l'anode. Leur séparation s'effectue ainsi en fonction de leur masse moléculaire.

Les échantillons (venin, fractions chromatographiques hémorragiques et marqueurs de poids moléculaires) sont dissous dans un tampon d'électrophorèse constitué par du Tris-HCl 10 mM contenant de l'EDTA 1 mM et du SDS 10 %, pH 8.

Après chauffage des échantillons à 100°C pendant 8 min, un volume de 1 µl de bleu de bromophénol est rajouté. Les échantillons sont ensuite déposés sur un gel de polyacrylamide à 12 %.

Après migration, le gel est mis dans une unité de développement où il subit différentes opérations.

- Un traitement par la glutaraldéhyde (8,3 %) pour fixer les protéines sur le gel, suivi par un lavage à l'eau distillée.

- La coloration des bandes protéiques est réalisée par le nitrate d'argent à 0,4 %.

- La révélation des bandes protéiques est réalisée par une solution de développeur (formaldéhyde 0,10 % dans le carbonate de sodium 12,5 %).

La conservation de la coloration se fait dans une solution d'acide acétique 10 % et de glycérol 10 %.

III. RESULTATS ET DISCUSSION :

III.1. Mise en évidence des activités enzymatiques et biologiques du venin de *Vipera lebetina* :

Afin d'évaluer et de caractériser les activités hémorragique, myonécrotique et oedématisante présentes dans le venin de *Vipera lebetina*, ainsi que les activités enzymatiques pouvant être en rapport avec la pathogénèse de ces effets, ce venin a été soumis à une série de tests biochimiques, macroscopiques et microscopiques.

III.1.1 Détermination de l'activité protéolytique :

Les venins des *Viperidae* contiennent diverses enzymes protéolytiques. Ces enzymes sont étroitement associées avec certains effets provoqués par les venins, notamment la perturbation du mécanisme de coagulation du sang et la formation de l'œdème (Willis et Tu., 1988 ; Braud et coll., 2000b).

L'activité protéolytique du venin de *Vipera lebetina* a été testée en utilisant une solution de caséine comme substrat. Les résultats obtenus montrent que ce venin est doué d'une activité caséinolytique.

La vitesse de cette réaction enzymatique déterminée en présence de concentrations croissantes du venin de *Vipera lebetina* révèle que cette activité est proportionnelle à la concentration de venin. Ce résultat indique que l'intensité de la réaction caséinolytique du venin de *Vipera lebetina* dépend de la quantité de molécules protéolytiques présentes dans ce venin (figure 8).

III.1.2 Détermination de l'activité amidolytique ou de type thrombine :

L'activité amidolytique du venin de *Vipera lebetina* a été déterminée par l'utilisation du substrat N_α-CBZ-L-Arginine-p-Nitroanilide-Hydrochloride. Ce substrat est un peptide de synthèse spécifique de l'activité de type thrombine.

L'hydrolyse de ce substrat chromogénique par les protéinases de type thrombine libère un produit, le paranitroanilide (PNA) de couleur jaune, qui est dosé à 405 nm. Les résultats obtenus révèlent que l'activité amidolytique augmente de manière linéaire avec la quantité de venin, montrant ainsi l'influence de la concentration des composants amidolytiques du venin de *Vipera lebetina* sur l'hydrolyse de ce substrat (figure 9).

III.1.3 Détermination de l'activité arginine-ester-hydrolase :

L'activité arginine-ester-hydrolase est fréquemment associée à la présence dans les venins de serpents d'enzymes de type thrombine et de kininogénases (Schwartz et Bieber., 1985 ; Silva et coll., 1985 ; Samel et coll., 1987 ; Shimokawa et Takahashi., 1995).

Figure 8 : Variation de l'activité caséinolytique en fonction de la concentration du venin de *Vipera lebetina*.

Figure 9 : Variation de l'activité amidolytique en fonction de la concentration du venin de *Vipera lebetina*.

La présence d'une activité estérasique dans le venin de *Vipera lebetina* a été déterminée en utilisant le N_α-Benzoyl-Arginine-Ethyl-Ester (BAEE) comme substrat. Les résultats obtenus indiquent que cette réaction augmente de manière proportionnelle avec la quantité d'enzymes estérasiques présentes dans le milieu réactionnel, montrant ainsi que l'activité estérasique du venin de *Vipera lebetina* dépend de la concentration de ce venin (figure 10).

III.1.4 Détermination de l'activité phospholipasique :

Les venins de serpents sont une des sources les plus riches en phospholipase de type A₂ (PLA₂). Ces enzymes sont douées de diverses activités biologiques, elles peuvent être neurotoxiques, myotoxiques, cardiotoxiques et cytotoxiques (Nicolas et coll., 1995 ; Valentin et coll., 1999 ; Perez et coll., 2001).

L'activité phospholipasique du venin de *Vipera lebetina* a été recherchée en utilisant comme substrat la lécithine du jaune d'œuf, selon la méthode d'hémolyse indirecte décrite par Césari et Boquet (1935) modifiée.

Les PLA₂ des venins de serpents exercent un effet cytolytique sur les globules rouges en affectant l'intégrité plasmique de ces cellules après hydrolyse des phospholipides (Balozet., 1957 ; Condrea et De vries., 1965).

Les résultats obtenus montrent que le venin de *Vipera lebetina* provoque une hémolyse des hématies de cheval en présence d'une solution de lécithine à 1 %.

III.1.5 Détermination de l'activité hémorragique

Une hémorragie sévère autour du site de morsure est la caractéristique de la plupart des envenimations vipérines (Soto et coll., 1988). L'hémorragie touche principalement les tissus cutanés et sous cutanés, mais elle peut être disséminée dans l'ensemble du corps de la victime (Mebs et Panholzer., 1982).

La recherche de l'activité hémorragique dans le venin de *Vipera lebetina* par la méthode macroscopique et semi-quantitative de Kondo et collaborateurs., (1960) modifiée par Ownby et collaborateurs., (1984) a montré que l'injection du venin brut, par voie sous cutanée, induisait l'apparition d'un spot hémorragique sur la surface interne de la peau dorsale des souris (figure 11).

La présence de ce spot révèle l'existence dans le venin de *Vipera lebetina* d'un ou de plusieurs facteurs doués d'un pouvoir hémorragique.

Les résultats obtenus indiquent également que le diamètre des lésions hémorragiques augmente progressivement avec les doses injectées de venin. Il apparaît ainsi qu'il existe une étroite relation entre la dose de venin et l'effet hémorragique produit. Cet effet dose – réponse est confirmé par le coefficient de corrélation égal à 0,98 (figures 12 et 13).

III.1.5.1 Détermination de la dose minimale hémorragique :

L'activité hémorragique est généralement caractérisée par une dose minimale hémorragique (DMH). La valeur de la DMH correspond à la dose de venin qui provoque l'apparition d'un spot hémorragique de 10 mm de diamètre (Kondo et coll., 1960 ; Ownby et coll., 1984).

Figure 10 : Variation de l'activité arginine ester hydrolase en fonction de concentration du venin de *Vipera lebetina*.

Figure 11 : Détermination de l'activité hémorragique du venin de *Vipera lebetina* en fonction de la dose de venin par le “ skin test ”.

Figure 13 : Variation de l'activité hémorragique en fonction du logarithme des doses de venin de *Vipera lebetina*.

La valeur de la DMH permet d'évaluer le pouvoir hémorragique d'un venin. En effet, le venin est considéré comme étant très hémorragique lorsque la valeur de sa DMH est très faible.

Dans le cas du venin de *Vipera lebetina*, les résultats obtenus permettent d'estimer une valeur de DMH égal à 0,2 µg. Cette valeur de DMH, comparée à celle d'autres espèces de *Viperidae*, montre que le venin de *Vipera lebetina* est doué d'une activité hémorragique très importante, en effet, les venins de certaines espèces de *Viperidae* présentent une valeur de DMH supérieure ou égale à 0,5 µg (tableau VI).

III.1.5.2 Neutralisation de l'activité hémorragique du venin de *Vipera lebetina* :

L'efficacité des sérums anti-venimeux est généralement évaluée en testant non seulement leur capacité à neutraliser l'effet léthal d'un venin, mais également leur capacité à neutraliser les autres effets biologiques, tels que les effets hypotensive, oedématisque, coagulant, myotoxique, néphrotoxique et hémorragique. L'effet hémorragique est considéré comme étant l'un des principaux facteurs de mortalité suite à une envenimation par morsures de serpents (Mebs et coll., 1988 ; Gutiérrez et coll., 1990b).

Afin de neutraliser l'effet hémorragique du venin de *Vipera lebetina*, différentes doses de venin ont été pré-incubées avec un immun-sérum dirigé contre les venins de *Vipera lebetina* et celui de *Cerastes cerastes*.

La neutralisation de cet effet hémorragique a été déterminée après une pré-incubation du venin, à différentes doses, avec l'anti-venin (V/V) pendant 30 min à 37°C et l'injection de ces mélanges à des souris, par voie sous cutanée, selon la méthode de Lomonte et coll., (1996).

Les résultats des essais de neutralisation obtenus montrent que l'immun-sérum anti-vipérin provoque une réduction du diamètre des lésions hémorragiques induites par les différentes doses de venin (figures 14 et 15).

III.1.5.3 Inhibition de l'activité hémorragique du venin de *Vipera lebetina*:

La majorité des molécules de venins douées d'une activité hémorragique ont été caractérisées comme étant des zinc-métallo-protéinases. Afin de caractériser cette activité dans le venin de *Vipera lebetina*, nous avons utilisé un agent chélateur de métal, l'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA), connu pour sa capacité à inhiber l'activité hémorragique et protéolytique des molécules hémorragiques des venins de serpents (Giroux et Lachmann., 1981 ; Bjarnason et Fox., 1988-89 ; Léon et coll., 1998). L'inhibition de l'activité hémorragique avec l'EDTA a été réalisée selon la technique de Huang et coll., (1984).

Dans un premier temps, l'EDTA à 10 mM a été incubé à 37°C pendant 15 min avec des doses croissantes de venin. L'hémorragie a été ensuite estimée par la mesure du diamètre de la lésion de la peau, 2 heures après l'injection du mélange venin-EDTA, selon la technique de Kondo et coll., (1960) modifiée par Ownby et coll., (1984).

Tableau VI : Comparaison de la valeur de la dose minimale hémorragique (DMH) du venin de *Vipera lebetina* avec les valeurs de DMH de venins d'autres *Viperidae*.

Espèces	Dose Minimale Hémorragique (DMH)	Références
<i>Vipera lebetina</i>	0,2 µg	Nos résultats
<i>Vipera berus</i>	3,2 µg	Caldéron et coll., (1993)
<i>Vipera palestinae</i>	2 µg	Ovadia (1978)
<i>Bothrops asper</i>	2 µg	Gutiérrez et coll., (1995a)
<i>Bothrops jararaca</i>	4,4 µg	Acosta de Pérez et coll., (1998)
<i>Bothrops jararacusu</i>	2,4 µg	Acosta de Pérez et coll., (1998)
<i>Bothrops neuwiedii</i>	1,5 µg	Acosta de Pérez et coll., (1998)
<i>Bothrops alternatus</i>	3,6 µg	Acosta de Pérez et coll., (1998)
<i>Bothrops godmani</i>	0,8 µg	Gutiérrez et Chaves (1980)
<i>Bothrops picadoi</i>	0,5 µg	Gutiérrez et Chaves (1980)
<i>Bothrops schlegelli</i>	1,8 µg	Gutiérrez et Chaves (1980)
<i>Bothrops lateralis</i>	2 µg	Gutiérrez et Chaves (1980)
<i>Bothrops nummifer</i>	4 µg	Gutiérrez et Chaves (1980)
<i>Bothrops nasutus</i>	5,1 µg	Gutiérrez et Chaves (1980)
<i>Bothrops ammodytoides</i>	200 µg	De Roodt et coll., (2000)
<i>Lachesis muta</i>	0,9 µg	Gutiérrez et Chaves (1980)

Figure 14 : Neutralisation de l'activité hémorragique induite par le venin de *Vipera lebetina*.

Figure 15 : Effet du sérum anti-vipérin sur l'activité hémorragique du venin de *Vipera lebetina*.

Les résultats obtenus montrent que l'EDTA à une concentration de 10 mM inhibe totalement l'activité hémorragique du venin aux doses de 5, 10 et 20 µg. Cette activité est réduite partiellement lorsque le venin est utilisé aux doses de 40, 80, 160 et 320 µg ou le taux de diminution est de l'ordre de 77,65 %, 54,27 %, 52,35 % et 51,65 % respectivement (figures 16a et 16b).

Dans une seconde étape, nous avons incubé le venin aux doses de 40, 80, 160 et 320 µg avec l'EDTA à une concentration de 20 mM pendant 15 min à 37°C. Nous avons recherché ensuite la présence d'une activité hémorragique 2 heures après l'injection de ce nouveau mélange.

Les résultats obtenus (figures 17 et 18) font apparaître que l'EDTA à 20 mM inhibe totalement l'activité hémorragique du venin à une dose de 40 µg et presque totalement celle de 80 µg (inhibition à 94,27 %). L'EDTA à 20 mM réduit également et de manière significative l'activité hémorragique du venin à une dose de 160 et 320 µg, avec un pourcentage d'inhibition de 77,59 % et de 58,27 % respectivement.

Ces résultats montrent que des concentrations croissantes en EDTA, ont un effet inhibiteur plus efficace sur l'activité hémorragique (figure 18).

III.1.6 Détermination de l'activité oedématisante du venin de *Vipera lebetina*:

L'œdème induit par une envenimation ophidienne se traduit par une élévation anormale des liquides interstitiels. Cet œdème est le résultat d'un accroissement de la perméabilité des capillaires sanguins.

L'œdème induit par les venins de serpents peut être localisé ou généralisé. Son extension vers le larynx et le pharynx peut entraîner une gêne respiratoire sévère, pouvant être fatale pour les victimes de l'envenimation.

L'activité oedématisante du venin de *Vipera lebetina* a été déterminée après une injection de venin à des doses croissantes, au niveau de la patte droite de la souris. La patte gauche de l'animal servira de témoin, elle recevra une injection de NaCl (9 ‰). Le pouvoir oedématisant de chaque dose de venin injectée est ensuite évaluée par comparaison du poids des deux pattes de la souris.

Les résultats expérimentaux montrent que chaque dose de venin provoque une augmentation du poids des pattes envenimées. Cette augmentation de poids indique la présence d'une activité oedématisante dans le venin de *Vipera lebetina*.

Les résultats obtenus montrent également, que cette activité oedématisante est proportionnelle à la dose de venin injectée ($r = 0,98$) (figure 19).

La dose minimale oedématisante (DME) définie comme étant la dose de venin qui provoque un œdème de 30 % a été estimée à 8 µg pour le venin de *Vipera lebetina*. Cette DME est approximativement 9 fois plus élevée que celle du venin de *Bothrops jararaca*, et est respectivement 5 fois, 4 fois et 2 fois plus élevée que celle des venins de *Bothrops jararacuse*, *Bothrops newiedii* et *Bothrops alternatus* (tableau VII).

Figure 16a : Inhibition de l'activité hémorragique du venin de *Vipera lebetina* par l'EDTA (10 mM).

Figure 16b : Effet de l'immun-sérum anti-vipérin et de l'EDTA sur l'activité hémorragique du venin de *Vipera lebetina*.

Figure 17: Effet inhibiteur de l'EDTA (20 mM) sur l'activité hémorragique du venin de *Vipera lebetina*.

Figure 18: Activité hémorragique du venin de *Vipera lebetina* et son inhibition par l'EDTA (10 et 20 mM).

Figure 19: Effet dose-réponse de l'activité oedématisante du venin de *Vipera lebetina*.

La valeur de DME du venin de *Vipera lebetina* est cependant inférieure à celle du venin de *Crotalus durissus durissus* et de *Crotalus durissus terrificus* (tableau VII) .

III.1.7 Détermination de l'activité myonécrotique du venin de *Vipera lebetina*:

La nécrose du tissu musculaire est souvent une conséquence caractéristique d'une morsure par les *Viperidae*. L'étendue de cette nécrose peut être très sévère et peut mener à des séquelles définitives (Homs-Brandeburgo et coll., 1988 ; Gowda et Middelbrook., 1993).

La myonécrose induite par le venin de *Vipera lebetina* a été évaluée par le dosage de la créatine kinase et par l'observation histologique du tissu musculaire, après une envenimation expérimentale de la souris.

III.1.7.1 Etude histologique du tissu musculaire:

L'analyse histopathologique du tissu musculaire de souris envenimées par le venin de *Vipera lebetina* a été réalisée après injection d'une dose de 100 µg de venin brut, par voie intramusculaire, au niveau de la patte de souris.

Un échantillon du muscle squelettique est ensuite prélevé à des intervalles de temps allant de 5, 15, 30 min, 1, 3 à 24 h après injection du venin.

Les souris témoins ont reçu une injection d'eau physiologique, par voie intramusculaire, au niveau de la patte.

Les échantillons musculaires prélevés ont été ensuite soumis à une série d'étapes de préparation pour la réalisation d'une étude histologique.

Les résultats obtenus après l'examen microscopique du tissu musculaire révèlent que l'hémorragie apparaît dès les premières minutes après l'envenimation. L'activité hémorragique est indiquée par la présence d'érythrocytes dans toutes les parties du tissu conjonctif.

A ce stade, les cellules musculaires présentent une morphologie normale avec des noyaux multiples disposés à la périphérie. A ce stade de l'envenimation, les cellules musculaires semblent s'écarter les unes des autres. Cet éloignement des cellules entre elles est très probablement le résultat de l'activité oedématisante présente dans le venin de *Vipera lebetina* (figure 21).

L'aspect du muscle squelettique 15 minutes après l'envenimation est caractérisé par une clarification du cytoplasme des cellules musculaires qui apparaissent pâles. Cette perte de l'affinité tinctoriale des cellules musculaires constitue la première altération morphologique visible du tissu musculaire après l'injection du venin de *Vipera lebetina* (figure 22).

L'observation du tissu musculaire 30 minutes après l'injection du venin révèle la présence d'une importante hémorragie dans les espaces interstitiels, la clarification d'un grand nombre de cellules, ainsi que l'apparition d'une désorganisation des myofibrilles de certaines cellules musculaires. Les myofibrilles de ces cellules forment des bandes transversales étroites séparées par des petits espaces dépourvus de myofilaments (figure 23).

TableauVII : Comparaison de la valeur de la dose minimale oedématisante (DME) du venin de *Vipera lebetina* avec les valeurs de DME de venins d'autres *Viperidae*.

Espèces	Dose Minimale Oedématisante (DME)	Références
<i>Vipera lebetina</i>	8 µg	Nos résultats
<i>Bothrops jararaca</i>	0,85 µg	Acosta de Pérez et coll., (1998)
<i>Bothrops jararacusu</i>	1,5 µg	Acosta de Pérez et coll., (1998)
<i>Bothrops neuwiedi</i>	2,05 µg	Acosta de Pérez et coll., (1998)
<i>Bothrops alternatus</i>	4,0 µg	Acosta de Pérez et coll., (1998)
<i>Crotalus durissus terrificus</i>	20,4 µg	Acosta de Pérez et coll., (1998)
<i>Crotalus durissus durissus</i>	11 µg	Lomonte (1985)
<i>Lachesis muta stenophrys</i>	5 µg	Lomonte (1985)

Figure 20 : Aspect histologique du tissu musculaire, en coupe transversale, des souris témoins.

Figure 21 : Aspect histologique du tissu musculaire, en coupe transversale, 5 min après l'injection du venin de *Vipera lebetina* (100 µg).

Figure 22 : Aspect histologique du tissu musculaire, en coupe transverse, 15 min après l'injection du venin de *Vipera lebetina* (100 µg).

Figure 23 : Aspect histologique du tissu musculaire, en coupe transverse, 30 min après l'injection du venin de *Vipera lebetina* (100 µg).

Une heure après l'injection du venin de *Vipera lebetina* l'altération du tissu musculaire apparaît plus importante. Cette altération se traduit par la présence de cellules musculaires pâles de tailles irrégulières. Certaines de ces cellules sont hypertrophiées, alors que d'autres sont atrophiées (figure 24a).

Les lésions nécrotiques sont également considérables pour certaines cellules, au niveau desquelles une perte progressive du matériel myofibrillaire est observée. Les myofibrilles de ces cellules se présentent sous un aspect filamenteux. Le contour de ces cellules musculaires reste cependant parfaitement délimité (figure 24a).

Une lyse débutante de certaines cellules est également observée à ce stade de l'envenimation (figure 24 a). Parallèlement à ces phénomènes, il apparaît au sein du tissu musculaire une importante région de nécrose de coagulation (figure 24b).

Une heure après l'envenimation, les noyaux des cellules musculaires ont totalement disparu, et l'infiltration hémorragique du tissu musculaire, à ce stade de l'envenimation, est toujours aussi importante. Les globules rouges sont massivement groupés en amas autour des cellules (figures 24a et 24b).

L'aspect microscopique des cellules musculaires 3 heures après l'injection du venin est caractérisé par la présence de cellules musculaires pâles ayant conservé des zones de myofibrilles non endommagées (figure 25a). D'autres cellules se caractérisent par une condensation de leurs myofibrilles. Ces dernières tendent à se détacher de la membrane plasmique. Ces cellules conservent leur membrane et un contour cellulaire parfaitement définie (figure 25b).

Trois heures après l'injection du venin, certaines cellules musculaires, paraissent totalement vides de tout matériel intracellulaire (figure 25c).

C'est également à partir de 3 heures que les signes de cytolyse des cellules musculaires se manifestent de manière plus importante, en effet de nombreuses cellules musculaires se fragmentent progressivement et leurs débris se dispersent dans le milieu environnant (figure 25d).

Au bout de 3 heures, l'hémorragie intramusculaire est toujours persistante (figures 25a, 25b, 25c et 25d).

L'observation du muscle squelettique de la souris, 24 heures après l'injection du venin de *Vipera lebetina*, montre une nécrose intense et étendue qui touche l'ensemble du muscle. Ce stade est, en effet, caractérisé par une extrême perturbation du tissu musculaire, avec une perte totale de la structure cellulaire et une infiltration massive des polynucléaires neutrophiles autour et à l'intérieur de la zone nécrosée (figure 26).

Figure 24 a: Aspect histologique du tissu musculaire, en coupe transversale, 1 h après l'injection du venin de *Vipera lebetina* (100 μ g).

Figure 24b: Aspect histologique du tissu musculaire, en coupe transversale, 1h après l'injection du venin de *Vipera lebetina* (100 μ g).

Figure 25 a: Aspect histologique du tissu musculaire, en coupe transversale, 3 h après l'injection du venin de *Vipera lebetina* (100 µg).

Figure 25b: Aspect histologique du tissu musculaire, en coupe transversale, 3 h après l'injection du venin de *Vipera lebetina* (100 µg).

Figure 25c: Aspect histologique en coupe transversale 3 h après l'injection du venin de *Vipera lebetina* (100µg).

Figure 25d: Aspect du tissu musculaire, en coupe transversale, 3h après l'injection du venin de *Vipera lebetina* (100µg).

Figure 26: Aspect du tissu musculaire, en coupe transverse, 24 h après l'injection du venin de *Vipera lebetina* (100 µg).

III.1.7.2 Dosage de la créatine kinase :

La nécrose d'un organe ou d'un tissu entraîne la libération dans le sang des molécules intracellulaires. Le dosage de ces molécules est généralement utilisé pour faire le diagnostic ou suivre l'évolution d'une pathologie (Kishida et coll., 1985 ; Gutiérrez et coll., 1986).

Le dosage de la créatine kinase (CK) dans le sang est très fréquemment utilisé pour mettre en évidence une lésion du muscle squelettique. Le dosage de cette enzyme est d'une importance considérable dans le cas des myopathies. (Kishida et coll., 1985 ; Gutiérrez et coll., 1995b).

L'activité de la CK sérique a été déterminée après injection d'une dose de 100 µg de venin brut de *Vipera lebetina*, au niveau de la patte de souris, par voie intramusculaire. Les souris témoins ont reçu une injection de NaCl (9 %).

Le dosage de la CK a été ensuite réalisé à des intervalles de temps de 5, 15 et 30 min, 1, 3 et 24 h après injection du venin.

Les résultats obtenus révèlent que le venin provoque une élévation du taux de CK dans le sang. Cette augmentation du taux sérique de l'activité CK est progressive, puisqu'elle débute au bout de 5 min après l'envenimation et continue à s'élever pour atteindre un maximum de 6 000 U/l au bout de 24 h après injection du venin de *Vipera lebetina* (figure 27).

III.2 Purification et caractérisation des hémorragines du venin de *Vipera lebetina* :

Afin d'isoler la ou les molécules du venin de *Vipera lebetina* douée (s) de propriété hémorragique, le venin brut a été soumis à un fractionnement par chromatographie d'exclusion moléculaire.

Chaque fraction obtenue au cours de cette étape a été testée pour son activité hémorragique. Les fractions qui se sont révélées capables d'induire une hémorragie ont été ensuite soumises à des étapes supplémentaires de purification par différentes techniques chromatographiques (figure 36).

Par ailleurs, Les fractions obtenus par les diverses méthodes de chromatographies ont été testées pour leurs activités hémorragique, protéolytique, amidolytique, estérasique, phospholipasique et pour leur activité myotoxique.

III.2.1 Fractionnement du venin de *Vipera lebetina* par chromatographie d'exclusion moléculaire :

Le fractionnement du venin de *Vipera lebetina* (1g) par chromatographie d'exclusion moléculaire sur Sephadex G-75, en utilisant un tampon d'élution d'AcNH₄ 0,1 M ; pH 8,5, a permis d'obtenir cinq fractions (figure 28).

Parmi ces cinq fractions, trois d'entre elles présentent une activité hémorragique (fractions GF2, GF3 et GF4) (figure 29). Le diamètre de la lésion hémorragique des fractions GF2, GF3 et GF4 mesurée selon la méthode de Kondo et coll., (1960) modifiée par Ownby et coll., (1984) est de 10,23, 2,82 et 0,84 cm respectivement. Ces résultats indiquent que

Figure 27 : Evolution du taux sérique de la créatine kinase après injection intramusculaire d'une dose de 100µg de venin de *Vipera lebetina*.

Figure 28 : Chromatographie d'exclusion moléculaire sur Sephadex G-75 du venin de *Vipera lebetina* (1g) utilisant une colonne pharmacia (5,5 x 50 cm) et un tampon d'élution d'Ac NH₄ 0,1 M, pH 8,5. Le débit est maintenu constant à 20 ml/l.

Figure 29 : Mise en évidence de l'activité hémorragique dans les fractions issues de la chromatographie d'exclusion moléculaire du venin de *Vipera lebetina*.

l'activité hémorragique du venin de *Vipera lebetina* semble être principalement associée à sa fraction GF2.

Quant au pouvoir hémorragique de la fraction GF4, qui apparaît sous la forme d'une tâche de faible intensité sur la peau des souris, il nous paraît être le résultat d'une contamination par la fraction GF3.

La caractérisation des activités enzymatiques des fractions GF1, GF2, GF3, GF4 et GF5 a révélé que toutes ces fractions sont douées d'une activité protéolytique, estérasique et d'une activité amidolytique de type thrombine.

L'activité phospholipasique de type A₂ n'a été cependant retrouvée que dans les fractions GF3 et GF4.

III.2.2 Purification des hémorragines du venin de *Vipera lebetina* par chromatographie échangeuse de cations sur CM Sephadex C-50 :

La fraction GF2 issue de la filtration moléculaire sur Sephadex G-75 du venin total et qui semble être la plus hémorragique a été soumise à une chromatographie échangeuse de cations sur CM Sephadex C-50.

Cette étape de purification a permis de séparer la fraction GF2 en deux sous fractions, appelées CM1 et CM2. La fraction CM1 a été éluée avec un tampon AcNH₄ 0,1 M ; pH 5, alors que la fraction CM2, plus basique, a été éluée à l'aide d'un tampon AcNH₄ 1 M ; pH 5 (figure 30).

Les fractions CM1 et CM2, soumises au " skin test ", se sont révélées douées d'une activité hémorragique avec un spot de 7,2 et 2,86 cm respectivement (figure 31). Il semblerait ainsi d'une part, que la fraction CM1 soit plus hémorragique que la fraction CM2, et d'autre part, que l'hémorragie induite par la fraction GF2 (diamètre du spot hémorragique égal à 10,23 cm) serait due à une action synergique des sous fractions CM1 et CM2.

Les fractions CM1 et CM2 sont également douées d'une activité protéolytique après hydrolyse du substrat caséine. Elles sont également capables d'hydrolyser le N_α-Benzoyl-Arginine-Ethyl-Ester (BAEE) et le substrat chromogène de la thrombine le N_α-CBZ_L-Arginine-p-Nitroanilide-Hydrochloride (CBZ). Ces fractions sont cependant dépourvues de toute propriété d'hémolyse indirecte.

III.2.3 Purification des hémorragines du venin de *Vipera lebetina* par chromatographie échangeuse d'anions sur DEAE Sephadex A-50 :

La fraction CM1 douée d'une activité hémorragique et obtenue après chromatographie échangeuse de cations sur CM Séphadex C-50 a fait l'objet d'une étape supplémentaire de purification par chromatographie échangeuse d'anions sur DEAE Sephadex A-50.

Cette étape chromatographique nous a permis d'obtenir deux autres sous fractions appelées respectivement CD1 et CD2 (figure 32). La fraction CD1 a été éluée avec le tampon AcNH₄ 0,1 M ; pH 8,5, tandis que la fraction CD2 n'a été éluée qu'avec un tampon AcNH₄ 2 M ; pH 8,5.

Figure 30: Chromatographie échangeuse de cations sur CM séphadex C-50 de la fraction GF2.

Figure 31: Mise en évidence de l'activité hémorragique dans les fractions CM1 et CM2 issues de la chromatographie échangeuse de cations sur Cm sephadex C-50 de la fraction GF2.

Figure 32: Chromatographie échangeuse d'anions sur DEAE Sephadex A-50 de la fraction CM1 (50 UDO).

Chacune de ces fractions a provoqué l'apparition d'une zone hémorragique, lorsqu'elle a été injectée, par voie sous cutanée, au niveau de la peau dorsale des souris, avec un diamètre égal à 2,33 cm pour la fraction CD1 et 1,56 cm pour la fraction CD2 (figure 33). D'après ces résultats, il semblerait que le pouvoir hémorragique de la fraction CM1 (diamètre du spot hémorragique égal à 7,2 cm) serait également le résultat de l'action combinée des sous fractions hémorragiques CD1 et CD2.

Ces fractions (CD1 et CD2) ont été caractérisées comme étant douées d'activités protéolytique, estérasique et amidolytique. Elles sont cependant dépourvues d'activité phospholipasique.

III.2.4 Purification des hémorragines du venin de *Vipera lebetina* par chromatographie d'affinité :

La fraction GF3 issue de la chromatographie d'exclusion moléculaire sur Sephadex G-75 du venin de *Vipera lebetina* et présentant une activité hémorragique a été soumise à une chromatographie d'affinité sur gel Benzamidine Sepharose 6-B.

Les résultats obtenus montrent un profil chromatographique avec un pic majoritaire correspondant à la fraction A1 (figure 34).

L'évaluation de l'activité hémorragique de cette fraction par le " skin test " a montré qu'elle induisait l'apparition d'un spot hémorragique de 1,85 cm de diamètre (figure 35).

La fraction A1 présente une activité protéolytique, amidolytique et estérasique. Cette fraction présente également une activité hémolytique à l'égard des hématies de cheval en présence d'une solution de jaune d'œuf, révélant ainsi l'existence d'une activité phospholipasique dans cette fraction.

III.2.5 Inhibition des fractions hémorragiques par l'EDTA :

Afin de mieux caractériser l'activité hémorragique du venin de *Vipera lebetina*, les fractions CD1, CD2, CM2 et A1 isolées à partir de ce venin ont été incubées avec l'EDTA (10 mM) pendant 15 min à 37°C. Après pré-incubation, les activités hémorragique, protéolytique, amidolytique et estérasique ont été recherchées dans ces fractions.

Les résultats obtenus révèlent que l'action hémorragique des fractions CD1, CD2, CM2 et A1 a été totalement inhibée en présence de 10 mM d'EDTA (figures 37, 38, 39).

Les résultats obtenus montrent, également, une inhibition partielle de l'activité protéolytique de ces fractions hémorragiques, tandis que l'activité amidolytique et estérasique de ces fractions reste inchangée.

Le pourcentage d'inhibition de l'activité protéolytique des fractions CD1, CD2, CM2 et A1 après traitement par l'EDTA est égal à 74,86 %, 77,65 %, 71,55 % et 70,87 % respectivement (figure 40).

Figure 33 : Mise en evidence de l'activité hémorragique des frcations CD1 et CD2 issues de la chromatogrpahie échangeuses d'anions sur DEAE Sephadex A-50 de la fraction CM2.

Figure 34 : Chromatographie d'affinité sur Benzamidine Sepharose 6-B de la fraction GF3 (150 UDO).

Figure 35 : Mise en évidence de l'activité hémorragique de la fraction A1 issue de la chromatographie d'affinité sur Benzamidine Sepharose 6-B de la fraction GF3.

Figure 36 : Schéma récapitulatif de la purification des molécules hémorragiques à partir du venin de *Vipera lebetina*.

Par ailleurs, nous avons noté une inhibition totale de l'activité hémolytique de la fraction A1 après incubation de cette fraction avec l'EDTA (10 mM). Ce résultat indique ainsi une inhibition de l'activité phospholipase A₂ par l'EDTA.

III.2.6 Restauration des activités inhibées par l'EDTA:

Dans cette étape, nous avons tenté de restaurer l'activité hémorragique et protéolytique des fractions CD1, CD2, CM2 et A1 inhibées par l'EDTA, ainsi que l'activité hémolytique de la fraction A1. Pour cela, ces différentes fractions ont été incubées avec l'EDTA (10 mM) pendant 15 min à 37°C, puis soumises à une dialyse pendant 24 h contre des solutions de ZnCl₂ (10 mM), de CaCl₂ (10 mM) et de ZnCl₂/ CaCl₂ (10 mM).

Les résultats de ces essais montrent que l'activité hémorragique provoquée par ces fractions ainsi que leur activité protéolytique n'ont pas été restaurées après dialyse prolongée contre les ions Zn⁺⁺ et Ca⁺⁺ (figures 37, 38, 39).

Ces activités n'ont pas été rétablies même lorsque le mélange fraction-EDTA est ajouté directement à des solutions de ZnCl₂ (10 mM), de CaCl₂ (10 mM) ou de ZnCl₂/ CaCl₂ (10 mM) et incubé pendant 24 h ou même lorsque la concentration de ces solutions a été augmentée à 100 mM et 1 M

La dialyse de la fraction A1, traitée par l'EDTA (10 mM), contre une solution de CaCl₂ (10 mM) a permis de restaurer l'activité phospholipasique de cette fraction, en effet, cette fraction a été capable de provoquer la lyse des hématies de cheval en présence de la lécithine de jaune d'œuf.

III.2.7 Activité myonécrotique des fractions hémorragiques du venin de *Vipera lebetina* :

L'activité myonécrotique des fractions hémorragiques CD1, CD2 et CM2 issues des chromatographies échangeuses d'ions, ainsi que la fraction A1 séparée par chromatographie d'affinité a été estimée par dosage de la créatine kinase sérique.

A cet effet, chacune de ces fractions (100 µg) a été injectée, par voie intramusculaire, à des souris. L'activité CK a été déterminée 3 h après l'injection.

Les résultats obtenus révèlent que parmi les quatre fractions hémorragiques, seules les fractions CM2 et A1 induisent une augmentation du taux de CK dans le sang (figure 41).

L'augmentation induite par la fraction A1 douée également d'une activité PLA₂ est respectivement 3 fois plus importante que celle provoquée par la fraction CM2 dépourvue d'une activité phospholipasique. Elle est 2 fois plus importante que celle provoquée par le venin total.

Ces résultats suggèrent d'une part que seules les fractions hémorragiques CM2 et A1 sont myotoxiques, et que cet effet myotoxique semble être principalement lié à la fraction A1.

Figure 37 : Inhibition et essai de restauratiion de l'activité hémorragique des frcations CD1 et CD2.

Figure 38 : Inhibition et essai de restauration de l'activité hémorragique de la fraction CM2.

Figure 39 : Inhibition et essai de restauration de l'activité hémorragique de la fraction A1.

Figure 40 : Activité protéolytique des fractions hémorragiques du venin de *Vipera lebetina* et son inhibition par l'EDTA (10 mM).

Figure 41 : Action des fractions hémorragiques isolées à partir du venin de *Vipera lebetina* sur le taux de créatine kinase séique.

III.2.8 Caractérisation protéique des fractions hémorragiques du venin de *Vipera lebetina* par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) :

La composition protéique du venin de *Vipera lebetina* et de ces fractions GF2, GF3, GF4 et GF5, ainsi que des sous fractions hémorragiques CD1, CD2, CM2 et A1 a été analysée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS.

