



**HAL**  
open science

# Le serpent, son venin et ses applications thérapeutiques

Alexandrine Perrimond

► **To cite this version:**

Alexandrine Perrimond. Le serpent, son venin et ses applications thérapeutiques. Sciences pharmaceutiques. 2019. dumas-02023095

**HAL Id: dumas-02023095**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02023095v1>**

Submitted on 18 Feb 2019

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# LE SERPENT, SON VENIN ET SES APPLICATIONS THERAPEUTIQUES.

THESE

PRESENTEE ET PUBLIQUEMENT SOUTENUE DEVANT LA  
FACULTE DE PHARMACIE DE MARSEILLE

LE 29 JANVIER 2019

PAR

**Mademoiselle PERRIMOND Alexandrine**

Née le 1 Août 1990 à MARSEILLE

EN VUE D'OBTENIR

LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

**JURY :**

Président : PICCERELLE Philippe.

Membres : GRIMALDI Frédérique.  
CODACCIONI Flora.

# LISTE DU PERSONNEL ENSEIGNANT DE LA FACULTE DE PHARMACIE DE MARSEILLE

## ADMINISTRATION

Doyen :	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
Vice-Doyens :	M. Jean-Paul BORG, M. Philippe CHARPIOT, M. Pascal RATHELOT
Chargés de Mission :	M. David BERGE-LEFRANC, M. François DEVRED, Mme Caroline DUCROS, Mme Pascale BARBIER
Conseiller du Doyen :	M. Patrice VANELLE
Doyens honoraires :	M. Jacques REYNAUD, M. Pierre TIMON- DAVID, M. Patrice VANELLE
Professeurs émérites :	M. José SAMPOL, M. Jean-Pierre REYNIER
Professeurs honoraires :	M. Guy BALANSARD, M. Jacques BARBE, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Aimé CREVAT, M. Bernard CRISTAU, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. José MALDONADO, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI,
Chef des Services Administratifs :	Mme Florence GAUREL
Chef de Cabinet :	Mme Sandrine NOURIAN
Responsable de la Scolarité :	Mme Myriam TORRE

## **DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE**

**Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE**

### **PROFESSEURS**

BIOPHYSIQUE

M. Vincent PEYROT

M. Hervé KOVACIC

GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE

M. Christophe DUBOIS

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE  
INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETIQUE

M. Philippe PICCERELLE

### **MAITRES DE CONFERENCES**

BIOPHYSIQUE

M. Robert GILLI

Mme Odile RIMET-  
GASPARINI

Mme Pascale BARBIER

M. François DEVRED

Mme Manon CARRE

M. Gilles BREUZARD

Mme Alessandra PAGANO

GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE

M. Éric SEREE-PACHA

Mme Véronique REY-  
BOURGAREL

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE  
INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE  
ET COSMETOLOGIE

M. Pascal PRINDERRE  
M. Emmanuel CAUTURE  
Mme Véronique ANDRIEU  
Mme Marie-Pierre SAVELLI  
M. Léopold TCHIAKPE

**A.H.U.**

CULTURE ET THERAPIE CELLULAIRE

M. Jérémy MAGALON

**ENSEIGNANTS CONTRACTUELS**

ANGLAIS

Mme Caroline MONTET

**DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE**

**Responsable : Professeur Philippe CHARPIOT**

**PROFESSEURS**

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET  
CLINIQUE

M. Philippe CHARPIOT

BIOLOGIE CELLULAIRE

M. Jean-Paul BORG

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Françoise DIGNAT-  
GEORGE

MICROBIOLOGIE

Mme Laurence CAMOIN

Mme Florence SABATIER-  
MALATERRE

M. Jean-Marc ROLAIN

M. Philippe COLSON

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE,  
HYGIENE ET ZOOLOGIE

Mme Nadine AZAS-  
KREDER

### MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET  
CLINIQUE

Mme Dominique

JOURDHEUIL-RAHMANI

M. Thierry AUGIER

M. Edouard LAMY

Mme Alexandrine BERTAUD

Mme Claire CERINI

Mme Edwige TELLIER

M. Stéphane POITEVIN

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Nathalie BARDIN

Mme Dominique ARNOUX

Mme Aurélie LEROYER

M. Romaric LACROIX

MICROBIOLOGIE

Mme Michèle LAGET

M. Michel DE MEO

Mme Anne DAVIN-REGLI

Mme Véronique ROUX

M. Fadi BITTAR

Mme Isabelle PAGNIER

Mme Sophie EDOUARD

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE,  
HYGIENE ET ZOOLOGIE

Mme Carole DI GIORGIO

M. Aurélien DUMETRE

Mme Magali CASANOVA

Mme Anita COHEN

BIOLOGIE CELLULAIRE

Mme Anne-Catherine

LOUHMEAU

**A.H.U.**

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Sylvie COINTE

## **DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE**

**Responsable : Professeur Patrice VANELLE**

### **PROFESSEURS**

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	M. Henri PORTUGAL Mme Catherine BADENS
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Philippe GALLICE
CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE – CHIMIE THERAPEUTIQUE	M. Pascal RATHELOT M. Maxime CROZET
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE	M. Patrice VANELLE M. Thierry TERME
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE	Mme Evelyne OLLIVIER

### **MAITRES DE CONFERENCES**

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne FAVEL Mme Joëlle MOULIN- TRAFFORT
--	--

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE  
ET NUTRITION

Mme Elisabeth  
SCHREIBER-DETURMENY  
Mme Catherine DEFOORT  
M. Alain NICOLAY  
Mme Estelle WOLFF  
Mme Elise LOMBARD

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET  
NUISANCES TECHNOLOGIQUES

M. David BERGE-  
LEFRANC  
M. Pierre REBOUILLON

CHIMIE THERAPEUTIQUE

Mme Catherine DIANA  
Mme Sandrine FRANCO-  
ALIBERT  
Mme Caroline DUCROS  
M. Marc MONTANA

CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE  
HYDROLOGIE

M. Armand GELLIS  
M. Christophe CURTI  
Mme Julie BROGGI  
M. Nicolas PRIMAS  
M. Cédric SPITZ  
M. Sébastien REDON

PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE,  
HOMEOPATHIE

M. Riad ELIAS  
Mme Valérie MAHIU-  
LEDDET

Mme Sok Siya BUN

Mme Béatrice  
BAGHDIKIAN

**MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)**

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION Mme Anne-Marie PENET-  
LOREC

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET M. Thierry ATHUYT  
NUISANCES TECHNOLOGIQUES

DROIT ET ECONOMIE DE LA PHARMACIE M. Marc LAMBERT

DROIT ET COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A M. Philippe BESSON  
L'OFFICINE ET GESTION DE LA PHARMAFAC

**A.H.U.**

CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE Mme Manon ROCHE

**A.T.E.R.**

CHIMIE ANALYTIQUE Mme Camille DESGROUAS

## **DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE**

**Responsable : Professeur Benjamin GUILLET**

### **PROFESSEURS**

PHARMACIE CLINIQUE	Mme Diane BRAGUER
PHARMACODYNAMIE	M. Benjamin GUILLET
TOXICOCINETIQUE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Athanassios ILIADIS
TOXICOLOGIE GENERALE	M. Bruno LACARELLE
TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT	Mme Frédérique GRIMALDI

### **MAITRES DE CONFERENCES**

PHARMACODYNAMIE	Mme Suzanne MOUTERDE- MONJANEL
PHYSIOLOGIE	Mme Sylviane LORTET  Mme Emmanuelle MANOS-SAMPOL

TOXICOCINETIQUE ET PHARMACOCINETIQUE

M. Hot BUN

M. Joseph CICCOLINI

Mme Raphaëlle

FANCIULLINO

TOXICOLOGIE GENERALE ET PHARMACIE CLINIQUE

M. Pierre-Henri

VILLARD

M. Stéphane HONORÉ

Mme Caroline SOLAS-  
CHESNEAU

Mme Marie-Anne

ESTEVE

**A.H.U.**

PHARMACODYNAMIE

M. Philippe GARRIGUE

**A.T.E.R.**

PHARMACODYNAMIE

M. Guillaume HACHE

Mme Ahlel BOUHLEL

## CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE

Mme Valérie AMIRAT-COMBRALIER, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-praticien hospitalier

Mme Marie-Hélène BERTOCCHIO, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Nicolas COSTE, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Sylvain GONNET, Pharmacien titulaire

Mme Florence LEANDRO, Pharmacien adjoint

M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire

M. Patrick REGGIO, Pharmacien conseil, DRSM de l'Assurance Maladie

Mme Clémence TABELLE, Pharmacien-Praticien attaché

Mme TONNEAU-PFUG, Pharmacien adjoint

M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Joël VELLOZZI, Expert-Comptable

Mise à jour le 22 FEVRIER 2018

# REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué à l'élaboration et au succès de ma thèse. Pour leur soutien et tous leurs précieux conseils.

## *Jury :*

**Je remercie en Premier lieu mon président de jury, Monsieur le professeur Philippe PICCERELLE** pour sa disponibilité et ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter ma réflexion. Vous me faites l'honneur de présider le jury de ma thèse. Recevez toute ma reconnaissance et l'expression de mon profond respect.

**Je remercie ma directrice de thèse, Madame la professeur Frédérique GRIMALDI,** d'avoir accepté d'encadrer la réalisation de ce travail et pour le temps que vous y avez consacré en m'apportant les outils méthodologiques indispensables. Merci encore pour votre aide, vos conseils avisés et votre disponibilité tout au long de la rédaction de cette thèse.

**Je remercie Madame le docteur Flora CODACCIONI** de m'avoir fait le plaisir de faire partie de mon jury. Tu m'as beaucoup appris sur le métier de pharmacien en me prenant sous ton aile. Merci d'avoir partagé tes connaissances et expériences dans ce milieu, tout en m'accordant ta confiance. Merci de ta présence et du soutien que tu m'apportes.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance et gratitude à l'ensemble du corps enseignant de l'université de Pharmacie Aix Marseille 2 qui m'a formé tout au long de mon cursus universitaire. Ainsi qu'au cadre administratif de la faculté.

J'adresse mes sincères remerciements à tous les professeurs, intervenant et toutes les personnes qui par leurs paroles, leurs écrits, leurs conseils et leurs critiques ont guidé mes réflexions.

Je tiens à remercier toute l'équipe de la Pharmacie Codaccioni, pour leur accueil, leur aide ainsi que leur soutien lors de mon stage de fin d'étude.

## *A ma famille, vous êtes ce que j'ai de plus précieux,*

**A mes parents**, sans qui je ne serais pas là. Maman, Papa, je sais que vous êtes fiers de moi et je suis très fier de vous montrer la personne que je suis devenu grâce à vous. Merci d'avoir toujours été là pour moi. Merci pour votre soutien inconditionnel dans tous les projets que j'ai pu entreprendre. Pour m'avoir épaulé moralement durant la réalisation de ma thèse. Merci d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir poussé chaque jour à donner le meilleur de moi-même. Je vous aime.

**A ma petite sœur Estelle**, pour toutes ces merveilleuses années d'enfance passées à tes côtés. Miracle j'y ai survécus ! ;-)) Merci pour tes encouragements, tes conseils et ton soutien en particulier dans les derniers instants de rédaction. Pour m'avoir toujours dit les choses telles qu'elles étaient et non telles que je voulais qu'elles soient. Pas toujours tendre avec moi, tu m'as permis de me dépasser et d'affronter les choses. On n'a pas besoin de mots pour se comprendre. C'est ce qui fait notre force ! Merci pour tous ces moments de complicité. Je suis peinée de la distance qui nous sépare, mais je suis très heureuse que tu réalises tes rêves et t'épanouisse professionnellement. Nos fous rires et nos chamailleries me manquent.... Je t'aime.

**A mon chéri**, merci pour tout. Pour ton aide pour la thèse, pour ta patience au quotidien. Et il en a fallu !!!! Merci pour toutes ces années où tu m'as soutenue. Pour ton amour, pour ta présence, ton écoute. Pour tous ces merveilleux souvenirs et ces moments de bonheur. Pour tous les projets que nous avons ensemble et ceux que nous construirons jours après jour. Tu es l'épaule sur laquelle je m'appuie. Mon rayon de soleil ! Ma moitié ! Merci de partager ma vie. Je t'aime.

**A Jean, Anny et Mémé**, vous m'avez accueillie, soutenue et choyée comme votre fille. Je vous remercie pour tous ces merveilleux moments partagés ensemble, ces voyages et ces week-ends au ski ou en mer. Merci pour tous ces petits plats fait maison. Et surtout pour votre joie de vivre ! Vous m'avez beaucoup apporté tout au long de ces 5 années. J'ai trouvé en vous une deuxième famille. Vous avez une grande place dans mon cœur.

**A Naya**, ma petite boulette piqueuse de chaussette qui remplit mon quotidien de joie et de rire !

**A mes grands-mères**, vous êtes partis trop tôt avant même que je ne réussisse le concours. J'espère que de là où vous êtes, vous me regardez et êtes fière de la personne que je suis devenue. Je suis fière d'être votre petite fille. Vous m'avez tant appris... Pour tous ces merveilleux moments passés à vos côtés. Pour tous ces souvenirs qui resteront gravés dans mon cœur. Pour votre sagesse, votre force, votre douceur et surtout pour votre amour. Vous m'avez enseigné que le bonheur est fait de l'instant présent et des petites choses simples de la vie. Vous me manquez énormément. Je pense chaque jour à vous. Merci de guider mes pas. Je vous aime !

**A pépé Germain**, j'éprouve une profonde joie et fierté à avoir réalisé ton rêve. Je regrette de ne pas t'avoir connu. **A mon grand-père**, tu m'as appris à voir la vie en rose, j'aurais aimé te connaître plus longtemps.

**Je remercie l'ensemble de ma famille pour leur soutien. A mes tatas et tontons, cousins et cousines, petit cousin et petites cousines.** Merci pour votre affection et tous ces merveilleux souvenirs ! Je vous aime.

*A mes amis, pour ces superbes années passées ensemble.*

**A Angélique, mon ami de toujours, 23 ans déjà !** Merci d'avoir toujours été présente pour moi dans les bons comme les moins bons moments. A tous nos fous rires à en pleurer et n'en plus s'arrêter ! A toutes nos parties de James bond ! A tous nos beaux souvenirs ! Tu es une amie en Or. Je t'adore !

**A mes amis rencontrés sur les bancs de la fac.**

**A Julie et Laurie,** mes amis 4 cents coup, sans qui toutes ces années d'études auraient été bien longues. Merci pour tous ces après-midis d'entraide durant les périodes examens. Et surtout pour tous nos francs moments de rigolade et nos soirées dansantes. Merci d'avoir supporté et accompagné ma folie !

**A Nathalie et sa petite famille,** merci pour ta gentillesse, ta douceur et ton écoute. Merci pour ces soirées délirantes. J'attends avec impatience la fameuse fondue au rosé d'Arnaud! ;-P

**A mes amis aventuriers Mathieu, Florian, Hélène, Leo et Roccio ; Yoan et Lolo, Christo et Marie** avec qui je passe d'excellents moments. A nos aventures et futures aventures au bout du monde. Merci de votre soutien.

**A mes amis Bachateros et Bachateras, Manou, Flo et Pierre.** Merci de votre amitié et soutien. Quand je me suis inscrite à la dance il y a bientôt 2 ans, je n'imaginai pas rencontrer de si belles personnes. Que la fiesta soit !!!

**A tous ceux que j'ai pu oublier et qui ont fait un bout de chemin avec moi. Toutes les personnes qui de près ou de loin, d'une manière ou d'une autre, m'ont aidé et soutenu durant ces années d'études, je vous dis Merci !**

**Enfin, un merci à toutes les personnes qui sont présentes en ce jour tant attendu et espéré.**

**« L'UNIVERSITE N'ENTEND DONNER AUCUNE  
APPROBATION, NI IMPROBATION AUX OPINIONS  
EMISES DANS LES THESES. CES OPINIONS  
DOIVENT ETRE CONSIDEREES COMME PROPRES  
A LEURS AUTEURS. »**

# TABLE DES MATIERES

LISTE DU PERSONNEL ENSEIGNANT DE LA FACULTE DE PHARMACIE DE MARSEILLE .....	0
REMERCIEMENTS .....	12
TABLE DES MATIERES .....	17
INTRODUCTION.....	37
PARTIE 1 - LE SERPENT .....	42
I Classification des ophidiens. ....	42
A) Origine et phylogénie. ....	42
1) Les Scolecophidia. ....	45
2) Les Alethinophidia.....	46
a) Les Hénophidia.....	47
b) Les Caenophidia. ....	47
1. La super-famille Acrochordoidea.....	48
2. La super-famille Colubroidea.....	48
B) Systématique. ....	49
1) Les Colubridae et les Lamprophiidae. ....	50
a) Les Lamprophiidae. ....	51
1. Psammophiinae. ....	51
2. Malpolon. ....	51
3. Atractaspidinae.....	52
a. <i>Atractaspis</i> (vipère taupe ou vipère fousseuse). ....	52
b) Les Colubridae. ....	53
1. Colubrinae. ....	53

a. Dispholidus (boomslang).....	53
b. <i>Thelotornis</i> (serpent liane). ....	53
c. <i>Boiga</i> (serpent ratier à ventre jaune). ....	54
d. Toxicodryas.....	54
e. Oxybelis.....	54
2. Dipsadinae.....	55
a. Philodryas.....	55
b. Clelia.....	55
c. Tachymenis.....	55
3. Natricinae.....	56
a. Rhabdophis.....	56
2) Les Homalopsidae.....	56
3) Les Elapidae.....	57
a) Les espèces terrestres : Elapinae (ou Elapidae).....	58
1. Acanthopis.....	58
2. <i>Boulengerina</i> (cobra aquatique). ....	58
3. <i>Bungarus</i> (bongare).....	58
4. Dendroapsis (mamba). ....	59
5. <i>Hemachatus</i> (cracheur du cap).....	60
6. <i>Micrurus</i> (serpent corail).....	60
7. <i>Naja</i> (cobra).....	61
8. <i>Notechis</i> (serpent tigre). ....	62
9. <i>Ophiophagus</i> (cobra royal).....	62
10. <i>Oxyuranus</i> (Taïpan).....	63
11. <i>Pseudechis</i> (serpent noir ou Mulga).....	64
12. <i>Pseudonaja</i> (serpent brun). ....	64
b) Les espèces semi-marines : Laticaudinae (ou Laticaudidae). ....	64

c) Les espèces marines : Les Hydrophiinae (ou Hydrophiidae).....	65
4) Les Viperidae. ....	66
a) Viperinae (Vipères « vraies »).....	67
1. <i>Causus</i> (vipère du cap).....	67
2. <i>Atheris</i> (vipère arboricole).....	68
3. <i>Bitis</i> . ....	68
4. <i>Cerastes</i> (vipère cornue). ....	68
5. <i>Daboia</i> (vipère de Rusell). ....	69
6. <i>Echis</i> (échide).....	69
7. <i>Macrovipera</i> . ....	70
8. <i>Montivipera</i> . ....	70
9. <i>Vipera</i> . ....	70
b) <i>Crotalinae</i> (Crotales).....	71
1. La tribu des Crotalini (serpents à sonnette).....	71
a. <i>Crotalus</i> (serpent à sonnette).....	71
b. <i>Sistrurus</i> (crotale pygmée ou serpent à sonnette pygmée). ....	72
2. La tribu des Lachesini. ....	72
a. <i>Bothrops</i> (fer de lance, trigonocéphale). ....	73
b. <i>Lachesis</i> (maître de la brousse, surucucu).....	73
c. <i>Protobothrops</i> (fer de lance asiatique). ....	74
d. <i>Trimeresurus</i> (crotales des bambous). ....	74
3. La tribu des Agkistrodonti.....	74
a. <i>Agkistrodon</i> (mocassins). ....	74
b. <i>Calloselasma</i> (crotale de Malaisie). ....	75
c. <i>Deinagkistrodon</i> (crotale cent pas).....	75
d. <i>Gloydius</i> (mocassin asiatique, mamushi). ....	76
e. <i>Hypnale</i> .....	76

c) Azemiopinae.....	76
II Anatomie du serpent.....	77
A) Morphologie externe.....	77
1) La silhouette.....	77
2) La taille.....	78
3) La peau et les écailles.....	78
a) Généralités.....	78
b) Fonctions des écailles.....	79
c) Les divers types d'écailles.....	80
1. Les écailles de la tête.....	80
2. Les écailles de la queue.....	82
3. Les écailles du dos.....	83
4. Les écailles du ventre.....	83
d) La mue.....	84
e) La coloration.....	85
4) Organes sensoriels.....	87
a) L'Ouïe.....	87
b) L'odorat.....	88
c) La Vision.....	89
1. La rétine.....	90
2. Le cristallin.....	90
3. La pupille.....	91
a. Généralités.....	91
b. Spécialisation de la pupille.....	91
d) Les fossettes thermosensibles.....	92
1. Structure.....	92
2. Principe.....	93

e) Autre sens : Les tubercules et fossettes des écailles.....	94
1. Les tubercules.....	94
2. Les fossettes. ....	95
B) Morphologie interne.....	96
1) Ostéologie. ....	97
a) Le squelette.....	97
b) La locomotion. ....	98
c) Le crâne. ....	99
d) La dentition. ....	99
2) L'appareil digestif.....	101
3) L'appareil respiratoire.....	102
4) L'appareil cardio vasculaire.....	103
5) L'appareil nerveux.....	104
6) L'appareil reproducteur. ....	104
7) L'appareil excréteur. ....	105
III L'appareil venimeux.....	105
A) Les quatre principaux types de maxillaires.....	106
1) Les maxillaires Aglyphes (Boas, Pythons, Colubridae, Lamprophiidae et les Homamopsidae). ....	108
2) Les maxillaires Opistoglyphes (Colubridae, Lamprophiidae et Homamopsidae (Malpolon)). ....	109
3) Les maxillaires Protéroglyphes (Elapidae). ....	110
4) Les maxillaires Solénoglyphes (Viperidae et Atractaspidinae). ....	111
a) Maxillaire des Viperidae. ....	111
b) Maxillaire des Atractaspidinae.....	111
B) Les glandes venimeuses.....	112
1) La glande de Duvernoy (Colubridae et Psammophiinae). ....	113
a) Origine et diversité. ....	113

b) Exemple d'espèces dangereuses.....	114
c) Structure. ....	115
d) Composition du venin. ....	116
2) La glande à venin dite « vraie ». ....	116
a) Description de la glande à venin des Elapidae. ....	117
b) Description de la glande à venin des Viperidae. ....	118
c) Description de la glande à venin des Atractaspidae. ....	118
d) Schéma des différentes glandes à venin. ....	119
<b>PARTIE 2 - LE VENIN</b> .....	<b>120</b>
I Synthèse naturelle du venin de serpent par la glande à venin. ....	120
II Composition chimique du venin. ....	121
A) Structure générale. ....	122
B) Les enzymes.....	124
1) Phospholipases A2. ....	125
a) Structure. ....	126
b) Activités toxicologiques.....	127
2) Acétylcholinestérases.....	128
3) Phosphoestérases.....	129
4) L-amino-acide-oxydases. ....	130
a) Structure. ....	131
b) Mécanisme d'action et effets biologiques et pharmacologiques.....	132
5) Hyaluronidases.....	133
6) Protéases. ....	133
a) Sérines-protéases (de type trypsine).....	134
1. Structure et mécanisme d'action.....	134
2. Fonctions physiologiques.....	135
b) Métallo-protéases (SVMP).....	136

1. Structure. ....	136
2. Classification. ....	138
3. Rôles biologiques et pharmacologiques. ....	140
7) Enzymes lytiques diverses. ....	142
C) Toxines. ....	142
1) Classification structurale. ....	143
a) Les toxines à trois doigts. ....	143
1. Structure générale des toxines à trois doigts. ....	143
2. Activité biologique des toxines à trois doigts. ....	144
2) Classification fonctionnelle. ....	146
a) Neurotoxines postsynaptiques (3FTx). ....	146
1. Les toxines curarisantes. ....	146
a. Structure. ....	146
b. Classification. ....	147
b. 1- Les $\alpha$ -neurotoxines. ....	147
b. 2- Les $\kappa$ -neurotoxines. ....	147
b. 3- Les $\alpha/\kappa$ -neurotoxines. ....	147
b. 4- Les neurotoxines non-conventionnelle. ....	148
2. Les toxines muscariniques. ....	148
3. Les toxines adrénergiques. ....	149
4. Les toxines gabaergiques. ....	149
b) Neurotoxines présynaptiques bloquantes (à activité enzymatique phospholipasique). ....	150
1. Structure et mécanisme d'action. ....	150
2. Classification. ....	151
a. Les neurotoxines- $\beta$ monocaténares. ....	151
b. Les neurotoxines- $\beta$ multicaténares. ....	151

b. 1- La $\beta$ -bungarotoxine. ....	151
b. 2- Les autres neurotoxiques- $\beta$ .....	152
c) Neurotoxines facilitatrices présynaptiques / Toxines dépolarisantes (généralant un bloc par dépolarisation). ....	153
1. Dendrotoxines. ....	153
2. Fasciculines (3FTx).....	154
d) Cytotoxines (3FTx). ....	154
1. Structure. ....	155
2. Mécanisme d'action. ....	156
e) Myotoxines. ....	157
f) Sarafotoxines.....	158
g) Les toxines inhibitrices des canaux calciques de type-L (3FTxs).....	160
1. Calciseptine et FS2 (3FTx). ....	160
2. Autres. ....	160
h) Désintégrines. ....	161
1. Structure. ....	161
2. Classification. ....	162
3. Diversité fonctionnelle et intérêts. ....	163
i) Toxines à activités analgésiques (3FTx). ....	164
j) Toxines à activité anticoagulantes : Les Hemextines (3FTx). ....	164
D) Autres composés. ....	165
1) Lectines de type C (CTL).....	165
a) Structure. ....	165
b) Classification. ....	166
c) Activité fonctionnelle biologique. ....	166
2) Facteur de croissance des nerfs « NGF ». ....	169
3) Facteur du venin de cobra « CVF ». ....	169

4) Facteurs cardiaques natriurétiques : La dendropeptine (hormone).....	170
5) Inhibiteurs et activateurs enzymatiques. ....	170
III Variabilité des venins. ....	171
A) Variations phylogéniques. ....	172
B) Variations ontogéniques et environnementales. ....	172
C) Variabilité de la quantité de venin injecté.....	173
IV L'aire des techniques « omiques ». ....	174
A) La protéomique. ....	175
B) La transcriptomique. ....	175
C) La génomique.....	176
D) Projet européen « VENOMIC » : Banque de séquences des venins d'animaux mondiale.	
177	
V Méthodes d'analyses des venins de serpents (protéomique). ....	178
A) Schéma général du venin au médicament.....	178
B) Techniques protéomiques. ....	180
1) Prélèvement du venin.....	180
a) Réglementation et conditions de détention des serpents. ....	180
b) Prélèvement, purification et conservation du venin de serpent.....	181
2) Séparation des différents constituants.....	181
a) L'électrophorèse. ....	181
b) La chromatographie.....	182
3) Spectrométrie de masse et caractérisation de la structure primaire (Analyse structurale).....	184
a) Une avancée technologique. ....	184
b) Spectromètre de masse simple MS (principe).....	185
1. Le système d'introduction de l'échantillon. ....	186
2. La source d'ionisation des molécules.....	186
a. MALDI (l'Ionisation par Désorption Laser Assistée par Matrice). ....	187

b. ESI (l' Ionisation par ElectroSpray).....	188
c. NanoESI (Nano-électrospray ou Nanospray analyse).....	189
d. Complémentarité.....	190
3. Le système dispersif ou analyseur.....	190
4. Le détecteur.....	191
5. Le système de traitement des données informatiques.....	192
c) Spectrométrie de masse en tandem : Le séquençage MS/MS : (Structure primaire (séquence d'acide aminé de NOVO)).....	192
4) Interrogatoire des bases de données et identification de la protéine par bio-informatique.....	194
C) Techniques de séquençage.....	194
1) Méthode enzymatique de Sanger.....	194
2) Séquençage de deuxième génération NGS (Next-generation sequencing).....	195
D) Synthèse de la protéine d'intérêt.....	196
1) Techniques recombinantes (in vivo).....	197
2) Synthèse chimique (in vitro).....	198
E) Analyse de la structure tridimensionnelle.....	200
1) Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).....	200
2) Cristallographie.....	200
3) Diffraction aux rayons X.....	201
F) Identification de la cible et détermination de l'activité biologique.....	201
1) Criblage pharmacologique à haut débit (HTS) : obtention de la protéine de plomb ou « hit ».....	202
2) Tests biologiques.....	203
a) Test in vivo (sur animal).....	203
b) Test ex vivo (sur tissus ou cellules isolée).....	203
c) Test in vitro (en éprouvette).....	204
d) Test in silico (bio informatique).....	204

3) Modélisation moléculaire tridimensionnelle.....	205
a) Méthodes de « modélisation comparative ».....	206
b) Méthodes « ab initio ».....	206
4) Méthode Docking (amarrage ligand-récepteur).....	207
5) SAR « structure activité relationship ».....	207
G) Ingénierie : Optimisation moléculaire (Lead optimisation).....	208
H) Essais précliniques et clinique.....	209
1) Etude préclinique.....	209
2) Etude clinique Phase I.....	209
3) Etude clinique Phase II.....	209
4) Etude clinique Phase III.....	210
5) Etude clinique Phase IV.....	210
<b>PARTIE 3 - APPLICATIONS THERAPEUTIQUES.....</b>	<b>211</b>
I Applications cardiovasculaires, notamment le traitement de la pression artérielle.....	212
A) Les Inhibiteurs de l'Enzyme de Conversion ou IEC.....	213
1) Les origines des IEC.....	213
a) Le pentapeptide BPP5a.....	215
b) Le nonapeptide BPP9 « Teprotide ».....	216
c) Modulation moléculaire : Relation Structure -Activité.....	217
d) 1974 : Création du Captopril.....	218
2) Le médicament.....	219
a) Indications.....	219
b) Mécanisme d'action.....	220
c) Pharmacocinétique.....	222
d) Effets indésirables et précautions d'emploi.....	222
e) Interactions médicamenteuses.....	223
f) Contre-indications.....	224

B) Les peptides natriurétiques.....	225
1) Rappels sur les peptides natriurétiques humains. ....	225
a) Structure. ....	227
b) Effets Physiologiques. ....	227
2) Les peptides natriurétiques ophidien : le DNP « Dendroapsis natriuretic peptide ». ....	229
a) Le CD-NP Cenderitide. ....	230
b) Essais cliniques. ....	231
C) Les inhibiteurs des canaux calciques de type-L.....	232
1) Calciceptine et FS2 : Inhibiteurs spécifiques des canaux calciques de type-L.....	232
2) L-calchin. ....	233
D) Les sarafotoxines. ....	234
E) La $\beta$ -cardiotoxine (une toxine $\beta$ -bloquante).....	235
II Applications de l'hémostase : Troubles de la coagulation et exploration de l'hémostase.	235
A) Physiopathologie.....	236
1) Physiologie de l'hémostase.....	237
a) Hémostase primaire. ....	237
b) Coagulation sanguine. ....	239
c) Fibrinolyse : restauration de la perméabilité vasculaire. ....	242
d) Mécanismes régulateurs de l'hémostase. ....	242
1. Régulation locale.....	242
2. Régulation systémique. ....	243
2) Modes d'action des venins de serpents sur l'hémostase. ....	244
a) Action sur l'endothélium.....	244
b) Action pro-coagulante. ....	245
c) Action anti-coagulante directes. ....	245
d) Action sur les plaquettes. ....	246

e) Schéma général.....	248
B) Utilisation comme agents thérapeutiques, outils de diagnostic et de surveillance des traitements anticoagulants.....	251
1) Les agents pro-coagulants.....	251
a) Les agents activateurs des facteurs de la coagulation sanguine. ....	251
1. Facteurs V-Like et Va-Like.....	252
a. RVV-V. ....	252
a. 1- Dosage du FV (essai chromogénique).....	253
a. 2- Suivi des traitements anticoagulants. ....	253
a. 2. 1- Pefakit® PiCT®.....	253
a. 3- Diagnostique du Facteur V de Leiden résistant à la protéine C activé (APC).....	255
a. 3. 1- Le facteur V Leiden. ....	255
a. 3. 2- Pefakit® APC-R Factor Leiden et ACTICLOT ®Protéine C Résistance. ....	255
2. Facteur X-Like (et Xa-like).....	257
a. RVV-X. ....	258
a. 1- Structure. ....	258
a. 2- Applications.....	258
a. 2. 1- Stypven® (temps au Stypven). ....	259
a. 2. 2- Diagnostique LA : « dRVVT » Temps de venin de la vipère de Russel dilué.....	260
a. 2. 3- Diagnostique d'une résistance à la protéine C : dRVVT (GradiLeiden V). ....	263
b. Activateur du facteur X de <i>Crotalus viridis helleri</i> .....	264
b. 1- Sta-Staclot APC-R (diagnostique de la résistance à la PCA par mutation de Leiden). ....	264
3. Facteur VIII ophidien pour soigner les hémophiles. ....	265
b) Les enzymes activatrices de la prothrombine. ....	265
1. Répartition en différents groupes. ....	266

a. Le premier groupe (groupe A).....	266
b. Les activateurs du second groupe (groupe B). ....	266
c. Le troisième groupe (groupe C). ....	266
d. Le quatrième groupe (groupe D).....	267
e. Le cinquième groupe. ....	267
2. Utilisations. ....	267
3. Ecarine.....	268
a. Le temps d'écarine (ECT : Ecarin Clotting Time). ....	269
a. 1- Application. ....	269
a. 2- Principe.....	270
a. 3- Le temps d'écarine « ECT » contre TCA.....	270
b. «Ecarin Chromogenic Assay» (ECA) (Diagnostica Stago, France): test écarine chromogénique. ....	271
c. Diagnostic d'un déficit en vitamine K.....	272
d. Processus de la préparation de sérum.....	272
4. Textarine.....	272
a. Le temps de Textarine : Textarine®.....	273
b. Le rapport Textarine / écarine. ....	273
5. Enzymes issus du venin de Taïpan et temps de venin de Taïpan dilué (TVTd). ....	274
6. Pseutarine C.....	275
a. Pseutarine C.....	275
b. CoVase® (V0801) facteur Va-like.....	276
c. Haempatch® (Q8009) (facteur Xa-like).....	277
c) Les enzymes thrombiniques ou thrombine-like ophidiennes (SVTLEs) homologues de la thrombine. ....	277
1. Les différents groupes d'enzymes thrombiniques. ....	279
a. Groupe 1, libération de fibrinopeptides A.....	279

b. Groupe 2, libération de fibrinopeptides B.....	279
c. Groupe 3, libération de fibrinopeptides A et B. ....	279
2. Applications médicales des enzymes thrombiniques.....	280
a. Prévention et traitement des thromboses vasculaire et maladies occlusives. .....	280
b. Outils de diagnostic.....	281
3. Batroxobine.....	281
a. Batroxobine comme agent thérapeutique.....	283
a. 1- Défibrinase®.....	283
a. 2- Reptilase® (Hemocoagulase) Bothropase®.....	283
b. Batroxobine comme outil de diagnostic, Reptilase® : « Temps de Reptilase®. .....	285
c. Batroxobine comme suture biologique.....	287
c. 1- Le Vivostat®.....	288
c. 2- SB50 : Pansement hydrogel intégrant la batroxobine.....	289
4. Ancrod (Viprinex®).....	290
a. Mécanisme.....	290
b. Essais clinique test.....	291
5. Les autres enzymes thrombiniques.....	293
a. Crotalase.....	293
b. Thrombocytine.....	294
c. Acutine.....	294
d. Gyroxine.....	295
e. Grambine.....	295
d) Les agents antifibrinolytiques (inhibiteur de plasmine).....	296
1. Textilinin-1 (Q8008).....	296
2) Les agents anti-coagulants.....	297
a) Les inhibiteurs directs de la thrombine.....	298

1. Bothrojaracine.....	298
2. Exanta.....	299
b) Les fibrino(géno)lytiques.....	299
1. Les fibrinogénases.....	300
a. Fibrolase.....	301
b. Alfimeprase.....	302
c. RVV -73.....	305
d. Hannahpep.....	305
2. Les fibrinolytiques par activation du plasminogène .....	305
a. TSV-PA.....	305
3. Autres agents fibrinolytique ophidiens : les estérases d'arginine.....	307
c) Les agents activateurs de la protéine C.....	307
1. ProtaC®.....	308
2. ProC Global®.....	310
3) Les agents qui agissent sur les plaquettes.....	311
a) Les inducteurs de l'agrégation plaquettaire.....	311
1. Botrocétine.....	311
a. La maladie de Von Willebrand.....	312
b. La dystrophie thrombocytaire hémorragique de Bernard et Soulier.....	313
2. Alboaggrégine-B.....	313
3. Echicétine.....	314
4. Convulxine.....	314
b) Les inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire .....	314
1. Les désintégrines qui ciblent l' $\alpha$ IIb $\beta$ III.....	315
a. Echistatine (Aggrastat®, Tirofiban®).....	316
b. Barbourin (Eptifibatide®, Integrillin®).....	317
c. Bitistatine.....	318

2. Toxine à trois doigts : KT-6.9. ....	318
III Applications oncologiques. ....	319
A) Intérêt du venin ophidien. ....	320
B) Mode d'action du venin ophidien. ....	321
1) Les désintégrines.....	324
a) Triflavine. ....	327
b) Contorstrostatine. ....	328
1. Cancer du sein ( $\alpha V\beta 3$ POSTIF). ....	329
2. Tumeur ovarienne ( $\alpha V\beta 3$ négatif, $\alpha v\beta 5$ positive). ....	330
3. Vicrostatine. ....	331
c) Eristostatine. ....	332
d) Salmosine. ....	333
e) Rhodostomine.....	334
2) Les métallo-protéases, la jararhagine.....	335
3) Lectine de type C. ....	336
a) BIL. ....	336
b) Lebécétine et Lébecétine.....	337
c) BJcuL.....	338
d) Rhodocétine, EMS16 et VP12. ....	338
e) Rhodocytine.....	338
4) Les phospholipases A2. ....	340
a) Mode d'action, généralités. ....	340
b) DssPLA <sub>2</sub> extraite du venin de <i>Daboia siamensis</i> . ....	341
c) <i>Macrovipera lebtina</i> et <i>Ceraste ceraste</i> effet anti tumoral et anti-angiogénique via les intégrines. ....	342
1. Etude structure fonction. ....	342
2. Cible les nouveaux vaisseaux.....	343

5) Les sérine-protéases thrombine-like. ....	345
a) Crotalase. ....	346
b) Batroxobine. ....	346
6) Les L-amino-acide-oxydases. ....	347
a) LAAO isolée du venin du cobra roi <i>Ophiophagus hannah</i> . ....	350
7) Toxines du venin de <i>Crotalus durissus terrificus</i> . ....	350
a) Le venin. ....	350
b) Crotoxine. ....	351
1. Structure. ....	351
2. Mécanisme d'action. ....	351
3. Applications. ....	353
c) Crotamine. ....	356
1. Mécanisme de pénétration cellulaire et de la délivrance cellulaire. ....	358
2. Essai préclinique in vivo. ....	359
3. Avantages de la crotamine et perspective. ....	359
4. Optimisation de la crotamine : "NrTPs" ....	360
IV Applications neurologiques. ....	361
A) Découverte et analyse du récepteur cholinergique. ....	362
B) La maladie d'Alzheimer. ....	363
1) K49-P1-20. ....	363
a) Etudes structurales. ....	364
b) Mécanisme. ....	365
c) Conclusion. ....	366
2) RVV-V. ....	367
3) Dendrotoxines. ....	367
4) Haditoxine. ....	368
C) Les facteurs de croissances des nerfs NGF. ....	369

1) Mécanisme d'action. ....	370
D) Sclérose en plaque et encéphalomyélite allergique. ....	371
1) $\alpha$ -cobratoxine. ....	371
2) RPI-78M. ....	372
E) Myasthénie grave-Dystrophie. ....	373
1) $\alpha$ -bungarotoxine. ....	374
2) Notexine. ....	375
a) Action myotoxique et étude sur le mécanisme de régénération musculaire. ....	375
b) Mécanisme de la notexine. ....	376
c) Aspect histologique. ....	377
d) Conclusion. ....	379
3) Crotamine et néostigmine. ....	379
F) Action sur les récepteurs GABA de type A (Epilepsie, schizophrénie, douleur chronique, etc.).....	380
1) Micrurotoxines. ....	381
a) Mécanisme d'action.....	381
G) Actions antidépressives nootropiques et antipsychotiques. ....	383
V Applications antalgiques et analgésiques. ....	384
A) Utilisation du venin de serpent. ....	385
B) Toxines analgésiques d'Elapidae. ....	386
1) Mambalgine : toxines actives sur les canaux ASICs « Acid- Sensing Ion Channels ». ....	386
a) La MiTx : identification d'une nouvelle cible biologique.....	387
b) Les canaux ASICs (canaux ioniques de détection acide).....	387
c) Mambalgines. ....	388
1. Structure. ....	389
2. Activité biologique. ....	389
3. Conclusion.....	390

d) Hannalgésine.....	392
1. Premières études pharmacologiques.....	392
2. Prohanine.....	393
3. THA 903.....	394
e) Cobrotoxine.....	395
1. Voie intra nasale.....	395
2. Traitement de la douleur cancéreuse.....	396
3. Traitement de l'arthrite.....	397
4. Nyloxine (homéopathie).....	397
f) Cobratoxine.....	398
1. Mécanisme d'action.....	398
2. Action analgésique.....	399
3. La réceptine.....	401
C) Toxine du Viperidae <i>Crotalus durissus terrificus</i> .....	402
1) Le venin brut.....	402
2) Crotalphine.....	403
3) Crotoxine.....	405
4) Crotamine.....	407
CONCLUSION.....	408
BIBLIOGRAPHIE.....	411
TABLES DES ILLUSTRATIONS.....	456
MOTS CLES.....	460

# INTRODUCTION

Depuis la nuit des temps, le serpent est à la fois objet de crainte et de fascination chez les Hommes du monde entier. Outre son pouvoir destructeur ou le danger potentiel qu'il représente, le serpent fascine par son apparence et l'altérité qui l'oppose aux autres vertébrés terrestres. Sa morphologie particulière, l'absence de membres, les déplacements sinueux et silencieux qui semblent le faire évoluer dans une autre dimension, sa peau écailleuse capable d'une mue régénératrice, sa langue agile et filiforme, organe sensoriel dépourvu de toute fonction toxique ou capacité vulnérante, inquiète et, pour beaucoup, représente un danger potentiel. L'inconscient collectif fait l'analogie avec le langage, distribuant mauvaises nouvelles et punitions. Tout cela représente un ensemble de caractéristiques ou attributs que l'homme a exalté depuis des millénaires.

Les serpents font partis des animaux les plus redoutés. Mal connus donc mal aimés, ils font l'objet de nombreuses légendes et croyances à l'origine d'un puissant contentieux culturel, ce qui renforce la crainte, voir le dégoût qu'ils inspirent. Pourtant sur les 3 500 espèces de serpents, moins de 700 espèces seulement sont dangereuses pour l'homme en raison de la conformation de leur appareil venimeux, de la composition du venin et des risques d'accidents.

Divinité fondatrice de la plupart des civilisations, le serpent est un symbole universel que l'on peut retrouver dans de nombreux mythes et cultures. Il est vie, mort, renaissance, renouveau, en relation avec la guérison, la sagesse, la connaissance, les choses secrètes, la fécondité.

Chez les Ouroboros, le serpent qui se mord la queue, symbole d'autofécondation et d'éternel recommencement. Le Quetzalcoatl, ou « Serpent à plumes », chez les Aztèques, était un dieu de la mort, mais aussi de la Renaissance. Il serait allé dans le monde souterrain afin de créer le cinquième monde des hommes. Le Serpent est également associé à un rôle protecteur, comme en Égypte où le cobra, l'uræus sacré, protégeait les pharaons. Mais aussi dans l'hindouisme et le bouddhisme où un cobra géant protège Bouddha en méditation. Le serpent, dépourvu de pattes, le corps tout entier collé au sol, s'abritant sous terre, est considéré assez universellement comme le symbole de la Terre-mère. Créature parfois aquatique, représente parfois l'Esprit de

l'Eau. Dans certaine culture, en Afrique par exemple le serpent est un animal sacré symbole de ce qui est magique et spirituel. Pour la culture aborigène le Serpent Arc en Ciel joue un rôle important dans le Temps des Rêves. La Kundalini est par ailleurs représentée comme un serpent endormi, lové au niveau du premier chakra où l'éveil de cette énergie vitale permet à l'initié d'atteindre la Sagesse.

Par le fait qu'il entre et sort de la Terre, le serpent incarne l'immortalité, l'infini et les forces sous-jacentes menant à la création de la Vie. Ses mues symbolisent la régénération, le rajeunissement et le renouvellement de la vie. Symbole de vie, de mort et de résurrection, il apparaît presque toujours sous deux aspects contradictoires, tantôt puissance vertueuse de la création et de l'immortalité, tantôt monstre détenteur de la connaissance et mortifère, véritable dichotomie entre le Bien et le Mal. Cette ambiguïté du serpent se manifeste le mieux dans sa double symbolique de donateur de vie et de messenger de mort, de sagesse et de chaos. A l'instar du serpent on retrouve la double nature du travail du médecin traitant de la vie et de la mort, de la maladie et de la santé. L'apparente opposition met en lumière la complémentarité de ces deux dimensions.

En dépit d'être toxique, les produits dérivés des venins ophidiens sont connus pour avoir des propriétés médicinales depuis toujours. L'ambiguïté se poursuit même jusqu'à l'utilisation de médicaments, qui peuvent être bénéfiques ou néfastes.

Le serpent est un animal étroitement lié à la terre, symbole du savoir. Messenger de la Terre, il apporte aux hommes la clef des mystères naturels, symbole des sciences. Le serpent est devenu le Tentateur des hommes qui recherchent la connaissance et bravent Dieu qui la leur interdit. C'est au Moyen-Âge que Satan, métamorphosé en serpent, fut désigné responsable du péché d'Ève et de la chute de l'homme. Dans la Bible, le Serpent symbolise la tentation, et provoquera la chute d'Adam lorsqu'il goûta avec Eve aux fruits de l'arbre de la Connaissance. Dans l'idéologie judéo-chrétienne, le serpent est le démon tentateur qui a entraîné la perte de l'homme et sa déchéance éternelle que seule la Rédemption divine peut absoudre. Sans doute, l'aspect le plus singulier de cette perception du serpent est qu'il est source du Savoir, et non pas simple corrupteur. Ce pouvoir, jugé primordial par les humains, est présent dans de nombreuses sociétés antiques. Du fait de sa symbolique de sagesse et de connaissance on retrouve le serpent sur le caducée, emblème des professions de santé.

Entre le serpent et notre santé, les liens remontent à la plus haute Antiquité. C'est ainsi que le dieu de la Médecine, Asclépios (Esculape), avait le Serpent pour attribut, appelé maintenant caducée. La légende rapporte qu'un jour, en se promenant, Asclépios voyant un serpent se diriger vers lui, lui tendit son bâton. L'animal s'y enroula. Asclépios frappa le sol et tua la bête. Un second serpent apparut soudain, tenant dans sa bouche, une herbe mystérieuse avec laquelle il rappela à la vie l'autre reptile. Asclépios eut alors la révélation de la vertu médicinale des herbes. Le bâton du caducée est le symbole de l'arbre de vie et du voyageur universel, de l'activité du médecin qui promène à travers le monde sa science secourable. Le serpent, en s'insinuant dans les fissures de la Terre, était censé en connaître tous les secrets ainsi que les vertus des plantes médicinales, voire les mystères entourant la mort (allusion aux oracles par lesquels Asclépios indiquait aux malades les remèdes à appliquer). **Le caducée d'Asclépios est devenu l'emblème universel des professions médicales et se prête à de nombreuses interprétations.** Lorsque le serpent d'Asclépios s'enroule autour du bâton d'Asclépios il forme l'emblème asclépiade qui symbolise le dieu de la Médecine. Lorsque le serpent d'Asclépios s'enroule autour d'un bâton surmonté d'un miroir, il forme le caducée de l'Ordre des Médecins de France. Le miroir symbolisant la prudence que le médecin doit avoir avant chaque décision médicale. Lorsque le serpent d'Asclépios s'enroule autour de la coupe d'Hygie, la déesse de la Santé et fille d'Asclépios, il forme l'emblème des Pharmaciens. Les sages-femmes ont remplacé le bâton d'Asclépios par une forme ovoïde symbolisant l'utérus de la femme enceinte, formant ainsi leur caducée. Lorsque le serpent d'Asclépios est associé au microscope et au miroir, il forme l'emblème de certains laboratoires d'analyses médicales. Enfin, le serpent d'Asclépios associé au diapason forme l'emblème des audioprothésistes



Medecins



Pharmaciens



Sages-femmes

Cependant vers le XVI<sup>e</sup> siècle, une confusion est apparue avec le caducée d'Hermès, qui peu à peu est devenu l'emblème de la profession médicale dans de nombreux pays. La légende rapporte qu'Apollon échangea avec Hermès une baguette en or contre une lyre. Hermès découvrit la vertu du bâton d'or lorsqu'il tenta de séparer deux serpents en lutte. Ceux-ci s'enroulèrent en sens inverse autour du bâton. Cet emblème devint la marque des hérauts et des messagers. Primitivement, le caducée, réalisant le difficile équilibre de tendances antagonistes autour de l'axe du monde. Les serpents représentant le feu et l'eau, la baguette la terre et les ailes le ciel, fut donc un symbole de paix porté par le Messager des Dieux. Pour les alchimistes les deux serpents représenteraient les principes antagonistes (soufre/mercure, fixe/volatile, humide/sec, chaud/froid...) qui doivent s'unifier dans l'or unitaire de la tige. Pour les domaines moral et médical, le caducée peut aussi représenter la lutte maîtrisée entre les instincts et la maîtrise de soi ou les maladies et la santé, avec une issue forcément spirituelle. Le serpent s'enroule autour du bâton qui symbolise l'arbre de vie, pour signifier la vanité domptée et soumise, son venin se transforme en remède.



**Les serpents possèdent dans leurs venins une ressource précieuse et exceptionnelle de médicaments. Si la représentation mythique que toutes les cultures se font du serpent tire son origine de l'ignorance de sa véritable nature, elle est également responsable du retard pris par les scientifiques dans l'étude de cet animal très particulier. Bien souvent, les légendes se sont substituées à l'observation et à l'expérimentation pour le décrire et l'expliquer. La découverte du venin et de ses propriétés toxiques remonte à la Renaissance. Outre la protection contre les morsures de serpent, les travaux sur les venins ophidiens s'orientent désormais vers leur utilisation en recherche biologique et en médecine. Apanages du XX<sup>ème</sup> siècle, mais promis au XXI<sup>ème</sup> à un avenir fructueux, ils offrent des débouchés particulièrement féconds à la recherche médicale et à la thérapeutique moderne.**

Cette thèse a pour objectif de permettre aux lecteurs une meilleure appréhension du potentiel thérapeutique des venins de serpent. Elle rappelle dans une première partie la classification, l'anatomie et la physiologie des serpents et plus particulièrement leur appareil venimeux avant de développer dans une seconde partie les différents composants des venins et leurs modes d'action variés. Nous développerons ensuite les processus mis en œuvre pour transformer une toxine animale en médicament efficace et les nouvelles avancées technologiques. Plusieurs de ces composés ophidiens sont à l'origine de nouvelles familles pharmacologiques. Ainsi, nous terminerons par énumérer dans une troisième partie les différentes applications thérapeutiques des venins de serpent, les médicaments déjà sur le marché ainsi que tous les espoirs et potentielles applications futures des molécules ophidiennes. De nombreuses toxines contenues dans les venins pourraient être utilisées pour développer de nouveaux agents pour le traitement et la prévention des maladies humaines.

# PARTIE 1 - LE SERPENT

## **I Classification des ophidiens.**

### **A) Origine et phylogénie.**

Les serpents sont récemment apparus sur terre, au milieu du crétacé, il y a environ 100 à 150 millions d'années, à partir d'un ancêtre commun avec les varans [1]. A cette époque, la terre est composée de deux continents, la Laurasia, qui donnera l'Amérique du Nord, l'Europe et l'Asie, et le Gondwana, qui deviendra l'Amérique du Sud, l'Afrique, l'Australie et l'Antarctique.

Le phénomène de la dérive des continents, puis les phénomènes climatiques par la suite ont contribué à la répartition et biodiversité mondiale des serpents telle que nous les connaissons aujourd'hui. La date d'apparition d'une famille de serpent détermine, dans une certaine mesure, les frontières des territoires colonisés, les limites étant liées à l'émergence des océans. L'occupation de la quasi-totalité des environnements naturels, des déserts aux forêts, de la mer à la haute montagne, ainsi que certains milieux anthropiques, atteste du succès évolutif et adaptatif des serpents, même s'ils apparaissent fragilisés par la pollution et la forte prédation dont ils font l'objet [1].

La biologie moléculaire est une science nouvellement utilisée en systématique. Elle permet d'établir le degré de similitude dans la composition nucléique de certains gènes appartenant à des spécimens distincts. Les techniques évoluent rapidement dans ce domaine mais les interprétations restent encore délicates en raison du calibrage difficile à réaliser et de la modélisation qui reste encore imparfaite. Bien qu'il existe une convergence entre la classification établie à partir de la morphologie des spécimens et celle proposée par les résultats de l'analyse de l'ADN, il n'en reste pas moins que des différences apparaissent, le plus souvent à propos d'individus morphologiquement proches. La datation biologique proposée, présente parfois des discordances avec les fossiles. Si la biologie moléculaire constitue un outil performant et incontournable dans l'étude de la phylogénie des espèces, elle ne peut toutefois

s'affranchir des autres disciplines : anatomie, paléontologie, physiologie, etc. Toutes ces démarches sont complémentaires et indissociables les unes des autres [1] [2].

Dans tout système de classification la principale difficulté est de caractériser les limites entre deux formes semblables et surtout de les hiérarchiser ou de définir leurs relations et liens de parenté. Ainsi, nous avons choisi le découpage taxonomique de Vidal et al (2007), Vidal et Hedges (2009) et Pyron et al (2011) (2013) qui sont les plus en adéquations avec les résultats récents de biologie moléculaire. Nous précisons que certains auteurs présentent des avis divergents et argumentés [1]. La phylogénie est basée sur les concepts de l'évolution. Les serpents appartiennent au règne **Animalia**, à l'embranchement des **Chordata**, au sous-embranchement **Vertebrata**, à la super classe **Tetrapoda**, au clade **Amniota**, à la classe **Sauropsida** et à la sous-classe **Diapsida**.

Les serpents sont des reptiles, il s'agit de vertébrés ectothermes, c'est-à-dire que leur température dépend du milieu extérieur. Ils sont amniotes, leurs œufs possèdent une membrane vitelline qui enferme un embryon ainsi que trois membranes extra-embryonnaires (l'amnios, le chorion et l'allantoïde). Le développement de l'embryon s'effectue sans stade larvaire [3]. Les reptiles constituent un ensemble paraphylétique et polyphylétique, divisé en quatre ordres :

- Les chéloniens (tortues ou testudinata).
- Les crocodyliens (crocodiles ou crocodilia).
- Les rhynchocéphales (sphénodons ou rhynchocephalia).
- Les squamates (squamata).

Les serpents appartiennent avec les lézards, les amphisbènes et les sphénodons au super ordre **Lepidosauria**. Les trois premiers partagent une peau écailleuse qui les fait réunir dans l'**ordre des Squamates**, dont l'homogénéité est peu contestée [1].

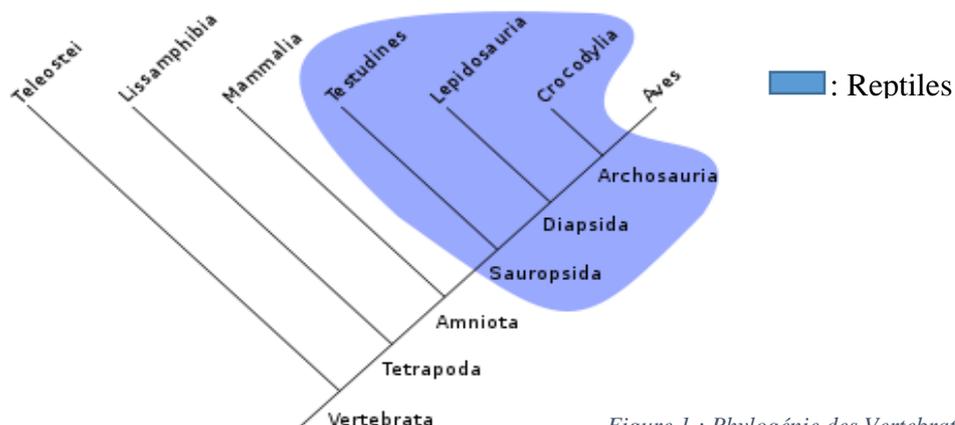


Figure 1 : Phylogénie des Vertebrata [369].

Dans une récente étude sur l'évolution de la fonction venimeuse, il a été montré que cette dernière est apparue précocement et à une seule reprise chez les squamates, il y a approximativement 170 millions d'années. Le nouveau **clade des Toxicofera** rassemble aujourd'hui plus de la moitié des espèces possédant des glandes venimeuses orales dont les sécrétions toxiques peuvent être inoculées à une proie, par l'intervention ou non d'une dentition spécialisée. Ce clade réunit les serpents, les hélodermes, les anguidés (orvets), les iguanes et les varans [4] [5] [6].

Le sous-ordre des serpents, « **Serpentes** », appelé aussi « **Ophidiens** » comprend environ 3 450 espèces actuelles occupant des niches écologiques variées. Les familles actuelles de serpents se sont constituées il y a moins de 80 millions d'années [1]. Elles doivent leur existence au processus complexe d'évolution, de spécialisation et d'extinction [7].

De nombreuses classifications ont été proposées au cours des années, certaines sont légèrement différentes des précédentes, tandis que d'autres s'en écartent beaucoup plus radicalement. La répartition des familles, l'ordre dans lequel elles sont apparues et les liens de parenté ne sont pas définitivement établis. Quelques familles peuvent changer de place au fur et à mesure qu'apparaissent de nouveaux éléments et de nouvelles théories [7].

La phylogénie et classification des squamates, et en particulier des serpents modernes, connaît de profonds changements depuis une quinzaine d'années. L'utilisation de l'outil moléculaire a permis, dans de nombreux cas, d'élucider des énigmes soulevées par les observations morphologiques [1].

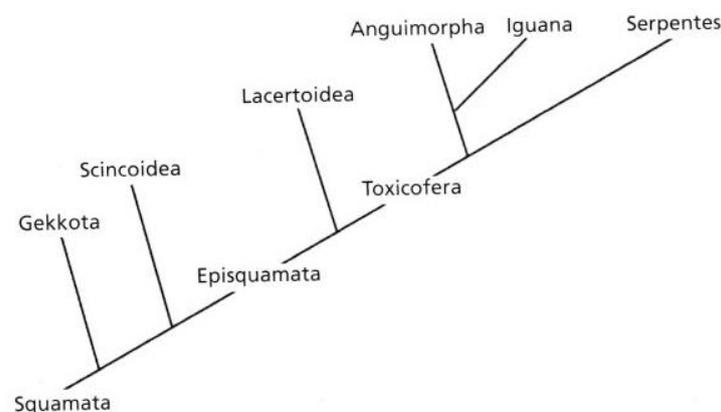


Figure 2 : Phylogénie et radiation des Squamates [1].

Une subdivision importante sépare actuellement les serpents primitifs des plus évolués. Elle est représentée par deux clades :

- Les **Scolecophidia** (404 espèces) (dit « Serpents aveugles »)
- Les **Alethinophidia** (3 046 espèces) (dit « Serpents véritables »)

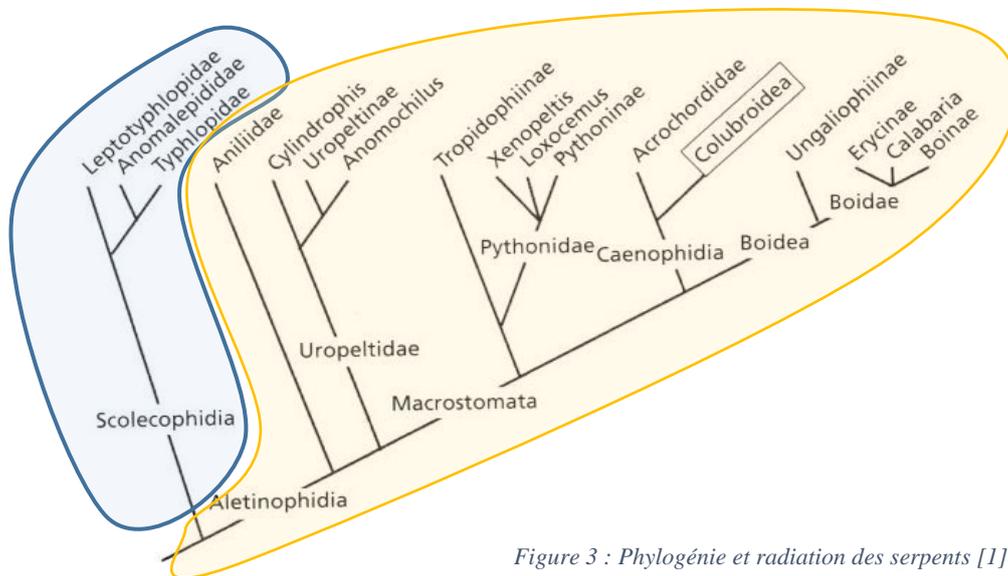


Figure 3 : Phylogénie et radiation des serpents [1].

### 1) Les Scolecophidia.

Les Scolécophidiens sont considérés comme les plus primitifs des serpents vivants. Ils ne possèdent aucun appareil venimeux, dépourvus de crochets et de glandes venimeuses, ils sont totalement inoffensifs pour l'homme. On les surnomme « serpent minutes », du latin « minutus », en raison de leur petite taille (il ne dépasse jamais plus de 30 cm), et non à cause de la toxicité de leur venin qui pourrait, d'après les idées reçues, tuer une personne en une minute. Ce sont des serpents aveugles, leurs yeux sont généralement réduits à une tache de pigment située sous une ou plusieurs écailles céphaliques. De mœurs terricoles, ces serpents fouisseurs creusent des trous dans la terre grâce à une écaille très dure située à l'avant de la tête. L'ouverture de leur bouche est limitée. La plupart des espèces possèdent des vestiges de pelvis mais aucune trace de membres inférieurs. Ces serpents ont une morphologie très homogène, le corps entier est recouvert de petites écailles brillantes toutes identiques [3].

Ce groupe se compose de 404 espèces réparties en 5 familles primitives [8] [1], à savoir Leptotyphlopidae, Typhlopidae, Anomalepididae, Gerrhopilidae, Xenotyphlopidae.

## 2) Les Alethinophidia.

Les Alethinophidia représentent les serpents dits « typiques ». La plupart des familles appartenant à ce clade se caractérisent par l'indépendance de leurs mandibules et leur capacité à ingérer des proies plus grosses que le diamètre de leur propre corps. L'indépendance des mandibules est un caractère évolutif qui rassemble ces familles sous le nom de **Macrostromata**.

Leur morphologie est parfaitement connue. Leurs yeux sont complets, et possèdent une rétine composée de cônes et de bâtonnets. La face ventrale est recouverte de plaques larges qui se différencient nettement des petites écailles en forme triangulaire ou de losange qui recouvrent leur dos.

La séparation de l'Amérique du Sud et de l'Afrique au cours du Crétacé moyen, a donné naissance à deux lignées évolutives majeures nommées d'après leur origine biogéographique [9] [5] :

- Les **Amerophidia**, qui rassemblent 2 familles :
  - Aniliidae, (genre Anilus).
  - Tropidophiidae, (genres Trachyboa et Tropidophis).
- Les **Afrophidia**, qui rassemblent toutes les autres familles.

Il est communément admis que les Alethinophidia se divisent en deux clades :

- **Les Hénophidia** (moins de 200 espèces).
- **Les Caenophidia** (plus de 2 850 espèces).

### a) Les Hénophidia.

Ce clade a été morcelé en plusieurs groupes en raison de sa forte hétérogénéité à la fois morphologique et moléculaire [10].

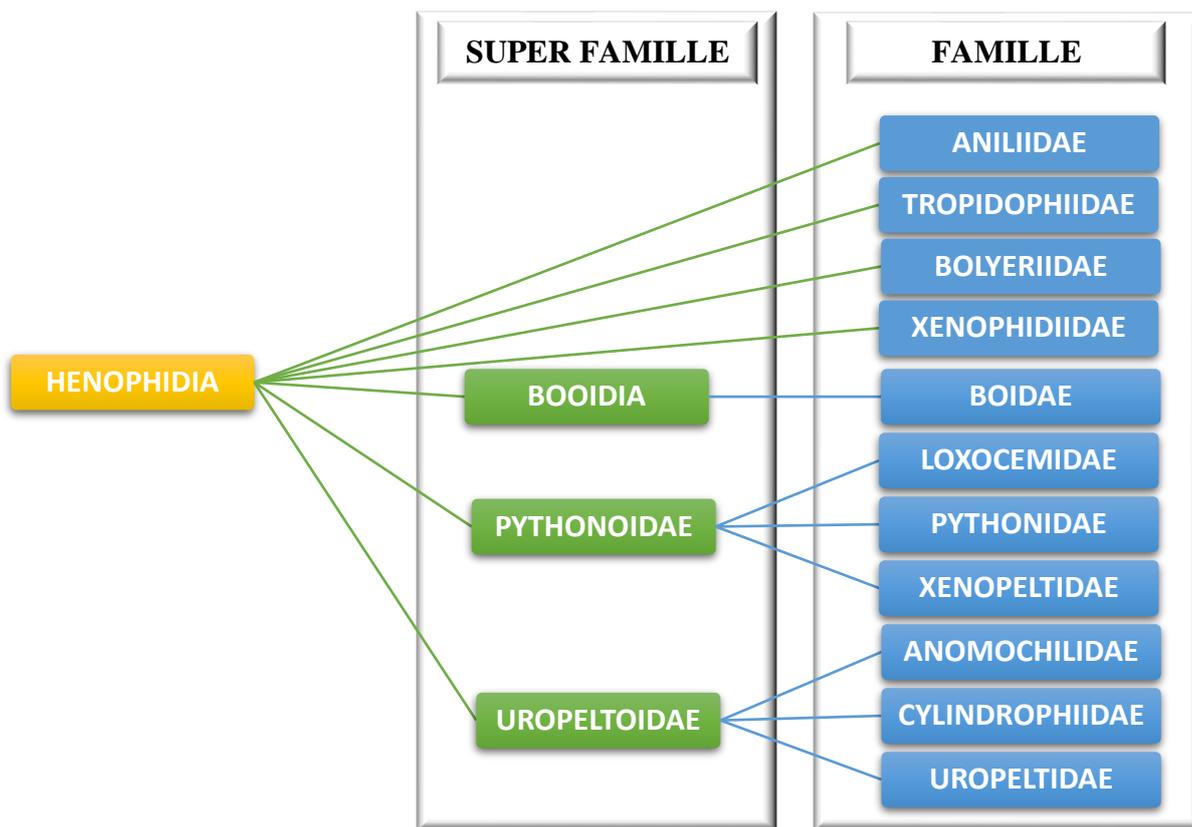


Figure 4: Phylogénie des Hénophidia

### b) Les Caenophidia.

Le clade des Caenophidia, serpents dits « avancés » ou serpents « modernes », représentent la grande majorité des serpents actuels avec 2 852 espèces, incluant tous les serpents venimeux. La phylogénie moléculaire a permis de reconstruire de façon détaillée l'histoire évolutive du venin au sein de ce groupe [5]. Les Caenophidia ont connus des remaniements importants ces dernières années, grâce à la découverte de nouveaux fossiles et sur la base des résultats de biologie moléculaire [8] [9]. Leur systématique dernièrement révisée comprend actuellement 9 familles [8] [11] ou 11 familles [5], selon les différentes équipes de recherches. Elles sont regroupées en deux super-familles.

## 1. La super-famille Acrochordoidea.

Famille des Acrochordidae, (genre aquatique *Acrochordus*) comprenant 3 espèces.

## 2. La super-famille Colubroidea.

La famille des Viperidae (vipères et crotales) rassemblent 320 espèces, celle des Elapidae (cobras, mambas, serpents corail, serpents marins) 354 espèces, les autres familles étant majoritairement constituées de 2 178 espèces autrefois regroupées sous le nom de « couleuvres ». Aujourd'hui divisées en 5 ou 8 familles. Les avis divergent, ainsi l'équipe de recherche de N. Vidal considère les Natracinae, Dipsadinae et Pseudoxenodontinae comme des familles à part entière, alors que l'équipe de A. Pyron maintient que ce sont des sous-familles appartenant aux Colubridae. La classification des serpents n'est pas définitivement établie, elle sera probablement encore sujette à de nombreux remaniements dans les années à venir. Pour notre systématique nous avons sélectionné les études les plus récentes celles de Pyron et al (2011) [8] et (2013) [11] [10].

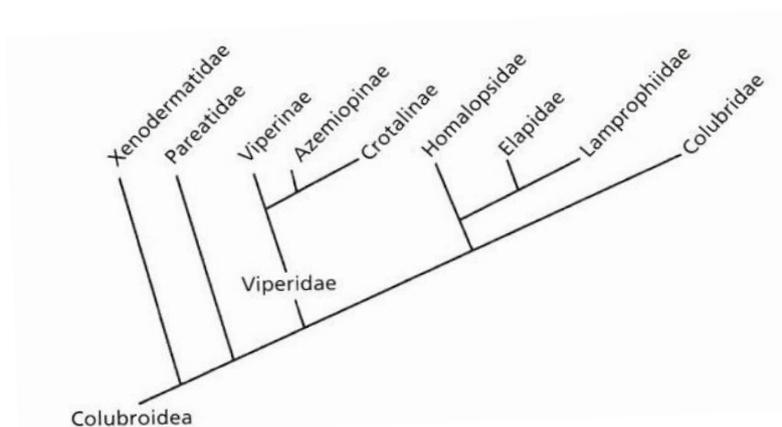


Figure 5 : Phylogénie et radiation des Colubroidea [1].

## B) Systématique.

A ce jour, quelques 3 000 espèces de serpents ont été décrites dont environ 1 000 sont venimeuses toutes regroupées au sein des Colubroïdés. Ce chapitre se limitera à la description des principales familles sur la base de leur fréquence et dangerosité, fondée sur l'action du venin, au premier rang certaines espèces d'Homalopsidés, de Lamprophiidés et de Colubridés dont les appareils venimeux et la composition du venin peuvent être dangereux pour l'homme, ainsi que deux familles comportant exclusivement des espèces « venimeuses » au sens classique du terme : les Viperidés et les Elapidés [1].

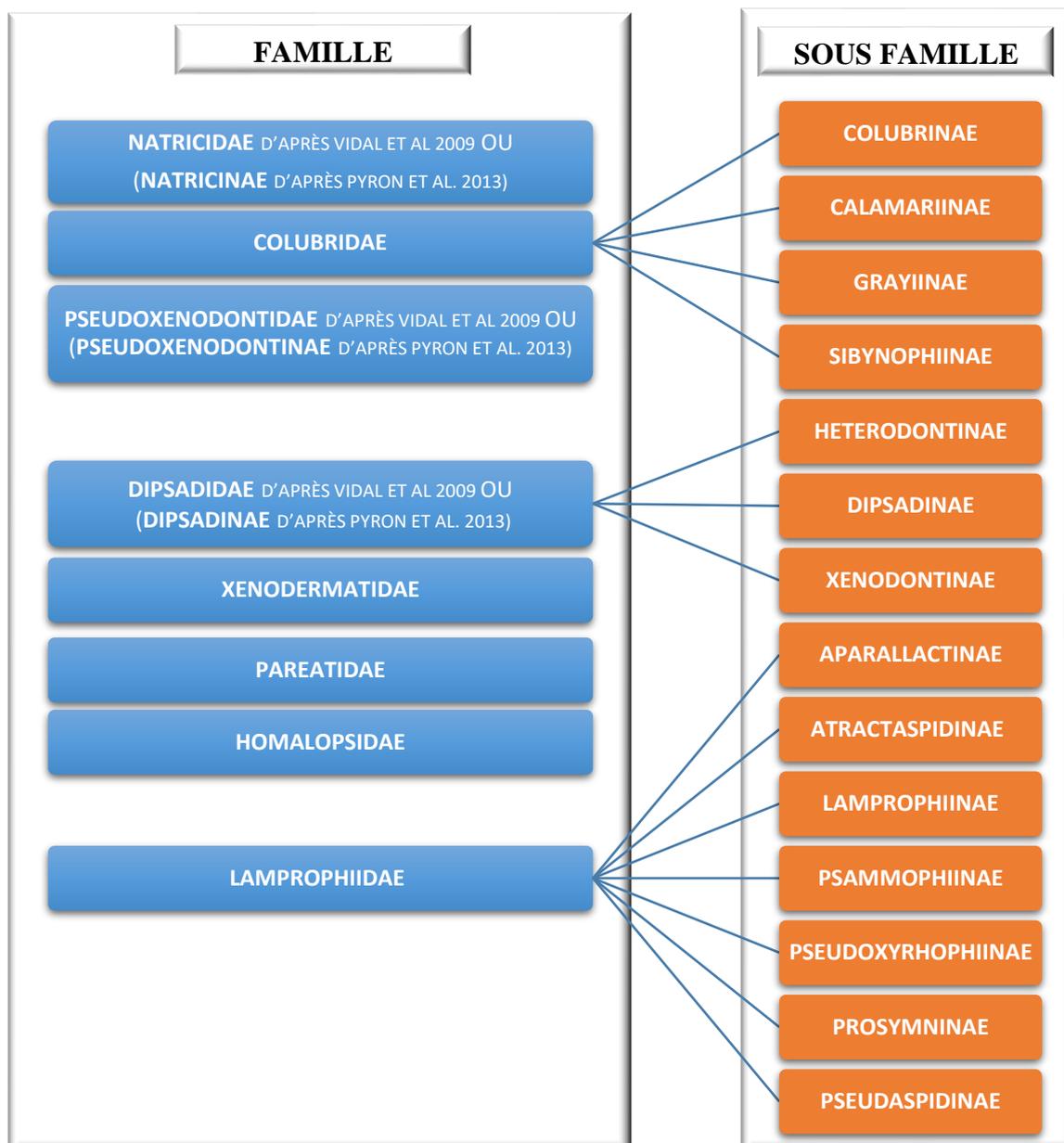
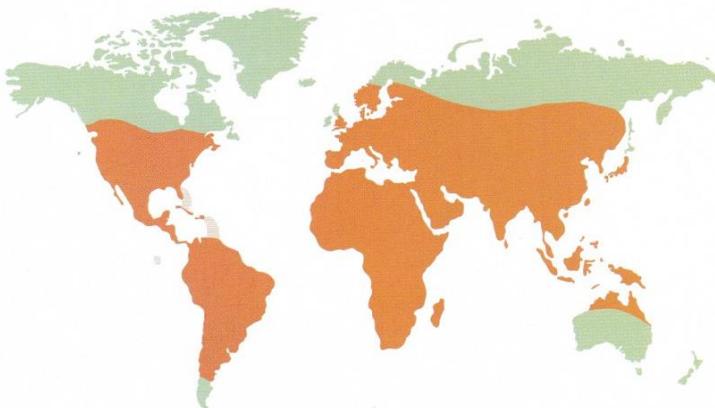


Figure 6 : Systématique.

## 1) Les Colubridae et les Lamprophiidae.

L'ancienne famille de Colubridae, est aujourd'hui démembrée en une dizaine de familles plus représentatives de la complexité de ce groupe. Ce vaste ensemble, présent dans la majeure partie du monde, comporte peu d'espèces dangereuses pour l'homme. En effet, ces espèces portent un maxillaire et sont soit de type aglyphe (dépourvu de crochets) ou de type opistoglyphe (crochets venimeux en position postérieure). Elles sont pour la plupart considérées comme non dangereuses, même si des symptômes locaux, voir des troubles généraux, ont parfois été décrits à la suite d'une morsure. Les espèces opistoglyphes dont les crochets postérieurs ne peuvent inoculer de grandes quantités de venin, représentent un risque relatif. En revanche, certaines espèces qui possèdent un venin particulièrement toxique et des crochets suffisamment imposants ont été responsables d'envenimations graves et parfois mortelles, notamment lors de manipulation de l'animal. D'autres espèces dangereuses encore inconnues peuvent être découvertes et il est difficile d'anticiper la gravité d'une morsure par l'une de ces espèces [1, 3].

Les Lamprophiidae et Colubridae présentent l'aspect général typique des couleuvres, au sens courant du terme. Le plus souvent, le corps est allongé, fin et cylindrique. La ceinture pelvienne est totalement absente. La queue est de taille variable mais plutôt longue et généralement filiforme. La pupille est ronde, la tête est arrondie et faiblement distincte du corps, sauf chez certaines espèces dont le cou est marqué. Elle est recouverte de grandes écailles céphaliques en forme de plaques, très différentes des petites écailles dorsales qui recouvrent le corps. Il existe quelques exceptions, notamment chez les espèces qui se sont adaptées à un environnement particulier [1]. Le maxillaire, le palatin, le ptérygoïde et le dentaire portent tous des dents. En revanche, le prémaxillaire en est toujours dépourvu. Le maxillaire est long et peut porter un ou plusieurs diastèmes [3].



*Figure 7 : Répartition mondiale des Colubridae, Lamprophiidae et Homalopsidae [7].*

### a) Les Lamprophiidae.

La famille des Lamprophiidae est divisée en 7 sous-familles dont 2 seulement (Psammophiinae et Atractaspidinae), comptent des genres connus pour être potentiellement dangereux pour l'homme. Certains auteurs [12] considèrent la plupart de ces sous familles comme des familles à part entière [1].

#### 1. Psammophiinae.

Mis à part le genre *Malpolon*, les autres espèces de Psammophiinae n'ont pas été décrites comme particulièrement venimeuses. Parmi les 33 espèces du genre africain Psammophis, certaines sont très fréquemment rencontrées, notamment près des habitations. En dépit de cette proximité, les morsures restent rares et ne présentent aucune gravité [1].

#### 2. Malpolon.

Ce genre méditerranéen et africain, est constitué de 2 espèces. La couleuvre de Montpellier, *Malpolon monspessulanus*, est localisée dans le sud de l'Europe et *Malpolon moilensis* en Afrique saharienne.

L'envenimation est responsable d'une inflammation locorégionale entraînant douleurs, œdème, lymphangite, etc. Dans certains cas le venin peut provoquer un syndrome neurotoxique similaire à celui des Elapidae. On observe alors une paresthésie, des troubles de la déglutition, un ptôsis (chute d'une paupière supérieure) et une dyspnée. Exceptionnellement, une paralysie de type cobraïque peut être observée [3].

### 3. Atractaspidinae.

Après avoir appartenu successivement au Viperidae puis Colubridae, puis avoir été élevé au rang de famille, les Atractaspidinae ont finalement été rattaché aux Lamprophiidae sur la base des résultats de biologie moléculaire [1] [8]. Cette sous famille présente en Afrique et Moyen-Orient, est actuellement composée de 2 genres et d'une vingtaine d'espèces, essentiellement venimeuses fousseuse. La majorité des genres de l'ancienne famille Atractaspididae a été attribuée à la sous famille nouvellement redéfinie Aparallactinae [10]. Seul le genre **Atractaspis** possède un appareil venimeux de type solénoglyphe.

#### a. *Atractaspis* (vipère taupe ou vipère fousseuse).

Ce genre, présent en Afrique Subsaharienne, en Israël et au Sud-Ouest de la péninsule arabique, réunit une vingtaine d'espèces, parmi lesquelles on peut citer : *A. microlepidota* et *A. irregularis*. Les *Atractaspis* sont des serpents fousseurs recherchant leurs proies dans les terriers. Ils sortent la nuit, de préférence après la pluie et se nourrissent de petits vertébrés [1]. Ces serpents possèdent un appareil venimeux très particulier [13].

La toxicité des venins peut être très variable d'une espèce à l'autre. Le venin est principalement cardiotoxique, avec également des manifestations cliniques de type hémorragique, inflammatoire et nécrotique [1, 3]. Des décès par morsure d'*Atractaspis* peuvent survenir en moins d'une heure par arrêt cardiaque consécutif à des spasmes coronariens et à un blocage auriculo-ventriculaire. Aucune manifestation neurotoxique n'a à ce jour été observée [1, 14]. Le venin est composé d'enzymes et de toxines à fort tropisme cardiaque appelées les **sarafotoxines** [13] [3]. Souvent associées à des troubles du rythme cardiaque sévères parfois mortels [3]. Un travail récent d'analyse du transcriptome d'un spécimen d'*Atractaspis* a **révélé l'existence de nombreux isoformes de toxines dites à « trois doigts »** retrouvées classiquement chez les Elapidae [15]. Des études structurales et fonctionnelles de ces molécules sont en cours afin de déterminer leur mode d'action [1].

## **b) Les Colubridae.**

Ce n'est pas une famille homogène, ce qui rend leur classification difficile. La grande majorité des espèces ne présente pas de risques pour l'homme [3]. Cependant, 3 des 7 sous-familles de Colubridae, comptent dans certains de leurs genres des espèces présumées dangereuses. Certaines de ces 7 sous familles sont considérées comme des familles à part entière par quelques auteurs [5] [1].

### **1. Colubrinae.**

Cette sous famille réunit une centaine de genres parmi lesquels 5 sont particulièrement venimeux, et potentiellement dangereux.

#### **a. *Dispholidus* (boomslang).**

Ce genre africain est représenté par une unique espèce arboricole : *Dispholidus typus*, surnommé boomslang ou bucéphale. Il s'agit de l'espèce la plus redoutable de cette famille. Ce serpent opistoglyphe est responsable de plusieurs morsures fatales.

Le venin très toxique contient « **la vénobine** », cette glycoprotéine de la classe des sérines protéases permet l'activation de thrombine. La symptomatologie d'une envenimation est essentiellement hématologique avec un syndrome inflammatoire discret. Il n'y a aucun signe neurologique caractéristique [3].

#### **b. *Thelotornis* (serpent liane).**

Ce genre africain, se compose de 3 espèces arboricoles et forestières. On les surnomme serpents lianes car, particulièrement fins, ils utilisent la stratégie du mimétisme pour se confondre parfaitement avec leur environnement.

Le venin est constitué d'un activateur du facteur X de la coagulation et de la prothrombine. Il possède une activité fibrinolytique, et selon certains chercheurs, une activité thrombinique. L'envenimation se traduit par un syndrome hémorragique sévère parfois mortel. Il n'existe pas d'antivenin ni de sérothérapie efficace [3].

### **c. *Boiga* (serpent ratier à ventre jaune).**

Ce genre présent en Asie et Australie, réunit une trentaine d'espèces (opisthoglyphes). On peut citer parmi elles : *B. dendrophila*, *B. cynodon*, *B. irregularis*.

Le venin est principalement constitué d'enzymes : phospholipases, phosphodiesterases, L-aminoacide-oxydases, cholinestérases, protéases, etc. L'activité phospholipasique est très importante, les autres activités enzymatiques sont peu ou moyennement toxiques. Le venin de *B. dendrophila* possède une activité hémorragique [3].

### **d. *Toxicodryas*.**

Ce genre distribué en Afrique est représenté par 2 espèces arboricoles : *Toxicodryas blandingii* et *T. pulverulenta*.

Le venin neurotoxique est composé d'une neurotoxine de faible poids moléculaire présentant un tropisme synaptique important et similaire dans ces effets à celui des Elapidae. L'envenimation provoque souvent un collapsus cardio-vasculaire. Bien que l'activité protéolytique soit très intense, on n'observe pas de trouble hémorragique [3].

### **e. *Oxybelis*.**

Ce genre du sud-est des Etats-Unis et du Brésil est composé de 4 espèces arboricoles et forestières. Parmi elles, l'espèce *Oxybelis fulgidus* contient dans son venin une neurotoxine de structure dite « à trois doigts » très similaire à celle des Elapidae, il s'agit de la **Fulgimotoxine**. Néanmoins, si elle est fortement neurotoxique pour les lézards qui sont leurs proies, elle semble sans effet pour les mammifères [16]. Cette « neurotoxicité spécifique » expliquerait la faible toxicité pour l'homme des venins de nombreux opisthoglyphes [1].

## **2. Dipsadinae.**

Certains auteurs considèrent cette famille comme une famille à part entière. Le venin de cette famille, encore mal connu aujourd'hui, est inflammatoire [1].

### **a. *Philodryas.***

Ce genre d'Amérique du Sud réunit une vingtaine d'espèces terrestres. Parmi elles, *Philodryas olfersii* possède dans son venin une myotoxine ainsi qu'une enzyme fibrinolytique catalysant le fibrinogène et la fibrine. Les hémorragies provoquées par l'envenimation sont très proches de celle des *Bothrops* qui ont une distribution géographique similaire. Bien que *P. olfersii* et *P. patagoniensis* soient responsables de plusieurs décès, les fréquentes morsures sont souvent sans gravité si le diagnostic différentiel est posé rapidement [3].

### **b. *Clelia.***

Ce genre localisé en Amérique latine, est constitué d'une unique espèce forestière nommée *Clelia clelia*. Son venin inflammatoire provoque des œdèmes, des ecchymoses, de discrètes hémorragies focales et parfois quelques nécroses qui restent limitées. Les symptômes sont locaux sans extension systémique [1] [3].

