



FÉDÉRATION ALGÉRIENNE DE PHARMACIE

Disponible en lignesur

ASJP
 Algerian Scientific Journal Platform

<https://www.asjp.cerist.dz/en/PresentationRevue/436>


ARTICLE ORIGINAL

Etude exploratoire et comparative de méthodes de détoxification de venin de vipère *Cerastes cerastes* à des fins de production de sérum antivipérin

Exploratory and comparative study of detoxification methods of viper venom *Cerastes cerastes* for the production of viper antivenom.

Sarah NAIT MOULOUD^a, Yasmine RABEHI^a, Safouane Mohamed BENAZZOUC^{a,b}, Oum El Kheir SADDEDINE^b, Nesrine BENLOUAHMIA^b, Karima BOUHADIDA^b, Meriem BENLAMARA^b, Wissem GHANEM^b, Mehdi ABDELLI^b, Mourad ISSAD^b, Djamel TAHTAT^c, Samah BENAMER^c, Assia NACER KHODJA^c, Belkacem MANSOURI^c, Kamel MANSOURI^a, Fawzi DERRAR^{b,d}

^a Faculté de Pharmacie d'Alger. Université d'Alger 1

^b Institut Pasteur d'Algérie

^c Centre de Recherche Nucléaire d'Alger

^d Faculté de Médecine d'Alger. Université d'Alger 1

MOTS CLÉS

Cerastes cerastes ;

Détoxification ;

Immunogénicité ;

Antivenin

Résumé

La sérothérapie antivenimeuse constitue le seul traitement spécifique des envenimations ophidiennes notamment celles causées par la vipère *Cerastes cerastes*. En raison de la haute toxicité du venin natif de cette espèce utilisé comme immunogène lors de la production de sérum antivipérin, des effets pathologiques parfois graves peuvent apparaître chez les chevaux producteurs de sérum.

L'objectif de cette étude était de déterminer la méthode de détoxification la plus efficace du venin de *Cerastes cerastes*, permettant d'obtenir une réponse immunitaire optimale et une moindre toxicité, dans l'optique de l'utiliser pour immuniser des chevaux producteurs de sérum antivipérin.

Pour cela, la toxicité des venins traités par différentes méthodes physico-chimiques a été testée sur des souris, et celles qui ont montré une bonne tolérance ont été soumises à une analyse d'immunogénicité par immunodiffusion double. Ensuite, quatre groupes de lapins ont été immunisés par des doses croissantes de venin natif, de venin irradié, de venin acidifié et de venin alcalinisé respectivement. La santé des animaux pendant la période d'immunisation était contrôlée via des observations quotidiennes. Après 48 jours, les lapins ont été saignés, et les sérums récupérés. La capacité neutralisante a été évaluée et les paramètres biologiques analysés.

L'étude a mis en évidence que la détoxification du venin par acidification était la plus efficace, en préservant l'immunogénicité et en augmentant la capacité de neutralisation par rapport au venin natif.

Les résultats de cette étude sont en faveur de l'emploi de l'acidification pour la détoxification de ce venin mais ceci devrait faire l'objet de tests complémentaires.

KEYWORDS

Cerastes cerastes;
 Detoxification;
 Immunogenicity;
 Antivenom

Abstract

Antivenom serotherapy is the only specific treatment of ophidian envenomation, particularly those caused by the *Cerastes cerastes* viper. Due to the high toxicity of the native venom of this species used as an immunogen during the production of antivenom, severe pathological effects may occur occasionally in serum-producing horses.

The objective of this study was to determine the most efficient detoxification method of *Cerastes cerastes* venom, which allows an optimal immune response and a reduced toxicity, with the aim of using it to immunize antivenom-producing horses.

For this purpose, the toxicity of venoms treated with different physicochemical methods was tested on mice, and those that showed a good tolerance were subjected to immunogenicity analyse using double immuno-diffusion. Subsequently, four groups of rabbits were immunized with increasing doses of native venom, irradiated venom, acidified venom, and alkalized venom, respectively. The health of the animals during the immunization period was monitored through daily observations. After 48 days, the rabbits were bled, and the sera were collected. The neutralizing capacity was evaluated, and the biological parameters were analysed.

The study showed that venom detoxification using acidification was the most efficient method, preserving its immunogenicity and increasing its neutralizing capacity compared to native venom.

The results of this study suggest the use of acidification for detoxifying *Cerastes cerastes* venom but this should be subjected to further testing.

© 2023 Fédération Algérienne de Pharmacie. All rights reserved.

S. Nait mouloud saghahnait@gmail.com
 Y. Rabehi rabehiyasmine29@gmail.com
 M.S. Benazzouz safouanebenazzouz@gmail.com
 O. Saddedine sadeddine_oumelkheir@yahoo.fr
 N. Benlouahmia nesrinebel@yahoo.fr
 K. Bouhadida karimabouhadida2@gmail.com
 M. Benlamara m-benlamara@hotmail.fr
 W. Ghanem ghanemwissam97@gmail.com
 M. Abdelli abdelli_ipa@yahoo.fr
 M. Issad m_issad@yahoo.fr
 D. TAHTAT djtahtat@crna.dz
 S. BENAMER s.oudih@crna.dz
 A. NACER KHODJA a.boukrif@crna.dz
 B. MANSOURI b.mansouri@crna.dz
 K. Mansouri kamelmansouri75@gmail.com
 F. Derrar fawziderrar@gmail.com

Introduction

Les envenimations ophidiennes sont une forme d'empoisonnement causée par des morsures de serpents venimeux. Il y a environ 2.7 millions d'envenimations de serpent chaque année dans le monde, on estime que jusqu'à 580 000 d'entre elles nécessitent un traitement (1).