L'analyse du venin de *Vipera lebetina* par SDS PAGE a permis de mettre en évidence la présence de 10 bandes protéiques ayant des masses moléculaires estimées à 11 000, 14 600, 19 952, 25 118, 39 810, 44 668, 67 000, 70 794, 80 432 et 100 000 Da (figure 42 et tableau VIII).

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide de la fraction GF2 (la plus hémorragique) et de la fraction GF3 permet de constater que la fraction GF2 est composée principalement de protéines de haut poids moléculaire (100 000, 80 432, 70 794, 67 000, 44 668 et 39 810 Da) alors que la fraction GF3 est plus hétérogène (67 000, 39 810, 25 118, 19 952 et 14 600 Da) (figure 42 et tableau VIII).

La fraction GF4 est composée de 2 bandes protéiques de 25 118 et 14 600 Da. Le profil électrophorétique de la fraction GF5 permet de révéler qu'elle est composée de 4 bandes protéiques de 67 000, 44 668, 25 118 et 19 952 Da (figure 42 et tableau VIII).

L'analyse électrophorétique des sous fractions hémorragiques CD1, CD2 et CM2 obtenues par chromatographies échangeuses d'ions de la fraction GF2 montre que la fraction CD1 est composée d'une protéine de 39 810 Da et d'une protéine de 67 000 Da (figure 43 et tableau VIII).

Les fractions CD2 et CM2 apparaissent chacune composée d'une seule bande protéique de 67 000 Da pour CD2 et 100 000 Da pour CM2 (figure 43).

Cinq protéines différentes ayant des poids moléculaires de 14 600, 19 952, 25 118, 39 810 et 67 000 Da sont retrouvées dans la fraction A1 issue de la chromatographie d'affinité de la fraction GF3 douées d'une activité phospholipasique (figure 44 et tableau VIII).

Figure 42 : Caractérisation protéique du venin de *Vipera lebetina* et des fractions issues de la chromatographie d'exclusion moléculaire sur Sephadex G-75 par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (12%) en présence de SDS.

Figure 43 : Caractérisation protéique des fractions hémorragiques du venin de *Vipera lebetina* par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (12%) en présence de SDS.

Figure 44 : Caractérisation protéique des fractions hémorragiques du venin de *Vipera lebetina* par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (12%) en présence de SDS.

Tableau VIII : Composition protéique du venin de *Vipera lebetina* et de ces fractions hémorragiques.

Venin brut	Fractions et sous-fractions hémorragiques					
	GF2	CD1	CD2	CM2	GF3	A1
11 000	-	-	-	-	-	-
<u>14 600</u>	-	-	-	-	<u>14 600</u>	<u>14 600</u>
19 952	-	-	-	-	19 952	19 952
25 118	-	-	-	-	25 118	25 118
39 810	39 810	39 810	-	-	39 810	39 810
44 668	44 668	-	-	-	-	-
67 000	67 000	67 000	67 000	-	67 000	67 000
70 794	70 794	-	-	-	-	-
80 432	80 432	-	-	-	-	-
100 000	100 000	-	-	100 000	-	-

- 39 810, 67 000 et 100 000 sont les bandes protéiques retrouvées dans toutes les fractions hémorragiques du venin de *Vipera lebetina*.
- 14 600 est la bande protéique retrouvée dans les fractions GF3 et A1 doués d'une activité phospholipasique.

III.3 Discussion :

La mise en évidence et l'évaluation de l'activité hémorragique, myonécrotique et oedématisante du venin de *Vipera lebetina* a permis de révéler la présence de ces trois activités dans le venin de *Vipera lebetina*.

Les résultats expérimentaux obtenus au cours de cette étude ont montré que le venin de *Vipera lebetina* est doué d'une importante activité hémorragique. Cette activité a été mise en évidence par un test macroscopique (skin test) et par une étude histologique du muscle squelettique.

L'étude macroscopique a montré que l'activité hémorragique est proportionnelle aux doses de venin injectées. La dose minimale hémorragique, définie comme étant la dose de venin qui induit l'apparition d'un spot hémorragique de 10 mm de diamètre, est estimée à 0,2 µg.

Cet effet dose – réponse de l'activité hémorragique du venin de *Vipera lebetina* a été observé avec d'autres venins, dont celui de *Vipera berus* (Lomonte et coll., 1996), de *Crotalus viridis viridis* (Ownby et coll., 1984), de *Bothrops alternatus*, *Bothrops neuwiedii*, *Bothrops jararaca* et *Bothrops jararacussu* (Acosta de pérez et coll., 1997), en effet, l'injection de ces venins provoque l'apparition d'un spot hémorragique dont le diamètre augmente proportionnellement avec la dose de venin.

L'activité hémorragique du venin de *Vipera lebetina* n'a été que partiellement neutralisée lorsqu'un mélange constitué de venin et d'anti-venin a été injecté à des souris.

Cette neutralisation partielle de l'activité hémorragique par un immun-sérum a été également décrite avec le venin de *Vipera berus* (Lomonte et coll., 1996), le venin de *Bothrops asper* (Gutiérrez et coll., 1981 ; Rucavado et Lomonte., 1996 ; Léon et coll., 1997), ainsi que le venin d'*Agkistrodon contortrix laticinctus* et de *Crotalus viridis viridis* (Evans et Ownby., 1999). Ces auteurs ont en effet constaté que le traitement de ces venins par des anti-venins polyvalents n'entraînait pas une disparition complète de l'hémorragie, mais plutôt une réduction partielle de cet effet.

Le résultat de la neutralisation de l'hémorragie provoquée par le venin de *Vipera lebetina* semble être, ainsi, en accord avec les résultats déjà obtenus par d'autres auteurs sur d'autres venins (Gutiérrez et coll., 1981 ; Nishioka et Silveira., 1992 ; Cardoso et coll., 1993 ; Rucavado et Lomonte., 1996 ; Léon et coll., 1997, 2000 ; Evans et Ownby., 1999). Ces derniers ont montré que la plupart des préparations d'immun-sérums polyvalents ne présentent qu'une activité neutralisante limitée non seulement vis à vis de l'activité hémorragique, mais aussi vis à vis de l'activité myotoxique et oedématisante des venins de serpents.

Il semblerait que la neutralisation partielle de ces effets par les anti-venins polyvalents, soit due à l'action très rapide des hémorragines, myotoxines et des composants du venin responsables de l'activité oedématisante (Gutiérrez et coll., 1984, 1987 ; Ownby et coll., 1986 ; Thwin et coll., 1988 ; Hati et coll., 1990 ; Léon et coll., 1999 ; Escalante et coll., 2000).

Cette incapacité des immun-sérums a neutralisé totalement l'effet hémorragique, myotoxique et oedématisant des venins a été également attribuée au fait que les molécules à l'origine de ces effets soient faiblement immunogènes et que la plupart des préparations d'immun-sérums ne contiendraient que très peu d'anticorps spécifiques de ces molécules (Ownby et coll., 1985 ; Gutiérrez et coll., 1986 ; Hati et coll., 1990 ; Rucavado et Lomonte., 1996 ; Nkinin et coll., 1997).

La neutralisation de l'ensemble des effets du venin brut nécessiterait l'utilisation des sérums anti-venimeux polyvalents associés à des immun-sérums dirigés contre les hémorragines et/ou les myotoxines. Ces immun-sérums spécifiques de certaines molécules actives du venin permettraient de potentialiser l'efficacité des immun-sérums polyvalents déjà existants (Ownby et coll., 1985 ; Li et Ownby., 1992 ; Lizano et coll., 1997).

Par ailleurs, les résultats obtenus après inhibition de l'activité hémorragique du venin brut de *Vipera lebetina* avec l'EDTA montre que cet effet est totalement inhibé par ce chélateur lorsque le venin est utilisé à faible dose. Les résultats montrent également que l'EDTA réduit partiellement l'activité hémorragique lorsque le venin est utilisé à forte dose.

Ces résultats indiquent que l'inhibition de l'hémorragie par l'EDTA est dose-dépendante, et que les ions divalents, très probablement les ions Zn^{++} et Ca^{++} jouent un rôle primordial dans l'expression de l'activité hémorragique du venin de *Vipera lebetina*, en effet, la plupart des facteurs hémorragiques décrit à ce jour contiennent essentiellement un ion Zn^{++} . Ces molécules peuvent contenir également un ion Ca^{++} .

L'étude des activités enzymatiques du venin de *Vipera lebetina* réalisée parallèlement à l'étude des activités biologiques, a révélé que ce venin est capable d'hydrolyser un substrat de type caséine, un substrat synthétique de type BAEE ainsi que le substrat chromogène spécifique de la thrombine. Le venin de *Vipera lebetina* possède, également, une activité d'hémolyse indirecte en présence de lécithine.

Ces résultats montrent que le venin de *Vipera lebetina* est constitué de molécules douées d'activités protéolytique, phospholipasique, d'activité coagulante de type thrombine ainsi que d'une activité arginine-ester-hydrolase.

Il semblerait, également, que ces activités enzymatiques soient influencées par la concentration du venin de *Vipera lebetina*. En effet, lorsque des concentrations croissantes de venin sont incubées avec une concentration fixe de substrat, la vitesse de la réaction enzymatique pour chacune de ces activités augmente avec la concentration de venin utilisée.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de la mise en évidence macroscopique de l'activité hémorragique du venin de *Vipera lebetina* ainsi que des autres activités enzymatiques ont permis de montrer qu'il existe une corrélation entre la dose de venin et les effets hémorragique protéolytique, amidolytique et estérasique provoqués par ce dernier.

L'étude histologique a permis non seulement de mettre en évidence l'effet hémorragique du venin de *Vipera lebetina*, mais également de rechercher et d'évaluer l'activité myonécrotique de ce venin. Ainsi, l'observation du tissu musculaire de souris ayant reçu une dose de 100 µg de venin brut a montré qu'une hémorragie apparaît massivement au niveau de ce tissu dans les premières minutes qui suivent l'injection du venin. L'hémorragie est en effet visible dans les espaces interstitiels du tissu musculaire dès 5 minutes après l'injection.

Cette manifestation rapide de l'hémorragie au sein du tissu musculaire après l'injection du venin de *Vipera lebetina* a été également remarquée avec le venin de *Bothrops jararaca* (Queiroz et coll., 1985), de *Crotalus atrox*, de *Crotalus viridis viridis* (Ownby et Colberg., 1988), d'*Agkistrodon bilineatus bilineatus* (Ownby et coll., 1990), de *Bothrops asper* (Chaves et coll., 1992) et de *Crotalus adamanteus* (Anderson et Ownby., 1997) où la présence massive d'érythrocytes au niveau du tissu musculaire a été constatée quelque minutes après l'injection de ces venins à des souris.

Ce résultat révèle que la première action du venin de *Vipera lebetina* se situe au niveau des capillaires sanguins, en effet, l'hémorragie est le premier changement observé au sein du tissu musculaire après l'envenimation. Aucune modification dans l'aspect des cellules musculaires n'est observée à ce stade de l'envenimation. Cette action des hémorragines contenues dans le venin de *Vipera lebetina* sur les capillaires apparaît être extrêmement rapide.

Selon Lomonte et collaborateurs (1994c), une apparition rapide et explosive des érythrocytes dans l'espace extravasculaire, après injection du venin, suggérerait que la fuite des érythrocytes s'est produite à travers les cellules endothéliales endommagées, et non pas par érythrodiapédèse.

Au vu des résultats obtenus, il semblerait que l'hémorragie induite par le venin de *Vipera lebetina* soit le résultat d'une lyse des cellules endothéliales. Cependant une dégradation protéolytique des composants de la lame basale pourrait également être un mécanisme par lequel l'hémorragie peut se produire.

Après 15 minutes de l'envenimation expérimentale avec le venin de *Vipera lebetina*, il apparaît une série d'altérations morphologiques au niveau des fibres musculaires. Ces altérations évoluent au bout de 24 heures vers une nécrose cellulaire, avec destruction totale du tissu musculaire et une infiltration massive des polynucléaires neutrophiles.

Le premier changement des cellules musculaires observées est une clarification du cytoplasme de ces cellules. Ce phénomène est ensuite suivi par une succession de modifications des cellules musculaires. Il s'agit d'une agrégation des myofibrilles, d'un gonflement ou une atrophie des cellules et d'une altération des structures myofibrillaires. Une nécrose de coagulation, où la plupart des contours cellulaires restent encore discernables est également observée.

Après une envenimation de 24 heures, le tissu musculaire apparaît totalement nécrosée avec disparition de l'architecture musculaire.

Les polynucléaires neutrophiles présents abondamment dans le tissu à ce stade auraient un rôle dans la dégradation des protéines myofibrillaires des cellules musculaires nécrosées (Gutiérrez et coll., 1986; 1990a ; Lomonte et coll., 1993).

Des lésions histopathologiques analogues à celles observées avec le venin de *Vipera lebetina* ont été décrites avec un certain nombre d'autres venins, notamment les venins de *Micrurus nigrocinctus nigrocinctus*, de *Micrurus carinicauda*, de *Micrurus frontalis*, de *Bothrops asper* et de *Lachesis muta muta* après une envenimation des souris. Il apparaît au niveau du tissu musculaire une désorganisation du matériel myofibrillaire et des cellules musculaires nécrosées. Après 24 heures d'envenimation une infiltration des polynucléaires neutrophiles est également observée (Gutiérrez et coll., 1980,1983 ; Chaves et coll., 1992 ; Rucavado et coll., 1995,1999 ; Fuly et coll., 2000).

En outre, dans le cas des venins de *Bothrops jararacussu* et de *Notechis scutatus* d'autres modifications tissulaires apparaissent, notamment une condensation du matériel myofibrillaire, une nécrose de coagulation, la présence de zones de myofibrilles non endommagées. A partir de 24 heures d'envenimation une lyse des cellules musculaires est également constatée (Queiroz et coll., 1984 ; Preston et coll., 1990).

Les résultats de l'étude histologique du tissu musculaire, après une envenimation expérimentale de la souris avec le venin de *Vipera lebetina* révèlent que ce venin présente une activité myotoxique. Cette activité est due à l'action de myotoxines présentes dans ce venin et non aux conditions ischémiques induites par la perturbation de l'intégrité capillaire provoquée par les hémorragies présentes dans ce venin.

En effet, dans le cas du venin de *Crotalus viridis viridis* (Gleason et coll., 1983) et de *Vipera aspis aspis* (Komori et Sugihara., 1988) où l'hémorragie induite par ces venins est précoce, les dommages des cellules musculaires n'apparaissent que 12 heures après l'injection du venin de *Crotalus viridis viridis* et 48 heures après l'injection du venin de *Vipera aspis aspis*.

Selon ces auteurs, l'effet myonécrotique de ces venins serait le résultat des conditions ischémiques provoquées par leur activité hémorragique. En effet, les conditions ischémiques apparaissent généralement 12 heures après une perturbation de l'irrigation sanguine d'un tissu (Ownby et coll., 1990).

Contrairement à ces venins, le venin de *Vipera lebetina* semble avoir un effet direct sur les cellules musculaires. En effet, les premiers changements du tissu musculaire débute 15 min après l'injection du venin et donc bien avant l'installation des conditions ischémiques.

La présence d'une activité myonécrotique dans le venin de *Vipera lebetina* a également été confirmée par le dosage de la créatine kinase (CK). En effet, lors de l'envenimation expérimentale de la souris, le dosage de la CK a révélé que le venin provoque une fuite de cette enzyme à partir du muscle squelettique vers le sang.

Cette élévation de l'activité de la CK, dans le sang, débute 5 minutes après l'injection du venin bien avant l'apparition d'une cytolysse des cellules musculaires. Ces résultats suggèrent qu'une modification de la perméabilité membranaire serait à l'origine de la fuite, à partir des cellules musculaires de la CK.

Les résultats obtenus révèlent également qu'il existe une bonne corrélation entre l'élévation du taux de CK dans le sang et les perturbations du tissu musculaire.

D'autres résultats obtenus, au cours de cette étude, ont permis de montrer que le venin de *Vipera lebetina* est également doué d'une activité oedématisante. Cette activité est dose-dépendante avec une dose minimale oedématisante (DME) estimée à 8 µg.

Il est assez difficile, à ce stade de nos résultats, d'attribuer l'activité oedématisante du venin de *Vipera lebetina* à un composé particulier du venin. En effet, l'œdème a des origines multiples. L'activité oedématisante peut être, en effet, le résultat de l'action de la phospholipase A₂, des molécules hémorragiques, myotoxiques, et protéasiques. Or, le venin de *Vipera lebetina* est caractérisé par la présence à la fois de toutes ces activités. L'œdème induit donc par ce venin, peut être une conséquence de l'action synergique de ces molécules.

L'étude macroscopique et microscopique ayant permis de montrer la présence dans le venin de *Vipera lebetina* de molécules douées d'une activité hémorragique, ce venin a été soumis à différentes méthodes chromatographiques (gel filtration, échangeuse d'ions et affinité) afin d'isoler les molécules responsables de cet effet.

Dans les différentes tentatives de purification, il nous a été donné de constater que l'activité hémorragique, du venin de *Vipera lebetina*, se retrouvait dans les différentes fractions hémorragiques éluées par les différentes techniques chromatographiques.

En effet, en soumettant le venin total à une chromatographie d'exclusion moléculaire, l'activité hémorragique a été retrouvée principalement dans les fractions GF2 et GF3.

Lorsque la fraction GF2 a été soumise à une chromatographie échangeuse de cations, l'activité hémorragique de cette fraction a été retrouvée dans les sous fractions CM1 et CM2. Par ailleurs, en soumettant la fraction CM1 à une chromatographie échangeuse d'anions, l'activité hémorragique a été retrouvée au niveau des deux sous-fractions issues de cette chromatographie (fractions CD1 et CD2).

Des résultats similaires, où l'activité hémorragique d'un venin se retrouvait répartie entre les différentes sous fractions obtenus après purification, ont été décrits avec le venin de *Vipera palestinae* (Ovadia., 1978), de *Bitis arietans* (Mebs et Panholzer., 1982), d'*Agkistrodon acutus* (Xu et coll., 1981 ; Mori et coll., 1984), de *Bothrops insularis* (Selistre et coll., 1990), de *Bothrops jararaca* (Assakura et coll., 1986 ; Mandelbaum et Assakura., 1988) et de *Crotalus atrox* (Bjarnason et Fox., 1994). Ces résultats indiquent généralement, la présence dans ces venins de plusieurs composants hémorragiques.

Les résultats obtenus, au cours des étapes de purification, tendent à montrer la présence dans le venin de *Vipera lebetina* de trois molécules douées d'activité hémorragique.

La présence de plusieurs hémorragines, dans un venin, n'est pas surprenante, puisque leur nombre peut varier de un à plusieurs, c'est le cas du venin d'*Agkistrodon bilineatus* qui contient une hémorragine (bilitoxine), des venins de *Bothrops jararaca*, de *Lachesis muta muta*, de *Bitis arietans*, de *Bitis gabonica* qui contiennent deux molécules hémorragiques (Queiroz et coll., 1985 ; Mandelbaum et coll., 1989 ; Maruyama et coll., 1993 ; Yamakawa et coll., 1995), de *Bothrops asper* qui contient 4 hémorragines (Gutiérrez et coll., 1995b) et d'*Agkistrodon acutus* qui contient 6 toxines hémorragiques (Xu et coll., 1981 ; Hati et coll., 1999).

La caractérisation des activités biologiques et enzymatiques des fractions hémorragiques du venin de *Vipera lebetina* révèle que ces fractions ne sont pas douées d'un pouvoir hémorragique équivalent. La fraction GF2 étant plus hémorragique que la fraction GF3, la fraction CM1 plus hémorragique que la fraction CM2, et enfin la fraction CD1 plus hémorragique que la fraction CD2.

Ce résultat a également été observé avec les toxines hémorragiques BaH1, BaH2 et BaH3 isolées du venin de *Bothrops asper*. Les toxines BaH2 et BaH3 sont chacune faiblement hémorragique, alors que la toxine BaH1 est douée d'un important pouvoir hémorragique (Borkow et coll., 1995 ; Hati et coll., 1999).

Dans notre cas, il semblerait que chacune des fractions hémorragiques du venin de *Vipera lebetina* interviennent seule pour provoquer l'effet hémorragique. Leur action synergique serait à l'origine de l'activité hémorragique globale du venin de *Vipera lebetina*.

Les fractions hémorragiques GF2, CD1, CD2, CM2, GF3 et A1 présentent des activités protéolytique, estérasique et amidolytique. L'activité phospholipasique n'a été détectée qu'au niveau des fractions GF3 et A1.

L'activité hémorragique des sous fractions CD1, CD2, CM2 et A1 a été totalement inhibée par l'EDTA et n'a pas été rétablie après incubation avec le $ZnCl_2$ et le $CaCl_2$. Cet effet inhibiteur de l'EDTA sur les molécules des venins de serpents douées d'une activité hémorragique a également été observé avec les fractions hémorragiques NHFa et NHFb du venin de *Bothrops neuwiedii* (Mandelbaum et coll., 1984), des fractions hémorragiques jararafibrase III et IV du venin de *Bothrops jararaca* (Maruyama et coll., 1993), de la fraction hémorragique isolée à partir du venin de *Crotalus viridis viridis* (Komori et coll., 1994), des fractions Hta et Htb du venin de *Bitis gabonica* (Marsh et coll., 1995), et des fractions hémorragiques isolées à partir des venins de *Trimeresurus mucrosquamatus* et *Trimeresurus gramineus* (Huang et coll., 1984, 1995).

Par ailleurs, le résultat obtenu lors de l'essai de restauration de l'activité hémorragique des fractions CD1, CD2, CM2 et A1 par dialyse contre des solutions de $ZnCl_2$ et de $CaCl_2$ est similaire à celui obtenu par Kurecki et Kress (1985), Ovadia (1987) et Civello et coll., (1983) qui ont tenter de restaurer l'activité hémorragique de la protéinase H du venin de *Crotalus adamanteus*, de l'hémorragine atractaspis du venin d' *Atractaspis engaddensis* et de la protéinase hémorragique du venin de *Crotalus horridus horridus* respectivement après traitement par l'EDTA. Ces auteurs ont constaté que l'activité hémorragique de ces protéinases n'a pas été restaurée après dialyse contre les ions Zn^{++} et Ca^{++} .

Ces résultats suggèrent ainsi que l'inhibition de l'activité hémorragique par l'EDTA est irréversible.

Les ions métalliques associés aux protéines jouent un rôle important dans la liaison des protéines avec le substrat, dans la catalyse enzymatique, dans le repliement et la stabilité des protéines, mais également dans les interactions protéines-protéines (Higaki et coll., 1992).

Certains facteurs hémorragiques sont caractérisés par la présence d'ion zinc uniquement, comme c'est le cas de l'hannahtoxine du venin de *Ophiophagus hannah* (Huang et coll., 1984

; Tan et Saifuddin., 1990). D'autres contiennent à la fois les ions Zn^{++} et Ca^{++} comme la mucrotoxine A du venin de *Trimeresurus mucrosquamatus* (Civello et coll., 1983 ; Sugihara et coll., 1983).

Selon Assakura et collaborateurs., (1985) la suppression de ces cations par les agents chélateurs de métaux tels que l'EDTA, résulte dans la formation d'un complexe enzyme-EDTA qui provoquerait un changement conformationnel et une dénaturation de l'enzyme.

Il apparaît, ainsi, que les ions Zn^{++} et Ca^{++} sont indispensables à l'activité hémorragique, non seulement, en tant que cofacteur, mais également interviendraient dans la stabilité et la cohésion structurale des toxines hémorragiques.

L'activité protéolytique des fractions hémorragiques du venin de *Vipera lebetina* a été inhibée par l'EDTA, avec un pourcentage d'inhibition de 74,86 %, 77,65 %, 71,55 % et 70,87 % pour les fractions CD1, CD2, CM2 et A1 respectivement. Ces fractions conservent, cependant, leur activité ésterasique et amidolytique. En effet, l'EDTA ne semble avoir aucun effet d'inhibition sur ces activités.

Ces résultats indiquent que les fractions CD1, CD2, CM2 et A1 sont des métallo-protéinases hémorragiques, puisque leur activité hémorragique et protéolytique ont été inhibées par l'EDTA.

Ces résultats révèlent, également, que les activités ésterasique et amidolytique ne semblent pas être associées à la présence d'ions métalliques comme c'est le cas pour l'activité hémorragique. Il est probable que ces activités soient plutôt associées à des sérine-protéinases présentes dans les fractions CD1, CD2, CM2 et A1, en effet, les activités de type thrombine et ésterasique sont généralement due à l'action des sérine-protéinases contenues dans les venins de serpents.

Il semble ainsi, que l'activité protéolytique des fractions hémorragiques, qui n'a pas été totalement inhibées par l'EDTA et qui est de l'ordre de 25,14 % pour la fraction CD1, 22,35 % pour CD2, 28,45 % pour CM2 et 29,13 % pour A1, n'est autre que le résultat de l'activité arginine ester hydrolase et amidolytique de sérine-protéinases qui contaminent encore les fractions hémorragiques du venin de *Vipera lebetina*.

L'activité phospholipasique présente dans la fraction A1, n'a pas été inhibée de manière irréversible par l'EDTA. En effet, cette activité a été inhibée après traitement par l'EDTA, mais a été restaurée, immédiatement, après dialyse contre le $CaCl_2$.

Un résultat similaire a été obtenu avec la PLA_2 du venin de *Notechis scutatus scutatus* (Harris et Mac Donnel., 1981), de *Naja naja atra* et *Naja naja nigricollis* (Yates et coll., 1990), de *Pseudechis australis* (Nishida et coll., 1985), d'*Oxyruranus scutellatus scutellatus* et de *Bungarus multicinctus* (Durkin et coll., 1981). Ces résultats suggèrent que l'inhibition de l'activité PLA_2 par l'EDTA n'est pas irréversible comme dans le cas des hémorragines du venin de *Vipera lebetina*.

L'injection des fractions hémorragiques CD1, CD2, CM2 et A1 du venin de *Vipera lebetina* à des souris, suivie du dosage de la créatine kinase (CK) dans le sang, révèle que la fraction A1 doué d'une activité phospholipasique entraîne une élévation importante du taux

sérique de CK, alors que les fractions hémorragiques, CD1 et CD2, ne semblent avoir aucun effet. La fraction CM2 apparaît être douée d'une activité myotoxique moins importante, que celle induite par la fraction A1.

Ce résultat obtenu avec le venin de *Vipera lebetina* est similaire à celui obtenu avec les venins de *Bothrops insularis* (Selistre et coll., 1990) et d'*Agkistrodon bilineatus bilineatus* (Ownby et coll., 1990). En effet, le venin de *Bothrops insularis* est caractérisé par la présence d'une activité hémorragique et myonécrotique. Les fractions hémorragiques de ce venin (SIII-SpIII3, SIII-SpIII4 et SIII-SpIII5) sont dépourvues d'activité phospholipasique et d'activité myotoxique, alors que la fraction SIII-SpVI est phospholipasique et myotoxique. Le venin d'*Agkistrodon bilineatus bilineatus* est caractérisé par la présence d'une molécule hémorragique et myonécrotique appelée bilitoxine. Cette molécule ressemble de ce fait à la fraction CM2 du venin de *Vipera lebetina* qui semble douée à la fois des deux activités hémorragique et myonécrotique.

Les résultats obtenus montrent que l'activité myonécrotique, du venin de *Vipera lebetina*, serait essentiellement et très probablement due à son activité phospholipasique.

L'analyse électrophorétique du venin de *Vipera lebetina*, ainsi que de ses fractions hémorragiques, a révélé la présence de bandes protéiques communes entre les fractions GF2 et GF3, issues de la filtration moléculaire du venin brut, (39 810 et 67 000 Da), entre la fraction GF2 et ses sous fractions hémorragiques CD1, CD2 et CM2, issues des chromatographies échangeuses d'ions, (39 810, 67 000 et 100 000 Da), ainsi qu'entre la fraction GF3 et A1 issue de la chromatographie d'affinité (14 600, 39 810 et 67 000 Da). Il semble, ainsi, que l'activité hémorragique retrouvée dans les fractions GF2 et GF3, puis dans les sous fractions CD1, CD2, CM2 et A1 soit due à la présence de trois métallo-protéases ayant des masses moléculaires de 39 810, 67 000 et 100 000 Da.

Ces protéines appartiendraient selon la classification de Bjarnason et Fox (1994) et Hati et collaborateurs (1999) à la classe II, III et IV des hémorragines respectivement.

L'activité hémolytique, des fractions GF3 et A1, semble être liée à la présence de la protéine de 14 600 Da dans ces fractions et qui semble être responsable de l'activité phospholipasique et myonécrotique du venin de *Vipera lebetina*.

Conclusion :

L'étude préliminaire que nous avons menée sur le venin de *Vipera lebetina* et portant sur les activités hémostatique, myonécrotique et oedématisante a permis de montrer que :

- Le venin de *Vipera lebetina* est doué d'une activité hémostatique dose-dépendante avec une dose minimale hémostatique de 0,2 µg. Cette activité hémostatique a été partiellement neutralisée par un immun-sérum anti-vipérin et totalement inhibée par l'EDTA.

- L'hémorragie apparaît massivement au niveau du tissu musculaire dans les minutes qui suivent l'injection du venin, indiquant ainsi l'action très rapide des molécules hémostatiques du venin de *Vipera lebetina* sur les capillaires sanguins. Cette activité hémostatique semble être le résultat d'une lyse des cellules endothéliales des capillaires sanguins.

- L'analyse des fractions hémostatiques du venin de *Vipera lebetina* par électrophorèse sur gel de polyacrylamide montre que cet effet hémostatique semble être essentiellement lié à la présence de trois métallo-protéases ayant des masses moléculaires de 39 810, 67 000 et 100 000 Da. Cependant, bien que l'électrophorèse tend à montrer que ces molécules soient pures, les tests enzymatiques révèlent que ces fractions semblent encore contaminées par des protéases de type thrombine et trypsine. Ces protéases seraient responsables des activités estérasique et amidolytique encore présentes dans les fractions hémostatiques du venin de *Vipera lebetina*.

- Le venin de *Vipera lebetina* est également doué d'une activité oedématisante qui est proportionnelle aux doses de venin. La dose minimale oedématisante a été estimée à 8 µg.

- Le venin de *Vipera lebetina* est aussi doué d'une activité myonécrotique. En effet ce venin provoque des perturbations drastiques du tissu musculaire. Ces perturbations débutent 15 minutes après l'envenimation et évoluent au bout de 24 heures vers une myolyse du tissu musculaire. Cette activité myonécrotique a également été mise en évidence par le dosage de la créatine kinase sérique (CK).

Parmi les fractions hémostatiques isolées à partir du venin de *Vipera lebetina*, seule la fraction hémostatique de 100 000 Da et la fraction douée d'une activité phospholipasique de 14 600 Da induisent une libération de CK dans le sang. Par ailleurs, parmi ces deux fractions seule la fraction phospholipasique provoque une élévation importante du taux de CK sérique. Il semble ainsi que l'effet myonécrotique du venin de *Vipera lebetina* soit principalement le résultat d'une activité phospholipasique présente dans ce venin.

Perspectives :

Le travail que nous avons effectué a porté essentiellement sur la mise en évidence, l'évaluation et la caractérisation des effets hémorragique, myonécrotique et oedématisant du venin de *Vipera lebetina*. Il ouvre la voie à plusieurs perspectives qui contribueront à une meilleure compréhension et neutralisation des effets physiopathologiques observés lors d'une envenimation vipérine. Il serait ainsi intéressant de :

- Vérifier l'homogénéité des trois métallo-protéinases hémorragiques du venin de *Vipera lebetina* par d'autres techniques de purification, notamment par HPLC.

- Caractériser ces molécules après leur purification (détermination du pHi, de la structure primaire et identification des cations divalents présents dans ces molécules).

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

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

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

 - * Réalisant une étude, en microscopie électronique, du muscle squelettique après injection de chacune de ces molécules hémorragiques purifiées à des souris.

- Produire des anticorps spécifiques de ces hémorragines et de tester la capacité de l'immun-sérum produit à l'égard de l'effet hémorragique du venin de *Vipera lebetina*.

- D'identifier et de caractériser le ou les composants du venin responsable de son activité oedématisante.

- Caractériser la molécule hémorragique et la molécule phospholipasique du venin de *Vipera lebetina* qui semblent être responsables de l'activité myonécrotique de ce venin (recherché la présence éventuelle des séquences cationique et hydrophobe au niveau de ces molécules).

Conclusion générale :

Bien qu'au cours des dernières années, un très grand nombre de médicaments aient été découverts, beaucoup de maladies attendent encore un traitement adéquat. Les besoins en molécules nouvelles sont donc ressentis de manière impérieuse.

Il est tentant dès lors de se tourner vers de nouvelles sources naturelles, en vue d'obtenir des molécules originales, susceptibles de présenter des propriétés physiologiques intéressantes.

Les venins de serpents constituent une source potentielle énorme de composés naturels nouveaux. La grande diversité et la haute spécificité des constituants du venin en font des outils de travail très recherchés, non seulement pour l'étude des mécanismes biochimiques cellulaires, mais également comme agent thérapeutique.

Malgré la complexité des venins qui rend difficile l'étude de leurs compositions et de leurs propriétés, de nombreuses recherches ont déjà conduit à la découverte de substances remarquables, tant par leur structure que par leurs activités pharmacologiques.

La purification et la compréhension du mécanisme d'action des composants du venin permettraient d'améliorer la sérothérapie anti-venimeuse, qui reste à l'heure actuelle, le seul traitement spécifique des envenimations. Ces substances pourraient servir, également, de modèles pour la synthèse de molécules nouvelles, à usage thérapeutique, plus actives et plus spécifiques. Ainsi La mise en évidence de molécules hémorragiques et myonécrotiques dans les venins de serpents et leur caractérisation ouvre la voie à leur futur utilisation dans le traitement et la prévention de certaines maladies, notamment les maladies thromboemboliques.

Un champ de recherche très vaste s'ouvre ainsi aux hommes et des espoirs immenses sont permis grâce ces venins.

Bibliographie :

1. **Acosta de Pérez, O.C., Tiebler, P., Koscinczuk, P., Negerette, M.S., Trulls, H et Marunak, S. (1996)** Edema y mionecrosis inducidos por veneno de *Bothrops jararaca* de Argentina en ratones. *APPTLA* **46**: 233-238.
2. **Acosta de Pérez, O.C., Marunak, S., Ruiz, R., Koscinczuk, P et Teibler, P. (1997)** Hemorragia inducida por venenos de serpientes de Argentina. *APPTLA* **47**: 221-224
3. **Acosta de Pérez, O.C., Koscinczuk, P., Teibler, P., Negerette, M.S., Ruiz, R., Marunak, S et Bogarin, G. (1998)** Hemorrhagic and edema-forming activity and histological changes in the mouse footpad induced by venoms from Argentinian *Bothrops* and *Crotalus* genres. *Toxicon* **36**: 1165-1172.
4. **Alape-Giron, A., Persson, B., Cederlund, E., Flores-Diaz, M., Gutiérrez-Thelestam, M., Bergman, T et Jornvall, H. (1999)** Elapid venom toxins: multiple recruitments of ancient scaff. *Eur. J. Biochem* **259**: 225-234.
5. **Anderson, S.G et Ownby, C.L. (1997)** Pathogenesis of hemorrhage induced by proteinase H from eastern diamondback rattlesnake (*Crotalus adamanteus*) venom. *Toxicon* **35**: 1291-1300.
6. **Angulo, Y., Chaves, E., Alape, A., Rucavado, A., Gutiérrez, J.M et Lomonte, B. (1997)** Isolation and characterization of a myotoxic phospholipase A₂ from the venom of the arboreal snake *Bothriechis (Bothrops) schlegelii* from Costa Rica. *Arch. Biochem. Biophys* **339**: 260-266.
7. **Angulo, Y., Nunez, C.E., Lizano, S., Soares, A.M et 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.
8. **Arni, R.K et Ward, R.J. (1996)** Phospholipases A₂ : a structural review. *Toxicon* **34**: 827-841.
9. **Arroyo, O., Rosso, J.P., Vargas, O., Gutiérrez, J.M et Cerdas, L. (1987)** Skeletal muscle necrosis induced by a phospholipase A₂ isolated from the venom of the coral snake *Micrurus nigrocinctus nigrocinctus*. *Comp. Biochem. Physiol* **87**: 949-952.
10. **Assakura, M.T., Reichel, A.P., Asperti, M.C.A et Mandelbaum, F.R. (1985)** Isolation of the major proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops moojeni* (caissaca). *Toxicon* **23**: 691-706.
11. **Assakura, M.T., Reichel, A.P et Mandelbaum, F.R. (1986)** Comparison of immunological, biochemical and biophysical properties of three hemorrhagic factors isolated from the venom of *Bothrops jararaca*. *Toxicon* **24**: 943-948.
12. **Audebert, F. (1993)** Analyse clinique et pharmaceutique des envenimations par les vipères européennes. Thèse de Doctorat, Paris VII: 1-23.
13. **Audebert, F., Sorkine, M., Robbe-Vincent, A et Bon, C. (1994)** Viper bites in France : clinical and biological evaluation; kinetics of envenomations. *Human and Experimental Toxicology* **13**: 683-688.
14. **Babu, A.S et Gowda, T.V (1991)** Effects of chemical modification on enzymatic and toxicological properties of phospholipase A₂ from *Naja naja naja* and *Vipera russelli* snake venoms. *Toxicon* **29**: 1251-1262.
15. **Balozet, L. (1957)** La vipère lébétine et son venin. *Arch.Inst.Pasteur d'Algérie* **35** : 220-260.
16. **Baramova, E., Shannon, J.D., Bjarnason, J.B et Fox, J.W. (1989)** Degradation of extracellular matrix proteins by hemorrhagic metalloproteinases. *Arch. Biochem. Biophys* **275**: 63-71.