### **c. *Tachymenis.***

Ce genre présent en Amérique du Sud, est composé de 5 espèces. Parmi elles, *Tachymenis peruviana* est responsable d'envenimations sévères et inflammatoires. Ce venin est encore mal connu [1] [3].

### 3. Natricinae.

Certains auteurs considèrent cette sous famille comme une famille à part entière [5]. Elle rassemble une quarantaine de genres.

#### a. *Rhabdophis*.

Ce genre distribué dans le Sud-Est asiatique, réunit une vingtaine d'espèces. Parmi elles, *Rabdophis subminatus* est responsable d'envenimation particulièrement grave, pouvant évoluer vers la mort.

Ses crochets particulièrement longs et la très grande toxicité de son venin compensent la faible capacité de stockage de ses glandes venimeuses. Le venin contient parmi ses composants un **activateur du facteur X de la coagulation**. L'agrégation plaquettaire est forte mais il n'y a pas d'activité fibrinolytique, ni fibrinogénolytique. L'activité protéolytique du venin est intense. L'envenimation se traduit par des hémorragies sévères :

- Le syndrome hémorragique est local, peut évoluer vers un syndrome généralisé.
- Le saignement est permanent au niveau de la morsure.

#### 2) Les Homalopsidae.

Les Homalopsidae constituent une famille ayant longtemps été incorporée à celle des Colubridae et récemment élevée au rang de famille. Cette famille d'Asie du Sud-Est, réunit 17 genres et une cinquantaine d'espèces. Vivipares et strictement aquatiques, leurs narines portent des valvules permettant d'éviter la pénétration de l'eau lors des plongées. Ces serpents possèdent un corps trapu et de petits yeux. Le maxillaire est opistoglyphe avec un diastème parfois peu marqué voire indistinct, et des crochets toujours sillonnés mais de taille très variable. *Erpeton tentaculum*, le serpent à tentacules, possède une paire de courts appendices au-dessus du museau que l'on suppose être un leurre lui servant à attraper les poissons dont il se nourrit. Les espèces des genres *Fordonia* et *Gerarda* déchiquètent leurs proies, notamment des crabes à carapace molle, avant de les manger. *Enhydris enhydris* est piscivore et chasse de jour ou de nuit, principalement dans les espaces aménagés, canaux, bassins de pisciculture. La chasse de nuit semble être privilégiée par de nombreux serpents aquatiques pour échapper à leurs prédateurs habituels, notamment les oiseaux et les carnivores [1].

### 3) Les Elapidae.

L'ensemble de cette famille est relativement hétérogène. Elle réunit une soixantaine de genres, et comprend environ 350 espèces largement représentées dans tous les biotopes, y compris le milieu marin. Les Elapidae sont présents sur tous les continents, à l'exception de l'Europe d'où ils ont disparu il y a environ 1 million d'années [17]. Ils sont également absents de Madagascar, ainsi que des zones les plus arides du Sahara. Ils sont de manière générale, mieux distribués dans l'hémisphère Sud que dans l'hémisphère Nord. Ils sont particulièrement bien représentés en Australie où coexistent le plus grand nombre de genres différents.



Figure 8: Répartition mondiale des Elapidae terrestre [7].

Il existe plusieurs systèmes de classification des Elapidae [7]. Les liens et relations entre les différentes espèces de cette famille ne sont pas encore bien établis et sont en cours d'étude et de remaniement. Nous choisissons de classer les Elapidae en 3 sous-familles comprenant les espèces : terrestres, semi-marines et marines. Il est à signaler que de nombreux auteurs tendent à élever les Elapidae marins au rang de famille.

Leur morphologie est proche de celle des couleuvres en général. L'écaillure céphalique est composée de larges plaques. La majorité des genres est ovipares, quelques-uns sont vivipares (certains serpents marins par exemple). La taille des Elapidae adultes varie de moins d'un mètre (serpents-coraïl et bongares) à 5 ou 6 mètres pour le Cobra royal ou hamadryade (*Ophiophagus hannah*).

Toutes les espèces sont protéroglyphes et possèdent un venin fortement neurotoxique [3].

## a) Les espèces terrestres : Elapinae (ou Elapidae).

### 1. *Acanthopis*.

Ce genre australien, compte une dizaine d'espèces présentes en Indonésie, Papouasie et Nouvelle-Guinée,

Leur aspect ressemble à celui des vipères. Ils sont très corpulents, leur tête est triangulaire et porte de nombreuses petites écailles sur son sommet.

*Acanthopis antarcticus* est l'un des serpents les plus venimeux au monde, pouvant causer la mort par arrêt respiratoire en moins de six heures. Son venin fortement neurotoxique est constitué de **neurotoxine- $\alpha$**  [3].

### 2. *Boulengerina* (cobra aquatique).

Les résultats de la biologie moléculaire appliquée à la phylogénie tendent à inclure le genre *Boulengerina* au sein des *Naja*. Ce genre africain réunit 2 espèces strictement aquatiques dont la plus connue est *Boulengerina annulata*.

Ces serpents se nourrissent de poissons et sont habituellement peut agressifs. Les morsures sont rares, le plus souvent dues à des accidents de pêche. Le venin est neurotoxique, il est composé de **neurotoxine- $\alpha$**  [3].

### 3. *Bungarus* (bongare).

Ce genre, réparti en Asie du Sud-Est, est composé d'une quinzaine d'espèces homogènes. Parmi lesquelles on peut citer : *Bungarus candidus*, *B. fasciatus*, *B. multicinctus*.

Ces serpents présentent généralement une coloration composée de larges anneaux noirs alternant avec les bandes claires plus ou moins fines. Certaines espèces nocturnes chassent à l'intérieur des maisons provoquant des accidents chez les habitants lors de leur sommeil. Son venin est fortement neurotoxique, il est composé de **neurotoxine- $\beta$**  et de **neurotoxine- $\alpha$**  chez certaines espèces. Il entraîne une paralysie pouvant évoluer vers la mort par asphyxie (syndrome cobraïque) [3].

#### 4. *Dendroapsis* (mamba).

Ce genre, localisé en Afrique Subsaharienne, comprend 4 espèces :

- 3 mambas verts (forestiers et arboricoles) : *D. viridis*, *D. jamesoni* et *D. angusticeps*.
- 1 mamba noir (savanicole et terrestre) : *D. polylepis*.

Grands, fins et extrêmement vifs, ces serpents sont redoutés en raison de leur rapidité et de la puissance de leur venin. *D. polylepis* peut dépasser 4 mètres de long. Il présente une tête étroite avec une coiffe, mince et allongée, différente de celle des *Naja*. Son maxillaire est relativement long, légèrement mobile, avec quelques similitudes aux solénoglyphes pour certains auteurs.

Son venin, extrêmement dangereux pour l'homme possède une grande diversité de fonctions biologiques. Il contient par exemple :

- **Phospholipases** (dépourvues normalement de toxicité présynaptique)
- Neurotoxines bloquantes ou facilitatrices :
  - **Dendrotoxines** et **fasciculines**, favorisent la transmission de l'influx nerveux.
  - **Neurotoxines- $\alpha$  aminergiques** qui ciblent de manière croisée les récepteurs muscariniques et adrénergiques bloquant la transmission de l'influx nerveux.
- **Mambines** interagissent avec les intégrines  $\alpha 2\beta 3$  perturbant l'agrégation plaquettaire.
- **Calciseptines** interagissent avec les canaux calciques voltage dépendant.
- **Mambalgines** qui sont de puissants analgésiques [18].

Le délai et la durée d'action de ces toxines sont différents, ce qui aboutit à des symptômes d'évolution capricieuse. La morsure peut être inflammatoire et douloureuse. Le venin est très neurotoxique. L'envenimation entraîne des troubles neurologiques de type muscarinique (sueurs abondantes, hyper salivation, troubles visuels, larmoiements, douleurs abdominales, diarrhées et vomissements). Ce syndrome muscarinique précède le syndrome cobraïque qui se traduit par paralysies en particulier respiratoires par curarisation et par cardiotoxicité avec collapsus cardio-vasculaire.

La morsure du mamba noir est appelée « baiser de la mort » car son venin peut tuer un être humain en 20 minutes. Il en inocule entre 100 et 120 mg alors que 10 mg suffisent à entraîner le décès [3].

### **5. *Hemachatus* (cracheur du cap).**

Ce genre vivant en Afrique du Sud est composé d'une seule espèce : *Hemachatus haemachatus*. Ce serpent, proche du *Naja*, à la particularité, tout comme ce dernier, de pouvoir projeter son venin à distance sur son agresseur ou sa proie. Il vise les yeux de sa victime provoquant une inflammation des conjonctives très douloureuse et cécitante en absence de traitement approprié. La morsure avec inoculation de venin reste cependant le principal moyen de défense et de capture des proies.

Le venin est composé, comme celui du *Naja*, de neurotoxine- $\alpha$  induisant une paralysie locomotrice pouvant évoluer vers la mort par asphyxie [3].

### **6. *Micrurus* (serpent corail).**

Ce genre est strictement américain et compte environ 80 espèces. Les serpents-corail sont les seuls représentants des Elapidae en Amérique.

Ce sont des petits serpents de mœurs fouisseuses ou semi-fouisseuses qui présentent, pour la plupart, une coloration constituée de bandes transversales alternées rouges, noires et blanches. Parfois, les anneaux ne sont que de deux couleurs.

Le venin contient une neurotoxine postsynaptique qui le rend neurotoxique.

La plupart des « serpents corail » appartiennent au genre *Micrurus*. Cependant on les retrouve aussi dans d'autres genres tels que *Micruroides* (*M. euryxanthus* genre monospécifique, en Amérique du Nord) ; *Calliophis*, *Maticaura* et *Parapistocalamus*, en Asie ; *Aspidelaps*, *Elapsoidea* et peut être *Walterinesia* qui serait un genre voisin, en Afrique ; *Simoselaps* et *Vermicella*, en Australie.

Souvent, la coloration des anneaux, plus terne que celle des *Micrurus*, s'estompe avec l'âge pour disparaître totalement chez certains spécimens. Les serpents corail de l'ancien monde se distinguent génétiquement de ceux du Nouveau monde, constituant probablement un clade distinct [3].

## 7. *Naja* (cobra).

Les *Naja*, connus aussi sous le nom de cobras (ce qui signifie « serpents » en portugais), représentent le groupe le plus emblématique des Elapidae. Ce genre, rencontré en Asie et en Afrique, rassemble environ une trentaine d'espèces. Ce groupe fait actuellement l'objet de révisions basées sur les résultats de biologie moléculaire tendant à y inclure le genre *Boulengerina* (cobra d'eau), un groupe de serpents aquatiques africains, et *Paranaja* dont l'unique espèce vit dans les forêts primaires d'Afrique centrale (Wüster et al 2007). Selon ces auteurs, le genre se divise en trois clades :

- Les espèces africaines capables de cracher leur venin dont *Naja nigricollis* serait le principal représentant.
- Les autres *Naja* africains, y compris *Boulengerina* et *paranaja*.
- Les *Naja* asiatiques qui se seraient séparés des précédents au Miocène inférieur, il y a 16 à 20 millions d'années.

Les espèces, majoritairement terrestres, sont forestières ou savanicoles.

En revanche, les genres *Hemachatus haemachatus*, un Elapidae cracheur d'Afrique du Sud et *Ophiophagus hannah* d'Inde, pourtant assez proches morphologiquement, se seraient séparés des *Naja* dès l'Oligocène, il y a plus de 25 millions d'années. Les *Naja* se caractérisent par une coiffe, appelée le « capuchon », qu'ils étalent lorsqu'ils sont inquiétés et qu'ils se redressent pour faire face à leurs prédateurs. La coiffe résulte de l'étalement des côtes cervicales sur une longueur variable selon les espèces.

Cette posture a fait l'objet de nombreuses représentations à commencer par l'Uroeus, protection divine accordée aux pharaons de l'Égypte ancienne. Ce symbole ornait leurs habits, notamment la double couronne de haute et basse Égypte. *Naja haje*, le cobra égyptien, est un symbole royal qui passe pour avoir été l'instrument du suicide de Cléopâtre (en réalité il s'agirait plutôt d'une vipère heurtante).

Certaines espèces sont fortement ubiquistes, à commencer par *N. nigricollis*, le principal cracheur africain, que l'on rencontre fréquemment dans les maisons où il peut mordre les habitants au cours de leur sommeil.

Le venin est constitué de :

- **Phospholipases**, généralement dépourvues de toxicité présynaptique.
- **Cardiotoxines**.
- **Neurotoxines- $\alpha$**  courtes ou longues selon les espèces.

La neurotoxicité du venin est élevée chez la plupart des espèces. Certaines espèces cracheuses (*N. nigricollis*, *N. mossambica*) provoquent des inflammations au siège de la morsure pouvant évoluer vers une nécrose peu extensive [3].

### **8. *Notechis* (serpent tigre).**

Ce genre très venimeux, est retrouvé en Australie. Il est représenté par 2 espèces, *Notechis scutatus* étant la plus importante.

Le venin très neurotoxique est produit en grande quantité par le serpent. Il provoque une paralysie locomotrice par atteintes musculaires associée à un syndrome hémorragique. Une insuffisance rénale peut parfois apparaître [3].

### **9. *Ophiophagus* (cobra royal).**

Ce genre asiatique est présent en Inde, dans l'ensemble de l'Indochine, en Asie du Sud-Est et aux Philippines. Il est composé d'une unique espèce : *Ophiophagus hannah* très proche des *Naja* morphologiquement. Il s'agit du plus grand serpent venimeux au monde, avec un record de plus de 5 mètres de long, cependant la plupart des spécimens ne dépassent pas 4 mètres en général [7]. Le venin est fortement neurotoxique. L'envenimation est dangereuse pour l'homme [3].

## 10. *Oxyuranus* (Taïpan).

Ce genre, distribué en Australie, Papouasie-Nouvelle-Guinée et Indonésie, comprend 2 espèces dont la plus répandue est *Oxyuruanus scutellatus*. Ces grands serpents font partie des plus dangereux au monde avec 80% de létalité lors des morsures.

Le venin contient :

- **Taipoxine**, (neurotoxine- $\beta$  a toxicité pré-synaptique).
- **Taicatoxine**, (toxine à tropisme cardiaque).
- Enzyme activatrice de la prothrombine.

On rencontre la plupart des symptômes dus aux envenimations ophidiennes. La symptomatologie d'une envenimation est complexe, on observe :

- Paralysie.
- Nécrose musculaire.
- Trouble neurologique classique (syndrome cobraïque classique : détresse respiratoire).
- Trouble du rythme cardiaque.
- Syndrome hémorragique.
- Insuffisance rénale aiguë.
- La morsure est indolore et l'inflammation locale est négligeable.

L'administration d'antivenin doit être précoce. Les saignements présents dans un tiers des cas répondent bien au traitement. En revanche une fois déclaré le syndrome cobraïque est peu sensible à l'antivenin et la respiration artificielle est indispensable [3].

### **11. *Pseudechis* (serpent noir ou Mulga).**

Ce genre réparti en Australie réunit 6 espèces. Parmi elles, *P. papuanus*, est aussi présente en Papouasie-Nouvelle-Guinée ainsi qu'en Indonésie, et *P. australis* est également retrouvé en Indonésie.

Le venin serait moins toxique que celui des autres Elapidae australiens. Néanmoins, la capacité de stockage des glandes à venin étant particulièrement importante (surtout chez *P. australis*), une envenimation peut se révéler sévère, voire mortelle en raison de la quantité de venin inoculé lors de la morsure. L'envenimation se traduit par des signes frustes, principalement des nécroses musculaires et une insuffisance rénale [3].

### **12. *Pseudonaja* (serpent brun).**

Ce genre vivant en Australie, réunit 7 espèces. *Pseudonaja textilis* est la plus importante.

L'envenimation se traduit par des troubles hémorragiques, une insuffisance rénale. On observe parfois, en plus de ces symptômes, une paralysie locomotrice et des troubles cardiaques avec collapsus cardio-vasculaire [3].

### **b) Les espèces semi-marines : Laticaudinae (ou Laticaudidae).**

Les Laticaudinae sont plutôt considérés comme une sous-famille des Elapidae. Ils partagent leur existence entre le milieu marin où ils cherchent leur nourriture et la terre ferme où ovipares, ils s'accouplent et pondent leurs œufs. Cette sous famille compte 7 espèces, réunies au sein d'un seul genre : *Laticauda* [3].

### c) Les espèces marines : Les Hydrophiinae (ou Hydrophiidae).

Les Hydrophiinae rassemblent une dizaine à une quinzaine de genres marins, parmi lesquels on peut citer *Aipysurus*, *Enhydrina*, *Lapemis*, *Pelamis* et *hydrophis*. Ce dernier genre rassemblant une quarantaine d'espèces. Beaucoup d'auteurs considèrent cette sous-famille comme une famille à part entière, distincte des Elapidae. Il est généralement admis que les espèces terrestres australiennes et les espèces marines (y compris les Laticaudinae) sont plus proches les unes des autres que des Elapidae des autres régions du monde. Ce qui les sépare serait dû à leur mode de vie, les différences reflétant les adaptations au milieu dans lequel ils vivent [7].

Les Hydrophiinae vivent dans les océans Pacifique et Indien. Ils sont strictement aquatiques même s'ils peuvent sortir de temps en temps de l'eau. Ils sont vivipares et les naissances se font en mer. Les serpents adultes mesurent en moyenne entre 1 et 2,5 mètres.

La réserve pulmonaire est particulièrement développée et associée à une forte musculature permettant la distribution de l'air dans l'organisme lors des plongées. La capacité respiratoire est encore renforcée par les échanges gazeux, notamment l'élimination du CO<sub>2</sub>, par voie cutanée. Les serpents marins peuvent ainsi rester plus de deux heures sous l'eau.

Ces serpents sont peu agressifs et se laissent facilement approcher. Ils peuvent mordre et inoculer leur venin sans difficulté. Les accidents restent cependant exceptionnels, sans doute aussi en raison de la rareté de leurs rencontres avec les humains.

Le venin contient des neurotoxines qui entraînent des paralysies locomotrices et une asphyxie pouvant être mortelle. En cas de morsure le risque de noyade est important [3].

#### 4) Les Viperidae.

En dehors des genres *Causus* et *Azemiops*, les Viperidae constituent une famille relativement homogène réunissant plus de 310 espèces que l'on peut répartir en 3 sous-familles, d'après les récentes études moléculaire [19] :

- **Les Viperinae** (13 genres vivant dans l'Ancien Monde).
- **Les Crotalinae** (24 genres répartis entre le Nouveau Monde et l'Asie).
- **Les Azemiopinae** (un seul genre *Azemiops*), sous famille voisine de la précédente.

Les Viperidae sont distribués dans la majeure partie du monde, mais absents d'Australie, de Madagascar et de quelques autres îles. Ils se sont différenciés à l'Eocène inférieur, il y a 50 millions d'années environ à partir d'une souche asiatique [19].

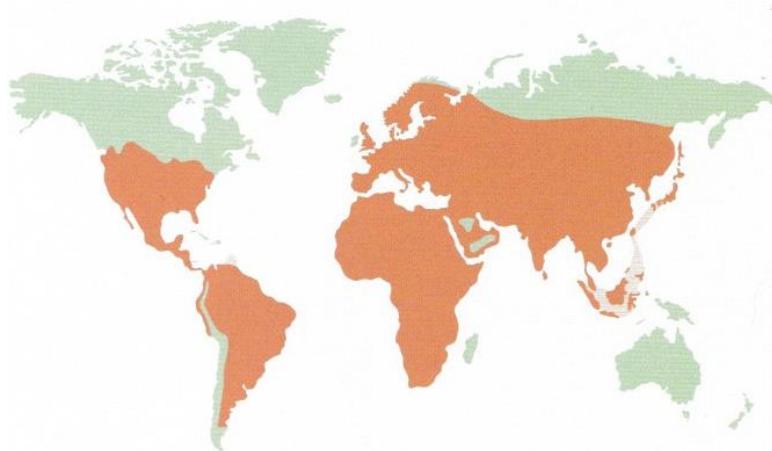


Figure 9: Répartition mondiale des Viperidae [7].

L'ensemble de cette famille présente des facultés adaptatives particulièrement développées. En effet, à l'exception des mers et océans, ils occupent tous les biotopes, dont certains très hostiles comme les déserts ou régions boréales. Les Viperidae sont généralement terrestres et quelque fois arboricoles. Leur taille varie de quelques dizaines de centimètres à 3,5 mètres. Ils sont majoritairement vivipares.

Toutes les espèces sont solénoglyphes. Leur venin est complexe et essentiellement composé d'enzymes. Les envenimations associent une forte inflammation, troubles de la coagulation sanguine, nécrose et parfois paralysie musculaire entraînant une asphyxie [1].

### a) Viperinae (Vipères « vraies »).

Les Viperinae vivent en Afrique, Europe et Asie (Ancien Monde), en revanche ils sont absents du continent américain. Leur radiation s'est faite au cours de l'Eocène moyen, il y a 40 millions d'années [19].

Le corps est robuste et trapu, la queue courte, la tête triangulaire est bien distincte du cou. L'écaillage céphalique est constituée de petites écailles identiques aux écailles qui recouvrent le dos (les dorsales). Sauf chez le genre *Causus* dont la tête est couverte de grandes plaques et d'écailles lisses. Les écailles du corps sont carénées chez la majorité des espèces, c'est à dire pourvues d'une arête médiane donnant à la peau un aspect rugueux.

Cette sous-famille comprend actuellement 13 genres.

#### 1. *Causus* (vipère du cap).

Malgré les différences morphologiques observées, de récentes analyses moléculaires portées sur 4 gènes mitochondriaux ont confirmé l'appartenance du genre *Causus* à la famille des Viperinae [19]. Ce genre relativement primitif est localisé en Afrique. Il réunit 6 espèces, dont les plus répandues sont *Causus rhombeatus* et *C. maculatus*.

Ce sont des espèces semi fouisseuses, ubiquistes et commensales. On les rencontre dans les jardins près des habitations et dans certaines plantations (bananeraies) où elles se nourrissent de batraciens.

Ces petits serpents mesurent environ 50 cm [1]. La tête est recouverte de plaques céphaliques, les écailles dorsales sont lisses contrairement à la plupart des Viperinae dont les écailles sont carénées.

La glande à venin est, dans la plupart des espèces, allongée. Elle occupe le quart ou le cinquième antérieur du corps dans une loge anatomique située sous la peau et n'est pas entourée de muscles squelettiques comme chez les autres Viperidae [1].

Le venin semble peu toxique pour les mammifères. Les envenimations sont douloureuses mais sans gravité en général, en dehors d'un œdème accompagné quelque fois de fièvre temporaire. Il n'existe pas d'antivenin [3].

## 2. *Atheris* (vipère arboricole).

Ce genre arboricole africain, réunit une quinzaine d'espèces, dont les plus répandues sont *Atheris squamigera* et *Atheris chlorechis*.

Le plus souvent de petite taille, la tête est triangulaire et la queue, relativement longue pour un Viperidae, est préhensile. Espèces forestières, elles sont généralement vertes et se confondent avec les feuillages [1].

Le venin, inflammatoire et hémorragique, peut être mortel. Il n'existe pas d'antivenin [3].

## 3. *Bitis*.

Ce genre présent en Afrique, réunit une quinzaine d'espèces terrestres, parmi lesquelles on peut citer *Bitis gabonica* (vipère du Gabon), *Bitis arietans* (vipère heurtante) et *Bitis nasicornis* (vipère rhinocéros).

Le corps est épais, la tête est triangulaire et la taille souvent imposante *Bitis gabonica* peut atteindre 2 mètres et mettre bas jusqu'à 50 vipéreaux [1].

L'envenimation se traduit par de fortes inflammations, des nécroses et des troubles hémorragiques. Parmi les différents composants du venin on a retrouvé un **inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine** qui provoque un choc cardio-vasculaire. Une **enzyme thrombinique** a été extraite du venin de *Bitis arietans* et de *Bitis gabonica* [3].

## 4. *Cerastes* (vipère cornue).

Ce genre déserticole est localisé en Afrique du Nord et au Moyen-Orient. Il se compose de 4 espèces dont, *Cerastes cerastes* (vipère à corne du Sahara, ornée de deux petites écailles qui pointent au-dessus des yeux) et *Cerastes vipera*.

L'envenimation entraîne une forte inflammation et nécrose des tissus, un syndrome hémorragique est souvent observé [3].

### 5. *Daboia* (vipère de Russell).

Ce genre distribué en Asie du Sud, rassemble 5 espèces. Parmi elles *Daboia russelii*, (longtemps incluse dans le genre *Vipera*) est particulièrement venimeuse et dangereuse. Agressive, elle est responsable d'un très grand nombre de morsures létales chez les agriculteurs, surtout dans les rizières.

La composition du venin, et avec elle la symptomatologie des envenimations varie en fonction des régions géographiques :

- Dans tous les pays, l'envenimation provoque une symptomatologie inflammatoire et hémorragique évoluant fréquemment vers une insuffisance rénale.
- Au sud de l'Inde et au Myanmar, le venin de *Daboia siamensis* entraîne en particulier des accidents thromboemboliques atteignant le cerveau et l'hypophyse.
- Au Sri Lanka et dans le sud de l'Inde, le venin de *Daboia russelii pulchella* entraîne des troubles neurotoxiques et musculaires [3].

### 6. *Echis* (échide).

Ce genre, largement distribué, réunit actuellement une dizaine d'espèces difficiles à distinguer les unes des autres. La moitié se trouve en Afrique du Nord, les autres se répartissent du Moyen-Orient jusqu'en Asie Centrale et au Sri Lanka.

Les *Echis* africaines sont particulièrement redoutables en raison de la toxicité de leur venin et de leur abondance dans les zones peuplées, notamment dans les cultures [1]. Dans de nombreuses régions, elles sont responsables de la majorité des morsures et des décès.

Parmi ces espèces on peut citer *Echis carinatus* (échide carénée), *Echis Coloratus* (échide colorée), *Echis Pyramidum* (échide ou vipère des pyramides), *Echis Leucogaster* (échide à ventre blanc) et *Echis Ocellatus* (échide ocellée).

Parmi les différents composants, le venin contient des **enzymes protéolytiques**, responsables des troubles inflammatoires et des nécroses locales et un **activateur de prothrombine** qui provoque un syndrome hémorragique sévère et prolongé [3].

### **7. *Macrovipera*.**

Ce genre, localisé en Afrique du Nord, Grèce, Moyen-Orient, Asie Centrale et Asie du Sud, s'est récemment séparé du genre *Vipera*. Il se constitue actuellement de 2 espèces, dont *M. lebetina* est la plus importante.

L'envenimation est fortement inflammatoire et nécrosante, en revanche aucun trouble hématologique particulier n'a encore été observé [3].

### **8. *Montivipera*.**

Rassemble à ce jour 7 espèces, dont *M. xanthina* qui a longtemps appartenu au genre *Vipera*.

Le venin de ces espèces est essentiellement hémotoxique. L'envenimation vipérine est similaire à celle de la Vipère aspic du genre *Vipera*.

### **9. *Vipera*.**

Ce genre fait partie d'un ensemble eurasiatique qui s'étend jusque dans la péninsule arabe et le Sud-Est asiatique. Représentatif des Viperinae, c'est le seul genre de cette famille à être présent en Europe et notamment en France.

Après avoir été amputé d'une quinzaine d'espèces réparties en 3 autres genres (*Daboia*, *Macrovipera* et *Montivipera*), le genre *Vipera* est actuellement composé de 23 espèces. On peut citer parmi elles *Vipera aspis* (vipère aspic, **présente en France, son venin est utilisé comme souche homéopathique**), *Vipera ammodytes* (vipère ammodyte), *Vipera ursinii* (vipère d'Orsini, **présente en France**), *Vipera berus* (vipère péliade) (**présente en France**), *Vipera latastei* (vipère de Lataste), *Vipera renardi* (vipère des steppes) et *Vipera raddei* (vipère d'Arménie).

L'envenimation est fortement inflammatoire et faiblement hémorragique. Une symptomatologie neurotoxique est parfois observée, notamment chez *Vipera ammodytes* et *Vipera palestinae*). Cette neurotoxicité d'intensité variable selon les individus, est associée à une phospholipase A<sub>2</sub> pouvant présenter une toxicité présynaptique [3].

## **b) Crotalinae (Crotales).**

Les Crotalinae d'origine Asiatique, se sont dispersés à l'Oligocène inférieur, il y a 30 millions d'années, vers le Nouveau Monde (continent américain) [19].

Les Crotalinae se caractérisent par la présence d'une fossette loréale située entre l'œil et la narine. Cette cavité profonde bien visible à l'avant de la tête du serpent, correspond à un organe thermosensible particulièrement efficace pour détecter les mouvements de proies dont la température corporelle est supérieure à celle de l'environnement, comme un petit mammifère par exemple.

On peut diviser cette sous-famille en 3 tribus [3].

### **1. La tribu des Crotalini (serpents à sonnette).**

Cette tribu est distribuée en Amérique du Nord et latine. Elle réunit 2 genres qui se caractérisent par la présence de bruiteur caudal ou « crepitalum » [3].

#### **a. *Crotalus* (serpent à sonnette).**

Ce genre américain, est distribué majoritairement en Amérique du Nord. Il réunit 35 espèces déserticoles pour la plupart. Parmi elles, les plus fréquentes sont *Crotalus horridus*, *C. Adamanteus*, *C. atrox*, *C. scutulatus*, *C. viridis*. La seule espèce rencontrée en Amérique latine est *C. durissus* (cascavelle).

Ce sont les serpents à sonnette traditionnel. La majorité des espèces sont grandes, certaines pouvant atteindre 2,5 mètres. L'écaillage céphalique se compose en général de petites écailles, mises à part les supra-oculaires qui sont grandes et parfois frontales qui peuvent être plus larges que les autres écailles.

L'envenimation entraîne une inflammation locale très importante, des nécroses et un syndrome hémorragique sévère. **Un syndrome neurotoxique** est parfois induit par le venin de certaines espèces nord-américaines dont *C. atrox*, *C. scutulatus*, *C. horridus*. Les symptômes sont variables mais on observe le plus souvent une fasciculation plus ou moins sévère des muscles squelettiques (contractures répétées, brèves et de faible amplitude) associées à des troubles sensitifs (picotements, fourmillements) ainsi qu'une profonde fatigue.

*C. durissus terrificus* est responsable d'un grand nombre de morsures dans certaines régions d'Amérique du Sud. Cette sous-espèce possède un venin myotoxique et neurotoxique

L'envenimation se caractérise par une symptomatologie locale frustrée, des troubles respiratoires, une lyse musculaire microscopique diffuse pouvant entraîner une insuffisance rénale par nécrose tubulaire [3].

**Le venin de la sous espèce *Crotalus horridus horridus* est utilisé comme souche homéopathique.**

#### **b. *Sistrurus* (crotale pygmée ou serpent à sonnette pygmée).**

Ce genre localisé en Amérique du Sud se compose de 2 espèces, *Sistrurus catenatus* et *S. miliaris*.

La taille moyenne est plus petite que celle des *Crotalus*, adulte il mesure moins de 80 cm. L'écaillure céphalique est composée de grandes plaques ressemblant à celles des Colubridae.

Le venin, moins toxique que celui des *Crotalus*, est fortement inflammatoire et faiblement nécrosant et hémorragique. Il n'existe pas d'antivenin spécifique, mais il y a une bonne para-spécificité des antivenins de *Crotalus* et de *Bothrops* [3].

### **2. La tribu des Lachesini.**

Cette tribu n'est pas caractérisée par la présence de bruiteur caudal. En revanche, l'écaillure céphalique est toujours composée de petites écailles carénées.

Cette tribu comprend les genres *Lachesis* et *Bothrops* sensu lato (endémique d'Amérique latine), *Trimeresurus* sensu lato (en Asie et scindé en 4 genres : *Ovophis*, *Protobothrops*, *trimeresurus* et *Tropidolaemus*) [3].

### **a. *Bothrops* (fer de lance, trigonocéphale).**

Ce genre largement représenté en Amérique du Sud et Amérique latine, rassemble une quarantaine d'espèces dont les principales sont : *Bothrops asper*, *B. atrox*, *B. bilineatus*, *B. brazilz*, *B. jararaca* (jaraca), *B. jararacussu*, *B. lanceolatus* (fer de lance), *B. moojeni*, *B. neuwiedi*.

*B. atrox* (trigonocéphale ou fer de lance commun) est une grande et dangereuse espèce, il doit son nom vernaculaire à la forme de sa tête. Ces serpents occupent tous les biotopes de la forêt primaire et peuvent se rencontrer dans les grandes villes. Ils sont responsables d'un grand nombre de morsures potentiellement létales, bien que la fréquence soit variable en fonction des régions. Le venin est fortement inflammatoire, nécrosant et hémorragique. Il est riche en enzymes protéolytiques et hémorragiques, notamment en enzymes thrombiniques qui favorisent la coagulation sanguine.

**Le venin de *B. lanceolatus* (espèce endémique de Martinique) est utilisé comme souche homéopathique.** Lors d'une envenimation, il provoque des micro embolies diffuses qui peuvent se traduire par des infarctus viscéraux et cérébraux [3].

### **b. *Lachesis* (maître de la brousse, surucucu).**

Ce genre, forestier et terrestre, est présent en Amérique Centrale et Amérique du Sud. Il réunit 4 espèces dont les plus importantes sont *Lachesis stenophrys* en Amérique Centrale et *Lachesis muta* en Amérique du Sud.

*L. muta* peut dépasser 3,5 mètres, c'est le plus grand serpent parmi les Viperidae.

**Son venin est utilisé comme souche homéopathique.** Les morsures sont assez rares, et malgré la taille imposante de certains individus les envenimations sont moins sévères que l'on pourrait le craindre et que leur réputation ne le laisse croire. Elle se traduit par une forte inflammation, on observe quelquefois des nécroses [3].

### **c. *Protobothrops* (fer de lance asiatique).**

Ce genre, largement distribué de l'Inde au Japon, réunit une quinzaine d'espèces majoritairement arboricoles. Les 2 plus importantes sont *Protobothrops flavoviridis* (responsable de 20% des envenimations du Japon) et *P. mucrosquamatus* (responsable de 40% à 50% des morsures à Taiwan et en Malaisie).

Le venin est fortement inflammatoire, nécrosant et hémorragique. Il contient une enzyme thrombinique qui accélère la coagulation sanguine et provoque des hémorragies après que les facteurs de coagulation ont été entièrement consommés par le venin [3].

### **d. *Trimeresurus* (crotales des bambous).**

Ce genre arboricole est réparti du Sri Lanka au Népal et du Japon à l'Indonésie. Il rassemble une cinquantaine d'espèces dont les principales sont : *Trimeresurus albolabris* (responsable d'un grand nombre des envenimations), *T. gramineus*, *T. popeiorum*, *T. purpureomaculatus* et *T. stejnegeri*. De nombreuses espèces sont vertes avec une queue préhensile.

Le venin contient des enzymes protéolytiques puissantes et une enzyme thrombinique. L'envenimation entraîne une inflammation locale sévère, parfois compliquée d'une gangrène ou d'une nécrose, associée à un syndrome hémorragique réductible avec un traitement symptomatique, même sans antivenin [3].

## **3. La tribu des Agkistrodonti.**

Auparavant réunis au sein du genre *Agkistrodon* sensus lato.

### **a. *Agkistrodon* (mocassins).**

Ce genre présent en Amérique du Nord et Amérique Centrale, réunit 6 espèces, *Agkistrodon contortrix* et *A. piscivorus* étant les 2 plus importantes. Ce sont les seuls viperidae aux mœurs aquatiques et piscivores [1].

Le venin, modérément toxique, est inflammatoire et hémorragique. Bien qu'il soit responsable d'une centaine d'envenimation par an, la létalité sans traitement reste de 0,1% [3].

### **b. *Calloselasma* (crotale de Malaisie).**

Ce genre présent dans toute l'Asie du Sud-Est, est représenté par une seule espèce : *Calloselasma rhodostoma*.

Ce serpent trapu et court, mesure moins d'un mètre. Il habite dans les forêts de basse altitude et les forêts côtières, où il colonise les plantations, notamment de caoutchouc. D'un tempérament très agressif, il est responsable d'un grand nombre d'envenimations sévères : 40% des morsures en Thaïlande et 70% en Indonésie.

Si le venin provoque de fortes inflammations, nécrosantes et hémorragiques lors d'une envenimation, il reste néanmoins modérément toxique.

L'étude de son venin a permis d'extraire la toute première enzyme thrombinique isolée d'un venin de serpent [3].

### **c. *Deinagkistrodon* (crotale cent pas).**

Ce genre, réparti entre Taïwan et la Chine Sud-Orientale, est constitué d'une unique espèce : *Deinagkistrodon acutus*.

Il s'agit d'un serpent très corpulent, de grande taille (1,50 mètre), avec une tête triangulaire. Il habite dans les forêts des montagnes. De mœurs nocturnes, il peut s'aventurer près des lieux habités.

Son nom commun « provient d'une légende selon laquelle, après une morsure, la victime ne pouvait faire plus de cent pas avant de s'effondrer ». Le venin, très toxique est inflammatoire et hémorragique. La létalité est élevée, supérieur à 15% en absence de traitement antivenimeux [3].

#### **d. *Gloydius* (mocassin asiatique, mamushi).**

Ce genre, présent dans toute l'Asie Centrale d'Afghanistan au Japon, regroupe une dizaine d'espèces. Parmi elles, *Gloydius blomhoffi*, abondante dans les plantations de cannes à sucre, est responsable de 80% des morsures dans certaines régions de Chine et du Japon.

Le venin est inflammatoire et dans certains cas neurotoxiques. La complication majeure est une insuffisance rénale pouvant parfois entraîner le décès de la victime [3].

#### **e. *Hypnale*.**

Ce genre, localisé au Sri Lanka et en Inde Sud-Occidentale, se compose de 3 espèces de petite taille dont *Hypnale hypnale* est la plus connue. Ces espèces, vivipares, forestières et nocturnes, sont généralement inoffensives. Elles sont responsables d'un nombre restreint de morsures modérément dangereuses [3].

#### **c) Azemiopinae.**

Cette branche sœur des Crotalinae américains, comprend un seul genre localisée en Asie du Sud-Est (sud de la Chine, nord du Vietnam et de la Birmanie).

Les azemiops réunit 2 espèces, il est peu connu et semble assez rare.

La morphologie générale est plus proche des couleuvres que des vipères. Le corps est fin, les écailles céphaliques sont grandes, celles du dos sont lisses et non carénées. La tête dans le prolongement du cou ne s'en distingue pas, il possède de petits crochets. La taille est moyenne et mesure moins d'un mètre.

## **II Anatomie du serpent.**

### **A) Morphologie externe.**

Si tous les serpents possèdent une silhouette globalement similaire, la grande diversité de leurs caractères superficiellement visibles à cependant permis de différencier près de 3 500 espèces différentes.

La morphologie des animaux ne doit rien au hasard, leur taille, leur forme, leur aspect, la coloration et les motifs de leur peau correspondent aux tâches qu'ils doivent accomplir pour survivre et se reproduire [7].

#### **1) La silhouette.**

Les serpents sont des reptiles de forme cylindrique et allongée, ils sont dépourvus de membres. Leurs morphologies peuvent être diverses, elles sont adaptées à leur mode de vie et à leur habitat. Lorsque l'on fait une coupe transversale des serpents elle est globalement cylindrique, cependant il existe quelques différences entre espèces. Ainsi, on distingue quatre grands types de sections :

- **La section cylindrique**, présente chez les espèces fouisseuses et semi-fouisseuses.
- **La section triangulaire**, présente chez une grande variété d'espèces très éloignées les unes des autres, allant de *Mehelya* à *Drymarchon corais*.
- **La section aplatie dorsalement**, présente chez beaucoup d'espèces corpulentes, telles les plus grosses vipères comme la vipère du Gabon (*Bitis gabonica*).
- **La section aplatie latéralement**, présente chez les serpents marins et chez de nombreuses espèces arboricoles comme par exemple les boas (*Corallus sp*) [7].



Figure 10: Coupes transversales de serpents [7].

## **2) La taille.**

La taille des serpents est très variable selon les espèces. Les plus petits serpents appartiennent à la famille des Typhlopidés, ils mesurent une dizaine de centimètres environ et sont pour cette raison surnommés « serpent minute ». Chez les plus grandes espèces, le python réticulé (*Broghammerus reticulatus*) peut atteindre une longueur de 9 ou 10 mètres, et l'anaconda vert (*Eunectes murinus*) un poids de 250 kg.

Il existe un rapport étroit entre la taille, la silhouette d'un serpent et son mode de vie :

- Les très grandes espèces de serpents vivent majoritairement dans les zones les plus chaudes du globe, où la température élevée permet de réchauffer efficacement un gros corps et où les proies sont abondantes.
- Les espèces arboricoles ont en général un corps allongé et mince, avec une queue préhensile et un corps aplati latéralement qui leur fournit une rigidité suffisante pour se déplacer de branche en branche.
- Les espèces fouisseuses ont quant à elles un corps cylindrique, court et épais avec une tête peu distincte du corps.
- Beaucoup d'espèces aux mœurs aquatiques ont les yeux et les narines placées en haut du crâne, ce qui leur permet de les garder émergées lorsqu'elles nagent à la surface de l'eau [7].

## **3) La peau et les écailles.**

### **a) Généralités.**

Contrairement à la croyance populaire, le serpent n'est ni gluant, ni visqueux mais sec, propre et souvent doux. La peau est composée d'un derme et d'un épiderme. Elle est presque dépourvue de glandes, elle ne peut donc absolument pas être visqueuse. Le derme constitue la couche intérieure de la peau qui est la plus épaisse et la plus développée, il contient la majorité des cellules pigmentaires. L'épiderme est formé de 2 couches, la couche intermédiaire est très fine et évolue continuellement. Les cellules sont rejetées vers l'extérieur où elles meurent, deviennent cornées et établissent la partie extérieure de l'épiderme. Cette couche superficielle repousse fréquemment car elle devient inapte à établir les rapports métaboliques avec l'extérieur.

Bien qu'elle soit entièrement recouverte d'écailles, ce qui la rend solide, la peau des serpents est extensible, elle permet la grande flexibilité et élasticité du corps, utile lors de la **locomotion**, immobilisation ou ingestion d'une proie de grande taille.

La peau interstitielle située entre les écailles est bien visible lorsque le corps du serpent est distendu, durant un repas par exemple.

Les écailles des serpents sont constituées de kératine, ce sont des zones de peau épaissies de l'épiderme. Elles ne sont pas individualisées comme chez les poissons mais font partie intégrante de la peau, chaque écaille arrachée provoquant une lésion cutanée. Le fait d'être disposées de manière discontinue sur la peau, participe à la souplesse et élasticité de cette dernière [7].

#### **b) Fonctions des écailles.**

Elles offrent **une protection mécanique** contre l'usure de la peau. Cette protection est particulièrement importante, étant donné que l'usure de l'épiderme est très rapide chez ces animaux qui se déplacent en rampant.

Elles jouent probablement un rôle dans la prévention de la **déshydratation**. Même si cette capacité est mal connue et est peut-être surestimée, on sait aujourd'hui que les écailles sont plus ou moins perméables en fonction de l'environnement du serpent. En effet, elles sont imperméables dans le désert et perméables dans les forêts tropicales.

Certaines espèces de serpents, notamment la Couleuvre de Montpellier (*Malpolon monspessulanus*), la Couleuvre de Moïla (*Rhagerhis moilensis*) et quatre couleuvres des sables du genre *Psammophis* **polissent leurs écailles** dorsales et ventrales grâce à un liquide visqueux sécrété par un petit orifice placé non loin des narines. Ce polissage a probablement pour fonction de limiter **l'évaporation transcutanée** en recouvrant les écailles de lipides ce qui les rend étanches. Mais cela pourrait également être un moyen de **communication chimique** en effet les substances odorantes produites par les glandes nasales sont répandues sur tout le corps, de cette manière le serpent rampant sur le sol y laissera sa marque.

Elles peuvent également **faciliter le déplacement**, ainsi des écailles lisses réduisent les frottements dans la végétation et le sable, tandis que des écailles plus rugueuses permettent de s'accrocher plus facilement à une branche par exemple. Les écailles ventrales transversales sont souvent plus larges afin de permettre une meilleure adhérence lors de la reptation ou de l'escalade. Le fait d'être disposées de manière discontinue sur la peau **participe à la souplesse et élasticité** du serpent.

Les écailles contiennent des cellules qui donnent chacune la **coloration** du serpent. Mises à la suite les unes des autres elles créent les motifs du serpent. Elles sont utiles dans la **défense** du serpent pour le camouflage ou pour intimider un prédateur [7].

### c) Les divers types d'écailles.

Les écailles de serpents peuvent être très diverses. Elles varient selon les espèces, et quelque fois au sein d'une même espèce selon leur fonction. La taille, la forme, la texture, le nombre et la disposition des écailles permettent de différencier et d'identifier les différentes espèces. Les différentes écailles de la tête, ainsi que le nombre de rangées dorsales (dans le sens de la largeur) et le nombre d'écailles ventrales (dans le sens de la longueur) sont généralement caractéristiques d'une espèce et permettent sont identification [7].

#### 1. Les écailles de la tête.

La disposition des écailles sur la tête des serpents est généralement assez constante. Elles ont été nommées pour faciliter leur identification.

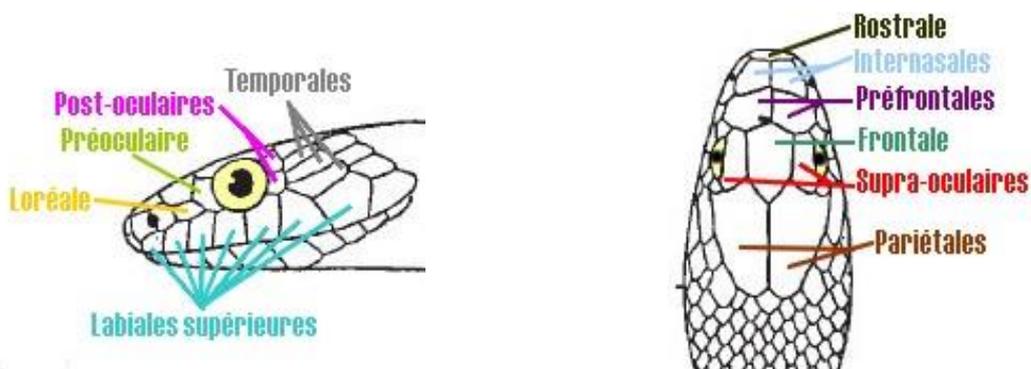


Figure 11: Disposition des écailles céphalique [370].

Chez la plupart des espèces ces écailles sont de grande taille et en forme de plaques. On les trouve chez la plupart des colubridés, chez les cobras et chez certaines vipères. D'autres serpents dont, la plupart des boas et de nombreuses vipères, ont de grandes écailles labiales bordant leur bouche, avec de petites écailles assez uniformes sur le sommet de la tête.

Certaines écailles de la tête se sont transformées et spécialisées chez plusieurs espèces. L'une des plus évidentes est l'écaille rostrale. Il s'agit d'une grande écaille unique située à l'extrémité du museau, elle est souvent modifiée afin de fournir un outil permettant de s'enfouir. Elles peuvent aussi avoir une fonction de camouflage. Chez les serpents à groin, comme *Heterodon simus*, l'écaille rostrale est retroussée ce qui leur permet de creuser.



Figure 12: Serpent groin, *Heterodon simus* [7].

Le serpent langaha crête-de-coq, *Langaha madagascariensis*, offre un unique et remarquable exemple de modification des écailles céphaliques. Son museau se termine par une longue excroissance, ces écailles formant **un long rostre**. Alors que celui du mâle est rectiligne, celui de la femelle est large et orné de nombreuses petites épines.

Certaines écailles au-dessus des yeux se sont transformées en **cornes**. Ces cornes peuvent être faites d'une seule écaille en épine, comme chez les vipères à corne du désert africain, *Cerastes cerastes* et *Bitis caudalis*. D'une seule écaille dressée, comme chez *Pseudoceraste* au Moyen orient, ou d'une grappe d'écailles pointues comme chez la vipère cornue *Bitis cornuta*.



Figure 13: Vipère à corne du désert africain [7].

D'autres espèces comme les vipères rhinocéros, *Bitis nasicornis*, portent sur le museau une grappe de grosses écailles pointues, alors que chez d'autres elles sont allongées pour former un rostre, ou une corne nasale, faite de nombreuses petites écailles recouvrant une protubérance osseuse ou charnue très fréquente chez les vipères ammodyte, *Vipera ammodytes*.



Figure 14: Vipère rhinocéros, *Bitis nasicornis* [7].

La couleuvre d'eau douce, *Erpeton tentaculatum*, d'Asie du Sud-est est la seule représentante à posséder deux « tentacules » au bout du museau. Certains auteurs pensent qu'il pourrait s'agir d'un leurre destiné à attirer les poissons, d'autres y voient un organe du toucher, alors que d'autres encore s'orientent vers une fonction de camouflage, ces écailles proéminentes permettant de briser la ligne de contours de la tête de l'animal aux yeux d'éventuels proies ou prédateurs [7].



Figure 15: Couleuvre d'eau douce *Erpeton tentaculatum* [7].

## 2. Les écailles de la queue.

La queue des serpents peut être longue ou courte, pointue ou émoussée, aplatie ou sphérique, ou encore, être équipée de bruiteurs, comme chez les crotales.

Les crotales, ou serpent à sonnette, ont des écailles caudales modifiées formant un bruiteur ou « **crepitalum** » qui peut produire un bruit de crécelle caractéristique. Ces sons d'avertissements permettent de faire fuir les éventuels prédateurs ou importuns. Ils sont engendrés par les écailles de la queue qui forment des segments imbriqués, ceux-ci se heurtent les uns aux autres quand le serpent les agite. La sonnette du crotale se constitue lors des mues successives. La dernière écaille caudale appelée « bouton », en forme de sablier plus robuste que les autres, se maintient et ne tombe pas avec le reste de la mue. Un nouveau segment s'ajoute après chaque mue, et de nombreux segments finissent par s'accumuler, le plus ancien étant celui de l'extrémité.

D'autres espèces de serpents présentent des particularités au niveau caudal :

- Chez les serpents vermiformes, les Typhlopidés ont la queue qui se termine par une petite épine qui leur sert d'accroche lorsque le serpent s'enfouit.
- Certains Colubridés possèdent une queue qui se termine par une écaille pointue, comme la couleuvre à queue fine *Contia tenuis* de l'ouest de l'Amérique du Nord.
- Chez les Uropeltidés, la queue est tronquée obliquement formant une banane coupée à un angle d'environ 45°. La surface ovale plane est couverte d'écailles rugueuses : carénées ou tuberculées.
- Chez d'autres espèces la queue est brutalement aplatie en deux ou quatre petites épines, ou en une seule écaille conique couverte de tubercules granuleux dépourvus de pigment comme chez les *Rhinophis*.

L'objectif de tous ces systèmes est probablement de permettre au serpent de prendre appui sur la queue pour s'enfouir, et l'écaille terminale de *Rhinophis* lui sert peut-être de bouchon afin de fermer l'orifice de sa tanière à tout intrus [7].

### **3. Les écailles du dos.**

Chez la plupart des espèces les écailles du dos sont en forme de losange et se chevauchent. Elles peuvent être lisses ou carénées, c'est-à-dire qu'elles sont surélevées le long de leur ligne médiane de façon plus ou moins proéminente. Elles sont disposées en rangées régulières qu'il est facile de compter pour aider à la détermination d'une espèce. L'extrémité des écailles peut être arrondie, comme chez les *Typhlops*, ou plus pointue. Le summum des écailles pointues est atteint par la vipère velue, *Atheris hispidata*, où l'apex des écailles est étiré en pointe. Les écailles sont allongées et redressées à l'extrémité ce qui donne à l'animal son aspect rugueux et hirsute. Le milieu de vie et le mode de locomotion des serpents conditionnent la texture (lisse ou granuleuse) de leurs écailles [7].

### **4. Les écailles du ventre.**

A l'exception des espèces fouisseuses tous les serpents possèdent une seule rangée d'écailles se chevauchant sur le ventre, elles sont larges et courtes, généralement lisses pour faciliter la reptation sur le sol. Les serpents aquatiques qui ne se déplacent pas ou très rarement sur des surfaces rugueuses possèdent néanmoins des écailles ventrales très réduites, parfois visibles seulement sous forme d'une étroite arête le long du ventre.

Ces écailles ventrales correspondent à la position et au nombre de côtes et sont normalement plus nombreuses chez les femelles que chez les mâles d'une même espèce. Le nombre d'écailles ventrales n'est cependant pas constant, il y a une fourchette spécifique déterminée pour chacun des mâles et femelles d'une espèce. La dernière écaille, l'écaille anale, peut-être simple ou divisée [7].

#### **d) La mue.**

Les écailles des serpents sont toutes composées de deux couches, la couche externe et la couche interne. La couche externe, en contact avec l'extérieur, va se détacher lorsque le serpent mue. La couche interne, en formation continue sous la couche externe remplacera alors cette dernière. Entre les deux, il existe une fine couche de cellules transparentes, sécrétant une substance visqueuse et opaque plusieurs jours avant la mue. Cette substance va aider à la séparation des deux parties de la peau pendant la mue. Les yeux prennent alors un aspect laiteux ou bleuté, la coloration du corps devient terne et les motifs des écailles s'atténuent. Souvent à cette période, les serpents cessent de manger.

Les serpents lancent le processus de mue en se frottant le museau sur un objet rugueux jusqu'à ce que ses écailles se décollent, puis il détache l'ancienne peau nommée « exuvie » en rampant dans la végétation, une écorce, des branches, un rocher ou autre surface rugueuse. En commençant par la mâchoire, la mue se retrouse jusqu'à la queue.

Lorsque la peau s'est détaché l'ancienne couche qui était interne va devenir la couche externe et une nouvelle couche interne se développe. La mue des serpents est totale, l'épiderme se détache généralement d'une seule pièce (ce qui est un signe de bonne santé). La mue est humide et souple immédiatement après être tombée, cela est dû à une substance lubrifiante. Au bout de quelques heures cette substance disparaît laissant la mue fragile et cassante.

Bien qu'elle puisse contenir quelques traces de motifs sous forme de taches sombres à peine visibles, la mue n'est pas colorée. En effet, les cellules pigmentaires ne sont pas présentes dans l'épiderme qui se détache lors de la mue mais dans le derme. Comme la nouvelle peau n'a pas encore été abîmée par l'usure, les coloris sont souvent beaucoup plus vifs qu'avant la mue.

La fréquence des mues est affectée par de nombreux facteurs, elle dépend de l'espèce, de l'âge, de la taille, de la température, de l'humidité, de la nutrition et de la santé du serpent. En moyenne un serpent mu entre 3 et 8 fois par an. Chez certaines espèces, la peau est renouvelée environ tous les vingt jours, alors que chez d'autres seulement une fois par an. La première mue d'un serpent se produit généralement peu de jours après la naissance, avant que les jeunes n'aient commencé à s'alimenter. La fréquence des mues diminue avec le taux de croissance. Les jeunes serpents qui grandissent rapidement muent plus souvent que les adultes dont la croissance est plus lente. En effet au cours de la croissance juvénile les serpents muent 10 à 15 fois par an. Les serpents grandissent jusqu'à la fin de leur vie.

Chez les espèces des zones tempérées qui passent l'hiver en phase de repos, la mue intervient souvent dès le début du printemps lorsque le serpent redevient actif. L'activité sexuelle est souvent grande les jours qui suivent cette mue dite « vernale ».

Les femelles muent souvent juste avant la ponte ou naissance des petits. Cette mue appelée mue de « pré-ponte » peut avoir lieu à une date déterminée avant la ponte par exemple chez les serpents rois et la plupart des serpents ratiers, cette mue se produit toujours 8 à 10 jours avant la ponte.

Les serpents blessés muent fréquemment, quelque fois en succession rapide. Le processus est probablement déclenché par des hormones, dans le but d'accélérer la cicatrisation. Le rôle de la mue n'est donc pas uniquement d'accorder la taille de la peau au corps grandissant [7].

#### **e) La coloration.**

Les serpents peuvent présenter toutes sortes de colorations. Ils sont presque toujours brillants, certains ont une couleur unie tandis que d'autres peuvent être très colorés, iridescents, et présenter des motifs très complexes. La coloration est d'ailleurs un critère d'identification des espèces même s'il existe une variabilité assez fréquente et parfois importante au sein d'une même population, chez les serpents issus d'une même portée, voire chez un même individu à différents moments de sa vie.

Quelques espèces peuvent changer de ton au cours d'une même journée :

- Parmi elles, une sous-espèce de petite taille de boa constricteur de l'île d'Hog est capable de changer assez nettement de couleur. Cela arrive généralement la nuit, il devient alors plus clair et les motifs de ses écailles palissent.
- Le python d'Oenpelli est capable de changer de teinte passant du brun le jour au gris argent clair la nuit.
- Plusieurs espèces de serpents semblent devenir plus sombres lorsqu'il fait froid, cela dans le but d'optimiser l'absorption des rayons solaires et de se réchauffer plus rapidement.
- Dans le même objectif, la femelle du boa arboricole de Madagascar, *Sanzinia madagascariensis* devient plus sombre lorsqu'elle est gestante permettant ainsi d'accélérer le développement des embryons.

Tous ces changements de couleur sont provoqués par la mobilisation des granules de mélanine au sein des mélanophores.

D'autres espèces changent de coloration sur le plus long terme. En effet, la couleur des jeunes individus peut être très différente de la couleur des adultes :

- Les jeunes serpent-roi, *Lampropeltis triangulum*, sortent de l'œuf vivement colorés et deviennent de plus en plus terne pour finir presque uniformément noirs. Chez cette espèce la production de mélanine se poursuit toute la vie du serpent, imprégnant graduellement de noir la surface de sa peau et recouvrant les motifs.
- L'exemple le plus remarquable reste celui du boa émeraude, *Corallus caninus* et du python vert, *Morelia viridis*. Les nouveau-nés naissent orange, jaune ou brun, et deviennent vert éclatant au bout d'un an environ.

La coloration est déterminée génétiquement. Elle est produite de trois manières différentes. Elle est déterminée en premier lieu par les pigments contenus dans les chromatophores présents entre le derme et l'épiderme. Il s'agit d'un phénomène chimique. Un grand nombre de pigments différents ont été isolés chez les serpents, (la mélanine est la plus répandue), leur mélange peut fournir une palette infinie de tons et de nuances. La coloration d'un serpent dépend également des caractéristiques physiques des écailles qui peuvent produire des phénomènes d'iridescence et d'effet Tyndall, (appelé aussi diffusion de Rayleigh.). Présente chez de nombreuses espèces, l'iridescence dépend des caractéristiques physiques de la lumière. La couche externe des écailles est mince et transparente, lorsque la lumière la frappe elle se décompose en éléments du spectre et à chaque longueur d'onde correspond une couleur créant ainsi un effet d'irisation. Tous les serpents à écailles lisses sont iridescents, mais certains le sont plus que d'autres. Le phénomène est plus visible chez les serpents noirs ou de couleur sombre. Le serpent arc-en-ciel, *Xenopeltis unicolor* par exemple et le Boa arc-en-ciel *Epicrates cenchria* ont des écailles très iridescentes. L'effet Tyndall est dû à un effet de dispersion de la lumière par de petites particules dites « iridophores ». Ces particules contenues dans les cellules vont réfléchir et réfracter la lumière de façon particulière. Les ondes lumineuses courtes, du côté bleu du spectre sont plus atteintes que les autres. Une couche de chromatophores jaunes recouvre celle contenant les iridophores, ce qui va additionner les effets. Le bleu va se mélanger au jaune produisant la couleur verte présente chez de nombreux serpents dont le boa émeraude, *Corallus caninus*, le python vert, *Morelia viridis*, plusieurs vipères à fossettes arboricoles et de nombreux colubridés.

La coloration des serpents joue un rôle important, elle participe à leur survie puisqu'elle leur permet de se camoufler aux yeux des prédateurs et des proies potentielles. Les taches, bandes ou rayures de certaines espèces aident à les confondre avec leur environnement. Les serpents arboricoles sont généralement verts, les serpents terrestres assortis au substrat, etc. De nombreux serpents diurnes sont rayés, alors que les espèces nocturnes ou crépusculaires sont plutôt annelées. Physiologiquement la coloration d'un serpent peut lui permettre de mieux absorber la chaleur ou se protéger des rayonnements nocifs [7].

#### 4) Organes sensoriels.

##### a) L'Ouïe.

Les serpents ne sont pas sourds, cependant ils n'entendent pas au sens classique du terme. L'ensemble de leur corps, et surtout leur tête lorsqu'elle est en contact avec le sol, perçoivent des vibrations qui seront transmises à l'oreille interne puis analysées par le cerveau.

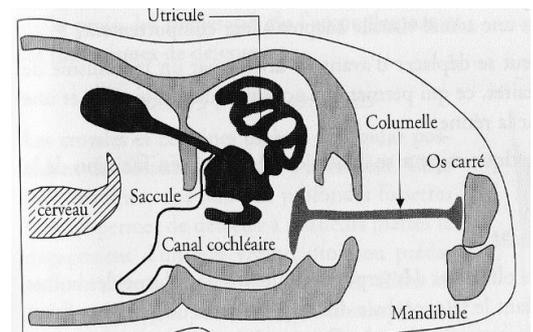


Figure 16: Organisation de l'oreille d'un serpent [3].

Les serpents ne possèdent pas d'oreille externe. L'oreille moyenne est rudimentaire, il n'y a ni trompe d'Eustache ni tympan. Le marteau, l'enclume, et l'étrier qui sont les trois osselets assurant la transmission des vibrations du tympan à l'oreille interne chez les mammifères sont remplacés par un os unique, appelé la columelle. La columelle est en contact avec l'os carré, qui lui-même est articulé sur la mâchoire inférieure. Les vibrations du sol sont perçues par les mandibules et sont transmises directement dans l'oreille interne par le biais de la chaîne d'os. En d'autres termes le serpent entend littéralement les vibrations du sol. Les serpents perçoivent également les ondes de basses fréquences transmises dans l'air.

L'oreille interne connaît une organisation particulière. Les canaux semi-circulaires, l'utricule et le saccule sont normalement développés permettant l'équilibre du serpent. Le seul organe de l'audition proprement dit est constitué du canal cochléaire et sa membrane basilaire, ceux-ci sont fortement développés paradoxalement à l'absence d'oreille externe et moyenne. Les serpents ne communiquent pas entre eux vocalement. Les sifflements ou bruit de crécelle que peuvent produire certains serpents servent à impressionner ou à faire fuir tout prédateur qui voudrait s'en approcher [3] [7].

## b) L'odorat.

L'odorat est particulièrement développé chez les serpents. Comme chez les autres vertébrés, les serpents ont des narines reliées aux centres olfactifs de leur cerveau. Le volume des bulbes et des pédoncules olfactifs dans le télencéphale des serpents indique que leurs capacités olfactives sont particulièrement actives.

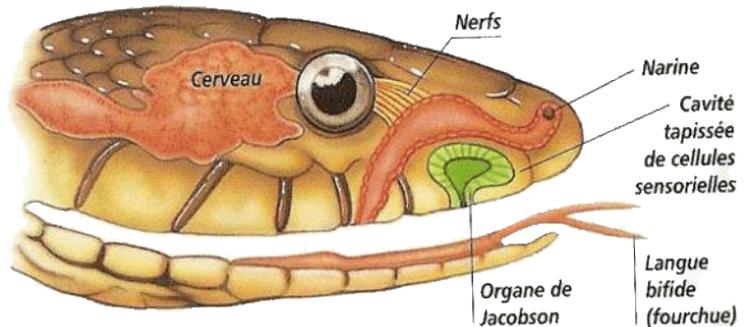


Figure 17: Organe de Jacobson [370].

L'organe voméronasal appelé aussi organe de Jacobson, est présent exclusivement chez les serpents et chez quelques lézards. Il est situé sur la partie antérieure de la tête, (sous les fosses nasales) et s'ouvre sur le palais. Il est composé de deux poches tapissées de cellules sensorielles, chacune d'elle s'ouvrant sur la cavité buccale par un étroit canal. Cet organe fonctionne simultanément avec les narines et le lobe olfactive du cerveau. Les terminaisons internes sont connectées à une ramification spécifique du nerf olfactif.

Lorsqu'un serpent veut sonder le milieu, il darde sa langue par une encoche, nommée « fosse linguale », située à l'avant de sa mâchoire supérieure. La langue capte les odeurs sous forme de molécules en suspension dans l'air et les ramène à la cavité buccale. L'extrémité bifide de la langue est alors insérée dans chacun des conduits de l'organe de Jacobson où les molécules sont analysées et identifiées par les cellules sensorielles qui la tapissent. L'information est alors envoyée au cerveau.

L'activité très rapide et constante de la langue permet d'analyser immédiatement les substances volatiles présentes dans le milieu. Lorsqu'elle n'est pas utilisée, la langue repose dans une gaine charnue du plancher de la cavité buccale.

Les serpents comptent autant sinon plus, sur leur organe de Jacobson que sur leurs narines. Cette fonction sensorielle est très importante dans la capture des proies, les préparatifs de l'accouplement et les mécanismes de défense.

Les narines servent à respirer, alors que la langue en association avec l'organe de Jacobson sert à sentir les odeurs [3] [7].

### c) La Vision.

Bien qu'ils ne disposent pas d'une très bonne vue, la vision joue un rôle important dans l'univers perceptif des serpents. Cela à l'exception des Scolécophidiens, serpents fouisseurs primitifs, qui possèdent des yeux atrophiés.

Les serpents n'ont pas de paupière, **l'œil est protégé par une grande écaille transparente et fixe**, parfois appelée **lunette**. Celle-ci tombe avec le reste de la mue. Certaines espèces plus primitives n'ont pas de lunette et l'œil est recouvert d'une ou plusieurs écailles plus classiques [7].

La plupart des espèces possède **une vision binoculaire** qui leur permet d'évaluer les distances et les reliefs [3]. Le fait que les yeux soient situés de chaque côté de la tête améliore leur sensibilité à percevoir les mouvements, les serpents ne percevant pas les objets immobiles [7]. **Le champ visuel des serpents est relativement large, de l'ordre de 120 à 140 degrés** [3]. Le recouvrement des champs perçus par l'œil droit et par l'œil gauche est d'environ 30°. En revanche, chez quelques serpents, tels que les 8 espèces asiatiques d'*Ahaetulla* et les 3 espèces africaines de *Thelotornis*, qui ont de grands yeux et des pupilles en ellipse horizontale ou dit « en trou de serrure », ce champ visuel augmente. Il peut en effet atteindre **210°** avec une vision stéréoscopique de 45°, comme celle de l'homme. Cela provient du fait que la **pupille horizontale** et le **museau étroit et pointu** marqué de deux dépressions réduisent la région nasale. Cette évolution de la morphologie de l'œil fournit aux serpents une large vision binoculaire et lui permet de juger assez précisément les distances. Il peut améliorer cette vision binoculaire en balançant la tête tout en sélectionnant sa proie. Il s'agit là d'un réel avantage adaptatif pour des serpents qui se déplacent dans un espace tridimensionnel [20].

**La mobilité des yeux est réduite**, sauf chez quelques espèces, dont les serpents lianes du genre *Oxybelys* qui peuvent faire pivoter les leurs tout en restant immobiles [7].

## 1. La rétine.

Les cellules visuelles tapissant la rétine, les bâtonnets et les cônes lesquels permettent de bien voir malgré les changements d'intensité de la lumière, ne sont pas aussi bien organisés chez les serpents que chez la plupart des vertébrés, et la majorité des serpents sont dépourvus de l'une ou de l'autre de ces cellules. Le résultat est une **incapacité à voir les détails et en particulier l'incapacité à repérer les objets statiques** [7]. Cette diversité des cellules rétinienne s'explique par deux hypothèses complémentaires. Cela proviendrait de leurs origines de lézards fouisseurs dont la rétine a été modifiée par adaptation de ce mode de vie. En effet les animaux fouisseurs n'ont guère besoin d'une bonne vue et leurs yeux ont tendance à dégénérer au fil du temps. La seconde hypothèse réside dans le fait que les serpents plus évolués sont ensuite remontés à la surface où ils ont dû se réadapter en développant leur vision, tout en permettant un retour éventuel à la vie en profondeur [7] [20]. **La rétine des Scolécophidiens** (serpents fouisseurs nocturnes) n'est pourvue que de bâtonnets, qui permettent la vision achromatique crépusculaire (c'est-à-dire en faible luminosité). **La rétine des Boas et pythons** présente, en plus des bâtonnets, des cônes qui permettent la vision colorée diurne (c'est-à-dire en forte luminosité). **Les espèces les plus évoluées, couleuvres, cobras et vipères**, présentent une déclinaison relativement complexe du type rétinien comprenant des bâtonnets et des cônes de structures différentes qui favorisent une acuité visuelle adaptée à leur comportement. De nombreuses **couleuvres diurnes** possèdent une rétine qui ne comporte que des cônes. Chez le genre *Natrix*, on a montré l'existence de cônes sensibles au rouge, au vert et au bleu [20, 3].

## 2. Le cristallin.

Le cristallin des serpents est généralement de couleur jaune chez les espèces diurnes, plus pale chez les espèces crépusculaires et incolore chez les espèces nocturnes [20]. Le cristallin peut se déplacer d'avant en arrière par un mécanisme de contraction des muscles ciliaires (situés à la périphérie de l'iris, leur contraction augmente la pression dans le vitré et pousse le cristallin vers l'avant.), ce qui permet une accommodation visuelle et une mise au point de l'image sur la rétine [3]. Le genre *Ahaetulla*, est capable d'effectuer une mise au point en changeant la forme de son cristallin ce qui représente un très bon avantage adaptatif permettant une meilleure accommodation [7]. Chez certaines couleuvres du genre *Natrix*, la face antérieure du cristallin peut aussi se déformer comme chez les mammifères [20].

### 3. La pupille.

#### a. Généralités.

La majorité des serpents a quelques exceptions près ont une pupille simple et ronde s'ils sont diurnes, ou en ellipse verticale s'ils sont nocturnes. Les espèces qui ont développé la meilleure vision sont des diurnes telles que *Masticophis* et *Thamnophis*. Ces chasseurs diurnes se reconnaissent généralement à leurs larges pupilles circulaires.

**La pupille est capable de se dilater ou se rétrécir en fonction de la luminosité.** Par exemple, chez les espèces marines, la vision dans l'air s'accompagne d'une diminution considérable du diamètre pupillaire, qui se réduit à la taille d'une tête d'épingle [20].

Les chasseurs nocturnes, tels *Trimorphodon* et *Telescopus*, possèdent de grands yeux, dont les pupilles en ellipse verticale se ferment au jour pour ne former plus qu'une fente étroite [7].

#### b. Spécialisation de la pupille.

Le serpent liane d'Asie du genre *Ahaetulla*, possède une pupille en ellipse allongée horizontalement dite « en trou de serrure » lui conférant une vision panoramique exceptionnelle et permettant de juger efficacement des distances.



Figure 18: Serpent liane du genre *Ahaetulla* [7].

Le boomslang *Dispholidus typus*, qui est un chasseur diurne, possède de grands yeux en forme de larme, légèrement étirée vers l'avant.

Le serpent montagnard mangeur de limaces de Malaisie, *Asthenodipsas*, est une espèce strictement nocturne qui ferme ses pupilles à la lumière du jour jusqu'à ce qu'elles ne forment plus qu'un ovale minuscule.

Malgré son importance, la fonction visuelle intervient rarement seule dans l'univers perceptif des serpents. Elle précède ou accompagne souvent une fonction sensorielle, chez les crotales les boas et les pythons, elle interfère de façon très étroite avec la thermosensibilité [20].

#### d) Les fossettes thermosensibles.

Certaines familles de serpents ont développé des organes supplémentaires uniques dans le règne animal. Il s'agit de **capteurs de chaleur** présents chez les boas, pythons et crotales.

Les crotales, surnommés « vipère à fossettes », sont pourvus d'une paire de profondes fossettes appelées « **loréales** », situées légèrement sous la ligne passant entre les yeux et les narines. Elles sont bordées de petites écailles et s'ouvrent vers l'avant. On a d'ailleurs longtemps cru qu'il s'agissait de petites narines supplémentaires d'où leur nom de *cuastro narines* « quatre narines » en Amérique latine.

Concernant les boas et les pythons les fossettes dites « labiales » sont portées sur le bord de la bouche, le plus souvent sur les lèvres supérieures. Elles forment alors de nombreuses dépressions, pouvant aller jusqu'à treize paires. Ces fossettes peuvent être d'assez grande taille, comme chez le boa émeraude *Corallus caninus*, ou n'être que de simples creux peu profonds, comme chez *Epicrates*. Chez les pythons, les fossettes sont situées parmi les écailles labiales et/ou rostrales. Alors que les rangées de fossettes des boas se situent entre les écailles labiales.

Les liens de parenté entre crotales et Boïdés sont très éloignés. La structure de leurs fossettes, très différente, nous indique qu'elles ont dû apparaître indépendamment chez les uns et chez les autres [7].

#### 1. Structure.

Chez les boas et pythons, l'épithélium qui tapisse le fond de la fossette est constitué de récepteurs sensoriels très superficiels, ce qui augmente leur sensibilité. Le nombre de récepteurs détermine la précision de la localisation de la source de chaleur [3].

Les crotales sont les serpents qui ont développé les détecteurs de chaleur les plus élaborés et les plus efficaces, certaines espèces pouvant détecter un changement de température jusqu'à 0,001°C.

Les fossettes sont constituées de 2 cavités, séparées par une fine membrane tapissée d'une couche de cellules épithéliales. Cette membrane contient de nombreux thermorécepteurs capables de détecter d'infimes élévations de température [7].

La membrane absorbe le rayonnement infrarouge incident et transmet l'excitation au nerf trijumeau (nerf sensoriel de la face), qui envoie l'information au cerveau. La sensibilité est de l'ordre de 3 millièmes de degrés centigrades [3].

La chambre interne remplie d'air est reliée à l'extérieur par un étroit canal qui s'ouvre juste devant l'œil, ce qui permet d'équilibrer la pression de l'air de chaque côté de la membrane et aussi d'enregistrer la température ambiante.

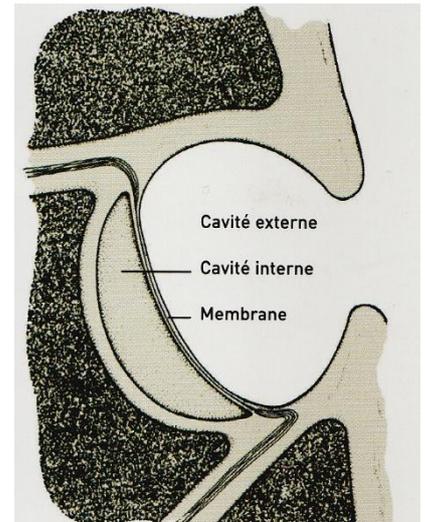


Figure 19: Fossette d'un crotale [7].

## 2. Principe.

La chaleur émise par les animaux à sang chaud est détectée seulement par la surface externe de la membrane. La différence de température entre les deux côtés de la membrane va permettre au serpent d'analyser s'il s'agit de la chaleur émise par un animal ou la radiation d'un objet chaud, ou simplement d'air chaud qui lui parvient par convection, transporté par la brise [7]. L'avantage de la chambre à air des crotales est de limiter les déperditions thermiques et d'améliorer ainsi la détection des rayonnements infrarouges.

La détection thermique va optimiser la vision. Ainsi la proie en mouvement, dégageant de la chaleur est perçue à la fois par l'œil et la fossette thermosensible, ce qui permet de la distinguer d'un objet fixe mais chaud, d'un autre mobile mais froid [3].

Les thermorécepteurs fonctionnent comme un appareil photographique sans lentille. En effet le trajet des voies nerveuses issues de ces organes diffère radicalement des modèles sensoriels classiques. Les relais nerveux des fossettes thermosensibles aboutissent dans le toit optique, (zones de l'encéphale où sont décodées les informations visuelles) la sensibilité thermique se superpose alors à la fonction visuelle. Des neurones multimodaux traitent et additionnent les deux catégories d'informations ce qui permet à l'animal d'élaborer une image mentale de sa proie, proche d'une image visuelle. Ceci permet au serpent de porter sa morsure efficacement et de s'en saisir sans l'avoir aperçue au préalable.

Un crotale est donc très bien équipé pour détecter sa proie. Il est d'abord alerté par les vibrations, puis l'identification de la proie se fait par la langue et l'organe de Jacobson. Dès qu'il s'en est rapproché, les fossettes lui fournissent les informations nécessaires à l'attaque. En fonctionnant

conjointement, les deux fossettes analysent les messages thermiques reçus de chaque côté de la tête, ce qui permet au serpent de la détecter à plusieurs mètres même dans la plus totale obscurité et cela même si la proie est parfaitement dissimulée derrière un objet. Des expériences scientifiques ont montré qu'un serpent à sonnette aveugle est capable de capturer sa proie 48 fois sur 49 essais. En revanche, lorsque les fossettes étaient couvertes, le taux de réussite tombait à 4 pour 15 essais.

Lorsqu'une proie est touchée, les zones les plus souvent frappées par les crochets sont les plus vulnérables, soit la tête ou le thorax. Ceci démontre avec quelle précision les crotales peuvent frapper en ne disposant pour les guider que de leurs fossettes faciales [7].

#### **e) Autre sens : Les tubercules et fossettes des écailles.**

De nombreux serpents ont dans certaines écailles de leur corps de petits tubercules et de petites fossettes, tout juste visibles à l'œil nu. Dans ces zones la cuticule est plus fine. Etant donné que les terminaisons nerveuses sont concentrées dans la région située immédiatement en dessous, il est quasi certain qu'il s'agisse d'organes sensoriels. En revanche, leur fonction reste inconnue, même si plusieurs hypothèses sont avancées [7].

#### **1. Les tubercules.**

Les tubercules semblent être présents chez toutes les espèces à ce jour examinées et ce en nombre variable. Le plus souvent ils sont portés par un grand nombre d'écailles. Les tubercules sont très petits, de 1 à 2mm de diamètre, chacun d'eux représente une petite excroissance, entourée d'une dépression circulaire. Sous le tubercule, l'épiderme est soulevé pour se loger parfaitement dans l'excroissance. Les terminaisons nerveuses sont localisées juste sous l'épiderme.

Les tubercules sont localisés de manière très variable selon les espèces. Chez la plupart d'entre elles ils se retrouvent sur la partie antérieure de la tête, essentiellement au niveau des écailles rostrales et labiales. Ils peuvent parfois atteindre les écailles dorsales et ventrales du corps et de la queue, mais ils y sont généralement moins nombreux que sur la tête.

Les tubercules ont tendance à être nombreux dans la partie du corps qui entre en contact avec le substrat, quand le serpent se déplace. L'hypothèse la plus probable est qu'il s'agit d'organes du touché.

Des agencements identiques ont été retrouvés près du cloaque des mâles chez certaines espèces. Il pourrait s'agir d'un caractère sexuel secondaire qui aiderait les mâles à trouver le cloaque de la femelle [3] [7].

## **2. Les fossettes.**

A l'inverse des tubercules, les fossettes appelées aussi ponctuations, sont présentes uniquement chez quelques espèces de serpents évolués. Elles sont absentes chez les Elapidae.

Les fossettes sont un peu plus grandes que les tubercules, jusqu'à 3 mm de diamètre, et elles peuvent être ovales ou circulaires. La cuticule est plus fine au fond de la fossette, zone où sont situées les terminaisons nerveuses. Les fossettes, lorsqu'elles sont présentes, sont plus nombreuses au niveau de la tête, essentiellement autour du museau. Sur le corps, les fossettes sont, le plus souvent, retrouvées par paires à l'extrémité (apex) des écailles. Elles portent alors le nom de « fossettes apicales ». Les fossettes et les tubercules peuvent coexister sur des régions différentes d'une même écaille.

On connaît encore moins bien le rôle des fossettes que celui des tubercules. Plusieurs hypothèses ont été proposées. Comme elles sont absentes chez les espèces fouisseuses, on a supposé que les fossettes seraient peut-être photosensibles. Permettant ainsi au serpent de savoir si une partie de son corps est encore exposée, lorsqu'il s'abrite sous un rocher ou entre dans un terrier. D'autres chercheurs pensent que les pores et autres zones fines des écailles permettent à une substance visqueuse de suinter à la surface des écailles empêchant ainsi l'eau de pénétrer.

On sait peu de choses sur cette forme de communication chez les serpents, mais il est probable que certains d'entre eux soit capables de sentir l'odeur de leurs congénères et peut-être d'autres espèces. Ou bien les fossettes pourraient encore sécréter des substances jouant un rôle dans la communication chimique, permettant aux serpents de se reconnaître et peut être de marquer leur territoire [7].

## B) Morphologie interne.

L'anatomie interne des serpents diffère peu de celle des autres vertébrés, nous nous intéresserons donc ici à ce qui les différencie de ceux-ci. La disposition générale des organes internes du serpent s'adapte à la forme particulièrement étirée en longueur de l'animal. Les viscères sont allongés et disposés les uns derrière les autres, certains sont même atrophiés [7].

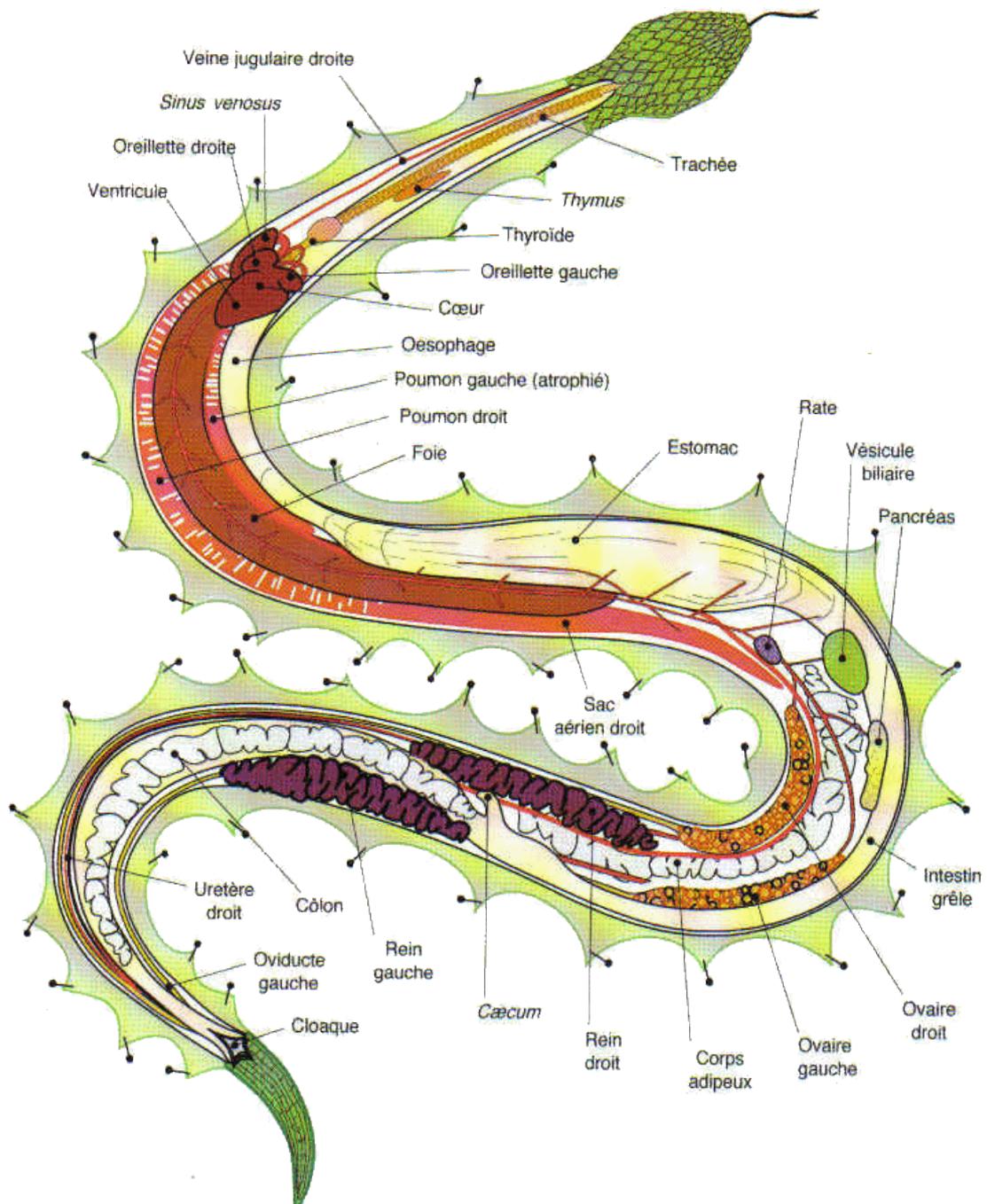


Figure 20: Anatomie interne d'un serpent [370].

## 1) Ostéologie.

### a) Le squelette.

Les serpents sont allongés et dépourvus de membres individualisés. Le squelette des serpents se compose d'un très grand nombre de vertèbres, de 140 à 435 selon les espèces, auxquelles sont attachées autant de paires de côtes, sauf au niveau de la queue où ces appendices osseux sont absents ou limités aux premières vertèbres caudales.

Le grill costal est ouvert et dépourvu de sternum, toutes les côtes sont libres et mobiles, ce qui permet notamment l'ingestion de proies volumineuses et la locomotion. Les vertèbres sont reliées entre elles par cinq surfaces articulaires permettant une remarquable cohésion. La moelle épinière est ainsi protégée tout en autorisant une grande flexibilité et souplesse de la colonne vertébrale.