Ces envenimations constituent en Afrique un problème de santé publique majeur. Plus de 100 000 cas de décès sont enregistrés dans le monde, dont 20 000 sont sur le continent Africain. Par ailleurs, quatre cents mille des victimes envenimées conservent des séquelles fonctionnelles graves et permanentes (2).

En Afrique tropicale, les morsures de *Viperidae* sont responsables de 90 % des envenimations. Et en Algérie, deux espèces sévissent dans les zones désertiques et les hauts plateaux : *Macrovipera lebetina* et *Cerastes cerastes*. Cette dernière déserticole d'Afrique du Nord est endémique de la région (3).

La vipère cornue ou *Cerastes cerastes* (*C. cerastes*) est une vipère redoutable retrouvée le plus souvent dans le désert sableux et rocheux d'Afrique du Nord jusqu'au Moyen-Orient. La particularité de cette vipère est la présence de cornes au-dessus de ses yeux, et ses écailles jaunes ombrées qui lui permettent de se camoufler dans son environnement (4).

La composition complexe du venin de la vipère *C. cerastes* en protéines, enzymes et toxines explique les tableaux cliniques très divers lors des envenimations (Tableau 1). Au vu des différentes activités biologiques dont il est doué, le venin interfère avec les fonctions biologiques de l'organisme ; ce qui explique les effets délétères induits, provoquant des coagulopathies, œdèmes, dermonécrose et troubles gastro-intestinaux (5),(6).

La toxicité du venin est la conséquence de l'ensemble des interactions de ses différents composants. Un traitement symptomatique semble suffisant pour les envenimations bénignes, mais une immunothérapie antivenimeuse semble nécessaire en cas d'envenimation sévère. Elle reste le seul traitement spécifique. Elle consiste en l'injection d'un antivenin produit par hyper-immunisation de chevaux avec du venin. Les antivenins sont constitués de fragments F(ab')₂ minimisant le risque de choc anaphylactique (7).

La problématique qui se pose est qu'en raison de sa haute toxicité, le venin natif utilisé comme immunogène lors de la production de sérum antivipérin induit des effets pathologiques parfois graves chez l'animal producteur de sérum et peut affecter sa santé et sa longévité lors d'une exposition chronique (Expérience propre du laboratoire des sérums thérapeutiques).

Le but de cette étude est de déterminer la méthode de détoxification du venin la plus efficace permettant d'obtenir une réponse immunitaire optimale tout en atténuant la toxicité, et ce en se basant sur les méthodes de détoxification décrites dans la littérature.

Cette étude consiste à explorer et à comparer différentes méthodes de détoxification réalisées sur le venin de différentes espèces provoquant des modifications physiques ou chimiques des toxines. Parmi ces méthodes : l'irradiation Gamma (8),(9), le chauffage(10),(11), l'exposition à la lumière UV (12), la photo-oxydation en présence de Bleu de méthylène(13), ou encore la modification du pH en acidifiant ou en alcalinisant. Le tableau 1 résume quelques méthodes de détoxification de venin décrites dans la littérature.



Figure 1: La vipère à cornes (*C. cerastes*) capturée par David A. Warrell.

Tableau 1: Activités toxiques de quelques composés du venin de *C. cerastes* (14) (15).

Molécules	Activités toxiques
Phospholipase A2	Pro-inflammatoire, anti-agrégante, hémolytique, myotoxicité, douleur, lésion des vaisseaux lymphatiques, œdèmes, néphrotoxicité.
Métalloprotéinases	Hémorragique, protéolytiques, myonécrose, dégradation de la matrice extracellulaire, dermonécrotique, douleur, œdèmes et choc cardiovasculaire, néphrotoxicité et coagulopathie.

Sérine-protéinases	Coagulopathie, œdèmes.
Désintégrines	Inhibition de l'agrégation plaquettaire.

Matériel et méthode

Matériel

❖ Matériels biologiques

- **Souris** : souche NMRI mâles et femelles de 20g ± 2 de poids.
- **Lapins** : douze lapins adultes femelles, de souche néozélandaise de 3kg ± 0.5.

Les animaux ont été fournis par l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA).

❖ Réactifs pharmacologiques

- Venin natif sec brut extrait en 2015 de vipères *C. cerastes* d'Algérie. (DL₅₀= 48.91 µg/20 g de souris), fourni par l'IPA.

La DL₅₀ est la dose de venin causant la mort de 50% d'une population animale donnée.

- **Adjuvant** : l'adjuvant incomplet de Freund (AIF) produit par Sigma Aldrich (Etats-Unis).
- **Sérum antivipérin purifié F(ab')₂** produit par le laboratoire des sérums thérapeutiques (LST).