17. **Barros, A.C., Fernandes, D.P., Ferreira, L.C et Dos Santos, M.C. (1994)** Local effects induced by venoms from five species of genus *Micrurus sp* (coral snakes). *Toxicon* **32**: 445-452.
18. **Bellairs, A. (1971)** Les reptiles : l'appareil venimeux et le venin. Editions Masson, Paris: 574-590.
19. **Berenbaum, F. (1995)** Inhibiteurs de phospholipase A₂ : un défi pour les années à venir. *Rev. Rhum* **62**: 433-438.
20. **Béreziat, G. (1992)** Médiateurs : biosynthèse des eicosanoides, importance des phospholipases A₂. Editions Pradel, Paris: 17-22.
21. **Berger, B.J et Bhatti, A.R. (1989)** Snake venom components and their cross-reactivity: a review. *Biochem. Cell. Biol* **67**: 597-601.
22. **Bilwes, A., Rees, B., Moras, D., Ménez, R et Ménez, A. (1994)** X-ray structure at 1.55 Å of toxin γ, a cardiotoxin from *Naja nigricollis* venom. Crystal packing reveals a model for insertion into membranes. *J. Molec. Biol* **239**: 122-136.
23. **Bjarnason, J.B et Fox, J.W. (1988-89)** Hemorrhagic toxins from snake venoms. *J. Toxin. Rev* **7**: 121-209.
24. **Bjarnason, J.B et Fox, J.W. (1994)** Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmac. Ther* **62**: 325-372.
25. **Boer-Lima, P.A., Gontijo, J.A.R et Cruz-Höfling, M.A. (1999)** Histological and functional renal alterations caused by *Bothrops moojeni* snake venom in rats. *Am. J. Trop. Med. Hyg* **61**: 698-706.
26. **Boquet, P. (1970)** Traité de zoologie: anatomie, systématique, biologie. Tome 14, Editions Masson, Paris: 125-150.
27. **Borkow, G., Gutiérrez, J.M et Ovadia, M. (1994)** A potent antihemorrhagin in the serum of the non-poisonous water snake *Natrix tessellata*: isolation, characterization and mechanism of neutralization. *Biochem. Biophys. Acta* **1201** : 482-490.
28. **Borkow, G., Gutiérrez, J.M et Ovadia, M. (1995)** *In vitro* activity of BaH-1, the main hemorrhagic toxin of *Bothrops asper* snake venom on bovine endothelial cells. *Toxicon* **32**: 1387-1391.
29. **Braud, S., Parry, M.A.A., Maroun, R., Bon, C et Wisner, A. (2000a)** The contribution of residues 192 and 193 to the specificity of snake venom serine proteinases. *J. Biol. Chem* **275**: 1823-1828.
30. **Braud, S., Bon, C et Wisner, A. (2000b)** Snake venom proteins acting on hemostasis. *Biochimie* **82**: 851-859.
31. **Bruses, J.L., Capaso, J., Katz, E et Pilar, G. (1993)** Specific *in vitro* biological activity of snake venom myotoxins. *J. Neurochem* **60**: 1030-1042.
32. **Bücherl, W., Buckley, E et Deulofeu, V. (1968)** Venomous animals and their venoms. Editions Academic press, New York: 320-330.
33. **Calderon, L., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., Tarkowski, A et Hanson, L.A. (1993)** Biological and biochemical activities of *Vipera berus* (European viper) venom. *Toxicon* **31**: 743-753.

34. **Cardoso, J.L.C., Fan, H.W., França, F.O.S., Jorge, M.T., Leite, R.P., Nishioka, S.A., Avila, A., Sano-Martins, I.S., Tomy, S.C., Santoro, M.L., Chudzinski, A.M., Castro, S.C.B., Kamiguti, A.S., Klen, E.M.A., Hirata, M.H., Mirandola, R.M.S., Theakston, R.D.G et Warrel., D.A. (1993)** Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in Sao Paulo. Brazil. Q. J. Med. **86**: 315-325.
35. **Cesari, E et Boquet, P (1935)** Venins de serpents et anti-venins. Collection de l'Institut Pasteur. Edition Flammarion, Paris: 63.
36. **Chaves, F., Gutiérrez, J.M et Brenes, F. (1992)** Pathological and biochemical changes induced in mice after intramuscular injection of venom from newborn specimens of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). Toxicon **30**: 1099-1109.
37. **Chaves, F., Barboza, M et Gutiérrez, J.M. (1995)** Pharmacological study of edema induced by venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo) in mice. Toxicon **33**: 31-39.
38. **Chaves, F., León, G., Alvarado, V.H et Gutiérrez, J.M. (1998)** Pharmacological modulation of edema induced by lys-49 and asp-49 myotoxic phospholipases A₂ isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). Toxicon **36**: 1861-1869.
39. **Chevremont, M (1979)** Notions de cytologie et d'histologie. Editions Maloine, Paris: 615-633.
40. **Chien, K.Y., Chiang, C.M., Hseu, Y.C., Vyas, A.A., Rulle, G.S et Wu, W.G. (1994)** Two distinct types of cardiotoxins as revealed by the structure and activity relationship of their interaction with zwitterionic phospholipid dispersions. J. Biol. Chem **269**: 14473-14483.
41. **Chippaux, J.P. (1998)** Snake-bites: appraisal of the global situation. Bulletin of the World Health Organization **76**: 515-524.
42. **Chippaux, J.P., Amadi-Eddine, S et Fagot, P. (1999)** Diagnostic et surveillance des hémorragies dues aux envenimations vipérines en savane africaine. Bull. Soc. Pathol. Exot **92**: 109-113.
43. **Chiu, H.F., Chen, I.J et Teng, C.M. (1989)** Edema formation and degranulation of mast cells by a basic phospholipase A₂ purified from *Trimeresurus mucrosquamatus* snake venom. Toxicon **27**: 115-125.
44. **Choumet, V., Audebert, F., Rivière, G., Sorkine, M., Urtizberea, M., Sabouraud, A., Scherrmann, J.M et Bon, C. (1996)** New approaches in antivenom therapy. Natural Toxins II, Editions Singh et Tu: 515-520.
45. **Cintra, A.C.O., Marangoni, S., Oliveira, B et Giglio, J.R. (1993)** Bothropstoxin-I : amino acid sequence and function. J. Protein. Chem **12**: 57-64.
46. **Civello, D.J., Duong, H.L et Geren, C.R.(1983)** Isolation and characterization of a hemorrhagic proteinase from timber rattlesnake venom. Biochemistry **22**: 749-758.
47. **Cogger, H.G et Zweifel, R.G. (1993)** Reptiles et Amphibiens. Editions Bordas, Paris: 201-207.
48. **Condrea, E et De Vries, A. (1965)** Venom phospholipase A : a review. Toxicon **2**: 261-273.
49. **Condrea, E., Fletcher, J.E., Rapuano, B.E., Yang, C.C et Rosenberg, P. (1981)** Dissociation of enzymatic activity from lethality and pharmacological properties by carbamylation of lysine in *Naja nigricollis* and *Naja naja atra* snake venom phospholipase A₂. Toxicon **19**: 705-720.

50. Coppola, M et Hogan, D.E. (1994) When a snake bites. J. Am. Osteopath. Assoc **94**: 494-501.
51. Davidson, F.F et Dennis, E.A. (1990) Evolutionary relationships and implications for the regulation of phospholipase A₂ from snake venoms to human secreted forms. J. Mol. Evol **31**: 228-238.
52. De Faria, L., Antunes, E., Bon, C et Lôbo de Araujo, A. (2001) Pharmacological characterization of the rat paw edema induced by *Bothrops lanceolatus* (fer de lance) venom. Toxicon **39**: 825-830.
53. Dennis, E.A. (1994) Diversity of groups types, regulation and function of phospholipases A₂. J. Biol. Chem **269**: 13057-13060.
54. De Roodt, A.R., Dolab, J.A., Hajos, S.E., Gould, E., Dinapoli, H., Troiano, J.C., Gould, J., Dokmetjian, J.C., Carfagnini, J.C., Fernandez, T., Amoroso, M., Segre, L et Vidal, J. (2000) Some toxic and enzymatic activities of *Bothrops ammodytoides* (yarara nata) venom. Toxicon **38**: 49-61.
55. Detrait, J et Jacob, J. (1990) Mouse paw edema induced by habu snake (*Trimeresurus flavoviridis*) venom: inhibition by morphine, naloxone and methylnaloxone alone or in combinations. Japan. J. Exp. Med **60**: 187-196.
56. Diaz, C., Gutiérrez, J.M., Lomonte, B et Gene, J.A. (1991) The effect of myotoxins isolated from *Bothrops* snake venoms on multilamellar liposomes: relationship to phospholipase A₂, anticoagulant and myotoxic activities. Biochim. Biophys. Acta **1070**: 455-460.
57. Diaz, C., Gutiérrez, J.M et Lomonte, B. (1992) Isolation and characterization of basic myotoxic phospholipase A₂ from *Bothrops godmani* (Godman's pit viper) snake venom. Arch. Biochem. Biophys **298**: 135-142.
58. Dixon, R.W et Harris, J.B. (1996) Myotoxic activity of the toxic phospholipase, notexin, from the venom of the Australian tiger snake. J. Neuropathol. Exp. Neurol **55**: 1230-1237.
59. Dixon, R.W et Harris, J.B. (1999) Nerve terminal damage by β -bungarotoxin, its clinical significance. Am. J. Pathol **154**: 447-455.
60. Dreisbach, R.H. (1983) Handbook of poisoning: prevention, diagnosis and treatment. Editions Middle East, New York: 509-517.
61. Durkin, J.P., Pickwell, G.V., Trotter, J.T et Shier, W.T. (1981) Phospholipase A₂ electrophoretic variants in reptile venoms. Toxicon **19**: 535-546.
62. El Ayeb, M., Marrakchi, N., Barbouche, R., Van Rietschoten, J., Mabrouk, K et Rochat, H. (1999) Lebetins, a new class of potent platelet aggregation inhibitors. Toxicon **37**: 261-324.
63. Elias, H., Puly, J.E et Burns, E.R. (1984) Histologie et micro-anatomie du corps humain. Edition Piccin nuova, Italie: 126-143.
64. Ernest, C.H et Zug, R. (1999) Snakes bites and venom (*Viperidae*). Editions Harrison, New York: 1-26.
65. Escalante, T., Franceschi, A., Rucavado, A et Gutiérrez, J.M. (2000) Effectiveness of batimastat inhibitor of matrix metalloproteinases, in neutralizing local tissue damage induced by BaP1, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. Biochem. Pharmacol **60**: 269-274.

66. Escarzo, S.H.A., Soares, A.M., Rodriguez, V.M., Angulo, Y., Diaz, C., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M et Giglio, J.R. (2000) Myotoxic phospholipase A₂ in *Bothrops* snake venoms: effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxin from *Bothrops jararacussu*. *Biochimie* **82**: 755-763.
67. Evans, J et Ownby, C.L. (1999) Neutralization of edema, hemorrhage and myonecrosis induced by North American crotalid venoms in simulated first-aid treatments. *Toxicon* **37**: 633-650.
68. Falconi, M., Desideri, A et Ruffini, S. (2000) Membrane-perturbing activity of *Viperidae* myotoxins: an electrostatic surface potential approach to a puzzling problem. *J. Mol. Recognit* **13**: 14-19.
69. Faure, G. (2000) Natural inhibitors of toxic phospholipase A₂. *Biochimie* **82**: 833-840.
70. Franceschi, A., Rucavado, A., Mora, N et Gutiérrez, J.M. (2000) Purification and characterization of BaH4, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Toxicon* **38**: 63-77.
71. Francis, B., Gutiérrez, J.M., Lomonte, B et Kaiser, I.I. (1991) Myotoxin II from *Bothrops asper* (terciopelo) venom is a lysine-49 phospholipase A₂. *Arch. Biochem. Biophys* **284**: 352-359.
72. Fry, B.G. (1999) Structure-function properties of venom components from Australian elapids. *Toxicon* **37**: 11-32.
73. Fuly, A.L., Calil-Elias, S., Zingali, R.B., Guimaraes, J.A et Melo, P.A. (2000) Myotoxic activity of an acidic phospholipase A₂ isolated from *Lachesis muta* (bushmaster) snake venom. *Toxicon* **38**: 961-972.
74. Gatineau, E., Lee, C.Y., Fromageot, P et Menez, A. (1988) Reversal of snake neurotoxin binding to mammalian acetylcholine receptor by specific antiserum. *Eur. J. Biochem* **171**: 535-539.
75. Gelb, M.H., Valentin, E., Ghomashchi, F., Lazdunski, M et Lambeau, G. (2000) Cloning and recombinant expression of a structurally novel human secreted phospholipase A₂. *J. Biol. Chem* **275**: 39823-39826.
76. Giroux, E et Lachmann, P.J. (1981) *In vivo* diminution by chelators of snake venom-provoked hemorrhage and *in vitro* inhibition of proteolytic activity. *Toxicon* **19**: 481-492.
77. Gleason, M.L., Odell, G.V et Ownby, C.L. (1983) Isolation and biological activity of viriditoxin and a viriditoxin variant from *Crotalus viridis viridis* venom. *Toxin. Rev* **2**: 235-265.
78. Gold, B.S et Wingert, W.A. (1994) Snake venom poisoning in the United States: a review of therapeutic practice. *South. Med. J* **87**: 579-589.
79. Gomis-Ruth, F.X., Kress, L.F et Bode, W. (1993) First structure of a snake venom metalloproteinase: a prototype for matrix metalloproteinases/collagenases. *EMBO. J* **12**: 4151-4157.
80. Gopalakrishnakone, P., Dempster, D.W., Hawgood, B.J et Elder, H.Y. (1984) Cellular and mitochondrial changes induced in the structure of murine skeletal muscle by crotoxin, a neurotoxic phospholipase A₂ complex. *Toxicon* **22**: 85-98.
81. Gowda, T.V et Middlebrook, J.L. (1993) Effects of myonecrotic snake venom phospholipase A₂ toxins on cultured muscle cells. *Toxicon* **31**: 1267-1278

82. Grams, F., Huber, R., Kress, L.F., Moroder, L et Bode, W. (1993) Activation of snake venom metalloproteinases by a cysteine switch-like mechanism. *FEBS. Lett* 335: 76-80.
83. Grassé, P.P. (1976) Précis de zoologie : vertébrés (agnathes, poissons, amphibiens et reptiles), reproduction, biologie, evolution et systématique. Tome 2, Editions Masson, Paris: 326-333.
84. Gruber, U. (1992) Guide des serpents d'Europe, d'Afrique du nord et du Moyen Orient. Editions Delachaux et Niestlé, Suisse: 206-207.
85. Gutiérrez, J.M et Chaves, F. (1980) Efectos proteolitico hemorragico y mionecrotico de los venenos de serpientes costarricenses de los generos *Bothrops crotalus* y *lachesis*. *Toxicon* 18: 315-321.
86. Gutiérrez, J.M., Arroyo, O et Bolanos, R. (1980) Mionecrosis, hemorragia y edema inducidos por el veneno de *Bothrops asper* en raton blanco. *Toxicon* 18: 603-610.
87. Gutiérrez, J.M., Chaves, F., Bolanos, R., Cerdas, L., Rojas, E., Arroyo, O et Portilla, E. (1981) Neutralizacion de los efectos locales del veneno de *Bothrops asper* por un antiveneno polivalente. *Toxicon* 19: 493-500.
88. Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., Portilla, E., Cerdas, L et Rojas, E. (1983) Local effects induced by coral snake venoms: evidence myonecrosis after experimental inoculations of venom from five species. *Toxicon* 21: 777-783.
89. Gutiérrez, J.M., Ownby, C.L et Odell, G.V. (1984) Isolation of a myotoxin from *Bothrops asper* venom: partial characterization and action on skeletal muscle. *Toxicon* 22: 125-128.
90. Gutiérrez, J.M., Rojas, G., Lomonte, B., Gené, J.A et Cerdas, L. (1986) Comparative study of the edema-forming activities of Costa Rican snake venoms and its neutralization by a polyvalent antivenom. *Com. Biochem. Physiol* 85: 171-175.
91. Gutiérrez, J.M., Rojas, G et Cerdas, L. (1987) Ability of a polyvalent antivenom to neutralize the venom of *Lachesis muta melanocephala* a new Costa Rican subspecies of the bushmaster. *Toxicon* 25: 713-720.
92. Gutiérrez, J.M., Avila, C., Camacho, Z et Lomonte, B. (1990a) Ontogenetic changes in the venom of the snake *Lachesis muta stenophrys* (bushmaster) from Costa Rica. *Toxicon* 28: 419-426.
93. Gutiérrez, J.M., Rojas, G., Lomonte, B., Gené, J.A., Chaves, F., Alvarado, J et Rojas, E. (1990b) Standardization of assays for testing the neutralizing ability of antivenoms. *Toxicon* 28: 1127-1129.
94. Gutiérrez, J.M et Lomonte, B. (1995) Phospholipases A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon* 33: 1405-1424.
95. Gutiérrez, J.M., Romero, M., Diaz, C., Borkow, G et Ovadia, M. (1995a) Isolation and characterization of a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon* 33: 19-29.
96. Gutiérrez, J.M., Romero, M., Nunez, J., Chaves, F., Borkow, G et Ovadia, M. (1995b) Skeletal muscle necrosis and regeneration after injection of BaH1, a hemorrhagic metalloproteinase isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Exp. Mol. Pathol* 62: 28-41.
97. Gutiérrez, J.M et Rucavado, A. (2000) Snake venom metalloproteinases : their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie* 82: 841-850.
98. Hamilton, R.C., Broad, A.J et Sutherland, S.K. (1980) Effects of Australian eastern brown snake (*Pseudonoja textilis*) venom on the ultrastructure of nerve terminals on the rat diaphragm. *Neurosci. Lett* 19: 45-50.

99. Harris, J.B et MacDonell, C.A. (1981) Phospholipase A₂ activity of notexin and its role in muscle damage. *Toxicon* **19**: 419-430.
100. Harris, J.B. (1989) Snake venoms in science and clinical medicine 3. Neuropharmacological aspects of the activity of snake venoms. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg* **83**: 745-747.
101. Harris, J.B., Grubb, B.D., Maltin, C.A et Dixon, R. (2000) The neurotoxicity of the venom phospholipases A₂ notexin and taipoxin. *Exp. Neurol* **161**: 517-526.
102. Harvey, A.L. (1985) Cardiotoxins from cobra venoms: possible mechanisms of action. *Toxin. Reviews* **4**: 41-69.
103. Hati, R.N., Mandal, M et Hati, A.K. (1990) Active immunization of rabbit with gamma irradiated russell's viper venom toxoid. *Toxicon* **28**: 895-902.
104. Hati, R.N., Mitra, P., Sarker, S et Bhattacharyya, K.K. (1999) Snake venom hemorrhagins. *Crit. Rev. Toxicol* **29**: 1-19.
105. Higaki, J.M., Fletterick, R.J et Craik, C.S. (1992) Engineered metalloregulation in enzymes. *TIBS* **17**: 100-104.
106. Hite, L.A., Shannon, J.D., Bjarnason, J.B et Fox, J.W. (1992) Sequence of a cDNA clone encoding the zinc metalloproteinase hemorrhagic toxin-e from *Crotalus atox* : evidence for signal, zymogen and disintegrin-like structures. *Biochemistry* **31**: 6203-6211.
107. Hite, L.A., Jia, L.G., Bjarnason, J.B et Fox, J.W. (1994) cDNA sequences for four snake venom metalloproteinases: structure, classification and their relationship to mammalian reproductive proteins. *Arch. Biochem. Biophys* **308**: 182-191.
108. Ho, C.L., Hwang, L.L et Chen, C.T. (1993) Edema-inducing activity of a lethal protein with phospholipase A₂ activity isolated from the black-bellied hornet (*Vespa basalis*) venom. *Toxicon* **31**: 605-613.
109. Homsí-Brandeburgo, M.I., Queiroz, L.S., Santo-Neto, H., Rodrigues-Simioni, L et Giglio, J.R. (1988) Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom : partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. *Toxicon* **26**: 615-627.
110. Huang, H.C. (1984) Release of slow reacting substance from the guinea-pig lung by phospholipase A₂ of *Vipera russelli* snake venom. *Toxicon* **22**: 359-372.
111. Huang, T.F., Chang, J.Y.H et Ouyang, C. (1984) Characterization of hemorrhagic principles from *Trimeresurus gramineus* snake venom. *Toxicon* **22**: 45-52.
112. Huang, T.F., Wang, W.J., Teng, C.M., Liu, C.S et Ouyang, C. (1991) Purification and characterization of an antiplatelet peptide, arietin, from *Bitis arietans* venom. *Biochim. Biophys. Acta* **1074**: 136-143.
113. Huang, C.C., Pan, F.M., Chow, L.P., Tsugita, A et Chiou, S.H. (1995) Characterization of multiple metalloproteinases with fibrinogenolytic activity from the venom of Taiwan habu (*Trimeresurus mucrosquamatus*): protein microsequencing coupled with cDNA sequence analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **216**: 223-233.
114. Huang, T.F. (1998) What have snakes taught us about integrins?. *Cell. Mol. Life. Sci* **54**: 527-540.
115. Hutton, R.A et Warrel, D.A. (1993) Action of snake venom components on the haemostatic system. *Blood* **7**: 176-189.
116. Iha, M., Qi, Z.A., Kannki, T., Tomihara, Y et Yonaha, K. (1995) The primary structure of a hemorrhagic factor, HR2b, from the venom of Okinawa habu (*Trimeresurus flavoviridis*). *Toxicon* **33**: 229-239.

117. **Incerpi, S., De Vito, P., Luly, P et Ruffini, S. (1995)** Effect of ammodytin L from *Vipera ammodytes* on L-6 cells from rat skeletal muscle. *Biochim.Biophys. Acta* **1268**: 137-142.
118. **Jeon, O.H et Kim, D.S. (1999)** Molecular cloning and functional characterization of a snake venom metalloprotease. *Eur. J. Biochem* **263**: 526-533.
119. **Jia, L.G., Shimokawa, K.I., Bjarnason, J.B et Fox, J.W. (1996)** Snake venom metalloproteases : structure, function and relationship to the ADAM's family of proteins. *Toxicon* **34**: 1269-1276.
120. **Jia, L.G., Wang, X.M., Shannon, J.D., Bjarnason, J.B et Fox, J.W. (1997)** Function of disintegrin-like/cystein-rich domains of atrolysin A: inhibition of platelet aggregation by recombinant protein and peptide antagonists. *J. Biol. Chem* **272**: 13094-13102.
121. **Jia, L.G., Wang, X.M., Shannon, J.D., Bjarnason, J.B et Fox, J.W. (2000)** Inhibition of platelet aggregation by the recombinant cysteine-rich domain of the hemorrhagic snake venom metalloproteinase, atrolysin A. *Arch. Biochem. Biophys* **373**: 281-286.
122. **Johnson, E.K et Ownby, C.L. (1993)** Isolation of a myotoxin from the venom of *Agkistrodon contortrix laticinctus* (broad-banded copperhead) and pathogenesis of myonecrosis induced by it in mice. *Toxicon* **31**: 243-255.
123. **Kamiguti, A.S., Theakston, R.D.G., Desmond, H et Hutton, R.A. (1991)** Systemic hemorrhage in rats induced by a hemorrhagic fraction from *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon* **29**: 1097-2000.
124. **Kamiguti, A.S., Zuzel, M et Theakston, R.D.G. (1998)** Snake venom metalloproteinases and disintegrins: interaction with cells. *Braz. J. Med. Biol. Res* **31**: 853-862.
125. **Kerrigan, K.R. (1991)** Venomous snakebite in eastern Ecuador. *Am. J. Trop. Med. Hyg* **44**: 93-99.
126. **Kini, R.M et Iwanaga, S. (1986a)** Structure-function relationships of phospholipases II: prediction of presynaptic neurotoxicity. *Toxicon* **24**: 527-541.
127. **Kini, R.M et Iwanaga, S. (1986b)** Structure-function relationships phospholipases II: charge density distribution and the myotoxicity of presynaptically neurotoxic phospholipases. *Toxicon* **24**: 895-905.
128. **Kini, R.M et Evans, H.J. (1989)** A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A₂. *Toxicon* **27**: 613-635.
129. **Kini, R.M et Evans, H.J. (1990)** Effects of snake venom proteins on blood platelets. *Toxicon* **28**: 1387-1422.
130. **Kishida, M., Nikai, T., Mori, N., Kohmura, S et Sugihara, H. (1985)** Characterization of mucrotoxin A from the venom of *Trimeresurus mucrosquamatus* (the chinese habu snake). *Toxicon* **23**: 637-645.
131. **Kochva, E. (1987)** The origin of snakes and evolution of the venom apparatus. *Toxicon* **25**: 65.
132. **Komori, Y et Sugihara, H. (1988)** Biological study of muscle degenerating hemorrhagic factor from the venom of *Vipera aspis* (aspic viper). *Int. J. Biochem* **20**: 1417-1423.
133. **Komori, Y et Sugihara, H. (1990)** Purification and physiological study of a hypotensive factor from the venom of *Vipera aspis aspis* (aspic viper). *Toxicon* **28**: 359-369.

134. Komori, Y., Nikai, T., Sekido, C., Fuwa, M et Sugihara, H. (1994) Biochemical characterization of hemorrhagic toxin from *Crotalus viridis viridis* (prairie rattlesnake) venom. *Int. J. Biochem* **26**: 1411-1418
135. Kondo, H., Kondo, S., Ikezawa, H., Murata, R et Ohsaka, A. (1960) Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of habu snake venom. *Jap. J. Med. Sci. Biol* **13**: 43.
136. Kouyoumdjian, J.A., Harris, J.B et Johnson, A.M. (1986) Muscle necrosis caused by the sub-units of crotoxin. *Toxicon* **24**: 575-583.
137. Krizaj, I., Bieber, A.L., Ritonja, A et Gubensek, F. (1991) The primary structure of ammodytin L, a myotoxic phospholipase A₂ homologue from *Vipera ammodytes* venom. *Eur. J. Biochem* **202**: 1165-1168.
138. Krizaj, I et Gubensek, F. (2000) Neuronal receptors for phospholipase A₂ and β -neurotoxicity. *Biochimie* **82**: 807-814.
139. Kunitz, M. (1947) Crystalline soybean trypsin inhibitor II. General properties. *J. Gen. Physiol* **30**: 291-230.
140. Kunkel, D.B., Curry, S.C., Vance, M.V et Ryan, P.J. (1984) Reptile envenomations. *J. Toxicol. Clin. Toxicol* **21**: 503-526.
141. Kurecki, T et Kress, L.F. (1985) Purification and partial characterization of the hemorrhagic factor from the venom of *Crotalus adamanteus* (eastern diamondback rattlesnake). *Toxicon* **23**: 657-668.
142. Lambeau, G., Ancian, P., Barhanin, J et Lazdunski, M. (1994) Cloning and expression of a membrane receptor for secretory phospholipases A₂. *J. Biol. Chem* **269**: 1575-1578.
143. Lambeau, G., Ancian, P., Nicolas, J.P., Cupillard, L., Zvaritch, E et Lazdunski, M. (1996) A family of receptors for secretory phospholipases A₂. *CR. Seances. Soc. Biol. Fil* **190**: 425-435.
144. Lamthanh, H., Léonetti, M., Navedryk, E et Ménez, A. (1993) CD and FTIR studies of an immunogenic disulphide cyclized octapeptide, a fragment of a snake curamimetic toxin. *Biochim. Biophys. Acta* **1203**: 191-198.
145. Landucci, E.C., Castro, R.C., Pereira, M.F., Cintra, A.C., Giglio, J.R., Marangoni, S., Oliveira, B., Cirino, G., Antunes, E et De Nucci, G. (1998) Mast cell degranulation induced by two phospholipases A₂ homologues: dissociation between enzymatic and biological activities. *Eur. J. Pharmacol* **343**: 257-263.
146. Laraba-Djebari, F., Martin-Eauclaire, M.F et Marchot, P. (1992) A fibrinogen-clotting serine proteinase from *Cerastes cerastes* (horned viper) venom with arginine-esterase and amidase activities : purification, characterization and kinetic parameter determination. *Toxicon* **30**: 1399-1410.
147. Laraba-Djebari, F., Martin-Eauclaire, M.F., Mauco, G et Marchot, P. (1995) Afaâcytin, an $\alpha\beta$ -fibrinogenase from *Cerastes cerastes* (horned viper) venom, activates purified factor X and induces serotonin release from human blood platelets. *Eur. J. Biochem* **233**: 756-765.
148. Laraba-Djebari, F. (1996) Etude de polypeptides pharmacologiquement actifs isolés à partir de la vipère *Cerastes cerastes* et du scorpion *Androctonus australis hector* : purification, caractérisation biochimique et pharmacologique. Thèse de Doctorat d'état, USTHB: 77-136.
149. Leeson, T.S et Leeson, C.R. (1980) *Histologie*. Editions Masson, Paris: 167-189.
150. Leon, G., Rojas, G., Lomonte, B et Gutiérrez, J.M. (1997) Immunoglobulin G and F(ab')₂ polyvalent antivenoms do not differ in their ability to neutralize

- hemorrhage, edema and myonecrosis induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Toxicon* **35**: 1627-1637.
151. Leon, G., Estrada, R., Chaves, F., Rojas, G., Ovadia, M et Gutiérrez, J.M. (1998) Inhibition by CaNa_2EDTA of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (terciopelo) venom: application in horse immunization for antivenom production. *Toxicon* **36**: 321-331.
 152. Leon, G., Stiles, B., Alape-Giron, A., Rojas, G et Gutiérrez, J.M. (1999) Comparative study on the ability of IgG and F(ab')_2 antivenoms to neutralize lethal and myotoxic effects induced by *Micrurus nigrocinctus* (coral snake) venom. *Am. J. Trop. Hyg* **61**: 266-271.
 153. Leon, G., Valverde, J.M., Rojas, G., Lomonte, B et Gutiérrez, J.M. (2000) Comparative study on the ability of IgG and Fab sheep antivenoms to neutralize local hemorrhage, edema and myonecrosis induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Toxicon* **38**: 233-244.
 154. Li, Q et Ownby, C.L. (1992) Evaluation of four different immunogens for the production of snake antivenoms. *Toxicon* **30**: 1319-1330.
 155. Lioret, S et Moreno, J.J. (1993) Edema formation and degranulation of mast cells by phospholipases A_2 purified from porcine pancreas and snake venoms. *Toxicon* **31**: 949-956.
 156. Lizano, S., Lomonte, B., Fox, J.W et Gutiérrez, J.M. (1997) Biochemical characterization and pharmacological properties of a phospholipase A_2 myotoxin inhibitor from the plasma snake *Bothrops asper*. *Biochem. J* **326**: 853-859.
 157. Lomonte, B. (1985) Edema-forming activity of bushmaster (*Lachesis muta stenophrys*) and central American rattlesnake (*crotalus durissus durissus*) venoms and neutralization by a polyvalent antivenom. *Toxicon* **23**: 173-176
 158. Lomonte, B., Gutiérrez, J.M et Mata, E. (1985) Isolation from a polyvalent antivenom of antibodies to a myotoxin in *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon* **23**: 807-813.
 159. Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., Furtado, M.F., Otero, R., Rosso, J.P., Vargas, O., Carmona, E et Rovira, M.E. (1990) Isolation of basic myotoxins from *Bothrops moojeni* and *Bothrops atrox* snake venoms. *Toxicon* **28**: 1137-1146.
 160. Lomonte, B., Tarkowski, A et Hanson, L.A. (1993) Host response to *Bothrops asper* snake venom: analysis of edema formation, inflammatory cells and cytokine release in a mouse model. *Inflammation* **17**: 93-105.
 161. Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., Borkow, G., Ovadia, M., Tarkowski, A et Hanson, L.A. (1994a) Activity of hemorrhagic metalloproteinase BaH-1 and myotoxin II from *Bothrops asper* snake venom on capillary endothelial cells *in vitro*. *Toxicon* **32**: 505-510.

162. Lomonte, B., Tarkowski, A., Bagge, U et Hanson, L. A. (1994b) Neutralization of the cytolytic and myotoxic activities of phospholipase A₂ from *Bothrops asper* snake venom by glycosaminoglycans of the heparin/heparan sulfate family. *Biochem. Pharmacol* **47**: 1509-1518.
163. Lomonte, B., Lundgren, J., Johansson, B et Bagge, U. (1994c) The dynamics of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom and myotoxin II on the mouse cremaster muscle: an intravital and electron microscopic study. *Toxicon* **32**: 41-55.
164. Lomonte, B., Moreno, E., Tarkowski, A., Hanson, L.A et Maccarana, M. (1994d) Neutralization interaction between heparins and myotoxin II, a lysine 49 phospholipase A₂ from *Bothrops asper* snake venom. *J. Biol. Chem* **269**: 29867-29873.
165. Lomonte, B., Leon, G et Hanson, L.A. (1996) Similar effectiveness of Fab and F(ab')₂ antivenoms in the neutralization of the hemorrhagic activity of *Vipera berus* snake venom in mice. *Toxicon* **34**: 1197-1202.
166. Lomonte, B., Angulo, Y., Ruffini, S., Cho, W., Giglio, J.R., Ohno, M., Daniele, J.J., Geoghegan, P et Gutiérrez, J.M. (1999a) Comparative study of the cytolytic activity of myotoxic phospholipases A₂ on mouse endothelial (tEnd) and skeletal muscle (C2C12) cells *in vitro*. *Toxicon* **37**: 145-158.
167. Lomonte, B., Pizzaro-Cerda, J., Angulo, Y., Gorvel, J.P et Moreno, E. (1999b) Tyr → Trp substituted peptide 115-129 of a lys49 phospholipase (2) express enhanced membrane-damaging activities and reproduces its *in vivo* myotoxic effect. *Biochim. Biophys. Acta* **1461**: 19-26.
168. Mackessy, S.P. (1996) Characterization of the major metalloprotease isolated from the venom of the northern pacific rattlesnake, *Crotalus viridis oreganus*. *Toxicon* **34**: 1277-1285.
169. Maillet, M et Chiarasini, D. (1981) *Histologie*. Editions Bréal, Paris: 52-60.
170. Mandelbaum, F.R., Assakura, M.T et Reichel, A.P. (1984) Characterization of two hemorrhagic factors isolated from the venom of *Bothrops neuwiedii* (jararaca pintada). *Toxicon* **22**: 193-206.
171. Mandelbaum, F.R et Assakura, M.T. (1988) Antigenic relationship of hemorrhagic factors and proteases isolated from the venoms of three species of *Bothrops* snakes. *Toxicon* **26**: 379-385.
172. Mandelbaum, F.R., Serrano, S.M., Sakurada, J.K., Rangel, H.A et Assakura, M.T. (1989) Immunological comparison of hemorrhagic principles present in venoms of the *crotalinae* and *viperinae* subfamilies. *Toxicon* **27**: 169-177.
173. Marcinkiewicz, C., Vijay-Kumar, S., McLane, M.A et Niewiarowski, S. (1997) Significance of RGD loop and C-terminal domain of echistatin for recognition of IIb3 and v3 integrins and expression of ligand-induced binding site. *Blood* **90**: 1565-1575.
174. Markland, F.S. (1991) Inventory of α and β fibrinogenases from snake venom. *Thromb. Haemost* **65**: 438-443.
175. Markland, F.S. (1997) Snake venoms. *Drugs* **54**: 1-10.
176. Markland, F.S. (1998) Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon* **36**: 1749-1800.