Chacune des vertèbres comporte :

- Une zone centrale, **le centrum**, court et cylindrique, il possède une extrémité concave et l'autre convexe qui s'articule avec la vertèbre suivante.
- **Un arc neuronal**, dans lequel passe la moelle épinière.
- **Des projections osseuses**, qui s'articulent avec leurs homologues de la vertèbre voisine [7].

Les vertèbres montrent d'intéressantes adaptations au différent mode de vie des serpents. Des hypapophyses (excroissances osseuses plus ou moins longues situées sur la face ventrale du centrum des vertèbres) sont présentes chez quelques espèces, notamment les serpents marins et les serpents mangeurs d'œufs du genre *Dasypeltis*, chez ces derniers les hypapophyses des premières vertèbres servent à casser la coquille de l'œuf ingurgité [7]. Chez les serpents marins et les espèces d'eau douce les plus spécialisées, les épines neurales et les processus ventraux des vertèbres caudales sont allongées, donnant à la queue sa forme de rame aplatie.

Aucun serpent ne possède de ceinture pectorale, mais quelques familles parmi les plus primitives ont conservé une ceinture pelvienne. On observe chez les boas et les pythons un vestige de membres inférieurs sous forme d'ergots. Ces appendices se rattachent à la ceinture pelvienne et sont situés de chaque côté de l'orifice anal. Ils sont souvent plus développés chez les mâles probablement dans le but de stimuler la femelle lors de l'accouplement [1].

## **b) La locomotion.**

Les serpents se déplacent par reptation : ils utilisent l'ensemble des muscles de leur corps pour se mouvoir. Quatre types de déplacements au sol sont décrits en fonction de la taille du serpent et de la qualité du terrain sur lequel il évolue.

Le mode de locomotion le plus fréquent est la reptation par ondulation latérale, dite « serpentine ». Le serpent pousse sur l'arrière de chaque courbe ou irrégularité du sol et avance doucement. Les ondulations sont amples, rapides et laissent une trace serpentine unique et continue. La vitesse peut atteindre 10 km/h.

La « locomotion du mille pattes » : Les serpents courts et massifs progressent en ligne droite beaucoup plus lentement. La colonne vertébrale est constamment rectiligne ; chaque paire de côtes se soulève successivement permettant à l'écaille ventrale correspondante d'accrocher le substrat et de faire avancer le serpent de quelques centimètres.

La « locomotion en accordéon » : Les serpents de taille moyenne se déplacent sur sol accidenté par progression télescopique ou en accordéon. Le serpent prend appui sur la partie postérieure du corps, soulève la tête et la propulse en avant où elle servira à son tour de point d'appui pour ramener le reste du corps et le faire avancer. Le corps est alternativement détendu puis ramassé à mesure que le serpent se déplace d'un point d'ancrage à un autre. Dans les galeries souterraines ce sont les parois qui fournissent les points d'appuis.

Enfin, sur le sol meuble, comme du sable fin, les serpents progressent par « déroulement latéral ». Le principe est similaire au précédent, mais la projection de la tête se fait sur le côté et non en avant de l'animal. Le serpent roule son corps sur le côté en un mouvement en boucle. Les traces au sol sont constituées de deux barres parallèles et discontinues.

Les serpents arboricoles peuvent parfois donner l'impression de voler, ils se jettent d'une branche pour planer plus ou moins loin en aplatissant leur corps [7].

### c) Le crâne.

Le crâne des serpents est composé d'un nombre élevé d'os fins. A l'exception de quelques serpents primitifs, les os ne sont pas soudés entre eux, mais sont très largement articulés. L'extrême laxité des os et ligaments du crane permet l'ingestion de proies plus volumineuses que le diamètre de leur tête [3]. **Les**

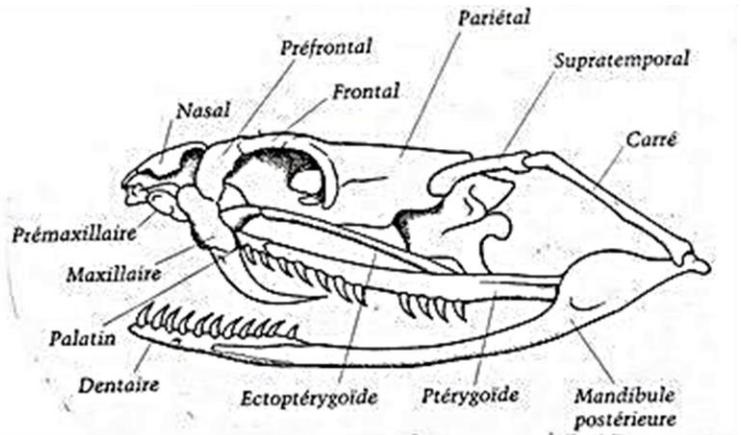


Figure 21: Crâne d'un serpent [373] [7].

**serpents sont incapables de découper leurs proies, ils les avalent toutes entières, sans les mâcher**, sans l'élasticité de leur peau et la capacité d'étirer démesurément leurs mâchoires, ils seraient contraints de ne manger que de très petites proies [7, 3].

Les mâchoires sont rigides, afin de résister aux forces exercées sur la base du crâne pendant l'ingestion de grosses proies. Elles sont cependant reliées de façon souple à la boîte crânienne. **Le maxillaire et les mandibules** sont très mobiles et peuvent s'écarter latéralement ainsi que d'avant en arrière, entraînant la proie pour l'avaloir [7]. Les mandibules s'articulent en arrière avec **l'os carré**, en pivotant jusqu'à la verticale avec ce dernier elles sont capables d'assurer une très large ouverture buccale. Chez la majorité des espèces, les deux moitiés de la mâchoire inférieure ne sont pas soudées à l'extrémité antérieure, mais **sont jointes par un ligament élastique**. Cette indépendance leur permet de s'éloigner l'une de l'autre augmentant ainsi la capacité de la cavité buccale. **L'absence de symphyse inter-mandibulaire ou « menton »** est une caractéristique d'évolution des serpents, qui les rassemble sous le nom **de Macrostromata**.

### d) La dentition.

Les dents des serpents servent à la préhension et contention des proies, elles sont fines, pointues, recourbées et orientées vers l'arrière ce qui permet de transpercer les téguments et d'empêcher la proie avalée entière de s'échapper. La dentition des serpents est de type « **pleurodonte** », la face interne de la mâchoire est oblique, formant un bourrelet osseux sur lequel les dents sont implantées. Le nombre et la disposition des dents sont très variables d'une espèce à l'autre ; chez certaines elles sont pratiquement absentes, alors que chez d'autres elles peuvent être nombreuses de taille et de type variés.

Les serpents portent leurs dents sur :

- **Le dentaire** (le long de l'arrête de la mâchoire inférieure ou mandibule).
- **Le maxillaire** (partie externe de la mâchoire supérieure).
- **Les os palatins** (os allongés du palais, entre les maxillaires).
- **Les os ptérygoïdes** (deux os fixés au palais à l'avant et aux os carrés à l'arrière) [7].

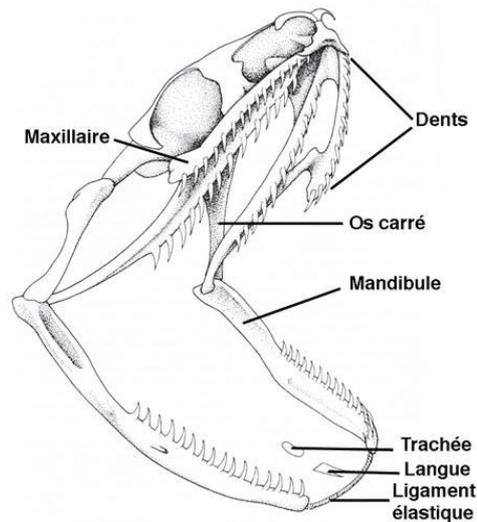


Figure 22 : Crâne de couleuvre [372]

Les dents n'ont pas de racines et certaines sont même mobiles. Les serpents ont plusieurs dentitions successives, chaque dent n'étant fonctionnelle que pendant quelques mois. Elles sont remplacées tout au long de la vie du serpent. La croissance des dents de remplacement s'effectue dans la muqueuse gingivale, à la base des dents en places, plusieurs générations de dents de taille croissante, peuvent s'observer simultanément, prêtes à se redresser en cas de besoin lorsque celles-ci tombent. Les crochets venimeux connaissent une dentition identique, ce qui fait qu'un crochet arraché, accidentellement ou volontairement, est presque aussitôt remplacé et que plusieurs crochets de remplacement sont prêts à se substituer au précédent en cas de nécessité.

La dentition des serpents a longtemps été utilisée pour définir les familles de serpents actuels. Il existe 4 types principaux de maxillaires rencontrés chez les serpents [7] [3].

## **2) L'appareil digestif.**

L'appareil digestif commence à la cavité buccale. Les glandes buccales sont bien développées, elles sécrètent de nombreuses substances qui permettent de faciliter la déglutition et commencer la digestion. Ces glandes sont présentes dans la langue, sous la langue et dans les lèvres. Les glandes labiales, ou parotides, sont particulièrement développées chez certaines espèces et les substances sécrétées contiennent des sucs digestifs puissants. Au cours de l'évolution, les sécrétions salivaires et/ou digestives se sont transformées afin de produire un puissant venin. Chez ces espèces venimeuses, le venin apporte sa contribution à la digestion tout en paralysant la proie.

Le serpent n'utilise pas sa langue au cours de l'ingestion. En revanche elle joue un rôle déterminant dans l'olfaction en association avec l'organe de Jacobson.

La gorge et l'œsophage des serpents sont très musclés et très extensibles ce qui permet de faciliter la progression de la nourriture vers l'estomac, notamment des grosses proies. L'œsophage s'élargit progressivement vers le tiers du corps, jusqu'à l'estomac.

L'estomac est une portion élargie et musculeuse du conduit digestif. De nombreuses enzymes très actives et d'autres sécrétions y attaquent la nourriture.

Le pancréas et la vésicule biliaire sont situés à l'autre extrémité de l'estomac.

Le gros intestin est légèrement enroulé, mais sans circonvolutions multiples présentes chez les herbivores et omnivore, on émet l'hypothèse qu'ils n'en n'ont pas besoin car ils sont exclusivement carnivores voire oophages.

Du fait de la forme étroite du serpent, l'intestin grêle et le gros intestin sont globalement plus courts que chez les autres animaux.

Le gros intestin s'ouvre sur le rectum, ce dernier mène au cloaque, qui mène à l'orifice anal par lequel sont rejetés les restes d'aliments non digérés.

La durée de la digestion dépend de la taille de la proie plus la proie est petite, plus la fréquence des repas augmente [7].

### 3) L'appareil respiratoire.

Mise à part quelques modifications, la respiration des serpents est assez semblable à celle des autres vertébrés aériens. Les échanges respiratoires sont relativement faibles, ce qui s'explique en partie par le métabolisme réduit des serpents.

L'appareil respiratoire est composé de manière générale en trois parties :

- **La trachée**, très musculeuse et fortement renforcée par des cartilages afin de favoriser la déglutition de larges proies sans risque d'asphyxie
- **Le poumon bronchial, alvéolaire** et vascularisé où se déroulent les échanges gazeux
- **La réserve d'air** permettant au serpent de survivre sans respirer pendant plusieurs dizaines de minutes [1].

Chez la grande majorité des serpents, excepté les boas et pythons, le poumon gauche ayant régressé se retrouve très petit, atrophié voire absent. Le poumon droit est en revanche très allongé, il mesure à peu près le quart du corps du serpent et est peu alvéolé. Chez de nombreuses espèces aquatiques, il est très développé, allant jusqu'à prendre presque toute la longueur du corps. Chez ces espèces, l'extrémité postérieure du poumon s'est modifiée formant le « **sac aérien** », ce dernier est peu efficace dans l'extraction de l'oxygène, mais sert de réserve d'air et d'organe de flottabilité.

De nombreux serpents ont développé un **organe supplémentaire** : « **le poumon trachéen** ». (Il s'agit d'une extension du poumon droit). Cet organe est logé près de la trachée-artère, à l'endroit où se prolonge la paroi vasculaire du poumon. Il fournit une capacité respiratoire supplémentaire et joue un rôle important non seulement chez les espèces aquatiques, mais aussi lorsque l'ingestion de nourriture, notamment de grosses proies, empêche la respiration. Lorsque celles-ci descendent le long du corps, certaines parties du poumon sont comprimées et ne peuvent fonctionner normalement ; en augmentant sa longueur, le poumon trachéen permet d'assurer qu'au moins une partie du poumon peut toujours être gonflée.

De même l'orifice de la trachée-artère appelé la « **glotte** », située à l'arrière de la bouche sur un renflement lingual est également modifiée à cet effet. Cet orifice prend la forme d'un tube musculeux qui peut être avancé sur le plancher de la cavité buccale, et maintenu ouvert malgré la pression exercée par la proie [7].

Les besoins énergétiques modestes ainsi que les réserves d'oxygène permettent la résistance prolongée des serpents à l'anoxie. Les Elapidae peuvent suspendre leur respiration pendant une trentaine de minutes et les Viperidae jusqu'à 95 minutes [3].

Les serpents peuvent produire **un sifflement** en expirant rapidement l'air de leur poumon. L'air est expulsé avec force sur une membrane particulière de la glotte, provoquant ainsi une forte vibration. Le son produit peut être très bruyant et saisissant chez les serpents-taureaux américains du genre *Pituophis*, ou chez les serpents à groin, *Heterodon*.

#### **4) L'appareil cardio vasculaire.**

Le cœur des serpents comporte trois cavités et non quatre comme chez les mammifères et les crocodiliens. Il est de forme allongée et se compose de deux oreillettes dissymétriques (l'oreillette droite étant la plus grosse) et d'un seul ventricule (la paroi du côté gauche étant plus épaisse que du côté droit). Une membrane incomplète divise le ventricule permettant ainsi d'éviter que le sang oxygéné issu des poumons ne se mélange avec le sang de retour.

Le cœur des serpents est généralement situé au tiers antérieur du corps pour une répartition équilibrée du sang dans toutes les positions adoptées par l'animal. Cependant la position de l'organe peut varier en fonction du mode de vie du serpent, cela dans le but de compenser les effets de la pesanteur. Par exemple chez les serpents arboricoles, le cœur est très proche de la tête pour favoriser l'irrigation du cerveau au cours de l'ascension. Chez les serpents aquatiques, le cœur est placé au milieu du corps pour réguler la pression hydrostatique [3]. Chez les serpents la position de l'aorte est aussi modifiée, variant selon les familles [7]. La fréquence cardiaque varie selon les températures idéales de chaque espèce approximativement entre 20 à 70 battements par minute.

## **5) L'appareil nerveux.**

Le système nerveux des serpents est assez classique dans son ensemble. Il se compose du cerveau, de la moelle épinière et des nerfs. La moelle épinière court tout au long de l'épine dorsale. En l'absence de membres, le réseau nerveux est simplifié. Parallèlement à cela, on a pu observer chez certaines espèces parmi les plus primitives des réseaux de nerfs qui desserviraient normalement les membres si elles en possédaient, renforçant ainsi l'hypothèse que les ancêtres des serpents avaient des pattes. Les particularités du système nerveux résident aussi et surtout dans la présence exclusive d'organes sensoriels chez les serpents. Le nerf olfactif, par exemple, présente des ramifications (supplémentaires) vers l'organe de Jacobson et vers les fossettes thermosensibles chez les espèces qui en possèdent. On observe également de nombreuses terminaisons nerveuses logées immédiatement sous les fossettes et tubercules des écailles [7].

## **6) L'appareil reproducteur.**

Les testicules et les ovaires sont des organes allongés, pairs et généralement situés l'un derrière l'autre.

Les mâles ont des organes copulateurs pairs et symétriques, les héli pénis, logés au repos dans la base de la queue. Ces héli pénis possèdent un corps caverneux permettant l'érection et à leur surface une ornementation complexe constituée d'épines et de tubérosités, facilitant le maintien de l'organe lors de l'accouplement.

Chez la femelle, il existe des clitoris qui correspondent aux héli pénis. Les ovaires sont alignés dans la cavité abdominale. L'ovulation est généralement saisonnière. Elle est précédée par une longue période de préparation et de constitution des réserves énergétiques et nutritives indispensables au développement embryonnaire : la vitellogénèse. Au cours de cette période, les modifications anatomiques sont relativement importantes. La plupart des espèces sont ovipares mais certaines vipères notamment sont ovovivipares et donnent naissance à des petits dont le développement s'est entièrement déroulé dans les oviductes de la femelle [7].

## **7) L'appareil excréteur.**

Les serpents ne possèdent pas de vessie, ils n'excrètent pas l'urée sous forme d'urine. Dans le but de mieux conserver l'eau, ce qui est essentiel aux espèces vivant en milieu aride, les serpents recyclent presque tous les liquides de leur système et excrètent les déchets azotés sous forme d'acide urique, produit semi-solide contenant le minimum de liquide nécessaire à son transport hors du corps.

L'excrétion des selles et des urines se fait par un conduit commun appelé « le cloaque », résultant de l'anastomose entre l'uretère et les intestins. Il est recouvert d'une écaille individualisée, de part et d'autre de laquelle se trouvent les glandes cloacales, odoriférantes, utilisées en cas de stress pour faire fuir les prédateurs [1] [3].

Les reins sont très allongés et décalés dans la cavité corporelle, de sorte que le rein droit est plus proche de la tête que le rein gauche. Ils sont métanéphritiques, c'est à dire que la filtration urinaire se fait à l'extrémité du néphron, ce qui représente un système précurseur de la filtration glomérulaire des mammifères [7].

## **III L'appareil venimeux.**

L'appareil venimeux est un dispositif complexe. Il associe une glande spécialisée qui synthétise une sécrétion toxique, le venin, avec un dispositif vulnérant, le crochet, qui permet de le faire pénétrer dans l'organisme de la proie ou de l'agresseur. On considère comme venimeux tous serpents possédant une glande buccale à sécrétion toxique, quel que soit le type de maxillaire.

Le perfectionnement de l'appareil inoculateur et de la glande à venin qui lui est reliée va faire la différence entre une espèce inoffensive, potentiellement à risque ou dangereuse pour l'homme. Appartenant au clade des Toxicofera, les serpents présentent tous, ou presque tous, des glandes labiales à sécrétion toxique, plus ou moins venimeuses. Et donc un risque potentiel à ne pas négliger chez certaines espèces.

La fonction venimeuse est particulièrement élaborée chez les serpents. Elle résulte d'une coévolution des os de la cavité buccale, notamment le maxillaire, et des glandes salivaires qui se sont différenciées il y a plusieurs dizaines de millions d'années [3].

### **A) Les quatre principaux types de maxillaires.**

Au cours de l'évolution, les dents des serpents se sont progressivement désolidarisées de la mâchoire pour devenir des appendices implantés dans les alvéoles osseuses. La dentition des serpents sert davantage à la préhension des proies qu'à les déchirer, démembrer, ou broyer.

La spécialisation des dents serait relativement ancienne et en voie de disparition dans certains groupes, l'évolution tendant, pour certains auteurs, à supprimer la fonction venimeuse. En effet on observe le retour de la denture aglyphe chez certaines formes plus évoluées que les Viperidae et Elapidae [1, 3]. Au cours de l'évolution, l'apparition d'un sillon ou d'un canal creusé le long d'une ou plusieurs dents va faciliter la pénétration de la salive, ou venin, dans les tissus de la proie. Ce sillon, selon les espèces, persistera sous la forme d'une gouttière (crochets cannelés) ou se fermera complètement pour former un conduit isolé (crochets canaliculés), permettant l'inoculation du venin sous pression.

Le maxillaire va se raccourcir, le crochet va progressivement s'individualiser et se séparer des autres dents du maxillaire. Cette séparation plus ou moins marquée entre les crochets et les dents pleines du maxillaire s'appelle le diastème. Le nombre total de dents se réduit, pour à son terme, ne laisser subsister que le seul crochet.

Outre la laxité ligamentaire permettant une large ouverture de la gueule, le développement du maxillaire et de la musculature a conduit, chez les espèces venimeuses, à la mise en place d'un mécanisme sophistiqué d'injection du venin.

Les études de biochimie et de biologies moléculaire, confirme l'hypothèse selon laquelle l'appareil venimeux des principales familles de serpents venimeux a connu une évolution séparée :

- La voie protérodonte avec les Elapidae.
- La voie opistodonte avec les Colubridae, Atractaspidinae et Viperidae [3].

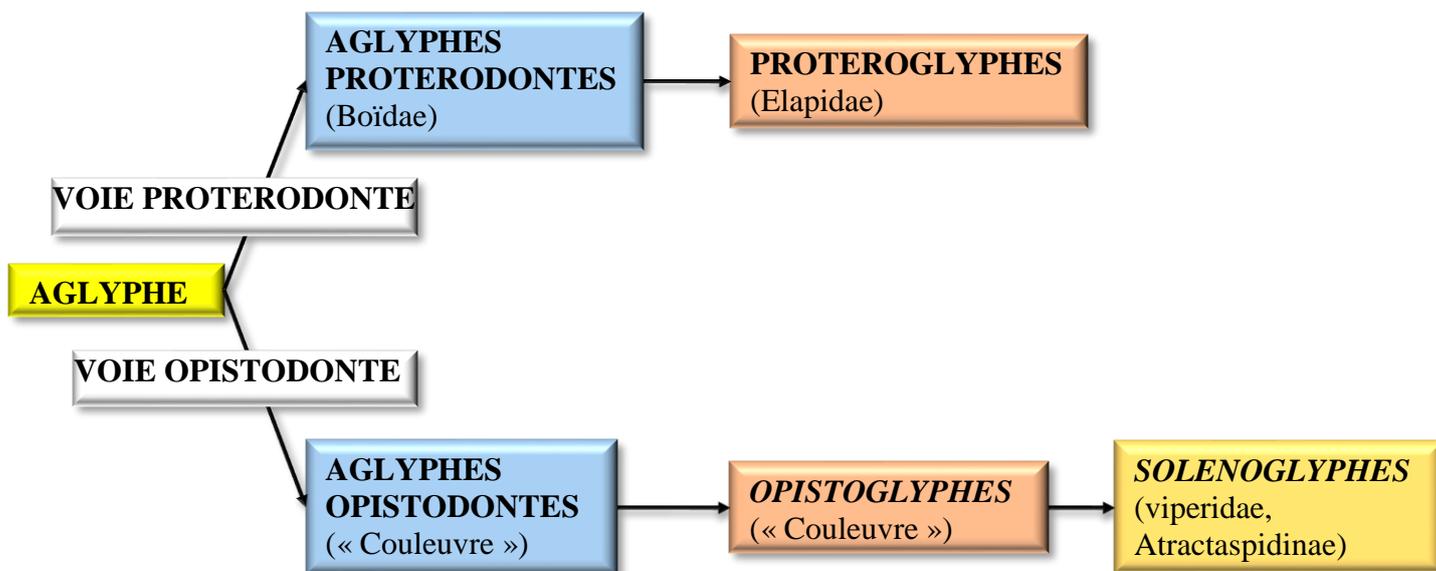


Figure 23: Evolution de l'appareil venimeux

Les études de biologie moléculaire confirment l'hypothèse selon laquelle les Viperidae et les Elapidae proviendraient de deux lignées évolutives séparées. Différents arguments conduisent à associer l'appareil venimeux des Colubridae aux Viperidae qui pourraient dériver d'un ancêtre commun.

L'appareil venimeux en position avancée est apparu 3 fois indépendamment au sein des Caenophidia. Ainsi l'appareil venimeux des Viperidae, Elapidae et Atractaspidinae sont structurellement et fonctionnellement très différents [1]. Sur le plan strictement anatomique il est utile de décrire les quatre principaux types de maxillaires.

## 1) Les maxillaires Aglyphes (Boas, Pythons, Colubridae, Lamprophiidae et les Homamopsidae).

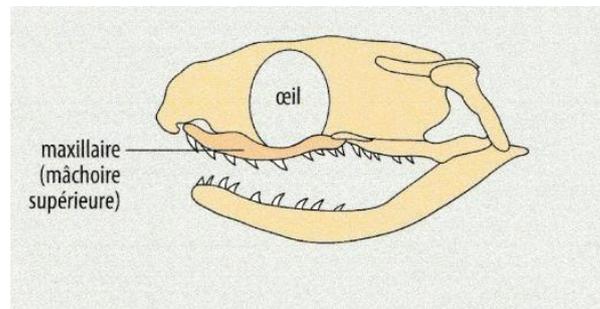


Figure 24: *Maxillaire Aglyphe (sans crochet venimeux)* [371].

La grande majorité des espèces ophidiennes présente un maxillaire de type aglyphe. Généralement long, le maxillaire aglyphe ne présente aucun crochet venimeux. Toutes les dents sont pleines et sans sillon inoculateur de venin.

Le terme aglyphe rassemble une très grande diversité de structure. De manière générale, le maxillaire aglyphe peut être homodonte (isomorphe), dans ce cas toutes les dents sont de tailles similaires. Ou bien hétérodonte, les dents sont alors de taille décroissante ou de taille croissante de l'avant vers l'arrière, ou être élargies dans la partie médiane du maxillaire [1].

Chez les espèces aglyphes hétérodontes, la dentition peut être de 2 types :

- **Aglyphes opistodontes**, (Colubridae ex. : *Heterodon nasicus*), les dents sont plus grandes et plus robustes à l'arrière du maxillaire qu'à l'avant. Ce qui va aider la pénétration du venin même s'il n'y a pas de sillon inoculateur. Le venin se mélange à la salive du serpent. Il faut qu'il y ait plaie ou mastication pour que le venin pénètre. Les dents postérieures commencent à se séparer des autres par un espace appelé « diastème ». Ce sont les précurseurs des appareils venimeux opistoglyphes et solénoglyphes.
- **Aglyphes protérodontes**, (boas et pythons et quelques colubrida) les dents sont de tailles plus imposantes à l'avant du maxillaire qu'à l'arrière. Ce sont les précurseurs de l'appareil venimeux protéroglyphe [3] [1].

## 2) Les maxillaires Opistoglyphes (Colubridae, Lamprophiidae et Homamopsidae (Malpolon)).

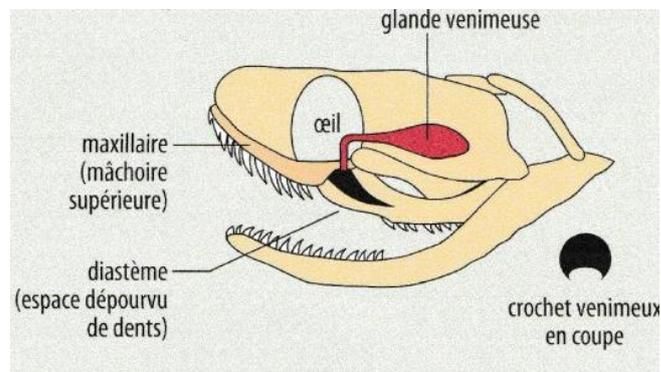


Figure 25: *Maxillaire Opistoglyphe* (un ou plusieurs crochets venimeux à l'arrière de la mâchoire et orientés vers l'arrière) [371].

Les maxillaires opistoglyphes sont portés par les « couleuvres » dites venimeuses potentiellement dangereuses pour l'homme. Exemple : la couleuvre de Montpellier, *Malpolon monspessulanus*.

Les serpents de type opistoglyphe présentent un maxillaire généralement long, légèrement raccourci par rapport au maxillaire aglyphe opistodonte. Les crochets sont en position « postérieure », situés à l'arrière du maxillaire au niveau de l'œil ou après celui-ci. Ils sont élargis et cannelés, c'est-à-dire qu'ils sont creusés d'un sillon permettant au venin de s'écouler, l'ouverture du sillon étant généralement très large. Ils sont séparés des autres dents par un diastème.

Les maxillaires aglyphes et opistoglyphes, ne présentent pas un grand intérêt descriptif appliqué à l'évolution, dans la mesure où ces deux types de maxillaires apparaissent simultanément dans chacune des familles regroupées autrefois sous le nom de « couleuvres », chaque genre comprenant à la fois des espèces aglyphes et opistoglyphes.

De plus, les termes « aglyphe » et « opistoglyphe » sont restrictifs. Il existe en réalité une très grande intensité et variabilité de structure, dont l'étendue commence à peine à être connue. On sait aujourd'hui que, les dents du maxillaire peuvent présenter des crêtes et des sillons sur toutes leurs faces (antérieure, postérieure, labiale, linguale), indépendamment de leur taille et de leur position relative. Des dents élargies peuvent aussi être présentes sur le dentaire, le ptérygoïde et le palatin [1].

### 3) Les maxillaires Protéroglyphes (Elapidae).

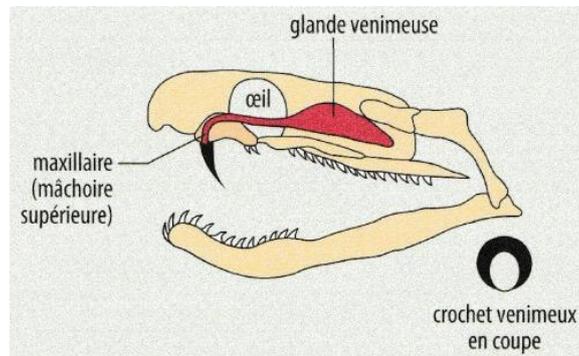


Figure 26: *Maxillaire Protéroglyphe* (crochet venimeux situés à l'avant de la mâchoire et fixes) [371].

Représentés par la famille des Elapidae. Les maxillaires protéroglyphe sont courts et fixes. Les crochets venimeux, de taille réduite (5 à 8mm) sont situés à l'avant du maxillaire. Ils sont séparés des autres dents par un diastème de taille variable [1]. Les crochets sont canaliculés. Le canal creusé est excentré, pratiquement, ou totalement clos sur toute la longueur du crochet, ce qui permet au contenu de la glande à venin qui lui est reliée d'être injecté sous pression lors de la morsure.

Chez les *Dendroaspis* comme chez certains Elapidae australiens, le maxillaire est resté relativement long et a acquis une certaine mobilité qui lui permet un mouvement de bascule autour de l'os ptérygoïde [3].

#### 4) Les maxillaires Solénoglyphes (Viperidae et Atractaspidae).

##### a) Maxillaire des Viperidae.

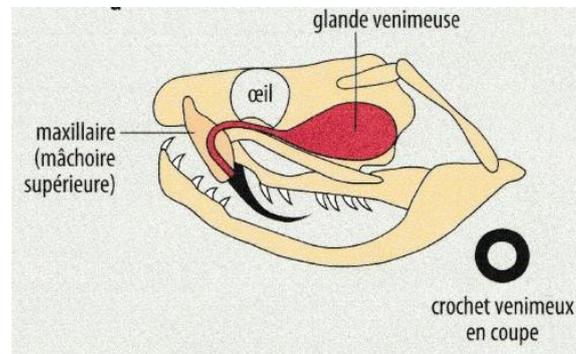


Figure 27: *Maxillaire Solénoglyphe* (crochets venimeux situés à l'avant de la mâchoire et mobiles) [371].

Le maxillaire, considérablement raccourci, est situé à l'avant de la mâchoire. Il ne porte plus que le seul crochet venimeux. Ce dernier est canaliculé, le canal creusé est central, parfaitement clos sur toute sa longueur.

Très long, le crochet peut atteindre une taille impressionnante (jusqu'à 5 cm), favorisant ainsi la pénétration du venin en profondeur [3]. En conséquence, il est devenu mobile autour de l'articulation préfrontale. Le maxillaire pivote autour de l'ectoptérygoïde animé par le ptérygoïde. Au repos, les crochets venimeux sont couchés dans la cavité buccale. Ils sont recouverts d'une gaine charnue et muqueuse et épousent parfaitement la forme du palais. Au moment de l'attaque le serpent frappe sa proie en projetant ses crochets protractiles vers l'avant [1].

##### b) Maxillaire des Atractaspidae.

L'appareil venimeux de type solénoglyphe des *Atractaspis* ressemble à celui des *Viperidae*. Toutefois, il s'en distingue probablement en raison des mœurs terricoles de ces serpents. Particulièrement long, le maxillaire peut s'extérioriser le long de la commissure des lèvres. Lors d'un mouvement latéral de la tête le serpent va « piquer » vers l'arrière sa proie. Les *Atractaspis* injectent leur venin la gueule fermée grâce à deux crochets canaliculés et horizontaux, capable de pivoter latéralement. Un seul crochet dépasse à la fois lors de l'attaque [14].

## **B) Les glandes venimeuses.**

Les serpents présentent une grande variété de glandes dans, et autour de la cavité buccale. Certaines sont dans la langue, le long des lèvres supérieures et inférieures, près de la cavité nasale ou près de l'œil [21].

Le venin des serpents est produit par une glande spécialisée homologue de la parotide, située le long de la mâchoire supérieure en arrière de l'œil et reliée par un canal excréteur à la base du crochet venimeux [1]. Le développement des glandes spécialisées est concomitant à l'évolution du venin lui-même. Les venins proviendraient d'une spécialisation des sécrétions salivaires, digestives et peut-être pancréatiques, assurant à l'origine la digestion des tissus.

La fonction venimeuse est apparue relativement tard et progressivement. Il faut probablement chercher l'origine des glandes à venin dans une évolution particulière des glandes labiales salivaires.

Le rôle de la salive est double. Elle lubrifie la cavité buccale et les aliments facilitant ainsi la déglutition et elle commence le processus de digestion. La salive devenue venin, aurait développé la capacité de tuer et d'immobiliser la proie à l'aide de toxines spécialisées pour faciliter la contention et l'ingestion rendues difficiles par l'absence de membres. Le venin est une arme défensive particulièrement redoutable bien que ce rôle soit accessoire.

Les premières substances actives ont sans doute été des enzymes dont le but essentiel était de digérer la proie.

L'évolution des **glandes labiales** sur les lèvres supérieures en direction de glandes plus complexes sécrétant des enzymes se serait faite en même temps que la modification des os du crâne, de la musculature et de la dentition. La différenciation des glandes labiales a probablement précédé la spécialisation des dents.

L'ensemble de ces structures histologiques pourrait également provenir de l'évolution d'une autre glande exocrine, comme le pancréas. Ainsi, de nombreuses enzymes pancréatiques (amylases, phospholipases, protéases) ont leur correspondant dans les glandes salivaires ou dans les glandes à venin. Le degré d'homologie est variable, mais il peut atteindre, pour certaines enzymes, 90%. Il semble que quelques-unes aient secondairement évolué pour se transformer en toxines [3].

Le développement des toxines à partir des enzymes pancréatiques permet également d'expliquer la présence d'inhibiteurs enzymatiques dans le sang, qui protègent le serpent contre son propre venin lorsque celui-ci s'échappe de la glande venimeuse et pénètre dans la circulation sanguine. Ces protéines trouvées dans le sérum des serpents et chargé de neutraliser le venin sont généralement des albumines ou des  $\alpha$ -globulines de haut poids moléculaire. On peut donc imaginer que chez les serpents, il y aurait un processus de coévolution concernant, d'une part, les toxines dérivant des enzymes digestives et d'autre part, des antitoxines provenant des inhibiteurs d'enzymes [3].

### **1) La glande de Duvernoy (Colubridae et Psammophiinae).**

L'ensemble des serpents désigné autrefois sous le nom de « couleuvres », présente une vaste variété de genres et d'espèces diverses, certains d'entre eux sont venimeux jusqu'à un certain point. Le venin est produit dans la glande de Duvernoy, qui est une glande salivaire modifiée, différente des glandes à venin des Viperidae et Elapidae [3] [1] [21].

#### **a) Origine et diversité.**

C'est une glande homologue des glandes venimeuse. L'apparition de la glande de Duvernoy est très ancienne et est partagée par d'autres groupes que les serpents, notamment chez certains lézards. Certains auteurs ne la considèrent pas comme une glande venimeuse « typique » dans la mesure où son rôle n'est pas univoque ni constant. En effet la glande de Duvernoy produit un liquide entre salive (sécrétions muqueuses) et venin (sécrétions séreuses), dont le but peut tout aussi bien se limiter à la lubrification des proies, qu'à leur digestion, immobilisation ou mise à mort rapide.

La glande de Duvernoy présente une très grande variabilité. Elle varie en taille, en volume, en structure anatomique et histologique selon les espèces et les genres ce qui confirme la grande hétérogénéité des couleuvres. De nombreux intermédiaires existent :

- Absence de la glande de Duvernoy.
- Présence d'une glande de Duvernoy mixte (mi muqueuse/mi séreuse).
- Présence d'une glande de Duvernoy bien différenciée et purement séreuse.

La glande pouvant contenir un taux variable de cellules muqueuses, en particulier au niveau du canal collecteur.

La présence de dents sillonnées spécialisées n'est pas nécessaire à l'injection dans la proie des sécrétions de la glande de Duvernoy. Certaines espèces de Colubridae aglyphes peuvent présenter des sécrétions venimeuses hautement toxiques élaborées par leurs glandes de Duvernoy. Paradoxalement, il existe des serpents qui présentent des dents différenciées mais qui sont dépourvus de glandes de Duvernoy. La glande de Duvernoy est souvent liée au type de dentition opisthogyphes même si elle peut apparaître indépendamment chez des espèces à denture aglyphe opisthodonte ou non spécialisée [3] [1] [21].

#### **b) Exemple d'espèces dangereuses.**

La plus imposante, et probablement la plus efficace des glandes de Duvernoy, est rencontrée chez le boomslang, *Dispholidus typus* et chez le serpent liane du genre *Thelotornis*, 2 espèces de Colubridae opisthogyphes. Ce dernier possède également d'imposants crochets postérieurs munis d'un profond sillon. Le venin de ces deux espèces est particulièrement toxique, immobilisant rapidement la proie, ce qui facilite la contention.

Toutefois, chez la majorité des couleuvres, le venin agit très lentement et tue la proie en 24 à 48 heures comme c'est le cas chez *Malpolon*, la couleuvre de Montpellier. Il est également possible que ce soit simplement la quantité de venin inoculée qui entraîne de telles différences.

### c) Structure.

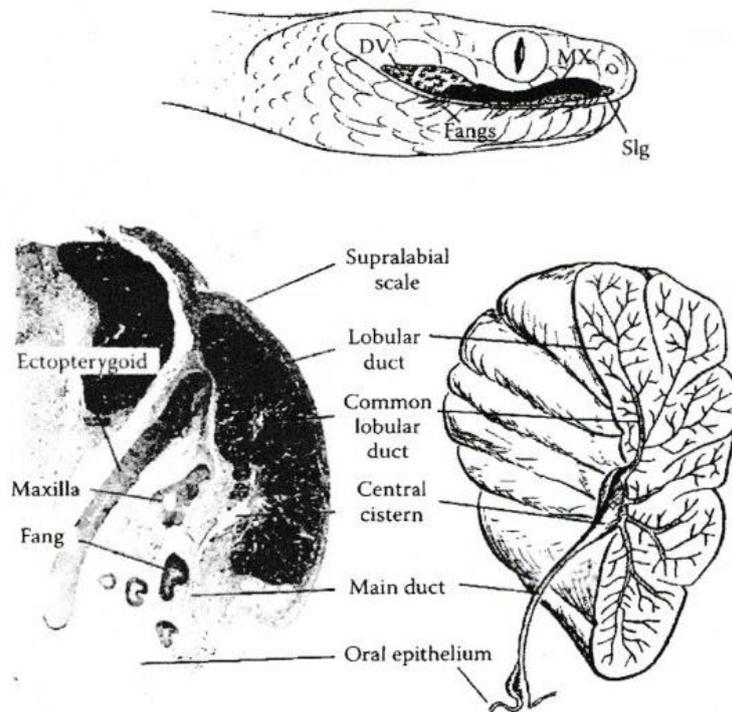


Figure 28: Glande de Duvernoy [20].

La glande de Duvernoy est emballée dans une capsule de tissus conjonctifs. Elle présente une structure tubulaire complexe très dense. Les cellules séreuses sont disposées en travées tubulo-acineuse autour d'une lumière centrale très réduite, ce qui restreint la capacité de stockage du venin. Les sécrétions toxiques sont stockées dans les granules de sécrétions à l'intérieur des cellules séreuses.

La glande de Duvernoy déverse le contenu de ses granules de sécrétion dans un réseau de canaux excréteurs, qui se rejoignent dans un canal efférent. Ce dernier s'ouvre à la base des crochets, dans le prolongement du sillon (chez un serpent opistoglyphe). Les sécrétions muqueuses constituées de mucopolysaccharides apparaissent au niveau des cellules épithéliales qui tapissent les canaux excréteurs.

Le système d'injection du venin est peu efficace, aucun muscle n'est directement associé à la glande. L'inoculation du venin, se fait par gravité ou capillarité, elle est souvent favorisée par le mâchouillement lors de la contention et de la déglutition de la proie [1].

#### **d) Composition du venin.**

Les activités enzymatiques des sécrétions de la glande de Duvernoy sont multiples. On y trouve des protéases, cholinestérases, phosphatases, hyaluronidases, collagénases, phospholipases et divers enzymes agissant sur la coagulation sanguine.

#### **2) La glande à venin dite « vraie ».**

Chez les Elapidae, Viperidae et Atractaspidinae les sécrétions digestives ont évolué pour produire un puissant venin [3] [7]. La glande venimeuse s'est différenciée et spécialisée à partir d'une glande labiale supérieure. Entourée d'une gaine fibreuse, cette dernière a migré en arrière de l'œil, en région temporale, où elle apparaît piriforme, nettement saillante et visible de chaque côté de la tête. Chez les Elapidae et Viperidae, la glande est composée de deux parties, la glande principale (séreuse) qui synthétise et stocke le venin et la glande secondaire ou accessoire (muqueuse) qui active le venin lors de son passage au moment de l'inoculation [22]. La glande séreuse comporte une grande diversité cellulaire permettant la synthèse des composants du venin. Il a été montré chez la vipère *Echis pyramidum* que chacune des cellules présentes dans la portion centrale de la glande est apte à synthétiser l'ensemble des constituants du venin. Ces derniers sont fabriqués successivement et/ ou à des vitesses différentes, pouvant expliquer la variation de toxicité du venin au cours du cycle sécrétoire.

La neutralisation de la toxicité du venin au cours de son stockage est assurée par la régulation du pH, la chélation de métaux cofacteurs des enzymes du venin, et des inhibiteurs endogènes qui contrôlent l'activité enzymatique du venin et protègent l'épithélium glandulaire ainsi que les différentes protéines qui le composent [21] [22] [23].

Le stockage du venin dans la lumière de la glande principale peut durer longtemps, notamment en cas de jeûne, mais le venin est immédiatement prêt à l'emploi en fin d'hibernation [22]. Après utilisation le venin est rapidement régénéré en une quinzaine de jours.

L'expulsion du venin se fait sous pression par la contraction de muscles propres à la glande, nommés « masséters », constitués de muscles mandibulaires et temporaux. Ce muscle entoure la glande à venin, en la comprimant il va pousser le venin sous pression le long du crochet [7]. On sait aujourd'hui, que la morphologie des muscles compresseurs de la glande séreuse permet au serpent de contrôler le volume de venin inoculé lors d'une morsure [24] [1].

### a) Description de la glande à venin des Elapidae.

La glande venimeuse principale est une glande lobulée composée de cellules séreuses disposées en acini autour d'une lumière centrale relativement réduite, (ne permettant pas le stockage d'une très grande quantité de venin).

Il y a de nombreux granules de sécrétions : Les sécrétions sont stockées dans des granules cytoplasmiques au sein des cellules sécrétrices séreuses, avant de gagner la lumière de la glande dont le volume va s'accroître. En cela, la structure histologique des cellules sécrétrices se rapproche de celle de la glande de Duvernoy.

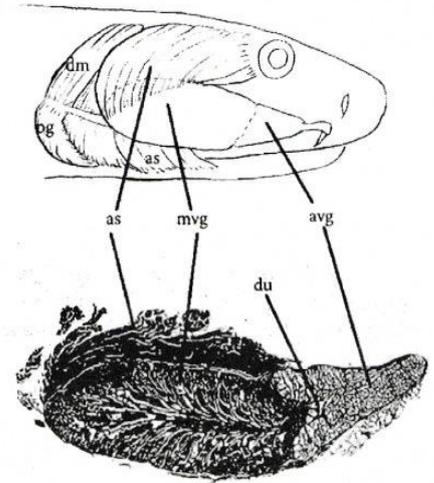


Figure 29: Glande à venin des Elapidae [20].

La glande muqueuse accessoire est attachée à la portion proximale de la glande principale. Elle est allongée, disposée le long du conduit efférent et se déversent dans le canal excréteur. Ce dernier s'ouvre à la base du crochet.

Le venin d'Elapidae est riche en toxines agissant sur des récepteurs cellulaires spécifiques et contient un nombre relativement restreint d'enzymes. En outre, quelques-unes d'entre elles, comme certaines phospholipases, présentent une activité de type toxinique, en même temps que leur propre activité enzymatique. Le venin est **neurotoxique** [1] [3].

### **b) Description de la glande à venin des Viperidae.**

Chez les Viperidae, la glande principale s'est séparée de la glande accessoire muqueuse, la glande accessoire globuleuse se situant au bout du canal excréteur, juste avant son ouverture à la base du crochet venimeux [22]. La glande principale possède une large lumière centrale. Elle est divisée en lobes, chaque lobe permettant le stockage d'une grande quantité de venin. Il y a peu de granules de sécrétions au sein des cellules sécrétrices séreuses, ce qui la différencie encore des Elapidae.

La composition du venin des Viperidae est complexe et principalement constituée d'enzymes nombreuses et variées. Le venin est **hémotoxique** et **nécrosant** [3].

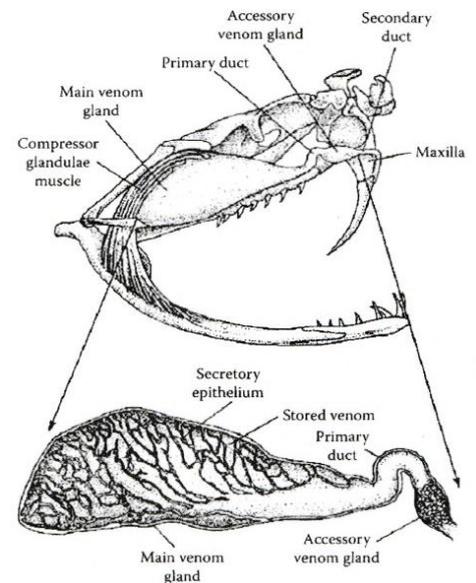


Figure 30: Glande à venin des Viperidae [20].

### **c) Description de la glande à venin des Atractaspidinae.**

La glande à venin des Atractaspidinae, est très particulière et différente de celle des Elapidae et des Viperidae. Extrêmement longue, elle se prolonge le long du cou et du thorax sur un tiers du corps pouvant mesurer jusqu'à 30 cm chez un individu d'un mètre de long.

Les tubules sécrétoires sont disposés autour d'une lumière centrale étroite et allongée, relativement large. Les glandes muqueuses accessoires sont absentes, mais chaque tubule sécréteur contient des cellules muqueuses, positionnées le long de la lumière centrale.

Cette structure, proche de celle des glandes de Duvernoy, conforte l'appartenance des Atractaspidinae aux Lamprophiidae [1].

Le venin contient des enzymes et un type particulier de toxines : les sarafotoxines [3].

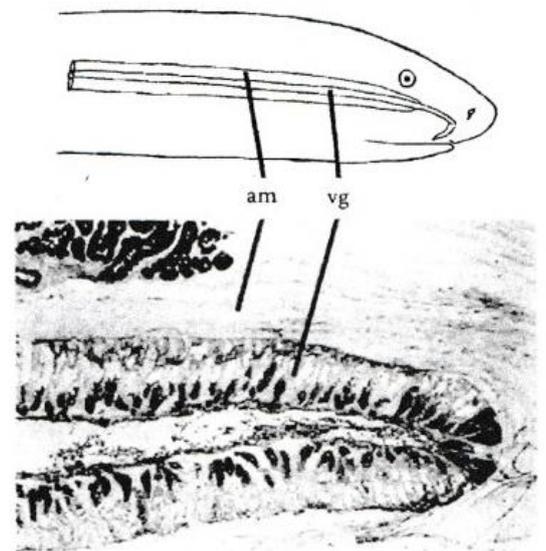


Figure 31: Glande à venin des Atractaspidinae [20].

d) Schéma des différentes glandes à venin.

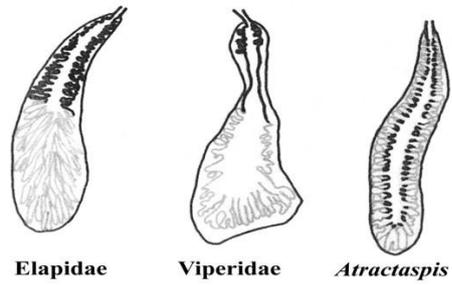


Figure 32 : Les différentes glandes à venin.

Dans la partie suivante nous traiterons surtout du venin de ces trois familles de serpents venimeux.

## **PARTIE 2 - LE VENIN**

Les venins de serpents se sont développés au cours des millions d'années pour cibler les processus physiologiques essentiels et vitaux de leurs proies avec une grande spécificité et une grande puissance. Pour le serpent, il s'agit d'abord d'un moyen d'immobilisation par paralysie ou mort de la proie puis d'un mécanisme de digestion par la destruction de ses tissus. Cela explique les principales propriétés biochimiques des venins. Accessoirement, le venin peut aussi servir à se défendre. Contrairement aux idées reçues, les serpents ne mordent les hommes que s'ils se sentent menacés ou acculés, et contraints de se protéger. Et même dans ce cas ils n'injectent pas toujours leur venin. La fonction venimeuse a de tout temps fasciné l'homme. Elle suscite à la fois crainte et intérêt à l'égard des serpents. C'est en observant les effets et réactions produits lors d'une morsure de serpent que l'homme eut l'idée d'étudier les composants du venin afin de mieux comprendre ses mécanismes. Les morsures des serpents peuvent être mortelles, mais les composants du venin possèdent également une valeur médicale et biotechnologique, ce qui constitue une source inépuisable d'exploration appliquée à la recherche fondamentale, clinique, diagnostic, découverte et mise au point de nouveaux médicaments [25] [2].

### **I Synthèse naturelle du venin de serpent par la glande à venin.**

La production du venin à partir de la glande à venin connaît un début de fabrication rapide. Le maximum de production est atteint en une semaine. Lorsque la glande commence à saturer, la synthèse ralentit pour atteindre une phase de plateau obtenue en deux à trois semaines. Chaque cellule sécrétrice produit l'ensemble des constituants du venin. Cependant ces derniers sont fabriqués à des moments différents du cycle sécrétoire. C'est la réabsorption d'eau qui permet de stabiliser la concentration protéique après une période de forte régénération des constituants du venin. Ainsi lorsque la lumière centrale de la glande jouant le rôle de réservoir, se retrouve pleine, la synthèse du venin s'arrête. Les glandes droite et gauche d'un même serpent synthétisent des venins strictement identiques d'un point de vue chimique [3].

## **II Composition chimique du venin.**

Connaitre la composition des venins est une étape essentielle pour parvenir à un médicament. La caractérisation des composants des venins de serpents permet l'étude des processus physiopathologiques d'envenimation et une meilleure compréhension de leurs effets biologiques. Les venins de serpents sont des fluides biologiques d'une très grande complexité moléculaire, affectant l'organisme envenimé de façon très variée. Ce ne sont pas des substances chimiquement homogènes, mais des mélanges de diverses substances exerçant dans leur ensemble des effets toxiques.

Le venin « frais » de serpent se présente sous la forme d'un liquide incolore ou jaunâtre, plus ou moins visqueux. Afin d'empêcher sa perte d'activité relativement rapide, il est possible de lui retirer les 50 à 90% d'eau qu'il contient par dessiccation sous vide ou lyophilisation. Il reste alors une poudre amorphe et stable qui, stockée au frais et à l'abri de la lumière, peut se conserver pendant des années sans perte notable d'activité.

Le venin desséché ou « résidu sec » se compose de plusieurs centaines de molécules. La grande majorité sont des peptides et protéines qui peuvent représenter jusqu'à 90% de la masse sèche du venin. Les 10% restant présentent une certaine importance pour la stabilité des composants protéiques. Ces derniers sont constitués d'hydrates de carbone (sucres), sels, lipides, acides aminés, petits peptides, amines biogènes (histamine, sérotonine, acétylcholine), nucléotides, nucléosides, voir des acides nucléiques (ARNm, ADN génomique) ainsi que des composants inorganiques (calcium, zinc, aluminium...).

Grâce aux avancées technologiques, l'analyse précise de ce mélange d'une extraordinaire biodiversité a pu être réalisée. Parmi tous les composants biologiques du venin, ce sont les peptides et protéines, majoritaires, qui présentent un plus grand intérêt pour la recherche. Ils ont donc été les plus étudiés d'un point de vue à la fois structural et fonctionnel [3] [18] [26].

On peut distinguer 2 ensembles :

- **Les enzymes** (surtout des protéines), dont la toxicité aiguë est généralement faible.
- **Les toxines** (généralement des peptides), dont le rôle pharmacologique est le mieux connu. Responsables de l'essentiel de la toxicité des venins, notamment chez Atractaspidinae et Elapidae.

Ces deux ensembles reconnaissent et interagissent avec une grande variété de protéines-cibles chez les proies récepteurs, canaux ionique, enzymes, facteurs sanguins, mais également les composés des membranes cellulaires, affectant selon les espèces, le système nerveux central ou périphérique, la cascade de coagulation sanguine, les systèmes cardiovasculaire et neuromusculaire, l'intégrité cellulaire des tissus ou encore l'homéostasie générale de la proie.

### **A) Structure générale.**

Au cours des vingt dernières années, la structure tridimensionnelle de nombreuses molécules des venins a été établie par cristallographie, diffraction des rayons X ou par résonance magnétique nucléaire (RMN). Il ressort de ces travaux d'analyse structurale, qu'un nombre relativement restreint de structures sont « utilisées » pour exprimer la toxicité des venins. Ainsi 22 architectures différentes sont actuellement identifiées dans les venins de serpents. Les protéines (enzymes) et surtout les peptides (toxines) sont particulièrement riches en pont disulfures. Ces ponts disulfures participent à la stabilisation structurale, ils sont composés de deux cystéines oxydées, structurellement proches formant ainsi des verrous moléculaires. Une fois réticulés, ces composés sont donc particulièrement résistants aux dégradations lors de leur stockage dans la lumière des glandes à venin et dans l'organisme des proies une fois injecté.

Au regard de la grande richesse moléculaire des venins, il a été démontré que plusieurs isoformes d'une même protéine ou peptide présentant une activité biologique identique peuvent coexister au sein d'un même venin. Il s'agit de formes moléculaires présentant de subtiles différences dans leurs séquences en acides aminés (structure primaire), le plus souvent réparties à la périphérie d'un cœur « fonctionnel » très conservé voir invariant. Avec l'élargissement des moyens d'investigations, il ressort que certaines de ces variations fines de structures permettent d'assurer un effet toxique vis-à-vis de cibles qui elles aussi sont susceptibles de varier d'une proie à l'autre : il s'agit du processus de coévolution ligand-cible. Ce processus peut être divergent ou convergent [18].

### Processus d'évolution divergent :

Une même architecture structurale peut être utilisée afin d'exercer des activités biologiques totalement différentes. C'est en particulier le cas des toxines dites à « trois doigts » et des phospholipases de type A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>).

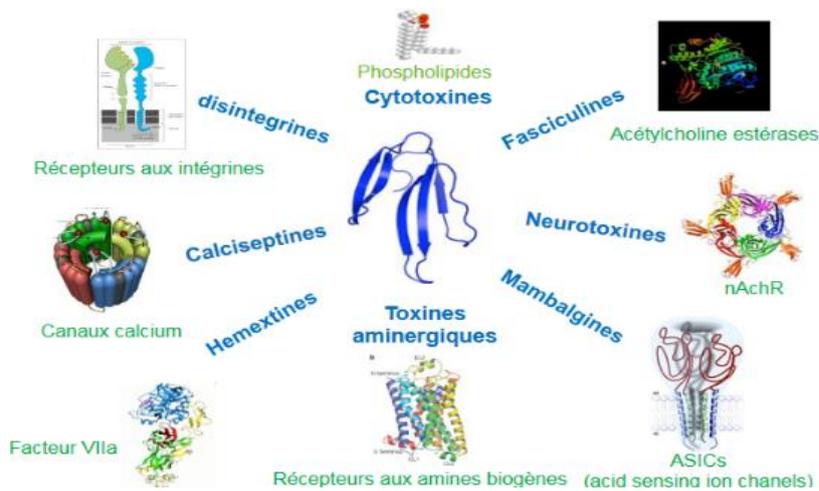


Figure 33: Schématisation du processus d'évolution divergent.

### Processus d'évolution convergent :

A l'opposé, il a été démontré que différentes structures moléculaires caractéristiques de toxines animales présentes dans différents phylums, sont susceptibles de porter une même activité biologique.

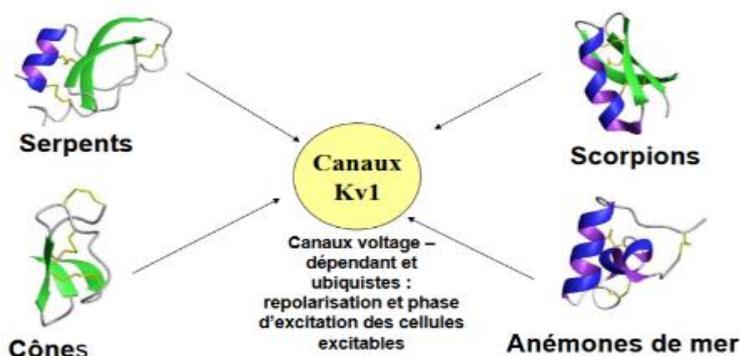


Figure 34: Schématisation du processus d'évolution convergent.

Ces différentes observations soulignent la très grande stabilité des architectures tridimensionnelles des composés des venins ainsi que de leur polyvalence et adaptabilité fonctionnelles [18].

## **B) Les enzymes.**

Les enzymes sont des protéines ubiquitaires de poids moléculaire élevé généralement plus important que les toxines. A la différence des toxines ce sont des catalyseurs biologiques qui favorisent la transformation d'une molécule sans prendre part directement à la réaction chimique et où elles ne sont pas modifiées. Elles abaissent l'énergie d'activation d'une réaction chimique, ce qui permet d'accélérer la vitesse de réaction. Les enzymes sont spécifiques de leur substrat, elles le transforment en un composé appelé « produit » [3]. Il s'agit d'un processus très efficace de dégradation, synthèse ou modification de structures chimiques définies [18]. Le mode d'action d'une enzyme est très différent de celui d'une toxine.

Les enzymes sont non-immunogènes. La toxicité est due au produit de dégradation de la réaction qu'elles catalysent. Il s'agit d'une réaction physiologique de l'organisme envenimé, celui-ci va reconnaître le produit de dégradation, il n'y aura pas de synthèse d'anticorps spécifique et donc aucune réaction immunitaire à son encontre.

Les effets toxicologiques et pharmacologiques ne dépendent pas de la quantité initiale d'enzyme inoculée mais plutôt du temps de la réaction enzymatique. En effet, tant qu'elles sont présentes au sein de l'organisme les enzymes peuvent catalyser de nouvelles réactions. Ainsi plus la vitesse de réaction enzymatique est rapide, plus elles auront le temps d'en catalyser avant leur élimination de l'organisme (au bout d'environ 3 jours). Chaque enzyme peut transformer autant de molécules de substrat qu'elle en rencontre, sa seule limite est la quantité de substrat disponible dans l'organisme envenimé [3]. Ceci explique, d'ailleurs, que certaines manifestations générales des venins de Viperidae peuvent apparaître tardivement, voire des jours après la morsure. Quant aux phénomènes locaux, douleurs ou œdèmes sont immédiats [2]. Les venins renferment de nombreuses enzymes caractérisées par des structures, des activités biologiques et des toxicités différentes. Ainsi les enzymes peuvent être dépourvues de toxicité ou induire des troubles cliniques mineurs, sévères voire létaux [18]. Les enzymes les plus toxiques vont agir sur l'hémostase ou l'activation du complément, elles peuvent provoquer une cytolysse, accélérer le métabolisme particulier des phospholipides, glucides, etc. [3].

## 1) Phospholipases A2.

Les phospholipases sont présentes dans la plupart des venins de serpents. Ce sont des enzymes lipolytiques qui hydrolysent, le plus souvent en présence de calcium, les glycérophospholipides (libres ou membranaires) en acides gras et lysophospholipides [3] [1].

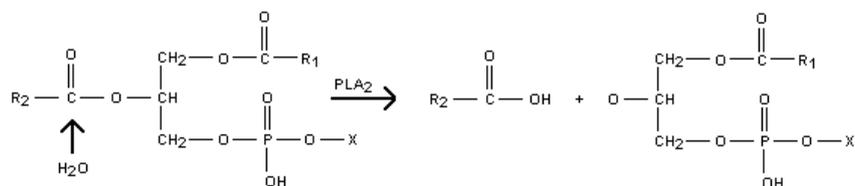


Figure 35: Schéma de la réaction phospholipasique.

Les lysophospholipides produits lors de l'hydrolyse sont tensioactifs et responsables de destruction cellulaire, comme l'hémolyse. Ce qui a pour conséquence une réaction inflammatoire et douloureuse. On distingue plusieurs types de phospholipases (PLA<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, C ou D) en fonction du site d'hydrolyse de la molécule.

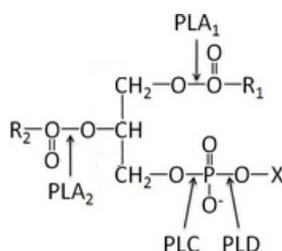


Figure 36: Types de phospholipase en fonction de leur site d'hydrolyse.

Les phospholipases de type A<sub>2</sub> ou « PLA<sub>2</sub> » qui hydrolysent les phospholipides membranaires en position sn-2 sont très largement majoritaires au sein des venins de serpent. Cette réaction génère un acide gras libre et un lysophospholipide. Il existe une très grande variété d'isoformes de cette enzyme qui peuvent coexister au sein d'un même venin. Les PLA<sub>2</sub> ophidiennes ont évolué à partir d'une PLA<sub>2</sub> ancestrale commune dotée d'une fonction digestive. En plus de leur possible rôle dans la digestion des proies, les PLA<sub>2</sub> présentent une grande variété d'effets toxiques et pathologiques [18] [3].

### a) Structure.

Les PLA<sub>2</sub> possèdent une structure compacte avec de nombreux ponts disulfures qui leur confère une grande stabilité et rigidité structurale. Elles existent sous la forme de monomère, hétérodimère ou oligomère dont au moins une sous-unité enzymatiquement active. Généralement un monomère de PLA<sub>2</sub> est composé d'environ 120 à 140 acides aminés stabilisés par 5 à 8 ponts disulfures, le poids moléculaire est en moyenne d'environ 14 à 19 kDa. Le monomère de base a en réalité un poids moléculaire voisin de 8 kDa, mais une polymérisation de la molécule peut élever le poids moléculaire jusqu' à 36 kDa [3] [1].

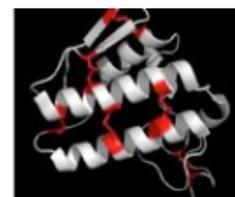


Figure 37 : Structure de la PLA<sub>2</sub>.

Le site catalytique qui accueille les phospholipides et le site de fixation du calcium sont particulièrement bien conservés. Ces deux sites sont composés respectivement de 4 acides aminés dont un en commun : l'acide aspartique en position 49. Certaines PLA<sub>2</sub> présentent une substitution de cet acide aminé clef, ce qui a pour conséquence la perte de la capacité à lier le calcium.

L'interaction avec les cellules cibles est assurée par une surface de contact appelée « surface de liaison interfaciale » distincte du site catalytique. Elle est constituée d'une quinzaine d'acides aminés basiques et hydrophobes principalement localisés dans les extrémités N- et C-terminales de la sPLA<sub>2</sub>. La diversité fonctionnelle des PLA<sub>2</sub> est expliquée, au moins en partie, par les différences subtiles de leur enzymologie interfaciale.

On classe les phospholipases de venins de serpents « SV-PLA<sub>2</sub> » en deux groupes :

- **Le groupe I** : structurellement similaire aux PLA<sub>2</sub> digestives pancréatiques des mammifères, elles sont présentes dans le venin d'Elapidae dont les serpents marins.
- **Le groupe II** : souvent plus longues, elles sont similaires aux PLA<sub>2</sub> inflammatoires non pancréatiques des mammifères et sont retrouvées dans les venins de Viperidae.

La structure globale et le mécanisme catalytique des PLA<sub>2</sub> sont très conservés. Elles présentent cependant des particularités structurales qui leur confèrent des propriétés enzymatiques et fonctionnelles différentes [18].

## **b) Activités toxicologiques.**

Les PLA<sub>2</sub> jouent un rôle clé dans la pathogenèse de la lésion tissulaire locale caractéristique des envenimations crotalines et vipérines. En fonction du type de phospholipides hydrolysés, les PLA<sub>2</sub> de venins de serpents peuvent intervenir sur de nombreux systèmes physiologiques et exercer une multitude d'effets pharmacologiques. Ce sont le plus souvent des médiateurs myotoxiques et inflammatoires, jouant un rôle important dans l'envenimation ophidienne. Elles sont associées à une série complexe d'événements dégénératifs : œdème, infiltrat inflammatoire (augmentation IL-6) et nécrose du muscle squelettique. Elles peuvent provoquer des dommages sur les organes ou tissus (foie, reins, poumons, hypophyse, testicules). La myotoxicité peut être locale ou systémique. Certaines PLA<sub>2</sub> peuvent montrer une toxicité neuronale par une action pré ou post synaptique et entraîner des convulsions. D'autres peuvent être cardiotoxiques et entraîner une hypotension. D'un point de vue hématologique, les PLA<sub>2</sub> vont présenter des effets anticoagulants, pro- et anti- agrégants plaquettaire, hémolytiques, pro-hémoglobinuriques ou hémorragiques. Les PLA<sub>2</sub> sont aussi cytotoxiques. Certaines possèdent des activités antimicrobiennes contre les souches bactériennes Gram-positives et Gram-négatives, antiparasitaires (anti-malarienne) et antivirale (contre le VIH, la dengue, la fièvre jaune, etc.). D'autres encore, présentent des activités antitumorales et anti-angiogéniques puissantes [1] [27] [28] [29] [30]. Récemment, on a décelé dans le venin du cobra *Naja haje* une PLA<sub>2</sub> qui inhibe directement la thrombine. Il s'agit de la première PLA<sub>2</sub> inhibitrice directe de thrombine issu d'un venin de serpent connu. Cette découverte offre un nouveau potentiel pour le développement thérapeutique [31].

Les effets biologiques et pathologiques induits par les PLA<sub>2</sub> ne peuvent pas être expliqués par la simple activité d'hydrolyse des phospholipides. Ceci est particulièrement évident dans le cas de certaines PLA<sub>2</sub> qui sont catalytiquement inactives à cause d'une mutation au niveau du site actif, mais sont encore myotoxiques. Par exemple la fonction phospholipasique de la Lys49 PLA<sub>2</sub> de *Bothrops neuwiedi urutu* s'est avérée enzymatiquement inactive, mais la toxine conserve sa myotoxicité. Il s'agit alors d'une myotoxine à structure phospholipasique [28].

## 2) Acétylcholinestérases.

L'acétylcholinestérase (AChE) contribue à l'action neurotoxique complexe des venins d'Elapidae. Il est abondamment retrouvé dans presque la totalité des venins à l'exception des mambas. Leur absence chez les mambas est peut-être due à la présence des fasciculines auxquelles elles sont sensibles [32].

L'AChE est présente chez tous les vertébrés, en particulier dans les muscles et les tissus nerveux. Elle joue un rôle physiologique clé dans la transmission cholinergique normale et la contraction musculaire. Elle permet en effet l'hydrolyse de l'acétylcholine (principal médiateur chimique de l'influx nerveux) empêchant ainsi la propagation du potentiel d'action au niveau synaptique [3].

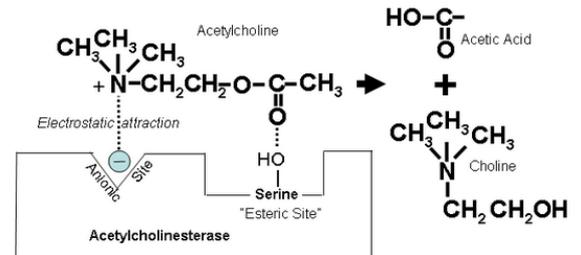


Figure 38: Action de l'acétylcholinestérase.

Cette enzyme est active à pH basique (entre 8 et 8,5). Elle est constituée de deux monomères de 63 kDa chacun et comporte un pont disulfure [3]. Les AChE des venins de serpents n'existent que sous forme monomérique hydrophile et soluble, sans être associées à des protéines d'ancrage ou être enchâssées dans les membranes comme c'est le cas chez les vertébrés. Les AChE des venins d'Elapidae présentent une plus ou moins grande homologie de séquences avec leurs homologues vertébrés. Par opposition, le clonage de l'ADNc de l'AChE à partir du venin de *Bungarus* a montré que le domaine C-terminal est très différent de celui des AChE des autres vertébrés. Ce domaine est codé par un exon alternatif nommé S, qui permet la génération de la forme soluble. Il est très basique et constitué de 15 résidus dont les 8 derniers sont éliminés de la protéine mature [32].

Le rôle des AChE reste énigmatique, puisqu'elles ne sont pas toxiques en elles-mêmes, bien que leur activité d'hydrolyse puisse perturber la transmission de l'influx nerveux. Elles ne semblent pas non plus agir en synergie avec aucun autre composé des venins. La présence de l'acétylcholinestérase physiologique dans les tissus dépourvus de la fonction cholinergique soulève également quelques questions quant à son rôle. En raison de leur large éventail d'activités, les AChEs des venins de serpents offrent un système exceptionnel pour analyser le mécanisme d'inhibition du site périphérique [18] [32].

### 3) Phosphoestérases.

De nombreux serpents contiennent dans leur venin diverses phosphoestérases qui sont des enzymes hydrolytiques. Découverte depuis 1932 à partir du venin de *Protobothrops flavoviridis* et *Gloydius blomhoffi*, ce type d'activité enzymatique a été virtuellement retrouvée dans tous les venins de serpents avec toutefois une prédominance chez les vipères [18]. Il existe plusieurs phosphoestérases.

**Nucléotidases** ou « **nucléotides phosphatase** » coupent le groupement phosphate des nucléotides (ribo ou désoxyribo). Les 5'nucléotidases hydrolysent le groupement phosphate en position 5'. Les 3'nucléotidases hydrolysent le groupement phosphate en position 3'.

**Phosphomonoesterases (acide et alcaline)**, moins spécifiques, hydrolysent tous les mononucléotides, en particulier ceux chargés du transport énergétique au niveau cellulaire [3].

**Nucléases** clivent les liaisons phosphodiester des brins d'acides nucléiques entre deux nucléotides. Elles agissent à pH alcalin environ 9 ou 10. Parmi les nucléases des venins de serpents, les ADNases, les ARNases, les ATPases, et surtout les phosphodiesterases (PDE) sont les plus abondantes et donc aussi les plus étudiées. On distingue les ribonucléases, qui ne s'attaquent qu'aux acides ribonucléiques (l'ARN), des désoxyribonucléases qui clivent les acides désoxyribonucléiques (l'ADN). Ce sont aussi des **exonucléases** qui coupent la base située à l'extrémité de la chaîne nucléique ou des **endonucléases** qui hydrolysent les liaisons entre les paires de bases situées à l'intérieur de la chaîne nucléique. Les ADNases et les ARNases sont des endonucléases ubiquitaires, de petites tailles (environ 15 kDa) qui coupent respectivement et spécifiquement l'ADN et les ARN. Les phosphodiesterases (PDE) quant à elles hydrolysent les liaisons phosphodiesters à partir de l'extrémité 3' des polynucléotides, libérant ainsi des 5'-mononucléotides. Il existe des phosphodiesterases spécifiques de l'AMPc ou du GMPc et d'autres non spécifiques. Les PDE sont d'un point de vue structural, des enzymes basiques qui sont pour la plupart de haut poids moléculaire, la masse varie entre 98 et 140kDa. Leur activité enzymatique est inhibée en présence d'agents chélateurs, complexant (par exemple l'EDTA) des cations divalents [3] [18].

L'identification et la caractérisation individuelle et spécifique des nucléases (PDE, ADNase, ARNase, ATPase) des venins ophidiens est difficile car ces enzymes partagent des spécificités de substrat qui sont similaires et se chevauchent ainsi que des propriétés biochimiques

communes [33] [34]. L'analyse de l'ADNc ou de séquences d'acides aminés des enzymes purifiés est souvent nécessaire pour les identifier clairement.

Si ces enzymes sont des acteurs majeurs pour la recherche en biologie moléculaire, on ne dispose à ce jour que peu de données précises quant à leur rôle lors d'une envenimation. Cependant, la distribution quasi omniprésente de ces enzymes dans les venins suggère cependant un rôle important dans les envenimations. La production, en particulier, de purine (adénine ou guanine, deux bases qui constituent les acides nucléiques), via différentes activités pharmacologiques, peut être impliquée dans des phénomènes de relaxation musculaire, de vasodilatation des vaisseaux ou encore affecter le système cardiaque [18]. Il a été suggéré que leur principale fonction peut être dans la génération de l'adénosine et par l'action de l'adénosine, aider à l'immobilisation des proies. D'autres recherches plus approfondies sont encore nécessaires pour caractériser les rôles biologiques et pharmacologiques de ces enzymes afin d'établir clairement leurs effets [33].

#### 4) L-amino-acide-oxydases.

Les L-Amino-Acide-Oxydases (LAAOs) que l'on retrouve dans des organismes aussi divers que les bactéries, les champignons, les algues, les poissons ou les escargots appartiennent à la famille des **flavoenzymes**. Elles sont particulièrement présentes et largement distribuées au sein des venins chez de nombreux genres et espèces d'ophidiens en particulier de Viperidae, Crotalidae et Elapidae. Elles représentent généralement entre 1 à 9% du venin total, à l'exception de la LAAO de *Calloselasma rhodostoma* qui constitue environ 30% du venin.

Elles catalysent la désamination oxydative stéréospécifique d'un L-aminoacide en un acide  $\alpha$ -cétonique correspondant. La fonction amine est alors remplacée par une fonction carbonyle via l'intermédiaire d'un acide iminé. Cette réaction est caractérisée par la production du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), et d'ammoniac (NH<sub>3</sub>). La génération de radicaux libre est responsable de phénomènes de stress oxydatif au niveau cellulaire. Il n'existe pas à ce jour, de consensus clair quant au rôle et aux mécanismes par lesquels les LAAOs ou SV-LAAOs (Snake Venom-LAAOs) contribuent à la toxicité des venins [1].

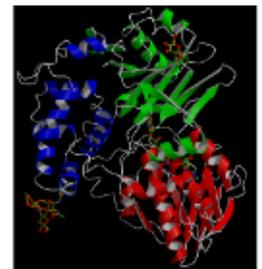


Figure 39 : L-amino acide oxydase

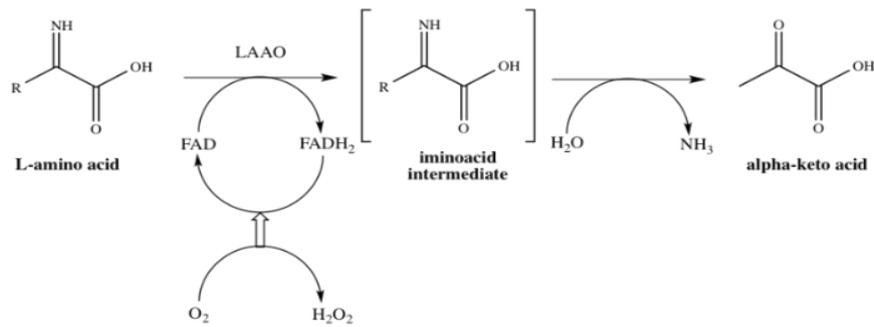


Figure 40: Schéma général de la réaction catalytique de la L-amino-acide-oxidase.

### a) Structure.

Les SV-LAAOs sont organisées la plupart du temps en homodimères, formées de deux sous-unités liées entre elles par des liaisons non covalentes. Chaque sous-unité renferme trois domaines :

- Un domaine d'interaction avec le cofacteur FAD ou FAD-Binding : qui assure la liaison non covalente du LAAO au cofacteur FAD.
- Un domaine d'interaction avec le substrat ou "Substrat-Binding".
- Un domaine en hélice.

Les SV-LAAOs couvrent une large gamme de points isoélectriques qui varie de 4,5 à 8. Dans certains cas, le même type de venin contient plus qu'un type de LAAO. Ainsi, les formes acides, neutres et basiques peuvent coexister dans un même venin de serpent. Cette différence de charge peut refléter des propriétés pharmacologiques différentes [35] [36].

Les LAAOs sont des **glycoprotéines** qui présentent 3 à 4% de glucides. Il a été montré que la glycosylation contribue à la micro-hétérogénéité signalée pour certaines SV-LAAOs. La glycosylation semble être importante pour la sécrétion et la solubilité de la protéine. Les motifs glycaniques semblent également jouer un rôle important dans les effets pharmacologiques de l'enzyme. Il a été suggéré que la LAAO se lie à la surface de la cellule par ce motif glycane. L'homogénéité de la partie glycane semble être une exigence fonctionnelle liée aux activités biologiques attribuées aux SV-LAAOs [35].

Les SV-LAAOs sont des **flavoprotéines** avec deux molécules de cofacteur. Les flavines ou « groupement prosthétique flavine-adénine-dinucléotide » (FAD) sont responsables de la couleur jaune caractéristique de nombreux venins de serpents et contribuent à leur toxicité en raison du stress oxydatif qui résulte de la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [3] [35].

## **b) Mécanisme d'action et effets biologiques et pharmacologiques.**

Les effets biologiques et pharmacologiques des SV-LAAOs sont médiés, tout au moins en partie, par le peroxyde d'hydrogène chimiquement très réactif généré lors du processus d'oxydation. En effet de nombreuses études ont montré que l'introduction de catalases dégradant par dismutation le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peuvent neutraliser l'action et les effets des SV-LAAOs [35]. Parfois, les effets toxiques ne peuvent pas être seulement attribués au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> libéré, mais ils sont aussi provoqués par des interactions directes entre les LAAOs et les cellules cibles. Les mécanismes d'action détaillés des activités biologiques des SV-LAAOs ne sont aujourd'hui pas encore totalement compris et nécessitent plus d'investigations.

Jusqu'aux années 1990, les recherches se sont principalement concentrées sur les activités physico-chimiques et enzymatiques des LAAOs. **Récemment, les SV-LAAOs sont devenues un sujet attractif, important pour la biochimie, la physiologie et la médecine étant donné leurs effets sur les cellules, les plaquettes et les microorganismes.** Des progrès considérables dans les études de la structure et du mécanisme d'action de ces enzymes ont été faits. L'accent a été mis sur l'investigation de leurs effets pharmacologiques et leurs applications biotechnologiques potentielles dans la recherche de nouveaux médicaments d'intérêt. Au cours de cette dernière décennie des travaux ont révélés les nombreux effets biologiques et pharmacologiques des SV-LAAOs parmi lesquels on peut citer : un pouvoir apoptotique et cytotoxique, l'induction et/ou l'inhibition de l'agrégation plaquettaire, l'apparition d'hémorragies (par effet apoptotique sur des cellules endothéliales de la paroi vasculaire), d'hémolyses, la formation d'œdèmes, des activités antitumorales ainsi que des activités antimicrobiennes, bactéricides, antiparasitaires (leishmanicides (leishmaniose) et tripanocides (maladie de chagas)) et antivirales (anti-VIH et anti-DENV-3 agent de la dengue) [1] [35] [36] [37] [38].

Malgré les nombreuses propriétés des SV-LAAOs, il y a très peu de conséquences cliniques et toxicologiques lors d'une envenimation car cette enzyme est peu concentrée et représente moins de 1% de la toxicité totale du venin [3]. Bien que le rôle exact des SV-LAAOs dans le venin reste encore mal élucidé, ces enzymes sont considérées comme des protéines multifonctionnelles avec des applications biomédicales prometteuses. D'autre part, il est à noter que les SV-LAAOs sont des glycoprotéines avec des masses moléculaires élevées variant de 110 à 150 kDa, ce qui pourrait les rendre inapplicables en raison de leur immunogénicité.

## **5) Hyaluronidases.**

Découvertes en 1947, les hyaluronidases se retrouvent dans la plupart des venins de serpents [18]. Au cours de la morsure les hyaluronidases potentialisent la toxicité du venin : Elles participent probablement à la diffusion du venin en hydrolysant l'acide hyaluronique ou le sulfate de chondroïtine, qui sont des mucopolysaccharides (de la matrice extracellulaire) responsables de la cohésion du tissu conjonctif. Leur capacité à détruire la barrière dermique favorise la pénétration du fluide venimeux dans la peau [3]. Non seulement, les hyaluronidases endommagent le tissu local mais elles augmentent aussi la puissance d'autres toxines [39]. Leur action potentialise les hémorragies locales quand le venin injecté contient aussi des toxines hémorragiques (« hémorragines »). Cette activité enzymatique est retrouvée dans les venins des Elapidae, Crotalinae et Viperidae.

Plusieurs isoformes de hyaluronidases peuvent coexister au sein d'un même venin, générant ainsi une large gamme de produits de dégradation de l'acide hyaluronique [39]. Les venins de serpents présentent aussi quelques variantes de hyaluronidases, appelées protéines de hyaluronidases analogues ou substances « hyaluronidases-like », qui sont probablement des produits de l'épissage alternatif. Ces formes tronquées de hyaluronidases ont été récemment identifiées, leur rôle dans l'envenimation n'est toujours pas établi [40].

La hyaluronidase mérite d'être explorée en tant que cible thérapeutique possible pour inhiber la distribution systémique du venin, ainsi que pour réduire au minimum la destruction locale des tissus au niveau du site de la morsure dans le cadre de l'amélioration des traitements d'une envenimation [39].

## **6) Protéases.**

Les Viperidae ont un venin particulièrement riche en protéases. Les protéases sont responsables de nécroses en détruisant les tissus et d'autres phénomènes pharmaco-toxiques comme les troubles de l'hémostase. De nombreuses protéases agissent sur la structure protéique de manière non spécifique. Cependant certaines protéases ne peuvent intervenir qu'au niveau d'un seul site moléculaire qui leur est spécifique. C'est cette spécificité qui est particulièrement intéressante dans le diagnostic et le traitement de certaines maladies [3].

Deux classes de protéases isolées des venins de serpents interviennent sur la coagulation sanguine par leur activité protéolytique. **Sérine-protéases de type trypsine (SVSP)** qui affectent principalement le système hémolytique et sont présentes dans tous les venins de serpents terrestres et plus rarement chez les serpents marins. **Métallo-protéases (SVMP)**, particulièrement abondantes chez les vipères (Viperidae), induisant chez les proies des saignements, des œdèmes, la formation de caillots sanguins, une inflammation ou des processus de nécrose tissulaire [1].

#### a) Sérines-protéases (de type trypsine).

Les sérine-protéases (SVSP) sont abondamment retrouvées dans les venins ophidiens, en particulier chez les Viperidae, où elles représentent environ 20% de la teneur totale en protéines du venin [41].

##### 1. Structure et mécanisme d'action.

Il existe une grande diversité de sérine-protéases (SVSP). Il s'agit de glycoprotéines dont la masse moléculaire varie de 20 à 100 kDa et plus particulièrement entre 26 et 67 kDa.

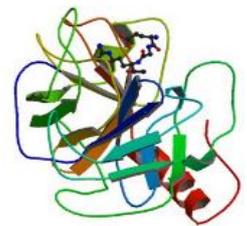


Figure 41: Structure d'une sérine-protéase (TSV-PA).

Comme l'indique leur nom, les SVSPs clivent les liaisons peptidiques, tout comme la trypsine, à la suite des acides aminés : arginine ou lysine via un mécanisme moléculaire de catalyse qui inclut une sérine très réactive, une histidine et un acide aspartique au sein de la poche catalytique. La sérine permet la liaison avec le substrat. A la différence des trypsines, les SVSPs présentent une haute spécificité vis-à-vis des molécules reconnues, via les motifs peptidiques des séquences qui entourent la liaison qui sera in fine clivée. En dépit de cette grande spécificité, les SVSP présentent des structures tridimensionnelles homologues, mono ou bicaténaires, le plus souvent monomériques, stabilisées par 6 ponts disulfures [18] [3].

## 2. Fonctions physiologiques.

Les SVSPs affectent diverses fonctions physiologiques comme la digestion, l'activation du système de complément, la différenciation cellulaire, hémostasie, la coagulation sanguine, la fibrinolyse, la pression sanguine et de l'agrégation plaquettaire. Plusieurs types d'enzymes appartiennent au groupe des sérine-protéases ophidiennes SVSPs.

Certaines agissent en ciblant des éléments de la cascade de la coagulation, ou le système fibrinolytique (action pro- ou anti- coagulante), quand d'autres ont une activité kininogénase de type kallikréine c'est-à-dire qu'elles clivent le kininogène libérant la bradykinine qui est un agent hypotenseur, d'autres encore déséquilibrent le système hémolytique par action sur les cellules qui le constituent [4]. Par exemple, certaines SVSPs activent spécifiquement la prothrombine, le facteur de coagulation V (RVV-V), la protéine C (ACC-C) ou le plasminogène (TSV-PA du venin de *Trimeresurus steijnegeri*).