❖ Réactifs chimiques

- Solution saline de chlorure de sodium à 0,9 %
- Bleu de méthylène
- Poudre de charbon actif
- Acide acétique
- Tris-HCl 0.5M
- NaOH
- Solution HCl
- Solution saline phosphrylée
- Agarose
- TRIS
- Acrylamide/ Bisacrylamide
- Sulfate Dodécyl de sodium
- Glycérol

Méthode

1. Préparation et traitement des solutions de venin

- Des solutions de venin natif ont été préparées par dissolution de venin sec dans une solution saline de NaCl à 0,9% à 1mg/ml. Ces solutions ont été traitées par l'une des méthodes de détoxification suivantes qu'on a adapté pour harmoniser les concentrations et dans certains cas selon les disponibilités des moyens.

- **Irradiation gamma** : la solution de venin natif a été soumise aux irradiations gamma de ⁶⁰Co avec 2 kGray à un débit de 4.25 Gray/min à température ambiante, et ce, au niveau du centre de recherche nucléaire d'Alger. Les échantillons ont été conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation (8).
- **Chauffage** : trois aliquotes de la solution de venin natif ont été chauffés dans un bain marie à 56, 70 et 100 °C pendant 30 min (10).
- **Exposition à la lumière UV** : une solution de venin natif a été mise dans un flacon en verre et déposée à une distance de 10 cm en dessous d'une lampe de lumière UV pendant 6h (12).
- **Photo-oxydation en présence de Bleu de méthylène** : une solution de venin natif à 3 mg/ml a été préparée. Un échantillon de 3ml de cette solution a été additionné à 1ml de bleu de méthylène et 4 ml de TRIS à pH 8,5. L'irradiation a duré 20h. A la fin de l'expérience, le Bleu de méthylène a été éliminé avec de la poudre de charbon et une filtration avec du papier wattman (13).
- **Modification du pH** :
 - Acidification : une solution de venin a été acidifiée par une solution de HCl jusqu'à un pH cible de 2. Le pH initial a été ensuite rétabli.
 - Alcalinisation : une solution de venin a été alcalinisée par une solution de NaOH jusqu'à un pH cible de 10,5 pour un échantillon et de 12 pour l'autre. Le pH initial a été ensuite rétabli.

2. Essai de détoxification

La toxicité du venin a été testée par injection intrapéritonéale de doses croissantes du venin natif et traité (3 DL₅₀, 6 DL₅₀) chez un groupe de 4 souris par palier pour chaque méthode de détoxification. Les souris ont été observées pendant 24h. Les mortalités et les signes de toxicité ont été notés.

3. Méthode d'Ouchterlony

Les échantillons du venin natif ainsi que des venins détoxifiés ont été testés qualitativement par la méthode d'immuno-diffusion double. Il s'agit d'une méthode d'immuno-précipitation fondée sur la diffusion d'antigène (le venin) et d'anticorps (sérum antivipérin purifié F(ab')₂) en milieu solide. La méthode a été réalisée sur gel d'agarose préparé en mélangeant de l'agarose avec du tampon PBS à pH7.25. Le mélange a été chauffé jusqu'à dissolution de l'agarose. Le gel a été coulé dans des boîtes de Pétri qu'on a laissé refroidir. Des

puits de diamètre de 4 mm qui ont été percés ont été remplis avec un volume de 20 µl. Les échantillons de venins ont été placés dans les puits périphériques tandis que le sérum a été ajouté dans le puits central. Les boîtes ont été incubées pendant 48h. Après le développement des arcs de précipitation, elles ont été lavées, colorées et décolorées par des bains successifs d'acide acétique (Protocole LST).

4. SDS-PAGE

Les échantillons de venins natif et détoxifiés ont été soumis à une SDS-PAGE. Une technique permettant la séparation des protéines de venin en fonction du poids moléculaire, afin d'obtenir une analyse fine de la composition du venin. Une solution d'acrylamide/bisacrylamide à 30 % avec une solution de SDS à 10% ont été utilisés dans la préparation du gel de séparation (TRIS, pH8.8) et du gel de concentration (TRIS, pH6.8) qui ont été coulés en formant les puits qui contiendront les échantillons et le standard de poids moléculaire. Une source de courant électrique a été appliquée pour faire migrer les protéines. Les bandes ont été visualisées en plongeant le gel dans une solution de bleu de Coomassie pendant 30 minutes, puis décolorées par des bains successifs de décoloration à base d'acide acétique (Protocole LST).

Les techniques d'immuno-diffusion double et SDS-PAGE ont été appliquées principalement aux solutions traitées qui se sont avérées non toxiques après l'essai de toxicité sur souris.

5. Immunisation des lapins

Quatre lots de trois lapins ont été immunisés par des solutions du venin natif (Lapins 1/2/3), irradié (4/5/6), acidifié (7/8/9) et venin alcalinisé (10/11/12). Les techniques retenues sont celles ayant une réactivité avec le sérum antivipérin ainsi que la méthode d'irradiation. L'immunisation a été réalisée en administrant une injection sous cutanée par semaine durant une période de 48 jours. Deux schémas ont été adoptés, présentés dans le Tableau 2(8). Les quatre premières injections dans les deux schémas ont été associées à l'AIF (1V AIF/2V solution de venin). Un suivi de la mortalité et des paramètres cliniques (poids, température, troubles digestifs, agitation, hémorragie, nécrose, œdèmes...) a été effectué tout au long de l'immunisation pour évaluer l'état de santé général des lapins. Ils avaient accès à l'eau et l'alimentation à volonté. A J 48, les lapins ont été saignés et les sérums ont été récupérés et conservés à -20°C.