177. **Marrakchi, N., Barbouche, R., Zinghali, L., Krifi, M., Bon, C et El Ayeb, M. (1994)** Propriétés biochimiques et pharmacologiques des pro-et anti-agregants plaquettaires des venins de vipères de tunisie. Archs. Inst. Pasteur. Tunis **71**: 487-491.
178. **Marsh, N.A et Whaler, B. (1978)** The effects of snake venoms on the cardiovasculaire and haemostatic mechanisms. Int. J. Biochem **9**: 217-220.
179. **Marsh, N.A. (1994)** Snake venoms affecting the haemostatic mechanism : a consideration of their mechanism, practical applications and biological significance. Blood. Coagul. Fibrinolysis **5**: 399-410.
180. **Marsh, N.A., Fyffe, T.L et Bennett, E.A. (1995)** Isolation and characterization of two haemorrhagic proteins (Hta and Htb) from the venom of *Bitis gabonica* (gaboon viper). Toxicon **33**: 883-899.
181. **Marsh, N.A et Fyffe, T.L. (1996)** Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. Bull. Soc. Ital. Biol. Sper **72**: 263-278.
182. **Maruyama, M., Sugiki, M., Yoshida, E., Shimaya, K et Mihara, H. (1992)** Broad substrate specificity of snake venom fibrinolytic enzymes: possible role in haemorrhage. Toxicon **30**: 1387-1397.
183. **Maruyama, M., Tanigawa, M., Suguki, M., Yoshida, E et Mihara, H. (1993)** Purification and characterization of low molecular weight fibrinolytic/hemorrhagic enzymes from snake (*Bothrops jararaca*) venom. Enzyme Protein **47**: 124-135
184. **Matsui, T., Fujimura, Y et Titani, K. (2000)** Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. Biochim. Biophys. Acta **1477**: 146-156.
185. **Maume, J. (1983)** In « éléments de parasitologie médicales ». Editions Flammarion, France: 519-533.
186. **McIntosh, J.M., Ghomashchi, F., Gelb, M.H., Dooley, D.J., Stoehel, S.J., Giordani, A.B., Naisbitt, S.R et Olivera, B.M. (1995)** Conodipine-M, a novel phospholipase A₂ isolated from the venom of the marine snail *Conus magus*. J. Biol. Chem **270**: 3518-3526.
187. **Mebs, D et Panholzer, F. (1982)** Isolation of a hemorrhagic principle from *Bitis arietans* (puff adder) snake venom. Toxicon **20**: 509-512.
188. **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.
189. **Mebs, D. (1986)** Myotoxic activity of phospholipases A₂ isolated from cobra venoms: neutralization by polyvalent antivenoms. Toxicon **24**: 1001-1008.
190. **Mebs, D et Samejima, Y. (1986)** Isolation and characterization of myotoxic phospholipases A₂ from crotalid venoms. Toxicon **24**: 161-168.
191. **Mebs, D., Pohlmann, S et Von Tenspolde, W. (1988)** Snake venom hemorrhagins: neutralization by commercial antivenoms. Toxicon **26**: 453-458.
192. **Meier, J et Stocker, K. (1991)** Effects of snake venoms on hemostasis. Crit. Rev. Toxicol **21**: 171-182.
193. **Meier, J. (1998)** Proteinase activating protein C. Enzymes from snake venom, Editions Graham, New York: 253-285.
194. **Miller, R.A et Tu, A.T. (1989)** Factors in snake venoms that increase capillary permeability. J. Pharm. Pharmacol **41**: 792-794.
195. **Moreira, L., Borkow, G., Ovadia, M et Gutiérrez, J.M. (1994)** Pathological changes induced by BaH1, a hemorrhagic proteinase isolated from *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom, on mouse capillary blood vessels. Toxicon **32**: 976-987.

196. **Morgenstern, K.A., Sprecher, C., Holth, L., Foster, D., Grant, F.J., Ching, A et Kisiel, W. (1994)** Complementary DNA cloning and kinetic characterization of a novel intracellular serine proteinase inhibitor: mechanism of action with trypsin and factor Xa as model proteinases. *Biochemistry* **33**: 3432-3441.
197. **Mori, N., Nikai, T et Sugihara, H. (1984)** Purification of a proteinase (Ac₅-proteinase) and characterization of hemorrhagic toxins from the venom of the hundred-pace snake (*Agkistrodon acutus*). *Toxicon* **22**: 451-461.
198. **Moura, A.M., Desmond, H., Liang, G et Theakston, R.D.G. (1991)** Isolation and comparaisn of myotoxins isolated froms venoms of different species of *Bothrops* snake. *Toxicon* **29**: 713-723.
199. **Mouriquand, C. (1982)** Les tissus. Editions Colin, Paris: 23-28.
200. **Nelson, B.K. (1989)** Snake envenomation. Incidence, clinical presentation and management. *Med. Toxicol. Adverse. Drug. Exp* **4**: 17-31.
201. **Nicolas, J.P., Lambeau, G et Lazdunski, M. (1995)** Identification of the binding domain for secretory phospholipase A₂ on their M-type 180 kDa membrane receptor. *J. Biol. Chem* **270**: 28869-28873.
202. **Nicolas, J.P., Lin, Y., Lambeau, G., Ghomashchi, F., Lazdunski, M et Gelb, M.H. (1997)** Localization of structural elements of bee venom phospholipase A₂ involved in N-type receptor binding and neurotoxicity. *J. Biol. Chem* **272**: 7173-7181.
203. **Nikai, T., Taniguchi, K., Komori, Y., Masuda, K., Fox, J.W et Sugihara, H. (2000)** Primary structure and functional characterization of bilitoxin-1, a novel dimeric P-II snake venom metalloproteinase from *Agkistrodon bilineatus* venom. *Arch. Biochem. Biophys* **378**: 6-15.
204. **Nishida, S., Terashima, M., Shimazu, T., Takasaki, C et Tamiya, N. (1985)** Isolation and properties of two phospholipases A₂ from the venom of an Australian elapid snake (*Pseudechis australis*). *Toxicon* **23**: 73-85.
205. **Nishikata, M. (1984)** Trypsin like protease from soybean seeds, purification and some properties. *J. Biochem* **95**: 1169-1177.
206. **Nishioka, S.A et Silveira, P.V.P. (1992)** A clinical and epidemiological study of 292 cases of lance-headed viper bite in a Brazilian teaching hospital. *Am. J. Trop. Med. Hyg* **47**: 805-810.
207. **Nkinin, S.W., Chippaux, J.P., Piétin, D., Doljansky, Y., Trémeau, O et Ménez, A. (1997)** Genetic origin of venom variability: impact on the preparation of antivenom serums. *Bull. Soc. Pathol. Exot* **90**: 277-281.
208. **Obrig, T.G., Louise, C.B., Moran, T.P., Mori, N et Tu, A.T. (1993)** Direct cytotoxic effects of hemorrhagic toxins from *Crotalus ruber ruber* and *Crotalus atrox* on human vascular endothelial cells *in vitro*. *Microvasc. Res* **46**: 412-416.
209. **Ouyang, C., Teng, C.M et Huang, T.F. (1990)** Characterization of snake venom principles affecting blood coagulation and platelet aggregation. *Adv. Exp. Med. Biol* **281**: 151-163.
210. **Ouyang, C., Teng, C.M et Huang, T.F. (1992)** Characterization of snake venom components acting on blood coagulation and platelet function. *Toxicon* **30**: 945-966.
211. **Ovadia, M. (1978)** Isolation and characterization of three hemorrhagic factors from the venom of *Vipera palestinae*. *Toxicon* **16**: 479-487.
212. **Ovadia, M. (1987)** Isolation and characterization of a hemorrhagic factor from the venom of the snake *Atractaspis engaddensis* (attractaspididae). *Toxicon* **25**: 621-630.

213. Ownby, C.L., Colberg, T.R et Odell, G.V. (1984) A new method for quantitating hemorrhage induced by rattlesnake venoms: ability of polyvalent antivenom to neutralize hemorrhagic activity. *Toxicon* 22: 227-233.
214. Ownby, C.L., Colberg, T.R et Odell, G.V. (1985) Ability of a mixture of antimyotoxin-a serum and polyvalent (*Crotalidae*) antivenom to neutralize myonecrosis, hemorrhage and lethality induced by prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom. *Toxicon* 23: 317-324.
215. Ownby, C.L., Colberg, T.R et Odell, G.V. (1986) *In vivo* ability of anti-myotoxin-a serum plus polyvalent (*Crotalidae*) antivenom to neutralize prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom. *Toxicon* 24: 197-200.
216. Ownby, C.L et Geren, C.R. (1987) Pathogenesis of hemorrhage induced by hemorrhagic proteinase IV from timber rattlesnake (*Crotalus horridus horridus*) venom. *Toxicon* 25: 519-526.
217. Ownby, C.L et Colberg, T.R. (1988) Classification of myonecrosis induced by snake venoms : venoms from the prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*), western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) and the indian cobra (*Naja naja naja*). *Toxicon* 26: 459-474.
218. Ownby, C.L., Nikai, 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.
219. Paine, M.J., Desmond, H.P., Theakston, R.D.G et Crampton, J.M. (1992) Purification, cloning and molecular characterization of a high molecular weight hemorrhagic metalloprotease, jararhagin, from *Bothrops jararaca* venom. Insights into the disintegrin gene family. *J. Biol. Chem* 267: 22869-22876
220. Perez, J.C et Sanchez, E.E. (1999) Natural inhibitors to hemorrhagins in snake venoms and their potential use in medicine. *Toxicon* 37: 703-728.
221. Perez, J.C., McKeller, M.R., Sanchez, E.E et Ramirez, M.S. (2001) An internet database of crotaline venom found in the United States. *Toxicon* 39: 621-632.
222. Pirkle, H et Stocker, K. (1991) Thrombin-like enzymes from snake venoms : an inventory. *Thromb. Haemost* 65: 444-450.
223. Pirkle, H. (1998) Thrombin-like enzymes from snake venoms : an updated inventory. *Thromb. Haemost* 79: 675-683.
224. Platel, R. (1991) *Zoologie des cordés*. Editions Ellipses, Paris: 77-109.
225. Polgar, J., Clemetson, J.M., Kehrel, B.E., Wiedemann, M., Magnenat, E.M., Wells, T.N.C et Clemetson, K.J. (1997) Platelet activation and signal transduction by convulxin, a C-type lectin from *Crotalus durissus terrificus* (tropical rattlesnake) venom via the p62/GPVI collagen receptor. *J Biol. Chem* 272: 13576-13583.
226. Preston, S.A., Davis, C.E et Harris, J.B. (1990) The assessment of muscle fibre loss after the injection of the venom of *Notechis scutatus* (Australian tiger snake). *Toxicon* 28: 201-214.
227. Prigent-Dachary, J., Boffa, M.C., Boisseau, M.R et Dufourcq, J. (1980) Snake venom phospholipases A₂. A fluorescence study of their binding to phospholipid vesicles correlation with their anticoagulant activities. *J. Biol. Chem* 255: 7734-7739.
228. Queiroz, L.S., Santo-Neto, H., Rodrigues-Simioni, L et Prado-Franceschi, J.P. (1984) Muscle necrosis and regeneration after envenomation by *Bothrops jararacussu* snake venom. *Toxicon* 22: 339-346.

229. **Queiroz, L.S., Santo-Neto, H., Assakura, M.T., Reichel, A.P et Mandelbaum, F.R. (1985)** Pathological changes in muscle caused by haemorrhagic and proteolytic factors from *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicon* **23**: 341-345.
230. **Ramirez, G.A., Fletcher, P.L et Possani, L.D. (1990)** Characterization of the venom from *Crotalus molossus nigrescens gloyd* (black tail rattlesnake): isolation of two proteases. *Toxicon* **28**: 285-297.
231. **Ramirez, M.S., Sanchez, E.E., Garcia-Prieto, C., Perez, J.C., Chapa, G.R., McKeller, M.R., Ramirez, R et De Anda, Y. (1999)** Screening for fibrinolytic activity in eight viperid venoms. *Comp. Biochem. Physiol. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol* **124**: 91-98.
232. **Reinharez, D.(1984)** Veines, lymphatiques, interstitium. Editions Boots-Dacour, Paris: 9.
233. **Renetseder, R., Brunie, S., Dijkstra, B.W., Drenth, J.S et Siegler, P.B. (1985)** A comparison of the crystal structures of phospholipases A₂ from bovine pancreas and *Crotalus atrox* venom. *J. Biol. Chem* **260**: 11627-11634.
234. **Rucavado, A., Lomonte, B., Ovadia, M et Gutiérrez, J.M. (1995)** Local tissue damage induced by BaP1, a metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Exp. Mol. Pathol* **63**: 186-199.
235. **Rucavado, A et Lomonte, B. (1996)** Neutralization myonecrosis, hemorrhage and edema induced by *Bothrops asper* snake venom by homologous and heterologous pre-existing antibodies in mice. *Toxicon* **34**: 567-577.
236. **Rucavado, A., Nunez, J et Gutiérrez, J.M. (1998)** Blister formation and skin damage induced by Bap1, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Int. J. Exp. Pathol* **79**: 245-254.
237. **Rucavado, A., Flores-Sanchez, E., Franceschi, A., Magalhaes, A., Gutiérrez, J.M. (1999)** Characterization of the local tissue damage induced by LHF-II, a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity isolated from *Lachesis muta muta* snake venom. *Toxicon* **37**: 1297-1312.
238. **Ruffini, S., Cesaroni, M.P., Balestro, N et Luly, P. (1996)** Proliferative effect of ammodytin L from the venom of *Vipera ammodytes* on 208F rat fibroblasts in culture. *Biochem. J* **320**: 467-472.
239. **Salvini, T.F., Belluzo, S.S., Selistre de Araujo, H.S et Souza, D.H.S. (2001)** Regeneration and change of muscle fiber types after injury induced by a hemorrhagic fraction isolated from *Agkistrodon contortrix laticinctus* venom. *Toxicon* **39**: 641-649.
240. **Samel, M., Siigur, E et Siigur, J. (1987)** Purification and characterization of two arginine ester hydrolases from *Vipera berus berus* (common viper) venom. *Toxicon* **25**: 379-388.
241. **Scarborough, R.M., Rose, J.W., Naughton, M.A., Phillips, D.R., Nannizzi, L., Arfesten, A., Campbell, A.M et Charo, I.F. (1993)** Characterization of the integrin specificities of disintegrin isolated from American pit viper venoms. *J. Biol. Chem* **268**: 1058-1066.
242. **Schwartz, M.W et Bieber, A.L. (1985)** Characterization of two arginine ester hydrolases from mojave rattlesnake (*Crotalus scutulatus scutulatus*) venom. *Toxicon* **23**: 255-269.
243. **Scot, D.L., Otwinowski, Z., Gelb, M.H et Siegler, P.B. (1990)** Crystal structure of bee venom phospholipase A₂ in a complex with a transition-state analogue. *Science* **250**: 1563-1566.

244. 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* (jararaca ilhoa) snake venom. *Toxicon* **28**: 261-273.
245. Selistre de Araujo, H.S., White, S.P et Ownby, C.L. (1996) cDNA cloning and sequence analysis of a lysine-49 phospholipase A₂ myotoxin from *Agkistrodon contortix laticinctus* snake venom. *Arch. Biochem. Biophys* **326**: 21-30.
246. Serrano, S.M., Mentele, R., Sampaio, C.A et Fink, E. (1995) Purification, characterization and amino acid sequence of a serine proteinase PA-BJ, with platelet-aggregating activity from the venom of *Bothrops jararaca*. *Biochemistry*. **34**: 7186-7193.
247. Shimokawa, K.I et Takahashi, H. (1995) Comparative study of fibrinogen degradation by four arginine ester hydrolases from the venom of *Agkistrodon caliginosus* (kankoku-mamushi). *Toxicon* **33**: 179-186.
248. Shimokawa, K.I., Jia, L.G., Wang, X.M et Fox, J.W. (1996) Expression, activation and processing of the recombinant snake venom metalloproteinase, pro-atrolysin E. *Arch. Biochem. Biophys* **335**: 283-294.
249. Shimokawa, K.I., Shannon, J.D., Jia, L.G et Fox, J.W. (1997) Sequence and biological activity of catrocollastatin-C: a disintegrin-like/cysteine-rich two protein from *Crotalus atrox* venom. *Arch. Biochem. Biophys* **343**: 35-43.
250. Shimokawa, K.I., Jia, L.G., Shannon, J.D et Fox, J.W. (1998) Isolation, sequence analysis and biological activity of atrolysin E/D, the non-RGD disintegrin domain from *Crotalus atrox* venom. *Arch. Biochem. Biophys* **354**: 239-246.
251. Siigur, E., Mahar, A et Siigur, J. (1991) $\alpha\beta$ -fibrinogenase from the venom of *Vipera lebetina*. *Toxicon* **29**: 107-118.
252. Siigur, E., Aaspollu, A., Tu, A.T et Siigur, J. (1996) cDNA cloning and deduced amino sequence of fibrinolytic enzyme (lebetase) from *Vipera lebetina* snake venom. *Biochem. Biophys. Resear. Comm* **224**: 229-236.
253. Silva, L.M., Diniz, C.R et Magalhaes, A. (1985) Purification and partial characterization of an arginine ester hydrolase from the venom of the bushmaster snake, *Lachesis muta noctivaga*. *Toxicon* **23**: 707-718.
254. Simon, T., Bdolah, A et Kochva, E. (1980) The two components toxin of *Vipera palestinae* : contribution of phospholipase A to its activity. *Toxicon* **18**: 249-259.
255. Smith, T.A et Figge, H.L. (1991) Treatment of snakebite poisoning. *Am. J. Hosp. Pharm* **48**: 2190-2196.
256. Soto, J.G., Perez, J.C et Minton, S.A. (1988) Proteolytic, hemorrhagic and hemolytic activities of snake venoms. *Toxicon* **26**: 875-882.
257. Stevens, A et Lowen, J. (1993) *Histologie*. Editions Pradel, Paris: 15-25.
258. Stocker, K., Fisher, H et Brogli, M. (1986) Chromogenic assay for the prothrombin activator ecarin from the venom of the saw-scaled viper (*Echis carinatus*). *Toxicon* **24**: 81-89.
259. Stocker, K et Meier, J. (1989) Snake venom proteins in hemostasis: new results. *Folia. Haematol. Int. Mag. Klin. Morphol. Blutforsch* **116**: 935-953.
260. Stocker, K.F. (1998) Research, diagnostic and medicinal uses of snakes venom enzymes. *Enzymes from snake venom*. Editions Graham, New York: 705-736.
261. Stocker, K. (1999) Use of snake venoms proteins in medicine. *Schweiz. Med. Wochenschr* **129**: 205-216.
262. Stryer, L. (1997) *Biochimie*. Editions Flammarion, Paris: 320-400.

263. Sugihara, H., Moriura, M et Nikai, T. (1983) Purification and properties of a lethal, hemorrhagic protein, « mucrotoxin A », from the venom of the chinese habu snake (*Trimeresurus mucrosquamatus*). *Toxicon* **21**: 247-255.
264. Takeya, H., Nishida, S., Miyata, T., Kawda, S., Saisaka, Y., Morita, T et Iwanaga, S. (1992) Coagulation factor X activating enzyme from Russell's viper venom (RVV-X). A novel metalloproteinase with disintegrin (platelet aggregation inhibitor)-like and C-type lectin-like domains. *J. Biol. Chem* **267**: 14109-14117.
265. Takeya, H., Nishida, S., Nishino, N., Makinose, Y., Omori-Satoh, T., Nikai, T., Sugihara, H et Iwanaga, S. (1993) Primary structures of platelet aggregation inhibitors (disintegrins) autoproteolytically released from snake venom hemorrhagic metalloproteinases and new fluoregenic peptide substrates for these enzymes. *J. Biochem* **113**: 473-783.
266. Tan, N.H et Saifuddin, M.N. (1990) Isolation and characterization of a hemorrhagin from the venom of *Ophiophagus hannah* (king cobra). *Toxicon* **28**: 385-392.
267. Tan, N.H et Armugan, A. (1990) *In vivo* interactions between neurotoxin, cardiotoxin and phospholipase A₂ isolated from Malayan cobra (*Naja naja sputatrix*) venom. *Toxicon* **28**: 1193-1198.
268. Tan, N.H., Saifuddin, M.N et Yong, W.Y. (1991) The edema inducing activity of phospholipase A₂ enzymes. *Biochem. Int* **23**: 175-181.
269. Thireau, M. (1995) La fonction venimeuse. Editions Masson, Barcelone: 183-268.
270. Thwin, M.M., Mee, K.M., Kyin, M.M et Than, T. (1988) Kinetics of envenomation with russell's viper (*Vipera russelii*) venom and of antivenom use in mice. *Toxicon* **26**: 373-378.
271. Tischfield, J.A. (1997) A reassessment of the low molecular weight phospholipase A₂ gene family in mammals. *J. Biol. Chem.* **272**: 17247-17250.
272. Tokunaga, F., Nagasawa, K., Tamura, S., Miyata, T., Iwanaga, S et Kisiel, W. (1988) The factor V-activating enzyme (RVV-V) from Russell's viper venom. Identification of isoproteins RVV-V α -V β and V γ and their complete amino acid sequences. *J. Biol. Chem* **263**: 17471-17481.
273. Tsai, I.H., Liu, H.C et Chang, T. (1987) Toxicity domain in presynaptically toxic phospholipase A₂ of snake venom. *Biochim. Biophys. Acta* **91**: 94-99.
274. Tsai, I.H., Wang, Y.M., Chiang, T.Y., Chen, Y.L et Huang, R.J. (2000) Purification, cloning and sequence analysis for pro-metalloprotease-disintegrin variants from *Deinagkistrodon acutus* venom and subclassification of the small venom metalloproteases. *Eur. J. Biochem* **267**: 1359-1367.
275. Valentin, E., Ghomashchi, F., Gelb, M.H., Lazdunski, M et Lambeau, G. (1999) On the diversity of secreted phospholipases A₂: cloning, tissue distribution and functional expression of two novel mouse group II enzymes. *J. Biol. Chem* **274**: 31195-31202.
276. Valentin, E et Lambeau, G. (2000) What can venom phospholipases A₂ tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipases A₂?. *Biochimie* **82**: 815-831.
277. Van Der Walt, S.J et Joubert, F.J. (1971) Studies on puff proteases A. *Toxicon* **9**: 153-161.
278. Vander, A.J., Sherman, J.H et Luciano, D.S. (1977) Physiologie humaine. Editions Mc graw-hill, New York: 177-213.
279. Van Heijne, G. (1990) The signal peptide. *J. Memb. Biol* **115**: 191-201.

280. Ward, R.J., Alves, A.R., Neto, J. R., Arni, R.K et Casari, G. (1998) A sequence space analysis of lys49 phospholipases A₂ : clues towards identification of residues involved in a novel mechanism of membrane damage and in myotoxicity. *Protein Engineering* **11**: 285-294.
281. Warrel, D.A. (1993) Venomous bites and stings in the tropical world. *Med. J. Aust* **159**: 773-779.
282. Willis, T.W et Tu, A.T. (1988) Purification and biochemical characterization of atroxase, a non hemorrhagic fibrinolytic protease from western diamondback rattlesnake venom. *Biochemistry* **27**: 4769-4777.
283. Xu, X., Wang, C., Liu, J et Lu, Z. (1981) Purification and characterization of hemorrhagic components from *Agkistrodon acutus* (hundred pace snake) venom. *Toxicon* **19**: 633-644.
284. Yamakawa, Y., Omori-satoh, T et Mebs, D. (1995) Hemorrhagic principles in the venom of *Bitis arietans*, a viperous snake. II. Enzymatic properties with special reference to substrate specificity. *Biochim. Biophys. Acta* **1247**: 17-23.
285. Yang, C.C., King, K et Sun, T.P. (1981) Chemical modification of lysine and histidine residues in phospholipase A₂ from the venom of *Naja naja atra* (Taiwan cobra). *Toxicon* **19**: 645-659.
286. Yates, S.L., Burns, M., Condrea, E., Ghassemi, A., Shina, R et Rosenberg, P. (1990) Phospholipid hydrolysis and loss of membrane integrity following treatment of rat brain synaptosomes with β -bungarotoxin, notexin and *Naja naja atra* and *naja naja nigricollis* phospholipase A₂. *Toxicon* **28**: 939-951.
287. Yuan, Y., Jackson, S.P., Newnham, H.H., Mitchell, C.A et Salem, H.H. (1995) An essential role for lysophosphatidylcholine in the inhibition of platelet aggregation by secretory phospholipase A₂. *Blood* **86**: 4166-4174.
288. Zamudio, F.Z., Conde, R., Arevalo, C., Becerril, B., Martin, B.M., Valdivia, H.H et Possani, L.D. (1997) The mechanism of inhibition of ryanodine receptor channels by imperatoxin I, a heterodimeric protein from the scorpion *Pandinus imperator*. *J. Biol. Chem* **272**: 11886-11894.
289. Zeller, A.E. (1977) Snake venom action : are enzymes involved in it ?. *Experientia* **33**: 143-150.
290. Zhang, Y., Wisner, A., Xiong, Y et Bon, C. (1995) A novel plasminogen activator from snake venom : purification, characterization and molecular cloning. *J. Biol. Chem* **270**: 10246-10255.
291. Zvaritch, E., Lambeau, G et Lazdunski, M. (1996) Endocytic properties of the M-type 180-kDa receptor for secretory phospholipases A₂. *J. Biol. Chem* **271**: 250-257.

Fiche technique de l'étude histologique

- Fiche technique n°1

*** Déshydratation des pièces après fixation :**

- 1 bain d'alcool 70° : pendant 15 min
- 2 bains d'alcool 90° : pendant 15 min chacun
- 3 bains d'alcool 100° : pendant 15 min chacun
- 3 bains de toluène : pendant 15 min chacun

*** Imprégnation à la paraffine :**

- Deux bains de paraffine, fondue dans une étuve réglée à 60°C :
 - Un premier bain d'une heure
 - Un deuxième bain de 24 heures
- Coulage des blocs

*** Déparaffinage et hydratation :**

- 2 bains de toluène : tremper la lame un moment dans chacun des bains
- 1 bain d'alcool 100° : tremper la lame un moment
- 1 bain d'alcool 90° : tremper la lame un moment
- 1 bain d'alcool 70° : tremper la lame un moment
- 1 bain d'eau distillée

- Fiche technique n°2

Coloration topographique de Mann-Domininci (1894-1905)

a) Préparation des réactifs :

- Erythrosine-Orange (dissoudre 0,2 g d'erythrosine jaunâtre et 0,6 g d'orange G dans 100 ml d'eau distillée, acidifier par une goutte d'acide acétique).
- Solution aqueuse à 0,5 % de bleu de toluidine (0,5 g/ml H₂O_D).
- Eau acétifiée à 0,2 % (V/V : 0,2 ml/100 ml H₂O_D).

b) Marche de la coloration :

- Coupes déparaffinées, hydratées ;
- Colorer pendant 2 à 5 min par le mélange d'erythrosine-orange G ;
- Rincer sommairement à l'eau distillée ;
- Colorer pendant 1 à 3 min par le bleu de toluidine ;
- Rincer sommairement à l'eau distillée ;
- Immerger les lames dans l'eau acétifiée jusqu'à coloration générale rouge ;
- Déshydrater et monter au baume de Canada.

c) Résultats :

Les noyaux et les cytoplasmes basophiles prennent une teinte bleue très intense due au colorant basique : bleu de toluidine.

Les cytoplasmes acidophiles sont roses dus au colorant acide : erythrosine-orange.

- Fiche technique n°3

*** Déshydratation et montage :**

- 1 bain d'alcool 70° : tremper la lame un moment
- 1 bain d'alcool 90° : tremper la lame un moment
- 2 bains d'alcool 100° : tremper la lame un moment dans chacun des bains
- 2 bains de toluène : tremper la lame un moment dans chacun des bains

Le montage au baume de Canada se fait sur une platine chauffante. On dépose une goutte de cette résine sur la lamelle que l'on applique délicatement sur la coupe.

Une fois le baume complètement propagé sur la coupe, les lames sont mises à sécher dans l'étuve réglée à 40°C.

TABLEAU I : Classification des serpents venimeux (Bellairs., 1971 ; Marsh et Whaler., 1978 ; Maume., 1983).

Famille	Genre	Espèces	Dénomination commune	Répartition géographique
<i>ELAPIDAE</i>	<i>Bungarus</i> <i>Micrurus</i> <i>Naja</i> <i>Notechis</i> <i>Ophiophagus</i>	<i>Bungarus multicinctus</i> <i>Micrurus corallinus</i> <i>Naja nigricollis</i> <i>Notechis scutatus</i> <i>Ophiophagus hannah</i>	Bungare Serpent corail Serpent cracheur Serpent tigre Cobra royal	Asie du Sud-est Amérique du centre et du Sud Afrique Australie Asie
<i>HYDROPHIIDAE</i>	<i>Hydrophis</i> <i>Lapemis</i> <i>Laticauda</i>	<i>Hydrophis ornatus</i> <i>Lapemis curtus</i> <i>Laticauda colubrina</i>		Asie Asie Asie
<i>VIPERINAE</i>	<i>Atheris</i> <i>Atractaspis</i> <i>Bitis</i> <i>Causus</i> <i>Cerastes</i> <i>Echis</i> <i>Vipera</i>	<i>Atheris suuamiger</i> <i>Atractaspis boulengeri</i> <i>Bitis atropos</i> <i>Causus rhombeatus</i> <i>Cerastes cerastes</i> <i>Echis coloratus</i> <i>Vipera ammodytes</i> <i>Vipera aspis</i> <i>Vipera berus</i> <i>Vipera latasti</i> <i>Vipera lebetina</i> <i>Vipera russelii</i> <i>Vipera ursinii</i> <i>Vipera xanthina</i>	Vipère d'arbre Vipère taupe Vipère heurtante Vipère nocturne Vipère à cornes Vipère à écaille en scie Vipère des sables Aspic Vipère commune Levante viper Daboïa Vipère d'orsini	Afrique Afrique Afrique Afrique Afrique Afrique Europe, Asie Europe Europe Europe, Afrique Afrique, Asie Asie Europe, Asie Europe, Asie
<i>CROTALINAE</i>	<i>Agkistrodon</i> <i>Bothrops</i> <i>Crotalus</i> <i>Lachesis</i> <i>Trimeresurus</i>	<i>Agkistrodon acutus</i> <i>Bothrops bilineatus</i> <i>Crotalus atrox</i> <i>Lachesis mutus</i> <i>Trimeresurus okinavensis</i>	Mocassin Fer de lance Western diamond rattlesnake Maître de la brousse Fer de lance	Amérique du Nord Amérique du Sud Amérique Amérique du Sud Asie

TABLEAU IV : Classification des PLA₂ des venins de serpents (Davidson et Dennis., 1990 ; Tichfield., 1997 ; Faure, 2000 ; Valentin et Lambeau, 2000).

Classification	Poids moléculaire	Acides aminés	Ponts disulfures	Localisation
Groupe I	14 - 15 kDa	120 résidus d'acides aminés	07	Venins des <i>Elapidae</i> et des <i>Hydrophiidae</i>
Groupe II	14 - 15 kDa	125 résidus d'acides aminés avec à l'extrémité C-terminale une extension de 5 à 7 résidus d'acides aminés	07	Venins des <i>Viperinae</i> et des <i>Crotalinae</i>
Groupe III	16 - 18 kDa	135 résidus d'acides aminés	05	Venins des abeilles, des lézards et des scorpions
Groupe IV	13,6 kDa	Deux chaînes polypeptidiques de 77 et 42 résidus d'acides aminés respectivement.	06	Venin de <i>Conus magus</i>

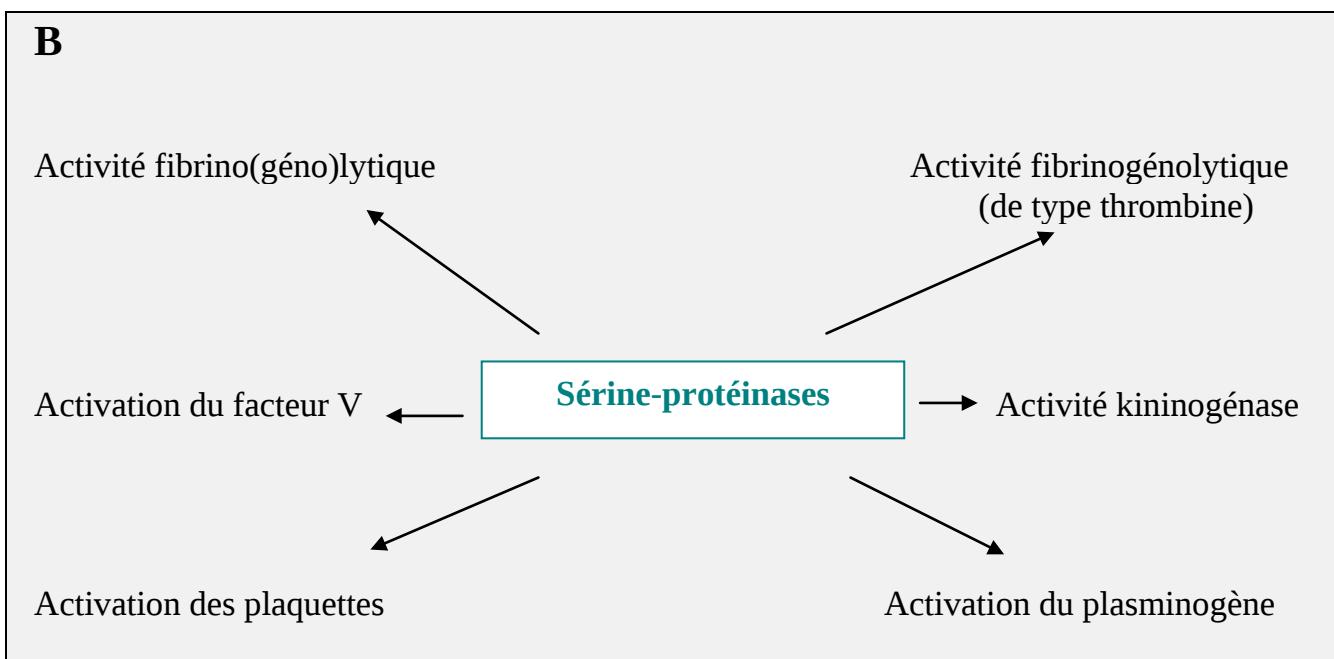
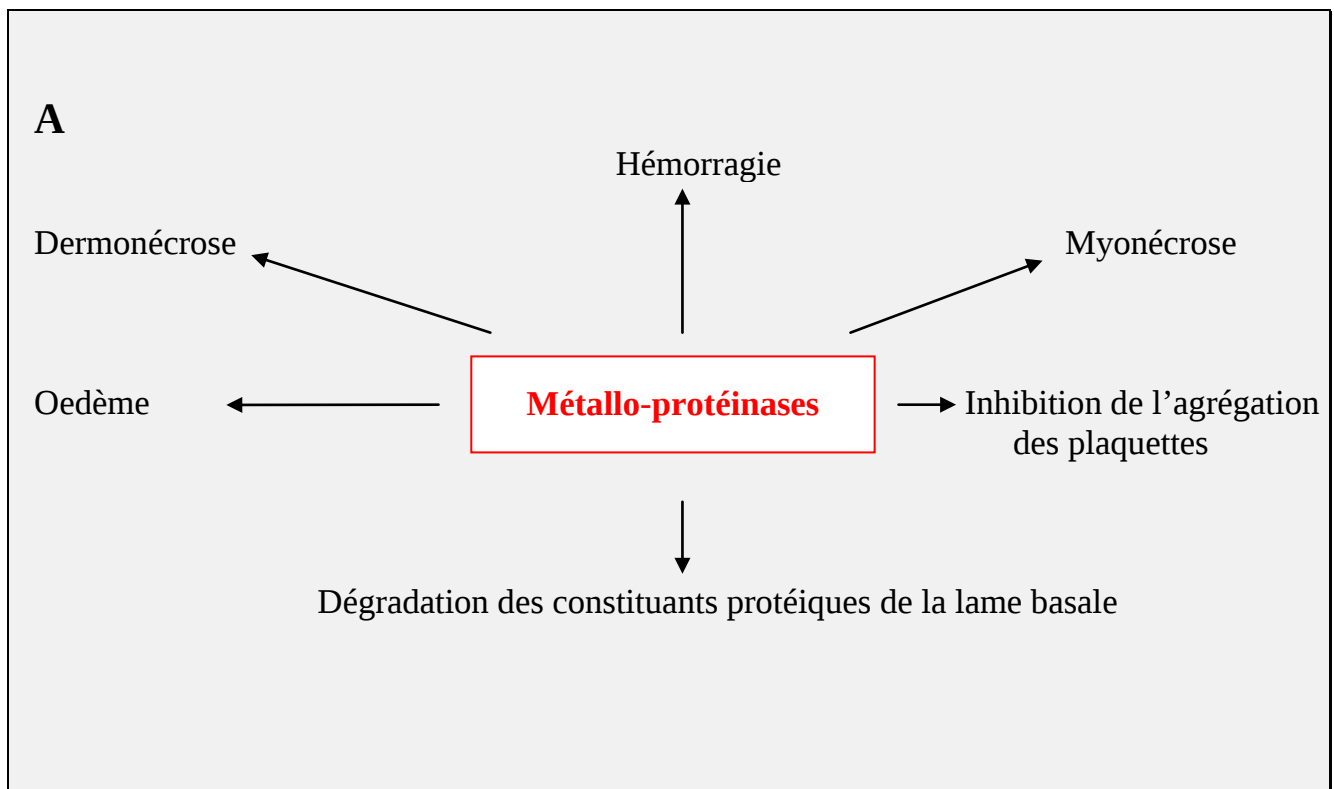
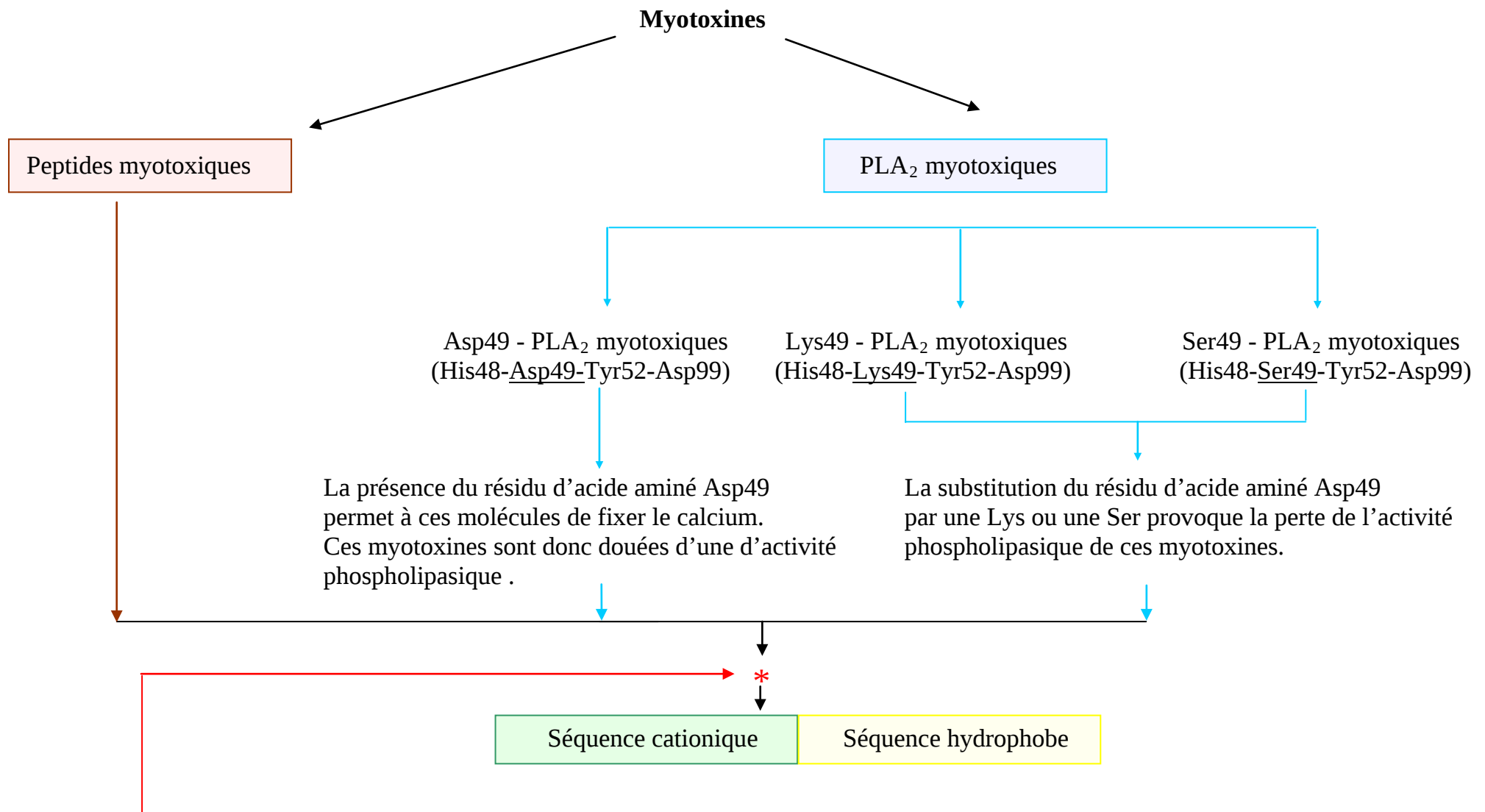


Figure 1 : Schéma récapitulatif des principales activités protéasiques des venins de serpents (Ouyang et coll., 1992 ; Laraba-Djebari et coll., 1995 ; Serrano et coll., 1995 ; Rucavado et coll., 1998 ; Braud et coll., 2000b ; Gutiérrez et Rucavado., 2000).