Beaucoup de SVSPs stimulent les plaquettes en provoquant simultanément leur agrégation et leur dégranulation. Parmi elles on peut citer la cérastobine, extraite du venin de *Cerastes vipera*, et la cérastocytine, extraite du venin de *Cerastes cerastes*, qui présente la propriété d'activer les plaquettes tout en permettant l'hydrolyse du fibrinogène. La thrombocytine, isolée du venin de *Bothrops atrox*, présente un mode d'action sur la membrane plaquettaire similaire à celui de la thrombine en reconnaissant les mêmes récepteurs. La crotalocytine du venin de *Crotalus horridus* est plus puissante que la thrombocytine et possède un mode d'action probablement différent, elle agrège les plaquettes en absence de fibrinogène exogène comme la thrombine naturelle [3].

La plupart des enzymes thrombiniques ou « thrombine-like », capables de convertir le fibrinogène en fibrine appartiennent au groupe des SVSPs. Leur structure est généralement similaire à celle de la chaîne  $\beta$  de la thrombine naturelle. Elles agissent en clivant l'une des chaînes de fibrinogène  $A\alpha$  (souvent) et  $B\beta$  ou plus rarement les deux, libérant ainsi les fibrinopeptide A et/ou fibrinopeptide B. L'une des enzymes thrombiniques les plus étudiées est la batroxobine extraite du venin de *Bothrops* (Reptilase® *Bothrops moojeni*). Elle clive une liaison de la chaîne alpha du fibrinogène, générant du fibrinopeptide A et de la fibrine dont l'agrégation sera responsable de la formation de caillots sanguins instables. On peut également citer l'Ancrod isolé du venin du crotale de Malaisie *Calloselasma rhodostoma*.

Certaines enzymes fibrinolytiques et/ou fibrinogénolytiques appartiennent également au groupe des SVSPs. Elles dégradent préférentiellement la chaîne B $\beta$  du fibrinogène, bien qu'il y ait un certain nombre d'exceptions à cette généralisation. Plusieurs SVSPs sont à la fois fibrinogénolytiques et fibrinolytiques, certaines ne sont pas fibrinolytiques

Par conséquent, les SVSPs ont été utilisées comme outils raffinés pour étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans l'activation des facteurs clés qui contrôlent l'hémostase et comme agents thérapeutiques dans diverses conditions thrombotiques et hémostatiques [18] [3] [41] [42] [43].

### **b) Métallo-protéases (SVMP).**

Les métallo-protéases des venins de serpents ou « SVMP », se trouvent essentiellement dans les venins de Viperidae (Vipéridés et Crotalidés), où elles jouent un rôle important lors de l'envenimation. Elles représentent jusqu'à 30% du venin, voire 60% dans certains cas [44].

#### **1. Structure.**

Les SVMPs appartiennent à la famille des metzincines. Ce sont des endopeptidases dont l'activité protéolytique est dépendante de la présence d'un ion métallique généralement un atome de zinc (Zn<sup>2+</sup>). Elles se caractérisent par la présence d'un motif de 3 histidines très conservé et localisé dans le site catalytique. Cette triade permet la fixation de l'ion zinc. Ce sont des protéines mono ou bicaténaires, leur masse moléculaire varie de 15 à 100 kDa. Quelques protéines dimériques de masse supérieure existent telle que la BaG, isolée du venin de *Bothrops alternatus* ayant une masse moléculaire de 130 kDa. La présence de calcium participe à la stabilité de la structure. Ces enzymes sont très sensibles aux variations de pH, en effet elles sont inactivées en milieu acide (pH < 3) [3] [42] [44].

La plupart des SVMP sont des protéines solubles composées d'un domaine « métalloprotéase » et d'un domaine « désintégrine ». Lors d'une morsure de serpent, l'activité métalloprotéasique du venin dégrade la membrane basale de l'endothélium vasculaire (induisant une fuite de sang dans les tissus interstitiels). Simultanément, le domaine désintégrine inhibe l'agrégation des plaquettes en se liant avec l'intégrine GpIIbIIIa présente à leur surface. La conjugaison de ces deux activités (antiadhérente et protéolytique) est responsable du développement de l'œdème, de la nécrose et de l'hémorragie aussi bien locale que systémique [44]. La structure générale des SVMPs se compose d'un domaine :

- Catalytique métalloprotéasique (domaine M).
- Désintégrine ou disintegrin-like (domaine D).
- Riche en cystéine (domaine C).

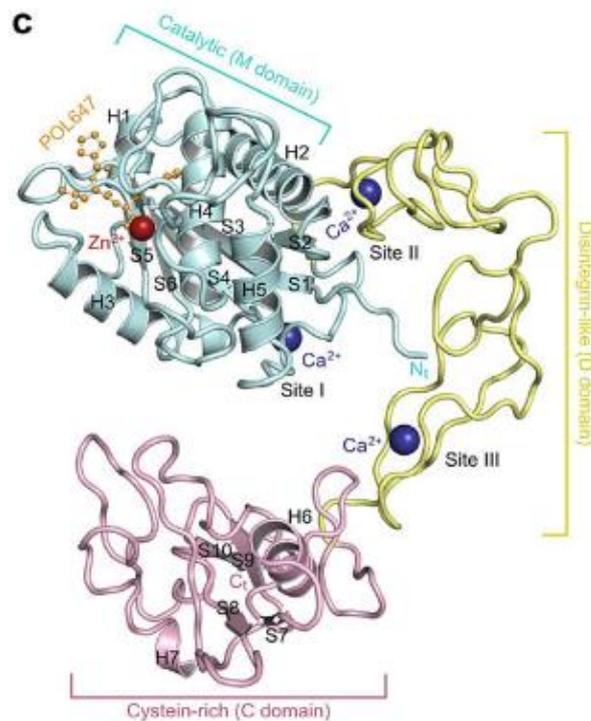


Figure 42: Structure d'une métalloprotéase (P III) (*Bothrops jaraca*).

## 2. Classification.

Les SVMPs sont regroupées en 3 classes différentes noté P-I, P-II et P-III en fonction de leur organisation en domaine fonctionnellement distinct. Afin d'être complètement exhaustif on peut cependant distinguer quatre groupes [44] [45].

**GROUPE 1 :** Composé de protéines inactives sur la coagulation sanguine. Elles sont considérées comme des « propeptides » précurseurs des autres métallo-protéases.

**GROUPE 2 « métallo-protéases pures » = P-I :** La classe P-I est composée de protéines de faible masse moléculaire (de 15 à 30 kDa) avec un effet hémorragique relativement faible. **Les SVMPs de ce groupe sont uniquement constituées du domaine métalloprotéasique.** Il se constitue d'environ 200 acides aminés et contient au niveau de son site catalytique un motif hautement conservé chélateur du zinc. Parmi les différentes SVMPs de cette classe on peut citer, l'adamalysine II de *Crotalus adamanteus*, l'atrolysine C de *Crotalus adamentus*, ou encore la graminelysine-I qui est une SVMP apoptotique extraite de *Trimeresurus gramineus*, la trimereylsine II de *Trimeresurus flavoviridis*.

**GROUPE 3 ou SVMPs = P-II :** La masse moléculaire des protéines de la classe P-II est plus élevée (allant de 20 à 60 kDa). **Ce groupe possède, en plus du domaine métalloprotéase, un domaine désintégrine (désintégrine -like).** La composition et la structure de la chaîne peptidique de ce domaine est identique à celle des désintégrines. Il se compose de 40 à 90 acides aminés, riche en cystéines et contient une séquence arginine-glycine-acide aspartique (RGD) indispensable entre autres pour inhiber l'agrégation plaquettaire médiée par l'intégrine. Ce domaine peut être libéré par autoprotéolyse ou sous l'action d'autres protéases donnant naissance à une nouvelle protéine stable. Parmi les SVMPs de la classe P-II on peut citer, la bilitroxine-I extraite d'*Agkistrodon bilineatus* qui est hémorragique, la jerdonitine isolée de *Trimeresurus jerdonii* [44] qui inhibe l'agrégation plaquettaire, ainsi que la MT-d isolée du venin de *Gloydus brevicaudus* qui est protéolytique.

**GROUPE 4 ou SVMPs = P-III :** La classe P-III, englobe des SVMPs très toxiques, de masse moléculaire élevée (allant jusqu'à 100 kDa) et ayant généralement une activité hémorragique intense. Les SVMPs de la classe P-III sont les plus complexes de toutes. **En plus de leur domaine M et de leur domaine D, elles ajoutent à leur constitution un domaine riche en cystéine noté « C » qui accentue la stabilité de la molécule.**

On distingue différents sous-groupes en fonction de divers éléments de maturation post traductionnelle, ils sont notés :

- **SVMP-PIIIa** : Elles possèdent une **organisation de type « MDC »**. La jararhagine issue du venin de *Bothrops jararaca* qui inhibe la formation du clou plaquettaire est l'exemple le plus étudié [26].
- **SVMP-PIIIb** : Elles sont organisées en une **structure type « DC »**, **dépourvue du domaine M** par clivages autoprotéolytiques. On peut citer parmi elles, la patagofibrase, extraite de *Philodryas patagoniensis*, qui provoque des hémorragies et inhibe l'agrégation plaquettaire ; ou encore la jararhagine-C extraite de *Bothrops jararaca* qui est le produit de dégradation (par autoprotéolyse) de la jararhagine (retrouvée dans le même venin).
- **SVMP-PIIIc** : Ce sont des SVMPs de formes homodimériques. On peut citer la VAP1 isolée de *C. Atrox* et la HV1 extraite de *Protobothrops flavoviridis*.
- **SVMP-PIIIId** : Ces SVMPs possèdent en plus des trois structures décrites dans la classe P-III, des **domaines supplémentaires nommé « snalec » pour « snake C-type lectin-like »** [45]. La RVV-X extraite de *Daboia russelli* activatrice du facteur X de la cascade de coagulation et la carinactivase-1 d'*Echis carinatus* qui activent la prothrombine sont toutes deux des SVMP-PIIIId.

La détermination de la structure tridimensionnelle de certaines SVMPs de la classe P-III a révélé qu'il existe une région hypervariable (HVR) dans le domaine riche en cystéine. Au cours de ces dernières années, des études ont montré l'importance et l'implication de la région riche en cystéines dans certaines activités biologiques, attribuées notamment aux SVMP-PIIIb de structure « DC » et donc, qui ne possèdent pas de domaine catalytique M. Ces activités résultent de sa capacité à interagir avec d'autres protéines, tels que le collagène, le facteur de von Willebrand et les intégrines. Actuellement, beaucoup de recherches se focalisent sur cette région pour explorer et identifier de nouveaux champs d'activités afin de les exploiter. L'une des premières séquences déterminées appartenant à cette classe était l'atrolysine A, purifiée à partir du venin de *Crotalus atrox*. La bothropasine, (PIII) extraite du venin de *Bothrops jararaca*, présente des effets similaires. Elle dégrade le collagène, la gélatine, la fibronectine, le fibrinogène et la fibrine [44].

Il est à signaler que des SVMP appartenant à ces différentes classes structurales et fonctionnelles sont souvent présentes simultanément dans un même venin [1].

### 3. Rôles biologiques et pharmacologiques.

**Les SVMPs sont principalement hémorragiques.** Elles peuvent être pro ou anticoagulantes. Elles possèdent un mécanisme d'action très complexe puisqu'elles agissent sur plusieurs éléments clés du système hémostatique en passant par les protéines matricielles et l'endothélium vasculaire. Les SVMPs sont susceptibles d'induire des saignements, des phénomènes de coagulation intravasculaire, des œdèmes, des inflammations, des nécroses tissulaires. Elles jouent un rôle important dans les hémorragies locales et systémiques observées lors des envenimations. Certaines SVMP n'induisent pas d'activité hémorragique, elles sont alors impliquées dans le dysfonctionnement de l'homéostasie via différents mécanismes [18].

L'activité hémorragique et la spécificité des métallo-protéases sont proportionnelles à leur poids moléculaire. L'addition de nouveaux domaines protéiques potentialise leur activité enzymatique [26]. Fonctionnellement, plusieurs SVMPs toxiques possèdent un large spectre d'activités biologiques. Ces différents champs d'activité peuvent être le résultat d'une synergie d'action entre les différents domaines des SVMPs.

Les hémorragines sont des métallo-protéases zinc-dépendantes et agissent directement sur l'endothélium vasculaire. Ces enzymes, qui partagent une action physiologique commune, ne présentent pas d'homogénéité structurale. On les retrouve dans la plupart des venins de Viperidae, ainsi que dans le venin de certains Elapidae australien et Colubridae. Elles attaquent la membrane basale et l'endothélium des capillaires. Cela entraîne, d'une part, l'extravasation immédiate du sang qui s'échappe des vaisseaux, le développement d'œdèmes, phlyctènes ou encore nécroses, et d'autre part, l'activation de la coagulation sanguine physiologique indépendamment de l'intervention directe des venins sur la coagulation sanguine. L'action des hémorragines peut être focale et induire des saignements au point d'inoculation du venin, ou au contraire systémique et entraîner des hémorragies à distance, voire contribuer à alimenter un syndrome hémorragique. C'est le cas par exemple de la bothropasine, une métallo-endopeptidase du venin de *Bothrops jararaca*, qui dégrade le collagène, la gélatine, la fibronectine, le fibrinogène et la fibrine [3] [46].

Une grande majorité des métallo-protéases des venins des Vipéridés et des Elapidés est dotée d'activités fibrinolytique et fibrinogénolytique qui dégradent le fibrinogène, bloquant ainsi l'agrégation plaquettaire. La plupart hydrolysent préférentiellement la chaîne A $\alpha$  du fibrinogène, puis la chaîne B $\beta$  avec une activité plus faible, pour quelques autres c'est l'inverse.

On peut citer la lébétase de type P-I issue du venin de *Vipera lebetina*, qui hydrolyse directement la fibrine. Son rôle d'anticoagulant est renforcé par le fait qu'elle empêche l'agrégation plaquettaire. Elle possède une faible activité hémorragique. Ou encore la fibrolase, une fibrinogénase (de 23kDa) appartenant aux SVMPs de type P-II isolée du venin d'*Agkistrodon contortrix contortrix*. Elle est très étudiée à l'heure actuelle.

Les SVMPs peuvent aussi activer certains éléments de la cascade de la coagulation comme le facteur X et la prothrombine [42]. Le plus important des activateurs du facteur X est la RVV-X. Il s'agit d'une métalloprotéase isolée du venin de *Vipera russelli*, qui hydrolyse la chaîne lourde du facteur X. Le représentant le plus étudié des SVMPs capables d'activer la prothrombine est l'écarine, isolée du venin d'*Echis carinatus*, qui hydrolyse la liaison Arg 322-Ile 323 de la prothrombine et libère ainsi la thrombine qui est le principal agoniste de l'agrégation plaquettaire.

Les SVMPs peuvent également interagir directement avec les récepteurs de l'agrégation plaquettaire comme les récepteurs de la surface plaquettaire ou le facteur de von Willebrandt. L'exemple le mieux décrit dans la littérature est la jararhagine isolée du venin de *Bothrops jararaca* [3] [46].

Les SVMPs (hémorragiques ou non hémorragiques), grâce à leur domaine métalloprotéasique, sont également capables d'adhérer et de dégrader les composants de la matrice extracellulaire à savoir le collagène type-IV de la paroi vasculaire, ce qui joue un rôle important dans le développement des métastases.

Plusieurs SVMPs induisent l'apoptose des cellules endothéliales humaines. Celles-ci jouent un rôle important au niveau de l'angiogenèse et de l'extravasation. On peut citer la VLIAP une métalloprotéase de type P-III isolée du venin de *Vipera lebetina* qui inhibe l'adhésion des cellules endothéliales sur les différentes protéines matricielles (fibrinogène, fibronectine, vitronectine, collagène I, et collagène IV). Le traitement des cellules endothéliales HUVEC par la VLIAP entraîne la mort des cellules. A l'inverse, certaines SVMPs inhibent la prolifération des cellules endothéliales sans être apoptotique telle que la TSV, une métalloprotéase de type P-III isolée du venin de *Trimeresurus stejnegeri*.

Les SVMPs peuvent aussi agir sur les cellules inflammatoires. La HF3, de type P-III, isolée du venin de *Bothrops Jararaca* active par exemple l'intégrine des macrophages, déclenchant ainsi le processus de phagocytose in vitro.

## 7) Enzymes lytiques diverses.

On peut également retrouver dans les venins de serpent diverses enzymes lytiques telles que des **amylases** en faible quantité, **des transaminases, des déshydrogénases** etc. Leurs activités pharmacologique et toxique restent cependant négligeables en pathologie humaine [3].

### C) Toxines.

Les venins d'Elapidae sont particulièrement riches en toxines. Les toxines sont des protéines plus petites que les enzymes, leur poids moléculaire est généralement inférieur à 30 kDa. Elles se fixent à un récepteur spécifique, le plus souvent membranaire, qui sera activé ou inhibé plus ou moins durablement. Selon la localisation de leur récepteur, les toxines peuvent avoir différents impacts au niveau de l'organisme, ainsi le tropisme peut être neurologique, cardiovasculaire, musculaire ou indifférencié. L'effet des toxines est dose-dépendant c'est-à-dire que la toxicité est proportionnelle au rapport entre la quantité de toxine introduite et celle du récepteur correspondant. En revanche, elle est peu dépendante du temps d'action, l'effet du venin étant extrêmement rapide. D'autres facteurs interviennent comme la vitesse de diffusion de la toxine, qui est fonction de la taille de la toxine et de l'affinité de la toxine pour son récepteur. Il est à noter que la quantité et la spécificité du récepteur peuvent différer d'une espèce animale à l'autre. On parle alors « d'effet cible » qui établit, pour une toxine donnée, une relation linéaire entre la quantité de toxine, le nombre de récepteurs disponibles et les effets pharmacologiques, dont la toxicité [3].

Il existe deux manières de classifier les toxines ophidiennes : Soit en fonction de leur structure, soit en fonction de leur activité biologique et fonctionnelle.

## 1) Classification structurale.

On peut classer les toxines ophidiennes en 3 familles selon leurs structures :

- **Les toxines à trois doigts ou 3FTx.**
- **Les toxines phospholipasiques**, qui illustrent un phénomène rarement rencontré, la transformation d'enzymes en toxines fonctionnelles.
- **Les autres toxines.**

### a) Les toxines à trois doigts.

Les toxines à trois doigts ont pendant longtemps été considérées comme l'apanage des venins d'**Elapidae**, serpents chez lesquels cette famille structurale multigénique possède une grande diversité : 400 séquences ont été déposées à ce jour dans les banques de données. Chez certains serpents marins du genre *Laticauda* et chez certains cobras du genre *Naja*, les 3FTx sont les composés majoritaires reflétant leur utilisation massive dans l'arsenal moléculaire des venins de serpents. On sait aujourd'hui qu'elles sont aussi présentes chez les *Viperidae*, *Actroctaspidinae* et même dans la salive de certaines « couleuvres ». Leur abondance a fait qu'elles ont rapidement été extraites, purifiées et étudiées [18].

#### 1. Structure générale des toxines à trois doigts.

Malgré la très grande diversité des séquences primaires identifiées dans les venins ophidiens, une surprenante identité structurale tridimensionnelle a été mise en évidence par les études de résonance magnétique nucléaire (RMN) ou de cristallographie et de diffraction des rayons X [47]. Les toxines à trois doigts sont des peptides de 57 à 82 acides aminés riches en ponts disulfures : 4 au minimum *via* 8 cystéines hautement conservées. Ces toxines possèdent en effet toutes un cœur globulaire hydrophobe où se situent les 4 ponts disulfures communs à toutes les toxines de type trois doigts. A partir de ce cœur globulaire émergent 3 boucles généralement structurées par des feuillets type  $\beta$ . Ces boucles symbolisent les trois doigts qui sont à l'origine du nom de cette famille peptidique [48].



Figure 43: Structure d'une toxine à trois doigts.

Par ailleurs, les acides aromatiques tyrosine et phénylalanine en position 25 et 27 sont également très conservées et apparaissent très importantes pour la structuration et la stabilisation de ces molécules. Certaines 3FTx possèdent un cinquième pont disulfure, dans la boucle I ou II (voir figure), celui-ci provoquant un changement drastique de l'orientation de l'extrémité de la boucle. On distingue les toxines dites « courtes » qui ont 4 ponts disulfures et les « longues » qui présentent un pont disulfure supplémentaire.

Des analyses poussées d'une centaine de structures publiées ont montré une superposition de la région réticulée comprenant les cystéines et une plus grande liberté et divergence structurale au niveau de l'extrémité des boucles I et II. Cette conservation structurale reflète les deux points essentiels et communs des toxines à trois doigts :

- Une grande stabilité grâce à une structure compacte et réticulée qui permet une résistance naturelle à la dégradation.
- Une tolérance aux mutations permettant, tout en conservant les cystéines, d'affiner la spécificité et l'affinité envers les récepteurs ciblés mais également d'élargir la diversité des cibles reconnues. Cette famille est donc devenue multigénique par le biais de l'évolution multifonctionnelle.

La grande diversité à la fois structurale (cœur conservé et boucles variées) et fonctionnelle fait que les relations structure-fonction de ce groupe sont difficiles à établir [49].

## **2. Activité biologique des toxines à trois doigts.**

Malgré leur grande homologie de structure globale, les toxines à trois doigts isolés des venins de serpent se lient chacune à des récepteurs différents présentant une grande variété d'effets biologiques. Les 3FTx agissent entre autres sur les récepteurs nicotiques (nAChR), muscarinique (mAChRs), les canaux calciques (Cav), les récepteurs adrénergiques ou les récepteurs de la douleur (ASICs), certaines agissent même par inhibition enzymatique en inhibant les acétylcholinestérases par exemple [48].

Toxines à 3 doigts (3FTxs)	Mécanismes d'actions
$\alpha$ -neurotoxines de type I, II, III	Antagonistes du récepteur nicotinique de l'acétylcholine des muscles.
<i>K</i> -neurotoxines	Reconnaissant les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine neuronaux.
Neurotoxines non conventionnelles	Liaison à différent récepteurs nicotinique
Toxines muscariniques	Reconnaissant les récepteurs muscariniques
Toxines adrénergiques	Liaison aux récepteurs $\alpha$ -adrénergique
$\beta$ -cardiotoxines	Liaison aux récepteurs $\beta$ 1- et $\beta$ 2 adrénergiques
Fasciculines	Inhibent les acétylcholinestérases
Calciseptines	Bloquent les canaux calcium de type L
Mambine et dendroapsine	Inhibent l'adhésion cellulaire
Cytotoxine/ Cardiotoxine	Formation de pores dans la membrane
Hemextines	Activité anti-coagulante (par inhibition d'enzyme)
Toxines facilitatrices	Inhibitrices de l'activité des plaquettes
Mambalgine, Hannalgésine	Action analgésique

Tableau 1 : Toxines à 3 doigts et mécanismes d'actions

## 2) Classification fonctionnelle.

### a) Neurotoxines postsynaptiques (3FTx).

La plupart des neurotoxines postsynaptiques ciblent les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine. D'autres ciblent les récepteurs muscariniques couplés à la protéine G ou encore les récepteurs adrénergiques [50].

#### 1. Les toxines curarisantes.

De nombreuses toxines à 3 doigts ciblent le récepteur nicotinique à l'acétylcholine (nAChR), situé sur la membrane postsynaptique des cellules musculaires ou nerveuses, bloquant rapidement et de manière quasi irréversible l'activité de ce récepteur et donc la transmission de l'influx nerveux [3]. Ces toxines sont exclusivement des antagonistes compétitifs de l'acétylcholine [48]. Elles sont dites « curarisantes » car comme le curare extrait des plantes dont *Chondodendron tomentosum* et *Strychnos toxifera*, elles induisent une paralysie flasque des muscles efférents [3]. Cette propriété est en partie responsable des effets neurotoxiques observés après une envenimation à la suite d'une morsure d'**Elapidae**. Bien que leur séquence en acide aminés soit différente de celle des Elapidae, les ARNm codant pour ces toxines sont également synthétisés par les glandes de **Viperidae** (des genres *Sistrurus* et *Lachesis*), d'**Atactaspidinae** (*Atractaspis aterrima*) et de certaines « couleuvres » (*Dispholidus typus*, *Psammodphis mossambicus*, *Boiga dendrophila* etc.). Chez *Boiga dendrophila* par exemple la **denmotoxine** se lie aux nAChR d'oiseaux [18].

#### a. Structure.

Les toxines curarisantes appartiennent à la famille des toxines à « trois doigts » (3FTx) [1]. Elles sont composées d'une seule chaîne polypeptidique constituée de 60 à 74 acides aminés, d'un poids moléculaire moyen de 7 à 8 kDa, repliée en trois boucles. La rigidité de cette structure est assurée par des ponts disulfures (4 à 5). Le cinquième pont disulfure qui se trouve soit dans la boucle I, soit dans la boucle II, se traduit par la formation d'une courte hélice à l'extrémité de la boucle concernée [3].

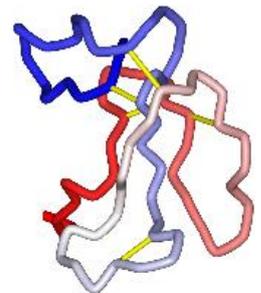


Figure 44: Structure moléculaire d'une neurotoxine- $\alpha$  ( $\alpha$ -bungarotoxine extraite de *Bungarus multicinctus*) [32].

## **b. Classification.**

Les toxines curarisantes peuvent être classées en quatre groupes selon leur structure et le sous-type de nAChR ciblé. Les différentes structures rencontrées jouent un rôle important dans la reconnaissance spécifique des récepteurs nicotiniques périphériques ou centraux. Ce qui leur confère des propriétés pharmacologiques diverses [3].

### **b. 1- Les $\alpha$ -neurotoxines.**

Leur chaîne polypeptidique peut être courte (60 à 62 résidus) ou longue (69 résidus). Elles contiennent quatre ponts disulfures et se présentent sous forme monomérique. Elles ciblent exclusivement et avec une forte affinité les récepteurs musculaires à l'acétylcholine des plaques motrices [3] [51].

### **b. 2- Les $\kappa$ -neurotoxines.**

Elles possèdent toutes une chaîne polypeptidique longue (66 à 70 résidus) et contiennent cinq ponts disulfures. Le cinquième pont additionnel est situé dans la boucle II. Elles forment des dimères et ciblent exclusivement les récepteurs neuronaux à l'acétylcholine [3] [51].

### **b. 3- Les $\alpha/\kappa$ -neurotoxines.**

Anciennement classées comme «  $\alpha$ -neurotoxines à chaîne longue », les  $\alpha/\kappa$ -neurotoxines possèdent une chaîne polypeptidique longue (66 à 74 résidus) et contiennent un cinquième pont additionnel dans la boucle II (comme les  $\kappa$ -neurotoxines). Elles se lient à la fois aux récepteurs musculaires et à certains récepteurs neuronaux ( $\alpha 7$ ,  $\alpha 8$  et  $\alpha 9$ ) [51].

#### **b. 4- Les neurotoxines non-conventionnelle.**

Les toxines non conventionnelles « Weak neurotoxins », également appelées « neurotoxines faibles », possèdent une chaîne polypeptidique longue et contiennent aussi un cinquième pont additionnel mais celui-ci est situé dans la boucle I. Elles sont très toxiques et se lient avec une haute affinité au récepteur nicotinique de l'acétylcholine (nAChR), mais avec une sélectivité et spécificité différentes de celles des neurotoxines classiques [49]. D'après certaines sources elles interagiraient avec une faible affinité sur les AChR de type musculaire (9a, 9b, 9c, 9d) [51].

#### **2. Les toxines muscariniques.**

Les toxines muscariniques sont représentées par une dizaine de polypeptides issus du venin de *Dendroaspis* (**mamba**). Leur nom provient de leur forte affinité pour la partie muscarinique du récepteur cholinergique. Les récepteurs muscariniques sont des protéines transmembranaires jouant un rôle dans de nombreux processus physiologiques. Il s'agit de récepteurs métabotropiques qui lient l'acétylcholine libérée dans le milieu extracellulaire. L'activation des récepteurs muscariniques conduit à la modulation de l'activité de différentes molécules de signalisation dont des enzymes (phospholipase, adénylate cyclase, MAP kinase) ou des canaux ioniques (canaux calciques voltage-dépendant ou GIRK).

Les toxines muscariniques présentent une structure voisine de celle des neurotoxines curarisantes (dites « à trois doigts »). Elles sont constituées d'environ 65 acides aminés et présentent 4 ponts disulfures. Leurs poids moléculaire moyen est de 7,5 kDa.

A la différence des toxines nicotiniqes qui sont toutes des inhibiteurs compétitifs, les toxines muscariniques peuvent agir soit comme antagonistes, soit comme modulateurs allostériques.

Les toxines muscariniques sont presque exclusivement spécifiques des récepteurs de type m1, essentiellement présents dans le système nerveux central, par rapport aux récepteurs de types m2 que l'on observe au niveau de certains organes, comme le cœur, ou du système nerveux sympathique [3] [48].

### 3. Les toxines adrénérgiques.

Les récepteurs adrénérgiques sont potentiellement exprimés dans toutes les cellules. Au niveau du système nerveux central, ils sont impliqués dans les processus cognitifs et d'apprentissage. Les toxines adrénérgiques se lient à ce type de récepteurs [48].

**La vipoxine isolée du venin de *Daboia russelii* (Viperidae)** est l'une des rares toxines adrénérgiques connues. La vipoxine est spécifique des récepteurs adrénérgiques et n'a aucune action sur les récepteurs nicotiniques ou muscariniques, ce qui est exceptionnel chez les serpents. Elle présente une affinité égale pour les récepteurs adrénérgiques  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$ , mais n'agit pas sur les récepteurs  $\beta$ . Inoculée par voie veineuse, elle ne présente aucune toxicité. En revanche, injectée par voie intra cérébrale à l'animal, elle provoque des convulsions [3].

### 4. Les toxines gabaérgiques.

**Récemment découvertes (2015), les micruROTOXINES extraites du venin d'un serpent corail du Costa Rica *Micrurus mipartitus*,** sont les premières toxines isolées de venin ophidien à posséder une activité Gabaérgique. Elles sont issues de l'adaptation du venin à l'alimentation du serpent celui-ci se nourrissant principalement de vers dont la locomotion est régie par le récepteur GABA<sub>A</sub>.

Les deux isoformes isolés du venin et nommés : micruROTOXINE 1 (MmTX1) et micruROTOXINE 2 (MmTX2) lient le récepteur de type A de l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique du système nerveux central « GABA A » avec une forte affinité et accroît sa susceptibilité aux agonistes. En cela, elles augmentent le flux des ions chlorures créant une hyperpolarisation, mais aussi accélèrent la désensibilisation du récepteur pour autant que la toxine reste liée. En présence de la toxine, les cellules montrent une augmentation importante de la fréquence des potentiels d'action qui, de façon intéressante, se produisent en rafales ce qui ressemble à une activité épileptique.

D'autres toxines gabaérgiques ophidiennes ont été rapportées depuis. Parmi elles on peut citer : **l' $\alpha$ -cobratoxine ( $\alpha$ -CTX), une neurotoxine à 3 doigts extraite du venin du cobra de Thaïlande *Naja kaouthia*** qui a présentée, en plus de son effet curarisant, une activité inhibitrice des différents récepteurs GABA-A ( $\alpha_1\beta_2\gamma_2 \approx \alpha_2\beta_2\gamma_2 > \alpha_5\beta_2\gamma_2 > \alpha_2\beta_3\gamma_2$  et  $\alpha_1\beta_3\delta$ ) et plus spécifiquement le  $\alpha_1\beta_3\gamma_2$ . La plupart de ces sites de liaison se chevauchent avec les sites orthostériques à l'interface de la sous-unité  $\beta/\alpha$  [52] [53].

**b) Neurotoxines présynaptiques bloquantes (à activité enzymatique phospholipasique).**

Isolées de certains venins **d'Elapides**, **d'Hydrophides** et de **Vipéridés**, les  $\beta$ -neurotoxines à action présynaptique illustrent un phénomène rarement rencontré : "**la transformation d'enzymes en toxines fonctionnelles**". En effet, ces phospholipases A2 neurotoxiques constituent un modèle de transformation d'enzymes dont la fonction primaire est de dégrader les phospholipides vers la reconnaissance de cibles sur les membranes présynaptiques [50].

**1. Structure et mécanisme d'action.**

Selon leur origine ces neurotoxines présynaptiques sont composées d'une à quatre, voir cinq sous-unités selon les auteurs [3] [54]. Toutes ont en commun une fonction phospholipase A2 basique indispensable à leur activité toxique associées à des protéines acides dénuées de toxicité. La sous-unité élémentaire est constituée d'une chaîne polypeptidique d'environ 120 acides aminés, avec 6 à 8 ponts disulfures et d'un poids moléculaire compris entre 13 et 14 kDa.

Malgré de nombreuses études et mise à part la  $\beta$ -bungarotoxine, on ne connaît encore aucune cible moléculaire reconnue par les PLA<sub>2</sub> neurotoxique. On peut toutefois affirmer qu'elles agissent spécifiquement sur le système nerveux périphérique provoquant un blocage persistant de la transmission neuromusculaire qui est suivi d'une paralysie des muscles, induisant la mort par arrêt respiratoire quand elles atteignent le diaphragme.

Le développement du blocage neuromusculaire apparaît être tri-phasique via une action sur les membranes des terminaisons axonales. Lors des deux premières phases on observe successivement une inhibition puis une facilitation prolongée de la libération d'acétylcholine. La dernière phase correspond à un déclin progressif de la neurotransmission. Des observations par microscopie électronique suggèrent que les PLA<sub>2</sub> neurotoxiques induisent une déplétion des vésicules synaptiques en neurotransmetteur en promouvant leur fusion avec la membrane présynaptique et en bloquant leur relargage [18], ce qui provoque, avec une certaine latence, la paralysie des muscles respiratoires.

La toxicité des toxines présynaptiques est variable, mais dans l'ensemble souvent supérieure à celle des neurotoxines postsynaptiques. Dans les venins qui possèdent ces deux types de toxines, les activités se potentialisent.

## 2. Classification.

### a. Les neurotoxines- $\beta$ monocaténares.

Ces toxines monocaténares ne sont constituées que par la seule sous-unité phospholipasique. Certaines neurotoxines  $\beta$  monocaténares extraite d'Elapidae australien, ont une séquence en acide aminés similaire à celle des PLA<sub>2</sub> pancréatique de mammifères. Elles sont représentées par la notexine extraite du venin de *Notechis scutatus* et la pseudexine extraite du venin de *Pseudechis porphyriacus*. Les autres sont constituées d'une chaîne polypeptidique de même taille, mais dont la séquence en résidu d'acides aminés diffère de celle de la phospholipase pancréatique. Ces toxines sont extraites essentiellement de venins de Viperidae : *Daboia russelii siamensis* (daboiatoxine), *Vipera ammodytes* (ammodytoxine), *Gloydius blomhoffi* (agkistrodotoxine), *Bitis caudalis* (caudoxine) [3] [50].

### b. Les neurotoxines- $\beta$ multicaténares.

Les neurotoxines- $\beta$  multicaténares résultent d'une association de 2 à 4 ou 5 sous-unités identiques ou distinctes selon les auteurs [3] [54]. Au moins l'un des polypeptides porte la fonction phospholipasique.

#### b. 1- La $\beta$ -bungarotoxine.

La  $\beta$ -bungarotoxine est extraite du venin de *Bungarus multicinctus*. Elle se lie aux canaux potassium au niveau de la membrane présynaptique. Cette toxine est un hétérodimère constitué de deux sous-unités polypeptidiques différentes, reliées entre elles par un pont disulfure.

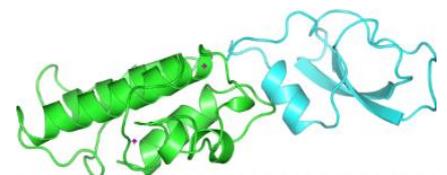


Figure 45:  $\beta$ -bungarotoxine.

L'une des sous unités (en vert sur le schéma) porte la fonction phospholipasique. Elle présente un poids moléculaire de 13 kDa et une séquence d'acide aminés similaire à celle de la phospholipase pancréatique.

L'autre (en bleu sur le schéma) est homologue à la dendrotoxine retrouvée dans le venin de mamba et possède un poids moléculaire de 7 kDa.

## b. 2- Les autres neurotoxiques- $\beta$ .

Il s'agit d'un petit groupe composé d'une dizaine de toxines appartenant aussi bien aux Elapidae qu'aux Viperidae. Ces « autres » neurotoxines proviennent d'une association de sous-unités composées de polypeptides, l'un d'entre eux portant la fonction phospholipasique. Aucune des sous-unités n'est homologue aux dendrotoxines. Ces polypeptides peuvent être identiques ou distincts, leur liaison n'est pas covalente. Ces toxines peuvent compter 2 à 4 ou 5 sous-unités.

On peut citer :

- **La cérulotoxine** extraite de *Bungarus fasciatus* et possède **2 sous-unités identiques**.
- **La crotoxine**, extraite de *Crotalus durissus terrificus*. Cet hétérodimère est composé de 2 sous-unités de structure moléculaire différentes. Une sous-unité protéique basique possédant exclusivement la fonction phospholipase A2 de faible toxicité nommée CB (Crotoxine B) et une sous-unité acide non enzymatique appelée crotapotine (CA = Crotoxine A) qui potentialise l'effet toxique en ciblant le site d'action de CB. La seconde sous-unité de taille plus réduite est dépourvue d'activité toxique et associe trois peptides qui se séparent de la sous-unité principale lorsque celle-ci se lie à son récepteur membranaire [55] [3].
- **La taipoxine** extraite d'*Oxyuranus scutellatus* possède **3 sous-unités identiques**.
- **La textilotoxine** extraite de *Pseudonaja textilis* possède **4 sous-unités** [3].

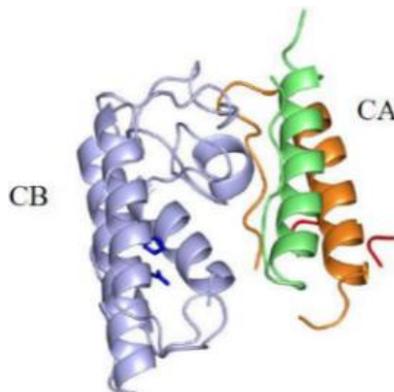


Figure 46: Crotoxine, extraite de *Crotalus durissus terrificus*.

**c) Neurotoxines facilitatrices présynaptiques / Toxines dépolarisantes (générant un bloc par dépolarisation).**

**1. Dendrotoxines.**

Appelées aussi **toxines présynaptiques facilitatrices**, les dendrotoxines se retrouvent dans les venins de *Dendroaspis* (mamba, Elapidae africain).

Ce sont des protéines de faible poids moléculaire compris entre 6 et 7 kDa, constituées d'une seule chaîne peptidique de 57 à 65 acides aminés réticulés par 3 ponts disulfures qui leur donnent une conformation pelotonnée et une certaine stabilité [3]. Ces toxines ont des similitudes structurales avec les inhibiteurs de protéases pancréatiques [50]. Plusieurs homologues de l' $\alpha$ -dendrotoxine ont été isolés, tous possédant une séquence légèrement différente. Cependant, l'architecture et la conformation moléculaire de ces protéines sont très similaires. Les dendrotoxines possèdent une très courte hélice à proximité de l'extrémité N-terminale du peptide, ainsi qu'une hélice alpha à deux tours à proximité de l'extrémité C-terminale. Un feuillet bêta antiparallèle à deux brins occupe la partie centrale de la structure moléculaire. Les résidus cystéines formant ces 3 ponts disulfures sont très conservés et sont situés entre C7 et C57, C16 et C40, C32 et C53.

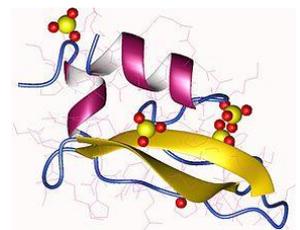


Figure 47: Structure d'une dendrotoxine extraite de *Dendroaspis*.

Ces toxines favorisent la libération d'acétylcholine par les boutons présynaptiques. Cette libération d'acétylcholine provoque une forte dépolarisation de la membrane postsynaptique. Prolongeant la durée du potentiel d'action à la jonction neuromusculaire, ce qui peut entraîner une hyperexcitabilité musculaire et des symptômes convulsifs. L'hyperexcitabilité progressive des muscles respiratoires peut provoquer une contraction tétanique conduisant à la paralysie des muscles respiratoires puis à la mort. Les dendrotoxines ne restent en contact avec leur cible que quelques minutes, mais la dépolarisation persiste longtemps après leur élimination [50].

Malgré leur homologie avec les inhibiteurs de sérine-protéase de type kunitz, les dendrotoxines ont peu ou pas d'activité anti-protéasique en revanche, elles bloquent les canaux potassique voltage-dépendants [50] et sont spécifiques des sous-types particuliers de la sous-famille Kv1 des neurones [56].

## **2. Fasciculines (3FTx).**

Ces toxines sont aussi extraites du venin des *Dendroaspis*. Leur poids moléculaire est d'environ 7 kDa, ce sont des polypeptides composés de 61 acides aminés et de 4 ponts disulfures. Mise à part leur séquence d'acides aminés constitutive de leur site actif, les fasciculines présentent une structure moléculaire à trois doigts très semblables à celle des toxines- $\alpha$  et des cytotoxines. Il n'y a cependant aucune réaction immunologique croisée avec les anticorps dirigés contre les toxines- $\alpha$ .

Le mécanisme d'action est relativement bien connu depuis la cristallographie de leur structure. Les fasciculines se lient spécifiquement à l'acétylcholinestérase et l'inhibent de façon non-compétitive en bloquant la voie d'accès du substrat au site catalytique [57] [48]. La neutralisation, de la destruction de l'acétylcholine entraîne une dysrégulation physiologique de la transmission de l'influx nerveux au niveau des jonctions neuromusculaires. La dépolarisation permanente de la membrane postsynaptique se traduit par des fasciculations musculaires qui peuvent se prolonger des heures, et à plus forte dose survient une paralysie des muscles respiratoires [50].

### **d) Cytotoxines (3FTx).**

Les venins d'**Elapidae** contiennent une grande quantité de cytotoxines. Les cytotoxines de venin de serpents sont des protéines amphipatiques fortement basiques, constituant 40 à 70% du venin de cobra (*Naja et Haemachatus*). Les méthodes utilisées dans leur détection initiale ont conduit à l'attribution de noms descriptifs de ces toxines en fonction de leurs nombreuses propriétés comme : facteurs lytiques directs, cardiotoxines, cobramines, cytolysines, hémolysines, membranotoxines, etc. [58] [3].

## 1. Structure.

Il existe de nombreux isoformes de cytotoxines [82]. Les cytotoxines appartiennent à la famille des toxines à trois doigts. Elles possèdent une masse moléculaire d'environ 7kDa, contiennent 60 à 65 résidus d'acides aminés. Toutes les cytotoxines de venin cobra ont une structure 3D similaire stabilisée par quatre liaisons disulfures. Les cytotoxines présentent des propriétés amphiphiles fortes sur leur surface moléculaire : des bouts apolaires des boucles I-III qui forment un noyau hydrophobe flanqué d'un "anneau" chargé positivement composé principalement de résidus Lys et Arg conservés qui sont groupés près de la région N-terminale de la protéine et par une région moins polaire C-terminale. En général, la plupart des cytotoxines sont des molécules fortement chargées positivement qui ont des cartes de potentiel de champ électrostatique très étendues. Leur champ électrostatique permet probablement aux cytotoxines de rechercher et d'interagir avec les phospholipides anioniques à travers de longue distance [58].

Longtemps considérées comme n'existant que sous la forme de monomères, les cytotoxines sont maintenant connues pour former des dimères. Par exemple, un dimère neurotoxique contenant une cytotoxine a été isolé à partir du venin de *Naja kaouthia*. Ce dimère est constitué d'une  $\alpha$ -neurotoxine à trois doigts liés à la cytotoxine via des liaisons disulfures. L'activité cytolytique de la cytotoxine est complètement perdue lors de son association à l' $\alpha$ -neurotoxine [58].

Lors de la purification des cytotoxines, des contaminations ont pendant longtemps été à l'origine des effets observés. On a pu constater à partir de ces contaminations l'existence d'une grande synergie entre cytotoxines et phospholipases. Leur contamination réciproque induit une forte augmentation du pouvoir cytolytique des deux. Cependant leur relation reste confuse [3].

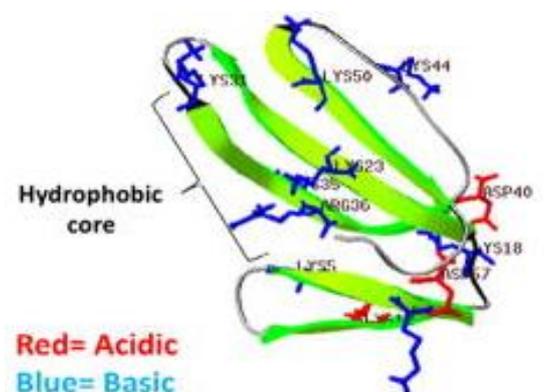


Figure 48 : Structure d'une cardiotoxine III extraite de *Naja naja atra*.

## 2. Mécanisme d'action.

Pathologiquement, les cytotoxines sont responsables de myotoxicités sévères, d'hémolyses et de nécroses chez les personnes affectées. La plupart des activités pathologiques des cytotoxines sont basées sur leur capacité à se lier aux membranes cellulaires induisant des modifications de l'organisation et de la fonction des bicouches lipidiques [3]. Les cytotoxines présentent une activité sur divers types cellulaires : les érythrocytes, les lymphocytes, les myocytes cardiaques, les cellules de rate et diverses cellules tumorales. Elles provoquent principalement la lyse des membranes cellulaires par différents modes d'actions. Le mécanisme d'action de chaque cytotoxine est fonction du type de membrane avec laquelle elle interagit [59]. En effet, suivant le type de membrane concerné, c'est-à-dire suivant les protéines membranaires et les phospholipides présents sur le feuillet externe de la membrane plasmique, elles n'utiliseront pas les mêmes régions de leur molécule et donc n'utiliseront pas les mêmes mécanismes [3][38].

Le noyau hydrophobe des cytotoxines représente le motif de liaison principal à la membrane cellulaire. Lors de la liaison, les cytotoxines produisent des défauts structurels dans les bicouches lipidiques qui conduisent à la formation de pores. Bien que le mécanisme moléculaire d'action précis reste à élucider, il est bien admis que les résidus de base Lys et Arg chargés positivement, sont nécessaires pour l'interaction des cytotoxines avec les phospholipides situés sur la face extérieure des bicouches lipidiques. En effet, les cytotoxines possèdent une forte affinité avec les lipides chargés négativement, leur interaction peut provoquer la dimérisation des cytotoxines, ce qui conduit éventuellement à l'oligomérisation, étape critique vers la formation de pores membranaires [58].

Le plus souvent, les cytotoxines dépolarisent rapidement et de façon irréversible la membrane cytoplasmique des cellules excitables ce qui va induire sa lyse. Elles activent la phospholipase C qui hydrolyse les triglycérides de la membrane, ce qui induit d'une part l'altération de la membrane et d'autre part une inhibition de la pompe calcium/magnésium qui provoque la libération de calcium dans le milieu extracellulaire. L'augmentation de concentration en calcium déclenche la contraction musculaire. Cette action dépolarisante concerne les muscles striés, lisses et cardiaques ainsi que, dans une moindre mesure, les neurones. Le fait que seule la cellule excitable soit lysée conforte l'hypothèse de l'existence d'un récepteur cytoplasmique des cellules excitables [3].

### e) Myotoxines.

On rencontre essentiellement les myotoxines dans les venins des *Crotalus*. Ce sont des peptides de faible poids moléculaire, environ 5 kDa, elles sont composées de 42 à 45 acides aminés et de 3 ponts disulfures. Mise à part la myotoxine extraite de *Philodryas* qui possède un poids moléculaire de 20 kDa et contient 182 acides aminés et 3 ponts disulfures.

Les myotoxines sont **dépourvues d'activité enzymatique**, elles agissent en altérant directement la structure des membranes. Ces enzymes myotoxiques possèdent un large éventail de fonctions biologiques. Elles entraînent, par exemple, la myonécrose en se fixant sur les canaux ioniques des cellules musculaires squelettiques. **Ainsi la myotoxine extraite du venin de *Crotalus viridis* agit sur le canal calcique. Quant à la crotamine extraite du serpent à sonnette sud-américain *Crotalus durissus terrificus* intervient sur les canaux sodiques** [60].

**La crotamine** a été la première myotoxine à être identifiée et isolée dans les années 1950. C'est l'un des composants les plus abondants du venin correspondant à environ 10% du poids sec du venin.

Il s'agit d'un polypeptide basique (9lys et 2arg) de faible poids moléculaire, 4,88kDa avec un point isoélectrique supérieur à 9,5. Plusieurs isoformes existent. La structure primaire est constituée de 42 acides aminés dont 6 cystéines formant 3 ponts disulfures qui rendent la structure très compacte, stable et chargée positivement. La structure secondaire présente une hélice- $\alpha$  N-terminal (en rouge) ainsi qu'un feuillet  $\beta$  à 3 brins antiparallèles (en bleu) [61] [62].

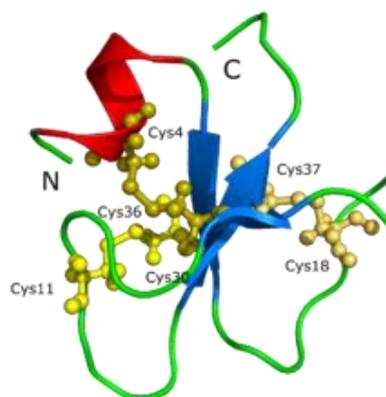


Figure 49: Crotamine extraite de *Crotalus durissus terrificus*.

La crotamine provoque des spasmes musculaires squelettiques et une paralysie spastique rapide. Aux niveaux cellulaire et moléculaire, la crotamine induit une augmentation du courant de sodium voltage-dépendant en provoquant une dépolarisation élevée de la membrane des myocytes des fibres musculaires à côté des plaques motrices. L'afflux massif d'ions de sodium provoque une dilatation du réticulum sarcoplasmique des myocytes et l'induction lente de la myonécrose limitée aux cellules des muscles squelettiques.

La crotamine possède un large éventail de fonctions biologiques avec des applications biotechnologiques et thérapeutiques potentielles [63]. En plus de ses actions **myotoxique** et **myonécrotique**, la crotamine peut aussi **potentialiser la sécrétion d'insuline**. Les isoformes (F2 et F3) peuvent être des outils précieux pour étudier l'implication des canaux Na (+) dans le mécanisme de la sécrétion d'insuline [64]. La crotamine présente également une activité **analgésique** [62] et **antimicrobienne** : antibactérienne par perméabilisation de la membrane lipidique (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*), antifongique (*Candida spp*, *Trichosporon spp*. et *Cryptococcus.neoformans*) [65]. La crotamine possède aussi la **capacité de pénétrer rapidement dans différents types cellulaires et blastocystes**. Elle apparaît également comme un **marqueur de cellules proliférant activement** en s'associant spécifiquement aux centrosomes ce qui permet de suivre le processus de duplication et de séparation du centriole [66].

Cette multitude d'effets biologiques la rend particulièrement intéressante pour le développement de **nouveaux traitements analgésiques ou comme agent anticancéreux**. De nombreuses études de recherches sont d'ailleurs actuellement en cours à cet effet.

#### f) Sarafotoxines.

Les sarafotoxines ont été extraites du venin d'*Atractaspis*, serpent fouisseur proche-oriental. Ce sont des peptides d'environ 2,5 kDa. Elles présentent toutes un motif structural commun composé de 21 acides aminés et de deux ponts disulfures invariants entre les cystéines 1 et 15 et les cystéines 3 et 11. Plusieurs isoformes de sarafotoxines peuvent coexister au sein d'un même venin [18].

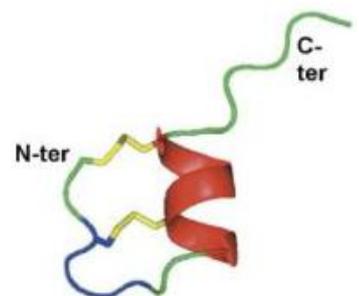


Figure 50: Structure d'une sarafotoxine [14].

Les sarafotoxines et les endothélines adoptent la même conformation de type CSH (Cysteine stabilize  $\alpha$ -helical motif) caractérisé par une structure étendue des 4 acides aminés N-terminaux (en vert), un coude  $\beta$  entre les résidus 5 et 8 (en bleu), une conformation en hélice- $\alpha$  du segment Lys 9-Cys 15 (en rouge) et l'absence de conformation du domaine C-terminal (en vert) [67] [18].

On distingue à ce jour deux familles de sarafotoxines :

- Les sarafotoxines dites « courtes », extraites du venin d'*Actractaspis engaddensis* et *A. bibroni*.
- Les sarafotoxines dites « longues », extraites du venin d'*A. microlepidota*, *irregularis*, *fallax* et *aterrima* qui présentent une extension dans leurs extrémités C-terminales de 3 ou 4 acides aminés. Les derniers résultats expérimentaux suggèrent que ces nouveaux peptides puissent exercer leur toxicité en reconnaissant d'autres cibles biologiques, celles-ci restant à être identifiées [1].

Les sarafotoxines sont **très proches fonctionnellement et structurellement des endothélines** qui sont des hormones vasoconstrictrices naturellement présentes en très faible quantité dans les cellules endothéliales des mammifères [3]. Les deux forment ensemble une famille homogène de puissants vasoconstricteurs [67].

Les approches biochimiques classiques combinées à la biologie moléculaire ou à la spectrométrie de masse, plus récentes, permettent de mieux comprendre ce qui rapproche et différencie sarafotoxines et endothélines.

Les sarafotoxines et les endothélines ont environ 60 % d'homologie de séquences. Les endothélines ayant pour effet de se lier aux récepteurs des cellules musculaires lisses de différents organes vitaux, jouent un rôle important dans la régulation des fonctions vasculaires, ainsi que dans diverses manifestations cardiopathophysiologiques, telles que l'hypertension, les défaillances rénales aiguës, ou l'angine de poitrine [67].

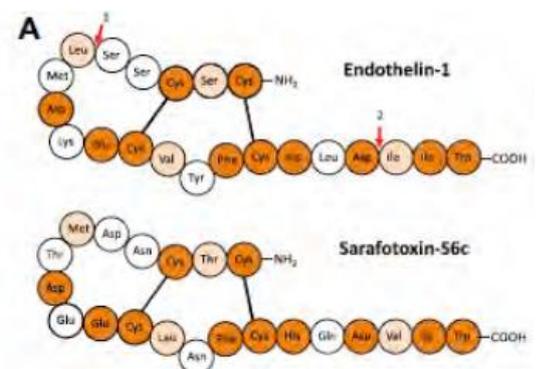


Figure 51: Comparaison structurale de la sarafotoxine avec une endothéline [67].

### **g) Les toxines inhibitrices des canaux calciques de type-L (3FTxs).**

Les inhibiteurs des canaux calcium type-L (Cav1) isolés des venins ophidiens appartiennent pour la plupart à la famille des toxines à trois doigts (3FTxs). Ces canaux sont impliqués dans une multitude de processus physiologique comme la contraction musculaire, la sortie de neurotransmetteur, etc. Les inhibiteurs des canaux calciques de type L ont un effet vasodilatateur artériel périphérique et coronarien prépondérant mais une activité infime sur la conduction du tissu cardiaque. On constate ainsi une baisse de la pression artérielle sans modification du rythme cardiaque.

#### **1. Calciseptine et FS2 (3FTx).**

La calciseptine et son homologue la FS2 sont des inhibiteurs de protéines membranaires non neurales. Elles inhibent les canaux calciques de type L, provoquant le relâchement des muscles lisses et inhibant la contraction cardiaque [48] [68].

Isolée du venin du mamba noir (*Dendroaspis polylepis polylepis*), la calciseptine est un peptide constitué de 60 acides aminés dont 8 cystéines formant 4 ponts disulfures. Ce peptide appartenant à la famille des toxines à trois.

La calciseptine, bloque sélectivement type L canaux  $Ca^{2+}$  et est totalement inactive sur d'autres canaux  $Ca^{2+}$  voltage-dépendants tels que le type N et canaux de type T. A ce jour, il s'agit du seul polypeptide naturel qui a été montré comme étant un inhibiteur spécifique de type L canaux  $Ca^{2+}$  [68].

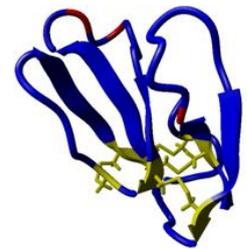


Figure 52: Calcipsetine extraite de *Dendroaspis*.

#### **2. Autres.**

La **calciclude** extraite du venin de mamba vert *Dendroaspis angusticeps* est un inhibiteur non spécifique des canaux calciques de type L, elle entraîne une réduction de la contraction des muscles cardiaques. La **taicatoxine** isolée du venin du Taipan australien *Oxyuranus scutellatus scutellatus*, qui n'est pas une 3FTxs, possède un tropisme cardiaque ainsi qu'une activité inhibitrice sur les canaux calciques cardiaques voltage dépendant, ce qui se traduit par une bradycardie de type sinusale [69].

## h) Désintégrines.

Les désintégrines inhibent les récepteurs de type intégrine, qui sont des hétérodimères transmembranaires permettant le transfert des messages extracellulaires vers le cytoplasme [3]. Le terme « désintégrine » a été inventé en 1990 après la découverte de la première protéine purifiée à partir du venin de serpent *Agkistrodon halys*, pour décrire une famille de protéines du venin de vipère qui a la capacité de neutraliser l'agrégation plaquettaire par inhibition efficace du récepteur plaquettaire du fibrinogène GPIIbIIIa ( $\alpha$ Ib  $\beta$ 3) [70]. Plutôt présentes dans les venins de Viperidae, une centaine de désintégrines solubles ont été caractérisées dans les venins des quatre familles ophidiennes (Atractaspididae, Elapidae, Viperidae et Colubridae).

### 1. Structure.

Les désintégrines forment une famille de polypeptides non enzymatiques et de faible masse moléculaire comprise entre 4 et 15 kDa. Leur structure primaire se compose de 40 à 100 acides aminés riches en cystéine et de 4 à 8 ponts disulfures avec une forte conservation dans l'arrangement des cystéines. Elles peuvent être solubles ou membranaires [70]. Bien que la plupart des désintégrines des venins de serpents soient des monomères, certaines sont retrouvées sous la forme homo- ou hétérodimère. La majorité de ces protéines constituent le domaine C-terminal des métallo-protéases de la classe PII et sont libérées dans le venin par clivage protéolytique [31]. Les désintégrines possèdent une structure non régulière caractérisée par un nombre variable de coudes et de boucles pour former un « corps » protéique rigide stabilisé par des liaisons hydrogènes [70].

Boucle d'adhésion et motif de reconnaissance, l'inhibition des intégrines est modulée par l'appariement approprié des cystéines, qui déterminent la conformation de la boucle d'adhésion inhibitrice des désintégrines. **La plupart des désintégrines contiennent une séquence consensus d'adhésion « RGD » (Arg-Gly-Asp)**

**bien conservé.** Cette séquence se trouve au niveau d'une boucle en « épingle à cheveux » stabilisée à la base par deux ponts disulfures. La boucle RGD est douée d'une grande mobilité

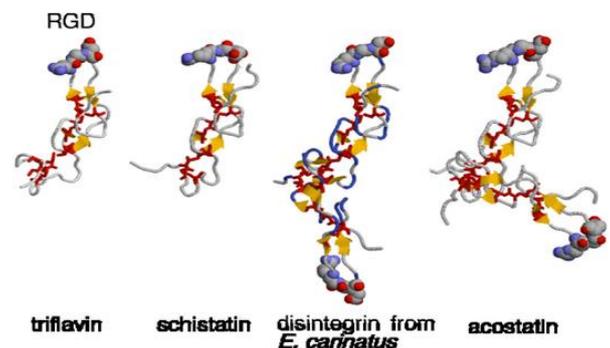


Figure 53: Structure tridimensionnelle de quelques désintégrines et leur motif RGD.

lui permettant une reconnaissance et une liaison rapide aux sites de liaison au niveau des intégrines [71].

Le motif tripeptide RGD représente le peptide bioactif le plus commun spécifique des intégrines  $\alpha_{IIb}\beta_3$ ,  $\alpha_V\beta_3$ , et  $\alpha_V\beta_1$ . Néanmoins, ce motif classique d'adhésion peut être remplacé chez certains membres par plusieurs autres motifs tripeptides distincts, dont les motifs : KGD (Lys-Gly-Asp), MVD, MLD, WGD, VGD, ECD, MGD, RTS ou KTS. Cela modifie leurs affinités et aboutit à un changement de spécificité de cible vis à vis des divers sous-types d'intégrines. Les désintégrines dimériques montrent la plus grande diversité de séquences dans leurs motifs de reconnaissance des récepteurs intégrines. Les résidus d'acide aminé voisins et "microenvironnement" conséquent autour du motif d'adhésion RGD influencent aussi l'affinité obligatoire [70] [31].

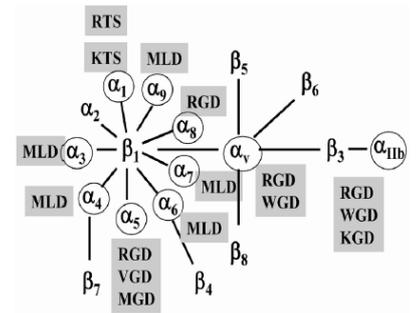


Figure 54: Diagramme de la famille des intégrines et les différents motifs inhibiteurs trouvés dans les désintégrines [70].

## 2. Classification.

La famille des désintégrines peut être classée en cinq groupes différents selon la longueur des polypeptides et le nombre des ponts disulfures :

FAMILLES DE DESINTEGRINES	TOXINES
Désintégrines courtes (41 à 51 aa) Réticulées par 4 ponts disulfures.	Echistatine extraite du venin d' <i>Echis carinatus</i> , Eristostatine extraite du venin d' <i>Eristocophis macmahoni</i> .
Désintégrines moyennes ou intermédiaires (68 à 73 aa). Réticulées par 6 ponts disulfures.	Tigramine extraite du venin de <i>Trimeresurus gramineus</i> , Kistrine extraite du venin de <i>Calloselasma rhodostoma</i> , Flavoviridine extraite du venin de <i>Protobothrops flavoviridish</i> Botroxostatine extraite du venin de <i>Bothrops atrox</i> .
Désintégrines longues (84 aa). Réticulées par 7 ponts disulfures.	Bitistatine extraite du venin de <i>Bitis arietans</i> .
Désintégrines-like (100 aa). Réticulées par 8 ponts disulfures.	
Désintégrines dimériques (67 aa/ss-unité). Réticulées par 4 ponts disulfures intra-chaînes et 2 ponts inter-chaînes.	

Tableau 2 : Famille de désintégrines et toxines associées.

### 3. Diversité fonctionnelle et intérêts.

En inhibant les intégrines, les désintégrines bloquent la transmission des signaux de croissance, migration et différenciation venant de l'extérieur [3].

Les désintégrines exercent leur action en fonction de l'intégrine ciblée. Par exemple une désintégrine ophidienne peut cibler une intégrine à la surface d'un leucocyte ce qui perturbera l'action de ce dernier. Une autre désintégrine peut cibler des polynucléaires neutrophiles, etc. Une même désintégrine peut aussi cibler plusieurs intégrines ce qui aura pour effet plusieurs effets distincts.

La spécificité des désintégrines est directement liée à la variabilité des récepteurs membranaires qu'elles reconnaissent. La plupart inhibent les intégrines  $\beta 1$  et  $\beta 3$  exprimées par les plaquettes et l'endothélium et auront donc de multiples impacts tant au niveau de la diversité des systèmes concernés (réponse inflammatoire, défense immunitaire, coagulation sanguine, régulation hormonale) que des effets induits sur ces dernières (interruption de la transmission des signaux extérieurs, inhibition de la cytoadhérence, blocage de l'agrégation plaquettaire, etc.) [3].

Les désintégrines forment un groupe d'inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire qui perturbent les interactions entre l'intégrine GPIIb/IIIa ( $\alpha \text{IIb}\beta 3$ ) et le fibrinogène. Pour les cellules non plaquettaires, les désintégrines ont été utilisées le plus fréquemment dans les modèles angiogéniques, de migration neutrophile, de détachement rétinale tractionnaire, de métastases expérimentales et de la thrombocytopénie associée aux infections bactériennes Gram+. Les désintégrines sont capables d'inhiber les fonctions des cellules exprimant les intégrines  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha \nu\beta 5$ ,  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha \nu\beta 3$  et  $\alpha \text{IIb}\beta 3$ . Cette inhibition empêche les cellules cancéreuses d'envahir les matrices artificielles des tissus connectifs et d'adhérer aux ligands natifs (fibronectine, vitronectine, collagène de type IV, fibrinogène, VCAM-1 et laminine).

L'intérêt des désintégrines dépasse ainsi leurs interactions sur l'agrégation plaquettaire. Cette famille exclusive de molécules d'adhésion fournit des intérêts significatifs pour l'étude des interactions entre les cellules et leur environnement extra cellulaire. Les désintégrines se sont avérées être utiles dans l'évaluation des signaux intracellulaires d'adhésion, de l'apoptose, de l'angiogenèse, de la caractérisation des cellules cancéreuses, des thromboses, des hémostases, de l'évolution des protéines et de la motilité cellulaire.

### **i) Toxines à activités analgésiques (3FTx).**

De nombreuses toxines à trois doigts extraits de venin d'Elapidae ont été découvertes pour présenter une activité analgésique. Parmi elles on peut citer la **mambalgine** dernièrement découverte dans les venins de mambas vert et noir, *Dendroapsis angusticeps* et *Dendroapsis polylepis*. La **najanalsésine** extraite du venin de *Naja naja atra*. L'**hannalgésine** extraite du venin du cobra royal *Ophiophagus hannah*. La **cobratoxine**, une  $\alpha$ -neurotoxine à chaîne longue extraite du venin de *Naja kaouthia* (cobra à monocle de Thaïlande) et *Naja siamensis* (cobra cracheur d'Indochine) [72]. La **cobrotoxine**, une  $\alpha$ -neurotoxine à chaîne courte extraite du venin du cobra de Taiwan, *Naja naja atra* [73]. D'autres toxines extraites du venin de *Crotalus durissus terrificus* (Viperidae) ont présenté des propriétés analgésiques parmi leur panel d'activités. On peut citer la **crotoxine** (une phospholipase A<sub>2</sub> neurotoxique ou  $\beta$ -neurotoxine), la **crotamine** (une myotoxine) et la crotalphine.

Parmi les nombreuses toxines découvertes, beaucoup présentent un potentiel thérapeutique important, et bien que certaines d'entre elles proviennent de serpents appartenant à une même famille, voire à une même espèce les spécificités de cible et les mécanismes d'action sont souvent bien différents [74].

L'analyse structurale et fonctionnelle de chacune de ces toxines à activité analgésique sera développée ultérieurement.

### **j) Toxines à activité anticoagulantes : Les Hemextines (3FTx).**

Les hemextines A et B ont été isolées du venin du cobra africain Ringhals, *Hemechatus haemechatus*. Lorsqu'elles s'associent en un complexe AB, elles inhibent l'activité protéasique du facteur VIIa ce qui empêche la coagulation [48]. Individuellement, l'Hemextine A possède une légère activité anticoagulante alors que Hemextine B n'en possède aucune. Cependant, lorsque les 2 molécules s'associent formant le complexe AB, on observe que l'hemextine B augmente de façon synergique la puissance d'action de l'**hemextine A**. La puissante activité anticoagulante est donc due à une véritable synergie d'action des deux toxines. Le complexe hemextine AB est le premier anticoagulant naturel connu qui inhibe spécifiquement l'activité enzymatique du facteur de la coagulation VIIa en l'absence du facteur Xa. Il s'agit aussi du seul hétérodimère connu constitué de deux toxines à 3 doigts [75].

## D) Autres composés.

### 1) Lectines de type C (CTL).

Les lectines sont une grande famille de glycoprotéines d'origine non-immune capables de se lier spécifiquement de manière non covalente et réversible à certains glucides, hydrates de carbone et glycoconjugués. Elles ne montrent aucune activité enzymatique pour ces substrats [76]. Les lectines sont des molécules ubiquitaires, largement représentées dans la nature, on les retrouve au niveau des plantes, des bactéries, des vertébrés et des champignons, chez les microorganismes (virus, bactéries), chez les plantes, chez les insectes et les animaux. **Le terme « lectine de type-C » (CTL) a été introduit pour distinguer le groupe des lectines animales  $\text{Ca}^{2+}$  dépendantes (type-C) dont l'interaction sucre-protéine se fait par l'intermédiaire d'un atome de calcium, des autre lectines  $\text{Ca}^{2+}$  indépendantes [77].** Les lectines C sont largement distribuées au sein des venins de serpents. Elles ont été retrouvées à partir de la famille de serpents Viperidae et Elapidae, comprenant les genres *Bothrops*, *Crotalus*, *Bitis*, *Agkistrodon*, *Lachesis*, *Dendroaspis* et *Trimeresurus*.

#### a) Structure.

L'étude structurale des lectines de type C a permis de découvrir que la liaison aux sucres est médiée par un domaine CRD « Carbohydrate Recognition Domain ». Ce domaine est uniquement présent chez les lectines de type C dépendantes du  $\text{Ca}^{2+}$ , il est représenté par trois acides aminés (Gln-Pro-Asp) caractéristiques et hautement conservés. Cependant, toutes les protéines contenant ce domaine ne peuvent lier les sucres ou le  $\text{Ca}^{2+}$  [77].

### **b) Classification.**

Les lectines de type C ophidiennes peuvent ainsi être classées en deux grands groupes :

- Les **lectines vraies** : Elles sont  $\text{Ca}^{2+}$  dépendantes avec un domaine CRD qui lie des sucres spécifiques de façon réversible et non covalente. Ces lectines possèdent une structure homodimérique avec des ponts disulfures inter-chaînes qui forment par multimérisation de grands homo-oligomères.
- Les **lectines-like (C-type lectin-like)** également appelées « snaclecs » (pour snake venom C-type lectins), (voir : métallo-protéases) : Dépourvues de la boucle de fixation au sucre et au calcium, leur domaine CRD est incapable d'interagir spécifiquement avec les sucres. Ces lectines possèdent une structure hétérodimérique. Leur structure de base se compose des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ . En s'associant, les hétérodimères peuvent former des complexes oligomériques d'hétérodimères. Ces protéines sont les plus fortement représentées au niveau du venin de serpent [77] [76] [78] [79] [80] [81].

### **c) Activité fonctionnelle biologique.**

En dépit de leur structure primaire hautement conservée, les lectines de type C sont caractérisées par des activités fonctionnelles et biologiques variées et différentes pour chacune d'entre elles [77]. Cette diversité fonctionnelle est probablement due à leurs différentes spécificités de reconnaissance de cible. Il est donc important d'identifier les cibles pour connaître les effets. Le mécanisme d'action des lectines de type C repose sur leur capacité de reconnaissance spécifique des différents sucres/glycoprotéine de signalisation situés à la surface des cellules. Leur interaction conduit à la transmission de signaux communiquant un message précis à la cellule.

Les lectines de venin de serpent sont capables de favoriser une diversité d'effets biologiques. Les lectines présentent des activités différentes.

**Une activité d'hémagglutination** c'est-à-dire agglutination des érythrocytes).

**Une activité mitogène** en favorisant la prolifération de certaines cellules (lymphocytes, macrophages, cellules endothéliales artérielles bovines, cellules mononucléaires, etc.). La CML extrait d'*Akgistrodon piscivorus leukostoma* stimule la mitose des lymphocytes T [78].

**Une activité sur la cascade de la coagulation.** On peut citer par exemple la **bothrojaracine**, une lectine C « snalec » bicaténaire, extraite du venin de *Bothrops jararaca* qui inhibe la thrombine naturelle.

**Une activité modulatrice de la fonction plaquettaire** : Certaines sont agonistes (généralement multimériques) et d'autres antagonistes (hétérodimérique) de l'agrégation plaquettaire [77]. Elles peuvent se lier au facteur de la coagulation sanguine (Facteur von Willebrand) ou directement à la surface des plaquettes via différentes intégrines (GPIb,  $\alpha 2\beta 1$ , GPVI, etc.) [81] [78]. La **botrocétine** voisine de la bothrojaracine et issue du venin de *Bothrops jararaca* et la **bitiscétine** isolée du venin de *Bitis arietans* qui sont des agrégants plaquettaires induisent la liaison du facteur von Willebrand (vWF) au GPIb, présent au niveau des plaquettes, entraînant ainsi leur agglutination [77]. La **convulxine**, issue du venin de *Crotalus durissus terrificus* agit sur le récepteur majeur pour le collagène au niveau des plaquettes : le GPVI))

**Une activité inflammatoire** : Certaines lectines stimulent la dégranulation des mastocytes et des macrophages permettant la libération de médiateurs pro-inflammatoires (histidine, sérotonine, Il-6, TNF- $\alpha$ , etc.), ce qui déclenche une réponse inflammatoire locale. Elles peuvent induire l'induction d'**œdèmes** pouvant être associées à une augmentation de la perméabilité vasculaire locale [78] ou encore favoriser le **roulement des leucocytes** [76]. D'autres agissent sur **les neutrophiles** où elles favorisent leurs migrations par chimiotaxie ou se lient aux glycoligands de leur surface améliorant ainsi leur polarisation, migration, adhérence, activité de phagocytose et leur production de superoxyde.

Certaines lectines sont capables d'induire des modifications des **paramètres fonctionnels rénaux** (pression de perfusion, résistance vasculaire, le débit urinaire, débit de filtration glomérulaire et transport d'ions tubulaires). Elles agissent directement par cytotoxicité directe

au niveau glomérulaire et/ou indirectement par participation des médiateurs pro-inflammatoires systémiques tels que les prostaglandines [78].

Une **activité antibactérienne** : Lors du processus d'infection par l'agent pathogène, l'adhérence à la cellule hôte implique des interactions protéine-glycane, les glycoconjugués de surface de la cellule pathogène représentent une cible potentielle pour les lectines [76] [78].

Des interactions avec les récepteurs HSR de la ryanodine déclenchant la libération de calcium dans le réticulum sarcoplasmique des muscles squelettiques et la contraction musculaire. Ces lectines peuvent se montrer utiles comme outil pharmacologique dans l'étude fonctionnelle de la libération de calcium à partir de THV dans le muscle squelettique afin d'élucider le mécanisme moléculaire de calcium à libération impliquant des récepteurs ryanodines [78].

Une activité **anti-tumorale et anti-angiogénique** :

- Par cytotoxicité spécifique et directe, induite par signal apoptotique sur les tumeurs par reconnaissance et interaction avec des glycoconjugués spécifiques de la membrane des lignées de cellules tumorales (effet antitumoral). Mais aussi sur les cellules endothéliales par interaction avec les intégrines (Effet anti-angiogénique) [77].
- Par inhibition de l'adhérence, migration, prolifération et invasion des différentes lignées de cellules cancéreuses.

Les altérations génétiques dans les cellules tumorales malignes sont associées à des changements dans leurs schémas de glycosylation par rapport aux cellules normales, qui comprennent une expression accrue de terminaux inhabituels de séquences glucidiques. Certaines lectines sont capables d'induire une toxicité contre une grande variété de lignées de cellules tumorales par la reconnaissance des glycoconjugués de la membrane [78].

## **2) Facteur de croissance des nerfs « NGF ».**

Le facteur de croissance des nerfs aussi appelé NGF (*Nerve Growth Factor*), est essentiellement présent dans **le venin des Elapidae**, il a été découvert par hasard dans le venin de cobra.

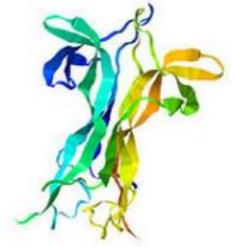


Figure 55 : Structure moléculaire du NGF.

Fréquemment retrouvée sous forme dimérique, cette protéine constituée de 116 acides aminés, NGF possède un poids moléculaire compris entre 20 et 40 kDa, ses 3 ponts disulfures lui donnent un aspect pelotonné.

Le NGF est entièrement dépourvu de toxicité et de toute activité enzymatique. Il favorise la différenciation des neurones sensoriels des ganglions sympathiques [3]. Une application éventuelle est possible pour les maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer entre autres [82].

## **3) Facteur du venin de cobra « CVF ».**

Le facteur du venin de cobra ou « CVF » (*Cobra Venom Facteur*) est un activateur du complément sérique. Il intervient principalement sur la fraction 3 du complément (C3), et dans une moindre mesure sur la fraction 5 (C5). Le CVF est composé d'une chaîne polypeptidique et d'une ou plusieurs chaînes oligosaccharidiques reliées entre elles par des ponts disulfures. C'est sur la chaîne peptidique que se situe la zone fonctionnelle de la molécule. Cependant il semblerait que les chaînes saccharidiques soient primordiales au bon fonctionnement du CVF. Le poids moléculaire moyen des CVF connus est compris entre 130 et 160 kDa.

D'autres molécules sont probablement impliquées dans l'activation du complément. Une étude a montré par exemple l'implication du venin brut du serpent *Bothrops asper* et de sa métalloprotéase BAP-1 purifiée dans l'activation de la fraction C5 du système du complément ce qui contribuait à induire le recrutement leucocytaire et la migration des neutrophiles [83].

#### **4) Facteurs cardiaques natriurétiques : La dendropeptine (hormone).**

Le venin de serpent représente une source importante de peptides natriurétiques. Parmi eux on peut citer la dendropeptine qui a été isolé du venin de *Dendroaspis angusticeps*. Cette hormone se compose de 38 acides aminés et d'un pont disulfure donnant à la molécule la conformation d'une boucle toujours constituée de 17 acides aminés. La dendropeptine fait partie de la famille des facteurs cardiaques natriurétiques (atriopeptine, atrial natriurétique peptide) du fait de sa structure et ses propriétés. C'est un compétiteur direct de l'atriopeptine. La dendropeptine joue un rôle hormonal dans la régulation de la pression artérielle. Elle inhibe l'aldostérone, favorise l'élimination rénale du sodium et possède une action vasodilatatrice. De plus, la dendropeptine favorise au niveau des cellules endothéliales la libération du second messager hormonal (adénosine monophosphate cyclique ou guanosine monophosphate cyclique) [3].

#### **5) Inhibiteurs et activateurs enzymatiques.**

Certaines protéines ophidiennes présentent une activité spécifique sur certaines enzymes naturelles des vertébrés. Elles possèdent des propriétés différentes et agissent sur divers mécanismes physiologiques en fonction de l'espèce dont est issu le venin. Elles sont généralement dépourvues d'effet clinique toxique, mais certaines présentent un grand intérêt pharmacologique. Ainsi, **des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I en angiotensine II ou « IEC »** ont été découverts dans certains venins. L'IEC extrait du venin de *Bothrops jararaca* a notamment suscité un grand intérêt thérapeutique et, après de multiples études, est devenu le chef de file des d'antihypertenseurs. On suppose qu'il existe d'autres inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine dans certains venins de Viperidae comme *Bitis arietans*. L'action des inhibiteurs de l'enzyme de conversion entraîne la disparition de l'angiotensine II dont l'action vasoconstrictrice ne s'exercera plus, la disparition de l'aldostérone qui assure la rétention du sodium et l'augmentation de la bradykinine et des prostaglandines (deux vasodilatateurs puissants). Le résultat de ces mécanismes est une baisse brutale des résistances périphériques qui se traduit par une chute de la pression artérielle. Celle-ci est rapide (quelques minutes) après l'inoculation du venin et importante. Le rythme cardiaque n'est pas modifié, ce qui exclut une toxicité cardiaque directe [3].

Il est intéressant de signaler que beaucoup d'enzymes et toxines appartenant à d'autres familles précédemment citées inhibent ou activent des enzymes. Par exemple certaines protéases, lectines de type C, etc. agissent sur les mécanismes enzymatiques de l'hémostase.

### **III Variabilité des venins.**

La variabilité des venins a été soupçonnée depuis l'antiquité sur des considérations cliniques et, plus tard, expérimentales. Elle a ensuite été largement confirmée par des techniques biochimiques puis immunologiques. La composition complexe et très variable des venins peut être influencée par des facteurs tels que l'âge, le sexe, le régime alimentaire, les différentes périodes de reproduction ou d'hibernation, l'emplacement géographique de l'échantillon, etc. Cependant les **variations saisonnières et physiologiques** semblent s'effacer devant la variabilité **génétique** propre à chaque individu. Elles portent à la fois sur la concentration des différentes fractions et sur leur structure biochimique. En revanche, et il est reconnu qu'à l'échelle de **l'évolution**, les facteurs environnementaux et les opportunités alimentaires ont conditionné la spécialisation des venins.

Le mélange de substances au sein d'un même venin conduit à des actions pharmacologiques complexes. Elles peuvent être **synergiques** entre elles, **antagonistes** ou **indifférentes**. La grande variabilité biochimique et toxicocinétique rend compte de tableaux cliniques très différents selon les espèces, les pays, voire les circonstances. Les venins diffusent rapidement dans les tissus. L'affinité, très variable selon les toxines ou les organes, conduit à une élimination qui peut être lente, de quelques heures à plusieurs jours, voire d'une ou deux semaines. L'excrétion du venin est le plus souvent rénale [2].

Les variabilités de venin sont tellement grandes qu'il est important de bien déterminer la méthodologie à employer car les différentes techniques utilisées peuvent induire des biais au sein des résultats. **L'impact de ces variations biochimiques peut aussi poser un problème d'un point de vu immunologique.** Ainsi les anticorps utilisés dans le traitement des envenimations présenteront une efficacité moindre au vu des écarts de composition des venins d'individus de la même espèce mais d'origine différente. Le mélange aléatoire de venins au sein des antivenins est une précaution qui a paru insuffisante, pour l'Organisation Mondiale de la Santé, puisqu'elle a été amenée à créer un centre international de venins de référence pour étudier ce problème et lui trouver une parade.

### **A) Variations phylogéniques.**

Il y a tout d'abord une grande variabilité entre les différentes familles ophidiennes :

- Les **venins de Viperidae** sont **riches en enzymes complexes** agissant sur de nombreux systèmes. Ils induisent principalement des effets hémolytiques (perturbation de la coagulation) et nécrosants tout en étant peu neurotoxiques.
- Les **venins d'Elapidae** sont plutôt **neurotoxiques**, les toxines ayant un fort tropisme neuro-musculaire, avec des manifestations de type hémolytique et myotoxique pour certains Elapidae australiens.
- Les **venins d'Atractaspidinae** sont **cardiotoxiques** et affectent le système cardiovasculaire.
- Les « couleuvres » partagent des effets cliniques que l'on retrouve à la fois chez les Elapidae et Viperidae [18] [1].

Au sein d'une même famille, la composition du venin peut également varier d'un genre à un autre, dans un même genre elle peut varier d'une espèce à une autre et à l'intérieur d'une même espèce d'un individu à l'autre. La diversité fonctionnelle et structurale au sein d'un venin peut aussi être plus ou moins importante selon le genre ou l'espèce.

### **B) Variations ontogéniques et environnementales.**

Il a été observé des variations du venin au sein d'une même population, voire même d'une même fratrie. Cela a été remarqué chez les espèces *Crotalus adamanteus* et *Calloselasma rhodostoma* où une fraction basique, absente chez les mâles est présente chez les femelles.

Lors d'analyses de la composition du venin d'un individu à différentes périodes de son existence, il a été mis en évidence une variabilité biochimique significative. Certaines protéines disparaissent, apparaissent ou se modifient au cours de la vie du serpent. Cela va induire chez le même individu, des différences entre le venin synthétisé à la naissance et celui présent à l'âge adulte. Par exemple chez *Crotalus atrox* on observe une variation de toxicité en fonction de l'âge. Le venin des jeunes *Bothrops jararaca* présente une toxicité plus élevée pour les batraciens que celui des adultes, ce qui laisse penser que les jeunes serpents de cette espèce consomment plus souvent des grenouilles que les adultes.

**L'activité enzymatique semble se développer au cours de la croissance puis se réduire lors de la sénescence.** Cela se justifie par le fait que la fonction de digestion est plus utile pour les adultes qui avalent de plus grosses proies plutôt que chez les jeunes. Cependant ces derniers se rattrapent sur d'autres fonctions, celles d'immobilisations et de toxicité immédiate. Il n'en reste pas moins que certaines observations, comme l'importante variation d'activité enzymatique observée chez un spécimen de *Pseudonaja textilis* au cours de l'année, ne trouvent pas d'explication. Quant aux observations cliniques de plus forte sévérité des morsures à certaines saisons, elles peuvent être liées à l'âge moyen de la population de serpents.

**Certaines conditions environnementales peuvent influencer de façon significative la composition du venin** comme dans le venin de populations distinctes de *Calloselesma rhodostoma*, où sa composition était fortement corrélée à la disponibilité des proies qui induirait une pression sélective sur la composition du venin [3].

### **C) Variabilité de la quantité de venin injecté.**

Un serpent peut injecter entre 10% à 50% de sa capacité glandulaire lors d'une morsure. On ne peut déterminer avec précision la quantité de venin qui sera inoculée dans une proie pour différentes raisons qui sont fonction de :

- L'espèce où le volume et la toxicité du venin varie.
- Des circonstances de la morsure.
- De la taille du serpent et de la taille de la proie.
- De l'appétit du serpent.
- De la situation (attaque ou défense) et du résultat escompté. Ainsi la quantité de venin injecté par un crotale lors d'une morsure défensive sera de deux à trois fois supérieure à celle administrée lors de la morsure d'une proie.
- Du nombre de morsures successives, ainsi au cours de morsures successives la quantité de venin délivrée par le serpent diminue graduellement.