Tableau 2: Schémas d'immunisation des lapins avec le venin de *C. cerastes*.

Jours	Emploi de l'adjuvant-AIF	Schéma A		Schéma B	
		Doses du venin natif (µg)	Doses du venin irradié (µg)	Doses du venin acidifié (µg)*	Doses du venin alcalinisé (µg)**
J1	2V	150	500	500	500
J7	2V	150	500	500	500
J14	2V	200	700	700	700
J21	2V	250	800	800	800
J28	/	250	800	800	800
J35	/	250	800	800	800
J42	/	250	800	800	800
J48			Saignée		

*Venin acidifié à pH02 **Venin alcalinisé à pH12

6. Séroneutralisation

La mesure de la capacité neutralisante a été effectuée en mélangeant des doses croissantes de venin natif (en progressant de 0.5 DL₅₀ par palier) avec 750 µl de sérum de lapin immunisé. Les mélanges venin-sérum ont été incubés à 37 °C pendant une heure, puis injectés par voie intrapéritonéale à des groupes de 4 souris homogènes. La lecture du taux de mortalité a été effectuée 24h après. Lorsque la mortalité n'a pas atteint 100%, de nouveaux paliers ont été ajoutés. La capacité de neutralisation a ensuite été calculée par la méthode mathématique de Reed et Muench (17) (Protocole LST).

7. Paramètres biologiques

Le dosage des transaminases dans le but de détecter une éventuelle hépatotoxicité, et le dosage de l'urée et de la créatinine pour vérifier s'il y a atteinte rénale suite à l'immunisation a été effectué, à partir du sérum récupéré après 24 h de décantation puis une centrifugation à 3500 tr/min pendant 10 minutes.

L'analyse des protéines totales par mesure de la densité optique par spectrométrie à λ= 280 nm a été réalisée.

Une numération de la formule sanguine du sang complet dans des tubes EDTA ainsi qu'une analyse des paramètres hématologiques TP, TCK sur tube citraté ont été effectués à titre indicatif chez un lapin par lot.

Résultats

1. Essai de détoxification

Les résultats n'ont montré aucune mortalité ou de signes de toxicité avec 6 DL₅₀ de venin avec les venins traités par chauffage à 70°C et 100°C, acidification (pH2), alcalinisé (pH12) et par irradiation. Le venin natif a provoqué un taux de 100 % de mortalité dès 3 DL₅₀. Les souris traitées par les venins détoxifiés par les autres méthodes n'étaient pas associées à une bonne tolérance. Les résultats du test sont présentés dans le Tableau 3 ci-dessous.

Tableau 3: Résultats des essais de détoxification sur souris.

Méthode de détoxification	DL ₅₀	Nombre de mortalités
Venin natif	3	4/4
	6	4/4
Chauffage à 56 °C	3	2/4
	6	3/4
Chauffage à 70 °C	3	0/4
	6	0/4
Chauffage à 100 °C	3	0/4
	6	0/4
Photo-oxydation en présence de bleu de méthylène (20 h)	3	0/4
	6	2/4
Exposition à la lumière UV (6 h)	3	3/4
	6	4/4
Irradiation gamma	3	0/4
	6	0/4
Venin acidifié (pH=2)	3	0/4
	6	0/4
Venin alcalinisé (pH=10,5)	3	0/4
	6	1/4
Venin alcalinisé (pH=11,85)	3	0/4
	6	0/4

2. Méthode d'Ouchterlony

Les résultats du test d'immuno-diffusion double ont montré la formation de deux arcs de précipitation distincts entre le puits central et le puits contenant le venin natif. L'un des arcs présentait une intensité plus marquée que l'autre. Dans les puits contenant les échantillons de venin traités à pH10,5 et pH2, l'apparition de deux arcs de précipitation a été observée, dont l'un présentait une intensité plus faible que l'autre. Quant au puits contenant l'échantillon de venin alcalinisé à pH12, un seul arc de précipitation s'est formé (Figure 2). L'absence d'arcs a été notée avec le venin irradié et le venin chauffé à 70°C.

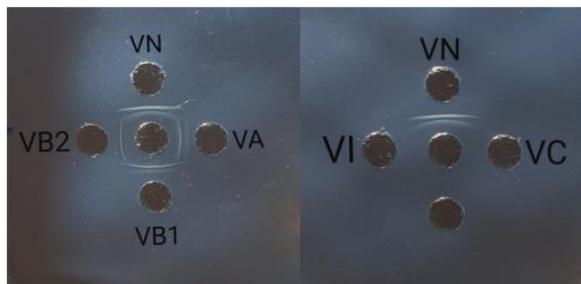


Figure 2: Résultats de l'essai d'immunodiffusion double (Puits central : sérum antivipérin purifié ; VN=Venin natif ; VI=Venin irradié ; VC= Venin chauffé 70°C ; VA= Venin acidifié ; VB1= Venin alcalinisé (pH10,5) ; VB2= Venin alcalinisé (pH12)).