A : Action des métallo-protéinases.

B : Action des sérine-protéinases.



* : Les peptides et les PLA₂ myotoxiques sont caractérisés par la présence à leur extrémité C-terminale d'une séquence cationique suivie d'une séquence hydrophobe. Ces deux séquences semblent être responsables de l'activité myotoxique de ces molécules.

Figure 2a : Mécanisme d'actions des myotoxines (Gutiérrez et Lomonte., 1995 ; Zvaritch et coll., 1996 ; Angulo et coll., 1997 ; Boer-Lima et coll., 1999 ; Falconi et coll., 2000 ; Harris et coll., 2000).

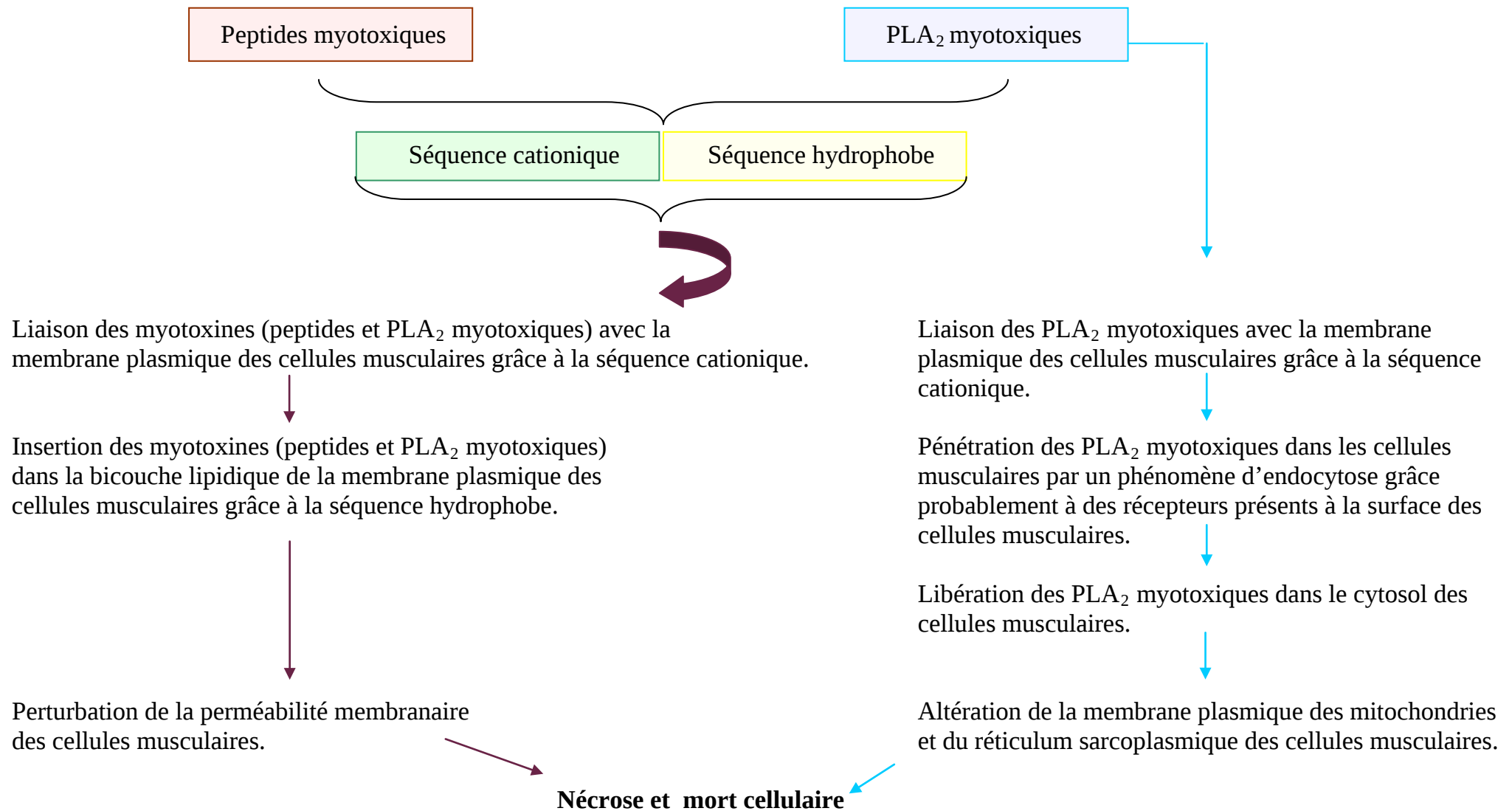


Figure 2b : Mécanisme d’actions des myotoxines (Gutiérrez et Lomonte., 1995 ; Zvaritch et coll., 1996 ; Angulo et coll., 1997 ; Boer-Lima et coll., 1999 ; Falconi et coll., 2000 ; Harris et coll., 2000).

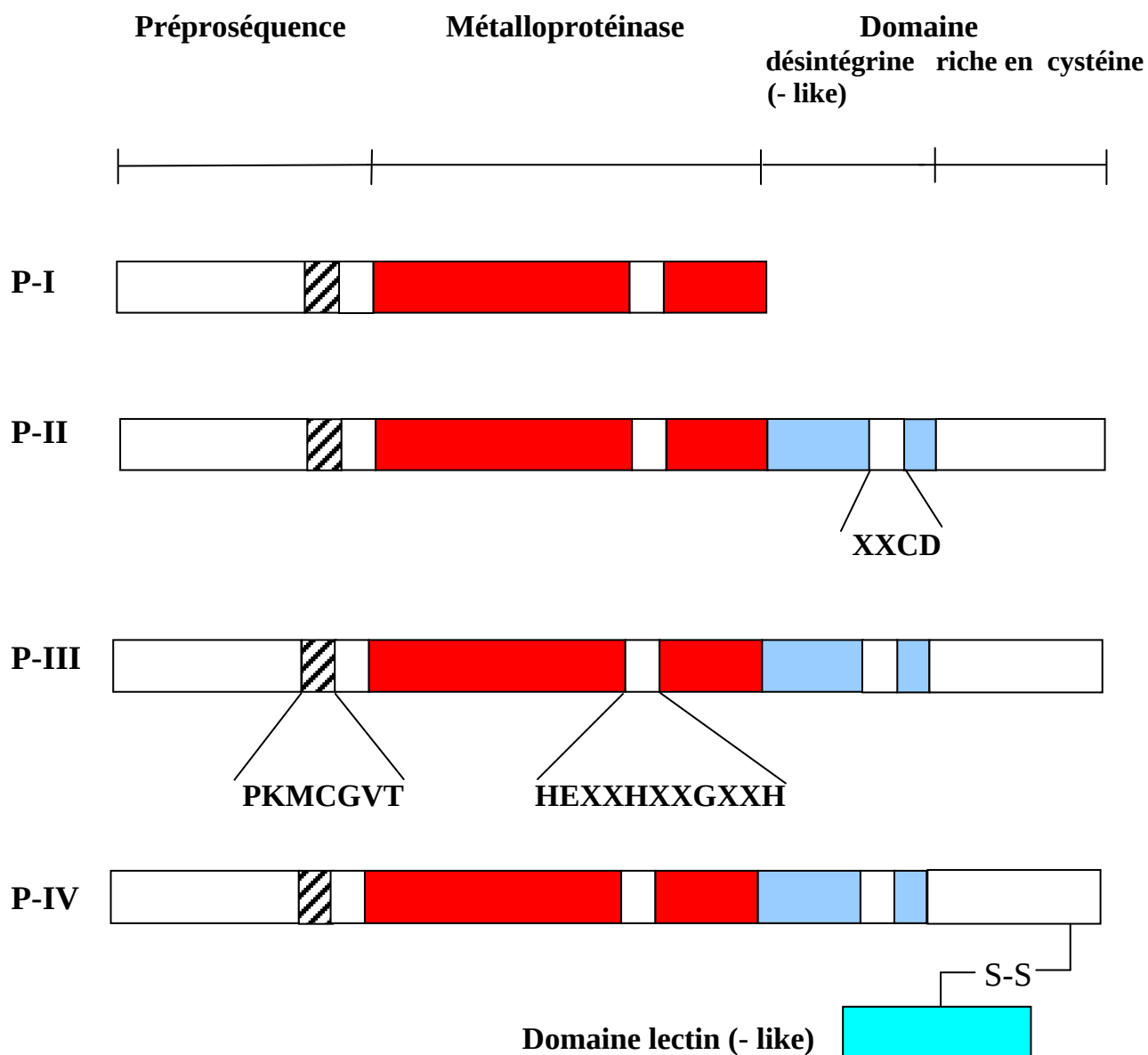


FIGURE 3 : Structure schématique des hémorragines des venins de serpents (Bjarnason et Fox., 1994 ; Hite et coll., 1992, 1994 ; Laraba-Djebari., 1996 ; Shimokawa et coll., 1996 ; Matsui et coll., 2000).

* P-I, P-II, P-III, P-IV : Protéines hémorragiques de classe I, II, III et IV respectivement.

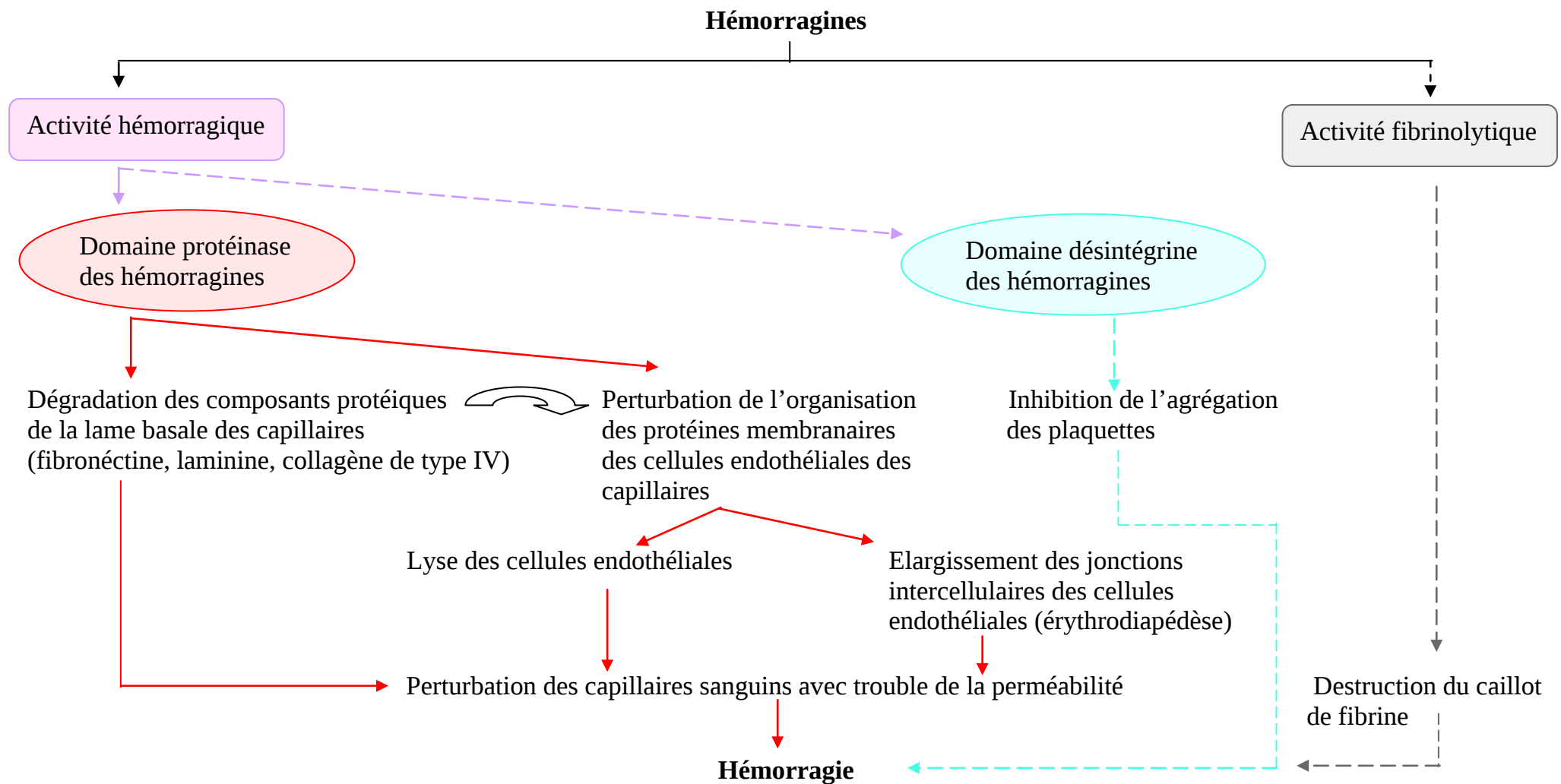


Figure 4 : Représentation schématique des différents mécanismes d'action des hémorragines (Hutton et Warrel., 1993 ; Bjarnason et Fox., 1994 ; Markland., 1997 ; Hati et coll., 1999 ; Gutiérrez et Rucavado., 2000 ; Matsui et coll., 2000).

— : Principaux mécanismes d'actions des hémorragines.

----- : Mécanismes secondaires pouvant favoriser l'effet hémorragique induit par le domaine protéinase des hémorragines.

↪ : La perturbation des cellules endothéliales peut être la conséquence de l'hydrolyse des constituants protéiques de la lame basale et non le résultat d'une action directe du domaine protéinase des hémorragines sur ces cellules.

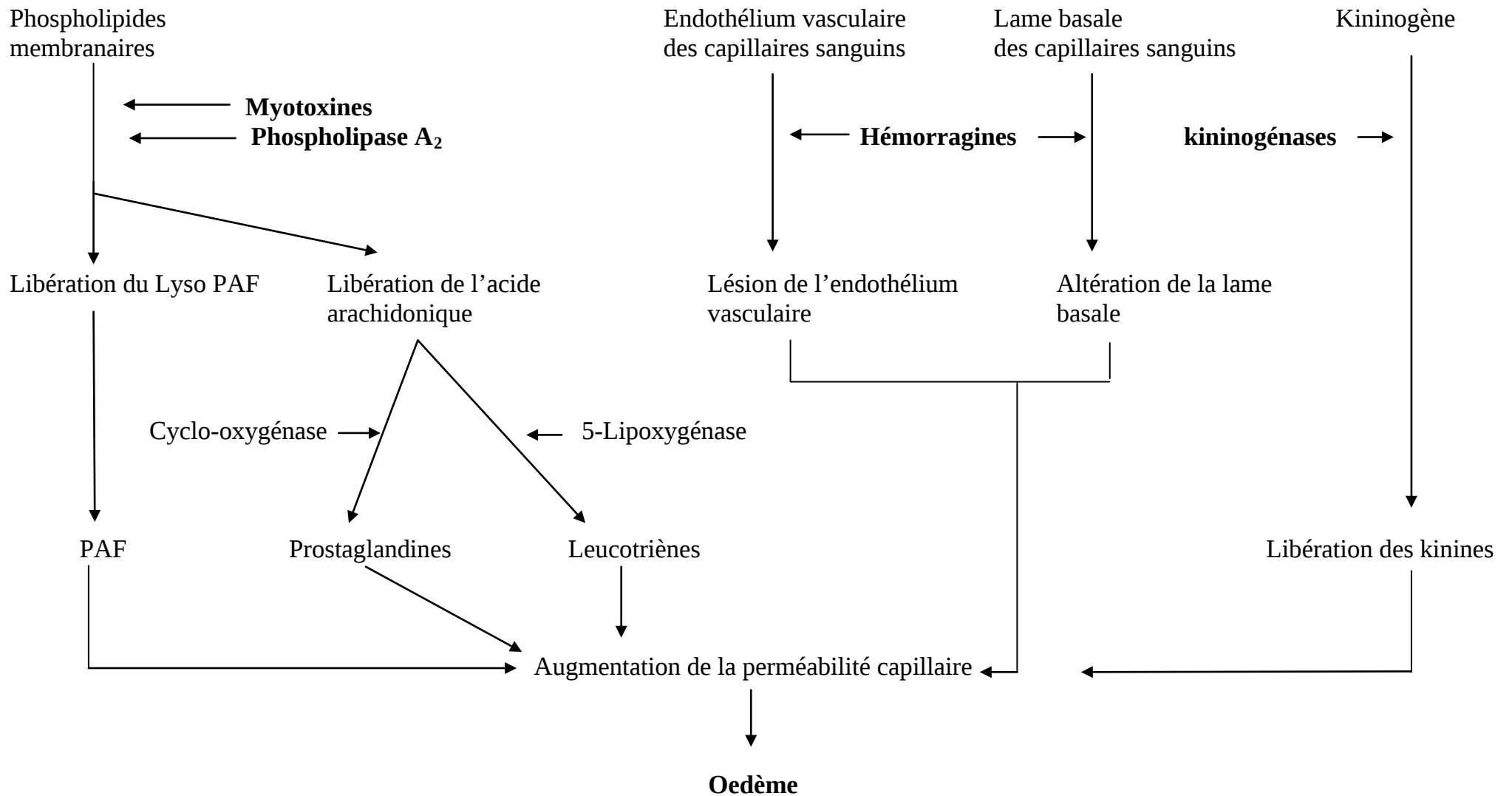


Figure 5 : Schéma récapitulatif des mécanismes susceptibles d'être à l'origine de l'activité oedématisante des venins de serpents (Hutton et Warrel., 1993 ; Lioret et Moreno., 1993 ; Berenbaum., 1995 ; Chaves et coll., 1998 ; Landucci et coll., 1998 ; De Faria et coll., 2001).

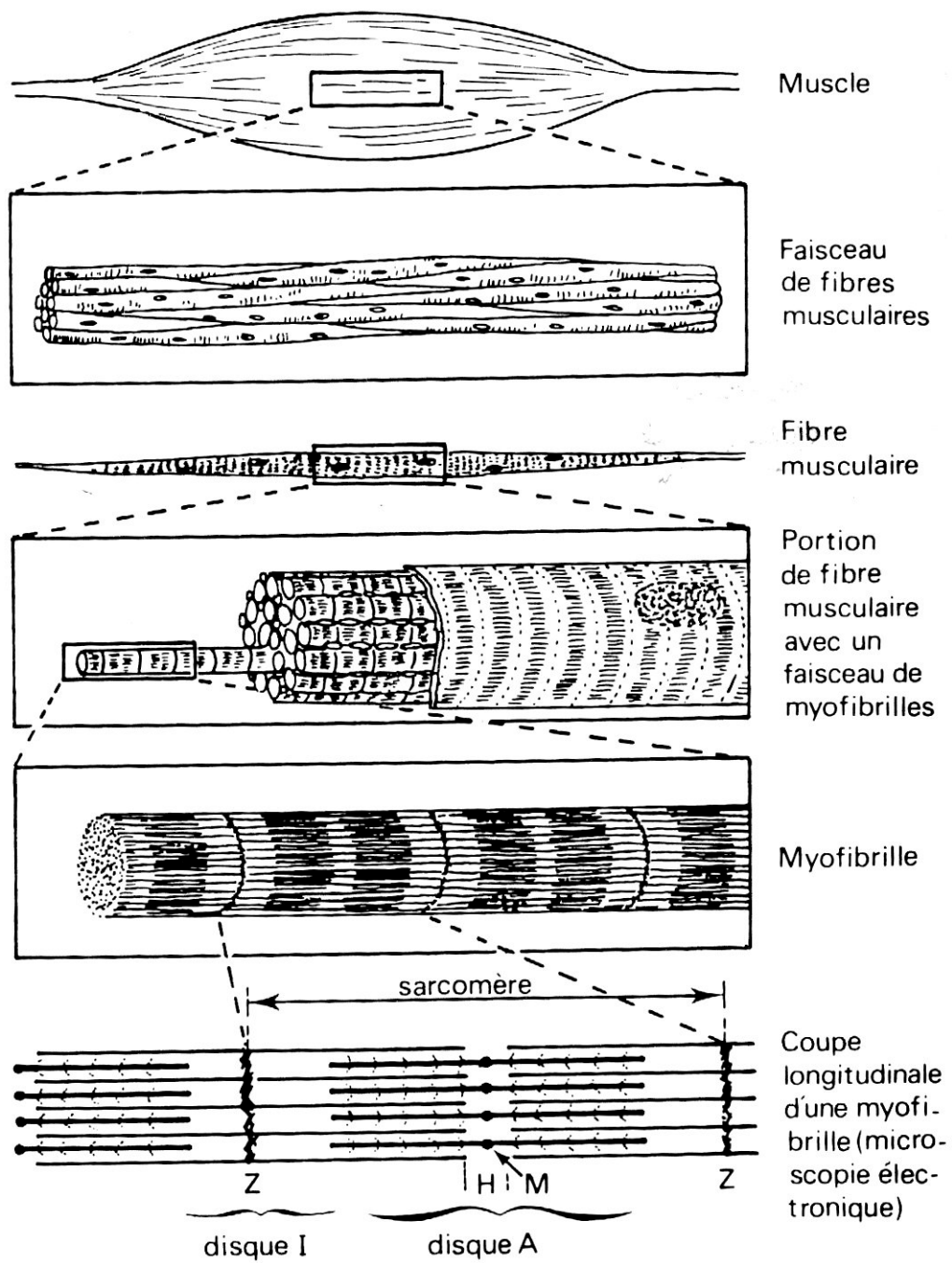


Figure 6 : Organisation du muscle strié squelettique (Vander et coll., 1977 ; Elias et coll., 1984).

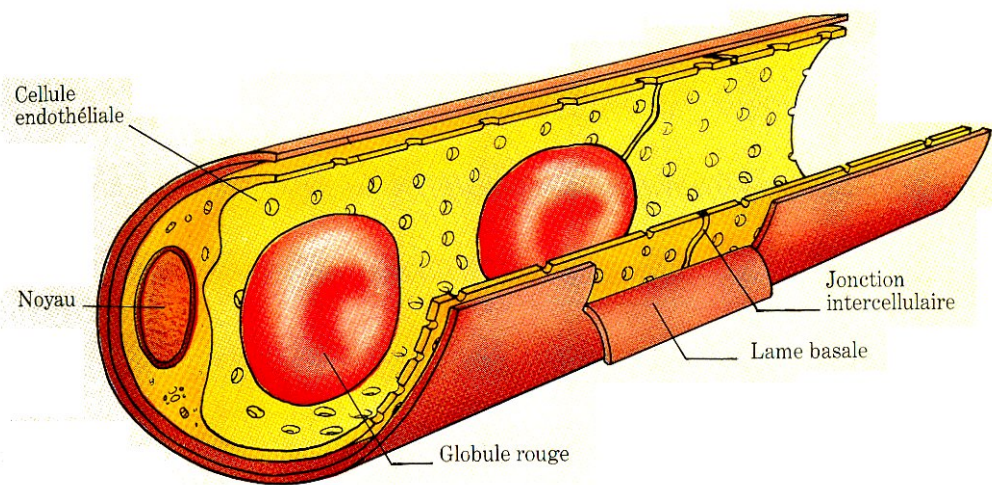


Figure 7 : Aspect schématique d'un capillaire sanguin (Reinharez., 1984).

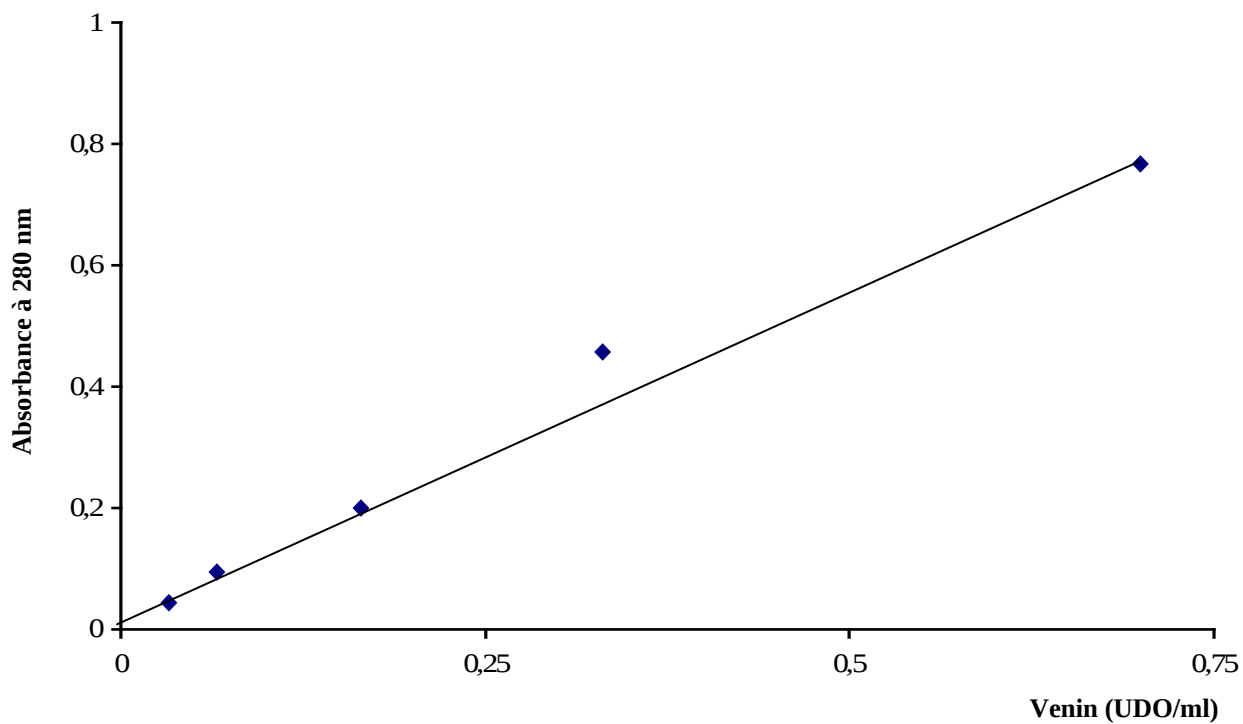


Figure 8 : Variation de l'activité caséinolytique en fonction de la concentration du venin de *Vipera lebetina*.

La réaction enzymatique est réalisée en présence d'une solution de caséine à 1 % et des concentrations croissantes de venin (0 à 0,7 UDO/ml), dans un tampon Tris-HCl 0,2 M, pH 7,5. Le mélange est incubé à 37°C pendant 20 min.

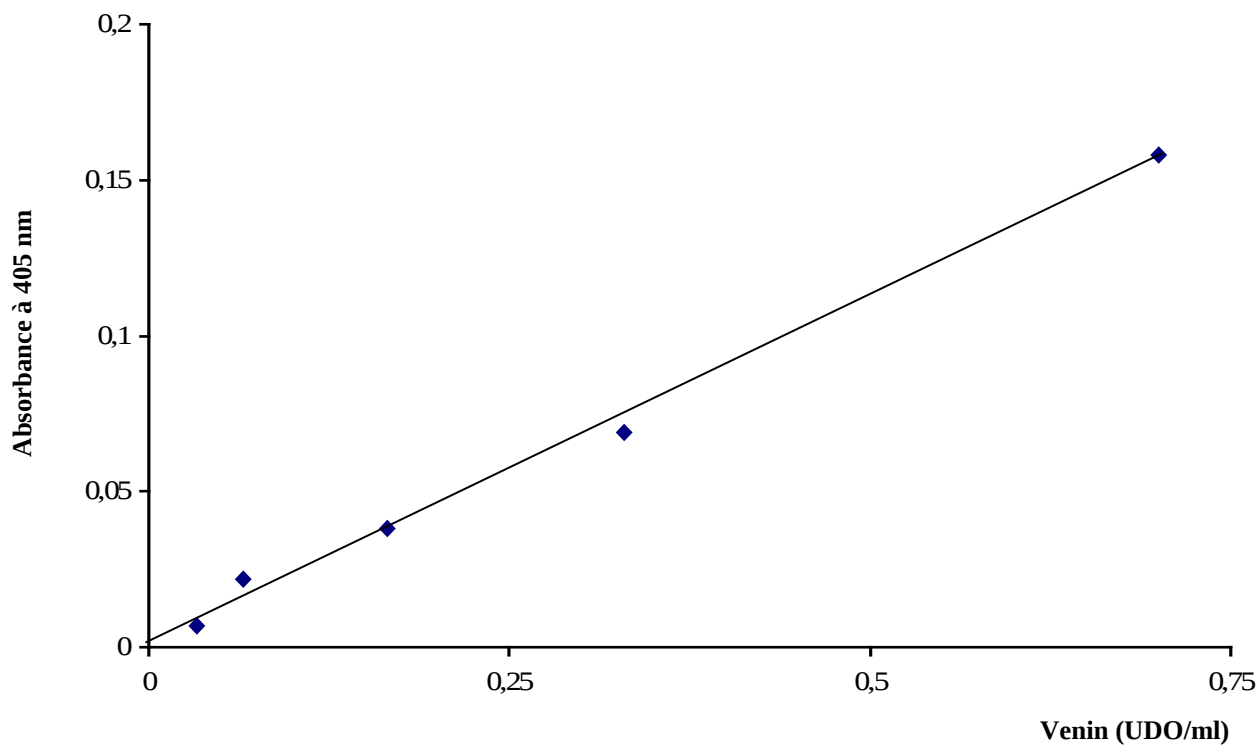


Figure 9 : Variation de l'activité amidolytique en fonction de la concentration du venin de *Vipera lebetina*.

La réaction est effectuée à 37°C pendant 15 min, en présence d'une quantité constante de CBZ ($6,6 \times 10^{-4}$ M) et des concentrations croissantes de venin (0 à 0,7 UDO/ml) dans un tampon Tris-HCl 0,01 M contenant du NaCl 0,1 M et du PEG 1 %, pH 8,7.

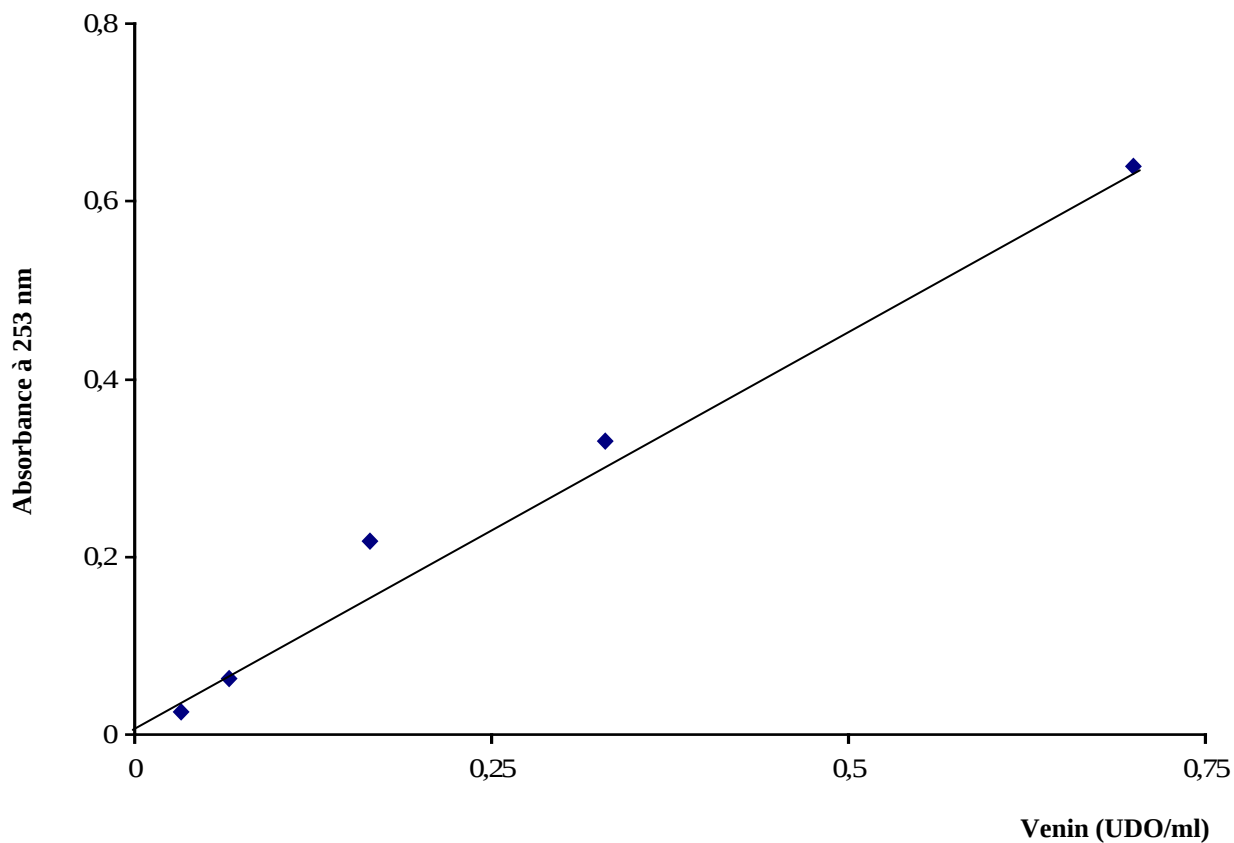


Figure 10 : Variation de l'activité arginine ester hydrolase en fonction de la concentration du venin de *Vipera lebetina*.