Certains serpents peuvent projeter leur venin et cela un certain nombre de fois. Par exemple *Naja nigricollis* peut émettre un très grand nombre de projections à la suite, jusqu'à 40 en moins de 5 minutes. Il utilise pour chaque projection environ 10% de son volume glandulaire. Dans les premières gouttelettes de son venin, on observe une protéine de 9 kDa. Cette protéine ne

peut être récoltée que lorsque le serpent a été excité avant la projection et de façon naturelle, c'est-à-dire sans appareil. **Les circonstances de la morsure ou de la projection influencent donc aussi la composition du venin.**

**Lors de la morsure, il a pu être observé une variation de la concentration des protéines en fonction du temps.** Ainsi la concentration en protéines baisse significativement alors que la concentration en cytotoxines baisse mais reste plus stable. Tout se passe comme s'il y avait une dilution du venin tout en maintenant la concentration en cytotoxine approximativement constante [3].

#### **IV L'aire des techniques « omiques ».**

L'analyse des venins d'animaux, en particulier ceux des serpents a fortement évolué au cours de ces quinze dernières années, **révélant une complexité et une diversité moléculaire insoupçonnées.** Il ressort de l'ensemble des résultats publiés, ainsi que des nombreuses recherches, que **plusieurs centaines de biomolécules de nature différentes coexistent dans les venins.** On parle aujourd'hui de véritable « cocktail » voire même de véritable « arsenal » moléculaire [18]. Ce constat récent est à l'origine d'un changement fondamental d'approche et d'analyse des venins, dont ceux des serpents.

Deux types de technologies appliquées à l'exploration des venins sont à l'origine de cette évolution : la **protéomique** et la **transcriptomique**. Ces stratégies expérimentales d'étude de la biodiversité moléculaire des venins permettent désormais de dresser un inventaire quasi exhaustif à la fois du contenu réel en biomolécules des glandes à venin et de l'activité de la synthèse des cellules qui constituent ces mêmes glandes. Ces études ont ouvert un vaste champ d'exploration dans plusieurs domaines de la recherche fondamentale [18].

Les récentes avancées technologiques dans le séquençage de nouvelle génération sont utilisées aux trois niveaux de la cascade d'omic (génomique, transcriptomique, protéomique) fournissant de grandes quantités d'informations qui doivent être efficacement analysées en utilisant le criblage haut débit et des outils bio-informatiques spécialement conçus pour le traitement de ces données de séquençage à grande échelle [84].

### **A) La protéomique.**

C'est la science qui étudie les « protéomes », c'est-à-dire l'ensemble des protéines d'une cellule, organe, organe, organisme ou dans la pratique d'une culture cellulaire, d'un tissu ou encore un fluide biologique, dans notre cas le venin. Elle a pour but d'identifier et de quantifier l'ensemble des protéines synthétisées, à un instant T et dans des conditions données. En effet, le protéome est une entité dynamique et complexe. Au sein de chaque cellule, le contenu de protéines se modifie en permanence en fonction des conditions intra ou extra cellulaire.

De plus par le biais de réarrangements qui modifient ses fonctions biologiques, un même gène peut donner naissance à plusieurs protéines. Le protéome contient ainsi un nombre beaucoup plus important de protéines que le génome ne contient de gènes. La protéomique permet de quantifier les variations du taux d'expression des gènes en fonction du temps, de leur environnement de leur état physiologique et pathologique. La protéomique permet également l'analyse **structurale** (structure primaire, secondaire ou tertiaire) et **fonctionnelle** de chaque protéine. Elle étudie aussi les **interactions** des protéines entre elles, avec l'ADN, l'ARN ou d'autres substances. Elle rassemble plusieurs techniques et se déroule en plusieurs étapes. Extraction des protéines, séparation des constituants (chromatographie), identification (spectrométrie de masse), recherche de la protéine d'intérêt (coloration, criblage), interrogatoire des bases de données (masse, taille apparente point isoélectrique), etc. [74].

### **B) La transcriptomique.**

La transcriptomique est l'étude et l'analyse du transcriptome, c'est-à-dire l'étude et l'analyse de l'ensemble des ARN messagers produits lors du processus de transcription du génome. Il s'agit d'un outil utilisé en génétique moléculaire dans l'objectif de réaliser en quelque sorte un inventaire global de l'activité de synthèse des glandes à venins. Elle repose sur la quantification systématique de ces ARNm, ce qui permet d'avoir des indications relatives du taux de transcription de différents gènes dans des conditions données. Plusieurs techniques ont été développées pour permettre d'accéder à ces informations tels que la puce à ADN, la PCR quantitative ou le séquençage systématique d'ADN complémentaire.

L'ensemble des différents ARN messagers est extrait puis purifié à partir des tissus glandulaires directement prélevés sur l'animal à l'aide d'un scalpel. En synthétisant le brin d'ADN

complémentaire des ARNm ont obtenu les séquences d'ADN du génome codante pour l'ensemble des protéines du venin. **Le séquençage haut débit** permet alors d'obtenir la séquence d'ADN et de l'enregistrer dans les bases de données bio-informatiques [74]. L'exploration et l'étude des séquences issues des travaux de transcriptomique ne correspondent à rien de connu à ce jour. Cette partie « inconnue » peut représenter jusqu'à 25% des séquences obtenues, renferme de nouvelles familles de molécules à fortiori totalement originales du point de vue de leur organisation structurale. L'espoir est que ces nouvelles molécules soient dotées d'activités biologiques et/ ou pharmacologiques différentes [18].

### C) La génomique.

Afin d'être exhaustif, il est nécessaire de compléter ces travaux par **l'analyse des génomes** des serpents venimeux ou non. La génomique se divise en deux branches :

- La génomique structurale, qui se charge du séquençage du génome en entier.
- La génomique fonctionnelle, qui vise à déterminer la fonction et l'expression des gènes séquencés en caractérisant le protéome et le transcriptome.

Peu de projets sont engagés à ce jour, probablement en raison de leur coût, ou de la taille des génomes ciblés (environ la moitié de celle de l'homme). Le but de ces études est, en particulier, d'étudier la structure et l'organisation des gènes codant les toxines et d'identifier les éléments génétiques qui contrôlent leur expression [18].

#### **D) Projet européen « VENOMIC » : Banque de séquences des venins d'animaux mondiale.**

Comme nous venons de le voir, des stratégies plus globales et exhaustives d'exploration des venins se développent, nécessitant des besoins en compétences nouvelles, telles que la bio-informatique afin de traiter l'ensemble des données issues des programmes de transcriptomique, génomique ou protéomique. Les approches modernes de protéomique et de transcriptomique ont révolutionné notre compréhension de la diversité chimique des venins animaux. Ce nouvel « El Dorado » moléculaire ouvre des **perspectives importantes dans l'ensemble des domaines de la recherche, aussi bien fondamentalement, qu'appliquée.** Il reste maintenant aux chercheurs, aux cliniciens, mais également aux industriels de la biologie, à s'organiser, à collaborer afin de décrypter et exploiter de la manière la plus efficace possible, cette immense biodiversité des molécules optimisées à la fois d'un point de vue structural et fonctionnel. **C'est dans ce contexte d'exploration et de découverte de nouvelles molécules d'intérêt clinique, que le projet européen « VENOMIC » (project dedicated to the exploration of biodiversity for public health, 2011-2015) s'inscrit.** Il rassemble 3 laboratoires et 5 entreprises de nationalités différentes (France, Espagne, Portugal, Belgique et Danemark). Dans le sud de la France, la société de biotechnologie VenomeTech (Sophia Antipolis) coordonne le projet dont l'AFMB de Luminy (Marseille) est partie prenante.

Ce vaste projet vise à reproduire in vitro une partie de la diversité moléculaire des venins et ce, afin de disposer des quantités suffisantes de biomolécules pour mener à bien des études de criblage d'activité biologiques cliniques pertinentes pour un usage chez l'homme.

Pour cela il associe :

- L'exploration conjointe de la biodiversité des venins de plusieurs dizaines d'espèces venimeuses animales différentes par protéomique et transcriptomique.
- **Le développement de stratégies appropriées de production** par synthèse chimique ou techniques de l'ADN recombinant à partir de l'information nucléique (ARN messagers) qui codent les peptides ou protéines produits par les glandes à venin.
- Le criblage des activités biologiques vis-à-vis de diverses cibles d'intérêts thérapeutiques.

Les partenaires du projet ont relevé le défi consistant à étudier une partie des 170 000 animaux venimeux, en combinant la protéomique sur les venins et la transcriptomique sur les glandes venimeuses. Cette base mettra à disposition des scientifiques plus de 25.000 séquences génétiques de toxines, provenant d'échantillons de 203 espèces animales, allant de quelques grammes (comme la majorité des araignées) à plusieurs kilos comme le serpent mamba. Selon Frédéric Ducancel, 4.000 toxines (fragments de protéines, ou peptides) ont déjà pu être produites *in vitro* à partir des venins étudiés. Ces toxines, qui font désormais l'objet de recherches, sont stockées au CEA à Saclay.

Ces nouvelles capacités d'exploration des venins, couplées à des stratégies de criblages pharmacologiques pertinentes vis-à-vis de cibles thérapeutiques d'intérêt (récepteur membranaire, canaux ioniques, enzymes...) constituent un élément fondamental et un prérequis indispensable à l'identification de nouvelles molécules-médicaments à usage chez l'homme. Il s'agit du domaine le plus actif et prometteur en matière d'exploration et exploitation des venins animaux. Grâce lui un grand nombre de peptides candidats médicaments seront identifiés plus vite. Ce n'est qu'à travers les connaissances croisées issues de ces différentes stratégies d'études de la fonction venimeuse des serpents que l'on sera un jour capable de comprendre ce qui fait de la glande à venin un tissu si particulier et efficace pour produire une telle diversité et quantité de molécules biologiquement actives [18] [74].

## **V Méthodes d'analyses des venins de serpents (protéomique).**

Différentes méthodologies sont utilisées pour le développement de "peptides médicaments".

### **A) Schéma général du venin au médicament.**

Le traitement des données fournit par les approches modernes de protéomique et transcriptomique complémentaire employées dans la découverte de médicament à base de venin suit habituellement le processus suivant :

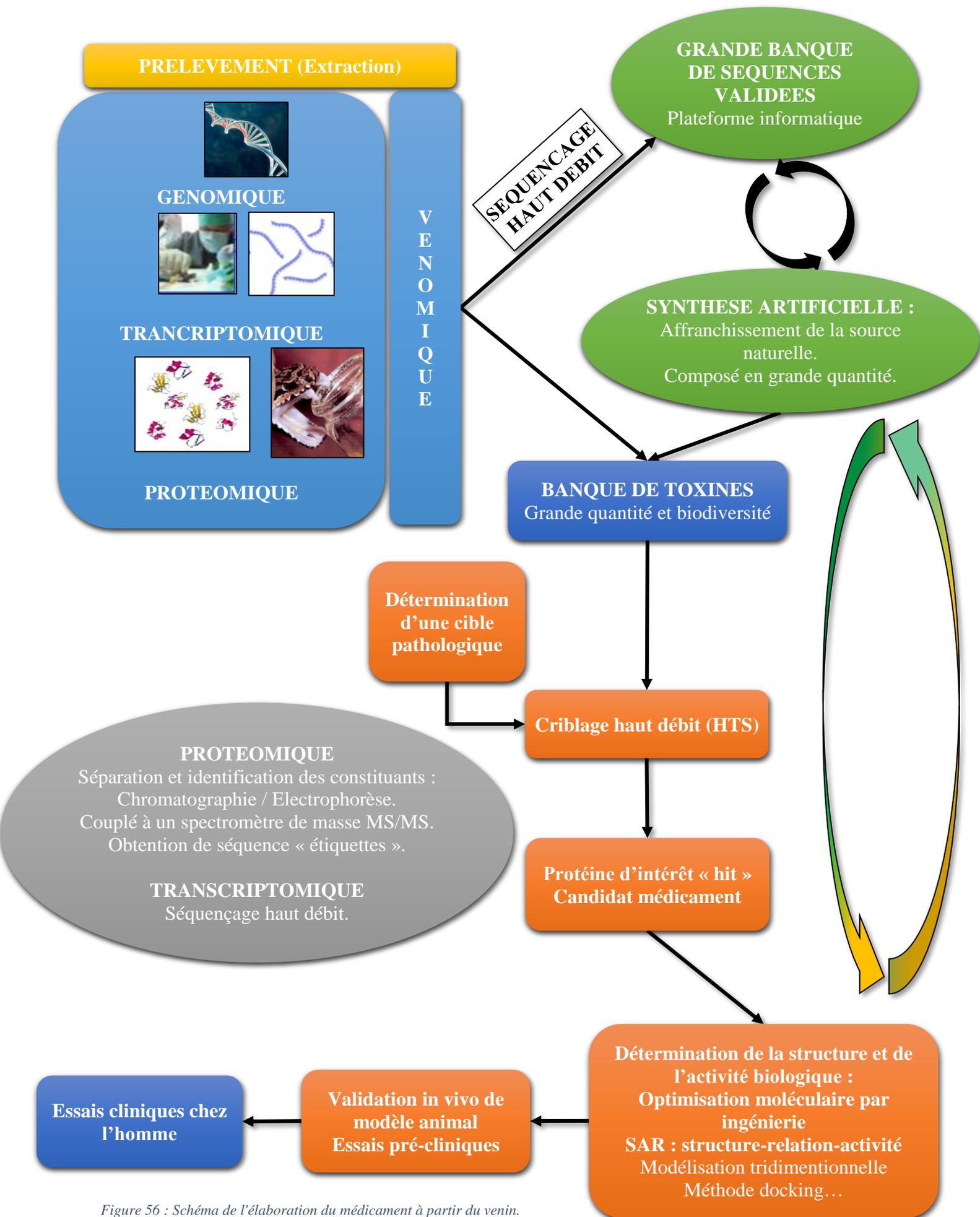


Figure 56 : Schéma de l'élaboration du médicament à partir du venin.

## **B) Techniques protéomiques.**

### **1) Prélèvement du venin.**

#### **a) Réglementation et conditions de détention des serpents.**

La convention de Washington (convention sur le commerce international d'espèces de faune et flore sauvage menacées d'extinction, ou CITES), signée en 1973 classe les espèces en trois annexes. La capture, le transport, la détention, la cession et la destruction des animaux inscrits dans une de ces annexes sont réglementés.

- L'annexe I : espèces menacées d'extinction dont le commerce est interdit, des autorisations au cas par cas peuvent être données pour des nécessités de recherche dûment justifiées.
- L'annexe II : espèces protégées dont le commerce est autorisé sous réserve d'accords particuliers délivrés avant le transport par une autorité habilitée.
- L'annexe III : espèces protégées dans leur pays d'origine, même disposition que l'annexe II.

Il n'existe pas de définition claire des animaux dangereux au regard des textes français. L'arrêté du 21 novembre 1997 les définit comme des animaux qui « présentent des dangers ou inconvénients graves ». Ils sont le plus souvent, assimilés aux animaux non domestiques et révèlent du cadre réglementaire correspondant.

Le certificat de capacité reconnaît à son propriétaire la compétence nécessaire pour l'entretien d'animaux non domestiques. Il est délivré par la direction des services vétérinaires. Un registre précisant l'origine des animaux et leur mouvement doit être tenu à jour.

Les installations doivent assurer la sécurité du personnel et visiteurs ainsi que la protection des animaux détenus. Il existe un devoir de protection et de bons traitements concernant la nourriture, les soins l'hébergement (cage adaptée à l'espèce) et la manipulation (excluant les instruments offensifs) [52] [3].

## **b) Prélèvement, purification et conservation du venin de serpent.**



*Figure 57 : Prélèvement de venin.*

Les herpétologues sortent les serpents de leur cage à l'aide d'un crochet. Ils les déposent au sol où ils les immobilisent, en les maintenant derrière la tête. Certaines manipulations se font à mains nues pour un meilleur ressenti des mouvements et réactions de l'animal. Le venin s'obtient par pression manuelle (massage de la glande à venin ou morsure d'un verre surmonté d'un film plastique) ou stimulation électrique des glandes salivaires de serpents [52].

S'il n'est pas directement utilisé, le venin brut ou « natif » ainsi obtenu est desséché sous vide ou lyophilisé. Il peut être conservé en ampoule scellée à basse température plusieurs dizaines d'années, cependant quel que soit le procédé de conservation certaines activités enzymatiques semblent toutefois s'altérer avec le temps. Plusieurs banques de venin se sont ainsi constituées et enrichies au fil des années dans les instituts de recherche [85] [3].

## **2) Séparation des différents constituants.**

Après avoir prélevé et purifié le venin, il faut séparer les différents constituants qui le composent afin de procéder à des analyses plus poussées en laboratoires. Il existe plusieurs techniques qui séparent les composants en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques ou de leur affinité pour un ligand. On peut citer l'électrophorèse et la chromatographie.

### **a) L'électrophorèse.**

L'électrophorèse (simple) est une technique permettant de déplacer des ions sous l'effet d'un champ électrique. Ceux-ci vont migrer vers leur électrode respective : les anions (chargés négativement) migrent vers l'anode (potentiel positif) et les cations (chargés positivement) migrent vers la cathode (potentiel négatif). Les molécules non chargées ne migrent pas. Du fait de leurs caractéristiques propres et des conditions de l'électrophorèse, la vitesse de migration et la distance parcourue dans la matrice par ces ions diffèrent, ce qui permet de les séparer.

L'électrophorèse de référence pour la protéomique est l'électrophorèse bidimensionnelle. La première dimension consiste en une isoélectrofocalisation (IEF). Les polypeptides migrent jusqu'à un pH égal à leur point isoélectrique « PI », c'est-à-dire jusqu'à ce que leur charge nette soit nulle. La deuxième dimension sépare les protéines selon leur différente masse molaire sur un gel d'électrophorèse de polyacrylamide en conditions dénaturantes.

Ces deux électrophorèses sont effectuées de manière perpendiculaire l'une par rapport à l'autre. Comme les paramètres de la séparation sont indépendants, cette technique est particulièrement résolutive, ainsi plusieurs centaines de chaînes polypeptidiques peuvent être séparées sous forme de taches de protéines appelées « spot » sur un gel. Les protéines sont révélées par coloration. Les logiciels d'analyse d'image des gels repèrent les spots et calculent leurs coordonnées et leur intensité.

### **b) La chromatographie.**

La chromatographie est une méthode séparative qui permet l'identification et le dosage des différents composés d'un mélange.

Le venin brut est injecté dans un chromatographe qui va séparer les différents constituants en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques. Cette opération sera répétée le nombre de fois nécessaire afin d'obtenir la molécule d'intérêt avec la pureté désirée [86].

Il existe 3 grandes familles de chromatographie :

- **CPG (GC)** : Chromatographie en Phase Gazeuse.
- **CPL (LC) et HPLC** : Chromatographie Liquide ou Chromatographie Liquide Haute Performance. L'**uHPLC** nouvellement développée fournit une nouvelle alternative.
- **CCM** : Chromatographie sur Couche Mince.

La chromatographie liquide haute performance (CLHP) est le plus souvent exécutée en utilisant la phase inverse ou « phase reverse » (RP) dans la protéomique pour séparer les différents composés de venin [84].

L'échantillon de venin dissous par une phase mobile ou « éluant » est entraîné à travers une phase stationnaire. **Le principe est basé sur les différences d'affinités des composés du mélange avec la phase stationnaire et la phase mobile.** La phase stationnaire fixe, retient plus ou moins fortement les substances contenues dans l'échantillon dilué selon l'intensité des forces d'interactions de faible énergie entre les différentes espèces moléculaires et la phase stationnaire.

Le chromatogramme traduit la variation du soluté dans l'éluant (phase mobile) en fonction du temps. Les différents composants de l'échantillon ont généralement une **vitesse caractéristique** qui permet de les séparer, voire de les identifier. Cette vitesse de séparation est fortement dépendante de la nature de la phase mobile et de la phase stationnaire. La maîtrise de toutes les conditions de séparation permet la reproductibilité parfaite du temps de migration d'un composé donné.

Souvent, l'échantillon est analysé par comparaison avec des substances déjà connues ou par comparaison avec les résultats de l'analyse d'une solution étalon. Ces substances servent de références et permettent d'identifier ou de doser chaque espèce par comparaison des vitesses de séparation et éventuellement d'autres renseignements donnés par la détection. Il s'agit de **chromatographie analytique**. Dans d'autres cas, on se contente de séparer les fractions pour les identifier par d'autres techniques : c'est **la chromatographie préparative**. **Le chromatographe peut être couplé à un spectromètre de masse pour l'identification de composés inconnus.**

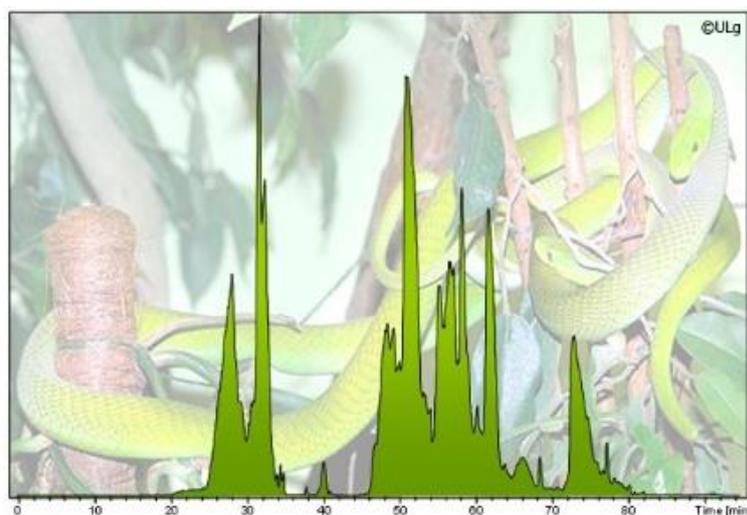


Figure 58 : Chromatographie RP-HPLC du venin de mamba vert (*Dendroaspis angusticeps*) révélant plus de 150 composés différents.

### **3) Spectrométrie de masse et caractérisation de la structure primaire (Analyse structurale).**

Il existe une très grande diversité moléculaire propre à chaque venin. Une fois que la toxine a été isolée on caractérise sa structure. La spectrométrie de masse donne accès à l'empreinte moléculaire du venin. Il s'agit d'une technique analytique très puissante et très sensible permettant d'analyser les composés organiques. Elle permet à la fois de déterminer la masse moléculaire et de remonter à la séquence en acide aminé du composé analysé mais aussi de corrélérer le spectre d'un composé avec sa structure. La caractérisation de la structure est primordiale car la structure qui constitue la carte d'identité de la molécule donne également des indications sur le récepteur qui sera ciblé [86].

#### **a) Une avancée technologique.**

La spectrométrie de masse, en tant que technique d'analyse, a effectué un bond prodigieux depuis une vingtaine d'année. **La mise au point de nouvelles sources d'ionisation, permet aujourd'hui d'entrer dans la protéomique** et d'analyser des échantillons de tout type : des petites molécules organiques apolaires et volatiles aux macromolécules biologiques polaires et peu volatiles telles que les peptides et protéines qui sont les constituants principaux des venins (ophidiens) et sous diverses formes (solide, liquide ou gazeuse). La nécessité de volatiliser l'échantillon, par chauffage sous vide, avant de pouvoir l'ioniser, a longtemps cantonné la spectrométrie de masse à l'étude de composés volatils (ou volatilissables), excluant l'analyse de tous les composés de haut poids moléculaire et thermolabiles (tel que les peptides et protéines). Il a fallu attendre la fin des années 1980 et l'émergence de nouvelles techniques d'ionisation dites « douces » comme l'électrospray (ESI) et l'ionisation-désorption laser assistée par matrice (MALDI), pour que la spectrométrie de masse mette le pied dans le domaine de la biologie et l'analyse des venins. Aujourd'hui, la spectrométrie de masse est devenue un outil incontournable en analyse protéomique (identification de protéines, séquençage de peptides, caractérisation de modifications post-traductionnelles) et trouve des applications dans des domaines variés. Sa sensibilité et son couplage facile avec des méthodes de séparation (chromatographie gazeuse ou liquide) en font également une méthode de choix pour le contrôle qualité et le dosage de diverses molécules présentes à l'état de traces dans des mélanges complexes [87].

## b) Spectromètre de masse simple MS (principe).

La spectrométrie de masse est une technique physique d'analyse permettant de détecter et d'identifier les molécules d'intérêt par mesure de leur masse et de caractériser leur structure chimique. Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse des molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge ( $M/Z$ ).

Le spectromètre de masse est composé de 5 parties :

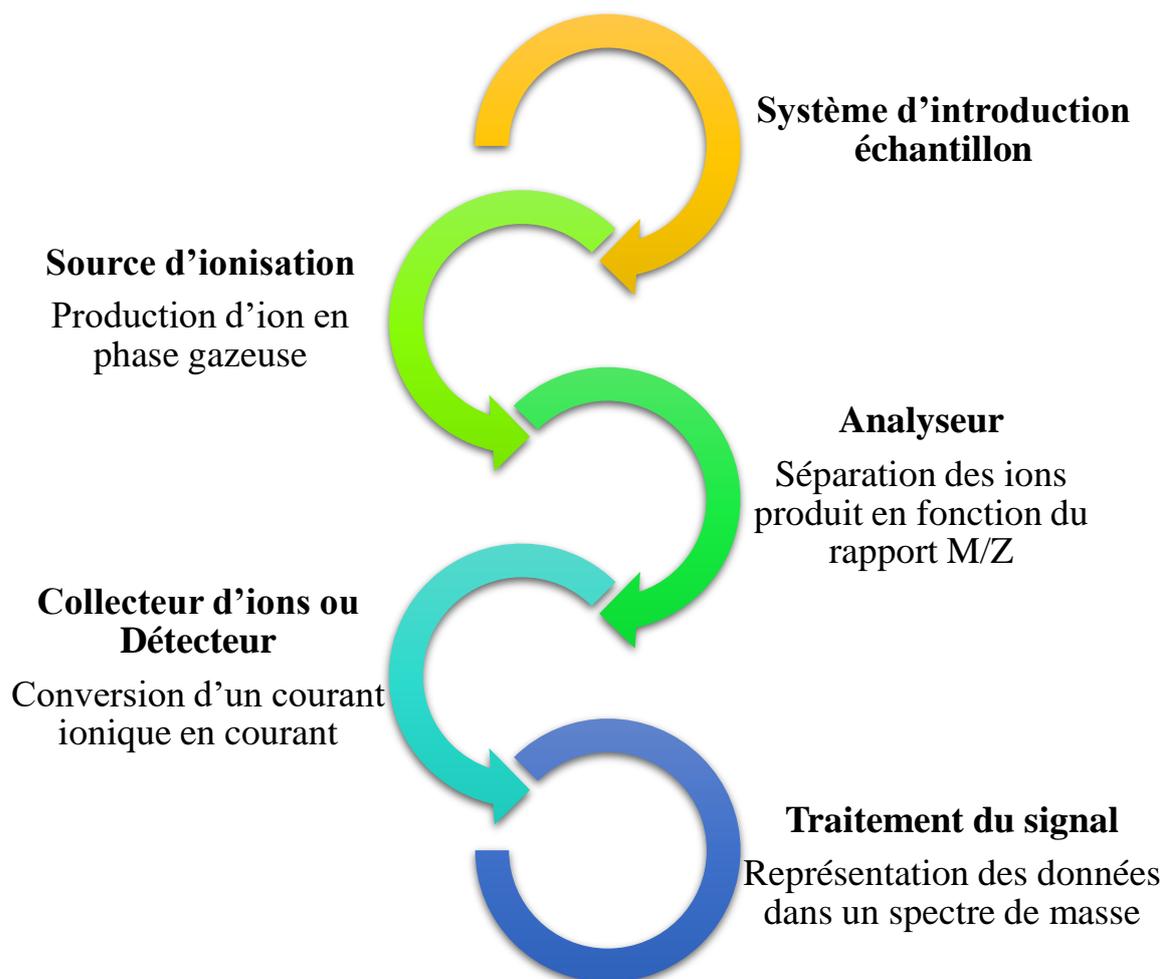


Figure 59 : Composition du spectromètre de masse

## 1. Le système d'introduction de l'échantillon.

Il permet d'introduire le composé à analyser.

## 2. La source d'ionisation des molécules.

La source d'ionisation permet d'ioniser le composé à analyser et de le transférer en phase gazeuse. Il existe un certain nombre de méthodes d'ionisation utilisées qui sont fonction, principalement, du type d'échantillon à analyser (composé organique, biologique ou autre). Les sources d'ionisation les plus employées pour les composés organiques (apolaire et volatil) sont les sources par Ionisation Electronique ou Ionisation Chimique, méthodes dites « fortes » qui fragmentent l'ion moléculaire obtenu. Alors que celles utilisées couramment pour les biomolécules (polaires et peu volatils) sont des méthodes dites « douces » qui n'utilisent pas la fragmentation, tel que l'électrospray (ESI) ou le nano-électrospray (nanoESI) ainsi que l'ionisation par désorption laser assistée par matrice (MALDI) [87].

- Parmi elles, trois techniques sont surtout employées pour l'analyse des protéines et peptides :
- **Ionisation par désorption laser assisté par matrice « MALDI »** désorption par effet de champ (ionisation par désorption au laser d'une matrice-temps de vol).
- Ionisation par électronébuliseur
  - **ESI** : Ionisation par électrospray
  - **Nano-ESI** : Ionisation par nano-électrospray

### a. MALDI (l'Ionisation par Désorption Laser Assistée par Matrice).

Le MALDI est une méthode douce particulièrement bien adaptée aux exigences de la protéomique. Elle constitue ainsi l'une des premières méthodes d'ionisation pour la caractérisation de composés biologiques. L'obtention majoritaire d'espèces mono-chargées permet de générer des spectres de masses simples et facilement interprétables. L'intérêt de cette technique repose également sur sa bonne tolérance aux sels et aux détergents, fréquemment rencontrés en analyse protéomique [87].

Son principe repose sur l'utilisation d'une matrice absorbant généralement dans l'ultraviolet. L'analyte "M" est dispersé dans une solution saturée de petites molécules aromatiques (matrice) et l'ensemble est co-cristallisé par évaporation du solvant. L'ensemble, matrice et analyte sont déposés sur une plaque métallique. Le dépôt solide obtenu est ionisé par désorption par un faisceau de photons issu d'un laser pulsé de longueur d'onde où les molécules de matrice ont une forte absorption (laser UV ou IR). Il en résulte la désorption (en phase gazeuse) des ions formés par transfert de proton ( $H^+$ ) entre la matrice photoexcitée et l'analyte M :  $[MH]^+$  [88].

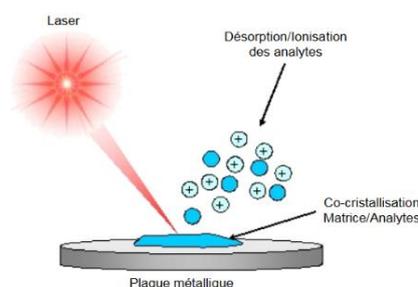


Figure 60: Représentation schématique de l'ionisation par méthode MALDI.

## b. ESI (l'ionisation par ElectroSpray).

L'électronebulisation (ou électrospray) est une technique d'ionisation à pression atmosphérique qui permet de former des ions en phase gazeuse par des mécanismes de désolvatation peu énergétique n'induisant quasiment pas de fragmentation. Raison pour laquelle l'électrospray est considéré comme une technique d'ionisation douce par opposition à d'autres techniques.

Trois étapes principales permettent la formation d'ions en phase gazeuse :

- La **formation des gouttelettes chargées** à l'extrémité d'un capillaire métallisé porté à potentiel élevé.
- L'évaporation du solvant et les explosions coulombiennes.
- **L'obtention d'ions désolvatés** en phase gazeuse à partir de gouttelettes fortement chargées issues des deux premières étapes [87].

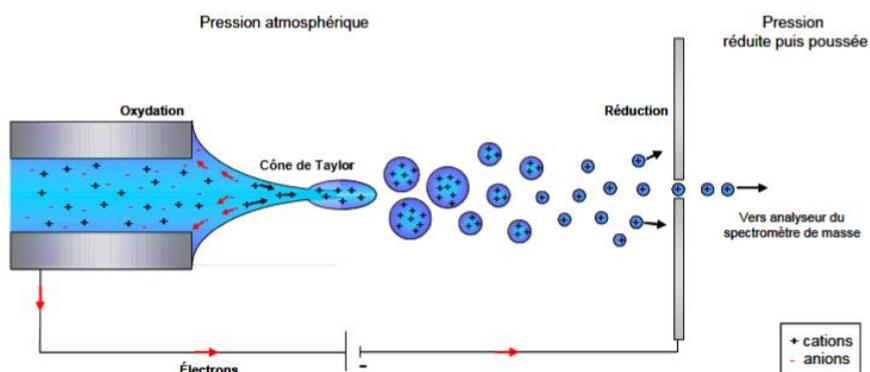


Figure 61: Représentation schématique de l'ionisation par électrospray.

L'électrospray est produit par application d'un fort champ électrique sur un liquide contenant l'analyte « M » traversant un fin capillaire. Ce champ électrique provoque une accumulation de charges à la surface du liquide en sortie du capillaire, ce qui va former de fines gouttelettes de soluté hautement chargées (nébulisât). Sous l'effet de ce champ et grâce à l'assistance d'un courant d'air coaxial, l'effluent liquide est transformé en nuage de fines gouttelettes (spray) chargé suivant le mode d'ionisation sous l'effet d'un second courant d'air chauffé, les gouttelettes s'évaporent progressivement. L'évaporation de solvant conduit au rétrécissement de la taille des gouttelettes jusqu'à ce que le champ électrique à leur surface soit suffisant pour provoquer la désorption des ions. Leur densité de charge devenant trop importante, elles explosent libérant des microgouttelettes etc. [88].

### c. NanoESI (Nano-électrospray ou Nanospray analyse).

La NanoESI fonctionne selon le principe où un faible volume d'échantillon (2-3  $\mu\text{L}$ ) est introduit dans une aiguille métallisée dont l'orifice de sortie possède un diamètre de l'ordre de 1 à 2  $\mu\text{m}$ . Une différence de potentiel est alors appliquée entre cette aiguille et la contre électrode placée quelques mm plus loin dans le spectromètre de masse afin de créer le spray, dont le débit peut être évalué à quelques dizaines de nanolitres par minute. **Ce débit étant très faible, aucun gaz de nébulisation n'est nécessaire pour former le spray, et les tensions appliquées sont beaucoup plus faibles** (quelques centaines de volts contre plusieurs milliers de volts en électrospray). La température est également inférieure à celle d'une source électrospray car la quantité de solvant à évaporer dans les gouttelettes est moindre.

La miniaturisation de l'électrospray, dans sa version nano-électrospray (nanoESI) présente de nombreux avantages par rapport à l'ESI

- **Moins consommatrice d'échantillons** puisque quelques microlitres d'une solution à une concentration de l'ordre du  $\mu\text{M}$  (ou moins) permettent d'enregistrer un spectre. Cet aspect est important lorsque les échantillons étudiés sont disponibles en faible quantité, ce qui est généralement le cas pour les études protéomiques.
- Les nanoESI se révèlent **plus sensibles que l'ESI** (au moins 100 fois supérieur). La principale explication à ce phénomène est que le faible diamètre de sortie de l'aiguille permet de former des gouttelettes initiales très petites qui vont conduire rapidement à la formation d'ions en phase gazeuse puisque le volume de solvant à évaporer est très faible. Ceci a pour conséquence d'améliorer l'efficacité d'ionisation (rapport charge/volume supérieur à celui de l'ESI).
- Une meilleure **tolérance aux sels** présents dans l'échantillon : des études ont ainsi montré que l'on peut analyser des échantillons jusqu'à dix fois plus chargés en sels que ne le permet l'utilisation d'une source ESI conventionnelle.

La nanoESI présente néanmoins quelques inconvénients principalement liés à l'aiguille utilisée pour réaliser le spray. Le fait que les aiguilles soient fabriquées par étirement du verre jusqu'à l'obtention d'une extrémité très petite (1 à 2  $\mu\text{m}$  de diamètre), conduit dans de nombreux cas à son obturation. Il faut donc "ouvrir" mécaniquement ces aiguilles afin de pouvoir initier le spray. Cette ouverture n'étant absolument pas reproductible, il est impossible de contrôler avec précision le diamètre de sortie du capillaire une fois ouvert. **La reproductibilité des résultats**

**obtenus par nanoESI n'est pas bonne.** Malgré cet inconvénient, le gain de sensibilité apporté par l'utilisation d'une source nano-électrospray en fait une technique d'ionisation de choix pour l'analyse de biomolécules (mesure de masse de protéines, séquençage de novo de peptides).

La source Nano fournit une haute sensibilité pour beaucoup de peptides et protéines avec une énorme amélioration à l'efficacité de l'ionisation. Cependant cette technique a des limites et n'est pas idéale lorsque les composants du venin sont inégalement répartis du fait de la petite quantité d'échantillon de venin analysé à moins qu'une autre dimension de séparation ne soit d'abord appliquée [84] [87].

#### **d. Complémentarité.**

L'utilisation du MALDI en complément de l'ESI permet non seulement d'augmenter le nombre de protéines identifiées, mais aussi la couverture des séquences de protéines identifiées.

### **3. Le système dispersif ou analyseur.**

Les ions formés dans la source sont ensuite conduits dans l'analyseur par l'intermédiaire de lentilles électrostatiques. L'analyseur est situé dans une enceinte à très basse pression ( $10^{-6}$  à  $10^{-9}$  mbar) assurée par un système de pompage progressif.

Il existe différents types d'analyseurs dont :

- Analyseurs type quadripolaire : triple-quadripôle (tQ) et pièges (trappes) à ions (IT).
- Analyseurs par temps de vol (TOF = Time Of Flight).
- Analyseurs à secteurs magnétiques.
- Spectromètres de masse à résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier (FT-ICR).
- Orbitrap, plus récents.

**Le rôle de l'analyseur est de trier les ions selon leur rapport masse/ nombre de charge (M/Z).** En effet les ions sont accélérés dans un champ électrique, et/ou magnétique, puis dirigés entre les pôles d'un aimant selon la trajectoire circulaire qui dépend de leur rapport masse/charge (M/Z). En faisant varier le champ électrique, on fait varier la vitesse des ions moléculaires, on peut ainsi les faire parvenir au détecteur par ordre croissant de rapport (M/Z).

Ce tri se fait de manière différente selon l'analyseur utilisé.

- Dans un analyseur de type "temps de vol" (TOF) les ions seront séparés en fonction du temps qu'ils mettent pour traverser le tube de vol et ce en fonction de M/Z.
- Dans une cellule ICR (analyseur à résonance cyclotronique ionique) ou analyseur de type « Trap, Fourier Transform Type » FT-ICR, ils seront séparés en fonction de leur "fréquence de rotation" dans le champ magnétique [87] ou de leur "courbure de trajectoire", le point d'impact des ions dépendant de M/Z.

**Ces analyseurs peuvent être couplés entre eux pour réaliser des expériences de spectrométrie de masse en tandem (MS/MS).** Généralement, un premier analyseur sépare les ions, puis une cellule de collision permet de fragmenter les ions, et enfin un second analyseur sépare les ions fragments. Certains analyseurs, comme les pièges à ions ou le FT-ICR, constituent plusieurs analyseurs en un et permettent de fragmenter les ions et d'analyser les fragments directement.

Pour l'analyse des protéines, les analyseurs utilisés sont : trappe à ions (IT), temps de vol (TOF) ou, quadripole (MS ou Q). Généralement les couplages avec les sources à ions sont : MALDI-TOF et ESI-Q ou ESI-IT. Récemment des améliorations instrumentales ont été apportées avec l'apparition de spectromètres hybrides. L'association de plusieurs types d'analyseurs permet de combiner les avantages de chacun. (Q-TOF, Q-IT, etc.).

#### **4. Le détecteur.**

**Le détecteur est chargé de "classer" les ions séparés précédemment.** Il collecte les ions (ou ions fragments) qui arrivent à des temps différents en fonction du rapport M/Z. Généralement, les détecteurs jouent également le rôle **de premier amplificateur de signal** [87].

## 5. Le système de traitement des données informatiques.

Le signal amplifié est ensuite traité par un système informatique.

Le résultat se présente sous la forme d'un spectre de masse, c'est à dire une représentation graphique du type intensité du signal = f

(m/z) [87]. On obtient un grand nombre de pics, tous de masse inférieure à celle de l'ion moléculaire.

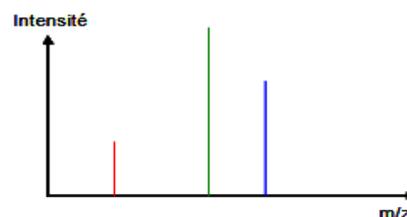


Figure 62 : Diagramme de fragmentation

Cet ensemble constitue le **diagramme de fragmentation**. Les groupements fonctionnels possèdent un diagramme de fragmentation, qui leur sont propres. Dans un spectre de masse, **la hauteur relative des pics indique l'abondance relative des espèces**.

Les spectromètres de masse sont pilotés informatiquement par un ordinateur qui permet à la fois le réglage et le calibrage du spectromètre de masse, l'acquisition et stockage des données, le traitement et la transformation des informations reçues en spectre de masse et la recherche dans les banques de spectre. Les spectromètres de masse actuels permettent d'enregistrer automatiquement plusieurs milliers de spectres MS/MS en quelques heures. L'interprétation de ces spectres est le facteur limitant.

### **c) Spectrométrie de masse en tandem : Le séquençage MS/MS : (Structure primaire (séquence d'acide aminé de NOVO)).**

La spectrométrie de masse en tandem MS/MS couplée à des techniques de digestion (enzymatique ou chimique) et des techniques de séparation, permet de déterminer la séquence peptidique des toxines sur quelques dizaines d'acides aminés et donne des indications sur leur structure.

La spectrométrie en tandem (MS/MS) se différencie de la MS par une fragmentation des ions pour permettre une meilleure identification. Le principe de fragmentation est le processus permettant de séparer chaque acide aminé d'un peptide. La technique combine en général deux analyseurs. Les ions formés dans la source entrent dans le premier analyseur, d'où seuls les ions ayant un rapport M/Z déterminé pourront sortir. Puis, dans une cellule de collision, ces ions sélectionnés sont dissociés en ions fragments qui seront analysés dans le second analyseur.

Les sources d'ionisation utilisées pour l'analyse des biomolécules (ESI, nanoESI, MALDI) conduisent à des ions avec peu d'énergie interne. On induit la fragmentation par un apport d'énergie au système. Cet apport d'énergie peut se faire de différentes façons. La technique de fragmentation « post source » en phase gazeuse dans la zone de collision est la plus souvent utilisée. L'énergie peut être ajoutée aux ions par collision post source avec un atome neutre, des molécules d'absorption, par (photo)radiation, transfert ou capture d'électron.

Selon les instruments utilisés, les étapes de sélection et d'analyse des fragments vont pouvoir se faire soit dans l'espace (triple-Q, Q-TOF, TOF-TOF), soit dans le temps (Trappe ionique, FT-ICR, orbitrap). Les équipements les plus souvent rencontrés dans les laboratoires sont des triples quadripôles.

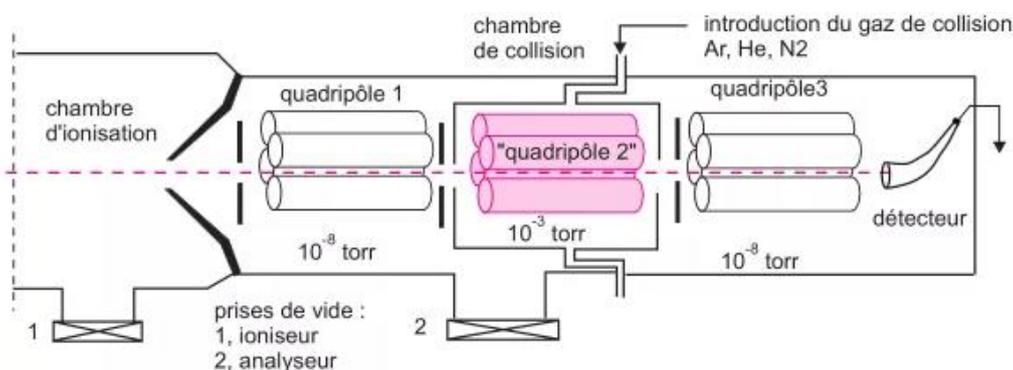


Figure 63 : Principe d'un appareil MS/MS à 3 quadripôles en série [89].

La spectrométrie de masse en tandem permet d'obtenir des informations de structure de l'ion fragmenté et permet, dans le cas de mélanges complexes, de sélectionner spécifiquement une espèce parmi les autres pour obtenir son spectre de fragmentation. L'identification obtenue est plus fine et plus exacte. La spectrométrie de masse permet une analyse qualitative et quantitative [89].

#### **4) Interrogatoire des bases de données et identification de la protéine par bio-informatique.**

On utilise un logiciel de bio-information afin de lier les renseignements sur la séquence d'acides aminés aux renseignements sur la séquence d'ADN. Les différentes informations récoltées sur les protéines (masse apparente, masse réelle, point isoélectrique, taille des fragments après digestion enzymatique, séquences partielles) sont comparées aux bases de données transcriptomiques, génomiques ou protéomiques en ligne. Les logiciels fournissent alors une liste de protéines et leurs probabilités associées. Seuls certains organismes, dits « organisme modèle », ont un génome complètement séquencé et disponible en ligne. Les autres sont étudiés par homologie avec les organismes connus.

#### **C) Techniques de séquençage.**

Le séquençage de l'ADN consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides pour un fragment d'ADN donné. Cette étape est indispensable avant de pouvoir synthétiser artificiellement une toxine ou autre protéine. Il existe actuellement 2 méthodes, la méthode Sanger et la méthode de deuxième génération NGS pour séquençage haut débit, avec bientôt l'apparition d'une nouvelle méthode de séquençage de troisième génération. Toutes les données obtenues sont enregistrées dans des banques séquences [84].

##### **1) Méthode enzymatique de Sanger.**

Le séquençage de l'ADN par la méthode de synthèse enzymatique de Sanger, a été utilisé pendant plus de 30 ans pour lire le code génétique des organismes vivants. La dernière génération des séquenceurs à capillaires, utilisant la technique Sanger, permet aujourd'hui de lire jusqu'à 2 millions de bases en une demi-journée.

L'approche de Sanger est une méthode par synthèse enzymatique qui consiste à initier la polymérisation de l'ADN à l'aide d'un petit oligonucléotide (l'amorce) complémentaire à une partie du fragment d'ADN à séquencer. L'élongation de l'amorce est réalisée par une ADN polymérase dépourvue d'activité exonucléase en présence d'un mélange des quatre désoxyribonucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) et une faible concentration de quatre

didésoxynucléotides (ddATP, ddCTP, ddGTP ou ddTTP) chacun associé à un marqueur fluorescent différent. Une fois incorporés dans le nouveau brin synthétisé, ces didésoxynucléotides empêchent la poursuite de l'élongation. Il en résulte un mélange de fragments d'ADN de tailles croissantes, qui se terminent à toutes les positions dans la séquence. Ces fragments sont ensuite séparés par électrophorèse capillaire sur un gel de polyacrylamide ce qui permet ainsi de lire la suite de chacune des bases dans la séquence. Une dernière étape de traitement bio-informatique permet alors la reconstruction d'un génome entier à partir de tous les fragments séquencés [90].

## **2) Séquençage de deuxième génération NGS (Next-generation sequencing).**

On désigne par séquençage haut débit (HTS pour *High-Throughput Sequencing*) aussi appelé NGS pour *Next-Generation Sequencing* un ensemble de méthodes produisant des millions de séquences en un temps rapide et à faible coût.

C'est en 2007 qu'est apparue sur le marché la première génération des appareils de séquençage à haut débit. Ces séquenceurs de « nouvelle » génération ont permis de s'affranchir d'un certain nombre de biais de la méthode Sanger comme la nécessité de cloner l'ADN à séquencer. C'est grâce notamment à la lecture de plusieurs millions de séquences en parallèle que ces nouveaux séquenceurs à « haut débit » ont pu révolutionner les analyses en génomique.

Trois technologies sont apparues de façon quasi simultanée : Le pyroséquençage, le séquençage avec des terminateurs réversibles (Illumina), et le séquençage par ligation (Applied Biosystems).

Globalement ces technologies sont assez proches et fonctionnent en 3 étapes :

- La préparation et l'amplification des molécules d'ADN à analyser.
- L'incorporation des bases complémentaires du brin à séquencer.
- La lecture de la séquence proprement dite.

Le champ d'application de ces nouvelles méthodes de séquençage est très vaste. En effet à partir du moment où il est possible d'obtenir une molécule d'ADN, le séquençage à haut débit peut être utilisé. Grâce à la capacité de ces machines à fournir de grandes quantités de séquences ou de travailler sur un grand nombre d'échantillons en parallèle, ces outils permettent de couvrir

plusieurs technologies différentes employées jusqu'à maintenant comme les puces à ADN, le séquençage classique de Sanger ou la PCR quantitative à haut débit. Les applications disponibles avec le séquençage à haut débit peuvent globalement se regrouper en 3 grandes catégories :

- **Le séquençage de novo** : pour sa capacité à fournir la séquence de génomes inconnus.
- **Le reséquençage** : lorsque la séquence du génome de référence est déjà connue, pour connaître quelles sont les variations génomiques de l'échantillon qui est étudié en comparaison avec celui pris comme référence.
- **Les analyses fonctionnelles** : Dans ce domaine, l'important n'est pas de connaître la séquence d'ADN des échantillons, mais plutôt de quantifier le nombre et le type d'éléments biologiques présents. Pour déterminer par exemple, quelles quantités et quels types d'ARN s'expriment dans une cellule [90].

#### **D) Synthèse de la protéine d'intérêt.**

L'avancement de la médecine moderne dépend largement du développement de la chimie organique synthétique où les molécules de plomb proviennent de produits naturels. En effet, les **toxines doivent être reproduites chimiquement puisque les quantités extraites à partir des animaux venimeux sont assez faibles et non suffisantes pour réaliser l'ensemble des recherches scientifiques.** Le travail de prélèvement et d'entretien des animaux ainsi que le risque qu'ils présentent sont également des inconvénients majeurs à la production naturelle.

Les techniques « omiques » et de séquençage permettent actuellement d'obtenir de grandes quantités de données. Les séquences validées obtenues permettent la synthèse artificielle de toxines d'intérêt thérapeutique, l'objectif majeur étant de **s'affranchir des venins de serpents.**

La pharmacologie est une grande consommatrice de peptides et protéines. Un grand nombre sont synthétisés et testés pour leur interaction avec un récepteur ou leur capacité à induire une réponse biologique. Les peptides et protéines synthétiques non utilisés peuvent être stockés dans des banques. **La synthèse peut être réalisée à tout moment dans le cheminement des étapes allant du venin au médicament final.** On peut par exemple synthétiser une toxine identique à la naturelle afin d'effectuer des tests ou bien produire une toxine optimisée avec

diverses modifications guidées par la modélisation moléculaire ou encore sélectionner et synthétiser uniquement la partie active d'une toxine [86].

Comparaison des avantages et inconvénients des protéines naturelles et synthétiques :

### PROTEINES NATURELLES

### PROTEINES SYNTHETIQUES

Avantages	Inconvénients	Avantages	Inconvénients
Structure native fonctionnelle. Absence d'immunogénicité.	Quantité disponible Difficulté à modifier Difficulté à purifier Risque de contamination	Maitrise de la chaîne de production industrielle (changement d'échelle de production facilité). Modification facilitée par génie génétique. Purification facilitée. Pas de contamination virale ou prion	Rendement Coût de production

Tableau 3 : Différences entre protéines naturelles et de synthèses

Les peptides et protéines peuvent être synthétisés grâce à plusieurs techniques. On peut aujourd'hui fabriquer du venin artificiellement grâce à la **culture de cellules glandulaires**, cependant le rendement reste faible. On peut aussi **synthétiser sous forme recombinante** certaines fractions protéiques par biologie moléculaire à des coûts acceptables. Enfin, on peut procéder à la **synthèse chimique** [52].

#### 1) Techniques recombinantes (in vivo).

Des techniques de biotechnologie permettent de synthétiser des protéines dites « recombinantes » ou encore dites « hétérologues ». Il s'agit de protéines synthétisées par une cellule dont le matériel génétique a été modifié par recombinaison génétique ou « transgénèse ». La transgénèse est une technique consistant à l'intégration d'un gène exogène au génome d'un organisme hôte. Le gène codant pour la protéine d'intérêt est incorporé dans le génome d'une cellule hôte productrice qui réalise alors les étapes de transcription et traduction. Le but de cette manipulation est de permettre à l'hôte de produire une protéine d'intérêt non produite par une espèce donnée et en plus grande quantité.

Le choix de l'hôte se fait en fonction de l'utilisation désirée de la protéine recombinante ainsi que des mécanismes cellulaires nécessaires à la production d'une protéine fonctionnelle telle que l'expression, la capacité de sécrétion, modification post traductionnelle, taille de la protéine synthétisée, etc. Il peut s'agir de bactéries, levures, champignons, cellules de mammifères en

culture, plantes ou encore d'animaux transgéniques. Dans notre cas (synthèse de protéines constitutives de venin ophidien) l'organisme hôte est le plus souvent une bactérie (*Escherichia coli*) ou une levure. Chacune présente ses avantages et inconvénients. Ainsi les bactéries présentent une forte croissance avec un niveau de sécrétion variable mais pas de modification post-traductionnelle alors que les levures, faciles à cultiver, présentent des modifications post-traductionnelles et une bonne expression mais une faible capacité de sécrétion des grosses protéines.

## **2) Synthèse chimique (in vitro).**

Les résidus d'acides aminés d'une chaîne peptidique sont reliés entre eux par la liaison peptidique qui est une liaison amide (-CONH-). Au cours de la synthèse chimique, ces liaisons sont formées de façon artificielle. La synthèse chimique des peptides a lieu dans le sens contraire de la synthèse biologique par activation de la fonction carboxyle (COOH) de l'acide aminé à introduire dans le peptide lors de la formation d'un ester [91]. Un agent déshydratant est utilisé pour former la liaison peptidique entre 2 acides aminés successifs de la séquence désirée.

La synthèse peptidique utilise des **stratégies de « protection » et de « déprotection »** des groupes susceptibles de conduire à des réactions parasites non désirées. Toutes les fonctions n'intervenant pas dans la réaction doivent être protégées afin de contrôler la formation des liaisons peptidiques souhaitée et obtenir un seul produit final. On utilise pour cela des groupements « protecteurs » des fonctions latérales et des fonctions amines N-terminal (-NH<sub>2</sub>) à engager dans la prochaine liaison peptidique.

Il est important de savoir enlever spécifiquement et efficacement ces agents protecteurs lors d'une étape dite de « déprotection ». Cette étape a lieu soit à la fin de la synthèse du peptide pour la déprotection des groupements latéraux, soit entre chacune des étapes de couplage, et ce sans toucher aux protections latérales pour la déprotection de la fonction amine. En effet, l'élongation de la séquence demande ensuite que la fonction N-terminale du peptide puisse être déprotégée sélectivement de manière à pouvoir réagir avec l'acide aminé suivant. Les groupes protecteurs utilisés et destinés à être retirés ainsi en cours de synthèse de façon répétitive, sont qualifiés de « **groupes temporaires** ». En général les chaînes latérales des acides aminés restent protégées tout au long de l'élongation de la séquence pour n'être libérées qu'en fin de synthèse.

Les groupements protecteurs employés sont alors qualifiés de « **permanents** ». Toutefois, certaines synthèses nécessitent la fonctionnalisation sélective de la chaîne latérale d'un acide aminé de la séquence. Dans ce cas précis, les groupements protecteurs sont qualifiés de « **semi-permanents** ».

La synthèse chimique d'un peptide peut se faire selon deux méthodes :

- Soit en phase liquide, avec purification du peptide entre chaque étape.
- Soit sur support solide, une résine polymère insoluble dans tout solvant sur laquelle on vient greffer chimiquement les acides aminés désirés. La séparation se fait alors par simple rinçage entre les étapes de couplage et de clivage de la protection intermédiaire.

Chacune de ces approches a ses avantages et inconvénients :

- **La synthèse en phase liquide** est longue et fastidieuse mais elle peut travailler sur des quantités très importantes, de plus la purification intermédiaire garantit un produit final très propre.
- **La synthèse sur support solide** aussi appelée synthèse de Merrifield est beaucoup plus rapide, elle est entièrement automatisable, mais reste limitée en quantité à quelques grammes de peptides par synthèse. Elle est plus exigeante au point de vue des rendements de couplage et de déprotection intermédiaires, car on conserve sur la résine tous les ratés de couplage. Il faut également disposer d'un support adéquat pour l'ancrage et l'élongation du peptide, et être capable de cliver le peptide de la résine en fin de synthèse.

Cette méthode peut être combinée avec d'autres stratégies de synthèse pour obtenir des protéines plus longues. Une technique fréquemment employée est la synthèse de fragments de plus petites tailles qui sont ensuite rassemblés. La synthèse permet d'obtenir un enchaînement défini d'acides  $\alpha$ -aminés, mais ne dirige pas le repliement de la chaîne. Là encore des techniques complémentaires sont développées en laboratoire.

## **E) Analyse de la structure tridimensionnelle.**

### **1) Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).**

La résonance magnétique nucléaire, connue sous le nom de RMN, est une technique d'analyse permettant de connaître la structure en 3 dimensions des molécules. Elle utilise les propriétés quantiques magnétiques de certains noyaux pour étudier la structure moléculaire. Une grande variété d'informations peut être recueillie par RMN pour les études chimiques (y compris les déterminations structurales et conformationnelles) ainsi que des études biologiques.

Lorsqu'ils sont placés dans un champ magnétique et soumis à un rayonnement électromagnétique, les noyaux atomiques absorbent l'énergie du rayonnement puis la relâche lors du phénomène de relaxation. L'énergie mise en jeu lors de ce phénomène de résonance correspond à une fréquence très précise, dépendant du champ magnétique et d'autres facteurs moléculaires. Seuls les atomes dont les noyaux possèdent un moment magnétique cinétique intrinsèque appelé « spin nucléaire  $\vec{s}$  » donnent lieu au phénomène de résonance. Les noyaux isotopes composés d'un nombre pair de protons et de neutrons ont un nombre quantique de spin nul et ne possèdent donc pas de spin nucléaire [25].

### **2) Cristallographie.**

La cristallographie se consacre à l'étude des substances cristallines à l'échelle atomique et étudie l'organisation des atomes dans la matière pour en comprendre et en utiliser les propriétés. C'est une science en grande partie expérimentale mais qui est aussi basée sur des concepts mathématiques. Les propriétés physico-chimiques d'un cristal sont étroitement liées à l'arrangement spatial des atomes dans la matière.

### 3) Diffraction aux rayons X.

On mesure le plus souvent la diffraction du rayonnement électromagnétique des rayons X dont les longueurs d'ondes (comprises entre 10 nm et 0,01 nm) sont de l'ordre des distances qui séparent les plans atomiques des réseaux cristallins.

Lorsque le cristal à étudier est irradié par un fin faisceau de rayons X, chacun des atomes du cristal réfléchit une onde de faible amplitude, qui se propage dans certaines directions spécifiques. Les ondes issues des atomes interfèrent, faisant apparaître sur un film photographique des taches qui correspondent au maximum des ondes en phase. Les autres ondes, en opposition de phase, s'annulent.

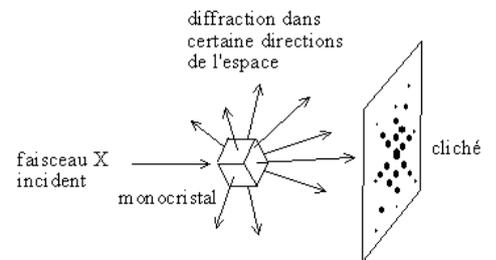


Figure 64 : Diffraction aux rayons X

Par la mesure des angles et de l'intensité des rayons réfractés, il est possible d'obtenir une image tridimensionnelle de la densité électronique dans le cristal. À partir de cette densité, la position moyenne des atomes du cristal peut être déterminée, ainsi que leurs liaisons chimiques, leur entropie et d'autres informations. L'appareil de mesure s'appelle un diffractomètre. Les données collectées forment le diagramme de diffraction ou diffractogramme.

### F) Identification de la cible et détermination de l'activité biologique.

Une fois la structure de la toxine obtenue, les chercheurs essaient de déterminer l'activité biologique de la toxine, c'est-à-dire de déterminer quel sera le(s) récepteur(s) ciblé(s) spécifiquement et quel sera l'effet de l'activation de ce(s) dernier(s) sur l'organisme [86]. **L'identification des cibles biologiques sert à comprendre les mécanismes d'action et prédire les effets pharmacologiques et thérapeutiques du composé étudié ainsi qu'à prédire la toxicité potentielle (effets indésirables, interactions et autres) sur les récepteurs membranaires, canaux ioniques, transporteurs, enzymes, etc.** [25] [92].

La prédiction et l'identification de la cible de la toxine se fait grâce à une modélisation 3D des complexes « molécule-cible » et l'analyse en profondeur des relations « structure-activité » (SAR) des toxines, de même qu'aux techniques de criblages pharmacologiques et utilisation de différents tests biologiques.

## **1) Criblage pharmacologique à haut débit (HTS) : obtention de la protéine de plomb ou « hit ».**

Les méthodes de criblages permettent de repérer et sélectionner parmi un ensemble de composés issus des banques de données, « la » molécule aux propriétés nouvelles, biologiquement actives et d'intérêt pharmacologique ou thérapeutique. Et cela dans le but de découvrir et produire un nouveau médicament.

Le criblage à haut débit « High Throughput Screening » (HTS) est un processus de découverte de médicaments largement utilisé dans l'industrie pharmaceutique. Cette méthode vise à isoler et caractériser les molécules bioactives du mélange complexe des peptides, des protéines et des petites molécules présents dans les venins. L'HTS se base sur le principe des interactions ligand-cibles. Cette approche s'appuie sur la mise en place des tests spécifiques pour examiner l'effet de nouveaux composés sur une cible pharmacologique particulière d'intérêt. **L'HTS permet de tester un grand nombre de structures chimiques diverses contre les cibles de la maladie dans le but d'identifier les « hits ».** Par rapport aux méthodes de criblage de médicaments traditionnels, HTS se caractérise par sa simplicité, sa rapidité, son faible coût et son haut rendement [25].

Il s'agit d'un domaine multidisciplinaire qui tire parti de l'automatisation pour analyser rapidement l'activité biologique ou biochimique d'un grand nombre de composés drug-like. L'HTS représente un système de test très sensible impliquant une opération-plate-forme automatisée, un modèle de dépistage spécifique (in vitro), une bibliothèque de composants abondante, et un système d'acquisition et de traitement des données.

Les différents tests s'appuient sur la robotique, l'informatique, la bio-informatique et les études transcriptomiques et protéomiques et parfois les nanotechnologies, etc.

Les essais HTS sont typiquement réalisés dans des plaques de microtitrage avec un format de 96, 384 ou 1536 puits.

Diverses technologies, en particulier les nouvelles technologies telles que la fluorescence, la résonance magnétique nucléaire, la chromatographie d'affinité, la résonance plasmonique de surface, et de puces à ADN, sont maintenant disponibles, et le dépistage de plus de 100.000 échantillons par jour est déjà possible [93].



*Figure 65 : Criblage haut débit*

Les scientifiques peuvent sélectionner une cible pathologique pour une maladie donnée et cribler des milliers de molécules différentes provenant de sources différentes vis-à-vis de cette cible. Ou ils peuvent sélectionner une molécule particulière issue de venins ophidiens par exemple et la tester sur des milliers de récepteurs potentiels différents pour déterminer ses actions. Pour ces tests, la toxine doit être reproduite chimiquement puisque les quantités extraites à partir des animaux venimeux sont assez faibles [86].

## **2) Tests biologiques.**

### **a) Test in vivo (sur animal).**

Les tests in vivo sont réalisés par administration du produit à tester chez l'animal vivant (souris, rat, lapin, chien, chat, cochon, cheval, etc.). Après administration d'un venin ou d'une toxine spécifique chez l'animal via différentes voies d'administrations, dosage et conditions expérimentales, les scientifiques peuvent observer les effets physiologiques et mesurer la pharmacocinétique en surveillant les constantes physiologiques, ou en effectuant différents examens (électrocardiogramme, prise de sang, récolte des urines, etc.) ou tests. Le test des plaques chauffantes permet par exemple d'observer les effets anesthésiques des venins. Les tests in vivo permettent également la détermination de la toxicité par l'évaluation de la dose létale 50 ou « DL50 » qui est la dose nécessaire pour entraîner la mort de la moitié des animaux testés. De nouveaux modèles biologiques comme les préparations tissulaires isolées (neurones, fibres musculaires ou cardiaques, ganglions, cultures de cellules) tendent à remplacer les animaux d'expérience.

### **b) Test ex vivo (sur tissus ou cellules isolée).**

Les tests ou bio-essais ex vivo sont des tests biologiques mis en place en dehors de l'organisme sur des tissus ou cellules isolées. Ce sont des cultures cellulaires vivantes effectuées à partir de cellules extraites d'un organisme (tel que des vaisseaux sanguins isolés ou des préparations de muscles squelettiques ou lisses pour étudier leur contraction ou relâchement sous l'effet d'une toxine par exemple ou mesure de l'activité électrique grâce à des microélectrodes).

### c) Test in vitro (en éprouvette).

Les tests *in vitro* sont réalisés en dehors de l'organisme vivant ou de la cellule. Ils permettent de qualifier un processus biologique observé et étudié en éprouvette dans des conditions artificielles. Par exemple l'étude de l'effet hématologique d'un composé par observation de la coagulation d'un échantillon de sang dans un tube sec à la suite de son introduction.

### d) Test in silico (bio informatique).

Le développement d'outils informatiques fiables couplé à la croissance de la puissance informatique a permis la mise en place de **techniques de simulations numériques centrées sur la biologie**. Par analogie avec les expressions *in vivo* et *in vitro*, le terme « *in silico* » a été introduit pour qualifier les méthodes numériques mises en œuvre pour traiter de tels systèmes. Le champ *in silico* regroupe un très large ensemble de méthodes numériques fondées sur les lois de la physique et de la chimie qui, utilisant les approches des mathématiques (algorithmes et calculs complexes), permettent de simuler ou de modéliser les phénomènes biologiques et physiologiques à l'aide de l'outil informatique.

Parce que les recherches *in silico* produisent et présélectionnent les médicaments potentiels, elles ont le pouvoir d'accélérer le taux de découvertes et de réduire le besoin d'expériences de laboratoire coûteuses ou d'essais cliniques. Néanmoins, ces travaux ne représentent pas un modèle tout à fait précis du comportement de toute la cellule. Des limitations de notre compréhension de la dynamique moléculaire et de la biologie cellulaire, en plus d'un manque de capacité informatique aboutissent à des suppositions simplificatrices qui restreignent l'utilité des modèles *in silico* actuels. **Les méthodes in silico sont complémentaires des études in vivo et in vitro mais ne peuvent remplacer l'expérience [94].**

**Les tests de criblage in silico existent :** D'après les connaissances existantes, des simulations virtuelles d'effets thérapeutiques pour des cibles données sont étudiées. Cette approche se différencie de celle des laboratoires de criblage à haut débit où on essaie physiquement des milliers de composés chaque jour avec un moindre taux de réussite.

### 3) Modélisation moléculaire tridimensionnelle.

**La modélisation moléculaire a pour but de prévoir la structure et la réactivité des molécules ou des systèmes moléculaires.** Elle va également permettre de tester des hypothèses et d'orienter des expériences. La capacité d'une protéine à interagir avec son récepteur dépend en effet de sa structure tridimensionnelle (3D). Connaître cette dernière permet de cerner sa cible et fonction biologique, et ainsi de mieux comprendre son mode d'action : activité enzymatique, transport, signalisation, liaison avec un ligand, un récepteur, une membrane, etc.

Les méthodes de modélisation moléculaire comprennent la chimie quantique, la mécanique moléculaire et la dynamique moléculaire.

Il existe plusieurs approches :

- **Les approches expérimentales** de détermination de la structure 3D des protéines sont lourdes et coûteuses en temps et ressources, voire inapplicables (cas des protéines non solubles, par exemple).
- **Les approches prédictives dites « in silico »** proposent une alternative rapide et bon marché. Elles sont basées sur un ensemble de lois physiques, statistiques et biologiques. La modélisation moléculaire bénéficie actuellement de tous les avantages de l'informatique qui la rendent compatible avec les analyses à grande échelle. **La bio-informatique dite « structurale »** permet de modéliser la structure tridimensionnelle, l'assemblage (structure quaternaire) et les interactions entre des molécules (ligands) et macromolécules biologiques (protéine, ADN). Elle permet aussi d'analyser le lien entre la structure et la fonction biologique.

On convient généralement qu'il existe 2 grandes classes. Les méthodes dites **de « modélisation comparative »** et les **méthodes « ab initio »**.

### a) Méthodes de « modélisation comparative ».

Elles dépendent de l'existence de protéines homologues dont les structures ont été déterminées expérimentalement. Elles exploitent les données récoltées et recherchent les similitudes.

On se base sur un modèle connu dans les bases de données :

- **Modélisation par homologie des séquences** : Prédiction de la structure 3D d'une protéine inconnue en utilisant comme modèle, une structure 3D connue d'une autre protéine homologue. La méthode se base sur le fait que la structure de la protéine est plus conservée que sa séquence. C'est-à-dire que si les séquences sont similaires alors leurs structures le sont aussi.
- **Reconnaissance des coudes (Fold Recognition) : Treading**. Elle identifie les structures 3D similaires mais dont les séquences ne sont pas homologues. Cette méthode se base sur le principe qu'il existe des protéines qui ont des structures qui se ressemblent avec un faible score d'alignement [95].

### b) Méthodes « ab initio ».

Ces méthodes ne se basent que sur des lois physiques et statistiques. Les algorithmes utilisés par ces dernières sont très gourmands en temps de calcul. Les résultats obtenus progressent avec les progrès en informatique.

A l'heure actuelle, et malgré les immenses progrès des méthodes ab initio, les méthodes comparatives sont encore celles qui proposent les meilleures prédictions [96].

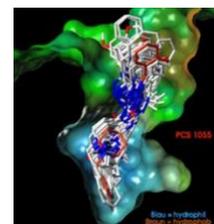
#### **4) Méthode Docking (amarrage ligand-récepteur).**

Le docking (amarrage en français) joue un rôle important dans la conception de nouveaux médicaments et la compréhension des processus biochimiques fondamentaux. Il s'agit d'une **méthode de modélisation moléculaire qui calcule et simule l'orientation préférentielle d'une molécule vers une seconde lorsqu'elles sont liées pour former un complexe stable.**

**L'objectif est d'identifier la conformation géométrique optimisée correcte de la protéine dans son site actif.** Le calcul de la force de liaison permet alors aux scientifiques de prévoir la solidité de l'union entre les deux molécules. L'orientation relative ou « conformation » des deux molécules associées peut aussi influencer le type de signal produit (agoniste / antagoniste). La modélisation du complexe est donc utile aux scientifiques pour la prédiction à la fois de la force d'interaction ainsi que du genre et intensité de signal produit.

L'identification de la conformation géométrique correcte du ligand dans son site actif se fait en 3 étapes :

- Caractérisation du site actif.
- Positionnement du ligand dans le site actif.
- Evaluation des interactions et complémentarité (stérique et électronique) du complexe.



#### **5) SAR « structure activité relationship ».**

La relation structure-activité (SAR) est la relation entre la structure chimique ou 3D d'une molécule et son activité biologique. L'analyse du SAR permet de déterminer les groupes chimiques responsables de l'apparition d'un effet biologique cible dans l'organisme. Ceci permet de modifier l'effet ou la puissance d'un composé bioactif (typiquement un médicament) en modifiant sa structure chimique. Les chimistes utilisent les techniques de synthèse chimique pour insérer de nouveaux groupes chimiques dans le composé biomédical et tester les modifications pour leurs effets biologiques dans le but d'optimiser la molécule d'intérêt thérapeutique.

### **G) Ingénierie : Optimisation moléculaire (Lead optimisation).**

Une fois que les molécules prometteuses ont été identifiées, elles passent par une série de tests afin de fournir une évaluation précoce de leurs toxicités caractéristiques et pharmacocinétiques « ADME » (Absorption, Distribution, Métabolisme et Elimination). Sur la base de ces résultats, la plupart des candidats prometteurs entreront dans **la phase d'optimisation de plomb pour les rendre plus efficaces et plus sûrs.**

L'optimisation moléculaire « lead optimisation » permet de comprendre les propriétés des protéines et peptides, et surtout **d'adapter la molécule d'intérêt au besoin de l'homme par création de mutation.** Il s'agit d'une évolution moléculaire dirigée dans le but d'améliorer certaines activités, affinités au récepteur, résistance à la dégradation, etc.

Les scientifiques peuvent influencer les propriétés des composés de plomb par des modifications chimiques dans la structure. L'objectif de ces modifications guidées est de produire des analogues de la molécule initiale avec une meilleure biodisponibilité, une meilleure puissance, une réduction des activités hors cible et autres propriétés physico-chimiques métaboliques désirables. **Les propriétés caractéristiques intrinsèques du peptide originel sélectionné par la nature sont donc conservées tout en optimisant ses effets dans l'organisme.**

Habituellement, des centaines de différentes variations sont fabriquées et testées à nouveau dans les systèmes biologiques, fournissant des informations supplémentaires pour les chimistes. Des banques de mutants sont créées. A la fin le composé pharmaco-modulé le plus performant est choisi comme médicament candidat pour entrer dans le développement préclinique.

## **H) Essais précliniques et clinique.**

Pour obtenir son autorisation de mise sur le marché (AMM), le médicament est soumis à des études cliniques organisées en 3 phases au cours desquelles sa sécurité d'emploi, son efficacité et son rapport efficacité/tolérance sont successivement étudiés.

### **1) Etude préclinique.**

Les études précliniques marquent les premiers pas du développement d'un médicament. Elles évaluent l'intérêt potentiel de nouvelles molécules dans une pathologie. Les molécules pressenties peuvent être testées in-vitro sur des modèles cellulaires. Elles sont également testées in vivo chez l'animal. Elles apportent les données préliminaires sur le comportement d'une molécule dans des cellules mises en culture et au sein d'organismes animaux vivants telles que : la toxicité (avec la DL50 par ex), la tératogénèse éventuelle, l'efficacité et l'élimination de l'organisme (cinétique), etc.

Les modèles animaux utilisés sont des modèles de rongeurs (souris, rat, cochon d'inde et gerbilles), chien (de moins en moins utilisé), porc pour sa « proximité biologique » avec l'homme ou encore de primates (lorsqu'une molécule a démontré son intérêt).

### **2) Etude clinique Phase I.**

Il s'agit de la première administration à l'homme chez des volontaires sains. Elle permet d'évaluer la pharmacocinétique, la toxicité et de déterminer la dose maximale du médicament tolérée chez l'homme.

### **3) Etude clinique Phase II.**

Il s'agit d'essais chez une population limitée et homogène de patients (quelques centaines). Elle permet de déterminer la posologie optimale du produit en termes d'efficacité et de tolérance par rapport à un placebo. Il est aussi possible de déterminer les interactions médicamenteuses et la pharmacocinétique dès cette phase.

#### **4) Etude clinique Phase III.**

Il s'agit d'essais chez les patients représentatifs de la population de malades à laquelle le traitement est destiné, de grande envergure (plusieurs milliers de patients). Ce sont des essais comparatifs où le médicament en développement est comparé à un ou plusieurs traitements de référence déjà commercialisés ou à un placebo (traitement sans activité pharmacologique). Ils visent à démontrer l'intérêt thérapeutique du médicament et à en évaluer son rapport bénéfice/risque.

Méthodologiquement, les essais qui auront le meilleur impact sont « **randomisés** », c'est-à-dire que l'attribution du traitement se fait par tirage au sort, prédéfini via une liste de randomisation établie avant le démarrage de l'étude ; et en « **double insu** » ou « **double aveugle** », les médecins et patients sont en aveugle du traitement attribué.

A l'issue de la phase III les résultats peuvent être soumis à l'AFSSAPS pour la France et aux Autorités Européennes de Santé (EMA) pour l'obtention de l'autorisation de commercialisation appelée AMM (Autorisation de Mise sur le Marché).

La Phase III se décompose en 2 sous-phases :

- **Phase IIIa** : Essais sur le médicament non encore commercialisé.
- **Phase IIIb** : Essais sur le médicament commercialisé en vue d'une demande d'extension de l'AMM (pour ses effets dans une autre pathologie par exemple).

#### **5) Etude clinique Phase IV.**

La phase IV des essais cliniques est réalisée **après commercialisation du médicament**, sur un nombre de patients souvent très important (jusqu'à plusieurs dizaines de milliers de personnes). Elle permet d'obtenir une meilleure connaissance du médicament dans les conditions réelles d'utilisation et d'évaluer à grande échelle sa tolérance. Tout effet ou événement noté par les médecins et professionnels de santé doit être rapporté au département de pharmacovigilance du laboratoire commercialisant le produit. La **pharmacovigilance** permet ainsi de détecter des effets indésirables très rares qui n'ont pu être mis en évidence lors des autres phases d'essais.

## **PARTIE 3 - APPLICATIONS THERAPEUTIQUES**

Les traitements à base de venin de serpent ont longtemps appartenu aux registres folkloriques ou mystiques. D'abord sous-estimé, on sait aujourd'hui que l'abondance et la diversité des venins représentent un potentiel pharmacologique énorme pour le développement de nouveaux médicaments. Ainsi les toxines ophidiennes sont aujourd'hui étudiées pour leur potentiel biotechnologique et biomédical [97] [98]. Dans la recherche fondamentale, les venins contribuent considérablement à notre compréhension de nombreux mécanismes biologiques allant de la physiologie humaine ainsi qu'à la compréhension des pathologies. Ce sont aussi d'importants modulateurs utilisés comme outils pharmacologiques de diagnostic ou de surveillance de différentes constantes et facteurs physiologiques. Plus important encore, en thérapeutique médicale, ils mènent à la découverte et à l'élaboration de nouveaux médicaments qui ont eu un impact positif significatif sur la santé humaine [25] [99]. En raison de leurs fonctions pharmacologiques très diversifiées, couplées à une forte spécificité de cible, les toxines ophidiennes suscitent un très grand intérêt des chercheurs pour le développement de nouveaux agents thérapeutiques de diverses pathologies telles que les troubles cardiovasculaire, l'hypertension artérielle, le cancer, la douleur, les troubles hématologiques, les maladies nerveuses, les maladies inflammatoires (arthrite), les maladies infectieuses, etc. [100] [97] [98] [296] [101]. De nombreuses toxines sont en cours d'études et développées dans la mise au point de nouveaux médicaments pour le traitement de nombreuses affections.

Dans cette troisième partie nous verrons les applications les plus avancées et plus prometteuses de la recherche médicale.

## **I Applications cardiovasculaires, notamment le traitement de la pression artérielle.**

De nombreux serpents contiennent dans leur venin des polypeptides susceptibles d'avoir un impact sur le système cardiovasculaire comme une chute de la pression artérielle. L'action de ces venins peut induire un état de choc par différents mécanismes :

- Hydrolyse de l'endothélium vasculaire (hémorragies).
- Augmentation de la perméabilité vasculaire.
- Augmentation de de la perméabilité vasculaire par hydrolyse de l'endothélium.
- Augmentation perméabilité vasculaire par la ICPP, structure similaire au VEGF.
- Inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine et augmentation de l'action biologique de la bradykinine.
- Vasoconstriction par l'action d'équivalents structurels et fonctionnels de peptides natriurétiques.
- Action directe sur le muscle cardiaque (sarafotoxines (taicotoxines) et cytotoxines).
- Inhibition des canaux calciques de type l (calciseptine, toxines fs2, c10s2c2 et s4c8) entraînant des destructions et des dérèglements d'intensité variable [3].

L'intervention des venins sur certaines fonctions physiologiques se complique secondairement par une atteinte cardiovasculaire. Le syndrome inflammatoire ou les troubles hémorragiques provoquent une baisse du volume sanguin ce qui va avoir des répercussions sur la pression sanguine et le cœur. Les atteintes neuromusculaires centrales ou périphériques et les perturbations respiratoires ont également des conséquences importantes sur le système cardiovasculaire, ne serait-ce qu'en raison des variations de la pression des gaz du sang. Ainsi, il existe une vaste gamme de toxines ophidiennes avec une activité cardiovasculaire puissante. Ces toxines se sont révélées très prometteuses dans la compréhension et le traitement des maladies cardiovasculaires, notamment de l'hypertension artérielle. Certaines toxines ont été utilisées comme sondes de cibles thérapeutiques potentielles ou comme composés de plomb dans le développement d'agents thérapeutiques. Parmi elles, 3 classes présentent un intérêt particulier pour les traitements [102] :

- Peptides potentialisant la bradykinine ou « Inhibiteurs de l'Enzyme de Conversion (IEC) ».
- Peptides natriurétiques ophidiens.
- Inhibiteurs de canaux calciques type-L [103].

On peut également citer les sarafotoxines et  $\beta$ -cardiotoxines, dont le potentiel thérapeutique commence tout juste à être exploré.

### **A) Les Inhibiteurs de l'Enzyme de Conversion ou IEC.**

Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion ou « IEC » forment un groupe thérapeutique récent, prenant une part importante dans le traitement de l'hypertension artérielle systémique, de l'insuffisance cardiaque congestive et du post infarctus avec ou sans insuffisance cardiaque mais avec une fraction d'éjection basse < 40%. Leur chef de file, le Captopril ®, dérive de l'étude d'une petite protéine issue du venin du serpent brésilien *Bothrops jararaca* [103].

#### **1) Les origines des IEC.**

L'intérêt thérapeutique général vis-à-vis des venins de serpent à réellement commencé avec les premières découvertes de médicaments antihypertenseurs sur la base de ce fameux peptide dans les années 1970. Déjà connu pour être particulièrement toxique, le venin du *Bothrops jararaca* est si puissant que les tribus brésiliennes indigènes l'utilisaient déjà à l'époque comme poison. Déposé sur leurs flèches, il entraînait l'effondrement immédiat de la proie, rendant sa fuite impossible [104]. Commercialisé à grande échelle, le Captopril fût le premier inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine par voie orale. Il représente aujourd'hui l'un des exemples les plus réussis du développement d'une nouvelle classe thérapeutique dérivée de venin [74].

**Tout débute en 1939**, lorsqu'un pharmacologue brésilien, le **Dr Maurício Rocha e la Silva** travaillant à l'Institut Biologique de São Paulo entame des travaux sur le venin des serpents de son pays et le choc circulatoire lié à la toxicologie de leur morsure. Les études consistaient à injecter différents venins de serpents dans l'organisme d'animaux puis à observer quelles enzymes ou autres produits chimiques avaient été générés par le corps de l'animal [104]. Rejoint par deux collègues physiologistes, Wilson Teixeira Beraldo et Gastão Rosenfeld, **ce n'est qu'en 1948 que le venin du *Bothrops jararaca* suscite réellement son intérêt**. En étudiant les composants du plasma sanguin des animaux envenimés, les chercheurs montrèrent que le venin du *Bothrops jararaca* induisait la libération d'un nonapeptide qu'ils nommèrent « **bradykinine** ». Ce peptide produit une puissante vasodilatation entraînant une chute brutale

de la pression artérielle [74] [105] [104]. Cette découverte contribua à une meilleure compréhension de nombreux phénomènes physiologiques et pathologiques. Malgré son grand potentiel, l'idée de l'utilisation de la bradykinine comme médicament antihypertenseur fut rapidement abandonnée car, administrée dans le corps humain la molécule est rapidement dégradée et rendu inactive par trois kinases l'enzyme de conversion à l'angiotensine (ECA), l'aminopeptidase P (l'APP) et carboxypeptidase N (CPN) qui clivent respectivement la bradykinine aux positions 7-8, 1-2 et 8-9 [104].

L'enzyme de conversion à l'angiotensine ou « ECA » fut découverte et identifiée en 1956 par Leonard T. Skeggs comme l'enzyme responsable de la conversion de l'angiotensine I en angiotensine II, substance vasoconstrictrice [106]. Le potentiel thérapeutique de cette enzyme pour la régulation de la pression artérielle fut d'abord sous-estimé. Quelques années plus tard, en 1965 l'un des collaborateurs de Rocha e Silva, le Dr Sérgio H. Ferreira, découvrit dans le venin du *Bothrops jararaca* le BFP « Bradykinin Potentiating Facteur » aussi nommée BPP « Peptide Potentiating Bradykinin ». Cette nouvelle fraction peptidique de faible poids moléculaire potentialise l'intensité et la durée de l'action de la bradykinine et en particulier ses effets vasodilatateurs hypotensifs. Cette découverte initiale donna l'idée d'une nouvelle gamme de médicaments pour le traitement de l'hypertension artérielle [74] [105] [104] [107].

En 1967, Kevin K.F. Ng a découvert et expliquer le fonctionnement du Système Rénine-Angiotensine-Aldostérone (SRAA) comme un système de régulation physiologique diminuant le diamètre des artères et contribuant ainsi à augmenter la pression intravasculaire. Cela a permis d'identifier l'angiotensine II, hormone vasoconstrictrice du « SRA », comme une cible intéressante pour la régulation de la tension. En effet, l'angiotensine II entraîne la vasoconstriction des vaisseaux sanguins et donc l'augmentation de la tension.