3. SDS-PAGE

Les venins traités par les méthodes de détoxification ont présenté des profils de bandes protéiques différents de celui du venin natif qui a présenté neuf bandes (Figure 3). Le venin alcalinisé a présenté cinq bandes et dix bandes pour le pH12 et le pH10.50 respectivement. Le venin acidifié a présenté onze bandes protéiques avec apparition de nouvelles bandes de bas poids moléculaires (inférieur à 25 kDa). Le venin chauffé a présenté six bandes pas très intenses et le venin irradié a présenté quatre bandes.

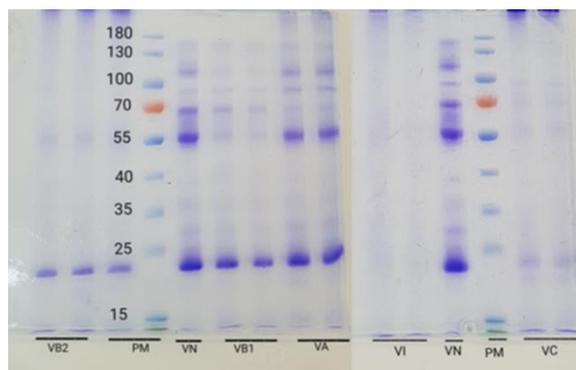


Figure 3: Résultats de l'analyse de l'électrophorèse verticale SDS-PAGE (PM= poids moléculaires kDa ; VN=Venin natif ; VC= venin chauffé à 70°C ; VI=venin irradié ; VA=venin acidifié pH2 ; VB1= venin alcalinisé pH10,5 ; VB2= venin alcalinisé pH12).

4. Etat de santé des lapins

Les observations faites indiquent qu'il y a eu deux lapins morts suite à l'immunisation par le venin alcalinisé : le premier à J6, le second à J22. Le troisième lapin du même lot a présenté des vomissements et une hématurie persistante à partir de J15 jusqu'au terme des immunisations. Les lapins traités par le venin acidifié ont présenté des vomissements et une hématurie transitoire suite à la troisième injection. Les lapins traités par le venin natif et irradié ont principalement présenté des vomissements.

Le suivi pondéral a montré des fluctuations de poids moyens (Figure 4), restant toujours dans l'intervalle des masses mesurées au début de l'étude.

L'étude des variations de température chez les lapins immunisés avec les différents venins (Figure 5) est restée dans les limites de la plage physiologique normale (38°C-40°C) (18).

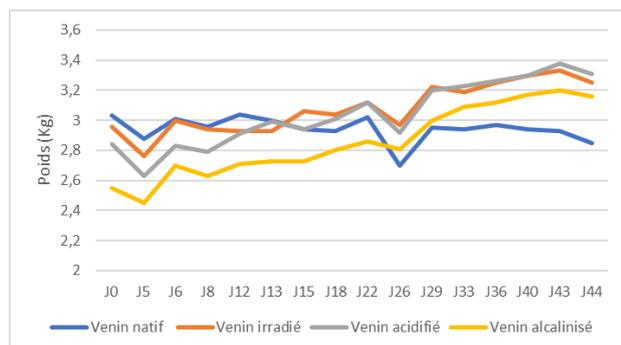


Figure 4: Evolution du poids moyen des lapins pendant la période d'immunisation.

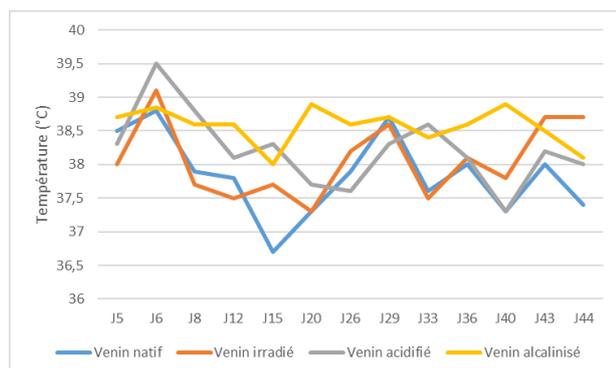


Figure 5: Evolution de la température moyenne des lapins pendant la période d'immunisation.

5. Analyses biologiques

Les résultats de l'analyse des paramètres biologiques effectuée sur les lapins immunisés par les différents venins ont été comparés à des intervalles de références. Ces références ont été établies par une étude menée séparément sur des lapins au niveau de l'IPA.

Les résultats obtenus récapitulés dans le Tableau 4 montrent une élévation des deux enzymes hépatiques ASAT et ALAT chez les lapins traités par le venin natif, ainsi qu'une perturbation chez les lapins exposés au venin acidifié et alcalinisé mais de façon moins prononcée. Pour le groupe de lapins traité par venin irradié les niveaux d'ASAT et ALAT sont proches des valeurs normales fixées.

L'analyse du bilan rénal montre chez tous les lapins un taux d'urée avoisinant ou dépassant la borne supérieure de l'intervalle définie. Le taux de créatinine est élevé uniquement chez les lapins traités par le venin natif.