Des concentrations croissantes de venin (0 à 0,7 UDO/ml) sont ajoutées à 200 μ l de BAEE ($6,6 \times 10^{-4}$ M) dans un tampon Tris-HCl 0,04 M ; CaCl_2 0,01 M, pH 8. L'incubation est réalisée à 37°C pendant 30 min.

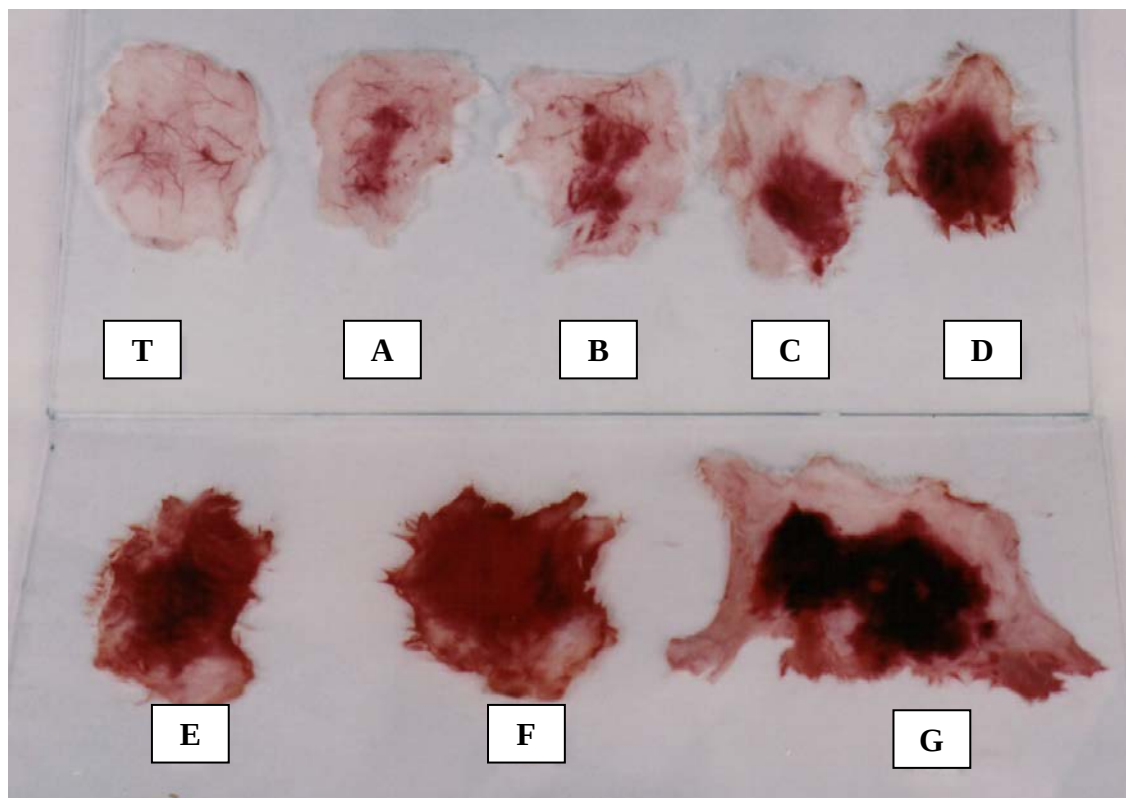


Figure 11 : Détermination de l'activité hémorragique du venin de *Vipera lebetina* en fonction de la dose de venin par le « skin test ».

L'injection des différentes doses de venin est effectuée par voie sous-cutanée, au niveau de la peau dorsale des souris. Le diamètre de la zone hémorragique est ensuite mesuré deux heures après l'injection selon la méthode de Kondo et coll., (1960) modifiée par Ownby et coll., (1984).

T : correspond au Témoin ; **A, B, C, D, E, F et G :** Venin de *Vipera lebetina* aux doses de 5, 10, 20, 40, 80, 160 et 320 μg respectivement.

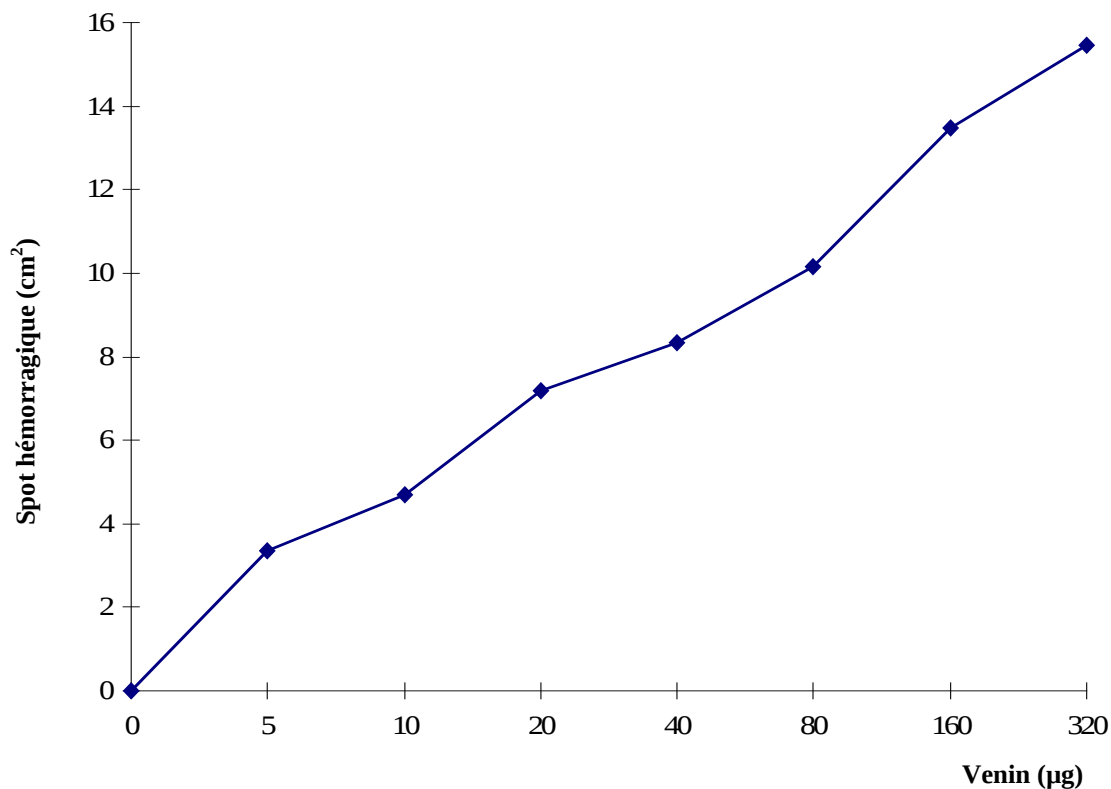


Figure 12 : Courbe dose-réponse de l'activité hémorragique du venin de *Vipera lebetina*.

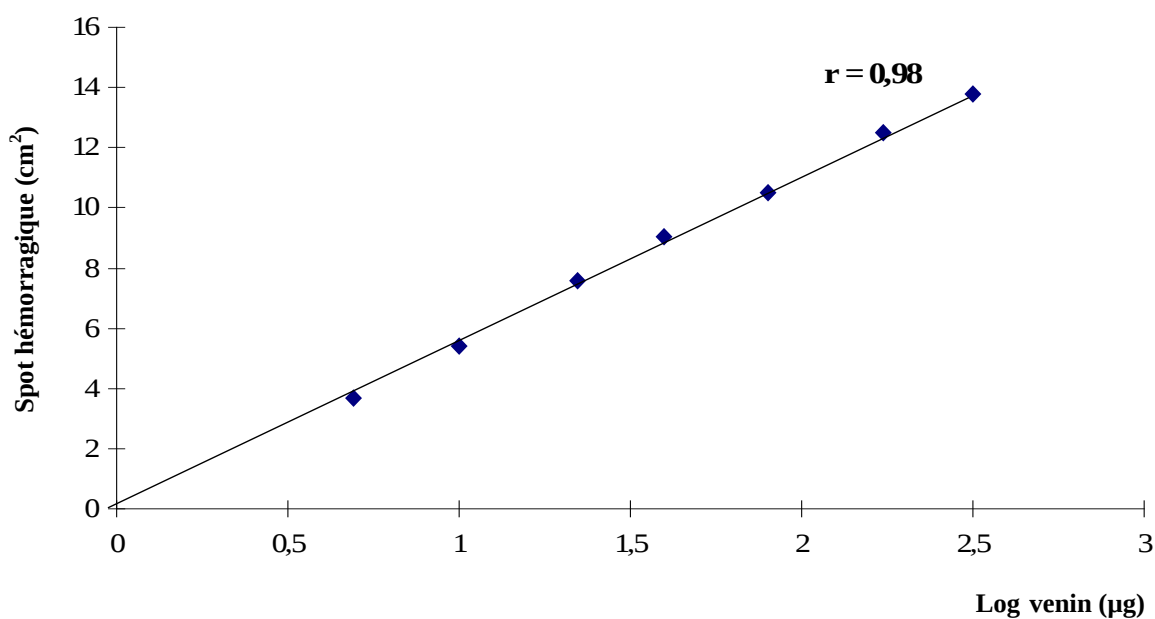


Figure 13 : Variation de l'activité hémorragique en fonction du logarithme des doses de venin de *Vipera lebetina*.

$$r : \text{coefficient de corrélation} = r = \frac{\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x - \bar{x})^2 \sum (y - \bar{y})^2}}$$

x : Log [venin]

y : Diamètre du spot hémorragique

$\bar{x}$: Moyenne du log [venin]

$\bar{y}$: Moyenne du diamètre du spot hémorragique

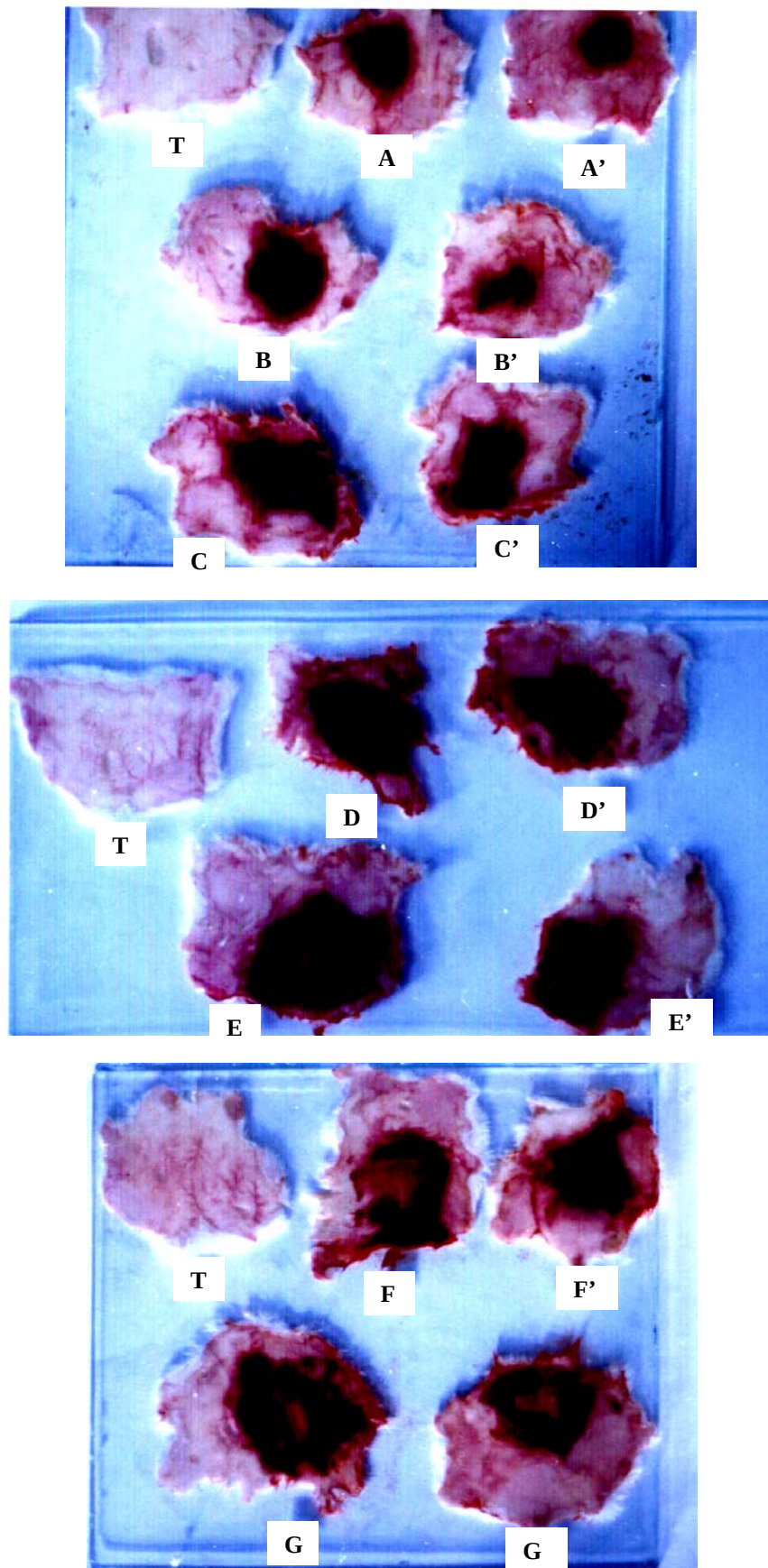


Figure 14 : Neutralisation de l'activité hémorragique induite par le venin de *Vipera lebetina*.
T : correspondent aux témoins.

A, B, C, D, E, F, et G : correspondent aux venin de *Vipera lebetina* aux doses de 5, 10, 20, 40, 80, 160 et 320 µg respectivement.

A', B', C', D', E', F' et G' : correspondent aux venin de *Vipera lebetina* aux doses de 5, 10, 20, 40, 80, 160 et 320 µg pré-incubées respectivement avec l'immun-sérum anti-vipérin.

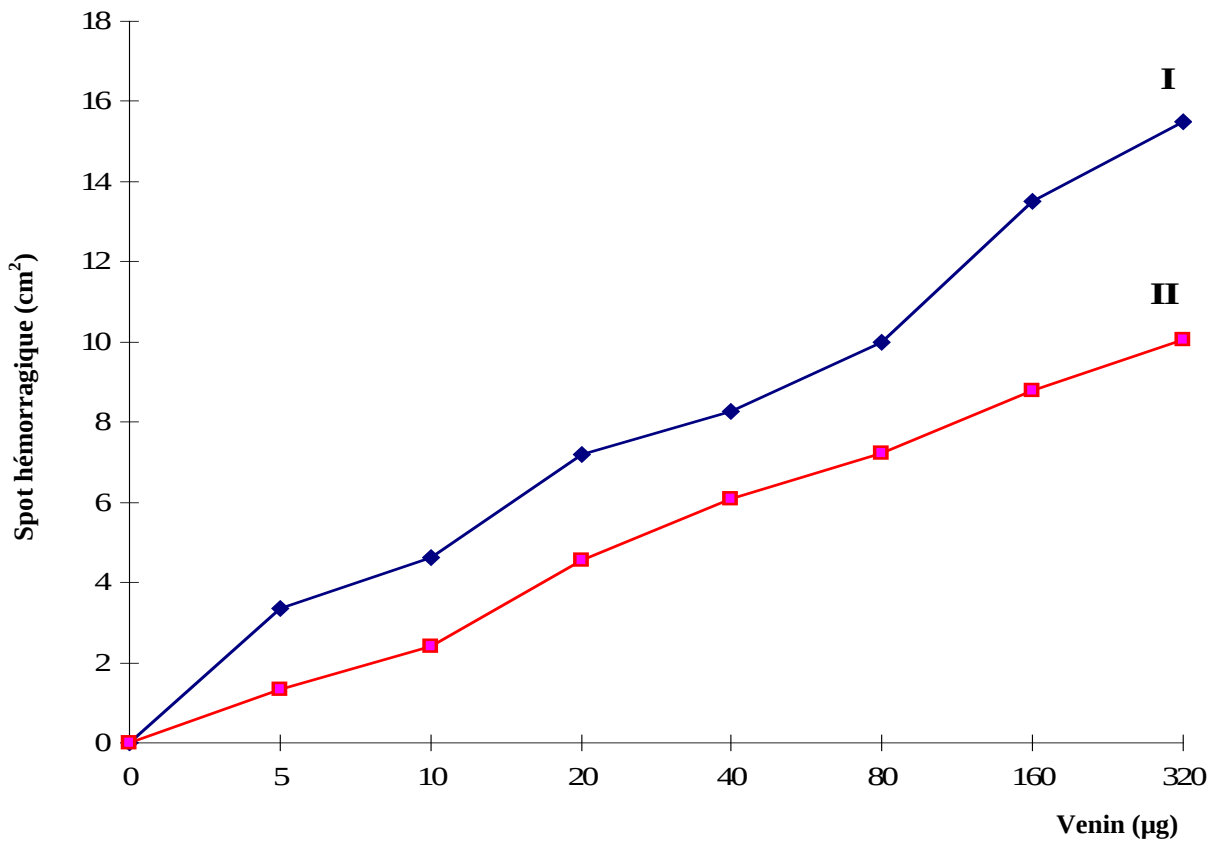


Figure 15 : Effet du sérum anti-vipérin sur l'activité hémorragique du venin de *Vipera lebetina*.

Les mélanges constitués de venin à différentes doses et d'anti-venin (V/V) sont préincubés à 37°C pendant 30 min. L'effet hémorragique est déterminé 2 heures après injection de ce mélange au niveau de la région dorsale des souris.

I : Activité hémorragique du venin de *Vipera lebetina*.

II : Activité hémorragique du venin de *Vipera lebetina* après traitement par l'immun-sérum anti-vipérin.

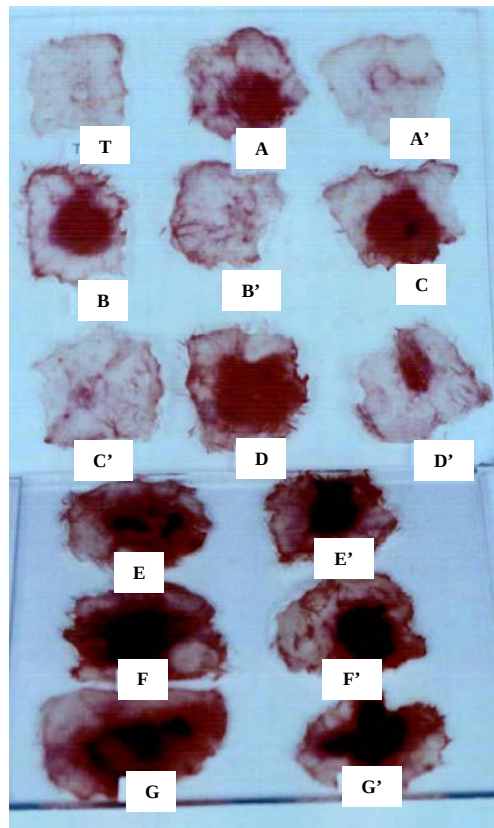


Figure 16a : Inhibition de l'activité hémorragique du venin de *Vipera lebetina* par l'EDTA (10 mM).

T : correspond au témoin.

A, B, C, D, E, F et G : correspondent aux différentes doses de venin de *Vipera lebetina* (5, 10, 20, 40, 80, 160 et 320 μg respectivement).

A', B', C', D', E', F' et G' : correspondent aux différentes doses de venin de *Vipera lebetina* (5, 10, 20, 40, 80, 160 et 320 μg respectivement) traitées par l'EDTA (10 mM).

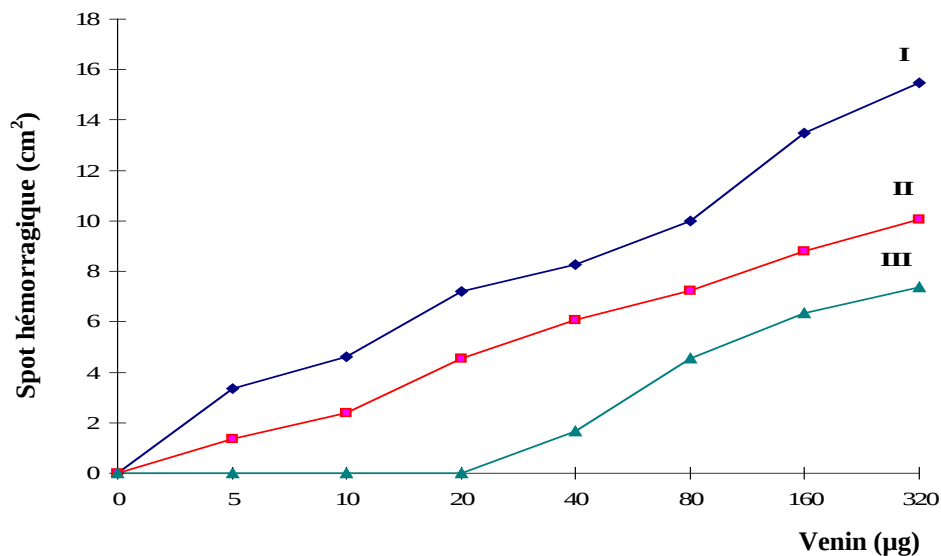


Figure 16b : Effet de l'immun-sérum anti-vipérin et de l'EDTA sur l'activité hémorragique du venin de *Vipera lebetina*.

I : Activité hémorragique du venin de *Vipera lebetina*.

II : Activité hémorragique du venin de *Vipera lebetina* après traitement avec l'immun-sérum anti-vipérin (volume /volume).

III : Activité hémorragique du venin de *Vipera lebetina* après traitement avec l'EDTA (10 mM) (volume/volume).

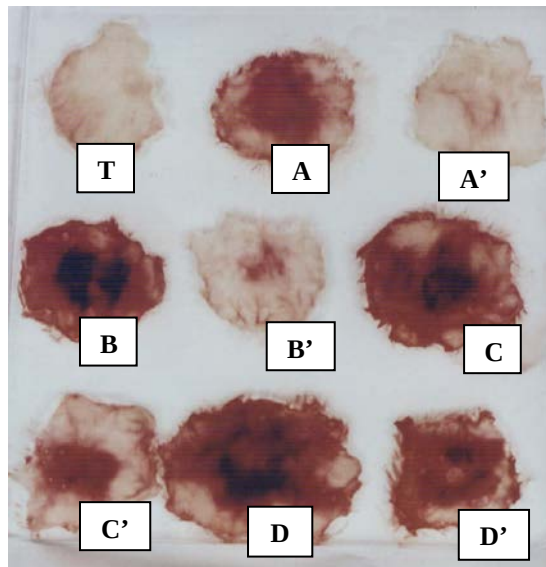


Figure 17 : Effet inhibiteur de l'EDTA (20 mM) sur l'activité hémorragique du venin de *Vipera lebetina*.

T : correspond au témoin

A, B, C et D : correspondent aux venins de *Vipera lebetina* aux doses de 40, 80, 160 et 320 µg respectivement

A', B', C' et D' : correspondent aux venin de *Vipera lebetina* aux doses de 40, 80, 160 et 320 µg respectivement par l'EDTA (20 mM).

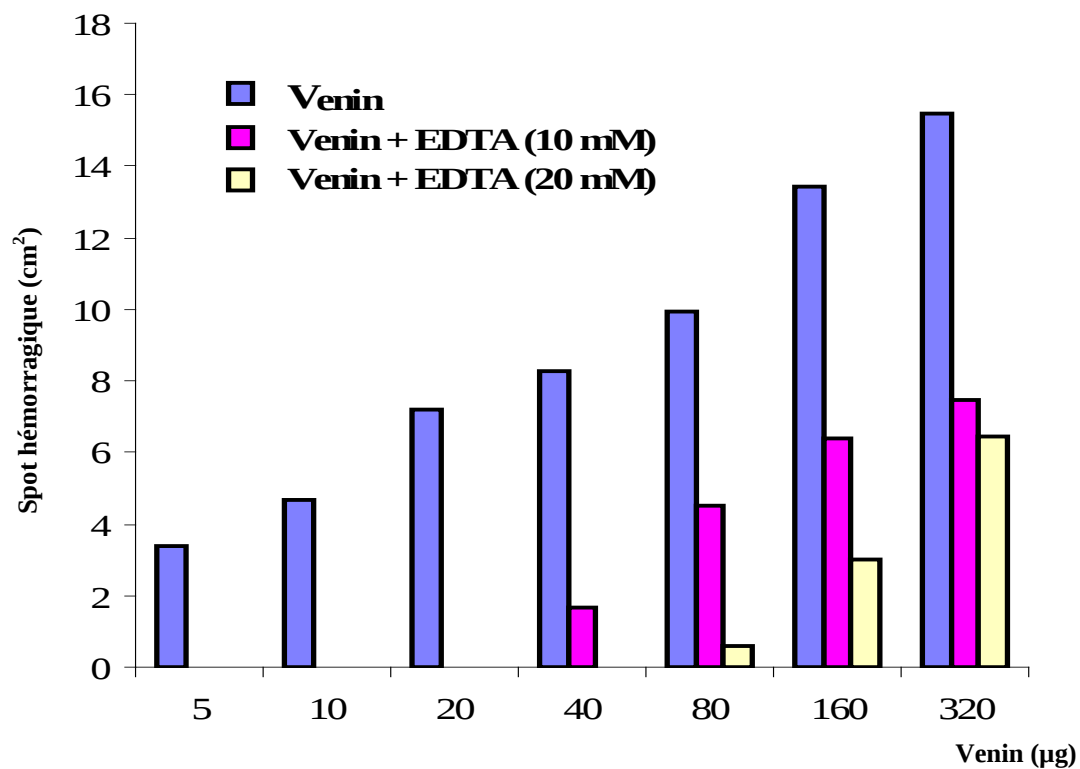


Figure 18 : Activité hémorragique du venin de *Vipera lebetina* et son inhibition par l'EDTA (10 et 20 mM).

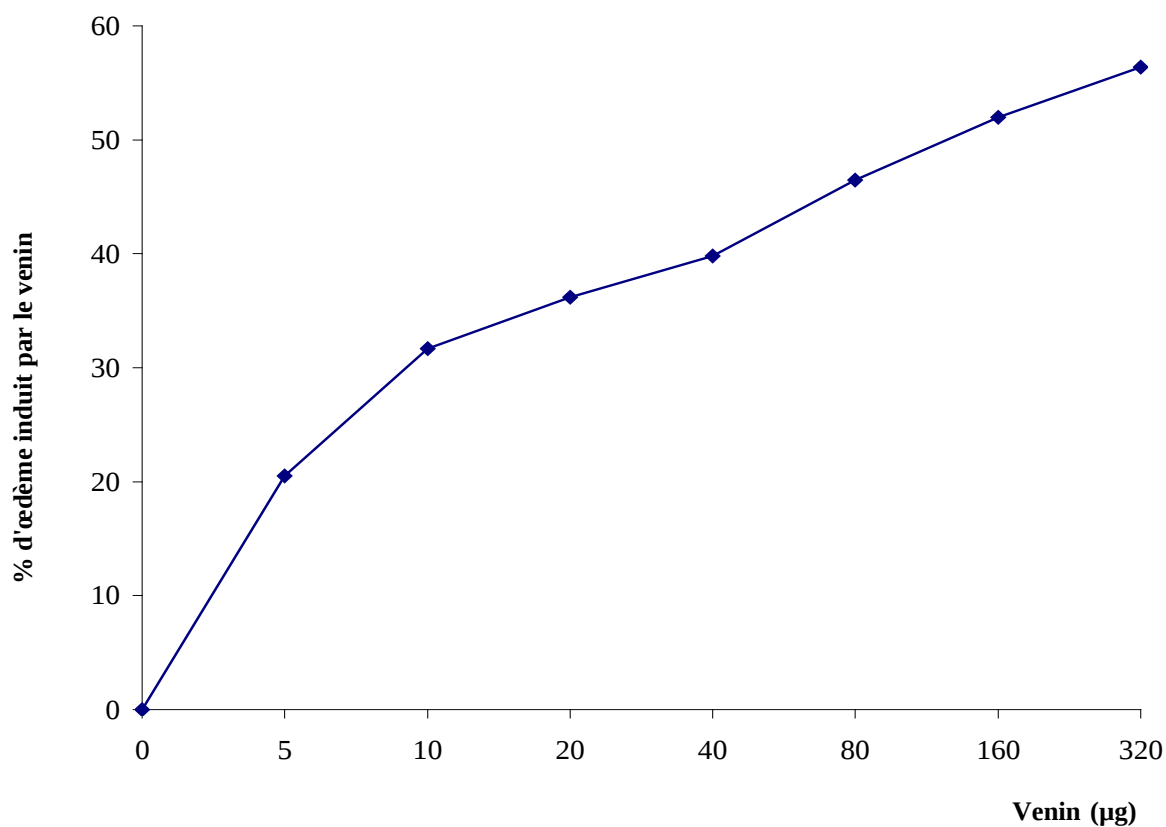


Figure 19 : Effet dose-réponse de l'activité oedématisante du venin de *Vipera lebetina*.

Chaque dose de venin est injectée par voie intramusculaire au niveau de la patte droite de la souris. La patte gauche reçoit une injection de NaCl à 9 ‰. Cette patte servira de témoin. Deux heures après l'injection, les souris sont sacrifiées et les deux pattes sont prélevées et pesées.

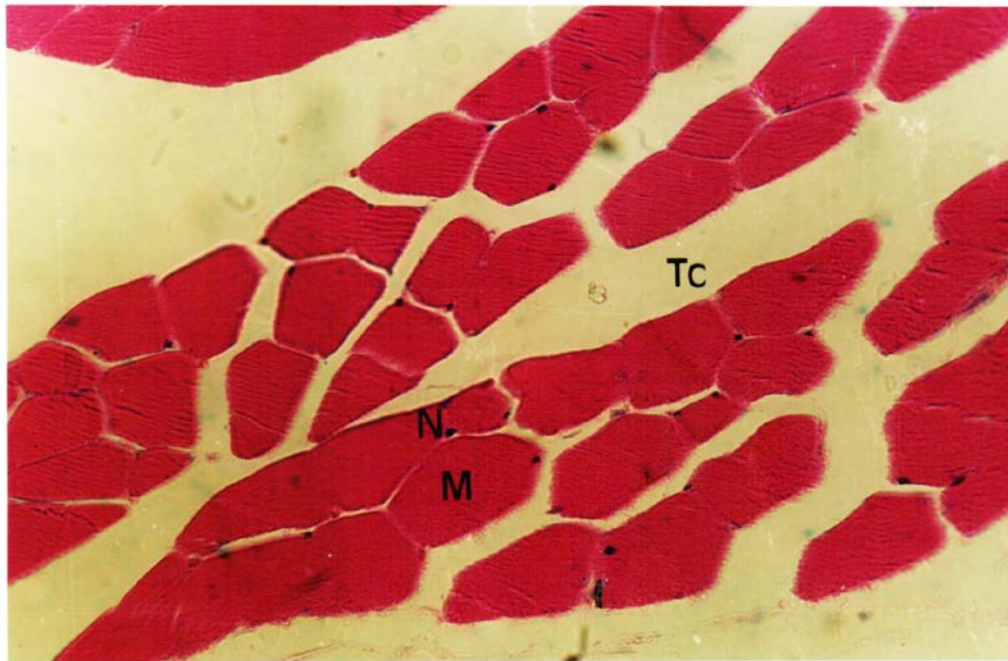


Figure 20 : Aspect histologique du tissu musculaire, en coupe transversale, des souris témoins.

Coloration : Mann-Dominici ; Grossissement : $\times 40$

M : Cellule musculaire

N : Noyau

Tc : Tissu conjonctif

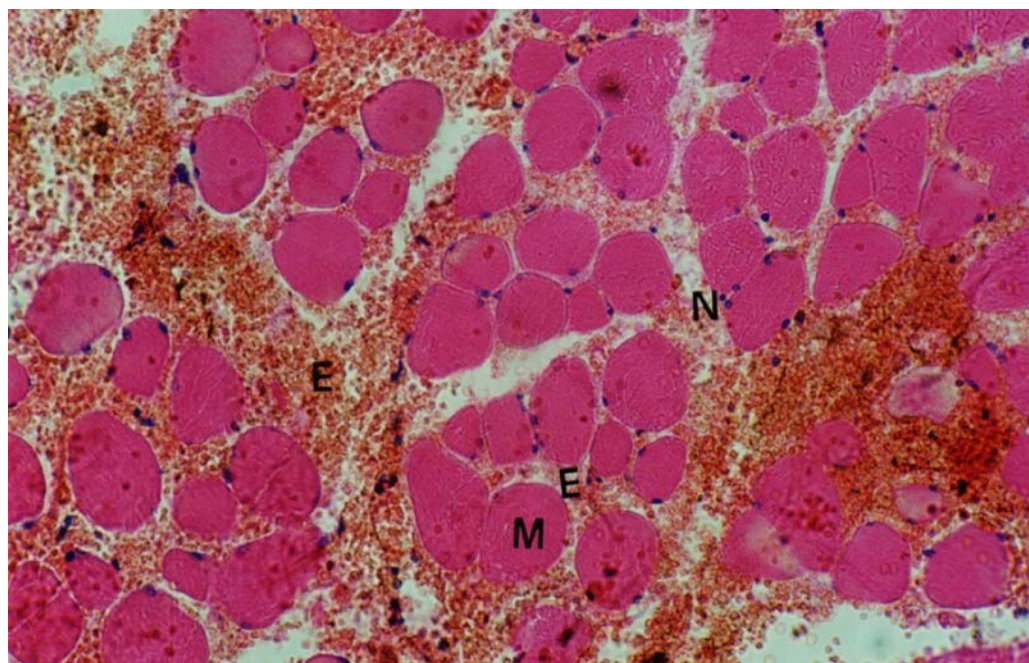


Figure 21 : Aspect histologique du tissu musculaire, en coupe transversale, 5 min après l'injection du venin de *Vipera lebetina* (100 μg).

Coloration : Mann-Dominici ; Grossissement : $\times 40$

M : Cellule musculaire

N : Noyau

E : Erythrocytes

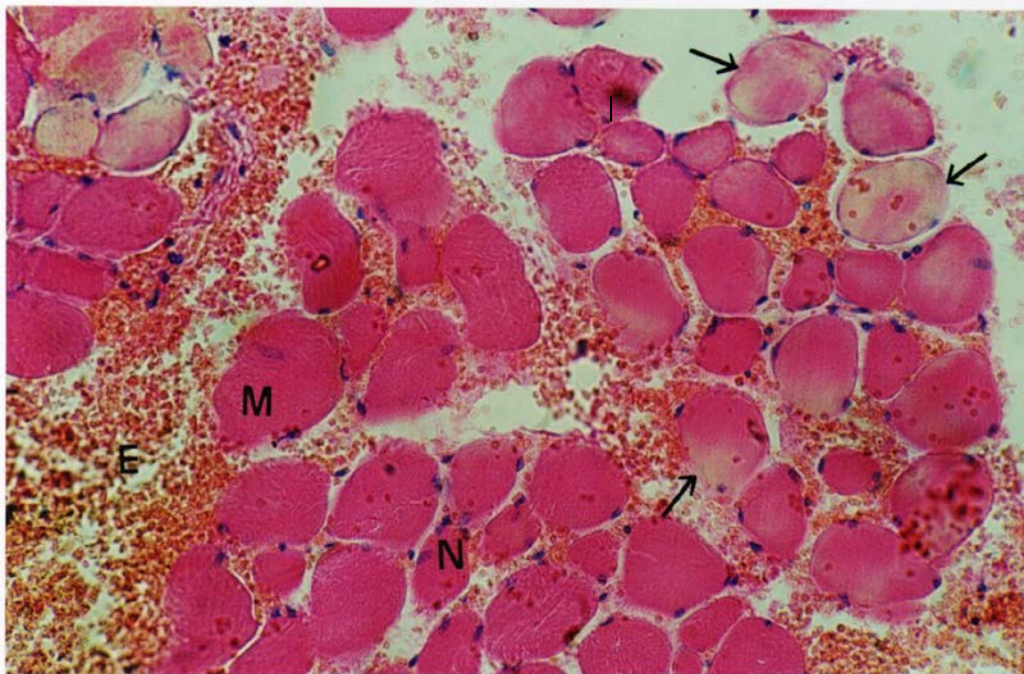


Figure 22 : Aspect histologique du tissu musculaire, en coupe transversale, 15 min après l'injection du venin de *Vipera lebetina* (100 µg).