En 1968, le Dr Y.S. Bakhle démontra que l'enzyme de conversion extraite du poumon de chien était inhibée par un mélange de BPF contenant 9 peptides différents extraits du venin de *Bothrops jararaca* [105] [108]. Le Dr Sergio H. Ferreira rejoignit à Londres l'équipe du pharmacologue John R. Vane (au début des années 70). En collaborant ensemble, les deux équipes de chercheurs réalisèrent que la conversion n'avait pas lieux dans le plasma comme il avait été suggéré mais dans la circulation pulmonaire et se rendirent compte que l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) était responsable de l'inactivation de la bradykinine [104] [109]. En testant le mélange de BPF les scientifiques constatèrent qu'en plus de potentialiser l'action de la bradykinine et d'inhiber sa dégradation, le BPF est aussi capable d'inhiber

l'enzyme permettant la conversion de l'angiotensine I en angiotensine II. Cette découverte ouvra la piste d'un potentiel traitement antihypertenseur [10]. Parmi les 9 peptides du mélange BPF deux suscitèrent un intérêt particulier pour le développement d'un futur médicament hypotensif, le pentapeptide BPP5a et le nonapeptide « téprotide » [108].

### a) Le pentapeptide BPP5a.

Le premier composant efficace inhibiteur de l'ECA (isolé du mélange BPF et extrait du venin) fut le pentapeptide « BPP5a », un substrat lent de l'ECA. La séquence de tripeptides « Tryptophane-Alanine-Proline » présente dans BPP5a a été identifiée comme le domaine actif de la molécule. Étant donné que le BPP5a et le tripeptide sont très instables et rapidement dégradés dans le corps, de nombreuses modifications ont été effectuées par la suite sur la molécule, afin de prolonger la durée d'action dans l'organisme ainsi que son efficacité. À cette fin, la séquence tryptophane-alanine-proline a été échangée contre une séquence similaire mais plus stable phénylalanine-alanine-proline. Ces séquences ont été jugées optimales pour se lier au site actif de l'enzyme de conversion [106]. L'intégration d'une structure analogue acide Bernstein ou acide glutarique a permis par la suite d'apporter une stabilité plus importante et un renforcement de l'inhibition à l'enzyme de conversion de l'angiotensine.

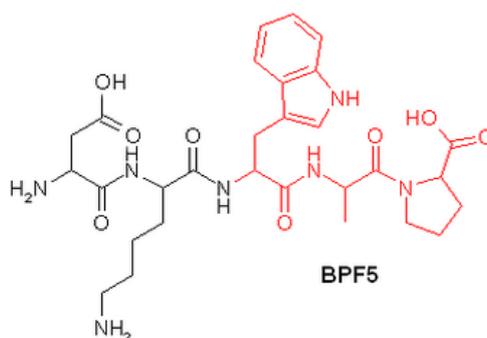


Figure 66 : BPF5

### **b) Le nonapeptide BPP9 « Teprotide ».**

Le BPP9 est le plus grand peptide isolé du mélange BPF. Constitué de 9 acides aminés (Pyr-Trp-Pro-Arg-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro), ce nonapeptide est aussi l'inhibiteur de l'ECA le plus puissant et le plus stable retrouvé dans le mélange BPF isolé du venin de *Bothrops jararaca*. Son nom « teprotide » provient d'ailleurs de ses 4 résidus proline qui lui confère sa grande stabilité [108]). Le teprotide inhibe la conversion d'angiotensine I en angiotensine II, la dégradation de la bradykinine et peut potentialiser certaines des actions pharmacologiques de bradykinines [11]. Choisi comme la molécule la plus prometteuse en raison de son effet de longue durée in vivo, le teprotide a été synthétisé pour la première fois en 1970 par Ondetti, ce qui a permis une étude plus approfondie de son action hypotensive. Bien que le teprotide soit un agent antihypertenseur efficace, son utilité fut limitée dans un premier temps en raison de son coût (un million de dollars le kilo) et son manque d'activité orale qui oblige une administration intraveineuse du produit [104].

Convaincu que le téprotide pouvait constituer un potentiel médicament antihypertenseur, le pharmacologue John R. Vane, alors consultant chez le laboratoire pharmaceutique américain Squibb (aujourd'hui Bristol-Myers Squibb), proposa à Charles G. Smith, directeur des programmes R & D du laboratoire, de développer cette hypothèse. L'idée ne souleva guère d'enthousiasme. Au début des années 70, l'enzyme de conversion de l'angiotensine I ne constituait pas une cible digne d'intérêt car elle passait pour essentiellement impliquée dans l'hypertension maligne qui affectait peu de patients. Vane, quant à lui, était persuadé qu'elle était aussi impliquée dans l'hypertension essentielle et que la commercialisation d'un inhibiteur de cette enzyme permettrait au laboratoire de s'imposer sur le marché de la cardiologie. Un seul des nombreux experts contactés exprima un intérêt pour ce concept, le cardiologue John H. Laragh [105]. Bien qu'il soit inactif oralement le rendant peu maniable pour traiter l'hypertension essentielle, Charles G. Smith, accepta toutefois de le tester malgré les dépenses nécessaires.

Dès le début, les études ont indiqué un besoin de médicaments qui interfèrent avec les activités Ang II, parce que son excès peut provoquer une nécrose tubulaire myocardique et rénale. Après diverses transformations, Laragh put enfin traiter avec un total succès 17 patients hypertendus [105] montrant ainsi que la suppression de l'Ang II par inhibition de l'ECA est bien un traitement efficace pour l'hypertension et l'insuffisance cardiaque [110].

### c) Modulation moléculaire : Relation Structure -Activité.

Le laboratoire pharmaceutique Squibb se lança aussitôt dans le développement d'un peptide actif par voie orale. De nombreux inhibiteurs furent conçus par deux chimistes de la société, David W. Cushman (biochimiste) et Miguel A. Ondetti (chimiste organique), qui mirent en œuvre une logique de corrélation structure-activité à partir des peptides de la fraction BPF [105] [108]. L'étude de ces peptides permis d'identifier puis d'affiner le modèle hypothétique du site de liaison actif de l'ECA utile pour développer des médicaments hypotenseurs [106] [104].

En modifiant systématiquement la structure du tetropride et en voyant quels effets ceux-ci avaient sur son activité, les chercheurs ont identifiés le site d'action indispensable comme étant le groupe proline (C-terminal indiqué en bleu figure ci-contre). Le reste de la molécule aidant seulement à lier le site actif à l'ECA [104].

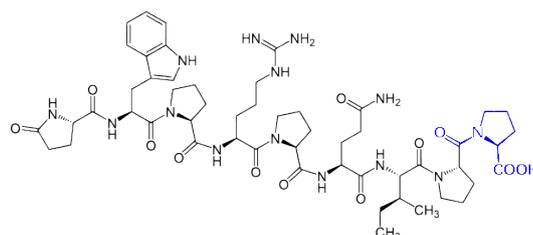


Figure 67 : Structure moléculaire du Teprotide. Chaîne peptidique constituée de 9aa : Pyr-Trp-Pro-Arg-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro [11].

L'étape logique suivante était de concevoir une molécule capable de combiner la capacité d'inhibition de l'enzyme de conversion (l'ECA) avec la capacité de se lier efficacement au substrat. Les chercheurs ont donc gardé le groupe de fin, proline, et ont ajouté une sidechain différente afin de lier plus efficacement l'enzyme (que le groupe à 8 acides aminés original) [104].

Un essai fut organisé avec pour base l'acide L-benzyl-succinique, un analogue de la Phénylalanine, ayant la capacité de masquer le site actif de la carboxypeptidase A, liée à une molécule de Proline, selon les séquences mises en évidence auparavant. Cela a abouti à la conception de la « succinyl-L-proline » d'efficacité supérieure mais pas encore assez grande pour la conception d'un médicament [104] [106].

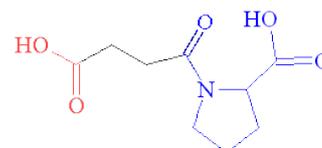


Figure 69 : Structure chimique du Succinyl-L-proline [11]

La synthèse de différents dérivés de cette structure a montré que le remplacement du groupement carboxyl (en rouge figure ci-contre) avec une fonction de sulfhydryl (SH) (en vert ci-contre) augmentait l'efficacité inhibitrice de la molécule (1000 fois plus actif que le succinyl-L-proline) [104]

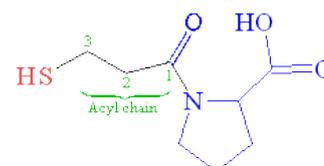


Figure 68 : Structure chimique du Succinyl-L-proline sulfide [11]

L'optimisation de la longueur de la chaîne « acyl » a révélé que la longueur de chaîne d'acyl optimale était de trois. En effet la molécule « 3-mercaptopropanoyl-L-proline » s'est révélé être 5 fois plus active que la « 2-mercaptopropanoyl » et 50 fois plus grande que le dérivé « 4-mercaptopropanoyl » [104]. De même, l'ajout d'un groupement méthyle en position 2 sur le résidu succinyl a encore permis une augmentation de la puissance d'action de 15 fois la capacité inhibitrice de la molécule [106].

#### **d) 1974 : Création du Captopril.**

Après le criblage et modulation d'un certain nombre de composés, David W. Cushman et Miguel A. Ondetti choisirent l'acide (2S)-1-[(2S)-2-méthyl-3-sulfanylpropanoyl] pyrrolidine-2-carboxylique (nom chimique du captopril) qui se révéla être l'inhibiteur le plus puissant [110].

Produit d'un grand travail de recherche et créé pour la première fois en 1974, il devint le médicament commercialisé sous le nom de Captopril® par la société pharmaceutique Bristol-Myers Squibb. Inaugurant ainsi une famille aujourd'hui irremplaçable : celle des inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) [105] [104] [106].

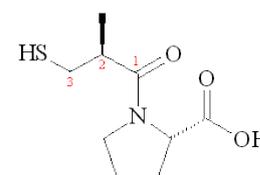


Figure 70 : Structure du captopril [11]

Le Captopril a gagné l'approbation FDA le 6 avril 1981 pour sa mise sur le marché. Ce médicament est maintenant généralement prescrit pour traiter l'hypertension. D'autres médicaments inhibiteurs de l'ECA basés sur la structure du Captopril ont été développés par la suite, afin d'améliorer l'efficacité et diminuer les effets indésirables [74] [104]. Deux ans plus tard (en 1983), un deuxième inhibiteur de l'ECA, « l'Enalapril » a été mis sur le marché. En raison du grand succès thérapeutique et économique des médicaments Captopril et Enalapril, une deuxième génération d'inhibiteurs de l'ECA a été développée. Elle est disponible depuis le début des années 1990, parmi elles, le Lisinopril et le Ramipril. D'autres ont suivi par la suite. Les inhibiteurs de l'Enzyme de Conversion « IEC » synthétisés sur le modèle du captopril réduisent le volume plasmatique et les résistances périphériques, principales causes de l'hypertension artérielle.

Les effets cliniques des IEC ont été étudiés chez un grand nombre de patients. En plus de leur effet hypotensif, ils réduisent la morbidité et la mortalité (cardio-vasculaire, que cela soit chez l'insuffisant cardiaque ou pas) [110]. Ces médicaments, constituant un traitement de fond de

l'hypertension artérielle, sont d'autant plus appréciés qu'ils ne présentent pas d'effet rebond, l'un des effets indésirables des traitements de l'HTA [3] [99].

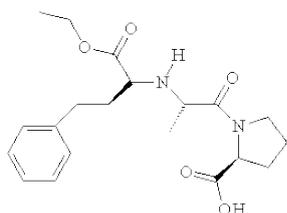


Figure 73 : Enalapril

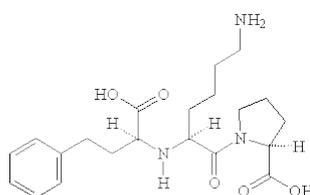


Figure 73 : Lisinopril

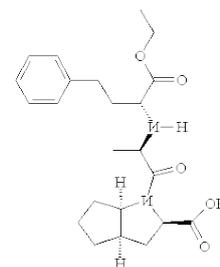


Figure 73 : Ramipril

## 2) Le médicament.

### a) Indications.

Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine ou IEC représentent l'un des exemples les plus réussis de développement thérapeutique à base d'un dérivé de venin. Leur efficacité est désormais bien établie dans le traitement de l'hypertension artérielle systémique (principale indication), de l'insuffisance cardiaque congestive, du post infarctus avec ou sans insuffisance cardiaque mais avec une fraction d'éjection basse < 40% et des néphropathies diabétiques [109]. En cas de pathologies rénales telles que la néphropathie diabétique, les inhibiteurs de l'ECA entraînent une excrétion réduite des protéines (protéinurie) et empêchent toute progression de l'affection (néphroprotection). Il est prouvé que les IEC réduisent les risques de crise cardiaque, d'AVC et de décès chez les personnes ayant des antécédents de maladie coronarienne ou d'insuffisance cardiaque de type systolique [111]. Les IEC peuvent également diminuer les sensations de fatigue et d'essoufflement, réduire la durée d'une hospitalisation [165]. Par ailleurs, les inhibiteurs de l'ECA se sont révélés dans de nombreuses études cliniques comme ayant pour effet d'allonger la vie même en cas d'insuffisance cardiaque congestive. Ils aident à contrôler la pression artérielle en facilitant le pompage du cœur par diminution de la post-charge et de la tension de la paroi du muscle cardiaque du fait de la baisse de l'angiotensine II. Ce sont des médicaments de première intention en cardiologie. Les IEC sont généralement prescrits à long terme en monothérapie ou en association avec d'autres anti-hypertenseurs. L'association d'un IEC et d'un diurétique thiazidique (l'hydrochlorothiazide) entraîne un effet antihypertenseur synergique (additif, qui entraîne une baisse de la pression artérielle plus importante que chacun des composants utilisés seuls et diminue en outre le risque d'hypokaliémie induite par le diurétique seul [111].

## **b) Mécanisme d'action.**

**Le système rénine-angiotensine-aldostérone (SRA) est une bonne cible pharmacologique.** En effet, il s'agit du principal système de régulation de la volémie qui agit conjointement avec le système nerveux végétatif de la pression artérielle (PA), aussi bien à court terme (minutes) qu'à long terme (jours) [109]. Il s'agit d'une cascade enzymatique dont le substrat initial est l'angiotensinogène et dont l'activation aboutit à la synthèse d'un octapeptide vasoactif, l'angiotensine II.

La cascade des réponses intermédiaires est pour l'essentiel la suivante :

- Sécrétion de l'enzyme protéolytique « **rénine** ».
- Rénine cliangiotensinogène plasmaticque en angiotensine I (décapeptide peu actif).
- Enzyme de conversion de l'angiotensine transforme l'angiotensine I en angiotensine II.
- Par ailleurs, **l'ECA dégrade et inactive la bradykinine** [109].

L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) active donc le système, dans le sens de l'augmentation de la pression artérielle. Elle augmente la production d'un vasoconstricteur puissant, l'angiotensine II, et dégrade parallèlement la bradykinine (vasodilatateur et hypotenseur) [106]. Les IEC agissent en inhibant l'ECA de manière spécifique, compétitive et réversible [109]. Le mécanisme d'action moléculaire des IEC repose sur leur similitude avec la partie terminale de la chaîne peptidique de l'angiotensine I. De ce fait, les IEC sont reconnus par erreur par l'enzyme de conversion de l'angiotensine comme le substrat physiologique angiotensine I, composant du système rénine-angiotensine-aldostérone. À la différence du substrat physiologique, ils ne sont cependant pas transformés par l'enzyme et bloquent cette dernière, entraînant une baisse rapide et durable de la pression artérielle [99]. L'aldostérone provoque une rétention de sodium, d'eau et une fuite du potassium, facteurs favorisant l'hypertension artérielle par augmentation du volume extracellulaire.

En inhibant l'enzyme de conversion, les IEC :

- **Bloquent la conversion de l'angiotensine I en angiotensine II** (vasoconstrictrice), qui stimule la sécrétion d'aldostérone par le cortex surrénalien. Ce qui entraîne :
  - Une diminution de la résistance artérielle, du tonus vasculaire et de la pression artérielle, permettant au sang de mieux circuler et au cœur de travailler moins.
  - Une diminution de la sécrétion d'aldostérone par la corticosurrénale permet une fuite d'eau, de sodium et une rétention de potassium.
  - Une élévation de l'activité rénine plasmatique où l'angiotensine II et l'aldostérone n'exercent plus de rétrocontrôle négatif.
- **Bloquent la dégradation des bradykinines**, entraînant une élévation de leur taux plasmatique :
  - Accroît son action vasodilatatrice hypotensive.
  - Augmente la synthèse de prostaglandines vasodilatatrice.
  - Son accumulation entraîne en revanche des effets indésirables [112] [3].

Les IEC présentent :

- Un effet vasodilatateur rapide par suppression de l'effet vasoconstricteur direct de l'Angiotensine II et du tonus sympathique entretenu par l'Angiotensine II. Cet effet s'exerce à la fois sur les veines (impliqués dans le remplissage diastolique ou pré-charge) et les artérioles (impliqués dans la post-charge et la PA systolique).
- **Un effet plus tardif de majoration de l'excrétion de  $\text{Na}^+$  et de la rétention de  $\text{K}^+$** , par suppression des effets ioniques de l'Angiotensine II (rétention du sodium  $\text{Na}^+$ ) et de l'aldostérone (rétention  $\text{Na}^+$ , d'eau et excrétion  $\text{K}^+$ ).
- **Un effet à long terme**, favorisant la **régression de l'hypertrophie compensatrice** pathologique du cœur et des grosses artères [109].

### c) Pharmacocinétique.

A l'exception du captopril et du lisinopril, tous les IEC utilisés en thérapeutique sont des prodrogues. Ce sont des esters, hydrolysés par les estérases plasmatiques de l'organisme pour libérer la forme acide active. La plupart des IEC commercialisés actuellement sont résorbés presque entièrement par le tractus digestif. Les concentrations plasmatiques maximales des formes actives sont atteintes après 1 à 8 heures. Les demi-vies plasmatiques varient entre 2 et 40 heures et leur durée d'action varie en conséquence de 8 à 48 heures. Beaucoup d'IEC sont essentiellement éliminés par les reins, ce qui nécessite un ajustement posologique en cas d'insuffisance rénale (fonction de la créatininémie) [109]. D'autres ont une élimination rénale et hépatique, qui peut être adaptative selon s'il existe une insuffisance rénale ou hépatique.

### d) Effets indésirables et précautions d'emploi.

Les effets indésirables des IEC sont assez rares, et le plus souvent banals, ce qui en fait des produits souvent bien tolérés, à condition de respecter les règles fondamentales de prudence et de surveillance, notamment chez le sujet âgé ou insuffisant rénal.

**Toux sèche isolée de type irritative, sans expectoration et persistante.** Retrouvée très fréquemment chez les patients, elle est due à une dégradation plus lente et à une accumulation de la bradykinine et cesse à l'arrêt du traitement. D'autres effets indésirables concernant les voies respiratoires peuvent survenir à la suite d'un excès de bradykinines comme l'enrouement et les maux de gorge, ainsi que des crises d'asthme et une détresse respiratoire même si c'est rare.

**Réactions d'hypersensibilités** (dû à l'excès de bradykinine) sont le plus souvent représentées par **des réactions cutanées** (rashes, exanthème, poussée urticaire), mais des **réactions allergiques sévères** peuvent aussi survenir, sous forme d'œdème de QUINCKE (ou angio-œdèmes). Ces effets indésirables graves surtout en cas de localisation au niveau de la glotte ou du larynx, sont sans doute liés à l'augmentation de la concentration de bradykinine. Les réactions d'hypersensibilités surviennent le plus souvent au début du traitement et imposent un arrêt immédiat et définitif.

**Hypotension artérielle**, généralement la conséquence d'un surdosage aigue à la suite d'une prescription inadaptée ou excessive. On peut aussi observer cet effet exagéré aux doses

thérapeutique lors des premiers jours du traitement, notamment dès la première dose chez les patients à risque, c'est à dire chez les sujets âgés ou en insuffisance cardiaque avec activité rénine plasmatique élevée. On préconise de débiter le traitement par de petites doses, à administrer préférentiellement le soir au coucher, avec surveillance de la tension [109].

**Troubles généraux, liés à l'effet hypotenseur** : asthénie, céphalées, vertiges, étourdissement et malaise peuvent survenir occasionnellement survenir.

**Hyperkaliémie** dû aux actions sur le système Rénine-Angiotensine-Aldostérone, avec diminution de la distribution d'aldostérone. Elle ne s'observe qu'en cas de supplémentation potassique inadaptée ou d'insuffisance rénale.

**Insuffisance rénale fonctionnelle**, aiguë ou chronique. Elle peut occasionnellement être observée, du fait de l'intervention dans le bilan hydrique et électrolytique et en cas de sténose bilatérale des artères rénales, par suppression de la vasoconstriction des artérioles glomérulaires efférentes, entraînant une baisse de la filtration glomérulaire. Ce mécanisme pourrait également intervenir chez certains malades traités par diurétiques ou en régime désodé sévère.

**Troubles du gout (de type dysgueusie)**, perte de goût ou goût métallique en général (surtout avec le captopril), cela ne survient qu'avec de fortes doses et se résorbe après quelques mois.

**Troubles digestifs** peuvent survenir rarement (diarrhée, nausées) [109] [112].

#### e) Interactions médicamenteuses.

Les associations déconseillées sont :

- **Les diurétiques hyperkaliémiants, et les sels de potassium** peuvent provoquer une hyperkaliémie (potentiellement létale), surtout lors d'une insuffisance rénale.
- **Le lithium** : on peut observer une diminution de l'excrétion rénale du lithium et donc une augmentation de la lithémie.

Associations nécessitant des précautions d'emploi :

- **Antidiabétiques (insulines, sulfamides hypoglycémiants).** L'utilisation des inhibiteurs de l'enzyme de conversion peut entraîner une majoration de l'effet hypoglycémiant chez le diabétique sous insuline ou sulfamides hypoglycémiants.
- **Baclofène** : il existe un risque de majoration de l'effet antihypertenseur.
- **Diurétiques** : L'association d'un IEC à un diurétique peut provoquer une hypotension artérielle brutale accompagnée ou non d'une insuffisance rénale aiguë.
- **AINS (anti-inflammatoire non stéroïdien), salicylés à forte doses** : il existe un risque d'insuffisance rénale aiguë chez le malade à risque (sujet âgé ou déshydraté).

Associations à prendre en compte :

- **Antidépresseurs imipraminiques (ou tricyclique) et neuroleptiques** : il y a addition des effets antihypertenseurs et risque d'hypotension orthostatique majorés.
- **Corticoïdes** : il y a diminution de l'effet antihypertenseur [106].

#### **f) Contre-indications.**

Les IEC sont contre-indiqués en cas :

- D'antécédent d'angio-œdème (œdème de Quincke) ou choc anaphylactique lié ou non au IEC.
- D'allergie au produit ou à l'un des composants.
- De déplétion hydrosodée excessive.
- De sténose serrée bilatérale des artères rénales ou sur rein fonctionnel unique.
- De grossesse et allaitement. La prescription des IEC à la femme enceinte est déconseillée en début de grossesse en raison d'un faible risque tératogène mais surtout au cours du deuxième ou troisième trimestre en raison du risque d'apparition d'une insuffisance rénale grave chez l'enfant.

## **B) Les peptides natriurétiques.**

Le venin de serpent représente une source importante de peptides natriurétiques (PNs). Du fait de leur structure et leurs fonctions proches des peptides natriurétiques humains, les peptides natriurétiques issus du venin de serpent représentent des candidats potentiels pour le développement de nouveaux médicaments dans le domaine cardiovasculaire et suscitent aujourd'hui un grand intérêt pour la recherche. En effet, ces peptides possèdent non seulement une stabilité plus grande comparée à leurs homologues mammifères, mais certains d'entre eux ont aussi une puissance plus grande.

Parmi les peptides natriurétiques les plus intéressants on trouve le DNP « **Dendroaspis peptide natriurétique** » extrait à partir du venin de mamba vert *Dendroaspis angusticeps* (Elapidae) qui fut le premier peptide natriurétique d'origine ophidienne identifié. Il possède une plus grande activité et stabilité par rapport aux PNs de la famille des mammifères. D'autres peptides natriurétiques ont été découverts suite à l'étude de nombreux venins de serpent tels que *Pseudocerastes persicus*, *Oxyuranus microlepidotus*, *Crotalus durissus cascavella* (*C. d. terrificus*), *Micrurus corallinus*, *Bungarus flaviceps* et *Agkistrodon halys blomhoffii* (*Gloydius blomhoffii blomhoffii*) [31] [113] [103].

Afin de mieux comprendre l'action du DNP et son intérêt dans le développement d'une molécule thérapeutique, il paraît important de faire un rappel sur les peptides natriurétiques humains.

### **1) Rappels sur les peptides natriurétiques humains.**

Les peptides natriurétiques humains (NPs) sont des hormones **cardioprotectrices** synthétisées et sécrétées (sous forme de précurseurs) essentiellement par les myocytes cardiaques et probablement aussi par les fibroblastes cardiaques en réponse à l'étirement du myocarde [31]. En effet, leur synthèse est très faible dans un cœur normal et ce n'est qu'en situation pathologique avec mise en tension anormale ou « distension » de la paroi ventriculaire que leur synthèse et sécrétion deviennent importantes. Il apparaît aussi clairement que divers stimuli hormonaux (angiotensine II, endothéline 1, catécholamines) et hypoxie stimulent la sécrétion. Ce sont des biomarqueurs majeurs des pathologies cardiovasculaires et leur dosage joue un rôle essentiel dans le diagnostic d'une insuffisance cardiaque. Les peptides natriurétiques agissent

sur des récepteurs spécifiques appelés NPR « Natriuretic Peptide Receptor » appartenant à la famille des récepteurs à activité guanylate-cyclase. Il existe trois types de récepteurs NPR qui sont le NPR-A, NPR-B et NPR-C. Ces récepteurs sont situés aussi bien au niveau de la membrane plasmique qu'au niveau du cytosol et sont exprimées dans la plupart des types cellulaires. L'activation de ces récepteurs entraîne une augmentation du GMP cyclique intracellulaire et divers effets bénéfiques au cours d'une insuffisance cardiaque [114].

Les peptides natriurétiques sont éliminés de la circulation par 3 mécanismes :

- L'internalisation au sein des cellules (Endocytose) par l'intermédiaire du récepteur NPR-C qui ne possède aucune activité enzymatique.
- Dégradation par l'endopeptidase neutre (NEP) qui est une enzyme ancrée à la surface des cellules endothéliales.
- Elimination par voie rénale.

Les peptides natriurétiques humains forment une famille polypeptidique dont les 3 principaux membres sont :

- L'ANP (28aa) peptide natriurétique auriculaire ou « *atrial natriuretic peptide* ». Sécrété par les myocytes des oreillettes lors de leur distension.
- Le BNP (32aa) peptide natriurétique cérébral ou de type B « *brain natriuretic peptide* ». Secréte par les myocytes des ventricules en réponse à un étirement.
- **Le CNP (22aa) peptide natriuretique de type C.** Synthétisé dans le cerveau et l'endothélium vasculaire.

Synthétisés sous forme de précurseurs ces peptides résultent de découpages enzymatiques successifs de grosses molécules, préprohormones et prohormones, en fragments peptidiques. Tous 3 ont été largement étudiés pour leur utilisation en tant qu'agents thérapeutiques pour le traitement des maladies cardiovasculaires. Bien qu'efficace, leur courte demi-vie et les effets secondaires rénaux limitent leur utilisation [113] [115].

### a) Structure.

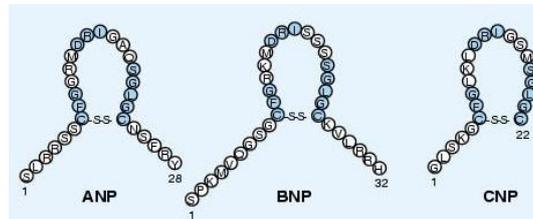


Figure 74 : Peptides natriurétiques humains [23].

Ces peptides renferment une structure cyclique commune de 17 acides aminés fortement conservés résultant d'un pont disulfure entre deux résidus de cystéines en position 7 et 23.

Les peptides natriurétiques ANP et BNP possèdent une extension N- et C- terminale qui sont bien conservées entre les membres de chaque classe, tandis que le CNP ne présente aucune extension C-terminal. L'effacement séquentiel des résidus C-terminal influence tout particulièrement l'activité biologique du CNP. En effet, la séquence C-terminal joue un rôle important dans la reconnaissance et la sélectivité du récepteur, son absence entraîne par conséquent une réduction de l'activité biologique.

### b) Effets Physiologiques.

Les peptides natriurétiques jouent un rôle essentiel dans l'homéostasie cardiovasculaire et rénale. Ils possèdent des effets divers sur ces systèmes et jouent notamment un rôle important dans la modulation de la tension.

Les peptides natriurétiques sont également des **modulateurs du volume de fluide dans le corps**. Leur nom provient de leur rôle dans la natriurèse et la diurèse. Ils agissent non seulement par l'augmentation de l'excrétion du sodium et du liquide d'excrétion mais aussi par vasorelaxation et inhibition du système rénine-angiotensine.

<b>RENAUX</b>	Augmentation de la filtration glomérulaire et de la diurèse aqueuse. Augmentation de l'élimination urinaire de sodium, de potassium, de calcium, de magnésium, de chlorure et de phosphate.
<b>VASCULAIRES</b>	Vasodilatation et diminution de la pression artérielle. Diminution de la réactivité vasculaire aux agents vasoconstricteurs. Au niveau rénal : vasodilatation des artères afférentes des glomérules et vasoconstriction des artères efférentes.
<b>HORMONAUX</b>	Diminution de la sécrétion de rénine et d'aldostérone, et peut-être de l'hormone antidiurétique. L'ANP pourrait diminuer la sensation de soif et d'appétit pour le sel. Les peptides natriurétiques ont globalement des effets opposés à ceux de l'angiotensine II.

Tableau 4 : Effets physiologiques des peptides natriurétiques.

Le **BNP** et l'**ANP** exercent leur action sur le cœur et les reins en se liant au récepteur NPR-A. Les effets physiologiques sont essentiellement hypotenseurs par :

- Vasodilatation artérielle et veineuse.
- Augmentation de la diurèse et sécrétion urinaire de sodium (natriurèse).
- Inhibition du système Rénine-Angiotensine-Aldostérone.

Ces propriétés sont « bénéfiques » au cours de l'insuffisance cardiaque. Un effet trophique cardiaque et vasculaire, dont l'importance est encore mal appréhendée chez l'homme, existe aussi.

Le **CNP** se liant au récepteur NPR-B exerce une action dont l'importance et les effets physiologiques sont encore mal connus. À la différence de l'ANP et du BNP, le **CNP n'induit qu'une dilation veineuse et n'a qu'une action limitée sur la fonction rénale et donc sur la pression artérielle**. Étant donné son manque d'action sur la diurèse, la sécrétion urinaire de sodium ainsi que sur l'aldostérone, **le CNP entraîne moins d'effet hypotenseur que les autres peptides natriurétiques**. Cette différence d'action au niveau rénal, avec l'ANP et le BNP, peut s'expliquer structurellement par l'absence de la séquence C-terminale du CNP. Elle peut aussi s'expliquer par le fait que le CNP soit plus rapidement dégradé par la NEP. Outre son effet de dilatation veineuse, diverses études sur le CNP ont permis de mettre en évidence une action antiproliférative au niveau des fibroblastes cardiaques [113] [114].

Les propriétés des peptides natriurétiques ont ainsi incité le développement de 2 analogues synthétiques de l'ANP humain, l'anaritide et le carperitide, ainsi que le développement de la

forme recombinante de BNP humaine, le nésiritide (NATRECOR). Ces peptides ont été examinés dans des essais cliniques et développés comme thérapies potentielles pour le traitement de l'insuffisance cardiaque décompensée aiguë ainsi que d'autres maladies. Approuvés dans certains pays, l'intérêt de leur utilisation est cependant controversé. Des études récentes ont engendré une forte diminution de leur utilisation dans les pays concernés en jetant un doute sur leur sécurité et leur efficacité avec l'apparition d'effets indésirables sur la fonction rénale et l'augmentation de la mortalité. Afin de diminuer, voire supprimer les effets délétères entraînés par les thérapeutiques émergentes, des peptides chimériques se sont développés. Parmi eux, le **Cenderitide** (CD-NP) qui nous intéresse particulièrement [113].

## **2) Les peptides natriurétiques ophidiens : le DNP « Dendroapsis natriuretic peptide ».**

Le DNP « Dendroapsis natriuretic peptide » découvert en 1992 dans le venin du mamba vert *Dendroapsis angusticeps*, fait partie de la famille des peptides natriurétiques [113]. Des études ont indiqué que le DNP est aussi présent dans le plasma humain et canin et le myocarde auriculaire. L'augmentation de sa concentration dans le plasma d'êtres humains souffrant d'insuffisance cardiaque congestive a également été observée. Sur le plan structural, le DNP présente, une structure cyclique de 17 acides aminés ainsi qu'un pont disulfure. Le DNP possède néanmoins une plus grande séquence d'acides aminés au niveau de la partie C-terminale, soit 15 acides aminés contre 5 pour l'ANP, 6 pour le BNP et aucun pour le CNP. Cette différence structurale confère au DNP une plus grande résistance à la dégradation par la NEP.

Le DNP agit sur le récepteur NPR-A [116] et engendre un effet proche de l'ANP et du BNP qui est une hypotension par dilation artérielle et veineuse, par augmentation de la diurèse et de la sécrétion urinaire de sodium [114]. Les propriétés hypotensives du DNP et sa plus grande résistance à la dégradation font de lui un candidat médicament intéressant dans le développement d'un nouvel agent thérapeutique chimérique qui est le Cenderitide.

### a) Le CD-NP Cenderitide.

L'association chimérique d'un peptide d'origine humaine à un peptide d'origine animale (ou autre) comme les serpents, permet d'augmenter les effets favorables du peptide natriurétique humain et de diminuer, voire supprimer, les effets défavorables de ce dernier [114].

Le CD-NP est un peptide chimérique qui associe à la fois le peptide natriurétique Humain de Type C (CNP) au peptide natriurétique du venin de *Dendroaspis angusticeps*, le DNP.

Développé pour le traitement de l'insuffisance cardiaque, le CD-NP est formé de 37 acides aminés soit 22 acides aminés issus du CNP et 15 acides aminés issus de la partie C-terminale du DNP. Il agit à la fois sur le récepteur NPR-A et NPR-B [117] [118] [119].

Parmi les trois peptides natriurétiques humains, lors du développement de ce peptide chimérique c'est le CNP qui a été sélectionné car il **entraîne le moins d'hypotension**. En effet on a pu observer des altérations de la fonction rénale lors de l'utilisation de formes recombinantes des peptides natriurétiques humains, ce qui entraîne une hypotension. En outre, le CNP **possède des effets antiprolifératifs**, qui est une propriété hautement souhaitable pour de nouveaux médicaments cardiovasculaires contre l'hypertrophie et le remodelage. Malgré tous ces avantages, l'inconvénient du CNP est qu'il exerce des actions rénales modestes. A l'inverse, le DNP est un puissant agent natriurétique et diurétique qui induit une hypotension significative. Par conséquent, le CD-NP a été synthétisé dans le but de combiner les 2 profils complémentaires ci-dessus du CNP et DNP en un seul peptide natriurétique chimère. Permettant une véritable synergie et complémentarité d'action des molécules, avec des actions améliorant la fonction rénale (du CNP) sans induire une hypotension excessive (du DNP) [119] [118]. Contrairement aux peptides natriurétiques parentaux, le CD-NP affecte en effet la natriurèse et diurèse, tout en ayant un effet protecteur rénal en préservant le flux sanguin rénal et le taux de filtration. L'apport de la partie C-terminale du DNP au CNP permet également de prolonger la durée de vie du CNP ainsi que son action au niveau des reins.

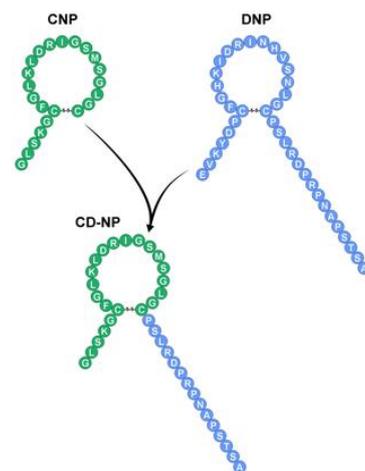


Figure 75 : Représentation schématique du peptide chimérique : CD-NP [29]

## **b) Essais cliniques.**

Les essais précliniques réalisés chez le chien et les essais cliniques effectués chez des sujets sains ont permis de confirmer l'intérêt et l'efficacité de ce peptide chimérique [119] [118]. La première phase d'essai clinique contre placebo évaluant la pharmacocinétique, la pharmacodynamie, l'innocuité et la tolérance lors de l'administration sous cutanée du Cenderitide (CN-NP) a été réalisée en 2012 chez les patients souffrant d'insuffisance cardiaque chronique. Cette première phase a montré une bonne tolérance du Cenderitide et a également montré un effet dose dépendant de ce dernier sur la diminution de la pression artérielle [120].

Le CD-NP possède des propriétés natriurétiques et diurétiques aussi bien chez le chien que chez l'homme. Il agit sur la fonction rénale en augmentant la diurèse, en améliorant l'élimination urinaire de sodium et en diminuant la sécrétion d'aldostérone. Aucune hypotension excessive n'a été observée lors de ces essais. Des données très encourageantes en ce qui concerne l'amélioration de la fonction rénale ont également été rapportées. D'autres études in vitro ont également permis de démontrer que le peptide chimérique met à profit l'effet antiprolifératif du CNP au niveau des fibroblastes cardiaques, ce qui permet de diminuer les hypertrophies cardiaques observées à la suite d'une insuffisance cardiaque [119].

Le CD-NP, est actuellement examiné, tout particulièrement pour le traitement de l'insuffisance cardiaque et l'infarctus du myocarde aigu. **Une étude de phase II évaluant la sécurité du CD-NP chez les patients atteints d'insuffisance cardiaque chronique ainsi qu'une étude pilote pour la préservation de la fonction ventriculaire chez les patients après un infarctus du myocarde sont actuellement en cours.**

Ces essais très encourageants confirment ainsi l'intérêt clinique du peptide chimérique associant un peptide d'origine ophidienne dans le développement de nouveaux médicaments en cardiologie. Bien que prometteuses, plus de recherches sont nécessaires pour le développement de nouveaux médicaments qui surmontent récepteur clairance médiée, et les problèmes potentiels de toxicité [113].

### **C) Les inhibiteurs des canaux calciques de type-L.**

En plus des BPPS et NPS, une autre classe de protéine dérivée de venin peut influencer la tension. Il s'agit de peptides qui ciblent les canaux calciques de type-L ou « voltage-dépendant Lent » (Cav1). Ces canaux sont impliqués dans une multitude de processus physiologique comme la contraction musculaire, la sortie de neurotransmetteur, etc. Les inhibiteurs des canaux calciques de type L ont un effet vasodilatateur artériel périphérique et coronarien prépondérant mais une activité infime sur la conduction du tissu cardiaque. On constate ainsi une baisse de la pression artérielle sans modification du rythme cardiaque.

De nombreux inhibiteurs des canaux calciques ont été retrouvés dans les venins ophidiens tels que la calciceptine [103].

#### **1) Calciceptine et FS2 : Inhibiteurs spécifiques des canaux calciques de type-L.**

La calciceptine et son homologue FS2, isolées du venin de mamba noir *Dendroaspis polylepis polylepis*, sont des inhibiteurs puissants et sélectifs des canaux calciques de type L. Ces derniers sont situés sur les muscles lisses vasculaires et cardiaques, ainsi que sur d'autres tissus. La calciceptine et la FS2 sont donc des relaxants de muscles lisses et des inhibiteurs des contractions cardiaques. La calciceptine inhibe spécifiquement les canaux calciques de type L et est totalement inactive sur d'autres canaux calcique voltage-dépendants tels que le type N et canaux de type T. L'inhibition est complète dans le système cardiovasculaire, partielle dans le système nerveux central (Cav1 neuronale) et il n'y a aucune activité contre les tissus du muscle squelettique [121] [122].

L'activité hypotensive des calciceptines synthétiques et FS2, ont été déterminées in vitro sur différentes préparations cellulaires (dont des Cav1 des cellules musculaires lisses portales de cochon d'inde de Guinée) et in vivo sur des modèles de rats anesthésiés. **Les 2 toxines produisent une relaxation dose dépendante** (de l'aorte de rat, de l'artère pulmonaire et de la trachée préalablement contractée par un agoniste des canaux Cav1). **Elles ont aussi inhibée la contraction provoquée par l'acétylcholine** du muscle longitudinal de l'iléon d'un cochon d'inde Guinée.

L'activité biologique de la calciseptine est semblable à celle des médicaments inhibiteurs de canaux calciques de type L classiques, tels que les 1,4-dihydropyridines (dont fait partie la nifédipine), qui sont utilisés dans le traitement des maladies cardiovasculaires. Cependant, il a été montré que la calciseptine et la FS2 possédaient une action antihypertensive prolongée encore plus puissante que la nifédipine [121] [122] [123] [50].

Le site fonctionnel « hypotensif » a pu être identifié par comparaison systématique des séquences des toxines à trois doigts de venins de mamba et en utilisant la théorie des supports de proline mise au point en 1998 par Kini et al. : une méthode prévisionnelle simple et directe de résolution des relations structure-fonction des toxines protéiques basée sur le fait que les résidus proline sont généralement retrouvés sur les segments latéraux des sites d'interaction et impliqués dans la reconnaissance du substrat et dans l'interaction. Il s'agit d'une **séquence de 6 acides aminés située entre la proline 42 et la proline 47, qui interagit avec le canal calcique type L** [124] [125].

## **2) L-calchin.**

Pour tester le site de liaison de la calciseptine et FS2, un peptide de 8 résidus d'acides aminés nommé « L-calchin » a été conçu et synthétisé sur la base de cette prédiction. Comme attendu le L-calchin synthétique, possède un comportement semblable à la molécule parente, il se fixe et bloque le canal calcique Cav1. L-calchin réduit aussi la tension ventriculaire systolique gauche sans affecter la pression diastolique dans le système de Langendorff [69]. La L-calchin montre des effets inotropes négatifs dans des cœurs isolés de rat semblables à la protéine parente. Des expériences de patch-clamp ont montré qu'il bloque également le courant calcique de type L dans les myocytes cardiaques de lapin. L'inhibition exercée est dose-dépendante mais est aussi indépendante de la tension (voltage-indépendant) [124].

Les inhibiteurs des canaux calciques de type L (Cav1) isolés des venins ophidiens n'ont finalement pas été poursuivis comme agent thérapeutique en raison de similitude dans les mécanismes d'action avec des médicaments déjà existants, et ce malgré la découverte et la conception de la « L-calchin » pourtant intéressante pour le développement d'un nouveau médicament. En outre, La calciseptine et la FS2 semble être des outils uniques et utiles pour étudier les canaux calciques de type L [122] [121] [124].

#### **D) Les sarafotoxines.**

Les sarafotoxines sont de courtes toxines peptidiques trouvées dans les venins *d'Atractaspis spp* qui présentent de puissantes propriétés de vasoconstriction. Ces peptides, qui partagent un haut degré d'identité de séquence avec les endothélines (environ 60%), reconnaissent et se lient aux récepteurs de ces dernières. Leur mode d'action est d'ailleurs encore largement décrit en faisant référence aux endothélines, hormones jouant un rôle essentiel sur la régulation locale de la pression sanguine.

Elles entraînent la contraction réversible des muscles lisses avec une préférence marquée pour certains organes selon les sarafotoxines considérées. Les sarafotoxines se fixent sur des récepteurs cellulaires elles entraînent l'activation de la phospholipase, provoquent l'hydrolyse du phosphoinositide (métabolite de l'acide arachidonique) et la libération des prostaglandines. Simultanément, elles entraînent la pénétration cellulaire du calcium dans les fibres cardiaques. Les sarafotoxines augmentent la force de contraction (action inotrope positive) avec vasoconstriction, sans trouble du rythme au début mais pouvant évoluer vers un ralentissement de la conduction auriculo-ventriculaire avec conservation d'un rythme régulier (bloc auriculo-ventriculaire du premier degré, c'est-à-dire augmentation de l'intervalle PQ). Les troubles de la conduction affectant l'un des centres de commande électrique du cœur (nœud auriculo-ventriculaire notamment) entraînent une arythmie, le plus souvent sous forme d'une bradycardie ventriculaire, et une désynchronisation de l'excitation cardiaque. Cliniquement l'envenimation se traduit par une hypertension transitoire avec augmentation de la pression diastolique et des troubles caractéristiques de l'électrocardiogramme (allongement PG et onde T aplatie puis inversée). La bradycardie est régulière et régressive en trois jours sauf complication pouvant entraîner le décès [3].

Il a été montré que l'administration de sarafotoxines avant une occlusion coronaire contribue aux propriétés cardioprotectrices et antiarythmiques. En effet, l'activation du récepteur endothélial ET (B) par une sarafotoxine 6c administrée de manière exogène avant l'ischémie active la libération d'oxyde nitrique (NO) ce qui facilite l'activation K mitochondriale (ATP) dans les cellules cardiaques et la cardioprotection. Testé in vivo chez des lapins, le traitement préalable avec la sarafotoxine 6c avant la période d'occlusion coronaire offre une réduction significative de la taille de l'infarctus et des effets antiarythmiques importants. Le traitement par la Sarafotoxine 6c a atténué significativement l'incidence des arythmies mortelles comme la tachycardie ventriculaire soutenue ainsi que d'autres arythmies [126].

### **E) La $\beta$ -cardiotoxine (une toxine $\beta$ -bloquante).**

Une nouvelle toxine à trois doigts, la «  $\beta$ -cardiotoxine » a été découverte et extraite récemment du venin du serpent *Ophiophagus hannah* aussi appelé roi cobra. Administré chez la souris, il a été montré que contrairement aux autres cardiotoxines dites « classiques » issues des venins de serpents, celle-ci diminue le rythme cardiaque. Il s'agit d'une protéine  $\beta$ -adrénergique à activité bêtabloquante d'où son nom. Elle ne présente aucune activité hémolytique ou anticoagulante. La diminution dose-dépendante de la fréquence cardiaque a été observée *in vivo* sur des rats anesthésiés et également *ex vivo* sur un cœur isolé de rat.

## **II Applications de l'hémostase : Troubles de la coagulation et exploration de l'hémostase.**

On a reconnu les venins de Viperidae dans le contrôle des **hémorragies** en 1935. Les altérations de la coagulation sanguine induites par les venins de serpent ont fait l'objet de nombreuses recherches. D'une grande diversité, les enzymes ophidiennes présentent de puissants effets sur l'ensemble des mécanismes de l'hémostase et de la fibrinolyse. Elles peuvent interagir avec la plupart des protéines de l'hémostase, soit en se substituant à l'une d'entre elles, soit en activant leur fonctionnement normal, ou plus rarement, en inhibant le processus naturel. Pour presque tous les agents impliqués dans la coagulation, que ce soit la fibrinolyse ou la fonction plaquettaire, il existe une protéine de venin qui peut l'activer ou l'inactiver. Les venins de Viperinés et Crotalinés essentiellement sont une source riche en protéines à activité dirigée contre les divers facteurs impliqués dans la coagulation et la fibrinolyse. Beaucoup de leurs enzymes affectent l'hémostase en agissant sur les facteurs coagulants, les plaquettes, ou en perturbant l'endothélium. En effet, certaines fendent les composants clés de la membrane basale lésant ainsi directement les capillaires sanguins pour provoquer une hémorragie. La grande diversité des protéines ophidiennes affectant l'hémostase contraste avec la haute spécificité de chaque composant [127] [128] [129].

Leur grande potentialité et spécificité de cibles moléculaires, leur résistance aux inhibiteurs physiologiques et leur stabilité in vitro et in vivo ont fait des protéines ophidiennes des outils particulièrement intéressants et largement utilisés pour :

- **L'étude des processus complexes impliqués dans les troubles de la coagulation sanguine.** Dans la recherche fondamentale que ce soit en physiologie, biochimie ou immunologie. Ces molécules ont fortement contribué à nos connaissances sur les mécanismes de l'hémostase [37].
- **Les tests de diagnostic clinique des troubles de l'hémostase** tel que les maladies hémorragiques (hémophilie par exemple) [20].
- Le suivi et surveillance des traitements anticoagulants à ajustement permanent.
- **Et le développement de nouveaux agents médicamenteux.** Plusieurs enzymes de venins ont été utilisées cliniquement comme anticoagulants, d'autres composants du venin sont utilisés dans la recherche pré-clinique pour examiner leurs éventuels effets thérapeutiques [71]. Le venin de *crotalus atrox* a notamment servi pour le traitement avant une opération chirurgicale du cerveau WO 2015184380 A1 afin d'éviter les complications hémorragiques post chirurgicale. En effet son venin augmente les niveaux de fibrinogène, de plaquettes et de coagulation au site de la lésion [37] [130] [131].

#### **A) Physiopathologie.**

L'hémostase est un processus physiologique essentiel chez les vertébrés. L'étanchéité du système vasculaire est assurée, d'une part, par les parois vasculaires constituées de fibres et de cellules endothéliales plus ou moins disjointes, et d'autre part, par la coagulation sanguine qui limite la fluidité du sang et son écoulement hors des vaisseaux [3]. Plusieurs toxines ophidiennes se sont développées afin de perturber l'hémostase de leur proie. La cessation de l'apport du flux sanguin aux organes essentiels (cerveau, poumon ou système de régulation de la chaleur corporelle) peut rapidement affaiblir la proie, réduisant ainsi sa capacité de fuite [31]. Les composants responsables de troubles de l'hémostase sont largement distribués au sein du venin de nombreuses espèces de serpents. Ils proviennent **essentiellement des venins Vipéridés, des Crotalidés, ainsi que certaines espèces d'Elapidés australiens de la famille des cobras et des mambas, et quelques Colubridés** [130] [46].

## 1) Physiologie de l'hémostase.

Classiquement, la coagulation est amorcée par une plaie vasculaire. Mais, en pratique, l'activation d'un complexe enzymatique appartenant à une étape quelconque de l'hémostase peut être favorisée par des circonstances variées, générales ou locales. Lorsqu'une lésion survient au niveau d'un vaisseau, elle doit être rapidement obstruée pour arrêter le saignement, c'est la fonction du caillot sanguin. Une fois le vaisseau réparé, ce caillot doit pouvoir se dissoudre. En situation normale, ces deux grandes étapes, coagulation et retour à la fluidité sanguine, sont le résultat d'une cascade complexe de réactions biochimiques qui peuvent se produire simultanément ou successivement, mettant en jeu plusieurs dizaines de protéines différentes présentes dans le sang, à la surface des plaquettes et sur la paroi des vaisseaux. La coagulation est en outre contrôlée par des mécanismes régulateurs qui font intervenir ces protéines. Schématiquement, l'hémostase, dont le rôle est de prévenir les hémorragies, comprend trois périodes intimement liées : L'hémostase primaire, la coagulation sanguine et la fibrinolyse [3] [130] [132].

### a) Hémostase primaire.

L'hémostase primaire se décompose en 2 temps successifs nommés : « temps vasculaire » et « temps plaquettaire ».

**Le temps vasculaire** consiste en une vasoconstriction réflexe qui réduit le saignement et favorise l'hémostase locale. Elle rend également la paroi vasculaire accessible aux facteurs de la coagulation plasmatique, ce qui stimule les étapes suivantes. La turbulence du flux améliore les interactions moléculaires et cellulaires.

**Le temps plaquettaire** permet l'adhésion des plaquettes à l'endothélium puis l'agrégation des plaquettes entre elles et la formation du clou plaquettaire autour duquel viendra s'organiser le futur caillot.

Le temps plaquettaire se décompose en 3 étapes successives :

- **L'adhésion plaquettaire** : La lésion de l'endothélium vasculaire entraîne la mise à nu du sous-endothélium vasculaire riche en collagène et l'adhésion des plaquettes. Ces dernières adhèrent à l'endothélium par l'intermédiaire du Facteur Von Willebrand (FvW). Cette protéine reconnaît à la fois le collagène et les récepteurs GPIb de la membrane plaquettaire et assure une liaison covalente entre ces différents substrats.
- **L'agrégation plaquettaire** : Les plaquettes s'agrègent entre elles par l'intermédiaire du fibrinogène qui lie un second récepteur plaquettaire, le GPIIbIIIa préalablement activée par l'adénosine diphosphate (ADP) et la thrombine. La liaison est réversible car le caillot est fragile.
- **L'activation plaquettaire (activité pro-coagulante et dégranulation)** : Une fois agrégées, les plaquettes activées changent de forme et créent des pseudopodes. La concentration intracellulaire en calcium et AMPc augmente, les phospholipides anioniques (très pro-coagulant) sont démasqués. Les plaquettes libèrent leurs granules de sécrétions (dense et alpha) qui contiennent entre autres des facteurs vasoconstricteurs (sérotonine, facteurs de croissance plaquettaire ou PDGF, thromboxanes A2 qui est également un médiateur de l'inflammation) et des agents renforçant l'adhésion cellulaire et donc l'agrégation plaquettaire (fibronectine, facteur von Willebrand, fibrinogène,  $Ca^{2+}$ , ATP, ADP qui est aussi un médiateur de l'inflammation). La dégranulation des facteurs pro-coagulants par les plaquettes recrutent et activent les autres plaquettes alentours qui sont encore au repos. Le caillot se solidifie formant le « **le clou plaquettaire** » [3] [46].

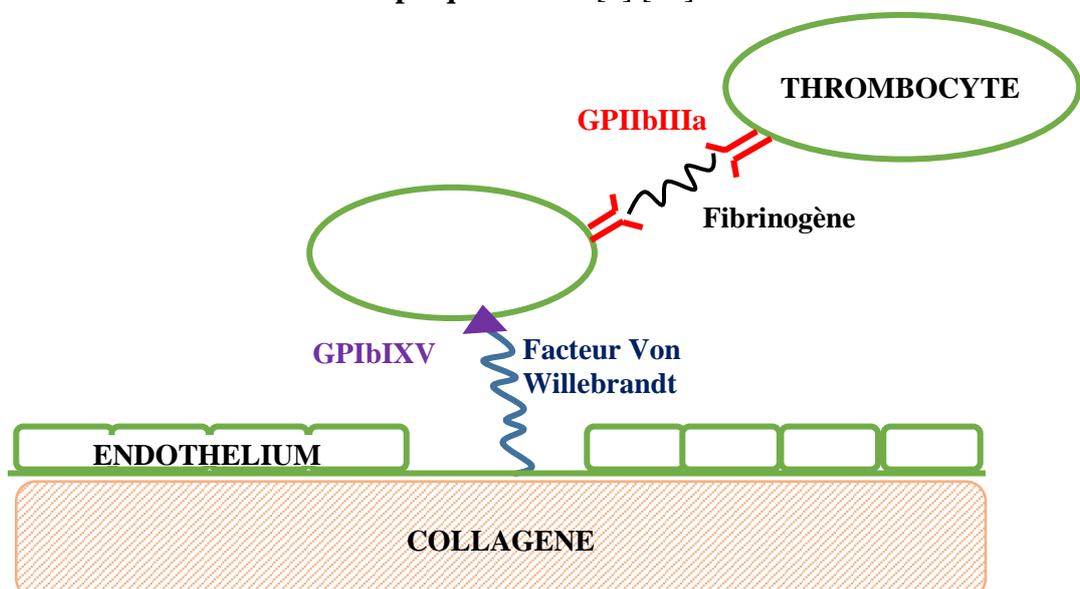


Figure 76 : Hémostase primaire

## **b) Coagulation sanguine.**

La coagulation proprement dite, correspond à la constitution puis à la solidification du caillot, grâce à la fibrinoformation, étape durant laquelle un réseau de fibrine emprisonne les éléments figurés du sang et consolide le clou plaquettaire. Le réseau de fibrine s'organise sous l'action d'une enzyme, la thrombine, présente dans le sang sous une forme inactive, la prothrombine. C'est son activation, appelée thrombinoformation, qui déclenche la cascade de réactions enzymatiques permettant la coagulation du sang. Il existe 2 voies d'activation de la coagulation, **la voie exogène extrinsèque et la voie endogène intrinsèque**. La cascade de coagulation sanguine aboutit à l'issue des 2 voies à la formation du caillot de fibrine qui associé au clou plaquettaire donne le « **bouchon hémostatique** ».

*La voie exogène ou voie extrinsèque du facteur tissulaire* : Le facteur VII plasmatique, mis au contact de son récepteur endothélial : le facteur tissulaire (FT, ex thromboplastine tissulaire), forme le complexe majeur d'activation de la coagulation qui initie in vivo l'activation du facteur IX (et du facteur X). Le facteur IX participe à la constitution du complexe « tenase » qui active le facteur X et aboutit à l'activation de la thrombine.

*La voie endogène ou voie intrinsèque* intervient de façon plus contingente dans les processus de coagulation intravasculaire disséminée (CIVD). Le facteur XII activé par le système contact (KHPM, PK, FXII) active à son tour le facteur XI qui aboutit à l'activation du facteur IX.

*La Thrombinoformation* est sous la dépendance de la **prothrombinase** qui transforme la **prothrombine (facteur II)** en **thrombine (facteur IIa)**. La prothrombinase est un complexe enzymatique constitué par le **facteur X activé (facteur Stuart)** associé au **facteur V (proaccélélerine)**. Pour exercer son action catalytique, le complexe doit être fixé sur des **phospholipides** d'origine tissulaire ou plaquettaire, en présence **d'ions calcium**. La prothrombinase rompt des liaisons peptidiques spécifiques de la molécule de prothrombine et permet la libération, successivement, de **préthrombine 2** puis, après une seconde hydrolyse, de **thrombine naturelle : thrombine- $\alpha$**  aussi nommé facteur II activé. Cette dernière est une enzyme protéolytique bicaténaire de la famille des sérine-protéases effectuant la conversion du **fibrinogène (facteur I)** en **fibrine (facteur Ia)** au cours de la fibrinoformation [46].

**La Fibrinoformation :** Dès qu'elle est présente en quantité suffisante la thrombine clive le fibrinogène, formant des monomères de fibrine. Elle libère alors deux paires de petits peptides, les **fibrinopeptides A et B** déclenchant la polymérisation des différentes chaînes protéiques entre elles et la formation d'un réseau de fibrine soluble. La fibrine polymérise encore pour former une maille qui est trans-liée par l'action de facteur XIIIa, créant ainsi un caillot sanguin [46]. La libération du fibrinopeptide A est rapide ; à l'emplacement laissé vacant, les monomères se polymérise longitudinalement en « protofibrilles ». Le fibrinopeptide B se détache des protofibrilles plus tardivement, ce qui permet une polymérisation latérale qui induit la formation de fibres plus épaisses : la fibrine soluble. L'action du **facteur XIIIa, ou facteur stabilisant la fibrine (= FSF)**, activé lui-même par la thrombine (FIIa), va stabiliser la fibrine et conduire à une fibrine insoluble constitutive d'un caillot stable. La fibrine insoluble est obtenue par transamination, c'est-à-dire par formation de nouvelles liaisons chimiques entre les monomères de fibrine polymérisée. Ces caillots de fibrine sont essentiels pour la fermeture de blessure et la guérison finale [31].

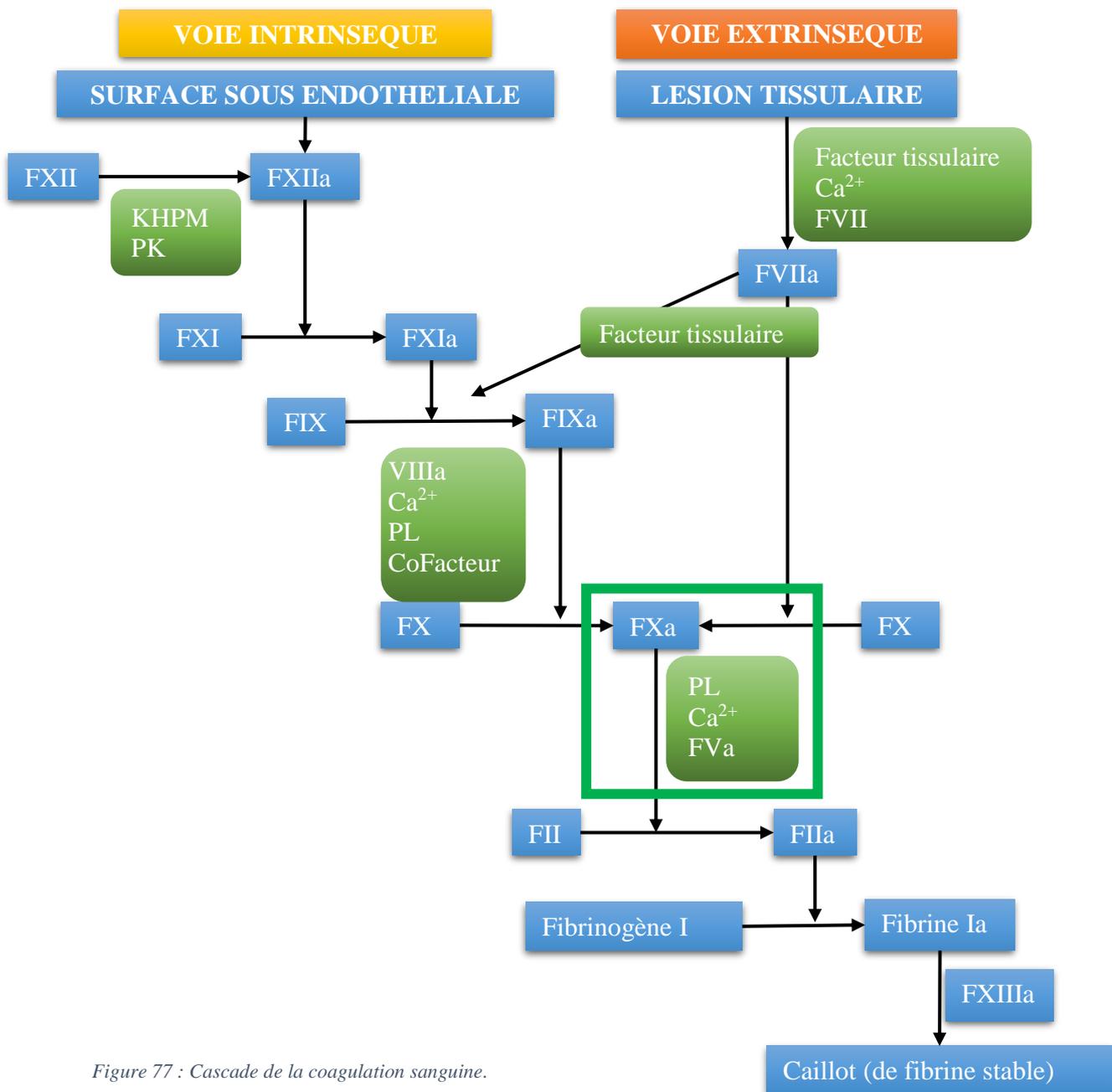


Figure 77 : Cascade de la coagulation sanguine.

- |  |   |
|--|---|
| <b>KHPM : Kininogène de haut poids moléculaire</b> | <b>FVIII : Anti hémophilique A</b>            |
| <b>PK : Prékallicroïne</b>                         | <b>FIX : Facteur anti hémophilique B</b>      |
| <b>FI : Fibrinogène</b>                            | <b>FX : Facteur Stuart</b>                    |
| <b>FII : Prothrombine</b>                          | <b>FXI : Facteur Rosenthal</b>                |
| <b>FIII : Facteur tissulaire</b>                   | <b>FXII : Facteur Hageman</b>                 |
| <b>FV : Proaccélérine</b>                          | <b>FXIII : Stabilisateur de fibrine (FSF)</b> |
| <b>FVII : Proconvertine</b>                        |   |

### **c) Fibrinolyse : restauration de la perméabilité vasculaire.**

Dans des conditions normales, la fibrinolyse doit être considérée comme un système régulateur assurant un équilibre avec la coagulation. Alors que les trois étapes de l'hémostase se déroulent en quelques minutes, quinze à trente au maximum, la fibrinolyse intervient beaucoup plus tard, le troisième jour environ, favorisant la cicatrisation de l'endothélium vasculaire. Dès que la brèche vasculaire est réparée, la fibrinolyse physiologique (thrombolyse), permet de détruire le caillot de fibrine ou "thrombus" et de (re)perméabiliser le vaisseau sanguin. Le caillot stabilisé persiste environ 72 heures avant d'être dégradé par la plasmine. La plasmine formée sous l'action de l'**activateur tissulaire du plasminogène (t-PA)** est une enzyme protéolytique qui exerce sans distinction son action sur le fibrinogène, la fibrine soluble et la fibrine stabilisée. La biodégradation de la fibrine stabilisée génère des molécules appelées des D-dimères qui peuvent alors être métabolisées par des protéases circulantes ou dégradées par le foie et les reins. Seule l'hydrolyse de la fibrine stabilisée génère des produits de dégradation de la fibrine spécifique (PDFn), distincts des produits de dégradations de la fibrine obtenus après digestion du fibrinogène ou de la fibrine soluble (PDFg). La différence entre PDFn et PDFg, est difficile à établir à l'aide des techniques courantes. Cette difficulté est due aux liaisons hydrogènes et aux liaisons covalentes qui caractérisent la fibrine stabilisée et qui sont résistantes à l'action de la plasmine. L'importance de cette distinction apparaît au niveau de l'envenimation et de son traitement [3] [46].

### **d) Mécanismes régulateurs de l'hémostase.**

Outre la fibrinolyse physiologique qui vient d'être décrite et dont l'action tardive se manifeste après la stabilisation du caillot, le contrôle des différentes réactions chimiques de la coagulation sanguine fait appel à des mécanismes autorégulateurs complexes.

#### **1. Régulation locale.**

L'endothélium est un site important de la thrombo-résistance par son rôle de barrière entre plasma et sous-endothélium, la synthèse des GAG et l'expression de la thrombomoduline. Les phospholipases membranaires constituent une interface privilégiée qui limite le phénomène d'hémostase à la zone lésée et réduit son risque d'extension [46].

## 2. Régulation systémique.

La régulation de la coagulation se fait par plusieurs mécanismes. La cascade de coagulation est compartimentée en étapes de telle sorte que le passage de l'une à l'autre n'est possible que lorsqu'une concentration seuil en enzyme activée est atteinte. De plus, Il existe des effets inhibiteurs exercés par la plupart des facteurs de la coagulation sur les réactions situées en amont et qui permettent de ralentir le processus de la coagulation, on parle alors de système de rétrocontrôle [46].

La thrombine par exemple, est l'élément central du système de rétrocontrôle du fait de son potentiel d'auto-amplification et de son intervention multifonctionnelle. Il s'agit de l'un des principaux facteurs plasmatiques qui assurent la formation du caillot. Activée par le complexe prothrombinase, elle rétroactive le facteur XI et les cofacteurs VIII et V. Le facteur XIa amplifie l'activation du facteur IX et participe ainsi à la génération extrêmement rapide de facteur Xa qui active davantage de thrombine. La thrombine est aussi le plus puissant agoniste plaquettaire de l'organisme, par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques. Bien qu'elle stimule l'agrégation plaquettaire et la coagulation, la thrombine possède également des propriétés anticoagulantes. Elle induit la synthèse de l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) et active la protéine C en se liant à la thrombomoduline endothéliale. A côté du site catalytique, la molécule de thrombine présente au moins deux autres sites de liaison, l'exosite I pour le fibrinogène et l'exosite II pour l'héparine [46] [43].

Deux inhibiteurs physiologiques assurent en permanence la régulation de la coagulation :

- **La protéine C** induite par la présence de thrombine dans la circulation. Elle hydrolyse, d'une part, les facteurs VIII et V activés, bloquant ainsi les réactions physiologiques de la coagulation et, d'autre part, l'inhibition de l'activateur du plasminogène, ce qui déclenche la fibrinolyse telle qu'elle est décrite ci-dessus.
- **L'antithrombine III**, faisant parti du système des inhibiteurs des sérines-protéases (serpins = Serine Protéinase Inhibitors), neutralise les facteurs XIIa, XIa, IXa et surtout le Xa et la thrombine.

La neutralisation qui est lente peut être potentialisée par les GlycosAmino-Glycanes (GAG) de la surface endothéliale comme le sulfate d'héparine. L'héparine exogène neutralise ainsi la thrombine en tant que cofacteur de l'antithrombine III. **Un autre système régulateur est l'inhibiteur du facteur tissulaire (TFPI)** [3] [46].

## 2) Modes d'action des venins de serpents sur l'hémostase.

Chaque venin possède un ensemble de substances favorisant ou inhibant la coagulation à plusieurs niveaux. Quel que soit le mode d'action biologique, il se traduit souvent par un syndrome hémorragique clinique, parfois brutal, le plus souvent progressif, dont l'évolution peut être fatale [3]. **La composition des venins est la plupart du temps dirigée contre plusieurs cibles au sein du système hémostatique.** Ainsi, le venin de *Bothrops jararaca* contient deux sérine-protéases qui se partagent les deux activités complémentaires de la thrombine. La bothrombine coagule le fibrinogène sans action plaquettaire et la PA-BJ provoque l'agrégation plaquettaire sans action sur le fibrinogène. La modélisation moléculaire a d'ailleurs montré que chaque molécule partage des homologues avec l'un des deux exosites de la thrombine. **En revanche, des activités différentes voire même contradictoires peuvent être portées par la même molécule.** La piscivostatine extraite du venin d'*Agkistrodon piscivorus piscivorus* par exemple, est une désintégrine qui induit deux activités contraires. A savoir qu'elle inhibe la liaison fibrinogène-GPIIb/IIIa en bloquant de ce fait l'agrégation plaquettaire, mais lorsque cette liaison est déjà formée, elle la rend alors irréversible. Bien que de nombreux venins de serpent contiennent un certain nombre de composants hémostatiquement actifs, il est sûr de dire qu'aucun venin unique ne contient tous les composants hémostatiquement actifs décrits ici [46] [71].

Les protéines ophidiennes agissant sur le système de l'hémostase se regroupent en 8 grandes familles comprenant des **sérine-protéases** et des **métallo-protéases** qui possèdent un large spectre d'action en agissant de plusieurs manières sur l'hémostase, ainsi que des **PLA2s**, **désintégrines**, **LAAOs**, **5'nucleotidase**, **lectines de type C** et certaines **toxines à trois doigts** qui présentent une sphère d'action plus restreinte [127].

### a) Action sur l'endothélium.

Les hémorragines, de la famille des métallo-protéases, agissent au niveau de l'endothélium et induisent des troubles de la perméabilité capillaire. Elles provoquent des lésions de la paroi des vaisseaux sanguins se traduisant par des saignements localisés (au siège de la morsure, au niveau de plaies présentes à distance de celle-ci) ou diffus (au niveau des muqueuses buccale, nasale ou génitale). **Les hémorragines des venins de certains Viperidae ont été proposées pour le dépistage des sujets atteints de fragilités capillaires congénitales ou acquises.**

### **b) Action pro-coagulante.**

Les enzymes pro-coagulantes agissent par clivage de la liaison peptidique et interfèrent avec la coagulation. Les enzymes les plus connues activent la coagulation sanguine, le plus souvent en se substituant aux enzymes physiologiques. Une protéine possède des propriétés analogues à l'un des facteurs de la coagulation va prendre sa place. Lorsque le processus de coagulation est activé, il persiste jusqu'à épuisement d'un ou plusieurs facteurs de la coagulation. Ce phénomène de consommation conduit à un syndrome hémorragique le plus souvent dû à une afibrinogémie. Après une phase transitoire d'hypercoagulabilité généralement courte où les facteurs de la coagulation sont consommés, le sang devient incoagulable entraînant de graves hémorragies. On peut opposer 4 grands groupes de facteurs coagulants :

- Activateurs de la prothrombine.
- Enzymes thrombiniques.
- Activateurs des autres facteurs de la coagulation, notamment les facteurs V et X.
- Enzymes antifibrinolytiques (inhibiteur de plasmine) [3] [46].

### **c) Action anti-coagulante directes.**

Il y a 5 grands groupes de facteurs anti-coagulants :

- Les activateurs de la protéine C.
- Les agents fibrinolytiques et activateurs du plasminogène.
- Les inhibiteurs directs de la thrombine.
- Les agents inhibiteurs des autres facteurs de coagulation.
- Les phospholipases.

Les phospholipides jouent en effet un rôle fondamental dans la coagulation en intervenant à différents niveaux. Ils constituent un élément essentiel de l'architecture et de l'organisation de la membrane cytoplasmique. L'hydrolyse des phospholipides endothéliaux génèrent de l'acide arachidonique précurseurs des prostaglandines (médiateurs de l'inflammation). Ceux plaquettaires interviennent dans l'activation de plusieurs facteurs de coagulation et libèrent le thromboxane A2 qui est un vasoconstricteur puissant. Enfin, les phospholipides tissulaires ou sériques représentent un support indispensable à l'initiation de plusieurs réactions biochimiques, en particulier la fixation du complexe « prothrombinase » [3] [46].

#### **d) Action sur les plaquettes.**

Les plaquettes sanguines, autrement appelées thrombocytes, sont de petits fragments de cellules sans noyau, circulant dans les vaisseaux sanguins et ayant pour rôle d'éviter les hémorragies. Ces éléments cellulaires du sang jouent un rôle essentiel dans la coagulation sanguine, notamment dans la formation du caillot. Ayant la capacité de s'agréger entre elles, elles bloquent le passage du sang là où les vaisseaux sont abimés. Une trop faible quantité de plaquettes ou un dysfonctionnement de leur agrégation cause des hémorragies incontrôlables. A l'inverse, une trop grande quantité de plaquettes ou une trop forte capacité à s'agréger mène à l'obstruction des vaisseaux sanguins, ou thrombose, une des principales causes de décès dans les pays occidentaux.

De nombreuses toxines ophidiennes perturbent l'hémostase primaire en agissant sur l'adhésion plaquettaire soit en activant les plaquettes, soit en les inhibant, soit les deux. Les inducteurs de l'agrégation plaquettaire sont abondants et représentés par des sérines-protéases, phospholipase A<sub>2</sub>, certaines lectines de type C, LAAOs et autres facteurs agissant sur l'activation plaquettaire. Les inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire sont encore plus abondants et comprennent de nombreuses toxines purifiées d'espèces multiples tels que désintégrines, métalloprotéase "MDC" riche en cystine, certaines lectines de type C, PLA<sub>2</sub>, LAAOs, etc. Certaines familles de molécules ophidiennes sont à la fois inductrices et inhibitrices de l'agrégation plaquettaire, lectine de type C, LAAOs, phospholipase A<sub>2</sub> [31] [46].

Ces molécules ont fait l'objet de nombreuses études. Elles affectent la fonction plaquettaire de diverses manières. Elles peuvent masquer les sites effecteurs de la membrane cytoplasmique, activer ou inhiber les récepteurs plaquettaire, lier ou dégrader le Facteur Von Willebrand, stimuler la dégranulation des plaquettes en modulant par exemple la libération d'ADP et la formation de thromboxane A<sub>2</sub>, etc. [3].

L'action de venins sur les plaquettes est loin d'être univoque, on rencontre par exemple dans le venin *d'echis carinatus* l'échistatine (désintégrine) qui inhibe l'agrégation plaquettaire et l'écarine (métalloprotéase), qui est au contraire un agoniste plaquettaire. L'activation ou l'inhibition des plaquettes, parfois observées avec un même venin, n'ont en principe aucune traduction clinique [3] [46].

La stratégie la plus efficace pour les venins ophidiens pour réduire la fonction plaquettaire n'est pas de l'inactiver mais au contraire en l'activer. En effet, l'activation de l'agrégation

plaquettaire par les venins de serpents aboutis le plus souvent à une thrombocytopénie et donc a fortiori à une inhibition de la coagulation sanguine [133].

Les phospholipases A<sub>2</sub> hydrolysent les phospholipides membranaires et libèrent l'acide **arachidonique, ce qui induit l'activation des plaquettes**. Toutefois, quelques phospholipases provoquent une agrégation plaquettaire indépendamment de la libération d'acide arachidonique, même en présence d'un inhibiteur de celui-ci. En clinique, l'action des phospholipases A<sub>2</sub> prédomine au niveau membranaire. Toutefois, les phospholipases A<sub>2</sub> des venins d'Elapidae libèrent des lysophospholipides qui peuvent être d'origine tissulaire ou sérique. Leur action tensioactive provoque la destruction des hématies. Les effets toxiques semblent secondaires, même lorsque l'hémolyse est importante [3]. **Plusieurs phospholipases A<sub>2</sub> agissent cependant comme des inhibiteurs de l'activation des thrombocytes**. Les modes d'action, lorsqu'ils sont connus, sont variables. L'altération du cytosquelette et l'augmentation de la concentration intracellulaire en adénosine monophosphate cyclique (AMPc) représentent les principales causes d'inhibition de l'agrégation plaquettaire. **Certaines PLA<sub>2</sub> des venins de certaines espèces de Vipères, Crotales et Cobras peuvent être utilisées pour étudier les glycoprotéines plaquettaires. Elles peuvent aussi permettre la détection d'une anomalie constitutionnelle de la membrane et une défaillance de l'agrégation plaquettaire.**

**Certaines LAAOs activent les plaquettes quand d'autres les inhibent.** Ces deux effets sont dus principalement à l'action du peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produit au cours de la réaction d'oxydation cependant les mécanismes exacts sont encore mal connus et restent à éclaircir. Une meilleure connaissance des activités biologiques des SV-LAAOs sur l'agrégation plaquettaire aidera à clarifier les mécanismes d'action précis et fournira des bases expérimentales pour l'application clinique des SV-LAAOs dans le traitement des maladies cardio-vasculaires. [128] [37].

**Certaines lectines de type C jouent un rôle dans l'hémostase.** En effet, elles ont récemment, été identifiées comme des modulateurs de la fonction plaquettaire et ont contribué à la compréhension de mécanismes impliqués dans la coagulation sanguine et l'activation des plaquettes. Certaines sont agonistes (généralement multimériques) et d'autres antagonistes (hétérodimériques) de l'agrégation plaquettaire. Elles peuvent se lier aux facteurs de la coagulation sanguine ou directement à la surface des plaquettes via différentes intégrines (ou glycoprotéine) [80] [81] [134] [135] [43] [77] [136] [137].

On peut citer entre autres :

- **L'échicétine** d'*Echis carinatus* qui bloque la liaison vWF-GP1b.
- La **lebécétine** (et lebectin) de *Macrovipera lebetina*, qui inhibe également l'agrégation plaquettaire (inhibant les intégrines  $\alpha 5\beta 1$  et  $\alpha V$ ).
- **L'alboaggregin-A et B** de *Trimesurus albolabris* qui sont au contraire des agonistes de l'agrégation plaquettaire par liaison au GPIb, et GPVI pour alboaggregin-A.
- **L'EMS16** d'*Echis multisquamatus* qui inhibe la formation du clou plaquettaire en bloquant les intégrines responsables des interactions plaquettes-fibrinogène.
- La **convulxine** de *Crotalus durissus terrificus* est une lectine de type C qui active les plaquettes en se liant avec une haute affinité au récepteur GP VI de la membrane plaquettaire [46].

Dans la dernière décennie, de nombreuses lectines de type C ont été isolées, séquencées et leurs mécanismes d'actions ont été déterminés. Elles pourraient être utiles **dans l'évaluation des thromboses et des hémostases**. Elles ont notamment été utilisées dans des études sur les glycoprotéines plaquettaires. La possibilité de trouver des lectines agissant sur de nouveaux récepteurs, autres que ceux déjà connue (GPIb, GPVI et  $\alpha 2\beta 1$ ...), permettrait de développer et de fournir de nouvelles possibilités dans le **diagnostic et le traitement de l'hémostase** [77].

#### e) Schéma général.

Dans le schéma ci-dessous se trouve les acteurs pro coagulant en vert et les acteurs anti coagulant en orange.

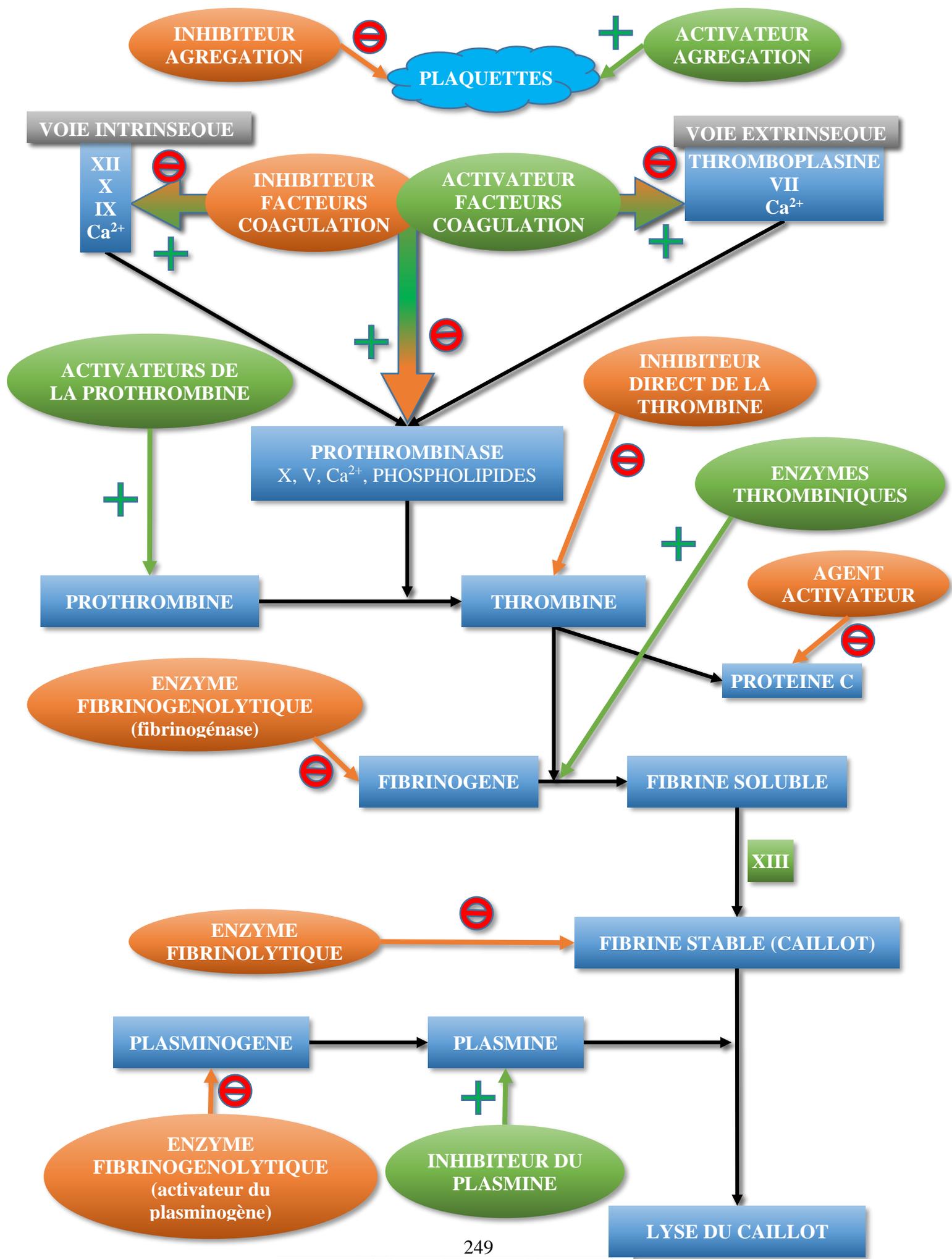


Figure 78 : Mode d'action des venins sur l'hémostase

<b>FAMILLES DE PROTEINES</b>	<b>CIBLES DU SYSTEME DE L'HEMOSTASE</b>	<b>EFFETS</b>
<b>SERINES PROTEASES</b>	Plaquettes FX, FVII, FV, FII, PC Plasminogène Fibrinogène Fibrine, Fibrinogène Serpines	Agrégation Activation Activation Coagulation Dégradation Inactivation
<b>METALLO PROTEASES</b>	Cellules endothéliales, membrane basale Plaquettes FX, FII Fibrinogène Serpines	Hémorragie Inhibition de l'agrégation Activation Dégradation Inactivation
<b>PHOSPHOLIPASES A<sub>2</sub></b>	FXa, FIIa TF/FVII Plaquettes	Inhibition de l'agrégation Agrégation Inhibition de l'agrégation
<b>ACIDES AMINO OXYDASES</b>	Cellules endothéliales Plaquettes	Hémorragie Agrégation Inhibition de l'agrégation
<b>5'-NUCLEOTIDASES</b>	Plaquettes	Inhibition de l'agrégation
<b>DESINTEGRINES</b>	Plaquettes	Inhibition de l'agrégation
<b>LECTINE TYPE-C</b>	FIX, FX, FIIa FX, FII Plaquettes	Inhibition Activation Agrégation Inhibition de l'agrégation
<b>TOXINES à 3 DOIGTS</b>	FVIIa, plaquettes	Inhibition Inhibition de l'agrégation

**F = Facteur de la coagulation ; PC = Protéine C**

Tableau 5 : Effets des protéines sur les différentes cibles de l'hémostase

## **B) Utilisation comme agents thérapeutiques, outils de diagnostic et de surveillance des traitements anticoagulants.**

Les premières observations documentées de l'utilisation des effets coagulants thérapeutique des venins ophidiens pour arrêter une hémorragie grave date de 67 av. J.-C. Après avoir subi de graves blessures à l'épée à la cuisse, Mithridate aurait été sauvé deux fois sur le champ de bataille par les chamans guérisseur Agari expérimentant l'application de petites quantités de venin de vipère de la steppe *Vipera ursinii* sur sa blessure. L'utilisation des venins comme agent hémostatique remonte à la fin du XVIII<sup>ème</sup> siècle, lorsque Fontana en 1767 a décrit les effets coagulant du venin de vipères. Les venins complets, plus ou moins dilués, d'*Agkistrodon*, de *Notechis*, de *Cerastes*, de *Naja* et de *Bothrops* ont été employés par la suite pour tenter de traiter les hémorragies spontanées ou accidentelles dans l'hémophilie, les traumatismes ou encore diverses pathologies de l'hémostase [138].