Les résultats de l'analyse des densités optiques (DO) et de la mesure des protéines totales sont supérieures aux valeurs normales des lapins de l'étude. Toutefois, le groupe de lapins ayant été exposé au venin natif a affiché le taux le plus élevé de protéines, suivis par la méthode de détoxification par irradiation et enfin par modification du pH.

La numération des formules sanguines ne présente aucune anomalie particulière.

Tableau 4: Résultats de l'analyse biologique effectuée sur sérum des lapins après immunisation.

Paramètres	ASAT (UI/l)	ALAT (UI/l)	Urée (g/l)	Créatinine (mg/l)	Taux de protéines totales (mg/ml)	
Valeurs normales	[25.87-37.23]	[34.6-37.5]	[0.35-0.46]	[9.74-11.38]	[34.38-35.2]	
Venin natif	Lapin 1	52.4	43.5	0.46	11.93	45,36
	Lapin 2	47.8	48.5	0.43	16.17	51,5
	Lapin 3	314.5	303.7	0.49	17.83	50,36
	Moyenne	138.23	131.9	0.46	15.31	49,07
	Ecart type	152,67	148,8	0,03	3,04	3,27
Venin irradié	Lapin 4	29.6	21.1	0.42	12.04	47,5
	Lapin 5	37.1	44.6	0.51	9.11	46,29
	Moyenne	33.35	32.85	0.47	10.5	46,89
	Ecart type	5,3	16,62	0,06	2,07	0,42
	Venin acidifié	Lapin 7	39.6	34.2	0.45	9.67
Lapin 8		35.7	54.3	0.46	9.39	44,57
Lapin 9		39.6	30.7	0.51	10.81	43,21
Moyenne		38.3	39.73	0.47	9.96	44,30
Ecart type		2,25	12,73	0,03	0,75	0,99
Venin alcalinisé	Lapin 10	52.3	24.9	0.39	9.67	42,71
	Moyenne	/	/	/	/	/
	Ecart type	/	/	/	/	/

6. Séroneutralisation

Les résultats du calcul des titres antivipérins obtenus suite au test de séroneutralisation sur souris démontrent une réponse positive chez l'ensemble des lapins, ce qui correspond à un taux de réponse de 100% à l'immunisation par le venin natif ou traité.

Il convient toutefois de noter que le titre obtenu varie en fonction de la méthode de détoxification utilisée, parmi les méthodes étudiées, l'acidification du venin a produit les titres les plus élevés avec un titre moyen de 29,91 DL₅₀/ml/20g de souris. Ensuite, les lapins immunisés avec le venin irradié ont présenté un titre moyen de 21,75 DL₅₀/ml/20g de souris. Un seul lapin sur trois du lot de lapins traités par le venin alcalinisé est resté vivant jusqu'au terme de la période d'immunisation, ce dernier a présenté un titre de 25 DL₅₀/ml/20g de souris.

Les lapins témoins immunisés avec le venin natif (non traité) ont présenté un titre moyen de 24,64 DL₅₀/ml/20g de souris.

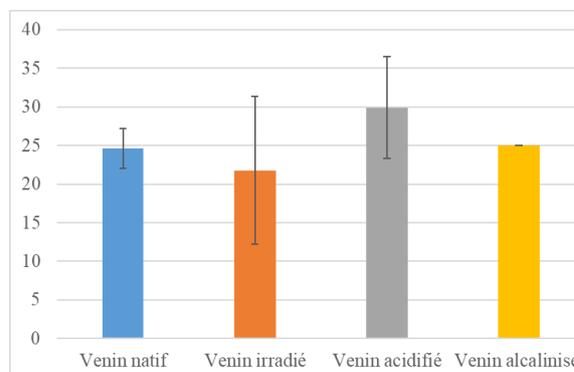


Figure 6: Capacités protectrices (moyenne et écart type) des sérums de lapins immunisés par les venins natif et traités de *C. cerastes*.

Discussion

Dans cette étude nous avons entrepris d'évaluer plusieurs méthodes de détoxification de venin de vipère *C. cerastes*. Certaines méthodes utilisées ont déjà été décrites chez d'autres espèces de serpents. Quant à la modification du pH, c'est une nouvelle technique que nous avons explorée pour tenter d'altérer la structure tridimensionnelle des protéines et affecter la capacité d'interaction avec leurs cibles (19). Cette approche tient également compte de la composition complexe du venin en enzymes sensibles à ces variations de pH. Par exemple, les metalloprotéases sont inactivées en milieu acide (pH < 3) (3).

Notre approche en plusieurs étapes allant des tests sur souris jusqu'à l'évaluation des réponses immunologiques chez les lapins a permis de fournir des informations importantes sur l'efficacité des méthodes testées.

Parmi les méthodes dont la détoxification s'est avérée insuffisante on rapporte : la méthode d'exposition à l'UV et le chauffage à 56°C. Ceci contraste avec les résultats de détoxification décrits par Tejasen P(12) et Rangel-Santos AC (10) qui ont travaillé sur les venins d'*Agkistrodon piscivorus* et *Crotalus durissus terrificus*. Cette discordance serait due à l'utilisation d'espèces de vipères différentes ou au changement de certains paramètres d'expérimentation.