Coloration: Mann-Dominici ; Grossissement: × 40

M: Cellule musculaire

N: Noyau

E: Erythrocytes

Les flèches (→) indiquent la présence de cellules musculaires pâles

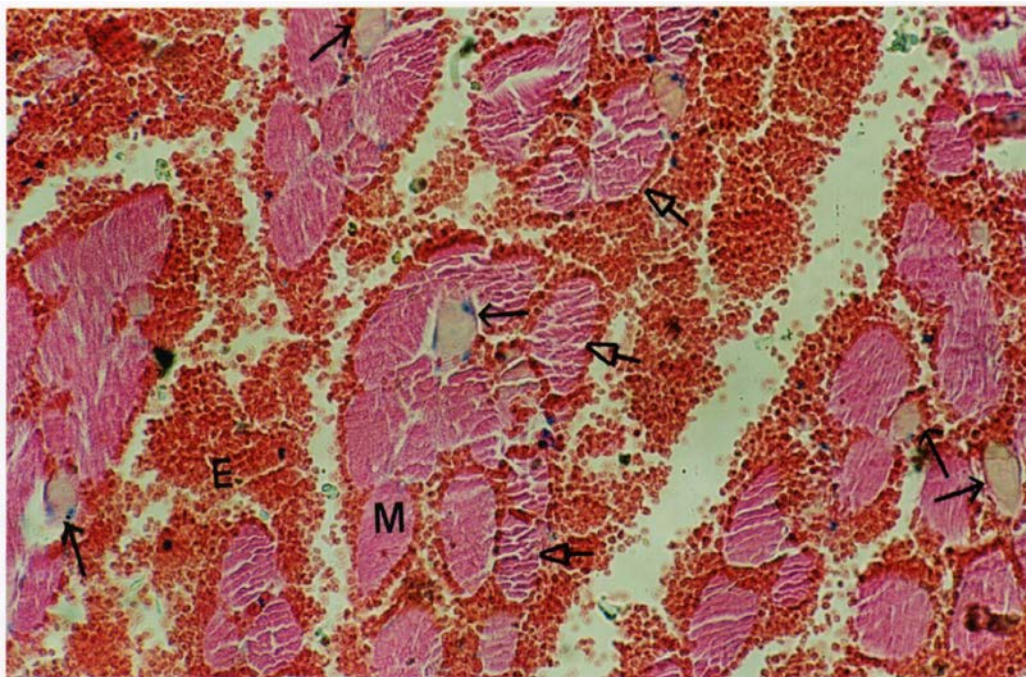


Figure 23 : Aspect histologique du tissu musculaire, en coupe transversale, 30 min après l'injection du venin de *Vipera lebetina* (100 µg).

Coloration : Mann-Dominici ; Grossissement : × 40

M : Cellule musculaire

E : Erythrocytes

Les flèches indiquent la présence de cellules musculaires pâles (→) et de cellules musculaires désorganisées (→▸)

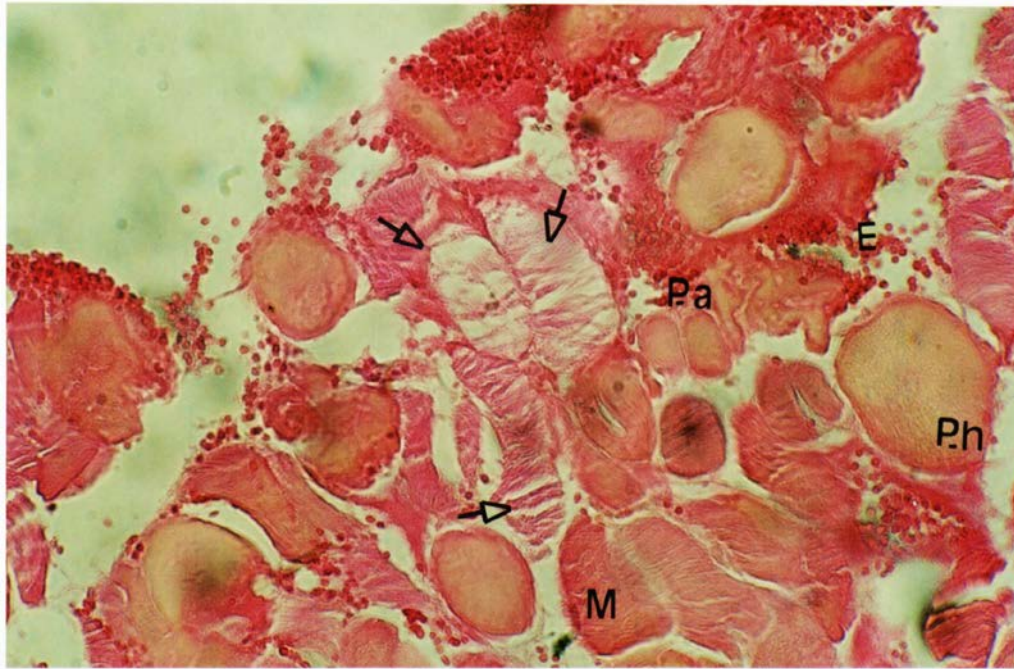


Figure 24a : Aspect histologique du tissu musculaire, en coupe transversale, 1 h après l'injection du venin de *Vipera lebetina* (100 µg).

M : Cellule musculaire

E : Erythrocytes

Ph : Cellule musculaire pâle hypertrophiée

Pa : Cellules musculaires pâles atrophiées

Les flèches (→) indiquent la présence de cellules musculaires nécrosées

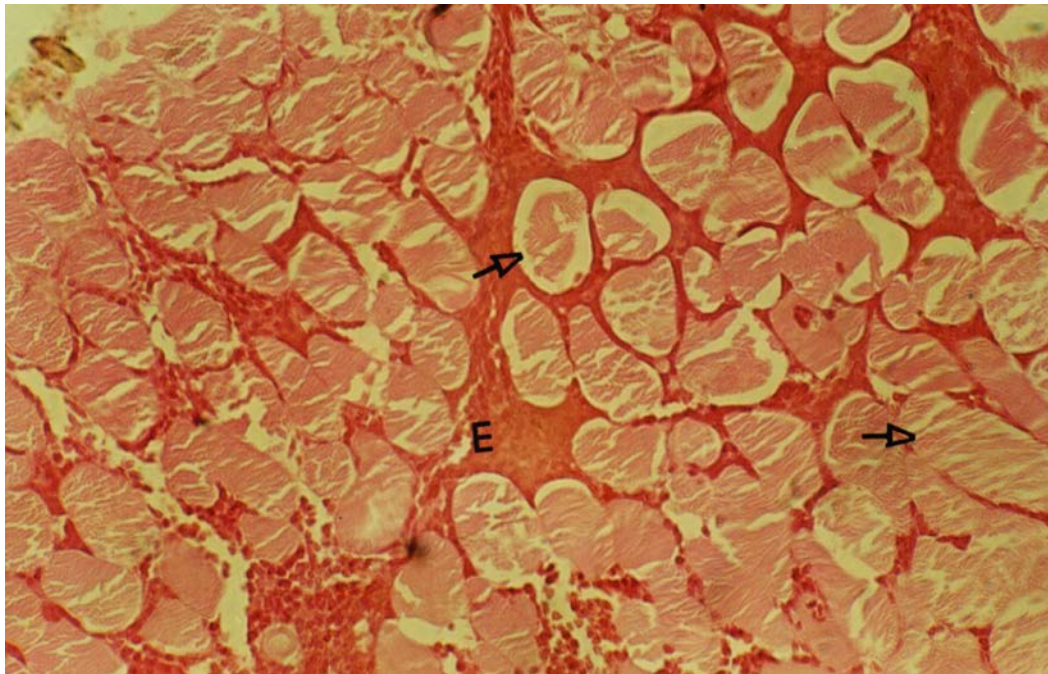


Figure 24b : Aspect histologique du tissu musculaire, en coupe transversale, 1 h après l'injection du venin de *Vipera lebetina* (100 µg).

Coloration : Mann-Dominici ; Grossissement : × 40

E : Erythrocytes

Les flèches (→) indiquent la présence d'une importante région de nécrose de coagulation au sein du tissu musculaire

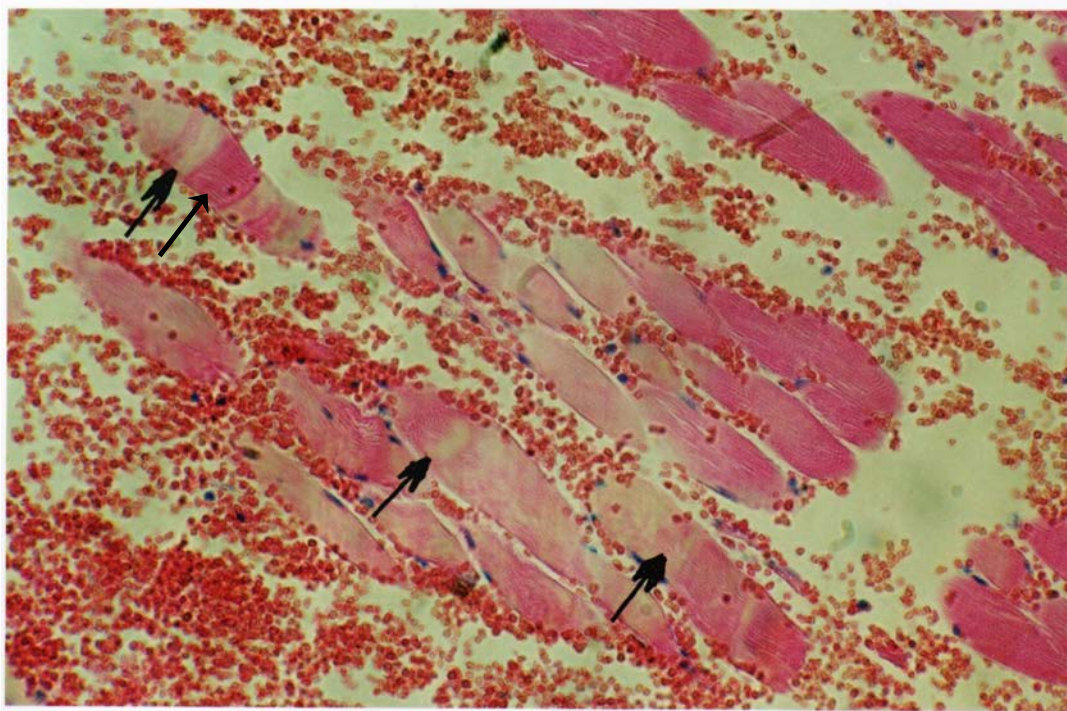


Figure 25a : Aspect histologique du tissu musculaire, en coupe transversale, 3 h après l'injection du venin de *Vipera lebetina* (100 µg). Les flèches (→) indiquent la présence de cellules musculaires ayant Conservées une zone de myofibrilles non endomagées

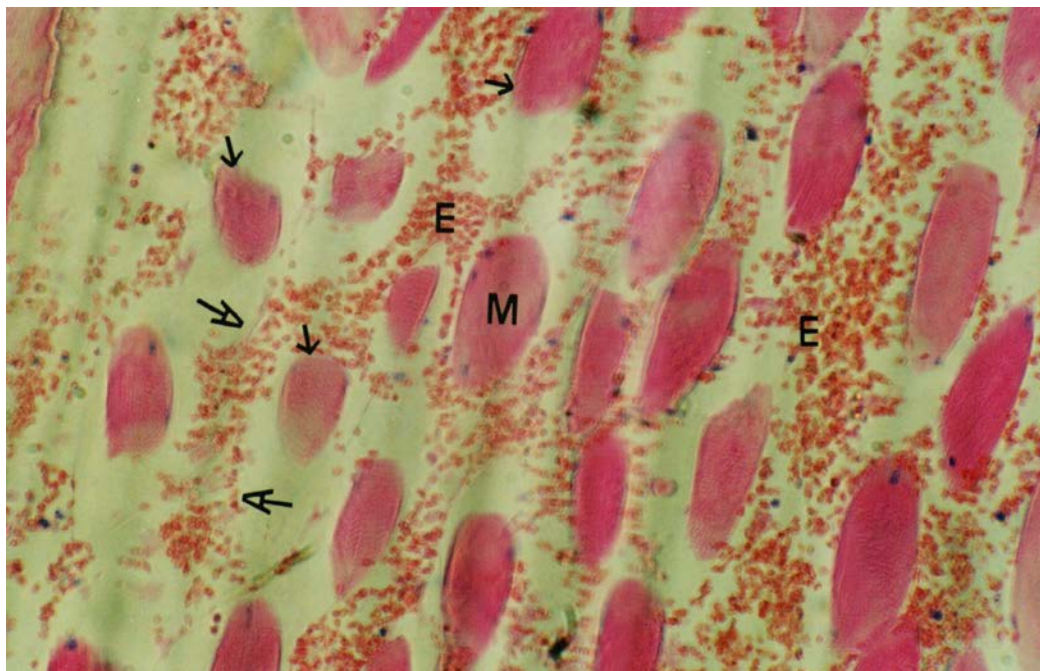


Figure 25b : Aspect histologique du tissu musculaire, en coupe transversale, 3 h après l'injection du venin de *Vipera lebetina* (100 µg). Coloration: Mann-Dominici ; Grossissement: × 40

M: Cellule musculaire

E: Erythrocytes

Les flèches indiquent une condensation des myofibrilles des cellules musculaires (→). Ces cellules ont un contour cellulaire parfaitement délimité (—▷)

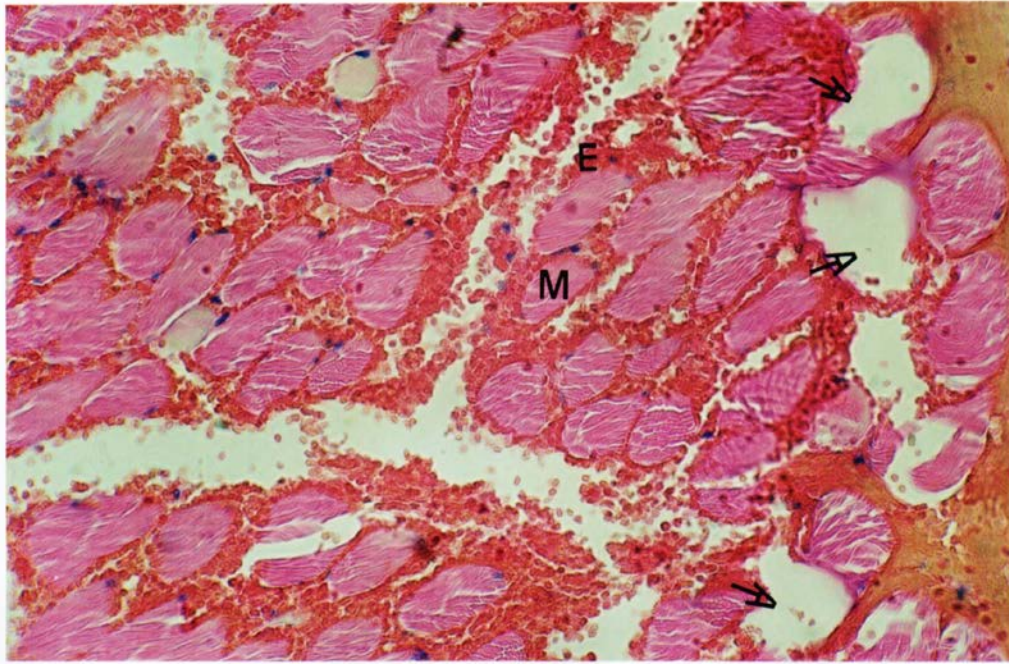


Figure 25c : Aspect du tissu musculaire, en coupe transversale, 3 h après l'injection du venin de *Vipera lebetina* (100 µg).

M : Cellule musculaire

E : Erythrocytes

Les flèches (—▷) indiquent la présence de cellules musculaires vides

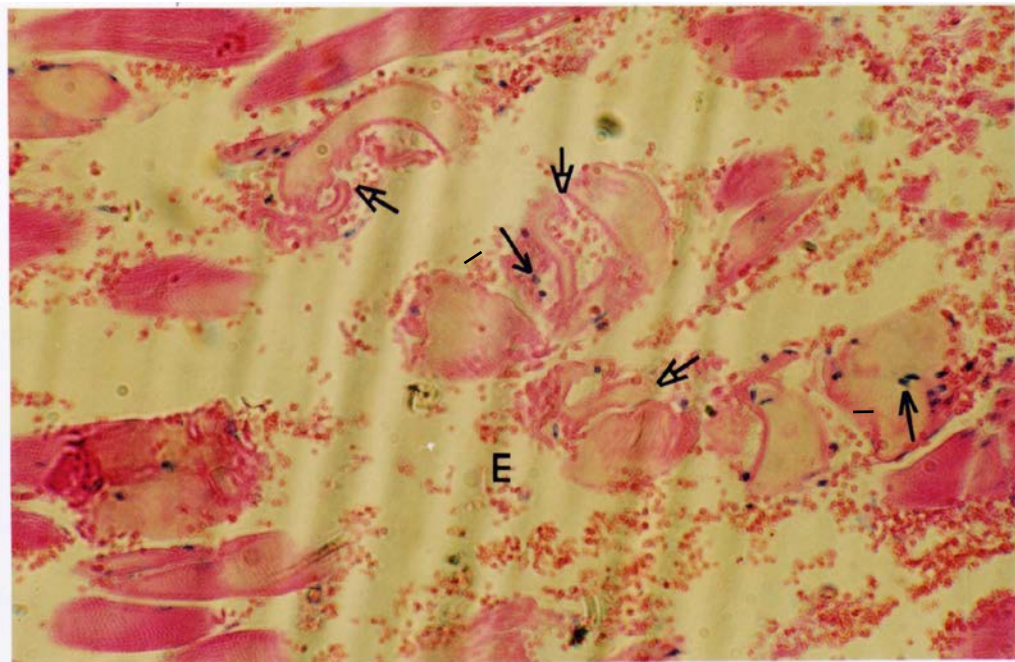


Figure 25d : Aspect du tissu musculaire, en coupe transversale, 3 h après l'injection du venin de *Vipera lebetina* (100 µg)

Coloration : Mann-Dominici ; Grossissement : × 40

E : Erythrocytes

Les flèches (—▷) montrent une lyse des cellules musculaires

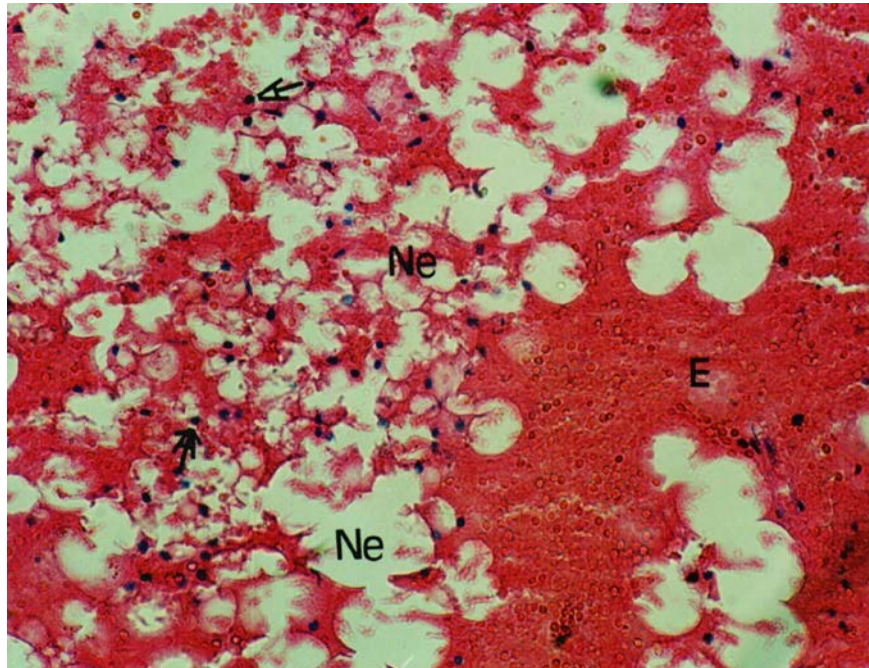


Figure 26 : Aspect du tissu musculaire, en coupe transversale, 24 h après l'injection du venin de *Vipera lebetina* (100 µg).

Coloration : Mann-Dominici : Grossissement : × 40

Ne: Tissu musculaire nécrosé

E: Erythrocytes

Les flèches (—▷) indiquent la présence des polynucléaires neutrophiles au sein du tissu musculaire

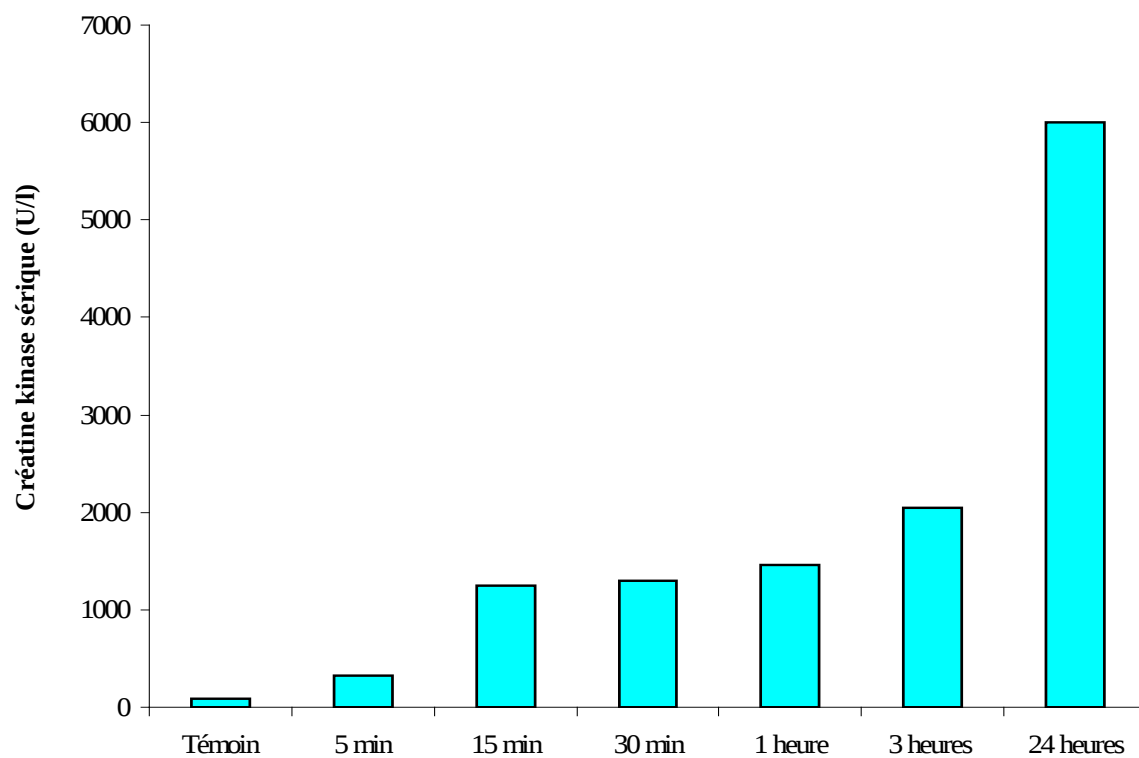


Figure 27 : Evolution du taux sérique de la créatine kinase après injection intramusculaire d'une dose de 100 µg de venin de *Vipera lebetina*.

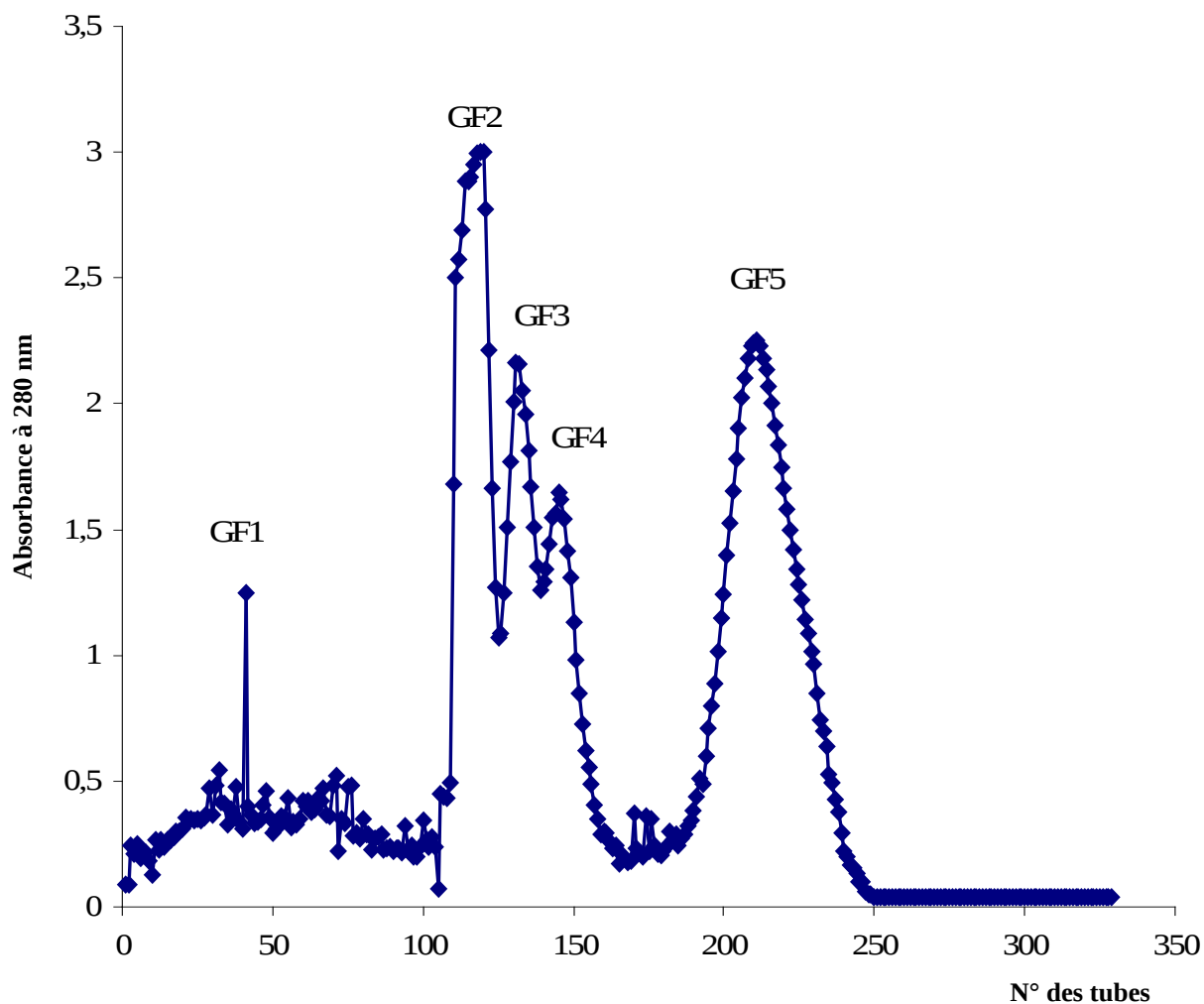


Figure 28 : Chromatographie d'exclusion moléculaire sur Sephadex G-75 du venin de *Vipera lebetina* (1g) utilisant une colonne Pharmacia (5,5 × 50 cm) et un tampon d'élution d'AcNH₄ 0,1 M, pH 8,5. Le débit est maintenu constant à 20 ml/h.

Les fractions GF2, GF3 et GF4 présentent une activité hémorragique.

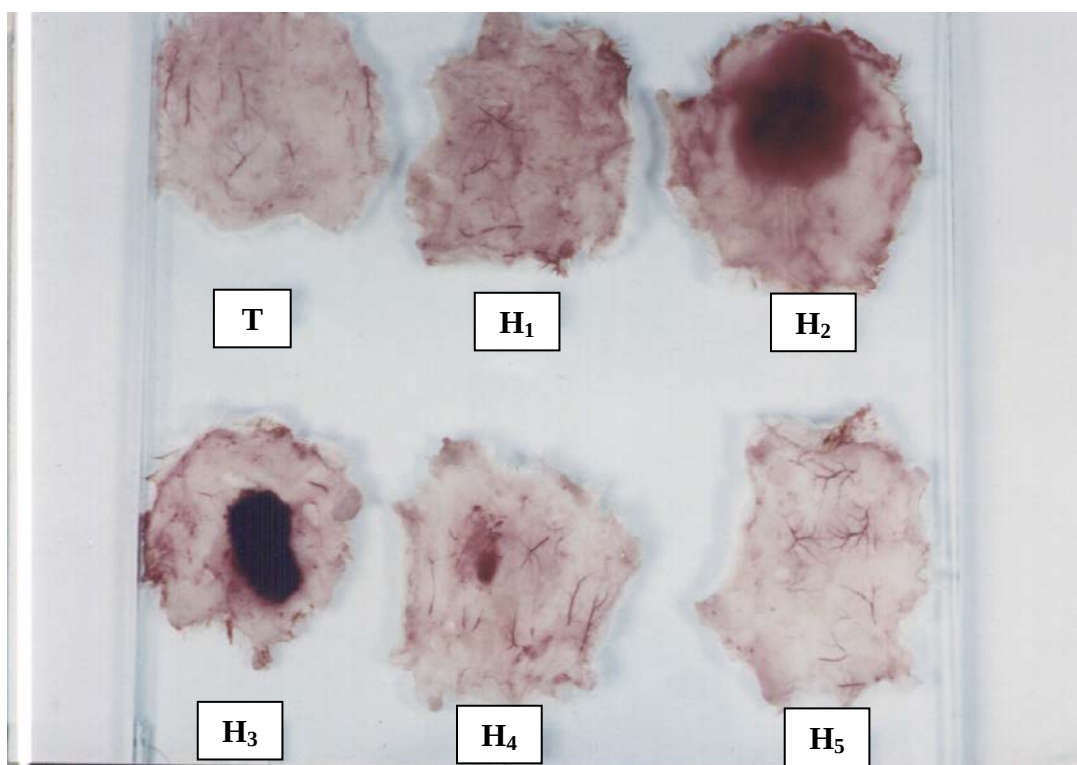


Figure 29 : Mise en évidence de l'activité hémorragique dans les fractions issues de la chromatographie d'exclusion moléculaire du venin de *Vipera lebetina*.

T : correspond au témoin ; **H₁, H₂, H₃, H₄ et H₅** : correspondent respectivement aux fractions GF1, GF2, GF3, GF4 et GF5 (0,54 UDO/ml) injectées, par voie sous cutanée, au niveau de la peau dorsale des souris. L'activité hémorragique, pour chacune de ces fractions a été ensuite recherchée 2 heures après l'injection.

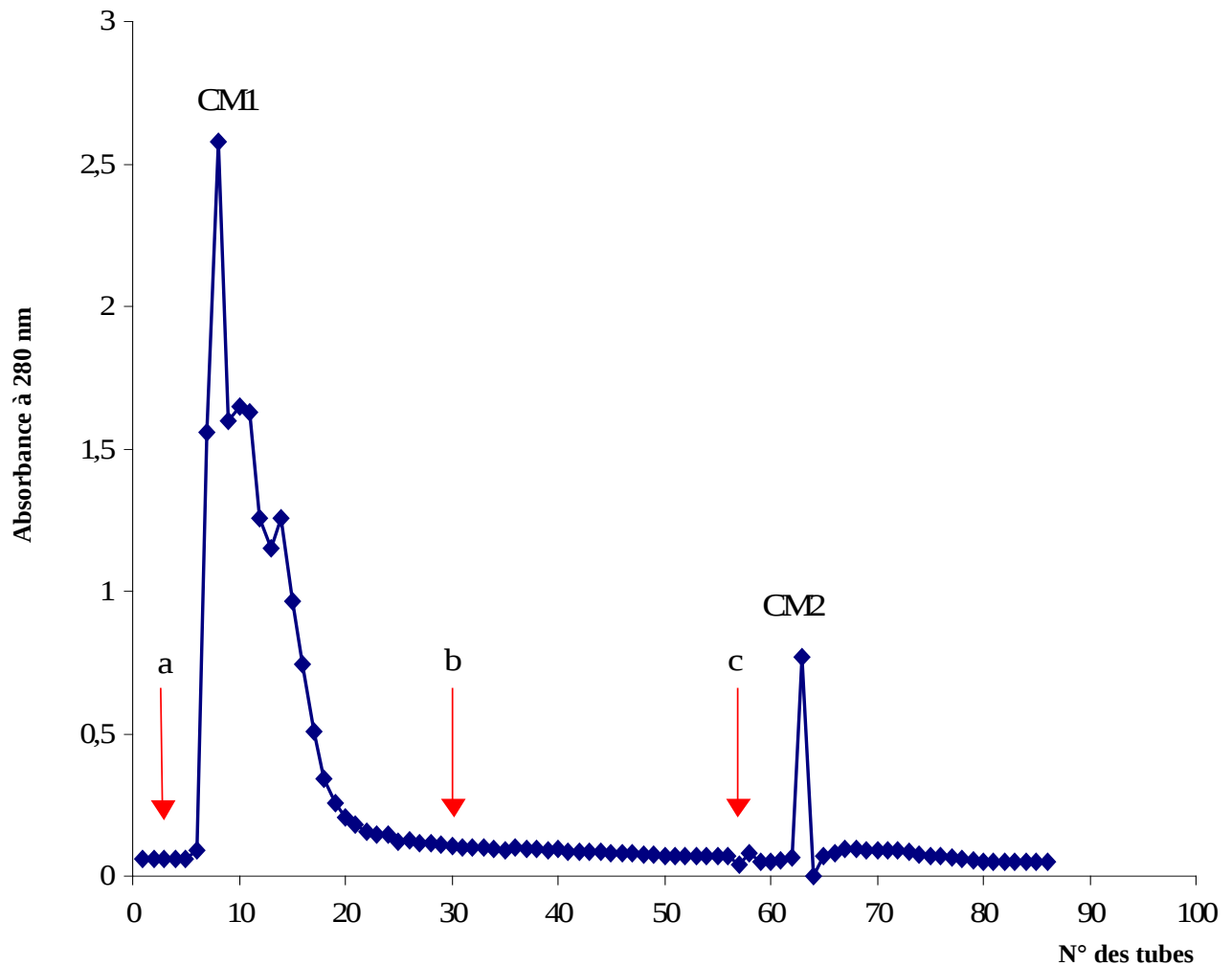


Figure 30 : Chromatographie échangeuse de cations sur CM Sephadex C-50 de la fraction GF2 (200 UDO) obtenue par filtration moléculaire sur Sephadex G-75 du venin brut de *Vipera lebetina*, utilisant une colonne Whatman (2,5 × 20 cm) et un tampon d'élution d'AcNH₄ 0,1 M, pH 5 (a), suivi d'un gradient linéaire d'AcNH₄ allant de 0,1 M à 0,5 M, pH 5 (b) et d'une élution à l'équilibre avec un tampon d'AcNH₄ 1 M, pH 5 (c). Le débit est maintenu constant à 24 ml/h.

Les fractions CM1 et CM2 présentent une activité hémorragique.

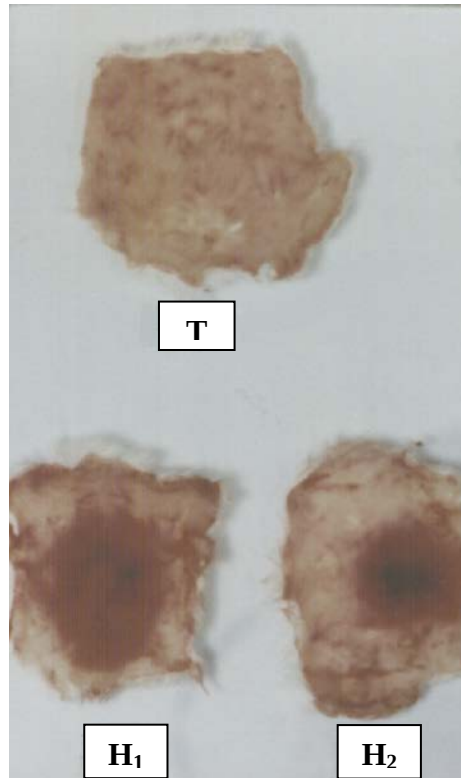


Figure 31 : Mise en évidence de l'activité hémorragique dans les fractions CM1 et CM2 issues de la chromatographie échangeuse de cations sur CM Sephadex C-50 de la fraction GF2.