Une meilleure identification des composants du venin actif sur la coagulation sanguine et, surtout, le développement des techniques de purification ont conduit à la commercialisation de plusieurs spécialités pharmaceutiques. Les protéines ophidiennes utilisées pour l'exploration de l'hémostase sont en grande majorité utilisées comme réactifs de laboratoire pour des analyses. Certains composants de venins de serpent ont permis de développer des outils de diagnostic des troubles de l'hémostase et de surveillance de traitements anticoagulants largement utilisés dans l'hémostase [99] [135] [43].

### **1) Les agents pro-coagulants.**

La majorité des enzymes pro-coagulantes interagissent avec la partie terminale de la cascade hémostatique sur les facteurs V ou X, sur la prothrombine, le fibrinogène ou la fibrine [46].

#### **a) Les agents activateurs des facteurs de la coagulation sanguine.**

Les activateurs des facteurs de la coagulation sanguine, notamment les facteurs V et X et en particulier les V(a)-like et X(a)-like sont largement distribués dans les venins de nombreuses espèces de serpents appartenant au genre Viperidae, Crotalidae et quelques espèces d'Elapidae.

## 1. Facteurs V-Like et Va-Like.

Certains venins de serpent, notamment *Vipera lebetina turanica* et *Lonomia achelous*, contiennent des protéases capables d'inactiver le facteur V ou le facteur Va de la coagulation sanguine, indispensable à la formation de thrombine. D'autres venins à l'inverse contiennent des activateurs du facteur V parmi lesquels on peut citer la **thrombocytine** extraite du venin de *Bothrops atrox* qui possède d'autres activités pro-coagulantes, le **LVV-V** isolé du venin de la vipère *Daboia lebetina* ou encore le **RVV-V** isolé du venin de la vipère de Russell *Daboia russelli* qui est le plus connu des activateurs du facteur V.

Les activateurs de facteur V ophidiens sont **généralement des sérine-protéases** effectuant une hydrolyse légère du facteur V. Ces enzymes, le RVV-V et les activateurs du facteur V ophidien en général se sont révélées être d'excellents outils de recherche pour étudier la relation structure-fonction du facteur V(a). Le RVV-V en particulier est également utilisé dans des tests de diagnostic pour le dosage plasmatiques de facteur V et le dépistage des défauts de la voie de la protéine C. [3] [139] [140] [141]

### a. RVV-V.

Le RVV-V extrait du venin de la vipère de Russell *Daboia russelli* est une sérine-protéase activant spécifiquement le facteur V. Le RVV-V agit sur un site qui est également la cible de la thrombine. Toutefois, contrairement à celle-ci, le RVV-V n'est pas inhibée par l'antithrombine III, même en présence d'héparine [3]. Bien que son utilisation soit limitée d'un point de vue pharmacologique, le RVV-V commercialement disponibles dans les trousse de dosage de la coagulation sanguine (Abcam, Pentapharm et Sigma-Aldrich etc. [138] [101]), reste néanmoins un outil utile **dans l'étude de l'activation du facteur V**. Il est par exemple employé pour définir l'importance fonctionnelle des sites actifs sur le facteur V sauvage et recombinant. Il est également utile dans la **surveillance d'un traitement anticoagulant et le diagnostic d'une insuffisance en régulateurs physiologiques de la coagulation (déficience héréditaire ou acquise en facteur V)**. Plus récemment, la découverte du facteur V Leiden génétiquement variable a conduit à une renaissance d'intérêt pour le facteur V et sa **participation dans la thrombophilie et dans la résistance à la protéine C activée** [135] [43].

### **a. 1- Dosage du FV (essai chromogénique).**

Physiologiquement, le facteur V est activé en facteur Va par la thrombine qui clive la simple chaîne glycoprotéique du FV au niveau de trois liaisons peptidiques : Arg709, Arg1018 et Arg1545. Le RVV-V quant à lui la coupe uniquement au niveau de l'Arg1545 libérant ainsi deux chaînes, une légère et une lourde (FVa) avec une activité coagulante plus élevée. Cette propriété très sélective est utilisée pour le dosage plasmatique du facteur V. Dans le système des mammifères, le facteur Va est une partie essentielle du complexe prothrombinase. Son niveau de disponibilité peut limiter la formation de ce complexe et de la coagulation sanguine postérieure. Que ce soit physiologiquement ou en présence de RVV-V, l'activité du facteur V exige la présence de cofacteurs [142] [135].

**Lors de l'essai chromogénique, le plasma du patient est mis en contact avec le RVV-V, une quantité définie de facteur Xa, des phospholipides mimant les membranes plaquettaires ou d'autres surfaces chargées négativement et des ions calcium afin de former le complexe prothrombinase. On ajoute ensuite de la prothrombine à partir de laquelle la thrombine sera produite. Le taux de formation de thrombine proportionnel à la quantité de FVa présent dans le mélange est déterminé à l'aide d'un substrat chromogène [43] [143].**

### **a. 2- Suivi des traitements anticoagulants.**

#### **a. 2. 1- Pefakit® PiCT®.**

Le temps de coagulation induit par la prothrombinase commercialisé par Pentapharm sous le nom de Pefakit® PiCT® (Prothrombinase-induced Clotting Time) est une simple analyse de la coagulation. Ce test fonctionnel prometteur a été conçu pour la surveillance des anticoagulants inhibants le facteur Xa et/ou la thrombine (FIIa) utilisées dans la prophylaxie et le traitement de thrombose tel que les héparines non fractionnée (HNF) ou de bas poids moléculaire HBPM (Lovenox, Innohep, etc.), fondaparinux, argatroban, héparinoïde (danaparoiide), r-hirudine, etc. [43] [144] [143].

Le test est basé sur l'activation de la coagulation de l'échantillon de plasma par une quantité définie de FX activé, de phospholipides et du RVV-V. Ce dernier active directement le FV. Le complexe prothrombinase se forme indépendamment des mécanismes feed-back de la thrombine endogène. L'activation du plasma directement au niveau du complexe

prothrombinase, donne une sortie analytique affinée directement liée à la teneur en médicament antithrombotique [143] [43].

Durant la période d'incubation (180s), le facteur Xa ajouté est inhibé en fonction de la quantité de complexes formé avec les anticoagulants AT-héparine et/ou d'inhibiteurs directs du facteur Xa et/ou de la thrombine (facteur IIa) présents dans l'échantillon. Le facteur IIa, généré par le complexe de prothrombinase est également inhibé en fonction de la quantité d'inhibiteurs de facteur IIa directs et/ou indirects dans l'échantillon. Après recalcification, le complexe de prothrombinase est formé à l'aide de facteur Xa restant, de phospholipides, de facteur Va généré à partir de RVV-V présent dans l'échantillon et d'ions calcium libres. Le temps de coagulation est alors enregistré.

Lors d'une étude, les échantillons plasmatiques de patients traités avec les médicaments décrits ci-dessus ont produit **une prolongation dépendante de la concentration du PiCT**. Bien que des réponses différentes aient été obtenues pour chaque médicament, la prolongation relative du PiCT était proportionnelle à l'inhibition de la génération de thrombine comme mesuré par FPA. Il a été démontré que **le PiCT est aussi simple de fonctionnement que l'aPTT et peut être adapté à n'importe quel instrument capable de détecter un caillot fibrine**. La réponse PiCT a également présenté **une meilleure sensibilité, reproductibilité et linéarité sur une gamme de dose plus large en comparaison avec les autres tests de coagulation** (aPTT, Heptest, temps de thrombine (TT), ecarin clotting le temps (ECT), test chromogenic anti-FIIa, test chromogenic anti-FXa et l'essai de génération de fibrinopeptide (FPA)) [145].

Il n'existe actuellement aucune méthode simple et fiable pour contrôler les patients traités par ces médicaments anticoagulants, particulièrement ceux souffrants d'insuffisance rénale ou d'obésité. A la différence d'autres tests, le PiCT est sensible à la plupart des anciens et nouveaux médicaments anticoagulants offrant ainsi la possibilité de développer le premier test unique universellement utilisé pour le contrôle des nouveaux médicaments anticoagulants [145].

### **a. 3- Diagnostique du Facteur V de Leiden résistant à la protéine C activé (APC).**

#### **a. 3. 1- Le facteur V Leiden.**

Physiologiquement, la protéine C activé dégrade le facteur Va et le facteur VIIIa par un clivage protéolytique spécifique d'un résidu arginine. La résistance à la protéine C activée est une des causes principales de thrombophilie et dans la majorité des cas elle est due à une mutation du gène du facteur V, on parle alors de facteur V Leiden. Cette mutation, appelée mutation Q506, consiste en la substitution d'une arginine par une glutamine en la position 506 du facteur V rendant la molécule résistante à la dégradation protéolytique par la protéine C activée [135].

#### **a. 3. 2- Pefakit® APC-R Factor Leiden et ACTICLOT® Protéine C Résistance.**

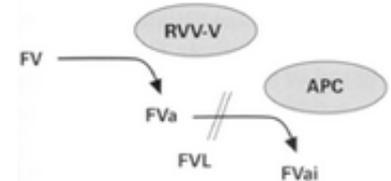
Pefakit® APC-R Factor Leiden (Pentapharm, Suisse) et ACTICLOT® Protéine C Résistance (Sekisui, US) sont utilisés dans un test fonctionnel de coagulation sanguin appelé « Functional Prothrombin-Based APC-R assay ». Ce test de coagulation plasmatique fonctionnel diffère des autres tests fonctionnels de résistance à l'APC en agissant spécifiquement au niveau du complexe de prothrombinase. Il est basé sur un activateur de prothrombine FVa-dépendant, isolé de venin de serpent *Notechis scutatus* et utilise l'activateur de facteur V RVV-V de *Daboia russelli* pour convertir le FV en FVa. La force et la spécificité du test sont améliorées par l'élimination des éventuelles perturbations des facteurs en amont de la cascade de coagulation et l'indépendance au calcium. Toute interférence des héparines non fractionnées (HNF) ou de bas poids moléculaire (HBPM) ou de pentasaccharide dans l'échantillon sanguin est exclue par l'addition de polybrène (inhibiteur d'héparine) [146] [147] [148].

Ce test est réalisé en deux étapes :

- Dans une première étape, l'échantillon est pré-dilué dans un plasma pauvre en FV. Puis le plasma est incubé à 37°C avec un réactif contenant APC et RVV-V (converti FV en FVa) :

**Si FV normal :** APC fait diminuer la concentration de FVa qu'elle transforme en FVai (FVa inactif).

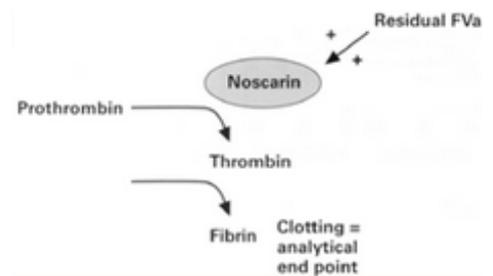
**Si FV Leiden :** APC n'a aucun effet et FVa est au plafond.



- Puis dans une seconde étape, la coagulation est déclenchée par l'ajout de la noscarine une enzyme ophidienne prothrombinique FVa-dépendante extraite du venin de *Notechis scutatus scutatus*. La noscarine convertie la prothrombine en thrombine induisant la formation du caillot sanguin. Le temps de coagulation est alors enregistré.

**Si FV normal :** FVa éliminé du plasma ⇒ temps de coagulation prolongé.

**Si FV Leiden :** FVa est présent ⇒ temps de coagulation normal.



Le test est réalisé une deuxième fois dans les mêmes conditions à l'exception que l'APC n'est pas rajouté dans le premier réactif de la première étape. Ainsi le temps de coagulation normal de l'échantillon de plasma est déterminé sans l'inactivation du FVa par l'APC. Il est appelé « APC(-) » comparé au premier test appelé « APC(+) » où le FVa est éliminé par l'APC.

Les temps de coagulation sont enregistrés et le ratio entre les deux tests : « APC(+) / APC(-) » est calculé. Le résultat détermine le diagnostic d'une mutation du facteur V Leiden homozygote, hétérozygote ou négatif.

RATIO	RESULTATS
> 2,5	FV normal (pas de FV Leiden)
1,5 – 2,5	> 95% de probabilité de FV Leiden ou autre mutation
< 1,5	Test PCR pour 506gln (homozygote- hétérozygote)

Tableau 6 : Diagnostic d'une mutation du Facteur V.

L'essai est indépendant du FVIII. En absence de calcium, et surtout aucun phospholipide n'est présent, ce qui élimine la possibilité d'influence par les anticoagulants lupiques. L'interférence par l'héparine non fractionnée ou de bas poids moléculaire est écarté par un agent inhibiteur. Jusqu'à présent, ce test a montré 100% de spécificité et sensibilité pour la détection du FV Leiden (mutation de FV : Q506) hétérozygote et homozygote. Le test présente aussi une bonne reproductibilité et ne serait pas affecté par une anomalie de PT, aPTT, Protéine C, Protéine S, Lupus Anticoagulant, FVIIIa, FIIa des activités, des Héparines, Fibrinogène, D-dimer, ou des niveaux plasma Antithrombine [146] [147].

**Remarques :** Les tests de diagnostic de résistance à la protéine C (et FV Leiden 95%) qui utilisent des activateurs de la coagulation de venins de serpents incluent :

- Le RV-V et la noscarine (Pefakit® APC-R Factor V Leiden, Pentapharm).
- Le **dRVVT (GradiLeiden V**, life thérapeutiques anciennement Gradipore).
- Le temps de textarine (Pentapharm).
- **Ainsi qu'un activateur spécifique de *Crotalus viridis helleri* (STA-STACLOT, Diagnostica Stago) [149] [135] [150].**

## 2. Facteur X-Like (et Xa-like).

Physiologiquement, le facteur Xa est le plus efficace des activateurs de la prothrombine [151]. Une carence en FX entraîne une tendance au saignement. Les activateurs du facteur de coagulation sanguine X ou « Xa-like » qui imite les effets de facteur X activé, ont été décrits dans le venin de nombreuses espèces de serpents appartenant au genre **Viperidae** et **Crotalidae** ainsi que chez **quelques espèces Elapidae**. On trouve notamment des activateurs du facteur X calcium-dépendants dans le venin des genres *Echis*, *Vipera*, *Daboia*, *Cerastes*, *Bothrops* et *Calloselasma* [46] [31] [152].

En se basant sur les propriétés structurales et fonctionnelles, les activateurs du facteur X sont soit des métallo-protéases, soit des sérine-protéases [152]. Ce sont notamment de bons outils de recherche pour l'analyse fonctionnelle du facteur X physiologique.

### **a. RVV-X.**

Il est le plus connu des activateurs du FX, découvert il y a plus de 70ans. Contenu en abondance dans le venin de la vipère de Russell *Daboia russelli*. Spécifique, puissant et efficace.

#### **a. 1- Structure.**

Le RVV-X est une métalloprotéase hétérotrimérique appartenant au groupe P-IV. Il est constitué d'une chaîne lourde contenant le domaine catalytique et de deux chaînes légères qui partagent une homologie avec les lectines de types C. Ces deux chaînes sont supposées exercer une fonction régulatrice dans l'activation du facteur X par le  $Ca^{2+}$ . L'activation du facteur X par RVV-X est strictement dépendante de la présence d'ions calcium [43] [151] [152] [153] [154].

#### **a. 2- Applications.**

Le RVV-X est l'un des meilleurs exemples d'utilisation d'activateurs exogènes dans la recherche sur la coagulation. Il a une place bien établie dans l'analyse du FX. Il a été notamment utile dans l'étude de l'activation du FX ou dans l'identification de ses sites de reconnaissance, dans la compréhension des effets de la glycosylation sur l'activation du FX ou encore pour le dosage du FIII plaquettaire [43] [135].

Présent dans de nombreux kits de recherche diagnostique, le RVV-X est couramment employé dans les laboratoires pour la conversion quantitative du pro-facteur X en FXa. Le RVV-X est utilisé comme outil dans plusieurs analyses de la coagulation, notamment :

- Pour le **diagnostic d'une déficience en FX** par **dosage direct** de celui-ci par une analyse très simple en une seule étape appelé temps de Stypven®. Ce temps peut également être employé pour le diagnostic différentiel entre une insuffisance en FVII et FX, un déficit en FV, FII ou encore en FIII plaquettaire.
- Dans le dépistage et l'analyse des anticoagulants lupiques (LA) (dRVVT)
- Pour le diagnostic du facteur V Leiden résistant à la protéine C (dRVVT)
- Pour diagnostiquer certains troubles héréditaires de la coagulation du sang ainsi que pour le contrôle de l'efficacité des traitements anticoagulants oraux [20] [99] [101] [43] [135] [138] [152].

### a. 2. 1- Stypven® (temps au Stypven).

Le venin de *Daboia russelii* est utilisé pour mesurer l'activité du FX chez un sujet présentant un déficit de la coagulation. Le Stypven® provenant de ce venin, est utilisé comme réactif pour produire la prothrombinase directement sans passer par les phases de contact tissulaire et d'activation des plaquettes ou des facteurs anti hémophiliques.

Le Stypven® possède des **propriétés analogues au facteur VII qui permet l'activation du facteur IX**. Ce dernier génère la prothrombinase et constitue la voie physiologique essentielle du premier temps de la coagulation. Le facteur IX activé obtenu est différent morphologiquement du facteur IX activé naturellement par la voie extrinsèque, ce qui confirme que **Stypven® intervient directement sur le facteur IX**. Ainsi il est **possible de localiser un déficit de la coagulation sanguine situé au niveau de la genèse de la prothrombinase**.

Le Stypven® est également **un activateur direct du facteur X en absence de phospholipides**, comme en témoigne le clivage partiel de la molécule native donnant naissance à un facteur Stuart actif (FXa), mais différent de celui formé naturellement et qui subit une seconde coupure réductrice [3].

Pour réaliser le temps de Stypven® le plasma d'un patient est mis en contact avec le RVV-X, des ions calcium, des phospholipides et du FV. Le complexe prothrombinase constitué va activer la prothrombine en thrombine. On peut déterminer la quantité de thrombine formée :

- Soit directement en utilisant un substrat chromogène spécifique et hautement sensible au facteur Xa (Pefachrome FXa® commercialisé par Pentapharm).
- Soit indirectement au moyen d'un test chromométrique de coagulation en mesurant le temps nécessaire à la formation du caillot. Le temps de coagulation dans ce cas, est inversement proportionnel à la quantité de facteur X présent dans le plasma.
  - Temps de Stypven® normal = insuffisance en facteur VII.
  - Temps de Stypven® anormal (allongé) = déficience en facteur V, II et X.

**RVV-X a aussi été utilisé pour analyser le facteur III plaquettaire**. Si le temps allongé de Stypven® retourne à la normale après ajout de céphaline, on conclut à un déficit en facteur III plaquettaire. Ceci présente un avantage par rapport aux essais courants de coagulation en distinguant les patients thrombotiques et les patients sains [101] [135] [43] [154] [155].

## **a. 2. 2- Diagnostique LA : « dRVVT » Temps de venin de la vipère de Russel dilué.**

Le temps de venin de la vipère du Russel dilué « dRVVT » occupe une place essentielle dans l'analyse des anticoagulants lupiques (LA). Considérée parmi les plus sensibles, cette technique rapide et peu coûteuse est largement utilisée comme test diagnostique dans les laboratoires hospitalier [101] [135] [156].

### ***Rappels des anticoagulants lupiques :***

Les anticoagulants circulant de type lupique (LA) sont un groupe hétérogène d'auto-anticorps produits par le système immunitaire d'une personne et dirigé contre ses propres phospholipides et/ou des protéines associées aux phospholipides. Les anticoagulants lupiques ont été nommés ainsi parce qu'ils ont d'abord été retrouvés chez des patients atteints de lupus érythémateux disséminé (LED), mais ils peuvent aussi être présents avec une fréquence accrue chez des personnes atteintes d'autres maladies auto-immunes, d'infections comme le SIDA, d'inflammation, de cancers et chez des patients sous certains médicaments, tels que les phénothiazines, la procainamide et le Fansidar®. Les anticorps sont présents chez environ 1 à 2% des personnes de la population générale et peuvent se développer chez les personnes ne présentant aucun facteur de risque connu. Dans l'organisme, les anticoagulants lupiques persistants augmentent le risque de développer des thromboses artérielles ou veineuses, un AVC, une crise cardiaque, une embolie pulmonaire, ainsi que des complications obstétricales (avortements spontanés répétés, morts fœtales intra-utérines, retards de la croissance fœtale ou prééclampsie) [156] [157].

**Au laboratoire, les anticoagulants de type lupique interfèrent avec les tests de la coagulation dépendant des phospholipides** (tels que le temps partiel de thromboplastine, taux de prothrombine ou temps de coagulation de kaolin). **Ils sont mis en évidence par un allongement des temps de coagulation en se fixant sur des phospholipides ou des protéines associées à ceux-ci, qui sont des composants nécessaires aux réactions de coagulation.**

Les méthodes de recherche d'anticoagulants lupiques (AL) ont été largement étudiées et plusieurs activateurs extraits de venins de serpents sont maintenant régulièrement utilisés. Ceux-ci incluent l'activateur du facteur X de venin de la vipère de Russell (RVV-X), les activateurs de la Prothrombine du venin de taipan *Oxyuranus scutellatus*, du venin du serpent brun Australien *Pseudonaja textilis* et d'*Echis carinatus* [54] [43] [157].

Il est recommandé par l'International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) et indiqué dans l'article de position du GEHT de 2009 et le rapport HAS de 2006 d'effectuer deux tests de dépistage sensibles basés sur des principes différents explorant deux segments différents de la cascade classique de la coagulation. En effet, en raison de la grande hétérogénéité des AL, aucun test unique ne permet à lui seul de détecter l'ensemble des AL. Toutefois, d'après l'ISTH, le risque de faux positifs est augmenté à un niveau non acceptable par l'utilisation de plus de deux tests [135] [158]. Les analyses initiales utilisent généralement un ou plusieurs tests qui dépendent de la présence de réactifs phospholipidiques pour fonctionner. **Le temps de venin de vipère Russell dilué (dRVVT) doit être systématiquement utilisé.** Ce test est considéré comme spécifique et efficace dans la détection des anticoagulants circulants de type lupique. **Le deuxième test à utiliser est un TCA utilisant la silice comme activateur, en raison de sa sensibilité à l'anticoagulant lupique.** L'utilisation de kaolin ou d'acide ellagique comme activateur n'est pas recommandée, de même que le temps de thromboplastine diluée, les tests basés sur l'utilisation d'écarine ou de textarine, ou le "Kaolin Clotting Time". Selon les résultats de ces 2 premiers tests, certains tests de suivi sont effectués pour confirmer ou exclure la présence d'anticoagulant lupique [157].

De nouveaux tests de diagnostic basés sur l'utilisation d'enzymes activatrices de prothrombine issues de venins de vipères comme **le temps de venin de vipère de Taïpan dilué et le temps de textarine** semblent également être sensibles et spécifiques pour la détection de l'anticoagulant de type lupique. Ils pourront éventuellement devenir des tests de confirmation dans l'avenir si l'altération est corrigée par des concentrations élevées de phospholipides. Par ailleurs, le temps de textarine pourrait devenir un test de confirmation si on établit un rapport entre le temps obtenu et un autre activateur de la prothrombine : l'écarine dérivé du venin *Echis carinatus*, qui n'a pas besoin de phospholipides pour agir, et est donc insensible à la présence de l'anticoagulant de type lupique [156]. De même il a été montré que le temps du venin de Taïpan couplé avec le temps d'écarine améliore la détection du lupus anticoagulant [159].

### ***Principe du dRVVT :***

Le test dRVVT évalue la transformation de la prothrombine en thrombine. Le RVV-X active directement le FX, qui transforme la prothrombine en thrombine en présence de FV et phospholipides. Le test utilise une combinaison de phospholipides dilués afin de rendre le test extrêmement sensible aux phospholipides ainsi qu'une faible concentration d'activateur du FX. **Le test est positif si : (temps du malade) - (temps du témoin) > 6 secondes ou MIT > 1,2.**

D'après l'ISTH, le temps de la vipère de Russell dilué (dRVVT) doit systématiquement être utilisé. Il est considéré comme spécifique et efficace dans la détection des AL. Néanmoins, quelques « faux positifs » ont été rapportés dans le cas d'anticorps anti-facteur VIII de titre élevé et dans le plasma de malades traités par anticoagulants oraux ou par héparine. Pour pallier ce dernier inconvénient, certains réactifs commerciaux contiennent des neutralisants de l'héparine. Afin de maximiser la sensibilité, plusieurs laboratoires ont employé des variations par rapport à la formulation conventionnelle de dRVVT [43] [156] [158] [160].

### ***Staclot® Screen dRVV et Staclot® dRVV Confirmer.***

Les anticoagulants lupiques sont des anticorps dirigés contre des complexes phospholipides/protéines. Les tests, Staclot® DRVV Screen et Staclot® DRVV Confirmer, permettent la détection du lupus anticoagulant (LA) dans le plasma par la méthode de dilution du venin de la vipère de Russell.

Le kit d'essai STA®-Staclot® dRVV Screen et Confirmer est constitué de produits lyophilisés comprenant le venin de vipère de Russell, les phospholipides, le calcium et l'héparine (UHF). **Entièrement automatisées, ces analyses utilisent la méthode du venin de vipère de Russell dilué pour détecter les anticoagulants du lupus dans le plasma du patient. Chaque réactif est codé en barres pour faciliter l'utilisation sur les analyseurs STA de Stago.**

Le test d'écran **Staclot® dRVV Screen** est réalisé avec une faible concentration de phospholipides réactifs pour tamiser les échantillons ce qui améliore sa sensibilité à la présence de LA. Si des anticoagulants lupiques sont présents, le temps de coagulation sera prolongé.

Le test de confirmation **Staclot® dRVV Confirm Reagent** contient une concentration en phospholipides plus élevée ce qui va neutraliser les LA présents dans le plasma à tester. Le temps de coagulation obtenu avec le Staclot® dRVV Confirm Reagent sera plus court par rapport à celui observé avec le réactif Staclot® dRVV Screen.

Les 2 tests ne sont pas affectés par des déficiences en facteurs de contact, des déficits en facteurs VIII et IX ou spécifiques. Le dosage n'est pas affecté par des échantillons contenant des taux thérapeutiques d'héparine. Lorsqu'ils sont utilisés en conjonction avec Staclot LA (une autre procédure de neutralisation des phospholipides en phase hexagonale, Staclot® DRVV Screen et Staclot® DRVV Confirmer répondent aux recommandations pour le diagnostic de lupus anticoagulants établis par le Sous-Comité scientifique sur Lupus Anticoagulants / anti phospholipides Anticorps de la Société internationale sur Thrombose et Hémostase (ISTH) [161] [162].

#### **a. 2. 3- Diagnostic d'une résistance à la protéine C : dRVVT (GradiLeiden V).**

**Le test « GradiLeiden V »** et un test similaire « CRYO check Clot APCR **utilise le RVV-X pour le diagnostic du facteur V Leiden résistant à la protéine C.** Le test GradiLeiden V est basé sur le **dRVVT** qui est prolongé quand l'échantillon plasma est pré-incubé avec le **Protac®**.

**Principe :** Le test Gradi Leiden V est réalisé en 2 temps : L'échantillon de plasma est mis en contact avec le **Protac®** un activateur de protéine C conçu sur la base du venin d'*Agkistrodon contortrix contortrix*. Puis on ajoute un mélange de **RVV-X, de phospholipides et de calcium à une concentration optimisé.** Le facteur X est activé par le RVV-X. Le résultat du test est exprimé comme le ratio entre le dRVVT avec et sans complément du Protac [150] [163].

Le test est sensible et efficace pour la détermination de la présence de facteur V Leiden. La méthode offre des avantages car elle peut être efficacement utilisée chez des patients atteints d'anticoagulant lupique (LA) et les patients traités par warfarine. Un plasma normal peut être utilisé pour diluer le plasma de patients traité par warfarine. L'emploi de plasmas normaux pour la dilution n'affecte pas la sensibilité du test à la mutation et est considérablement moins cher que le plasma FV-déficient. On recommande une dilution 1/2 dans plasma normaux uni pour des patients traités sous warfarine [164].

Le test de résistance à l'APC à base de venin de vipère dilué (dRVVT) montre une sensibilité et une spécificité améliorées comparé au temps de céphaline activée (TCA ou APTT) pour la mutation du facteur V Leiden. L'utilisation systématique des deux tests offre une fiabilité optimale pour le diagnostic de la résistance à l'APC génétique. Il est suggéré que lorsque les deux tests sont positifs ou négatifs, l'analyse de l'ADN est inutile. De plus, les interférences par les anticoagulants du lupus (LA) sont considérablement réduites par le réactif DRW riche en phospholipides utilisé dans le dosage. Le test est également insensible à l'activité élevée du facteur VIII. En outre, les résultats du dosage fonctionnel permettent d'identifier les patients qui peuvent avoir un phénotype résistant à l'APC acquis [165].

## **b. Activateur du facteur X de *Crotalus viridis helleri*.**

### **b. 1- Sta-Staclot APC-R (diagnostique de la résistance à la PCA par mutation de Leiden).**

Le test STA-STACLOT APC-R (Diagnostica Stago, Asnières, France) est un nouveau test fonctionnel pour la détection de la résistance accrue du facteur de coagulation V à la dégradation par la protéine C activée (mutation Leiden facteur V). STA-STACLOT APC-R est basé sur l'activation spécifique du facteur X par le venin de serpent de *Crotalus viridis helleri*.

Les résultats du temps de coagulation du plasma du patient en présence de venin et de protéine C activée sont donnés en seconde. Des valeurs inférieures à 136 secondes sont trouvées dans tous les échantillons de patients porteurs de la mutation du facteur V de Leiden, alors qu'aucun patient présentant une déficience en protéine C ou protéine S n'ont réduit les temps de coagulation. Les porteurs homozygotes de la mutation du facteur V Leiden présentent des temps de coagulation inférieurs à 66 secondes et les porteurs hétérozygotes présentent des temps de coagulation supérieurs à 80 secondes. **Ainsi, sur la base du temps de coagulation individuel, les patients homozygotes pour la mutation Leiden du facteur V peuvent facilement être distingués des individus normaux ou hétérozygotes** [149] [149].

Évalué en 1998 [166] et en 2000 [149] ce test simple, rapide et pratique dans une utilisation courante a montré une **excellente sensibilité (100%) et spécificité (98,8%)**. En présence d'anticoagulant lupique, la spécificité du test STA-STACLOT APC-R est en revanche nettement diminuée. L'influence du facteur de coagulation X, V ou II sur le test STACLOT

APC-R a été évaluée et a révélé des temps de coagulation prolongés aux activités du facteur V inférieures à 50% [149] [166].

En testant simultanément les échantillons avec et sans APC, une étude a révélé en 2005 que l'utilisation de STA-STACLOT APC-R avec un ratio APCR permettait d'avoir une sensibilité et spécificité de 100% avec aucun chevauchement entre les hétérozygotes et les sujets normaux et aucune interférence des facteurs connus du test APCR [167].

Le test STA-STACLOT APC-R est capable de diagnostiquer les porteurs de la mutation du facteur V de Leiden à partir de contrôles sains ou de patients présentant une carence en protéine C ou protéine S [149].

### **3. Facteur VIII ophidien pour soigner les hémophiles.**

A partir des venins de *Bitis arietans* et de *Calloselasma rhodostoma*, il a été possible de purifier du **facteur VIII** (facteur anti hémophilique A), qui peut être administré à des **hémophiles** [3].

#### **b) Les enzymes activatrices de la prothrombine.**

Physiologiquement, la prothrombine est hydrolysée au niveau de deux liaisons peptidiques, (Arg274-Thr 275) puis (Arg323-Ile324), par le facteur X activé, c'est-à-dire fixé sur le facteur V et sur un phospholipide en présence de calcium. Cette réaction libère la thrombine naturelle ou thrombine- $\alpha$ . **Les activateurs de prothrombine ophidiens peuvent être classés en cinq groupes différents en fonction de leurs propriétés structurales et fonctionnelles et selon la nécessité de cofacteurs pour activer la prothrombine** [3] [46] [43] [168] [135].

## 1. Répartition en différents groupes.

### a. Le premier groupe (groupe A).

Le groupe A est constitué par la majorité des activateurs de prothrombine rencontrés dans les venins ophidiens dont l'exemple le plus connu est l'écarine extraite du venin d'*Echis carinatus*. Ils n'hydrolysent que la liaison (Arg323- Ile324), ce qui conduit à la formation de meizothrombine dont les propriétés sont différentes de celles de la thrombine- $\alpha$ . Leur activité n'est sous la dépendance d'aucun cofacteur ni facteur V, ni phospholipides, ni calcium. Les activateurs de prothrombine isolés des venins de *Trimeresurus gramineus* et de *Bothrops jararaca* appartiennent à ce groupe, ainsi que la majorité des venins de Colubridae (*Dispholidus typus*, *Thelotornis kirtlandii*, *Rhabdophis tigrinus*) [3] [168] [46] [135].

### b. Les activateurs du second groupe (groupe B).

Le groupe B hydrolysent la prothrombine aux mêmes sites que le complexe prothrombinase physiologique, le produit obtenu est donc une thrombine naturelle. Ils dépendent uniquement de la présence de calcium même si l'efficacité de ces activateurs de la thrombine est multipliée par un facteur de 1 à 10 millions en présence de phospholipides, de facteur V activé et de calcium. Le représentant de ce groupe est la noscarine isolée du venin du serpent tigre *Notechis scutatus*. En associant le RVV-V extrait de *Daboia russelli*, la noscarine peut être utilisée pour le diagnostic de la résistance à la protéine C activée dans un test appelé Pefakit® APC-R Factor V Leiden, décrit plus haut [3] [168].

### c. Le troisième groupe (groupe C).

Le groupe C comprend les activateurs de certains venins d'Elapidae australiens, comme celui d'*Oxyuranus scutellatus* aussi nommé Taïpan côtier. Le site d'hydrolyse est identique à celui du deuxième groupe **libérant la thrombine naturelle**. L'hydrolyse des 2 liaisons peptidiques de la prothrombine **ne nécessite pas la présence de facteur V activé mais elle dépend uniquement de la présence de phospholipides et de calcium**. Issu du venin de *Pseudonaja textilis* on retrouve la pseutarine C qui possède une structure qui ressemble au complexe prothrombinase et contient des domaines à la fois Xa et Va-like [3] [168] [169].

#### **d. Le quatrième groupe (groupe D).**

Le groupe D est constitué d'activateurs de prothrombine qui transforment la thrombine en préthrombines 1 et 2, substances dépourvues d'activité enzymatique donc de toxicité. L'acutine extraite du venin de *Deinagkistrodon acutus* en est le type. On les observe dans les venins de crotales américains (*Crotalus, Agkistrodon*) ou asiatique (*Calloselasma*) [3] [168].

#### **e. Le cinquième groupe.**

**Ce dernier est représenté par une unique enzyme isolée du venin d'*Echis carinatus*, la carinactivase.** Elle présente une structure composée, associant une métalloprotéase du type de l'écarine (issu du même venin et appartenant au groupe A) à un peptide dimérique qui favorise la présentation de l'enzyme sur son substrat et facilite son hydrolyse [3]. La carinactivase 1 (CA-1) qui requiert l'addition d'ions calcium et nécessite l'intégrité du domaine Gla de la prothrombine pour activer la thrombine a notamment été proposée pour la surveillance des traitements anticoagulants oraux [46].

## **2. Utilisations.**

### ***La détection de formes anormales de la prothrombine :***

Ils ont pour cible la prothrombine qu'elle soit normale ou fonctionnellement anormale. Ainsi **les formes décarboxylées PIVKA** (Protéines Induites par l'Absence de Vitamine K/Antagonistes) **présentes dans certaines affections hépatiques** peuvent être détectées tout comme les dysprothrombinémies. L'utilisation de ces enzymes est cependant limitée chez les patients traités par warfarine (coumadine® AVK).

### ***Le suivi et l'ajustement de la posologie de traitements anticoagulants :***

L'ajustement de la posologie de traitements anticoagulants est réalisé en fonction du résultat d'un test de coagulation qui consiste à mesurer le taux de prothrombine dans le sang du patient. Cependant, la présence d'un anticoagulant perturbe le résultat de la plupart des tests de coagulation car il inhibe l'une ou l'autre des protéines sanguines activatrices de la coagulation [130]. Certains agents ophidiens résistent à ces inhibiteurs représentant ainsi une alternative.

### ***Autres utilisations :***

D'autres enzymes ophidiennes activatrices de la prothrombine ont aussi été employées dans la préparation de meizothrombine, dans l'analyse des formes non enzymatiques de la thrombine et de la meizothrombine, ou encore pour les études menées sur le clivage de la prothrombine recombinante et les mécanismes de l'activation de la prothrombine [43] [135].

Plusieurs enzymes activatrices de la prothrombine d'origine ophidienne sont disponibles dans le commerce. On peut citer: **l'écarine** extraite du venin *d'echis carinatus* (Pentapharm), la **noscarine** extraite du venin de *notechis scutatus* (Pentapharm), la **textarine** activateur extraite du venin du serpent brun australien *Pseudonaja textilis* (Venom Supplies, Tanunda, Australie) et une enzyme issu du venin de **taipan**, *Oxyuranuss Scutellatus* (Diagnostic Reagents Ltd, Thame, UK) [135] [43].

### **3. Ecarine.**

Le plus connu et le plus utilisé des activateurs de prothrombine est l'écarine, isolé à partir du venin de la vipère des pyramides *Echis carinatus* et retrouvé dans les venins de la plupart des *Echis*. Cette métalloprotéase hautement purifié appartient au premier groupe des activateurs de la prothrombine. L'écarine active spécifiquement la prothrombine par un clivage protéolytique pour former la meizothrombine un intermédiaire prothrombine-thrombine qui possède un niveau bas d'activité enzymatique pro-coagulante. Contrairement au FXa, l'écarine active la forme acarboxy de la prothrombine présente dans le plasma des patients subissant une thérapie anticoagulante orale avec des antagonistes de la vitamine K [43] [170] [171].

De parts ses propriétés, l'écarine est utilisé dans de nombreuses applications :

- Dans la surveillance et le suivi de traitement anticoagulant, permettant de surveiller taux de coagulation sous traitement à l'hirudine ou autres inhibiteurs thrombinique.
- Dans la détermination du taux de prothrombine chez les patients sous un traitement anticoagulant (hirudine ou inhibiteurs de la thrombine).
- Dans le diagnostic d'une anomalie de la thrombino- et/ou fibrino- formation.
- Dans le diagnostic d'un déficit en vitamine K.
- Dans le diagnostic d'un Lupus érythémateux [3].
- Pour faciliter la détection de la maladie de Willebrand [99] [129].

### **a. Le temps d'écarine (ECT : Ecarin Clotting Time).**

Commercialement disponibles dans les trousse de dosage de la coagulation sanguine, l'écarine est le réactif principal du test : **Ecarin clotting Time (ECT)** ou « **temps de coagulation à l'écarine** ». Basé sur l'interaction de l'hirudine avec la meizothrombine générée par l'écarine, ce test simple a été développé **pour la surveillance du temps de coagulation des patients traités par hirudine**, un anticoagulant extrait de la sangsue et prescrit aux patients allergiques à l'héparine. Il permet **également une quantification précise des autres inhibiteurs directs de la thrombine** et peut être **utilisé pour mesurer l'activité de ces derniers afin de surveiller l'inhibition de la thrombine veineuse et artérielle et le risque thromboembolique** [142] [138] [171] [172].

L'ECT a démontré son utilité depuis de nombreuses années aussi bien dans des études biochimiques et pharmacologiques que dans la recherche et dans la clinique. Il a été ajusté par de nombreuses modifications pour s'adapter aux exigences précliniques et cliniques. Le test est d'ailleurs préconisé dans une méthode de pharmacovigilance pour la surveillance des traitements anticoagulants par r-hirudine (Refludant®) [43] [46] [173].

#### **a. 1- Application.**

Le temps de coagulation par l'écarine (ECT) en sang total a été utilisé avec succès au cours d'une circulation extracorporelle lors d'une chirurgie cardiaque pour la surveillance biologique d'un traitement anticoagulant par lépirudine (Refludan®), une hirudine recombinante (ou r-hirudine), dans un contexte de thrombopénie ou d'allergie induite par l'héparine. La mesure de l'ECT en sang total au bloc opératoire est performante. L'ECT donne un résultat rapide (temps de coagulation < 1 minute), permettant une adaptation efficace en temps réel des posologies prescrites en particulier en cas d'insuffisance rénale. Néanmoins, le risque hémorragique mériterait d'être approfondi [174].

### **a. 2- Principe.**

En pratique dans l'essai clinique, une quantité connue d'écarine est ajoutée au plasma d'un patient traité par hirudine. L'écarine, transforme directement et sans cofacteur (phospholipide, calcium et FV) la prothrombine en son intermédiaire, la meizothrombine, qui peut ensuite se lier de façon stœchiométrique à l'hirudine à doser. La génération de meizothrombine par l'écarine est inhibée par les inhibiteurs directs de la thrombine telle que l'hirudine. En revanche, elle n'est pas affectée par l'héparine (HNF et HBPM) et cela en raison de l'encombrement stérique du complexe héparine-antithrombine. Les anticoagulant oraux, antivitamines K et aspirine sont également dépourvu d'effet. En présence d'hirudine, la meizothrombine est donc inhibée et la formation de caillots est prolongée. Ainsi, l'ECT est prolongé d'une façon spécifique et linéaire avec les concentrations croissantes d'hirudine. L'ECT peut détecter des concentrations d'hirudine aussi basses que 0.05ug / ml et apparaît relativement indépendante des variations du niveau d'un certain nombre de facteurs de coagulation dont fibrinogène (60-100 %) et la prothrombine (20-60 %) [171] [174] [175].

### **a. 3- Le temps d'écarine « ECT » contre TCA.**

Le développement clinique des inhibiteurs directs de la thrombine s'accompagne de la nécessité de disposer d'un test permettant d'évaluer l'efficacité du traitement et de prédire le risque hémorragique. Le TCA « temps de céphaline avec activateur » est le test le plus couramment utilisé pour le suivi des patients traités par l'héparine non fractionnée. Il a donc été le candidat de choix pour l'évaluation biologique de l'activité des inhibiteurs directs de la thrombine, mais les études menées ont montré les limites de ce test. En effet, les valeurs du TCA sont plus ou moins bien corrélées à la dose administrée et l'allongement du TCA est différent en fonction du type d'inhibiteur et dépend du réactif utilisé. Par exemple, avec l'augmentation des concentrations en hirudine, il n'y a aucune prolongation supplémentaire de la TCA. Le TCA sous-estime donc l'effet anticoagulant des taux plasmatiques élevés de l'hirudine [171].

Le temps d'écarine (ECT), s'est alors avéré être un meilleur test. Dans des études in vitro et in vivo chez l'animal mais aussi en thérapeutique, les résultats ont montré une bonne corrélation entre l'ECT et les différentes concentrations d'inhibiteurs. D'autre part, l'ECT par rapport au TCA présente l'avantage de n'être sensible ni à l'héparine, ni aux antivitamines K. Les variabilités interindividuelles et la dépendance par rapport à la nature du réactif du temps

d'écarrine sont faibles. Il reste à déterminer s'il existe une dépendance par rapport à l'instrumentation. L'ECT fiable et de réalisation simple, il peut être fait sur sang total au lit du patient et semble donc être un test plus approprié que le TCA pour le suivi des traitements par les inhibiteurs directs de la thrombine, bien que son utilisation doive encore être validée en pratique clinique [175].

**b. «Ecarin Chromogenic Assay» (ECA) (Diagnostica Stago, France): test écarine chromogénique.**

L'écarrine chromogénique essai (ECA) est une version améliorée de l'ECT. Elle a été développée pour la **détermination quantitative d'inhibiteurs directs de la thrombine**. Cette nouvelle méthode dans laquelle l'échantillon dilué est mélangé avec un excès de prothrombine purifié, est semblable à celle du temps de coagulation de l'écarrine à la différence que **la génération de la meizothrombine et son inhibition par les inhibiteurs directs de la thrombine est mesurée à l'aide d'un substrat chromogène spécifique**. La meizothrombine générée par l'écarrine hydrolyse un substrat chromogène pour générer un produit coloré. L'inhibiteur direct de la thrombine présent dans le plasma inhibe l'activité de la meizothrombine : **la génération du produit coloré est donc inversement proportionnelle à la concentration du médicament dans le plasma**. Les résultats ne sont pas influencés par un déficit factoriel, un anticoagulant lupique, les anticoagulants ayant une activité anti-Xa. L'ECA est indépendante des variations en prothrombine et fibrinogène. Cette méthode aujourd'hui disponible dans le commerce est très précise, sensible et appropriée pour la mesure de tous les inhibiteurs directs de la thrombine, qui combine les avantages de l'ECT avec ceux des dosages chromogéniques [176] [177].

### **c. Diagnostic d'un déficit en vitamine K.**

En cas de déficit de vitamine K, la prothrombine est synthétisée de façon anormale et ne présente plus les groupements carboxyglutamiques indispensables à son activation en thrombine. L'écarine, est capable d'activer le fragment incomplet de prothrombine anormale. Des tests utilisant un substrat chromogénique ont été mis au point et permettent de diagnostiquer de nombreuses causes : insuffisance hépatique, carences nutritionnelles et, surtout, surdosage de traitement anticoagulant utilisant la vitamine K [172].

### **d. Processus de la préparation de sérum.**

L'écarine a aussi une place dans le processus de la préparation de sérum. En effet, la préparation de sérum à partir d'échantillons de sang par coagulation spontanée et rétraction du caillot, suivi d'une centrifugation, peut être fortement accélérée par l'addition d'écarine, même s'il y a de l'héparine dans ces échantillons. Pour cette application, la pureté de l'écarine est d'importance cruciale puisque la présence d'électrolytes, de facteurs hémolytiques direct ou indirect, d'inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire, les fibrinogénases rendraient l'échantillon de sérum inefficace pour des utilisations à buts analytiques [43].

## **4. Textarine.**

La Textarine est une sérine-protéase extraite du venin de *Pseudonaja textilis* un Elapidae brun australien. Elle permet l'activation directe de la prothrombine mais nécessite la présence de facteur V, de calcium et de phospholipides.

Elle est exploitée dans un test de laboratoire pour détecter la présence d'anticoagulants de lupus dans le plasma de patient. En effet, la textarine purifiée permet d'hydrolyser la prothrombine chez les patients atteints de lupus hémorragique produisant des anticorps contre les phospholipides. Elle est également utilisée dans un test fonctionnel de coagulation pour le diagnostic de la résistance à la protéine C activé (APC) et facteur V Leiden. Le temps de textarine se corrèle plus étroitement avec le génotype du facteur V Leiden en comparaison avec l'essai basé sur le taux de prothrombine [149].

### **a. Le temps de Textarine : Textarine®.**

Le temps de textarine proposé par Triplett et Stocker, n'est pas perturbé chez les malades sous traitement anticoagulant oral (antivitamine K) car ce venin reconnaît la prothrombine native aussi bien que sa forme décarboxylée. Il est toutefois anormal dans les déficits en facteur V ou en présence d'inhibiteurs de ce facteur [156]. Peu utilisé en pratique, il peut servir à la détection d'une anomalie de la thrombinoformation, d'une insuffisance hépatique entraînant un déficit en vitamine K ou pour la surveillance d'un traitement anticoagulant Lupus érythémateux.

### **b. Le rapport Textarine / écarine.**

Comme nous l'avons vu précédemment, le diagnostic de laboratoire du LA est difficile à réaliser et compte de multiples tests. Parmi eux, le rapport Textarine / Ecarine conçu sur la base de deux fractions de venin ophidien différent (*Pseudonaja textilis* et *Echis carinatus*) s'est montré être un essai sensible, relativement spécifique et efficace.

**Principe :** Le rapport Textarine / Ecarin est un test basé sur la dépendance différentielle de ces deux venins de serpents sur les phospholipides pour activer la coagulation. La textarine active la prothrombine en thrombine en présence de phospholipides, de facteur V et de calcium alors que l'écarine active la prothrombine en meizothrombine en absence de cofacteurs. Lors du test, le temps de Textarine et d'Ecarine sont mesurés individuellement sur un échantillon de plasma puis comparés sous forme de ratio. En présence de LA, le temps de Textarine est prolongé en raison de sa dépendance aux phospholipides. En revanche le temps d'Ecarine n'est pas affecté. Un ratio Temps de Textarine/ Temps d'Ecarine élevé  $> 1,3$  est considéré comme anormal ce qui suggère la présence d'un anticoagulant de lupus. Le ratio moyen Temps de Textarine/Ecarin pour un individu normal étant de 0,8 [178].

Le système Textarine/Ecarine a été évalué chez diverses populations de patients : traités par héparine, anticoagulant oral ; en routine préopératoire ou atteint de LA confirmé, de maladie hépatique, anticorps anti cardiolipine positif LA négatif, hémophilie A et autres facteurs protéiques héréditaires déficient ou dysfonctionnels, et inhibiteur spécifique des facteurs V et VIII. Les patients atteints de LA positifs représentaient une population mixte de maladies auto-immunes, d'états induits par les médicaments et post-infectieux. Il s'est montré sensible pour la

confirmation du diagnostic LA. Un essai a été employé avec succès lors de l'identification d'anticoagulant de lupus rendue difficile à cause d'une anticoagulation continue [179].

Le déficit en facteur V et/ou les inhibiteurs spécifiques du facteur V semblent être les seules carences en facteurs causant des faux positifs par allongement du temps de Textarine.

Aucuns inhibiteurs spécifiques des facteurs et aucunes carences (à l'exception de la prothrombine) n'affectent la durée du temps d'écarine, cette dernière agissant directement sur la prothrombine indépendamment de tous les autres facteurs. Cependant, il est à signaler que les héparinoïdes et les médicaments apparentés à l'héparine activent le cofacteur II de l'héparine (HCII) et inhibent la thrombine, ce qui peut prolonger le temps de coagulation de l'écarine. Pour utiliser le système de test le plus efficacement possible, il est donc recommandé d'incorporer du polybrène avec la textarine lors de l'évaluation des échantillons héparinés.

Le rapport de textarine/écarine a prouvé être un essai de confirmation utile pour le diagnostic des patients présentant des anticoagulants lupiques et ayant un APTT prolongé non expliqué. Le test doit être répété 12 semaines plus tard chez les personnes chez qui un AL est identifiée. Il convient également de rappeler que tous les tests, y compris le temps Textarin/Ecarin, n'identifie pas tous les LA et, par conséquent, en cas de suspicion de LA d'autres tests de dépistage doivent être entrepris [135] [178].

### **5. Enzymes issus du venin de Taïpan et temps de venin de Taïpan dilué (TVTd).**

Le venin brut de taïpan (*Oxyyuranu*) contient une proportion si élevée d'enzymes activatrices de la prothrombine, qu'il peut être utilisé sans purification dans une analyse en une seule étape. Cependant, la facilité avec laquelle le venin de taïpan peut faire augmenter le facteur tissulaire a fait qu'il n'a pas été adopté pour une utilisation courante [135] [43].

Le venin de vipère de Taïpan est un complexe moléculaire formé par un composant enzymatique semblable au facteur Xa et un cofacteur qui ressemble au facteur Va. Il est insensible au déficit en facteur X et est peu affecté par les anomalies du facteur V. En revanche, il est fortement modifié chez les malades sous traitement anticoagulant oral [156].

Un test de dépistage utilisant des phospholipides dilués a été développé en se basant sur le temps du venin de taïpan combiné à une procédure de neutralisation de plaquettes. Bien que ce test de confirmation se soit avéré être une approche sensible et spécifique pour la détection des anticoagulants lupiques il n'a cependant pas été retenu.

Il a été montré que le temps de venin de Taipan associé au temps d'écarine offre une bonne précision de diagnostic pour la détection de l'anticoagulant lupus (LA) chez les patients où il est difficile d'identifier les anticoagulants lupiques en raison d'une anticoagulation en cours, la fraction de venin d'écarine étant insensible aux anticoagulants lupiques et aux effets des anticoagulants oraux. Chez les patients lupus anticoagulant-positif traités avec warfarine, le temps d'écarine a en effet atteint des taux de détection plus élevés que la procédure de neutralisation des plaquettes, quelle que soit la méthode utilisée pour évaluer la correction. Il n'y a cependant aucun avantage à utiliser le temps d'écarine dans la détection des anticoagulants lupiques « non compliqués ».

Une méthode chromogénique de dosage de la prothrombine a également été développée utilisant le venin de serpent de taïpan et le substrat chromogénique Tos-Gly-Pro-Arg-pNA (chromozm TH). La méthode est sensible et reproductible et montre une bonne corrélation avec un essai spécifique conventionnel pour prothrombine. La réaction est dépendante d'ions calcium et de phospholipides et est donc sensible au défaut prothrombine induit par coumarine. L'essai est rapide et bien adapté pour l'utilisation dans le laboratoire de coagulation ordinaire [180].

## 6. Pseutarine C.

### a. Pseutarine C

La Pseutarine C est un activateur de prothrombine isolée du venin du serpent brun australiens *Pseudonaja textilis* (Elapidae). Il s'agit d'un complexe protéique de 250kDa constitué d'une partie enzymatique et d'une autre non-enzymatique. Semblable au facteur Xa, la sous-unité catalytique convertit la prothrombine en thrombine en fendant les liaisons peptidiques Arg274-Thr275 et Arg323-Ile324. **Pseutarine C est classé dans le groupe C des activateurs de prothrombine car il ne nécessite pas la présence de cofacteur facteur V pour exercer son activité. En revanche il a besoin de la présence de phospholipides et d'ions calcium.**

L'action de pseutarine C est similaire au FXa complexé au FVa :

- La sous-unité catalytique est semblable à environ 60% structurellement et fonctionnellement au FXa des mammifères.
- La sous-unité non-catalytique est semblable à environ 55% structurellement et fonctionnellement au FV.

La sous unité non catalytique sert de cofacteur essentiel, indispensable pour l'activité de prothrombinase de la sous-unité catalytique similaire au FX. **Pseutarine C est ainsi le premier agent pro coagulant ophidien structurellement et fonctionnellement semblable au complexe « FXa-FVa » des mammifères.**

Dans les conditions physiologiques, les FV et FVa sont inactivés par la protéine C activé (APC) à travers la dégradation protéolytique de la chaîne lourde. Cependant, la sous-unité non-enzymatique de Pseutarine-C conserve son activité même avec une forte concentration d'APC.

Il y a deux hypothèses :

- Cette protéine possède un des trois sites de clivage présent sur le FV et ciblé par l'APC.
- La liaison avec le site catalytique protège le site de clivage de l'inactivation [181] [129].

#### **b. CoVase® (V0801) facteur Va-like.**

La sous-unité non-catalytique FVa-like extrait du venin de *Pseudonaja textilis* est développée comme un potentiel médicament pharmaceutique sous le nom de CoVase® (V0801) [182].

Il s'agit d'un cofacteur pro coagulant qui peut avoir une application comme agent antihémorragique systémique dans **le traitement d'hémorragie interne et d'hémorragie non-compressible**. Contrairement au facteur humain V, le facteur Va-like V0801 est déjà sous forme active et semble être résistant au clivage de la Protéine C activée. **Ce candidat médicament est actuellement en début de développement préclinique.** Les études sont réalisées par la société biopharmaceutique australienne QRxPharma Ltd et sa filiale Venomics Pty Ltd (VPL) en partenariat avec l'Université du Queensland (UQ) [31] [182] [183].

### **c. Haempatch® (Q8009) (facteur Xa-like).**

Par ses propriétés pro coagulantes puissantes, la sous-unité catalytique FXa-like extraite *Pseudonaja textilis* est actuellement en cours de développement préclinique sous le nom d'Haempatch® (Q8009). L'Haempatch® est proposé comme agent hémostatique topique pour réduire la perte de sang résultant d'une intervention chirurgicale ou d'un traumatisme. C'est la société biopharmaceutique australienne QRxPharma Ltd et sa filiale Venomics Pty Ltd (VPL) en partenariat avec l'Université du Queensland (UQ) qui travaillent au développement d'un médicament aux propriétés hémostatique [182] [31] [184].

Q8009 possède 48% de similitude avec le facteur humain Xa. Il coupe la prothrombine au niveau des mêmes sites que le facteur Xa humain, mais à la différence qu'il est actif dans la circulation sanguine sans besoin en calcium, phospholipides ou facteur Va. Son utilisation a été montrée pour réduire la perte de sang dans beaucoup de modèles physiologiques différents et son effet de coagulation globale est 50 à 70 fois plus grand que celui de thrombine. En 2009, une étude a caractérisé les propriétés hémostatiques de Q8009 in vivo dans un modèle de lésions chirurgicales de différents organes parenchymateux chez le rat. Il a été observé que l'application de Q8009 avec une matrice de collagène réduisait significativement le volume de la perte sanguine totale ainsi que le temps d'hémostase. En comparaison à un dispositif hémostatique disponible dans le commerce, le Q8009 s'était montré plus efficace et plus rapide. Une forme recombinante de Q8009, exprimé dans des cellules mammifères, a montré une activité semblable, mais n'a pas encore été produite à une échelle assez grande pour une utilisation commerciale [31] [185].

### **c) Les enzymes thrombiniques ou thrombine-like ophidiennes (SVTLEs) homologues de la thrombine.**

Les enzymes thrombiniques ou « thrombine-like » simulant l'action de la thrombine naturelle sans la reproduire intégralement permettent de disposer de traitements coagulants d'action locale ou générale remarquablement efficaces. Elles sont aussi largement utilisées pour le diagnostic des troubles de la coagulation. Capables d'hydrolyser directement le fibrinogène pour le transformer en fibrine, ces enzymes sont largement distribuées dans les venins de nombreuses espèces de serpents. On les retrouve dans plusieurs genres de Viperidae aussi bien chez les crotalinae (*Agkistrondon*, *Bothrops*, *Lachesis* et *Trimeresurus*) que quelques genres de

Viperinae (*Bitis* et *Cerastes*). Elles ont aussi été trouvées chez une espèce de Colubridae, *Dispholidus typus* [31] [3] [172].

Les enzymes thrombiniques ou « thrombine-like » ophidiennes sont pour la grande majorité [135] des sérines-protéases qui se substituent à la thrombine. Aucune d'elles n'est toutefois identique à cette dernière, ou même à la meizothrombine :

- **Sur le plan structural**, alors que la thrombine est constituée de deux chaînes peptidiques reliées entre-elles par un pont disulfure, toutes les enzymes thrombiniques extraites de venins de serpent sont composées d'une seule chaîne polypeptidique. L'isoforme de la vipère *Cerastes cerastes* est une exception rare constituée de deux chaînes identiques reliées par pont disulfure.
- **Sur le plan fonctionnel**, les enzymes thrombiniques n'agissent pas de la même façon que la thrombine naturelle. Elles libèrent les fibrinopeptides A ou B mais rarement les deux avec une efficacité égale contrairement à la thrombine. **Elles produisent alors le plus souvent un caillot éphémère, translucide et friable**, vraisemblablement en raison du manque de trans-jonction de fibrine par le facteur XIIIa. Le caillot est alors éliminé par divers processus enzymatiques. Cette propriété est très appréciée en thérapeutique [3] [31] [99].

Par ailleurs, en fonction de l'espèce de serpent, le siège de l'hydrolyse (libération de fibrinopeptides A ou B), l'action sur d'autres facteurs de la coagulation (facteur V, VIII, X, prothrombine, facteurs stabilisant la fibrine, plaquettes) et la sensibilité au divers inhibiteurs naturels ou thérapeutiques (hirudine, héparine associée ou non à l'antithrombine III, Diisopropylfluorophosphate, phénylméthylsulphonylfluoride) seront très différents. Contrairement à la thrombine naturelle, la plupart des enzymes thrombiniques ophidiennes ne sont inhibées ni par l'héparine ni par l'hirudine. En revanche, presque toutes celles connues sont inhibées par le diisopropylfluorophosphate. Il existe généralement aussi un effet protecteur de l'antithrombine III [3].

## **1. Les différents groupes d'enzymes thrombiniques.**

### **a. Groupe 1, libération de fibrinopeptides A.**

Ce groupe rassemble la plupart des enzymes thrombiniques connues (Ancrod, Acutine, Défibrinase R, Crotalase, Reptilase, Arvin) et libèrent exclusivement le fibrinopeptide A. La fibrine, qui se constitue rapidement par la polymérisation longitudinale (fibrine I), ne pourra être stabilisée par le facteur XIII, ou facteur stabilisant de la fibrine (FSF), qui est incapable d'exercer son action sur la fibrine incomplète, le caillot reste donc friable [3].

### **b. Groupe 2, libération de fibrinopeptides B.**

La fibrine II qui en résulte, dont la polymérisation est uniquement latérale, n'est pas plus stable que la fibrine I et le caillot est lui aussi friable. On peut citer la venzyme, produite par *Agkistrodon contortrix* (un crotale nord-américain) de même que l'enzyme extraite de *Glydius halys* (crotale asiatique) appartiennent à ce groupe [3].

### **c. Groupe 3, libération de fibrinopeptides A et B.**

La gabonase, provenant du venin de *Bitis gabonica* (un Viperidae africain), conduit à une polymérisation normale de la fibrine et à un caillot stable. Toutefois, la gabonase ne peut pas plus être assimilée à la thrombine que les autres enzymes thrombiniques puisqu'elle n'active aucun des facteurs de la coagulation sur lesquels agit la thrombine (FII, FV, FVIII) et qu'elle n'agit ni sur la protéine C ni sur les plaquettes. De rares enzymes thrombiniques possèdent une action agrégante sur les thrombocytes. Parmi elles, la cérastobine, sérine-protéase isolée du venin de *Cerastes vipera*, petit Viperidae nord-africain et proche-oriental, présente simultanément une activité enzymatique conduisant à l'hydrolyse des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  du fibrinogène et à une dégradation des protéines constitutives de la membrane plaquettaire [3].

## 2. Applications médicales des enzymes thrombiniques.

### a. Prévention et traitement des thromboses vasculaire et maladies occlusives.

Les enzymes thrombines-like ont été utilisés pour développer des médicaments thérapeutiques de défibrinogénération, c'est-à-dire de diminution de la concentration de fibrinogène présent dans le sang afin de réduire la formation de caillot dans des circonstances diverses.

La suggestion que l'effet anticoagulant pourrait être réalisé par "**défibrination thérapeutique**" en éliminant totalement le fibrinogène de la circulation au moyen d'une protéine ophidienne thrombine-like a été faite la première fois en 1968. Un extrait du venin d'*Agkistrodon Rhodostoma* a alors été isolé, épuré puis rendu disponible pour l'usage thérapeutique. L'enzyme utilisée est l'ancrod (Viprinex® (anciennement Arvin®), Knoll). Par la suite, un extrait du venin de *Bothrops atrox* fut utilisé, la batroxobine (Défibrase®, Pentapharm) [43]. La défibrinogénération thérapeutique avec des enzymes ophidiennes a été essayé pour traiter des maladies d'occlusion artérielles périphériques dans lesquelles la revascularisation chirurgicale ne pouvait pas être réalisée de manière satisfaisante [101].

Les enzymes de défibrinogénération isolées des venins ophidiens et jusqu'à présent développées ont montré quelques résultats positifs, mais il est généralement difficile de fournir les interprétations conclusives de leur utilisation médicale [31]. La limite de ce type de traitement pourrait être une genèse d'anticorps dirigés contre l'enzyme, souvent de haut poids moléculaire, lors d'une administration prolongée de celle-ci. Ce risque est désormais limité par le large éventail d'enzymes thrombinique ayant une faible parenté immunologique.

Plusieurs de ces enzymes thrombiniques font actuellement l'objet d'essais cliniques prometteurs dans différents pays (Etats-Unis, Chine et Brésil). Les enzymes les plus étudiées sont celles du venin de *Bothrops atrox* avec la batroxobine et la thrombocytine (batroxobin, reptilase), *Callosellasma rhodostoma* (ancrod) et *Agkistrodon c. contortrix* [43] [135].

Parmi les enzymes thrombine-like, 3 sont en cours d'investigation et représente un grand intérêt pour les applications médical :

- La batroxobine du venin de *Bothrops atrox* et *B. moojeni*.
- L'ancrod du venin de *Callosellasma rhodostoma rhodostoma*.
- La crotalase du venin du crotale oriental *Crotalus adamantus*.

Les fractions purifiées d'ancrod, de batroxobine et de crotalase possèdent des propriétés coagulantes, protéolytiques et estérolytiques. Bien que leur principal mécanisme d'action soit un effet protéolytique sur le fibrinogène circulant [186]. De nombreuses autres enzymes thrombine-like ont été découvertes dans les venins de serpent, mais n'ont pas encore subi de test thérapeutique-type (shedaonase, agacutase, Cdc SI et Cdc SII) [31].

### **b. Outils de diagnostic.**

Les enzymes thrombiniques (thrombine-like) des venins de Viperidae permettent d'explorer la fibrinofomation, temps de formation du caillot, grâce à la transformation du fibrinogène en fibrine, dans certaines circonstances pathologiques. Les enzymes thrombines-likes ne sont pas inhibés par les inhibiteurs de sérine-protéase classiques, les inhibiteurs de thrombine endogène (antithrombine III) ou l'inhibiteur de thrombine exogène (hirudine). Elles ont l'avantage de ne pas être inhibé par l'héparine, ce qui les rend très utile dans la réalisation de tests de mesures de la coagulation sanguine sur des échantillons de plasma de patients sous héparine [31] [135].

Le défaut de coagulation peut être lié :

- A un taux insuffisant de fibrinogène.
- A une anomalie qualitative du fibrinogène, congénitale ou acquise [172] [31].

La batroxobine et probablement plusieurs autres enzymes de venin de serpent coagulant le fibrinogène peuvent être utilisés pour la détermination quantitative de fibrinogène dans plasma (voir temps de Reptilase).

### **3. Batroxobine.**

La batroxobine est une enzyme thrombine-like, qui a été isolé du venin des vipères sud-américaines du genre *Bothrops*. Celles extraites du venin des espèces *Bothrops Atrox* et *B. moojeni* ont été les plus étudiés [31].

Cette enzyme protéolytique analogue à la thrombine est une sérine-protéase qui exerce une action spécifique sur le fibrinogène. Mais contrairement à la thrombine qui scinde le fibrinopeptide A et B du fibrinogène, la batroxobine clive uniquement le fibrinopeptide A. Elle

n'a de plus aucun effet sur les plaquettes ou les autres facteurs de la coagulation. Administrée in vivo pour créer un état d'hypercoagulabilité passager, il n'a été observé aucun changement de la numérotation plaquettaire, temps de saignement, fragilité capillaire, temps de prothrombine ou changement du taux de fibrinogène [7]. A l'inverse de la thrombine, la batroxobine n'est pas inhibée par l'héparine, les héparinoïdes, l'antithrombine, l'hirudine, l'aprotinine ou les médicaments antifibrinolytiques.

La batrotoxine a trouvé de nombreuses applications en tant qu'outil pour la recherche (exploration de la fibrinoformation par exemple) et outil de diagnostic de la coagulation sanguine. Cela en raison de sa spécificité sur le fibrinogène, sa capacité à coaguler un plasma riche en plaquettes sans affecter l'intégrité ni la fonctionnalité des plaquettes, et en raison de son insensibilité aux inhibiteurs de la thrombine. La batroxobine peut être, utilisé pour tester le système contractile des plaquettes. En outre, la batroxobine est utilisé pour la défibrinogénéation du plasma. En thérapeutique, elle est utilisée aux Etats Unis et surtout en Chine) pour le traitement de beaucoup de troubles thrombotiques notamment pour le traitement de l'attaque ischémique aiguë, des accidents vasculaires cérébraux, des embolies pulmonaires, des thromboses veineuses, des infarctus du myocarde et des saignements péri-opératoires.

Il est important de différencier les différentes formes de batroxobine. Il existe actuellement trois formes de batroxobine isolées du venin de *Bothrops atrox moojeni*, deux utilisées comme agents thérapeutiques pour traiter la thrombose vasculaire et une comme outil de diagnostic :

- **La batroxobine**, commercialisée sous le nom de **Défibrinase®**, **Défibrol®**, **D-Fibrol®** et initialement **Reptilase-Def ®**. D'action thrombinique, elle est utilisée dans des situations nécessitant une défibrination ou l'élimination de la plasmine avant un traitement fibrinolytique.
- L'hémocoagulase Klobusitzky, sous le nom commercial de Reptilase® ou Botropase®.
- **Le F. T. H, Reptilase-R ND**, une fraction thrombinique du venin de *Bothrops atrox moojeni*, réactif de laboratoire employé pour déterminer le temps de Reptilase, qui permet globalement, même en présence d'héparine d'explorer les premières phases de la fibrinoformation. La batroxobine est alors utilisée pour étudier la coagulation sur le sang du patient en présence d'héparine et du temps de prothrombine en l'absence de thrombine ou encore pour surveiller les niveaux de fibrinogène chez les patients sous héparine [31] [129] [187].

## **a. Batroxobine comme agent thérapeutique.**

### **a. 1- Défibrinase®.**

La batroxobine commercialisé sous le nom de Défibrinase®, Défibrol® ou D-Fibrol® est actuellement utilisé pour diminuer le taux de fibrinogène. Cet agent antithrombotique sélectif est employé sur les thromboses veineuses périphériques et profondes, et les maladies artérielles. Non approuvée par la FDA (Organisme de certification des aliments et des médicaments des États-Unis), cet agent n'est donc actuellement disponible qu'à l'extérieur des USA [101] [31].

La batroxobine contient 12 résidus cystéines formant 6 ponts disulfures. Son site catalytique correspond à trois acides aminés originaires d'exons différents : His41, Asp86 et Ser178 [31]. Elle exerce son action par le clivage entre les résidus Arg16 et Gly17 de la chaîne  $\alpha$  du fibrinogène libérant uniquement le fibrinopeptide A et permettant en parallèle la libération de fibrine I qui stimule les activateurs de plasminogène de l'endothélium vasculaire et active la protéine C. In vivo, le polymère de fibrine friable formé est rapidement dégradé par le système fibrinolytique et éliminé par le système réticulo-endothélial. La friabilité de la fibrine formée par la batroxobine écarte donc tout risque de thrombose vasculaire. Le taux de fibrinogène abaissé par consommation et les effets anticoagulants de la plasmine et de la protéine C vont de plus réduire la viscosité du sang et par conséquent les risques thromboemboliques. La réduction de la viscosité de sang est dépendante de la dose de batroxobine injecté employée [43] [172].

### **a. 2- Reptilase® (Hemocoagulase) Bothropase®.**

Reptilase® est un médicament directement issu du fractionnement de venin *Bothrops atrox moojeni*. Le principe actif retenu est appelé **hémocoagulase de Klobusitzky** (DCI), du nom de l'auteur qui l'isole pour la première fois en 1936, du venin de *Bothrops jararaca* [186].

Reptilase® est un complexe protéique constitué de 2 fractions :

- **Une fraction thromboplastinique** (métalloprotéase à zinc, 65000Da) indépendante du calcium et qui, en présence des facteurs V, X et du facteur plaquettaire III, transforme la prothrombine en thrombine [43].
- **Une fraction thrombinomimétique (batroxobine)** insensible à l'antithrombine III et l'héparine, libérant uniquement le fibrinopeptide A à partir du fibrinogène [187].

Reptilase® possède plusieurs activités enzymatiques pro coagulantes et entraîne une diminution du temps de coagulation (TC). Elle agit à deux niveaux :

- **Au niveau des plaquettes : Reptilase® normalise ou augmente leur adhésion** ce qui permet ensuite leur agrégation. Pour certains auteurs, elle augmente directement l'agrégation thrombocytaire. Elle aurait ainsi un effet bénéfique vasoconstricteur sur les capillaires par la libération de sérotonine et d'adrénaline contenues dans les plaquettes après leur agglutination. Ainsi, en favorisant la formation d'un clou hémostatique plaquettaire, **l'effet de la Reptilase se traduit déjà in vivo par la réduction du temps de saignement (T.S.)** [43] [187].
- **Au niveau de la fibrinoformation**, l'hémocoagulase conduit à la formation du complexe enzymatique prothrombinase. Cela est dû à son activité thromboplastinique qui active les facteurs VII et X, en la présence indispensable du facteur III plaquettaire, et augmentant l'activité du facteur V.

D'autre part, sa fraction thrombomimétique (la batroxobine), présente en faible quantité dans le complexe médicamenteux, libère uniquement le fibrinopeptide A à partir du fibrinogène, à la différence de la thrombine qui sépare les fibrinopeptide A et B. Les des-Afibrinomonomères forment avec le fibrinogène un complexe qui ne coagule pas. Il faut attendre la saturation des capacités de complexation du fibrinogène pour qu'il y ait la formation d'un caillot non rétractile. Formation qui nécessite la présence, même en faible quantité, du facteur stabilisant de fibrine (XIII) (produit sous l'action de la thrombine) [43].

Cette préparation hémostatique était utilisée depuis le début des années 50 dans différentes branches de la médecine [187]. **Commercialisé en France et figurant dans le Vidal, ce médicament a récemment été retiré de la vente le 12 janvier 2016. Reptilase® était proposé comme agent hémostatique dans le traitement symptomatique des hémorragies chirurgicales en per- ou post- opératoire, des hémorragies (spontanées ou non) médicales diverses (épistaxis, hémoptysie, hémoptysie, hématomèse, hématurie, ménométrorragies), non liées à un déficit en facteur de la coagulation et/ou un allongement isolé du temps de saignement** [188].

Conditionné sous forme d'ampoule de 1 ml, Reptilase® s'administrait par voie IV, IM, SC ou local (sous forme d'aérosol pour les hémorragies respiratoires), à la posologie d'une à trois ampoule(s) par 24h pour un adulte et d'une demie à une ampoule par jour pour un enfant de

plus de 3 ans. Chaque ampoule contenant 1 unité de Klobusitzky c'est-à-dire la quantité d'enzyme qui coagule 5 cm<sup>3</sup> de sang frais de cheval, décalcifié, in vitro, en l'espace de 10 minutes à 22°C ou 0,3 unité NIH, unité définie par le National Institute of Health, mesurant l'effet thrombinomimétique.

Etant donné que ce médicament était issu du venin de serpent, il est important de spécifier qu'il y avait possibilité de production d'anticorps, mais à des doses très largement supérieures aux doses thérapeutiques (10 fois environ) ce qui explique sa remarquable tolérance clinique.

Il n'existe d'ailleurs peu de contre-indications. Ce médicament était notamment non indiqué dans les cas de syndrome hémorragique : coagulation intravasculaire disséminé (CIVD), hémophilie, thrombopénies, thromboasténies sans thrombopénie, allongements du T.S. sans thrombopénie mais avec trouble de la coagulation. En cas exceptionnel de manifestation allergique ou le traitement était interrompu [43] [187].

#### **b. Batroxobine comme outil de diagnostic, Reptilase® :**

##### **« Temps de Reptilase®.**

Commercialisée sous le nom de Reptilase®, la batroxobine permet de déterminer la concentration et la qualité du fibrinogène d'un patient ou de détecter la présence d'un inhibiteur de la fibrinoformation, cela même lorsqu'il est traité avec un anticoagulant [20]. Elle a donné naissance à un test hématologique appelé « Reptilase-Time » ou « temps de Reptilase ». Le réactif Pefakit® Reptilase® Time contenant une quantité standard de batroxobine.

Le temps de Reptilase est le temps de coagulation d'un plasma citraté en présence de Reptilase® [189]. C'est un test chronométrique simple et automatisable, qui explore la fibrinoformation, c'est à dire la transformation du fibrinogène en fibrine [190].

**Le test de coagulation Reptilase Time représente en réalité une alternative simple à la mesure du temps de thrombine.** En effet, le temps de thrombine mesure la vitesse de coagulation du sang dans certaines conditions bien précises. Il évalue la formation de fibrine et est utile au diagnostic de certaines anomalies de la coagulation, notamment en cas d'hémorragies importantes mal contrôlées. La reptilase quant à elle, mime la thrombine, en activant la coagulation selon un mécanisme voisin. Mais **contrairement à la thrombine, elle n'est pas sensible aux mécanismes régulateurs de la coagulation et, est capable de**

**provoquer la transformation du fibrinogène en fibrine sans être affecté par la présence de médicaments à activité antithrombotique, tels que les héparines, l'hirudine, l'antithrombine III, l'aprotinine, etc.** [190] [189]. La reptilase permet donc d'obtenir une coagulation sanguine et d'en mesurer la vitesse dans le but de détecter un défaut de polymérisation de fibrine chez un patient, et ce alors même que celui-ci est sous traitement anticoagulant [48] [189]. **Contrairement au temps de thrombine, le temps de Reptilase est donc normal sous héparine (ou autres traitements antithrombotiques) mais est allongé en cas d'anomalie congénitale du fibrinogène, de présence de produits de décomposition du fibrinogène (PDF) ou d'agents fibrinolytiques** [46] [135] [191].

Le temps de Reptilase est toujours effectué en parallèle avec le temps de thrombine. En présence d'un allongement du temps de thrombine, le temps de Reptilase permet alors de préciser si ce phénomène est dû ou pas à la présence d'antithrombine. Un temps de thrombine prolongé avec un Temps de Reptilase normal peut par exemple indiquer la présence d'héparine dans le sang [189].

De même, les produits de décomposition du fibrinogène (FDP) prolongent le temps de Reptilase par leur influence sur la polymérisation de la fibrine. Ainsi, combiné au temps de thrombine, le test de routine « Reptilase Time » peut être utilisé pour la **détection de FDP et la différenciation entre les perturbations de la synthèse de fibrine et l'influence d'héparine et d'héparinoïdes** [135].

Associé au temps de thrombine, le temps de Reptilase permet l'exploration des anomalies qualitative du fibrinogène [190]. La comparaison de l'allongement du temps de thrombine et du temps de reptilase permet de **poser le diagnostic différentiel entre une hypo- ou dysfibrinogénémie dû à une maladie hépatique ou la présence d'une antithrombine (héparine)**. Par exemple : En présence d'une hypofibrinogénémie, l'addition du fibrinogène à l'échantillon corrige le temps de reptilase allongé. Si cela ne se produit pas et que des PDF peuvent être éliminés par un test basé sur des anticorps, un défaut de polymérisation de fibrine est alors confirmé par exemple dans la maladie de Kawaguchi [43].

Le temps de reptilase est exprimé en seconde ou sous forme de ratio par rapport temps de coagulation d'un plasma témoin normal [190]. Le temps de thrombine témoin normal est compris entre 15 et 20s, il est allongé (> 1min) lorsque se produit une hypo ou dysfibrinogénémie ou lorsqu'il se trouve dans le plasma une antithrombine. Il permet ainsi de

vérifier que l'allongement observé n'est pas dû à l'un des traitements qui n'aurait pas été signalé par le patient et d'orienter le diagnostic vers une anomalie de la coagulation (afibrinogénémie ou hypofibrinogénémie, problème de polymérisation de la fibrine (myélome, anticorps anti-fibrinogène), hyperfibrinolyse, maladie hépatique, CIVD ...). Ce test est donc réalisé le plus souvent en deuxième intention chez des personnes présentant des saignements plus ou moins importants [43].

### **c. Batroxobine comme suture biologique.**

La thrombine est utilisée en chirurgie comme suture biologique pour obtenir l'adhésion de deux surfaces cellulaires. L'action catalytique de la thrombine sur le fibrinogène permet la polymérisation *in situ* de la fibrine avec les protéines tissulaires. Les risques de contamination de la thrombine naturelle font préférer les enzymes thrombiniques de venin de Viperidae [172] [99].

On sait depuis un certain temps que des mélanges de fibrinogène et de thrombine peuvent être appliqués sur des plaies, telles que des plaies ouvertes d'une personne, pour fermer la plaie, arrêter le saignement et empêcher que d'autres substances, comme des agents infectieux, pénètrent dans la plaie. La fibrine est un agent de scellement tissulaire bien connu qui est fabriqué à partir d'une combinaison d'au moins deux composants principaux, le fibrinogène et la thrombine. Lorsqu'ils entrent en contact l'un avec l'autre, le fibrinogène et la thrombine interagissent pour former un agent d'étanchéité tissulaire, la fibrine.

La "colle de fibrine" peut être employée dans presque toutes les disciplines chirurgicales, en application directe sur les tissus, et cela dans trois buts :

- Pour contrôler le saignement diffus dans les organes parenchymateux (foie, rein, rate, pancréas), les saignements de grandes surfaces et les saignements locaux chez les patients présentant une diathèse hémorragique (extraction dentaire).
- Pour la jonction des surfaces de résection des organes parenchymateux, pour renforcer les sutures incertaines et pour réduire le besoin d'une seconde suture
- Pour avoir un effet curatif sur la blessure, dans la gestion de l'ulcération de la peau, de la nécrose et de la transplantation [43].

### c. 1- Le Vivostat®.

La batroxobine extraite du venin de la vipère fer de lance sud-américaine *Bothrops moojeni* est également utilisée comme suture biologique ou « colle de fibrine » sous le nom de Vivostat®. Le Vivostat® System est utilisé en chirurgie depuis 1995 comme colle biologique. Vivostat® est un dispositif médical innovant entièrement automatisé qui permet d'obtenir 4 à 6 ml de colle de fibrine à partir de 120 ml de sang du patient. La préparation de fibrine autologue humaine (c'est-à-dire fabriqué à partir du propre sang du patient) est réalisée en 23 minutes en pré- ou per-opératoire [192]. La batroxobine est mise à incuber avec le plasma du patient où elle amorce le processus biochimique en agissant sur le fibrinogène. Le caillot de fibrine formé est d'abord débarrassé de la batroxobine (à pH acide), puis remis en solution (à tampon neutre) pour être appliqué sur la plaie où la polymérisation est immédiate. Ce type de suture biologique présente l'intérêt d'être reproductible, diffus, résistant, rapide, résorbable et propre [99]. Selon le rapport du CEDIT (Comité d'Evaluation des Technologies de Santé) de 2006 et les recommandations de la HAS de 2011, le Vivostat® présentait une polymérisation de la fibrine plus rapide et efficace, une plus grande adhésion instantanée et une meilleure élasticité in vitro que d'autres colles de fibrine d'origine humaine [192]. Peu de données ont été publiées depuis l'avis du CEDIT de 2006 et depuis l'avis de la HAS (Haute Autorité de Santé) de 2011 sur les hémostatiques chirurgicaux même si l'intérêt du vivostat® a été réévalué par le CEDIT en 2014 [193]. Selon l'analyse réalisée par le CEDIT, Vivostat® présente des avantages mais également des inconvénients par rapport aux autres colles de fibrine. **Les principaux avantages du Vivostat® sont son automatisation et la fabrication de fibrine « autologue ».** Le caractère autologue est avancé comme argument majeur pour l'utilisation du Vivostat® (il permet une excellente biocompatibilité et l'absence de composant d'origine animale ou de thrombine exogène permet d'éliminer la source d'un risque d'infection virale ou d'une réaction immunitaire), cependant aucun élément scientifique n'est actuellement disponible pour le justifier.

**Aspect médical :** Les études montrent que l'utilisation des colles de fibrine apporte un gain modeste en termes d'aérostase et d'hémostase. La réduction de la perte sanguine moyenne lors d'une opération chirurgicale étant de 160ml, le gain net du Vivostat® serait donc d'environ 40 ml seulement. Peu de données sont actuellement disponible et aucune étude comparative n'apporte d'élément pouvant montrer une supériorité de Vivostat® en termes d'efficacité ou de tolérance par rapport aux autres colles de fibrine. D'un point de vue clinique, le Vivostat® semble moins bien évalué que les autres colles de fibrine, tant au niveau européen que national.

*Aspect médico-économique* : L'équipement nécessaire à la préparation de la colle autologue Vivostat® mobiliserait environ 40 000 euros (24 000 dans le rapport du CEDIT de 2006). Et chaque kit à usage unique coûterait entre 400 et 450 euros (360 à 440 dans le rapport du CEDIT de 2006). En l'état actuel des données médicales, tout coût supérieur de Vivostat® par rapport aux autres colles de fibrine serait le signe d'un rapport coût-efficacité défavorable.

*Aspect organisationnel* : L'utilisation au bloc opératoire de Vivostat® implique la présence et l'entretien des différents appareils nécessaires directement et indirectement (stérilisation), processus plus complexe que le stockage et l'utilisation des autres colles de fibrine ayant un statut de médicament et qui sont pratiquement prêts à l'emploi.