La méthode par photo-oxydation en présence de Bleu de méthylène quant à elle a été écartée pour son faible rendement. Cette méthode nécessite des quantités importantes de solution de venin natif. Notre étude vise à trouver une méthode qui est plus rentable, économique et simple à réaliser pour une meilleure production de sérum antivipérin.

L'analyse des profils électrophorétiques a montré que les traitements ont eu des effets différents sur la composition protéique du venin. En effet, pour l'acidification et l'alcalinisation à pH10,5 de nouvelles bandes sont apparues suggérant une fragmentation des protéines de haut poids moléculaire en protéines plus petites. Pour les autres méthodes (irradiation gamma et alcalinisation), la diminution du nombre de bandes peut être justifié par la dégradation importante par ces traitements qui aurait conduit à la formation de protéines de poids moléculaire <15kDa n'apparaissant pas dans le profil protéique.

Suite à l'analyse d'immuno-diffusion double, les venins traités qui ont réagis ont révélé des arcs de précipitation d'intensité moins importante de celui du venin natif. Cela indique qu'il y a eu un léger changement dans les déterminants antigéniques dû au traitement des venins.

Les méthodes retenues sont celles présentant un profil électrophorétique proche du venin natif et ayant reconnu le sérum antivipérin spécifique

témoignant que les épitopes sont préservés, et que le traitement a atténué l'effet létal du venin tout en maintenant les propriétés antigéniques et immunogéniques. Les autres méthodes ont été abandonnées à cause de la dénaturation de leurs protéines causant une perte de reconnaissance par les anticorps.

Durant l'immunisation une relative tolérance aux venins traités par les différentes méthodes a été observée, à l'exception de l'alcalinisation qui a provoqué le décès de deux lapins.

L'augmentation des marqueurs de la fonction hépatique chez le groupe de lapins immunisés par le venin natif est due à une réponse inflammatoire sévère au niveau du foie qui serait provoqué par une infiltration cellulaire inflammatoire ainsi qu'une dégénérescence des hépatocytes en réponse aux composés toxiques de venins (20).

Pour la fonction rénale, les lapins ont montré des taux d'urée légèrement perturbé ainsi qu'une élévation de la créatinine chez les lapins exposés au venin natif. Ces effets indiquent un certain degré de dysfonctionnement rénal qui peut être dû soit à une ischémie secondaire à une diminution du débit sanguin rénal ou à une dégradation protéolytique de la membrane basale glomérulaire par les metalloprotéinases et le dépôt de micro-thrombi dans la microvascularisation rénale (14), comme ça peut être expliqué par une réaction d'hypersensibilité de type III dû au dépôt de complexes immuns au niveau rénal. L'ensemble des résultats mettent en évidence de manière notable l'atténuation de la toxicité du venin par l'irradiation et l'acidification

L'exploration du bilan d'hémostase (TP, TCK) n'a pas été faite, à cause de la non-conformité des échantillons prélevés sur tubes citratés qui ont présenté une coagulation. Une hypothèse a été émise suggérant que la coagulation été due à l'effet du venin mais qui s'est avéré incorrecte car le même phénomène a été observé dans le sang des lapins témoins. Il aurait été pertinent de constater l'impact de la détoxification sur l'activité pro-coagulante du venin par plusieurs de ses composants notamment cerastocytine qui a une activité pro coagulante et activatrice de l'agrégation plaquettaire (21) et cerastatine qui elle inhibe l'agrégation plaquettaire (22),(23). Comme certaines de ces toxines ont des actions opposées, l'effet net sur les plaquettes par exemple peut ne pas être perceptible comme dans notre étude (6).

La mesure de la capacité neutralisante dans les différents schémas a montré que la détoxification par acidification du venin à pH=2 est la méthode qui a donné la meilleure capacité protectrice avec le titre moyen le plus élevé 29,91 DL50/ml/20g, suivie par l'alcalinisation du venin à pH12 et enfin l'irradiation du venin. L'obtention d'une activité neutralisante pour le venin irradié malgré

l'absence de réactivité avec la méthode d'Ouchterlony serait expliquée par la faible sensibilité de cette méthode aux concentrations utilisées.

La détoxification s'est avérée efficace avec l'acidification et l'irradiation, tandis que l'alcalinisation a montré des résultats moins satisfaisants. En ce qui concerne le pouvoir neutralisant, l'acidification et l'alcalinisation ont présenté une supériorité par rapport à l'irradiation. Considérant ces deux paramètres la méthode qui s'avère la plus intéressante est l'acidification du venin, par sa meilleure tolérance et par sa capacité neutralisante supérieure. Une évaluation complémentaire de son impact sur les activités enzymatiques (phospholipasique, hémorragique et dermonécrotique) pour renforcer sa fiabilité serait judicieuse.

Conclusion

Cette étude portait sur les méthodes de détoxification de venin de vipère *C. cerastes* nous a permis d'effectuer une comparaison entre les différentes méthodes et d'explorer une nouvelle approche qui semble une piste prometteuse de détoxification du venin, et ce, par acidification du venin.