T : correspond au témoin ; **H₁ et H₂ :** correspondent respectivement aux fractions CM1 et CM2 (0,54 UDO/ml) injectées, par voie sous cutanée, au niveau de la peau dorsale des souris. L'activité hémorragique de ces fractions a été évaluée 2 heures après l'injection à la souris.

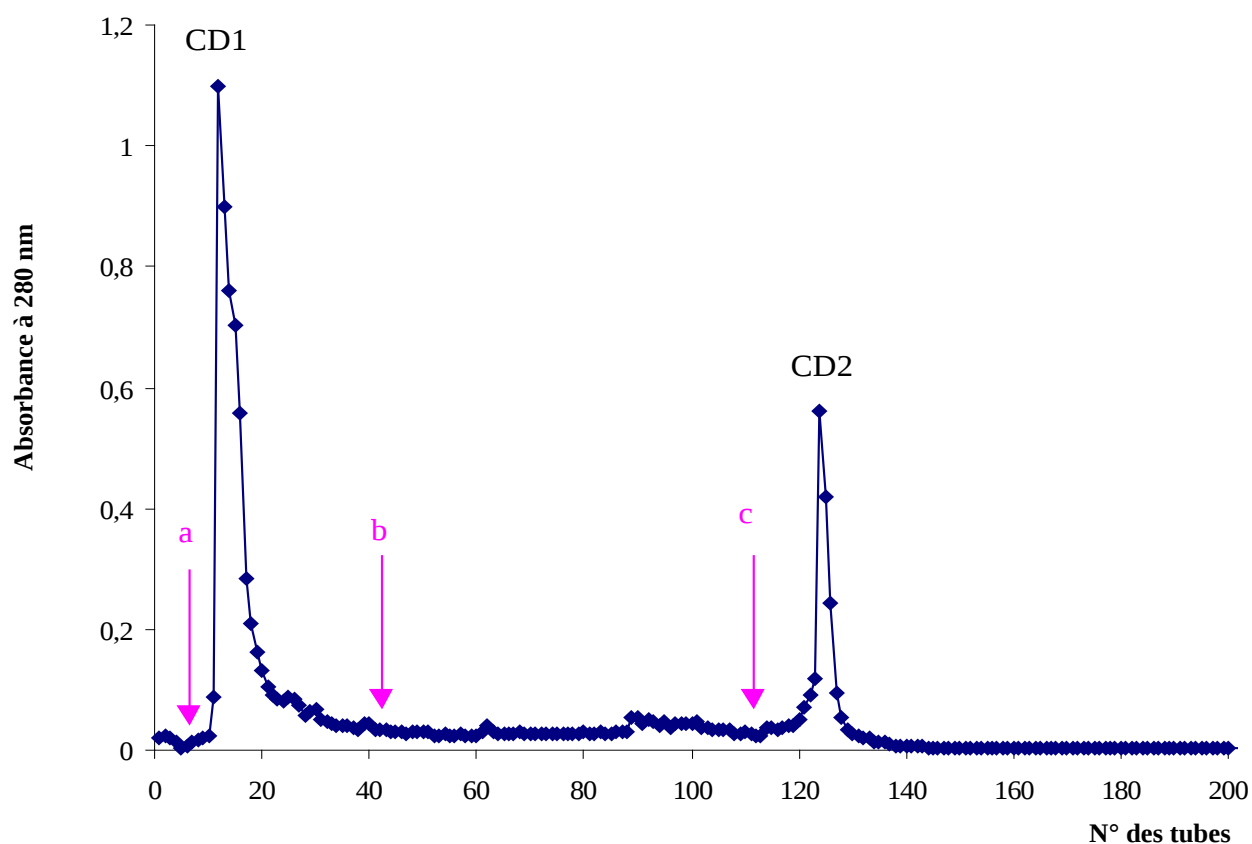


Figure 32 : Chromatographie échangeuse d'anions sur DEAE Sephadex A-50 de la fraction CM1 (50 UDO) issue de la chromatographie échangeuse de cations sur CM Sephadex C-50 de la fraction GF2, utilisant une colonne Whatman (1,6 × 26 cm). L'élution a été réalisée en utilisant un tampon d'AcNH₄ 0,1 M, pH 8,5 (a), suivi par un gradient linéaire d'AcNH₄ allant de 0,1 M à 0,5 M, pH 8,5 (b) et d'une élution à l'équilibre avec un tampon d'AcNH₄ 2 M, pH 8,5 (c). le débit est maintenu constant à 12 ml/h.

Les fractions CD1 et CD2 présentent une activité hémorragique.

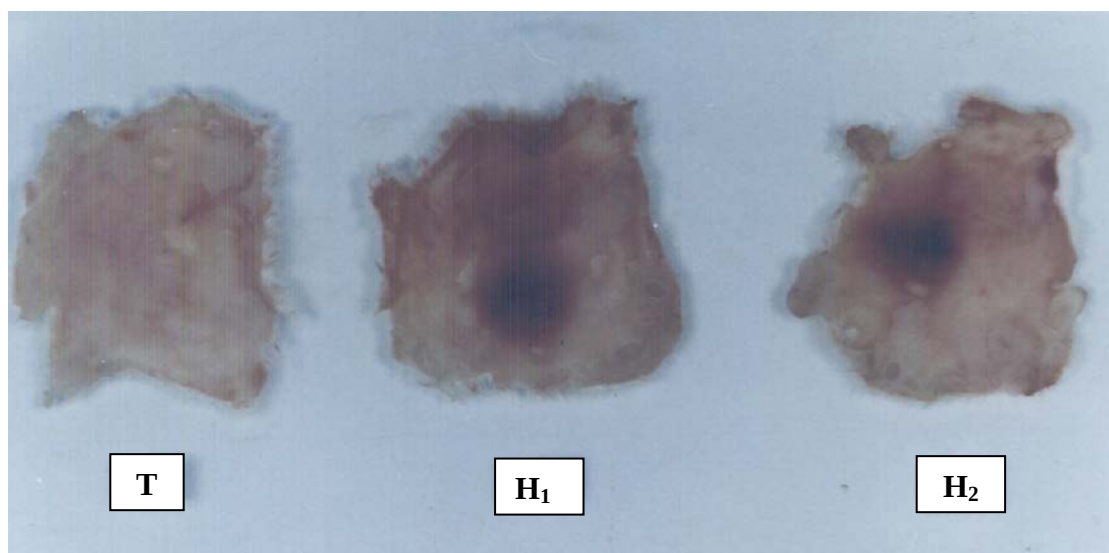


Figure 33 : Mise en évidence de l'activité hémorragique des fractions CD1 et CD2 issues de la chromatographie échangeuse d'anions sur DEAE Sephadex A-50 de la fraction CM2.

T : correspond au témoin ; **H₁ et H₂ :** correspondent respectivement aux fractions CD1 et CD2 (0,54 UDO/ml) injectées, par voie sous cutanée, au niveau de la peau dorsale des souris. L'activité hémorragique a été recherchée 2 heures après l'injection de ces fractions.

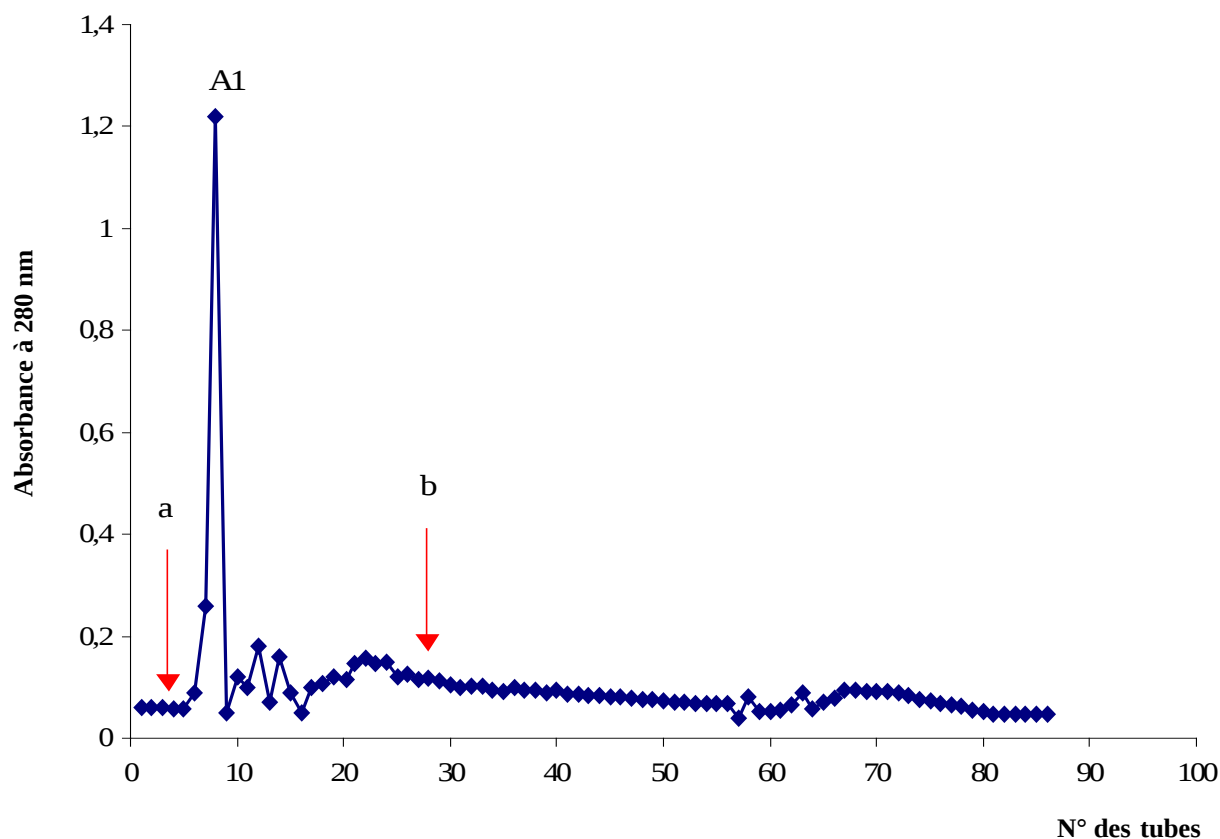


Figure 34 : Chromatographie d'affinité sur Benzamidine Sepharose 6-B de la fraction GF3 (150 UDO) issue de la chromatographie d'exclusion moléculaire du venin de *Vipera lebetina*, utilisant une colonne Pharmacia (1,6 × 7,6 cm). L'élution a été réalisée par un tampon Tris HCl 0,05 M, KCl 0,5 M, pH 8 (**a**), suivi d'un tampon Tris HCl 0,05 M, KCl 0,5 M, BAEE 0,01 M pH 8 (**b**). Le débit est maintenu constant à 5 ml/h.

La fraction A1 présente une activité hémorragique.

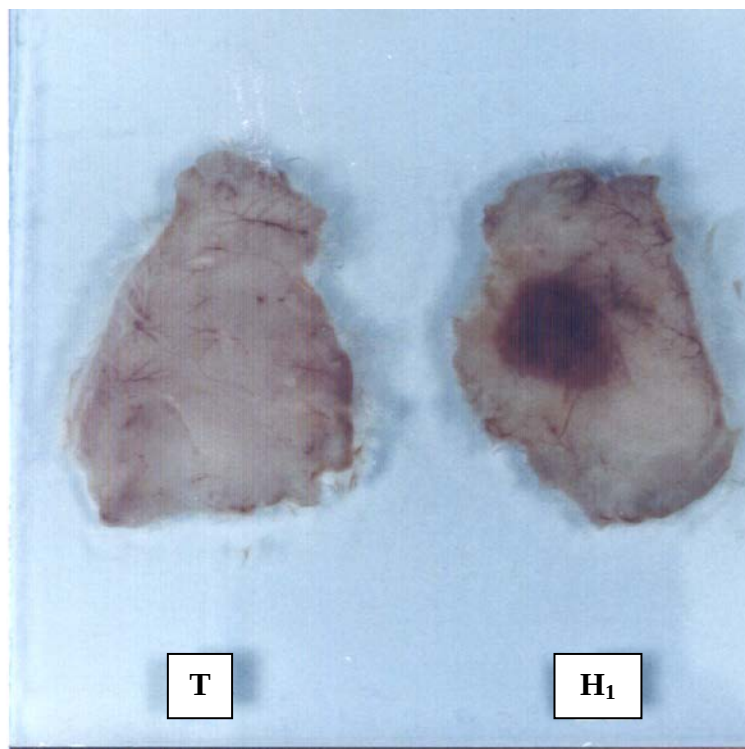


Figure 35 : Mise en évidence de l'activité hémorragique de la fraction A1 issue de la chromatographie d'affinité sur Benzamidine Sepharose 6-B de la fraction GF3.

T : correspond au témoin ; **H₁ :** correspond à la fraction A1 (0,54 UDO/ml) injectée, par voie sous cutanée, au niveau de la peau dorsale des souris. L'activité hémorragique de cette fraction a été déterminée 2 heures après l'envenimation des souris.

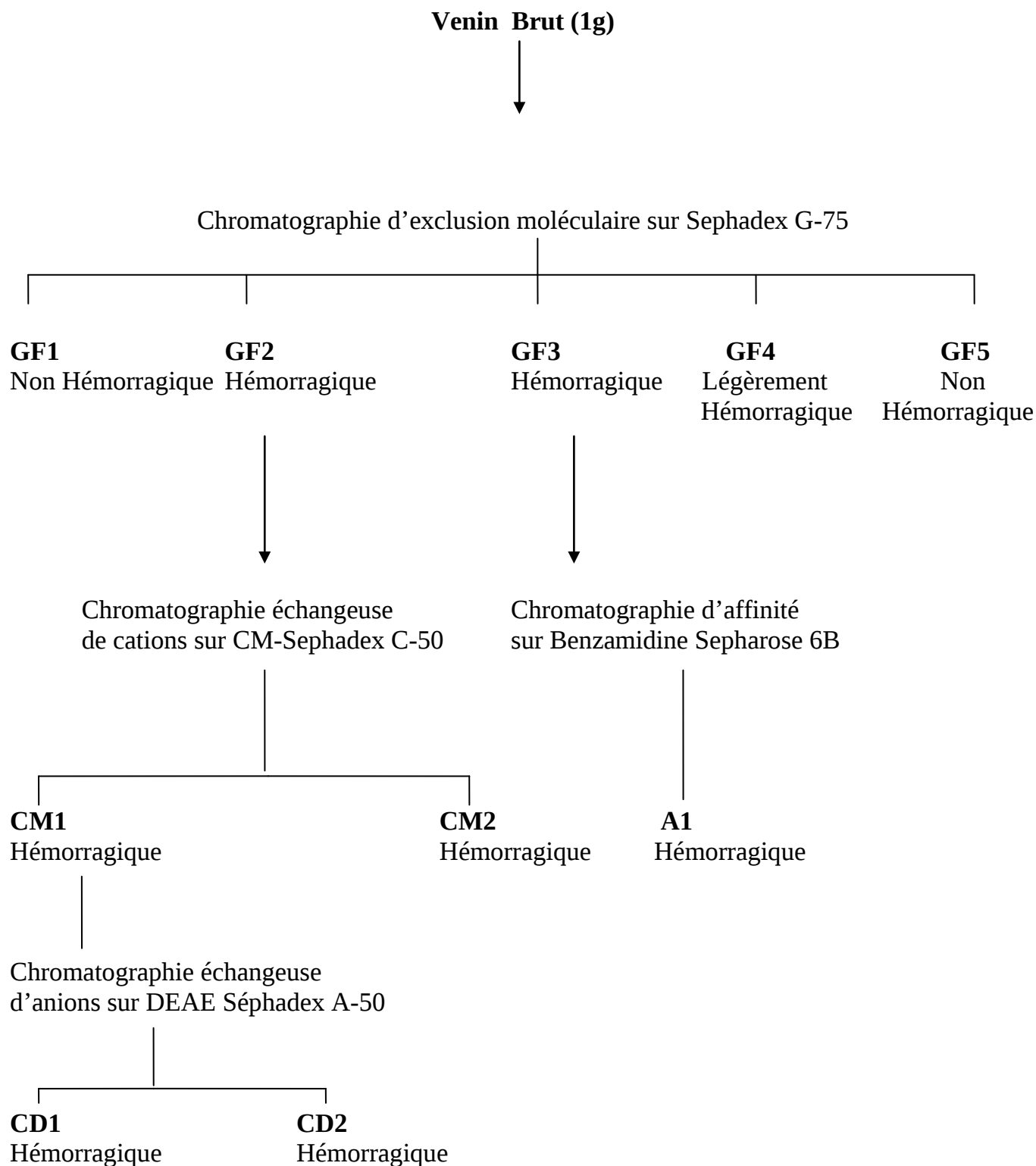


Figure 36 : Schéma récapitulatif de la purification des molécules hémorragiques à partir du venin de *Vipera lebetina*.

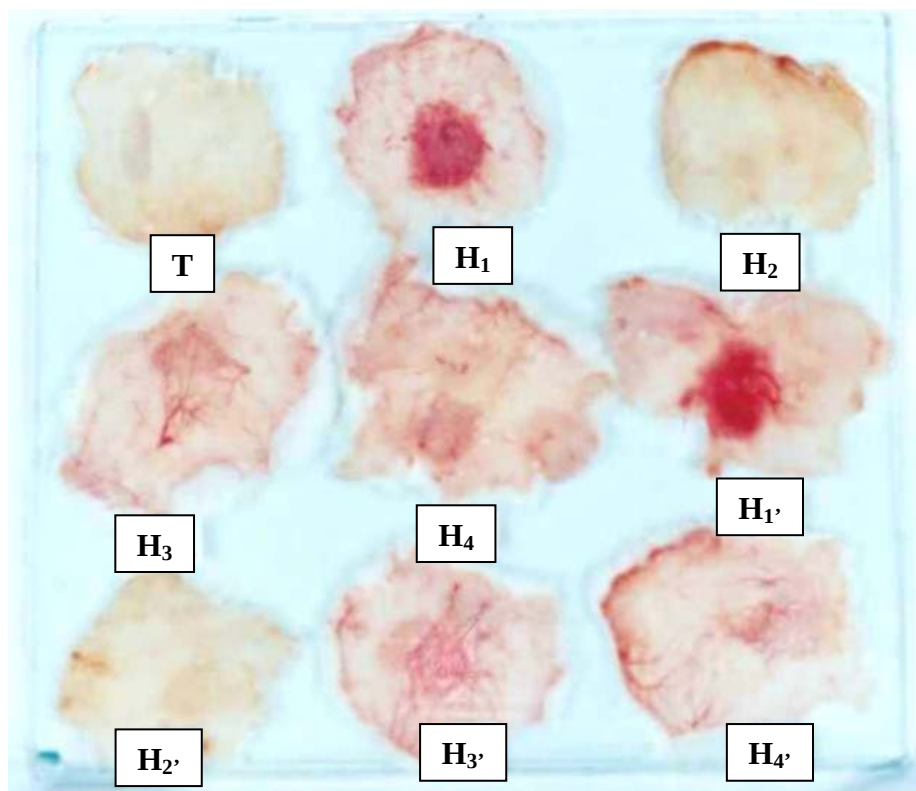


Figure 37 : Inhibition et essai de restauration de l'activité hémorragique des fractions CD1 et CD2.

T : correspond au témoin ; **H₁** : correspond à l'activité hémorragique de la fraction CD1 ; **H₂** : correspond à l'activité hémorragique de la fraction CD1 après traitement par l'EDTA (10 mM) ; **H₃** : correspond à l'activité hémorragique de la fraction CD1 après traitement par l'EDTA (10 mM) et dialyse contre le ZnCl₂ (10 mM) ; **H₄** : correspond à l'activité hémorragique de la fraction CD1 après traitement par l'EDTA (10 mM) et dialyse contre le CaCl₂.

H₁' : correspond à l'activité hémorragique de la fraction CD2 ; **H₂'** : correspond à l'activité hémorragique de la fraction CD2 après traitement par l'EDTA (10 mM) ; **H₃'** : correspond à l'activité hémorragique de la fraction CD2 après traitement par l'EDTA (10 mM) et dialyse contre le ZnCl₂ (10 mM) ; **H₄'** : correspond à l'activité hémorragique de la fraction CD2 après traitement par l'EDTA (10 mM) et dialyse contre le CaCl₂ (10 mM).

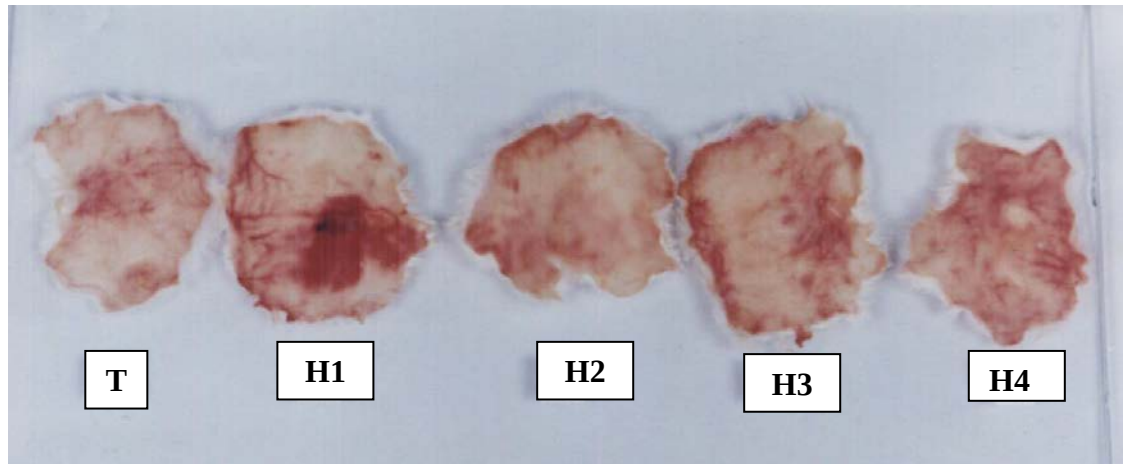


Figure 38: Inhibition et essai de restauration de l'activité hémorragique de la fraction CM2.

T : correspond au témoin ; **H1** : correspond à l'activité hémorragique de la fraction CM2 ; **H2** : correspond à l'activité hémorragique de la fraction CM2 après traitement par l'EDTA (10 mM) ; **H3** : correspond à l'activité hémorragique de la fraction CM2 après traitement par l'EDTA (10 mM) et dialyse contre le ZnCl_2 (10 mM) ; **H4** : correspond à l'activité hémorragique de la fraction CM2 après traitement par l'EDTA (10 mM) et dialyse contre le CaCl_2 .

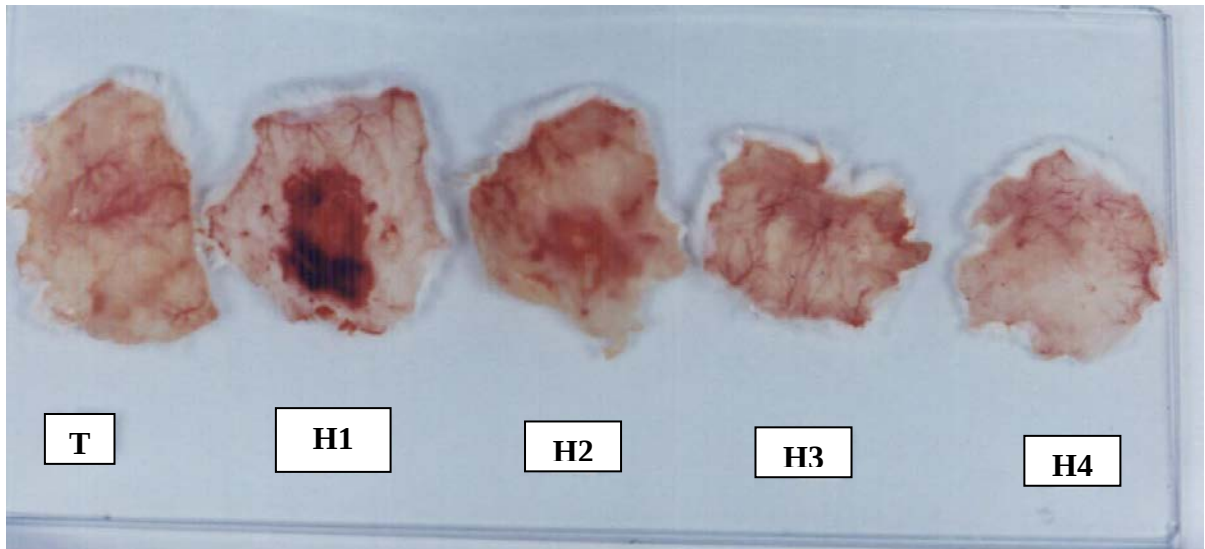


Figure 39 : Inhibition et essai de restauration de l'activité hémorragique de la fraction A1.

T : correspond au témoin ; **H1** : correspond à l'activité hémorragique de la fraction A1 ; **H2** : : correspond à l'activité hémorragique de la fraction A1 après traitement par l'EDTA (10 mM) ; **H3** : : correspond à l'activité hémorragique de la fraction A1 après traitement par l'EDTA (10 mM) et dialyse contre le ZnCl_2 (10 mM) ; **H4** : correspond à l'activité hémorragique de la fraction A1 après traitement par l'EDTA (10 mM) et dialyse contre le CaCl_2 (10 mM).

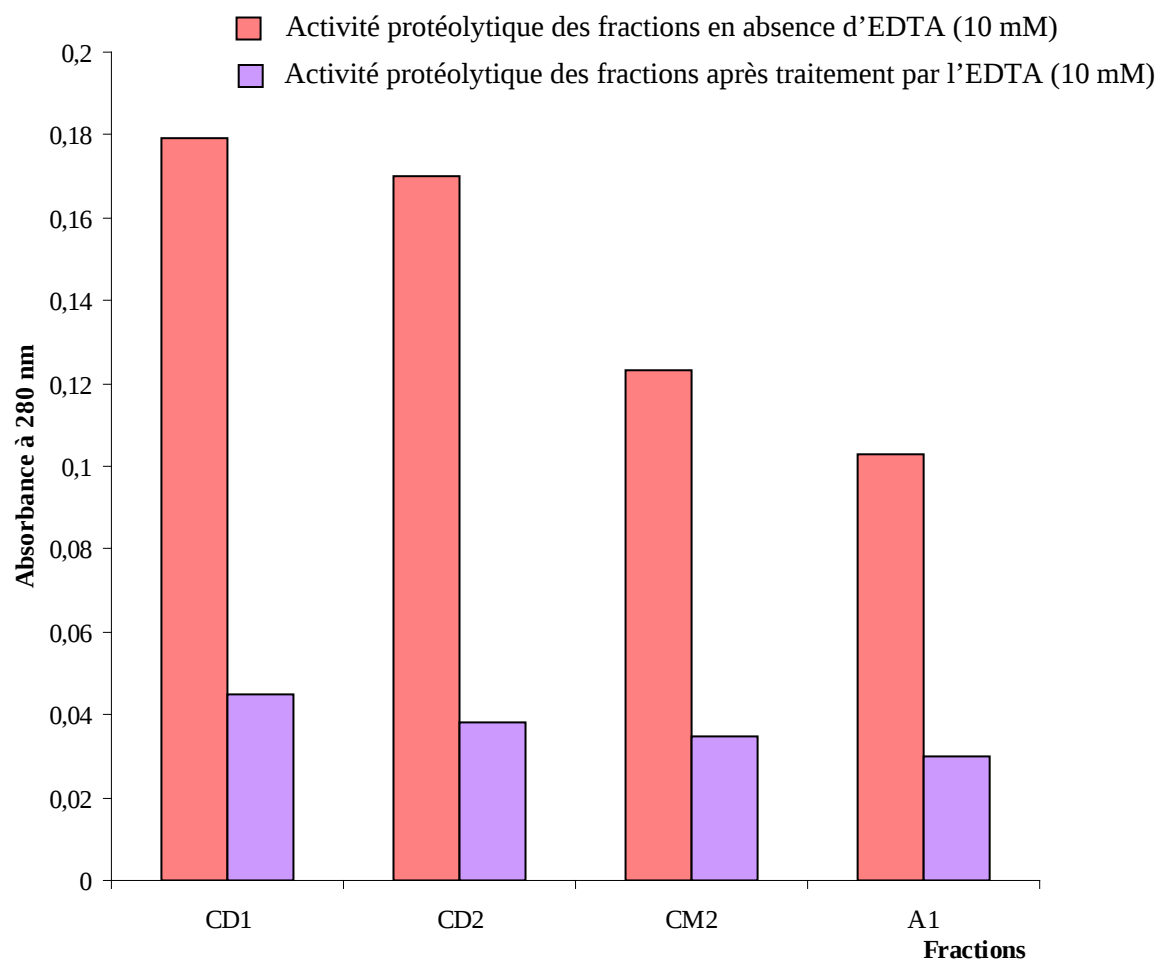


Figure 40 : Activité protéolytique des fractions hémorragiques du venin de *Vipera lebetina* et son inhibition par l'EDTA (10 mM).

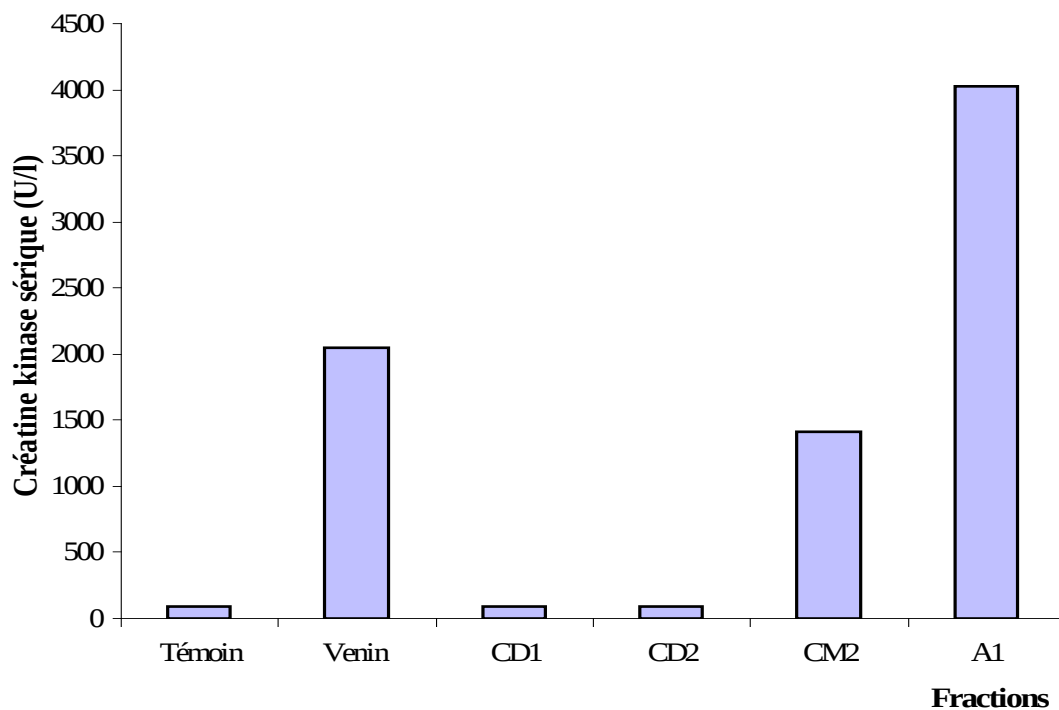


Figure 41 : Action des fractions hémorragiques isolées à partir du venin de *Vipera lebetina* sur le taux de créatine kinase sérique.

L'activité CK a été déterminée 3 heures après l'injection, par voie intramusculaire, des fractions hémorragiques isolées à partir du venin de *Vipera lebetina*.

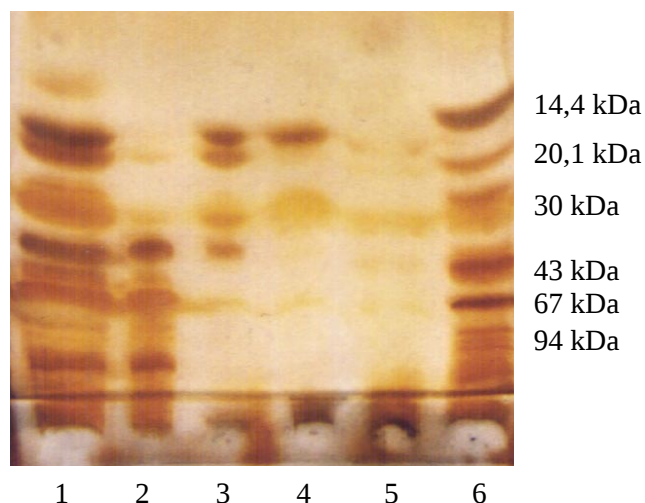


Figure 42 : Caractérisation protéique du venin de *Vipera lebetina* et des fractions issues de la chromatographie d'exclusion moléculaire sur Sephadex G-75 par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (12 %) en présence de SDS.

1 : Venin brut de *Vipera lebetina*.

2 : Fraction GF2 issue de la chromatographie d'exclusion moléculaire du venin total.

3 : Fraction GF3 issue de la chromatographie d'exclusion moléculaire du venin total.

4 : Fraction GF4 issue de la chromatographie d'exclusion moléculaire du venin total.

5 : Fraction GF5 issue de la chromatographie d'exclusion moléculaire du venin total.

6 : Marqueurs de poids moléculaire (de haut en bas : lysosyme 14 400, Soybean trypsin inhibitor 20 100, Anhydrase carbonic 30 000, Ovalbumine 43 000, Serum albumine bovine 67 000, phosphorylase 94 000).

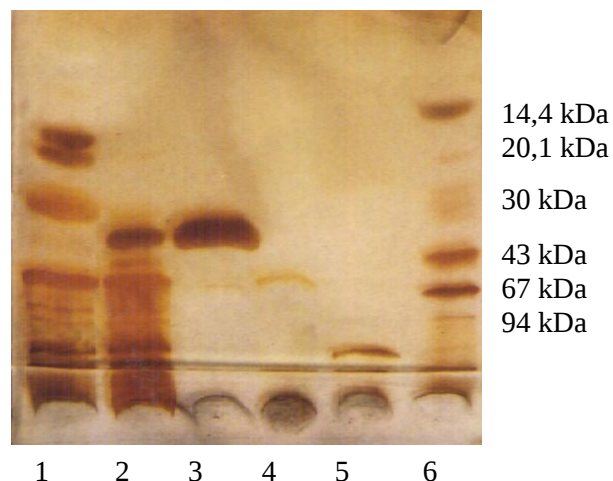


Figure 43 : Caractérisation protéique des fractions hémorragiques du venin de *Vipera lebetina* par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (12 %) en présence de SDS.

1 : Venin brut de *Vipera lebetina*.

2 : Fraction GF2 issue de la chromatographie d'exclusion moléculaire du venin brut.

3 : Fraction CD1 issue de la chromatographie échangeuse d'anions de la fraction CM1.

4 : Fraction CD2 issue de la chromatographie échangeuse d'anions de la fraction CM1.

5 : Fraction CM2 issue de la chromatographie échangeuse de cations de la fraction GF2.

6 : Marqueurs de poids moléculaire (de haut en bas : lysosyme 14 400, Soybean trypsin inhibitor 20 100, Anhydrase carbonic 30 000, Ovalbumine 43 000, Serum albumine bovine 67 000, phosphorylase 94 000).

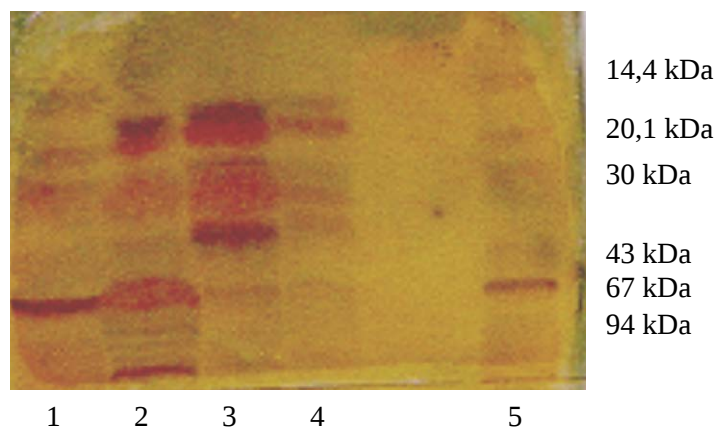


Figure 44 : Caractérisation protéique des fractions hémorragiques du venin de *Vipera lebetina* par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (12 %) en présence de SDS.

1 et 5 : Marqueurs de poids moléculaire (de haut en bas : lysosyme 14 400, Soybean trypsine inhibitor 20 100, Anhydrase carbonic 30 000, Ovalbumine 43 000, Serum albumine bovine 67 000, phosphorylase 94 000).

2 : Venin brut de *Vipera lebetina*.

3 : Fraction GF3 issue de la chromatographie d'exclusion moléculaire du venin brut.

4 : Fraction A1 issue de la chromatographie d'affinité de la fraction GF3.