En perspective, il serait nécessaire de réaliser une recherche sur un plus grand nombre de lapins pour établir la significativité statistique de ces résultats et leur reproductibilité. Une étude approfondie de l'état physiologique et métabolique de l'animal, incluant une exploration biochimique complète et une évaluation de l'activité enzymatique du venin serait également judicieuse.

Il serait également indispensable de conduire une étude sur un cheval producteur de sérum pour confirmer la tolérance.

Références bibliographiques

- Gutiérrez JM, Calvete JJ, Habib AG, Harrison RA, Williams DJ, Warrell DA. Snakebite envenoming. *Nat Rev Dis Primer*. 14 sept 2017;3(1):17063.
- Snakebite envenoming [Internet]. [cité 25 avr 2023]. Disponible sur: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/snakebite-envenoming>
- Chippaux JP. Venins de serpent et envenimations. IRD Editions; 2002. 296 p.
- who guidelines snake biting.pdf [Internet]. [cité 5 mai 2023]. Disponible sur: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204458/9789290231684.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Bakour MR, Laraba-Djebari MF, Touil MC, Satta MD, Mentouri U, Ouali-Hasnaoui MS, et al. BIOCHIMIQUES ET IMMUNOLOGIQUES DU VENIN DE *Cerastes cerastes* : APPORT DANS L'IMMUNOTHERAPIE OPHIDIENNE.
- Schneemann M, Cathomas R, Laidlaw ST, El Nahas AM, Theakston RDG, Warrell DA. Life-threatening envenoming by the Saharan horned viper (*Cerastes cerastes*) causing micro-angiopathic haemolysis, coagulopathy and acute renal failure: clinical cases and review. *QJM*. 1 nov 2004;97(11):717-27.
- Chippaux JP. Management of Snakebites in Sub-Saharan Africa. *Médecine Santé Trop*. juill 2015;25(3):245-8.
- Oussedik-Oumehdi H, Laraba-Djebari F. Irradiated *Cerastes cerastes* Venom as a Novel Tool for Immunotherapy. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. janv 2008;30(1):37-52.
- Bennacef-Heffar N, Laraba-Djebari F. Evaluation of the effect of gamma rays on the venom of *Vipera lebetina* by biochemical study. *Can J Physiol Pharmacol*. 1 déc 2003;81(12):1110-7.
- Rangel-Santos AC, Mota I. Effect of heating on the toxic, immunogenic and immunosuppressive activities of *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon*. oct 2000;38(10):1451-7.
- Tang Y, Dong W, Kong T. Effects of heating on the immunogenicity and biological toxicity of *Deinagkistrodon acutus* venom and its fractions. *Toxicon*. août 2010;56(1):45-54.
- Tejasen P, Ottolenghi A. The effect of ultraviolet light on the toxicity and the enzymatic and antigenic activities of snake venom. *Toxicon*. sept 1970;8(3):225-30.
- Kocholaty W. Detoxification of *Crotalus atrox* venom by photooxidation in the presence of methylene blue. *Toxicon*. mars 1966;3(3):175-86.
- Chafia TB, Fatima LD, Mustapha MO, Sonia AY, Habiba OO, Fatah MC. Etude de l'activité cytotoxique du venin de *Cerastes cerastes* et de ses constituants peptidiques : caractérisation des mécanismes impliqués.

15. Gutiérrez J. Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie*. 10 sept 2000;82(9-10):841-50.
16. Huang TF. What have snakes taught us about integrins? *Cell. Cell Mol Life Sci CMLS*. 1 juill 1998;54:527-40.
17. Reed LJ, Muench H. A SIMPLE METHOD OF ESTIMATING FIFTY PER CENT ENDPOINTS. *Am J Epidemiol*. mai 1938;27(3):493-7.
18. Roux E. La physiologie des animaux de laboratoire.
19. Dumetz AC, Chockla AM, Kaler EW, Lenhoff AM. Effects of pH on protein-protein interactions and implications for protein phase behavior. *Biochimica Biophysica Acta BBA - Proteins Proteomics*. avr 2008;1784(4):600-10.
20. Salama WH, Abdel-Aty AM, Fahmy AS. Rosemary leaves extract: Anti-snake action against Egyptian *Cerastes cerastes* venom. *J Tradit Complement Med*. oct 2018;8(4):465-75.
21. Marrakchi N, Zingali RB, Karoui H, Bon C, El Ayeb M. Cerastocytin, a new thrombin-like platelet activator from the venom of the Tunisian viper *Cerastes cerastes*. *Biochimica Biophysica Acta BBA - Gen Subj*. mai 1995;1244(1):147-56.
22. Marrakchi N, Barbouche R, Bon C, el Ayeb M. Cerastatin, a new potent inhibitor of platelet aggregation from the venom of the Tunisian viper, *Cerastes cerastes*. *Toxicon Off J Int Soc Toxinology*. janv 1997;35(1):125-35.
23. Marrakchi N, Barbouche R, Guermazi S, Karoui H, Bon C, El Ayeb M. Cerastotin, a Serine Protease from *Cerastes Cerastes* Venom, with Platelet-Aggregating and Agglutinating Properties. *Eur J Biochem*. 1997;247(1):121-8.