L'intérêt médical, médico-économique et organisationnel de ce dispositif médical n'est donc actuellement pas avéré. Le Vivostat® ne bénéficie pas de statut de médicament et n'est pas approuvé par la FDA. Malgré tous ces avantages, et en raison de son coût bénéfice/risque la batroxobine est délaissée au profit d'autres colles biologiques. Néanmoins, s'agissant d'un produit considéré comme potentiellement intéressant par les chirurgiens, le CEDIT considère que l'utilisation Vivostat® devrait être rendue possible à l'AP-HP, à condition qu'elle se fasse dans le cadre d'une étude clinique comparative randomisée, ou à défaut d'une cohorte avec témoins historiques ou contemporains. Par ailleurs, il s'agit d'un produit dont la production doit être anticipée. A l'AP-HP, Vivostat® a été utilisé ces dernières années par deux hôpitaux (Pitié et HEGP), chez une dizaine de patients par an tout au plus [194] [195] [196]

### **c. 2- SB50 : Pansement hydrogel intégrant la batroxobine.**

Les scientifiques de l'Université de Rice ont combiné un dérivé du venin avec leurs hydrogels injectables sur lequel ils travaillent pour créer un nouveau matériau. Il s'agit du premier (pansement hydrogel) qui utilise une combinaison de nanofibres et infusé de batroxobine. Injecté, les nanofibres se rassemblent en un gel, en se conformant au site de la plaie, la gardant fermée arrêtant le flux de sang en quelques secondes. Lors de tests sur des rats en laboratoire, les chercheurs ont constaté que ce nouveau matériau nommé « SB50 » peut soumettre les saignements très rapidement en temps record de six secondes.

SB50 possède un grand potentiel pour arrêter le saignement chirurgical, en particulier dans les cas difficiles des patients sous héparine ou autres anti-coagulants. Il nécessitera l'approbation de la FDA (Food and Drug Administration) avant de pouvoir être testé dans les essais cliniques. (Plusieurs années de tests sont à prévoir avant toute utilisation clinique.) [197].

#### 4. Ancrod (Viprinex®).

L'Ancrod extrait du venin du crotale de Malaisie *Calloselasma rhodostoma*, utilisé depuis longtemps comme agent hémostatique sous le nom commercial **d'Arvin®** ou **d'Arwin®**, est aujourd'hui proposé comme agent **antithrombotique commercialisé sous le nom de Viprinex®**. En effet, après la courte phase de coagulation, les enzymes thrombiniques favorisent la disparition des facteurs de l'hémostase et les processus de régulation entraînant une période d'incoagulabilité durable [99]. Le médicament est utilisé dans **la prévention** et le **traitement de maladies occlusives vasculaires** [101]. L'injection intraveineuse ou sous-cutanée d'ancrod (Viprinex®) chez l'homme, cause une réduction spécifique, dose-dépendante du fibrinogène dans le plasma (hypofibrinogénémie) et le sang devient incoagulable.

L'ancrod est composé de 234 acides aminés avec 5 sites de glycosylation confirmé, 6 ponts disulfures et des résidus catalytiques fonctionnels conservés (Ser43, Asp88 et Ser182). Cet arrangement est semblable à celui de la batroxobine, avec une identité de 58 %. Une différence intéressante entre les deux molécules est la présence d'un 13<sup>ème</sup> résidu de cystéine supplémentaire (Cys180) dans l'ancrod près de la sérine 182, offrant une éventuelle capacité pour une dimérisation [31].

##### a. Mécanisme.

**L'ancrod est une enzyme de défibrination.** Elle possède une activité anticoagulante importante par destruction direct du fibrinogène. L'ancrod produit son effet anticoagulant en convertissant le fibrinogène plasmatique en une forme instable de fibrine qui est alors rapidement éliminée de la circulation. La réduction de la fibrinogénémie est rapide quelques heures. Cette défibrination réduit la concentration de fibrinogène circulant sans produire d'occlusion vasculaire.

L'ancrod appartient au premier groupe des enzymes thrombiniques, elle clive spécifiquement le fibrinopeptide A du fibrinogène pour produire une fibrine non stabilisée par le FXIII et rapidement lysée par le système fibrinolytique et les cellules réticulo-endothéliales [46] [43].

L'ancrod ne semble pas affecter directement les autres facteurs de coagulation, mais le niveau élevé de produits de dégradation de la fibrine pendant la période d'induction peut altérer de manière transitoire la fonction plaquettaire. Le clivage du fibrinogène empêche la formation de caillots stable, réduit la viscosité du sang et augmente le flux sanguin vers les régions ischémiques.

### **b. Essais clinique test.**

L'Ancrod a fait l'objet de nombreuses études cliniques et a été testé pour le traitement de diverses maladies thrombotiques comme les accidents vasculaires cérébraux (AVC), la thrombose veineuse profonde, la thrombose de veine rétinienne ou la thrombose artérielle, ainsi que pour son utilisation au cours de la circulation extra-corporelle (CEC) [198] ou encore lors de l'anticoagulation des patients porteurs de thrombopénie induite à l'héparine. L'Ancrod a également été administrée en prophylaxie pour réduire l'incidence de la thrombose veineuse profonde postopératoire et la réapparition de la thrombose après chirurgie vasculaire [46] [43].

Des études suggèrent que l'Ancrod puisse être utilisée thérapeutiquement sans risque chez les patients présentant un syndrome de thrombocytopenie induite par l'héparine ou de thrombose ou comme une alternative à l'héparine en pré-opératoire pour la prévention de thrombose lors d'une déviation cardio-pulmonaire [199] [198] [43]. Malgré l'absence de réaction croisée avec l'héparine, on réserve en revanche l'Ancrod comme alternative au danaparoiide pour plusieurs raisons : Son coût est plus élevé, une administration lente est nécessaire pour éviter la formation d'un microthrombus intravasculaire, elle n'inhibe pas et peut même augmenter la formation de thrombine et de microthrombine chez les patients présentant une TIH, lors d'une utilisation prolongée des anticorps peuvent se développer et une résistance peut survenir, à l'inverse du danaparoiide la diminution du fibrinogène par l'ancrod est difficilement prévisible d'un patient à l'autre [43].

Des résultats positifs de l'utilisation de l'Ancrod ont été notés avec l'étude d'Ina examinant les effets de l'Ancrod sur l'insuffisance circulatoire. L'étude a montré que l'Ancrod ne doit pas être utilisé à long terme à cause des complications hémorragique, mais pourrait être utile pendant les périodes où une fluidité sanguine accrue est nécessaire, comme lors d'une cicatrisation après l'amputation d'un membre par exemple [31].

L'Ancrod a été examiné comme traitement de l'attaque ischémique, avec des résultats équivoques pour la durée des essais cliniques multiples. Les études initiales ont montré que le traitement d'Ancrod administré à des victimes d'attaque ischémique abouti à une amélioration de leur mobilité après 3 mois. Ces résultats positifs ont mené des études à plus grande échelle. Dans la première étude de suivi, les patients recevant Ancrod avaient réduit leur niveau de plasminogène, mais il n'y avait aucune différence entre eux et ceux recevant le placebo en termes de score d'échelle d'attaque neurologique. Pour les patients avec des niveaux fibrinogène au-dessous de la moyenne du groupe traité le score d'échelle d'attaque était significativement meilleur que le placebo. En général les principales complications hémorragiques n'ont pas été observées. Bien que les résultats soient encourageants, ils n'étaient pas conclusifs et la taille d'étude était relativement petite [31].

L'Ancrod est un agent de reperfusion prometteur pour le traitement de l'AVC ischémique aiguë qui semble avoir une certaine efficacité dans les accidents vasculaire cérébraux pris précocement. L'efficacité et la sécurité de l'Ancrod a été évalué chez (495 patients atteints d'AVC aigu ischémique dans l'étude « STAT » (Stroke Treatment with Ancrod Trial), un essai randomisé réalisé en double aveugle, contrôlé par placebo mené entre août 1993 et janvier 1998. Dans cette étude, l'ancrod avait un profil bénéfice/risque favorable [200]. Les résultats, évalués à court et long terme, ont révélé que le traitement par Ancrod abouti à une amélioration de la qualité et de l'espérance de vie et à la baissent des coûts médicaux contre placebo. La différence étant principalement attribuable aux implications à long terme, c'est-à-dire au rôle de l'Ancrod dans la réduction de l'invalidité. Conclusions, même modérément efficace (42% des patients recevant ancrod ont obtenu un résultat favorable par rapport à 34% des témoins), l'impact net au niveau de la population des traitements d'AVC peut être substantiel. L'Ancrod reste rentable d'un point de vue à la fois médicale et économique [201]. D'autres études cliniques (2006) ont indiqué que l'utilisation d'Ancrod pendant les 3 premières heures de l'attaque avait un avantage léger sur le placebo [202].

Sur ces résultats prometteurs, des essais cliniques de phase 3 randomisés en double aveugle contrôlés par placebo nommés « ASP-II : Ancrod Stroke Program » ont été entrepris sur 1222 patients atteints d'AVC ischémique aigu pour confirmer l'efficacité de l'Ancrod (Viprinex®) lorsqu'il est utilisé dans les 6 h suivant l'apparition d'un accident vasculaire cérébral. Le but principal de cette étude était de déterminer si une brève perfusion intraveineuse d'Ancrod administré dans les 6 heures suivant l'apparition d'un AVC améliore le résultat fonctionnel des patients à 3 mois. Le résultat des patients, 90 jours après un AVC ischémique aigu, ont été évalué en comparant le traitement par Viprinex® au traitement par placebo. Aucune différence cliniquement significative entre les deux groupes n'a été mesurée sur l'échelle d'évaluation globale de handicap Rankin, critère principal d'évaluation de l'étude. Cet essai a été interrompu en 2008 aucun bénéfice (amélioration sur le handicap 90 j après traitement) n'ayant été observé par rapport au placebo [129].

L'ensemble de toutes les études cliniques réalisé indique que la récurrence des attaques, la dépendance et la mort ont été réduites avec l'utilisation d'Ancrod. Cependant plus de données sont nécessaires pour déterminer les tendances globales de l'utilisation d'Ancrod. Beaucoup d'études ont jusqu'à présent des facteurs confondants qui écartent toutes conclusions définitives. Il est possible que l'Ancrod ne puisse pas être utilisé comme un traitement général pour toutes les victimes d'attaque ischémique, mais qu'il trouve son utilisation thérapeutique seulement dans certaines indications précises. En effet, une hypothèse que le blocage secondaire de la micro-vascularisation du cerveau peut représenter un certain effet indésirable de l'Ancrod [31].

## **5. Les autres enzymes thrombiniques.**

### **a. Crotalase.**

La crotalase est une enzyme thrombine-like extraite du venin de *Crotalus adamanteus*. Elle appartient à la famille des sérine-protéases. Sa structure globale et son ordre de séquence d'acide aminé ont été rapporté. Cette enzyme a été examinée pour sa fonction de coagulation. Des études in vitro sur plasma humain et in vivo sur des animaux ont été menées. La crotalase coupe seulement le fibrinopeptide A du fibrinogène et dégrade lentement la chaîne  $\beta\text{B}$  produisant des fragments plus petits. Il a été rapporté que la crotalase possède aussi une activité Kallikrein-like. Cependant, il n'a pas encore été examiné d'effets thérapeutiques humains [31] [203] [204].

### **b. Thrombocytine.**

La thrombocytine est une autre enzyme thrombine-like issue du venin de *Bothrops atrox*. C'est une sérine-protéinase (36kDa) qui exerce un **très faible effet coagulant sur le fibrinogène**. Elle dégrade progressivement la chaîne alpha du fibrinogène et clive la prothrombine activant la thrombine. **Elle active aussi les facteurs FV, FVIII et FXIII**, les thrombocytes ce qui **déclenche l'agrégation plaquettaire et des réactions de sécrétion** (libération de la sérotonine plaquettaire). Elle interagit également avec l'endothélium vasculaire [3] [205] [206] [207].

La thrombocytine a été utilisée comme outil biologique pour comprendre les fonctions plaquettaires [207] et les aspects moléculaires de l'activation des facteurs XIII et V, afin d'élucider le mécanisme de relâchement des coronaires dépendant de l'endothélium [208].

Du fait de sa faible activité coagulante, la thrombocytine pourrait être utilisée comme un substitut de thrombine dans un plasma dans lequel il ne faut pas qu'il se forme de thrombus. Puisqu'elle n'est pas inhibée par l'hirudine, cette enzyme peut aussi présenter un intérêt tout spécial comme réactif pour l'évaluation de la fonction plaquettaire dans le plasma de patients traités par cet anticoagulant [43]. **La thrombocytine permet également de diagnostiquer une défaillance de l'agrégation plaquettaire ou une anomalie constitutionnelle de la membrane.**

### **c. Acutine.**

L'acutine est une enzyme thrombine-like hémocoagulase extrait du venin du mocassin chinois *Deinagkistrodon acutus*. Elle est actuellement examinée pour sa fonction de coagulant lors de l'utilisation dans la diminution du temps de coagulation lors d'incision chirurgical [31].

#### d. Gyroxine.

La gyroxine (28kDa) appartient est une enzyme thrombine-like, sérine-protéase, isolée à partir du venin du serpent à sonnette *Crotalus durissus terrificus*. Cette enzyme a fait l'objet de récentes études et peut être un modèle moléculaire intéressant pour le développement d'agents thérapeutiques. Elle a été étudiée in vivo chez des animaux et possède plusieurs activités dont une action pro-coagulante fibrinolytique, induction de l'agrégation plaquettaire, vasodilatation et neurotoxicité certainement dû à une augmentation de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique qu'elle provoque. Les mécanismes impliqués dans cette activité neurotoxique ne sont actuellement pas bien connus et l'identification du mécanisme d'action de la gyroxine est extrêmement important pour son développement thérapeutique [209] [210] [211] [212].

#### e. Grambine.

La gramine (45,4 kDa) est une sérine-protéase de type thrombine-like isolée à partir du venin de *Trimeresurus gramineus*. Les dix acides aminés NH<sub>2</sub> terminal présentent une forte homologie avec d'autres enzymes venimeuses de type thrombine.

Grambin coagule le fibrinogène humain avec une activité spécifique. Il libère préférentiellement le fibrinopeptide A accompagné d'une libération lente de quantité trace de fibrinopeptide B.

L'EDTA, l'aprotinine, l'hirudine et l'héparine n'affectent pas l'activité de coagulation du fibrinogène de gramine. De plus, elle a provoqué **une défibrinogénéation** et a montré un **effet antiplaquettaire marqué lorsqu'elle a été administrée par voie intraveineuse à des souris**. Elle a également considérablement prolongé le temps de formation de thrombus riches en plaquettes dans les veinules mésentériques irradiées de souris traitées par fluorescéine sodique.

Ainsi, gramine peut être utilisé comme agent thérapeutique non seulement dans le traitement de la thrombose veineuse mais également dans la prévention de la thrombose artérielle [213] [138].

#### **d) Les agents antifibrinolytiques (inhibiteur de plasmine).**

En plus de leur capacité de dissoudre des caillots, beaucoup de toxines de venin de serpents ont la capacité de maintenir la présence de caillots en agissant sur la plasmine, le facteur principal responsable de la dissolution de caillots sanguins [31].

##### **1. Textilinin-1 (Q8008).**

La Textilinin-1, l'un des deux isoformes de la textilline, est un inhibiteur de serine-protéase de type Kunitz extraite du venin du serpent brun australiens *Pseudonaja textilis* [214]. **Ce puissant et sélectif inhibiteur de plasmine peut être utilisé comme un agent anti-fibrinolytique pour réduire la perte de sang associée aux chirurgies complexes** [182].

Textilinin-1 est développé sous le surnom de « Q8008 » comme une alternative à l'aprotinine un inhibiteur de la plasmine bovine commercialisé sous le nom de Trasyol®. Ce médicament anti-fibrinolytique était largement utilisée en chirurgie pour arrêter les hémorragies, cependant les effets non spécifiques de l'aprotinine, sa tendance à s'accumuler dans les reins et son utilisation présentaient un risque accru d'attaque cardiaque et d'insuffisance rénale. En conséquence la commercialisation du médicament pharmaceutique de l'aprotinine (Trasyol®) a été suspendue en 2008 (récemment remis sur le marché janvier 2018).

Le Q8008 recombinant est constitué d'une structure semblable à l'aprotinine [31]. Il y a 47% d'homologie entre les deux molécules. Le Q8008 possède un puissant effet sur la plasmine mais celui-ci est réversible. Des études réalisées en 2005 [215] et 2009 [216] ont révélées que la textilinin-1 semblait être un inhibiteur de plasmine plus spécifique que l'aprotinine. Comme l'aprotinine, la textilinine-1 a donné une inhibition presque complète (91%) de la fibrinolyse de caillots sanguins entiers induite par l'activateur de plasminogène tissulaire contre 99% pour l'aprotine. Le temps de thromboplastine partielle activée (aPTT) pour le plasma a été nettement augmenté par l'aprotinine, mais non affecté par la textilinine-1. Dans un modèle de saignement de la veine de queue de souris, la textilinine-1 intraveineuse et l'aprotinine ont provoqué des diminutions similaires dans la perte de sang, à la différence du temps d'hémostase chez les animaux traités avec la textilinine était significativement plus court que dans les souris traitées par l'aprotinine. La textiline-1 serait donc a priori plus efficace et plus rapide à agir. Sur la base

de ces données, la textilinine-1 mérite d'être approfondie comme alternative thérapeutique à l'aprotinine [215] [216].

Bien que des recommandations récentes aient été faites pour soulever la suspension d'aprotinine, les actions plus spécifiques de textilin-1 en font un composé intéressant pour le développement d'un futur médicament [31]. La Textilinine (Q8008) et son procédé de fabrication ont été brevetés en 2014 [217]. Ce candidat médicament hémostatique est actuellement en début de développement préclinique [182].

## **2) Les agents anti-coagulants.**

Des molécules issues des venins de serpents servent de modèles ou d'outils moléculaires dans le **développement d'agents antithrombotiques ou thrombolytiques** [46] dans le traitement des maladies vasculaires occlusives : thromboses (artérielles ou veineuses) et pathologies associés (Infarctus du myocarde aigue, AVC (accident vasculaire cérébrale), embolie pulmonaire...)

On peut classer ces molécules en 3 catégories en fonction de leurs mécanismes d'action :

- Les inhibiteurs directs de la thrombine.
- Les fibrinolytiques (ou fibrinogénolytique) direct.
- Les agents activateurs de la protéine C.

## a) Les inhibiteurs directs de la thrombine.

### 1. Bothrojaracine.

La bothrojaracine (27kDa), isolée du venin de *Bothrops jararaca*, est un puissant et sélectif inhibiteur de la thrombine [3]. Une étude réalisée en 2005 a montré qu'administré à une concentration de 1 mg/kg (iv) in vivo chez des rats atteints de thrombose veineuse on observe une diminution de 95% du poids du thrombus initial. Et une même dose offre une protection de 100% de la mortalité lorsqu'elle est administrée chez des souris atteintes de maladies thromboemboliques pulmonaires induite par la thrombine [218].

La bothrojaracine est **une lectine de type C** appartenant au groupe « snaclec » constituée de deux chaînes polypeptidiques distinctes de 13 et 15kDa reliées par des ponts disulfures. Elle exerce une inhibition sur la thrombine aussi bien libre que liée au caillot sanguin. Elle forme un complexe non covalent avec la thrombine- $\alpha$ . La liaison de la thrombine- $\alpha$  à la bothrojaracine immobilisée est de **haute affinité et implique au moins deux sites de la thrombine, les exosites I et II** nécessaires à l'interaction de celle-ci avec ses substrats macromoléculaires (fibrinogène, récepteurs plaquettaires, facteur V, thrombomoduline...) et ses inhibiteurs physiologiques (héparine, antithrombine III). **La bothrojaracine n'interagit donc pas avec le site catalytique de la thrombine mais bloque plusieurs de ses fonctions**, coagulation du fibrinogène, activation plaquettaire, liaison à la fibrine et à la thrombomoduline (protéine membranaire qui active la protéine C). La bothrojaracine réduit également l'activation de la protéine C par la thrombine- $\alpha$ .

Elle empêche l'association entre la thrombine- $\alpha$  et le fibrinogène. Elle entre en compétition avec l'héparine au niveau des deux sites de fixation membranaires des thrombocytes. Elle inhibe également l'activation du facteur V par les traces de thrombine formées à la phase initiale de la coagulation et limite ainsi la génération massive de thrombine [172] [219] [220] [221].

La bothrojaracine possède un mécanisme d'action original en interagissant avec les exosites I et II de la thrombine. Sa haute affinité pour la thrombine, sa liaison à la prothrombine, et sa capacité à inhiber la thrombine liée à la fibrine suggèrent que, transformée par génie génétique, la bothrojaracine pourrait être utilisée comme un nouvel agent antithrombotique dans le traitement de thromboses [46] [43] [221].

## 2. Exanta.

Le médicament Exanta, produit par AstraZeneca, a été rapporté pour être un inhibiteur direct de la thrombine basé sur la structure d'une toxine purifiée du venin de cobra. Ce médicament était indiqué dans la prévention des événements thromboemboliques veineux en chirurgie programmée pour prothèse de hanche ou de genou. Cependant son utilisation prolongée provoquait des hépatites médicamenteuses ce qui a conduit à son retrait du marché le 14 février 2006. Selon certains auteurs, il apparaît cependant, que l'idée qu'Exanta ai été tiré d'une protéine de venin de serpent est une erreur rapportée dans un article non-examiné-par-des-pairs. La prodrogue (ximelegatran) et ses formes actives (melagatran) serait en réalité basées sur la structure du fibrinopeptide A liée à l'homme [31] [222].

### b) Les fibrino(géno)lytiques.

La dissolution pharmacologique d'un thrombus établi est devenue une approche thérapeutique acceptée chez de nombreux patients qui développent une maladie occlusive thrombotique. La perfusion intraveineuse d'activateurs du plasminogène, comprenant l'activateur du plasminogène tissulaire recombinant (rt-PA), l'urokinase (UK), la streptokinase (SK) et le complexe activateur streptokinase anisoylé (APSAC), est efficace pour rétablir le flux sanguin dans les artères et veines occluses. Les médicaments fibrinolytiques sont donnés après une crise cardiaque pour dissoudre le caillot sanguin bloquant l'artère coronaire. Ils sont aussi utilisés expérimentalement lors d'AVC ou d'embolies pulmonaires massives. Cependant, malgré la disponibilité d'agents thrombolytiques spécifiques de la fibrine, le traitement actuellement disponible présente un certain nombre de limitations importantes : 25 à 30% des patients atteints d'infarctus aigu du myocarde sont résistants à la reperfusion en moins de 90 minutes, **10 à 30% des patients présentent une réocclusion coronaire aiguë**. Il existe aussi un risque faible mais significatif de complications neurologiques, y compris un accident vasculaire cérébral et une hémorragie intracrânienne, l'inhibiteur du t-PA, PAI-1 à action rapide, qui est significativement augmenté dans l'infarctus du myocarde peut, avec d'autres facteurs, prédisposer les patients à réinfarcter [223].

Des approches thérapeutiques alternatives sont donc recherchées et les composés issus des venins de serpents représentent une véritable opportunité. La capacité de dégrader des caillots de fibrine et l'insensibilité aux inhibiteurs physiologiques tels que les serpinines à générer un

intérêt croissant pour une potentielle utilisation thérapeutique des enzymes fibrinolytiques de venin ophidien dans le traitement des maladies thrombotiques artérielles ou veineuses occlusives.

Les enzymes fibrinolytiques et fibrinogénolytiques ont été identifiées chez de nombreuses espèces de serpents. Elles ont été étudiées en vue de leur utilisation thérapeutique potentielle pour la réduction de la formation de caillot sanguin et le contrôle des thromboses. A la différence des enzymes thrombiniques (thrombine-like), les enzymes fibrinolytiques ophidiennes ne mènent pas à la défibrinogénéation, mais digèrent directement les caillots de fibrine.

La grande majorité des enzymes fibrino(géno)lytiques ophidiennes sont des métallo-protéases de la famille des métallo-zincine. **Les enzymes fibrino(géno)lytiques peuvent être classées en 2 catégories selon leur mode de fonctionnement :**

- **Les fibrinogénases** qui coupent directement le fibrinogène.
- **Les activateurs de plasmine** qui agissent sur le thrombus de manière indirecte par l'intermédiaire de la plasmine [71] [7].

### **1. Les fibrinogénases.**

Les fibrinogénases représentent un groupe d'enzymes qui libèrent spécifiquement une ou plusieurs chaînes du fibrinogène.

Les fibrinogénases peuvent se diviser en 2 groupes :

- **Les  $\alpha$ -chaînes fibrinogénases** qui clivent préférentiellement la chaîne  $A\alpha$  du fibrinogène avec une activité plus faible pour la chaîne  $B\beta$ . Elles rassemblent la majorité des métallo-protéases fibrinogénases
- **Les  $\beta$ -chaînes fibrinogénases** qui clivent préférentiellement la chaîne  $B\beta$  avec une faible affinité pour la chaîne- $\alpha$ . La grande majorité des sérines-protéases fibrinogénases appartiennent à ce groupe.

Cependant la spécificité de chaîne n'est pas réellement reconnue et fonction du temps [71].

Parmi les nombreuses enzymes fibrinolytiques identifiées jusqu'ici, les plus intéressantes sont:

- La **fibrolase** d'*Agkistrodon contortrix contortrix* qui dégrade à la fois les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  de fibrine et promet une utilisation certaine en tant qu'agent thrombolytique.
- L'**atroxase** de *Bothrops Atrox*.
- La **fibrinogénase et lebetase** du venin de *Vipera lebetina* [43].
- **VRR-73** du venin de de la vipère de Russel *Daboia russelii russelii*.
- L'**hannahpep** du venin du cobra royal *Ophiophagus hannah* [138]

#### **a. Fibrolase.**

La fibrolase (203aa) est une métalloprotéase à Zinc isolée du venin de la vipère cuivrée *Agkistrodon contortrix contortrix*. Elle lyse rapidement et efficacement le caillot. Contrairement aux médicaments déjà sur le marché, **la fibrolase** est un agent thrombolytique qui **provoque la dégradation de la fibrine et du fibrinogène par action directe**. Elle exerce son action fibrinolytique avec peu ou pas d'activité hémorragique et ne repose pas sur le plasminogène pour la dissolution du caillot. **La fibrolase clive rapidement la chaîne A $\alpha$  du fibrinogène et la chaîne B $\beta$  à une vitesse plus lente. Elle n'a aucune activité sur la chaîne  $\gamma$**  [224] [225] [129] [226].

Etudié pour les traitements des maladies artérielles occlusives et des thromboses veineuses, son mode d'action a été caractérisé in vitro et in vivo. Elle est sensible au changement de pH et de température. La stabilité et solubilité sont constantes à pH neutre et basique (5 à 9) [227]. Expérimentalement la fibrolase a été utilisée pour digérer des caillots sanguins occlusifs dans des modèles animaux [101]. Elle s'est avérée avoir une activité thrombolytique très efficace dans la thrombose artérielle. Une étude réalisée en 1994 a montré qu'administrée localement chez un chien anesthésié, la fibrolase est capable de lyser rapidement un thrombus de l'artère carotide sans provoquer d'hémorragie excessive ou compromis hémodynamique. **Il a été conclu qu'utilisée en combinaison avec un médicament antiplaquettaire connue, la fibrolase pourrait représenter une alternative thrombolytique cliniquement plus efficace aux agents thrombolytiques actuellement utilisés ou pourrait agir de manière synergique avec les activateurs du plasminogène** [226] [228].

En 1997, une équipe de scientifique a rapporté la préparation d'un agent thrombolytique supérieur possédant aussi bien des propriétés thrombolytiques qu'antiplaquettaires, en conjuguant la fibrolase à un peptide qui inhibe l'accumulation plaquettaire [101]. La **fibrolase recombinante « polypeptide NAT »** a été brevetée en 2007 (Brevet US n ° 7195903, 2007) comme méthode de traitement pour la thrombose. Elle est utile pour la lyse des caillots de sang *in vivo* [229].

### **b. Alfimeprase.**

Créé par l'entreprise américaine Agem, l'**alfimeprase est une forme recombinante modifiée de la fibrolase** [224]. Constituée de 201 acides aminés, l'alfimeprase est identique à la fibrolase à l'exception d'une troncature de deux résidus d'acides aminés à l'extrémité N-terminal suivie de l'insertion d'un nouvel acide aminé N-terminal dans la protéine tronquée. Ces changements on permit d'obtenir une enzyme plus stable avec une durée de vie plus longue pour un stockage prolongé [31] [226].

L'alfimeprase, comme la fibrolase, possède une activité protéolytique directe contre la chaîne  $\text{A}\alpha$  du fibrinogène avec une affinité beaucoup plus grande que pour la chaîne  $\text{B}\beta$ . elle n'a aucune affinité pour la chaîne  $\gamma$ . Les deux molécules sont des agents fibrinolytiques direct, elles agissent directement sur la fibrine pour dissoudre le caillot par contraste avec la classe de médicament thrombolitique activatrice du plasminogène, elles ne comptent pas sur le système fibrinolytique endogène (c'est-à-dire la conversion du plasminogène en plasmine) [31].

L'un de ses principaux avantages est que l'alfimeprase est inhibée par l' $\alpha$ 2-macroglobulines. Ce dernier est un inhibiteur de protéase polyvalent et très répandu dans le plasma sanguin des mammifères. Il joue un rôle dans la fibrinolyse et se montre très réactif envers les métallo-protéases. En effet, l' $\alpha$ 2-macroglobulines est capable de former un complexe macromoléculaire avec l'alfimeprase par interaction covalente irréversible ce qui empêche alors allostériquement celle-ci de se lier à son substrat et donc la neutralise. A l'extérieur de la zone d'intérêt thérapeutique où est localisé le thrombus, l'excès d'alfimeprase est donc rapidement pris au piège et inactivé par les défenses physiologiques normales de l'organisme (l' $\alpha$ 2-macroglobuline). Le complexe reste indissociable, ainsi les risques de complications hémorragiques systémiques sont considérablement réduits [31] [224].

Cependant, bien que l' $\alpha$ 2-macroglobuline soit une protéine majeure du plasma, la quantité disponible pour lier et neutraliser l'alfimeprase est saturable. L'activité de l'alfimeprase a donc été étudiée *in vitro* sur un modèle de caillot afin de déterminer la dose efficace. Il a aussi été observé qu'avec une quantité fixe d'alfimeprase le temps nécessaire pour lyser le caillot est proportionnel à la taille du caillot sanguin lui-même [224].

Des études pharmacologiques comparatives avec d'autres agents fibrinolytiques réalisées sur des artères carotide intensément thrombosées ont révélé que l'alfimeprase est plus efficace que les autres agents en termes de rapidité de lyse et de sécurité des patients. Les données animales *in vivo* indiquent que la vitesse de lyse du caillot est grandement accélérée. Elle est 6 fois plus rapide que celle des activateurs du plasminogène avec un risque minimal de complication hémorragique [31] [224].

En 2004, Amgen a accordé à Nuvelo, dans le monde entier, les droits de développer et de commercialiser de l'alfimeprase en échange de marges et de redevances. La valeur thérapeutique de l'Alfimeprase sur les maladies humaines a été évaluée lors d'essais cliniques réalisés par l'entreprise Nuvelo, Inc qui s'est mis en collaboration avec Bayer par la suite.

L'alfimeprase a été examiné pour le traitement de l'occlusion artérielle périphérique (PAO) dans un programme d'études nommé « NAPA » (Novel Arterial Perfusion with Alfimeprase-2) ainsi que son dispositif d'accès veineux central (CVAD) dans un programme d'étude nommé « SONOMA » (Speedy Opening of Non-functional and Occluded catheters with Mini-dose Alfimeprase). Comme l'alfimeprase est rapidement neutralisé dans la circulation sanguine il est important de l'injecter directement au niveau du site d'intérêt thérapeutique pour qu'elle soit efficace. Conçue pour dissoudre les caillots en dégradant directement la fibrine, l'alfimeprase est administrée au moyen d'un cathéter directement au point du caillot via de multiples perfusions pulsées manuelle. Des résultats prometteurs ont été obtenus pour les deux conditions (PAO et CVAD) dans les phases I et II des essais cliniques, cependant l'alfimeprase a échoué à atteindre les objectifs lors de la phase II de l'essai SONOMA-3 et lors de la phase III de l'essai NAPA-2. Les résultats de ces essais étaient médiocres et n'ont pas répondu aux critères d'évaluation principaux. Les essais de phase III NAPA-3 tout juste initiés et SONOMA-3 ont donc été suspendus.

Le critère d'évaluation principal de l'essai NAPA-2 était l'évitement de la chirurgie vasculaire ouverte dans les 30 jours suivant le traitement par alfimeprase, tandis que le critère d'évaluation

de l'essai de phase III SONOMA-2 était la restauration de la fonction 15 minutes après l'administration de 3mg d'alfimeprase contre placebo. Une variété de critères secondaires a été également évalué dans les 2 essais tels que : l'incidence hémorragique, l'analyse cout-efficacité avec la durée d'hospitalisation en soin intensif.

L'objectif principal de l'essai de phase II SONOMA-3 était l'évaluation l'efficacité de l'alfimeprase dans la restauration de la fonction 15 min après administration avec une dose supérieur à 3mg en comparaison à un traitement déjà existant : Cathflo® Activase®. L'augmentation de la dose n'a pas augmenté suffisamment l'efficacité pour répondre aux critères de la société et rivaliser avec Cathflo® Activase®.

L'alfimeprase a également été examiné en 2007 pour le traitement d'un AVC ischiémique aigu dans une étude clinique multicentrique en phase II nommée CARNEROS-1 (Catheter directed Alfimeprase for Restoration of Neurologic Function and Rapid Opening of Arteries in Stroke) dans laquelle les principaux critères d'évaluation étaient le déblocage de la lésion occlusive dans les 120 minutes suivant le traitement et l'hémorragie intracérébrale symptomatique. Et cela avec l'administration de doses progressives d'alfimeprase de 1, 5 et 10 mg administrées (chez 100 patients) dans les 3 à 9 heures suivant l'apparition d'un AVC. Aux États-Unis, trois brevets ont été délivrés concernant l'alfimeprase. Les brevets américains n°6261820 (séquence protéique d'alfimeprase), n°6440414 (formulation d'alfimeprase avec un stabilisant à base de zinc) et n°6455269 (méthodes pour l'administration localisée d'alfimeprase). Le développement de l'alfimeprase, dans cette indication a finalement été interrompu [230]. Nuvelo a totalement abandonné le développement de l'alfimeprase en 2008.

Certains scientifiques pensent toujours que l'Alfiméprase peut être utile pour le développement d'un nouveau traitement thrombolytique et de nouvelles investigations sont à attendre. L'alfimeprase représenterait une alternative aux médicaments déjà sur le marché qui active le plasminogène. Les gros caillots présents dans la PAO en particulier, exigerait de grandes infusions pour les détruire, de même le plasminogène est présent en quantité variable selon les caillots encore plus pour les grands caillots des PAO. Des analyses supplémentaires sont nécessaires pour déterminer comment procéder à l'élaboration de l'alfimeprase avec possibilité de changement de dosage et de mode d'administration [31] [226].

### c. RVV -73.

La toxine, VRR-73 extraite du venin de de la vipère de Russel *Daboia russelii russelii*, montre des actions fibrinolytiques et estérolipidiques qui sont indépendantes de l'activité hémorragique. Le venin de la vipère de Russel peut être détoxifié par dénaturation thermique à une température de 100°C, ce qui lui permet de perdre son activité hémorragique, avec restauration réversible de l'activité fibrinolytique [231]. In vitro des études ont démontrées l'efficacité de VRR-73 pour dissoudre la fibrine et le caillot sanguin artificiel [101]. Ainsi, l'activité fibrinolytique de VRR-73 présente un potentiel de développement comme agent anticoagulant thrombolitique pour une utilisation thérapeutique une fois que l'activité hémorragique du venin a été enlevée [232].

### d. Hannahpep.

L'hannahpep, est un peptide fibrinolytique qui a été extrait et purifié à partir du venin du cobra royal *Ophiophagus hannah* [138]. L'Hannahpep produit une activité défibrinogénante in vivo chez des souris. Il a également présenté une activité fibrinolytique et fibrinogénolytique significative in vitro. Hannahpep a montré une activité anticoagulante sur le plasma sans présenter d'activité hémolytique, hémorragique ou phospholipasique. **D'après ces différentes observations, ce peptide peut avoir une application thérapeutique dans le traitement de thromboses ou d'occlusion d'un vaisseau sanguin** [233].

## 2. Les fibrinolytiques par activation du plasminogène

### a. TSV-PA.

Les activateurs du plasminogène ophidiens sont encore une autre classe d'enzymes fibrinolytiques qui aboutissent à la dégradation du thrombus en activant le plasminogène inactif en plasmine qui dégrade à son tour la fibrine. L'une d'entre elles, le TSV-PA, reproduit à l'identique le clivage du plasminogène par les activateurs du plasminogène rencontrés chez l'homme [101] [3].

Le TSV-PA est une sérine-protéase extraite du venin de *Trimeresurus stejnegeri* qui active spécifiquement le plasminogène. Il s'agit d'une glycoprotéine de 33 kDa constituée d'une unique chaîne peptidique de 234 acides aminés et 6 ponts disulfures. Le TVS-PA partage

environ 70 % d'homologie avec les autres sérines-protéases ophidiennes. Il possède d'importantes similarités structurales avec l'activateur du plasminogène de type tissulaire (t-PA) et converti le plasminogène en plasmine de la même façon que celui-ci : c'est-à-dire par clivage de la liaison Arg 561-Val 562 [46]. Le TSV-PA présente une séquence identique à 23% avec le domaine catalytique de l'activateur du plasminogène de type tissulaire (t-PA), 21% avec l'urokinase (U-PA) et 63% avec la batroxobine, une enzyme thrombine-like du venin de *Bothrops atrox* qui n'active pas le plasminogène [234] [18].

Le TSV-PA appartient à la sous famille « trypsine-like » caractérisée par une haute spécificité de substrat et une résistance à l'inhibition. Beaucoup de ces enzymes se heurte aux mécanismes hémostatiques et montre une longue durée-de vie circulante ce qui en fait des molécules attractives pour le développement de futur médicament [235].

**Le TSV-PA pourrait représenter une alternative potentielle au t-PA dans le traitement des thromboses.** En effet, le t-PA possède plusieurs inconvénients, une demi-vie courte (quelques minutes), une inactivation rapide in vivo due à l'interaction avec son principal inhibiteur endogène (le PAI-1), la réapparition possible de l'occlusion coronaire aiguë et des saignements [43]. **Le TSV-PA quant à lui, présente l'avantage d'avoir une plus longue durée de vie.** Cela s'explique par le fait que contrairement au t-PA, le TSV-PA ne possède pas le domaine du facteur de croissance épidermique impliqué dans l'absorption de cette molécule par les cellules hépatiques, il est donc éliminé plus lentement de l'organisme [43] [410]. De plus, **l'action du TSV-PA n'est pas empêchée par les inhibiteurs physiologiques de la famille des sérines protéinases.** Cette absence d'inhibition est due à l'absence de sites impliqués dans les interactions serpentine/protéinase ou à certains résidus ayant des fonctions spécifiques. Le TSV-PA représente un bon modèle moléculaire pour améliorer les propriétés des agents thrombolytiques actuellement utilisés et en créer de nouveaux [43].

Il a été montré qu'une mutation ou substitution d'un acide aminé au niveau du site catalytique entraîne une perte d'activité sur le plasminogène. L'ordre de la séquence en acide aminé est donc important. **On pense également que l'acide aminé « Phe » en position 193 joue un rôle important dans la résistance à la dégradation du TSV-PA.** En effet, habituellement l'acide aminé en position 193 du TSV-PA est un résidu Gly pour les protéases trypsine-like. La création du variant F193G de TSV-PA, par remplacement du résidu Phe par Gly altère ses propriétés de façon intéressante. Alors que TSV-PA est insensible aux inhibiteurs naturels du t-PA (comme PAI-1) et à d'autres serpinines (A 2-antiplasmine et  $\alpha$ 1-antitrypsine), le variant est

inhibé par ces facteurs. Ceci illustre le rôle majeur du résidu 193 et laisse imaginer que le **remplacement du résidu Gly par Phe sur la molécule de t-PA pourrait donner un nouvel agent thrombolytique insensible aux serpinés et donc de demi-vie plus longue** [46].

### **3. Autres agents fibrinolytiques ophidiens : les estérases d'arginine.**

Les estérases d'arginine, largement distribuées dans les venins de crotalidae, viperidae et certains venins de serpent de mer, ont été employées pour le **traitement de l'atteinte ischémique** [43].

L'arginine estérase ophidienne s'est **avérée réduire le taux de fibrinogène sérique chez l'homme et pourrait être utile dans le traitement de l'AVC ischémique**. L'effet thérapeutique de l'arginine estérase a été comparé à celui de l'héparine sur 50 patients. L'arginine estérase semble être sûre et a des effets fibrinolytiques significatifs lorsqu'elle est administrée chez les patients ayant subi un AVC ischémique aigu. Cependant, son efficacité dans cette étude préliminaire, n'était pas supérieure à celle de l'héparine en termes d'amélioration des déficits neurologiques. Des études supplémentaires avec des doses plus importantes et un plus grand nombre de sujets sont nécessaires [236].

#### **c) Les agents activateurs de la protéine C.**

Plusieurs activateurs de la protéine C ont été trouvés dans les venins ophidiens. Notamment dans les venins de plusieurs espèces de Viperidae appartenant aux genres *Agkistrodon*, *Bothrops*, *Trimeresurus*, *vipera* et *Cerastes* [3] [131].

La protéine C, est une glycoprotéine vitamine K-dépendante synthétisée par le foie. Sous sa forme active (PCA), la protéine C joue un rôle clé [135] dans le contrôle l'hémostase, en exerçant un double effet anticoagulant. D'une part, elle inhibe la coagulation par hydrolyse des facteurs VIIIa et Va activés et d'autre part, elle stimule la fibrinolyse par dégradation des inhibiteurs de l'activateur du plasminogène permettant ainsi de limiter l'extension du thrombus. Il s'agit d'un régulateurs physiologiques de la coagulation dont les défaillances congénitales ou acquises sont souvent associées à un risque anormalement élevé de thrombose vasculaires

spontanées, notamment des thrombophlébites superficielles et des thromboses artérielles [20] [99] [3].

L'analyse fonctionnelle de la protéine C est problématique car son activation en PCA nécessite de la thrombine et de la thrombomoduline, elle peut aussi être incomplète et la thrombine peut interférer dans les analyses chromogènes. L'utilisation de l'activateur de la protéine C extrait du venin d'*Agkistrodon contortrix contortrix*, actuellement commercialisé sous le nom de Protac®, a aujourd'hui résolu ces problèmes en activant directement la protéine C. Le test au Protac®, est d'ailleurs la technique la plus utilisée. En laboratoire, trois types de mesure sont utilisées couramment pour mettre en évidence un déficit en protéine C :

- Méthode de mesure de l'activité de la PCA par de test de coagulation sanguine en première intention (la prot C y est activée par Protac®).
- Dosage immunologique évaluant la concentration plasmatique de la protéine C (PC Antigène).
- Méthode de mesure de l'activité amidolytique évaluant la capacité fonctionnelle de site catalytique. (Protac® test chromogène direct) [43] [135].

### **1. Protac®.**

Le Protac® (ou venzyme) extrait du venin du serpent à tête cuivrée *Agkistrodon contortrix* est une sérine-protéase d'environ 40 kDa. C'est un puissant activateur de la protéine C qui provoque *in vitro* un allongement du temps de coagulation proportionnel à la concentration en protéine C dans le sang du patient [130]. L'activation de la protéine C par le Protac® est 15 fois plus rapide qu'avec son activateur naturel, la thrombine. Elle s'effectue en l'absence de calcium et indépendamment de la thrombomoduline, en revanche une protéine de la membrane cytoplasmique est indispensable à l'activation physiologique de la protéine C. Elle requiert la présence de vitamine K [3]. Le Protac® est inhibée par le phénylméthylsulphonylfluoride et l'antithrombine III.

Efficace et d'action rapide, le Protac® est très utile pour l'étude de l'activation de la protéine C. Il permet à la fois le dosage et l'analyse fonctionnelle de la protéine C. Il est utilisé dans les tests de première intention pour le dépistage d'un déficit en protéine C qu'il soit acquis ou constitutionnel, ainsi que pour le dépistage d'une anomalie de la voie C de la coagulation.

Eventuellement il peut aussi être employé pour le dépistage d'une résistance à la protéine C activée (FV Leiden) et pour l'analyse de la protéine S.

Il existe trois types de méthodes utilisant le ProtaC [135] [43] [101] :

- ***Pour l'analyse de la coagulation fonctionnelle***, le ProtaC convertit la protéine C présente dans le prélèvement en protéine C activée, laquelle lors d'addition de calcium et de phospholipides catalyse la dégradation des facteurs V et VIII de ce même plasma, ce qui conduit à un allongement du temps de coagulation proportionnel à la concentration de protéine C dans le plasma.
- ***Pour l'analyse par méthode chromogénique direct***, la Protéine C présente dans le plasma peut aussi être directement déterminée, sur activation par ProtaC, en mesurant son activité amidolytique, au moyen d'un substrat chromogène. L'augmentation de l'absorbance due au dégagement du chromophore catalysé par PCa est proportionnelle à la quantité de PC présente dans l'échantillon. (CHROMOPEP® PROTEIN C : dosage quantitatif de la protéine C fonctionnelle dans le plasma humain citraté. Dans ce test ProtaC active la protéine C, celle-ci hydrolyse le substrat chromogène, la quantité de para-nitroaniline libérée est mesurée à 405nm et est proportionnelle à la quantité de protéine C présente dans le milieu réactionnel).
- ***Pour l'analyse par méthode chromogénique indirect***, étant donné que la PCa conduit à une augmentation du temps partiel de thromboplastine activée (APTT), ce système peut aussi être utilisé comme une méthode de détermination de la PC. Dans ce cas il faut un **substrat chromogène de la thrombine** et un photomètre d'absorbance fixe. En utilisant cette méthode, c'est le temps nécessaire entre le début de la réaction jusqu'au dégagement du chromophore atteignant une absorbance définie qui est mesurée [135].

Les résultats des analyses utilisant le ProtaC® rivalisent favorablement avec ceux des méthodes immunologiques. Le ProtaC® peut également permettre l'identification d'une protéine C dysfonctionnelle via des résultats différentiels entre des analyses chromogènes et des analyses de la coagulation [237] [135]. Enfin, la méthode utilisant ProtaC® apporte une amélioration par rapport aux analyses utilisant la thrombine puisque cette dernière peut mener à une mauvaise classification des patients déficients en protéine C de façon normale ou congénitale [43] [135].

ProtaC® a considérablement simplifié l'analyse de la protéine C, il a permis la réduction des coûts et a facilité la diminution de l'échantillon. Il a aussi joué un rôle important dans l'analyse de la protéine S (qui est le cofacteur exigé pour l'inactivation des facteurs Va et VIIIa par la PCa), même si les tests y sont beaucoup moins sensibles avec beaucoup de faux négatif. Protac® a également été utilisé pour comparer l'activation de la protéine C indigène (physiologique humaine HPC) et recombinante (rHPC) [238] [135].

En 1996, un test basé sur le ratio du temps de thromboplastine partielle activé en l'absence et en présence de Protac® a été employé pour identifier les patients présentant des défauts dans la voie anticoagulante de la protéine C [135]. Tous les patients atteints, soit d'un déficit de protéine C, soit d'une mutation FV de Leiden, soit les deux, soit d'une mutation FV Leiden accompagné d'une déficience en protéine S ont été diagnostiqués avec succès (par un ratio < 3,37). Cependant, un ratio chevauchant la plage normale (> 3,37) a été obtenu avec les plasmas déficients en protéine S uniquement (Faux négatif). De plus des plasmas atteints de déficit en antithrombine seule ou sans défaut de la voie C de coagulation ont présenté un ratio < 3,37 (faux positifs) [239].

## 2. ProC Global®.

**Le ProC Global® est un nouveau test de coagulation global** conçu pour dépister rapidement **les anomalies de la voie de la protéine C**. Il est basé sur la capacité des PCA (protéine C activé) endogène, activé par le ProtaC, à prolonger le temps de céphaline activé (TCA ou temps de thromboplastine partiel activé). Il a été testé chez des femmes souffrant de pré-éclampsie ou de syndrome HELLP associé à un défaut de protéine C et S et augmentation LA [240] [241].

Dans cet essai le plasma du patient est incubé avec un réactif TCA puis un « activateur de solution tampon » contenant ProtaC® est ajouté. Le TCA contenant le ProtaC est appelé « PCAT », tandis que le TCA ne contenant pas le ProtaC se nomme « PCAT-0 ». Après addition de chlorure de calcium, les 2 temps de coagulation (aPTT) sont enregistrés. Le résultat est exprimé en un ratio appelé « PCAT-NR » (ou PCAT-normalisé). Il est obtenu en divisant le ratio du plasma du patient par le ratio d'un plasma standard, le tout multiplié par un coefficient de sensibilité.

$$PCAT_{NR} = \frac{\text{ratio PCAT plasma patient } (PCAT/PCAT_0)}{\text{ratio PCAT}_{standard}} \times SV$$

Ce test n'est pas largement utilisé et est remplacé dans la plupart des cas par d'autres tests automatisés. En effet, **malgré le fait qu'il y ait quelques bons résultats ProC Global® présente un manque de sensibilité important.** Le PCAT-NR est réduit ( $<0,80$ ) chez les patients insuffisants hépatique ou traités par anticoagulants oraux ainsi que chez des patients en absence de toutes anomalies (38%). Néanmoins, avec un seuil approprié (PCANR=0,75) le test permet de détecter les patients présentant une mutation FV Leiden et dans 90 % des cas une carence en protéine C mais une carence en protéine S moindre (68% des cas) [240] [241].

### **3) Les agents qui agissent sur les plaquettes.**

Les plaquettes sanguines sont impliquées dans de nombreux désordres pathologiques, comme l'oblitération progressive des vaisseaux sanguins à l'origine d'embolies vasculaires, d'infarctus du myocarde ou d'accidents vasculaires cérébraux. L'étude moléculaire de ces troubles utilise les phospholipases isolées des venins de serpents qui dégradent spécifiquement les phospholipides de la membrane des plaquettes. De nombreuses toxines et enzymes inductrices/inhibitrices de l'agrégation plaquettaire, de poids moléculaire et de structure très variables, ont été identifiés. Ainsi les plaquettes sanguines sont l'une des cibles privilégiées des venins de *Viperidae* [3].

#### **a) Les inducteurs de l'agrégation plaquettaire.**

Ils ont été utilisés pour l'étude de la fonction plaquettaire et le diagnostic de certaines maladies.

##### **1. Botrocétine.**

La botrocétine est une lectine de type C principalement extraite du venin de *Bothrops jararaca*. Il s'agit d'un agrégant plaquettaire très puissant qui permet le diagnostic de plusieurs maladies hémorragiques d'origine génétique :

- La maladie de Von Willebrand.
- La dystrophie thrombocytaire hémorragique de Bernard et Soulier.

Ces deux affections entraînent une forte perturbation du premier temps de l'hémostase et sont marquées par un temps de saignement prolongé [3] [77].

### a. La maladie de Von Willebrand.

La maladie de Von Willebrand est causée par le déficit du facteur Von Willebrand, associé au facteur VIII. Le facteur Von Willebrand est indispensable à l'adhésion des plaquettes sanguines lors du processus de coagulation, son déficit entraîne une défaillance de l'agrégation plaquettaire [99] [172].

La botrocétine peut être employée pour le dosage du facteur von Willebrand (FVW) dans le plasma et le diagnostic de la maladie de Willebrand. Pour exercer son effet sur les plaquettes, la botrocétine exige en effet une liaison avec le facteur Willebrand. En se liant au FVW elle induit une interaction avec la GPIIb $\alpha$  située à la surface des plaquettes entraînant l'agrégation plaquettaire. Habituellement on utilise la ristocétine pour doser le facteur Von Willebrand, cependant l'inconvénient de ce peptide est qu'il ne reconnaît pas tous les polymères mais seulement ceux de haut poids moléculaire. On ne peut donc pas faire la différence entre une absence totale de facteur Von Willebrand ou la présence de polymère de faible poids moléculaire. **La botrocétine a quant à elle, un effet légèrement mais sensiblement différent de celui de la ristocétine. Elle a pour avantage de se fixer sur toutes les conformations du facteur de Von Willebrand, quelle que soit leur structure dans le plasma. Cela permet la caractérisation et le diagnostic plus sensible des différentes mutations du FVW responsables des différentes formes pathologiques de la maladie de Von Willebrand** [172] [242]. La botrocétine et la ristocétine peuvent donc être employés simultanément pour différencier des variantes moléculaires du facteur Willebrand. Par exemple, pour la maladie de Willebrand de type IIa (VWD) où les multimères de FW de haut poids moléculaire sont absents, la botrocétine va agréger les plaquettes alors que la ristocétine ne les agrègera pas [243] [43] [135].

**Remarque** : En raison de leurs caractéristiques uniques de détermination des facteurs X et V et la prothrombine dans le sang, **les enzymes RVV** (RVV-V et RVV-X) isolées du venin de la vipère de russell *Daboia russelli* sont aussi utilisées pour l'amélioration de la détection de maladie Von Willebrand [101] [129].

## **b. La dystrophie thrombocytaire hémorragique de Bernard et Soulier.**

La dystrophie thrombocytaire hémorragique de Bernard et Soulier est une anomalie constitutionnelle de la membrane plaquettaire. Cette maladie est causée par l'absence de glycoprotéine I (GPIb) sur la membrane plaquettaire qui se traduit par une anomalie de l'adhésion plaquettaire. La botrocétine agrège partiellement les plaquettes de patients souffrant **de la maladie de Bernard-Soulier (où la glycoprotéine GP Ib est absente)** alors que la ristocétine n'induit pas d'agrégation dans le plasma de ces patients puisqu'elle dépend de GPIb. Ces deux agonistes peuvent donc être utilisés ensemble pour établir le diagnostic différentiel de la maladie de Bernard Soulier [99] [43].

## **2. Alboaggrégine-B.**

Les alboaggrégines A, B et C extraite du venin du crotale des bambous *Trimeresurus albolabris* appartiennent à la famille des lectines de type C « snalec » [244]. L'alboaggrégine-B (23kDa) est un hétérodimère qui n'a aucune activité semblable aux lectine C [245]. Il s'agit d'une autre protéine agrégante dépendante du facteur von Willebrand. Elle n'a besoin ni de calcium, ni d'aucun autre facteur pour exercer son activité [246]. **Présentant un haut degré d'homologie avec la botrocétine, elle rivalise avec celle-ci. Mais alors que la botrocétine se lie spécifiquement avec le FVW, l'alboaggrégine-B se lie à la glycoprotéine GPIb sans affecter la liaison de la botrocétine au FVW.** La liaison de l'alboaggrégine-B à GPIb n'active pas l'agrégation plaquettaire même par fibrinogène exogène ce qui suggère qu'elle n'active pas le complexe GPIIb/IIIa [247]. La ristocétine n'affecte pas la liaison de l'alboaggrégine-B aux plaquettes, ni son activité [246]. L'alboaggrégine-B a été utilisée lors d'une étude chez 30 patients insuffisants rénaux chronique avec accumulation plaquettaire induite par hémodialyse pour quantifier les récepteurs du FW sur la molécule de GPIb [248] [135].

### 3. Echicétine.

L'échicétine est une lectine de type C d'*Echis carinatus sochureki* qui se lie à la glycoprotéine plaquettaire Ib $\alpha$  et bloque la liaison du facteur von Willebrand et de la thrombine. L'échicétine peut être utilisée soit pour bloquer les fonctions de GPIb $\alpha$  ou pour mesurer les niveaux d'expression de la GPIb $\alpha$  si elle est marquée avec de l'iode<sup>125</sup>, de la biotine ou de la fluorescéine isothiocyanate. En présence de plasma, l'échicétine agglutine les plaquettes via la GPIb  $\alpha$  et IgM. Elle peut être utilisée pour évaluer les niveaux d'expression de la GPIb $\alpha$ , directement et indépendamment des taux de facteur von Willebrand [249].

### 4. Convulxine.

La convulxine est une lectine hétérodimérique de type C isolée du venin du crotale brésilien *Crotalus durissus terrificus*. Elle active les plaquettes sanguines des mammifères en se liant spécifiquement sur le récepteur du collagène p62 / GPVI des plaquettes sanguines dans des conditions physiologiques. Ainsi elle peut être utilisée dans les études sur les récepteurs plaquettaires et la fonction plaquettaire [249].

#### b) Les inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire

De nombreuses enzymes hydrolysant les inducteurs de l'activation plaquettaire sont présentes dans les venins de serpents. Elles ont une action anti-agrégant indirect. D'autres enzymes entrent en compétition avec les médiateurs de l'activation plaquettaire au niveau des intégrines et s'opposent ainsi à la formation du clou plaquettaire en inhibant l'agrégation plaquettaire [3].

CLASSES	
<b>Classe I</b>	Toxines non enzymatiques antagonistes du complexe glycoprotéine IIb/IIIa.
<b>Classe II</b>	Toxines non enzymatiques antagonistes du récepteur du vWF glycoprotéine Ib.
<b>Classe III</b>	Toxines non enzymatiques antagoniste de l'interaction plaquettaire du collagène.
<b>Classe IV</b>	Toxines non enzymatiques antagonistes de récepteur thrombine-thrombine.
<b>Classe V</b>	Toxines non-enzymatiques V.
<b>Classe VI</b>	Toxines enzymatiques inhibitrices.

Tableau 7 : Classes des inhibiteurs de l'activation plaquettaire

Le groupe le mieux étudié est la classe des toxines non-enzymatiques, nommées désintégrines, qui empêche l'interaction entre le fibrinogène et son récepteur plaquettaire (GPIIb/IIIa) l'intégrine  $\alpha$ IIB $\beta$ 3 [31].

### 1. Les désintégrines qui ciblent l' $\alpha$ IIB $\beta$ III

Parmi les nombreuses toxines issues des venins de serpents qui affectent la fonction plaquettaire, les plus intéressantes pour l'étude de l'hémostase appartiennent à la famille des désintégrines constituée de nombreuses protéines très homologues.

Les désintégrines forment un groupe d'inhibiteur de l'agrégation plaquettaire qui perturbe les interactions entre les intégrines GPIIb/IIIa ( $\alpha$ IIB $\beta$ 3) et le fibrinogène. L'intégrine  $\alpha$ IIB $\beta$ 3 est une protéine majeure de la surface des plaquettes. Elle permet l'agrégation par la fixation du fibrinogène qui va lier les plaquettes entre-elles. Cette intégrine est donc une bonne cible [250].

En raison de leur potentiel clinique, un grand nombre de désintégrines ont été isolées et caractérisées. Parmi elles : échistatine, bitistatine, albolabrine, applagine, batroxostatine, élégantine, flavoridine, halysine, kistrine, triflavine et trigramine. L'échistatine de la vipère *Echis carinatus* est le plus petit de ces inhibiteurs de la glycoprotéine GPIIb/IIIa [71] [43] [135] [46] [70].

En empêchant l'agrégation plaquettaire via l'inhibition de l'activité réceptrice des glycoprotéines de surface, les désintégrines offrent une occasion unique d'étudier les glycoprotéines plaquettaires ainsi que leurs interactions (plaquette-plaquette et plaquette-endothélium). Bien qu'aujourd'hui encore, aucun test d'hémostase en laboratoire n'utilise les désintégrines, elles restent des composants importants qui pourront potentiellement être utilisées comme outil de diagnostic [43] [101] [135].

Les désintégrines peuvent trouver un rôle dans l'inhibition de la formation des thrombus et des embolies. En effet lors de désordres thromboemboliques, le principal objectif est d'inhiber l'intégrine  $\alpha$ IIB $\beta$ 3 réceptrice du fibrinogène sur les plaquettes sanguines. Les essais cliniques suggèrent que le blocage GPIIb/IIIa des plaquettes est un traitement efficace pour les événements thrombotiques et la resténose fréquemment associés aux maladies cardiovasculaires et cérébrovasculaires [71]. D'abord testées dans plusieurs études expérimentales, les désintégrines ophidiennes ont notamment prévenu l'occlusion artérielle en

inhibant l'agrégation plaquettaire, empêché la fermeture brusque et la resténose des artères ou encore inhibé l'agrégation plaquettaire induite par des cellules tumorales (tigramine et rhodostomine) [251]. Des études *in vivo* ont également montré le rôle potentiel des désintégrines pour la prévention de l'agrégation plaquettaire après angioplastie ou thrombolyse [43]. C'est dans cette optique que la structure des désintégrines a été utilisée comme modèle pour concevoir des composés capables de se fixer avec une plus forte affinité au fibrinogène.

Les résultats encourageants de ces études ont montré aux scientifiques qu'une utilisation thérapeutique de ces désintégrines ou d'agents construits à partir de ces molécules était possible. Inspiré par la puissance des désintégrines, une série d'inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire ont été conçus, aboutissant finalement à deux antagonistes de  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  : **le tirofiban et l'eptifibatide**. Développées respectivement à partir de composés des venins de *Sistrurus miliaris barbouri* et *Echis carinatus*. Ces deux médicaments ont été **approuvés par la FDA pour leur utilisation comme médicament antiplaquettaire dans le traitement des syndromes coronariens aigus et dans la prévention des complications thrombotiques chez les patients subissant une chirurgie coronarienne percutanée telle qu'une pose de stent ou de ballonnet**. Depuis 15 ans des millions de patient ont été soignés et sauvés par l'administration de ces médicaments. Avec des effets secondaires de saignement et la mise sur le marché de nouveau médicament l'utilisation des antagonistes de  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  décroît. Néanmoins ils sont toujours utilisés pour la prévention de thromboses péri-chirurgicales pendant les interventions coronariennes percutanées [31] [252] [138].

#### **a. Echistatine (Aggrastat®, Tirofiban®)**

L'échistatine, extraite du venin de la vipère des pyramides *Echis carinatus* a été découverte à la fin des années 1980. En plus de son effet inhibiteur sur la résorption osseuse, cette désintégrine de bas poids moléculaire s'est révélée être un inhibiteur particulièrement puissant de l'agrégation plaquettaire en comparaison à d'autres molécules ophidiennes [31]. Elle possède une structure simple qui la rend facile à reproduire par synthèse chimique [103].

Modélisé à partir de l'échistatine, le tirofiban® (Aggrastat) est un antiagrégant plaquettaire antagoniste de GPIIb/IIIa [43]. Conçu sur la base de la structure du motif tripeptide « RGD » présent dans la molécule parentale, il fut le premier médicament antiplaquettaire dérivé d'une désintégrine anticoagulante ophidienne [31]. Bien qu'il inhibe l'activité du récepteur intégrine

$\alpha$ IIB $\beta$ 3, le motif RGD peut potentiellement interagir avec d'autres récepteurs intégrine, menant à des effets secondaires indésirables.

Ce médicament est indiqué pour réduire les taux d'événements cardiovasculaire thrombotiques chez les patients avec un syndrome coronarien aigu avec des élévations non-ST. Il est utilisé dans la **prévention des thromboses au cours de la maladie angoreuse** [46]. En complément de l'administration d'héparine et d'aspirine il servira pour la prévention des complications cardiaques ischémiques chez les patients qui font l'objet d'une intervention coronarienne percutanée et pour la réduction du risque d'infarctus du myocarde chez les patients souffrant d'angor instable ou d'infarctus du myocarde sans onde Q, chez lesquels une intervention coronarienne percutanée est programmée. Le Tirofiban est utilisé dans la prévention de l'agrégation plaquettaire après une angioplastie ou thrombolyse par exemple [99].

#### **b. Barbourin (Eptifibatide®, Integrillin®).**

Le deuxième médicament antiplaquettaire inspiré d'une désintégrine ophidienne fut l'Eptifibatide, utilisé dans la prise en charge de l'infarctus du myocarde. L'Eptifibatide a été conçu sur la base de la structure de la désintégrine barbourin extraite du venin du serpent à sonnettes pygmée du Sud-Est, *Sistrurus miliarus barbouri*. Contrairement à la grande majorité des désintégrines qui interagissent avec le récepteur  $\alpha$ IIB $\beta$ 3, **barbourin possède un motif tripeptide « KGD » qui inhibe spécifiquement le récepteur  $\alpha$ IIB $\beta$ 3, bien que l'activité baissent légèrement comparée au motif RGD.** À la suite de modifications, le peptide KGD de barbourin a finalement été conçu dans un analogue heptapeptide cyclique, l'**eptifibatide (Integrillin®)**, qui a non seulement démontré la haute spécificité et puissance envers le récepteur  $\alpha$ IIB $\beta$ 3, mais a aussi montré la résistance à la dégradation protéolytique [103] [31].

### **c. Bitistatine.**

Les désintégrines peuvent aussi avoir un rôle dans l'imagerie moléculaire médicale (scintigraphie) des thromboses veineuses profonde et des embolies pulmonaires. La bitistatine extraite du venin de *Bitis arietans* est un des composés les plus prometteurs à cet égard [101]. Elle lie la glycoprotéine plaquettaire l' $\alpha$ IIb $\beta$ 3 et pourrait être utilisée comme radiotracer. La bitistatine a été également proposé comme radio marqueur des tumeurs solides. En effet, elle présente une affinité pour l'intégrine  $\alpha$ V $\beta$ 3 retrouvés dans les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins nouvellement formé lors de l'angiogenèse, qui est un phénomène commun des tumeurs solides.

La bitistatine est composée d'une chaîne unique de 83 acides aminés réticulés par 7 ponts disulfures, 14 Cys. Une méthode de production à grande échelle et des essais fonctionnels de la bitistatine recombinante ont été entrepris confirmant la conservation des caractéristiques fonctionnelles de la protéine native.

### **2. Toxine à trois doigts : KT-6.9.**

KT-6.9 est un peptide antiplaquettaire de bas poids moléculaire (6,9 kDa) isolé du venin de *Naja kaouthia*. Il s'agit de la première toxine à trois doigts du venin de cobra indien monoculaire signalée comme un inhibiteur d'agrégation plaquettaire. Cette toxine se lie à la surface plaquettaire puis exerce son action de manière dose-dépendante. L'activité antiplaquettaire de KT-6,9 a été trouvée 25 fois plus forte que celle du médicament antiplaquettaire clopidogrel, ce qui représente un potentiel pour développer un médicament.

### **III Applications oncologiques.**

Le cancer est une maladie dégénérative chronique considérée comme la deuxième cause de décès la plus fréquente dans les pays économiquement en développement. Selon un récent rapport de l'Agence Internationale pour la Recherche sur le Cancer (CIRC), il existe actuellement plus de 10 millions de cas de cancer par an dans le monde. Le cancer se caractérise par une multiplication accélérée et incontrôlée d'un ensemble de cellules aberrantes qui perdent leur capacité apoptotique, l'invasion, l'angiogenèse et les métastases.

Aujourd'hui, le traitement du cancer est un défi majeur pour le monde médical. Les méthodes actuelles de traitement sont très coûteuses et ont de nombreux effets secondaires. Les patients souffrent physiquement, mentalement et économiquement. Les connaissances de base sur les néoplasmes augmentent rapidement. Cependant, peu de progrès ont été réalisés dans le traitement clinique des tumeurs. La thérapie du cancer continue d'impliquer des procédures invasives, y compris l'application par cathétérisme d'une chimiothérapie, une chirurgie pour éliminer les tumeurs, l'utilisation de rayonnements, et même des médicaments cytotoxiques non sélectifs.

La recherche et le développement de nouveaux médicaments pour la thérapie contre le cancer afin d'améliorer le pronostic et d'augmenter la survie des patients est actuellement l'un des objectifs majeurs de la recherche biotechnologique et représente l'un des objectifs les plus prometteurs de l'industrie pharmaceutique. La toxicité du venin de serpent sur le métabolisme cellulaire a motivé, depuis ces dernières années, certains chercheurs à étudier les effets du venin sur les cellules cancéreuses [253] [254].

### A) Intérêt du venin ophidien.

Les venins de serpents sont une source naturelle de substances bioactives qui possède un potentiel thérapeutique prometteur dans la lutte contre le cancer. C'est en 1933 que Calmette et ses collègues ont rapporté pour la première fois l'activité anticancérogène du venin de cobra *Naja naja*. Il existe aujourd'hui de nombreuses études décrivant et établissant le potentiel anticancéreux du venin extrait de différentes espèces d'Elapidae, Viperidae et Crotalidae [254].

Au cours des dernières années, les effets des venins de serpents et de leurs enzymes isolées ont été étudiés sur les cultures de cellules tumorales. Certains tests *in vivo* ont montré une activité antinéoplasique contre les tumeurs induites chez la souris. Chez les êtres humains, le venin brut et les enzymes isolées ont révélé des activités antitumorales dans les essais préliminaires, avec des réponses cliniques mesurables dans la phase de traitement avancé. Les venins de *Bothrops newweidii*, *Naja Naja*, *Naja nigricollis*, *Naja naja atra*, *Bothrops Leucurus*, *Opiophagus Hannah*, *Bothrops jararacussu*, *Naja Kaouthia*, l'Okinawa Habu, *Lapemis curtus*, *Daboia russelli russelli*, *Walterinnesia aegyptia*, *Crotalus durissus terrificus*, *Agkistrodon acutus*, *Macrovipera lebetina*, *Bungarus multicinctus*, *Bungarus fasciatus*, *Laticauda semifasciata* et *Agkistrodon rhodostoma* sont d'utilisation potentielle dans la recherche anti cancer [255].

Les venins peuvent être regroupés en fonction de leur activité sur la cellule cancéreuse et de la famille ophidienne dont ils proviennent. Les protéines issues des Elapidae entraînent une altération irréversible de la cellule par la destruction des cellules. Les protéines des Crotalines causent la perte de la capacité de la cellule à fonctionner correctement. Quant aux protéines issues du venin des Viperidae, elles agissent sur l'adhésion des cellules, jouent un rôle dans l'inhibition de la prolifération des cellules tumorales, dans l'inhibition du processus de croissance de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux préexistants (angiogenèse) et dans l'inhibition des métastases cancéreuses [253].

## **B) Mode d'action du venin ophidien.**

Un problème majeur auquel sont confrontés les médecins est le fait que les médicaments et les divers agents chimiothérapeutiques habituellement utilisés pour le traitement de cancer ne distinguent pas les cellules tumorales des cellules saines, causant des effets secondaires indésirables, menant parfois à la mort. Les toxines ophidiennes semblent agir seulement sur certains types de cellules et ont montré des activités lytiques différentes contre diverses lignées cellulaires et organelles subcellulaires. Les venins de serpents qui présentent un potentiel cytotoxique plus élevé et sélectif envers les cellules cancéreuses que les cellules normales suggèrent la possibilité d'applications cliniques. Par exemple la toxine TSV extraite du cobra *Naja naja oxiana* a induit une apoptose dans les lignées de cellules cancéreuses avec des effets minimaux sur les cellules normales étudiées [256]. Ce potentiel pourrait faire de ce venin un choix approprié pour le traitement du cancer. De plus, il est également possible de diriger spécifiquement les composants ophidiens vers les cellules cancéreuses sans affecter les cellules normales en les combinant avec des nanoparticules, comme des nanoparticules d'or. De nouveaux systèmes de vectorisation de composés ophidiens avec des applications cliniques antitumorales ont été décrit tel que la vectorisation liposomale intraveineuse ou encore l'adénovirus recombinant portant le gène cystatin ophidien [255].

**Le potentiel thérapeutique des venins de serpents ouvre la voie à de nombreuses pistes dans la recherche contre le cancer.** Ils ont montré leur **efficacité sur de nombreux types de cancer** et pourrait à terme **limiter l'accroissement des tumeurs malignes**. Certaines des molécules sont soumises à des essais cliniques et pourront participer au développement de médicaments anticancéreux dans un proche avenir [257]. Les composants du venin du cobra *Naja naja* ont notamment montré de bons résultats comme agent chimiothérapeutique dans les essais cliniques. D'autres études doivent encore être menées pour assurer l'efficacité et la sécurité des différents composés de venins de serpents pour le développement de médicaments contre le cancer [253]. La nouvelle enquête de thérapie d'anti-adhérence mènera peut-être à la prévention de métastases chez certains patients.

De nombreuses familles de protéines isolées de ces différents venins ophidien ont démontré une action anti-cancéreuse telles que les **désintégrines**, les **métallo-protéases**, les **L-aminoacides oxydases**, les **lectines de type C** et les **phospholipases A<sub>2</sub>**. Ces composants ophidiens inhibent la migration, la prolifération et l'invasion cellulaire. Ils inhibent l'angiogénèse et favorise la mort cellulaire par différents moyens.

**L'induction de l'apoptose est le mécanisme le plus important de nombreux agents anticancéreux.** L'apoptose est la mort cellulaire programmée. Elle est caractérisée par des modifications morphologiques, biochimiques et moléculaires. Elle joue un rôle important dans le développement et l'homéostasie des tissus normaux [46]. En cas de cancer il se produit, soit la perte de la fonction d'apoptose, soit le déséquilibre entre la division cellulaire et la mort cellulaire. Par conséquent, l'induction de l'apoptose dans les cellules tumorales est l'un des mécanismes les plus importants des thérapies antitumorales. Il s'agit d'un moyen de contrôler la prolifération et l'inhibition de la progression du cancer.

Les mécanismes d'actions des composés ophidiens comprennent entre autre, l'action toxique directe, la génération de radicaux libres (LAAOs), l'augmentation de l'influx de  $Ca^{2+}$ , la libération du cytochrome C, l'augmentation ou la diminution de l'expression de protéines qui contrôlent le cycle cellulaire, la défibrination (sérine-protéase), etc. [254] [253].



Figure 79 : Mécanisme d'action sur la cellule tumorale [165]

De nombreuses familles de composés ophidiens agissent par inhibition des intégrines. Les intégrines sont des récepteurs de surface cellulaire qui jouent un rôle primordial dans l'adhésion, la migration, la prolifération, l'organisation et la croissance cellulaire, l'invasion, la survie, l'angiogenèse ainsi que dans l'hémostase et les réponses inflammatoires, de sorte qu'ils sont à l'étude pour le développement de médicaments anti-cancéreux [103] [258].

**L'effet sur l'angiogenèse en particulier suscite un grand intérêt.** Certains agents sont connus pour montrer une activité anti-angiogénique et anti-tumorale par leur capacité à interagir avec des intégrines distinctes exprimées dans les cellules endothéliales angiogéniques de la vascularisation tumorale. Les intégrines sont en effet essentielles dans le processus multi-étape complexe d'angiogenèse qui est maintenant devenu une cible majeure pour le développement des thérapies anticancéreuses [259].

L'angiogenèse est la formation de nouveaux capillaires à partir de vaisseaux sanguins préexistants. Il s'agit d'un processus physiologique fondamental pour la guérison normale, la reproduction et le développement embryonnaire. Cependant, ce processus est aussi important dans la pathogénie d'une large gamme de troubles dont fait partis le cancer. Les vaisseaux sanguins sont des structures complexes qui sont essentiels pour la survie de tous les tissus, y compris les tumeurs solides. Ils permettent l'apport des substances nutritives et de l'oxygène indispensable à la croissance et proliférations migration et différenciation des cellules tumorales.

La cellule endothéliale microvasculaire recrutée par la tumeur est donc devenue une cible importante dans la thérapie contre le cancer, elle présente aussi l'avantage d'être génétiquement stable.

De nombreux composants anti-angiogéniques ciblant les récepteurs de l'intégrine ont été isolés des venins ophidiens. Parmi ces peptides, la famille des **désintégrines** est la première à avoir été caractérisée. Elle est aussi la plus largement étudiée. Certaines **métallo-protéases** possèdent aussi des propriétés anti-angiogénique. Plus récemment, il a été démontré que **des lectines de type C** ainsi que des **phospholipases A2** présentaient également des propriétés anti-angiogéniques [259].

Un certain nombre de facteurs anti-angiogéniques sont actuellement testés dans des essais cliniques.

### 1) Les désintégrines.

Largement représentées au sein des venins de serpent, les **désintégrines ophidiennes ont fait l'objet de nombreuses études dans le développement de nouveaux agents anticancéreux.** Elles agissent par inhibition de grands médiateurs des interactions cellule-cellule et cellule-matrice, que sont les intégrines. Comme les intégrines sont fortement impliqués dans la survie des cellules cancéreuses, les désintégrines qui les ciblent sont très utiles pour la recherche et le développement de nouveaux médicaments anti-cancéreux et pourraient même devenir une nouvelle classe d'agents antitumoraux. Elles ont particulièrement été étudiées pour leurs puissants **effets inhibiteurs sur l'angiogénèse**, en plus de leur intérêt dans l'inhibition de l'agrégation des plaquettes. La plupart des désintégrines ont également la **capacité d'inhiber l'adhésion, la migration et l'invasion cellulaire** ce qui a grandement stimulé les chercheurs à étudier ces protéines comme **inhibiteurs de la dissémination des cellules tumorales** [260].

Elles peuvent cibler des intégrines spécifiques et, à ce titre, il est concevable qu'elles puissent interférer dans des processus importants impliqués dans la **carcinogénèse**, la **croissance tumorale**, la **motilité**, l'**invasion**, la **migration**, l'**angiogénèse**, la **différenciation** et la **métastase** [258].

La liaison des intégrines à leurs ligands extracellulaires apparentés, tels que le collagène, la laminine et la fibronectine cellulaire, déclenche des voies de signalisation intracellulaire qui contrôlent l'organisation du cytosquelette, la polarité cellulaire et la force de génération. **Par conséquent, les désintégrines ophidiennes qui inhibent l'adhésion cellulaire à médiation par intégrine, inhibent aussi la migration des cellules.** L'adhésion et la migration des cellules sont des étapes cruciales pour le développement des métastases, processus dans lesquels les intégrines sont fortement impliquées. Les désintégrines ophidiennes ont montré qu'elles **inhibaient les métastases en bloquant efficacement les activités de l'intégrine.** Le manque de spécificité de ces molécules semble être un facteur positif dans l'inhibition de l'adhésion cellulaire [260].

**Les désintégrines sont capables d'inhiber les fonctions des cellules exprimant les intégrines  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 5$ ,  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 3$  et  $\alpha IIb\beta 3$ .** Cette inhibition empêche les cellules cancéreuses d'envahir les matrices artificielles des tissus connectifs et d'adhérer aux ligands natifs (fibronectine, vitronectine, collagène de type IV, fibrinogène, VCAM-1 et laminine)

**Les désintégrines monomériques et homodimériques de type RGD** inhibent l'adhésion et la migration des cellules endothéliales dépendantes du récepteur  $\alpha v\beta 3$ . On peut citer l'exemple de l'accutine, la triflavine, la salmosine la rhodostomine et la contortrostatine. Cette inhibition est induite par un mécanisme apoptotique des cellules endothéliales. **Le rôle des intégrines  $\alpha v\beta 3$  dans le processus angiogénique sont bien documentés.** Récemment, **des essais cliniques** ont été réalisés utilisant des antagonistes des intégrine  $\alpha v\beta 3$  dans la thérapie contre le cancer.

**La famille des désintégrines la plus récemment décrite est celle qui possède le motif d'adhésion KTS.** Les protéines appartenant à cette famille **agissent sphériquement à travers l'intégrine  $\alpha 1\beta 1$ , récepteur septique du collagène de type IV.** Cette intégrine est exprimée essentiellement à la surface des cellules endothéliales vasculaires, suggérant son implication dans l'angiogenèse.

La corrélation entre l'étude génétique et l'étude pharmacologique évalue l'importance de l'intégrine  $\alpha 1\beta 1$  dans les processus angiogéniques qui pourrait donc être une cible pharmacologique pour bloquer le développement tumoral. L'obtustatine, la viperistatine, la lebestatine et la jerdostatine sont des désintégrines monomériques courtes qui agissent via ce récepteur.

Dans les stratégies anti angiogéniques, l'idée est de cibler les cellules endothéliales qui supportent la croissance tumorale plutôt que les cellules cancéreuses elles-mêmes. Cette approche est particulièrement prometteuse car elle cible des cellules génétiquement stables, ce qui limite l'apparition d'une résistance [70].

Comme vu précédemment, les désintégrines possèdent des affinités significativement différentes envers les divers sous-types de récepteurs intégrine via leur motif tripeptide bioactif spécifique. Il est intéressant de déterminer quel groupe pourrait générer une nouvelle classe d'agent anti-tumorale.

Désintégrines	Serpents	Motif actif	Intégrines cible	Effets physiologiques
Triflavin	Trimeresurus flavoviridis	RGD	$\alpha 5\beta 1$	Inhibe adhésion cellules tumorales à la matrice extra cellulaire.
			$\alpha \nu \beta 3$	Inhibe migration et angiogenèse in vitro et in vivo
			$\alpha 3\beta 1$	Induit l'apoptose
Rhodostomin	Agkistrodon rhodostoma	RGD	$\alpha \nu \beta 3$	Inhibe migration cellulaire, invasion des cellules endothéliales. Inhibe l'angiogenèse in vivo et in vitro
Contortrostatin	Agkistrodon contortrix	RGD	$\alpha \nu \beta 3$ $\alpha 5\beta 1$ $\alpha \nu \beta 5$ $\alpha II\beta 3$	Empêche adhésion, migration et invasion par différents types de cellules tumorales
Lebestatin	Macrovipera lebetina	KTS	$\alpha 1\beta 1$	Inhibe migration cellulaire et angiogenèse
Accurhagin-C	Agkistrodon acutus	DPE	$\alpha \nu \beta 3$	Limite migration et invasion des cellules endothéliales.
				Inhibe activité angiogénique in vitro et in vivo.
				Induit une mort cellulaire
Esristostatin	Eritocophis macmahoni	RGD	$\alpha 4\beta 1$	Inhibiteur de la motricité cellulaire. Sans effet sur la prolifération cellulaire ou l'angiogenèse
DisBa-01	Bothrops alternatus	RGD	$\alpha \nu \beta 3$	Effet anti angiogénique et anti métastatique sur les cellules de mélanomes
Leberagin-C	Macrovipera lebetina	DPE	$\alpha \nu \beta 3$	Inhibition de l'adhésion des cellules de mélanome
Accutin	Agkistrodon acutus		$\alpha \nu \beta 3$	Inhibiteur de l'angiogenèse in vitro et in vivo et inducteur de l'apoptose

Tableau 8 : Effets des extraits du venin ophidien sur les cellules cancéreuses (Sarray S et al. 2013)

### a) Triflavine.

La première désintégrine à avoir montré de puissantes propriétés anti-angiogénique est la trivafline isolée du venin de *Trimeresurus flavoviridis* (actuellement *probothrops flavoviridis*). Il s'agit d'un polypeptide monocaténaire (7,6 kDa), constitué d'environ 71 résidus qui contient le motif tripeptide RGD (Arginine-Glycine-Aspartate) essentiel à son activité [261]. La triflavine exerce son action de manière dose-dépendante. Elle a montré son efficacité au niveau de l'inhibition de l'adhésion cellulaire. Chez la souris, elle a par exemple inhibée l'adhésion des cellules de mélanome B16-F10 à la matrice extracellulaire (fibronectine, fibrinogène, vitronectine et collagène de type I) en se liant directement et principalement via son motif RGD, aux récepteurs exprimés sur la surface des cellules B16-F10 [262]. La triflavine **inhibe également l'agrégation plaquettaire induite par les cellules tumorales (B16-F10)** en bloquant la liaison du fibrinogène aux récepteurs du fibrinogène associés au complexe glycoprotéique GPIIb/IIIa sur la surface des membranes plaquettaires [261]. Plusieurs études ont montré que la triflavine **inhibe la colonisation pulmonaire** induite par les cellules de mélanome B16-F10 chez les souris. L'effet inhibiteur de la triflavine **sur l'adhérence des cellules tumorales à la MEC** (fibronectine, vitronectine et collagène de type I) **et/ou sur l'agrégation plaquettaire induite par les cellules tumorales** peut être partiellement responsable de **son activité anti métastatique** chez la souris [172] [263].

À la suite de la découverte des effets de cette molécule, de nombreuses autres désintégrines ayant un intérêt dans l'inhibition de la prolifération tumoral, de l'angiogenèse et des métastases ont été identifiées dans plusieurs venins de serpents.

## b) Contorstrostatine.

La contorstrostatine est une désintégrine extraite du venin de la vipère cuivrée Nord-américaine *Agkistrodon contortrix contortrix*. Il s'agit d'un homodimère de 13,5 kDa, chacune des 2 chaînes monomériques est composée de 65 acides aminés et portes un motif RGD à l'extrémité d'une boucle flexible stabilisée par des liaisons disulfure. Les deux motifs RGD interagissent avec les intégrines des cellules tumorales et des cellules vasculaires endothéliales angiogéniques. La contorstrostatine exerce son action anti-tumorale en interagissant avec les intégrines  $\alpha\nu\beta 3$ ,  $\alpha\nu\beta 5$ ,  $\alpha 5\beta 1$  et  $\alpha IIb\beta 3$  [264] [265] [258].

Particulièrement bien étudiée, la contorstrostatine fournit un modèle exemplaire de désintégrine médiant l'inhibition de l'angiogénèses. C'est également un agent efficace pour limiter la croissance et la propagation de la tumeur [266]. Elle permet en effet, d'inhiber l'adhésion de nombreux types de cellules cancéreuses aux protéines de structure, ce qui les empêche de traverser les membranes basales bloquant ainsi leur dispersion dans l'organisme. Cette propriété est partagée par plusieurs désintégrines de Viperidae qui pourraient ainsi limiter le processus métastatique à l'origine de la dissémination des cellules cancéreuses dans l'organisme.

La contorstrostatine a par exemple fortement inhibé l'adhérence du mélanome métastatique humain (M-24 mét) à la matrice extracellulaire et *in vivo*, ainsi que la colonisation des cellules des poumons. **La contorstrostatine a également inhibée la croissance tumorale et l'angiogénèse et prolonger la survie des souris atteintes de gliome** [265]. Elle a également fait l'objet de plusieurs études précliniques, *in vitro* et *in vivo*, pour traiter le cancer du sein et le cancer des ovaires qui reste aujourd'hui de mauvais pronostique.

## 1. Cancer du sein ( $\alpha V\beta 3$ POSTIF).

Des études in vivo en utilisant la lignée cellulaire de cancer du sein métastatique humain MDA-MB-435 dans un modèle de xénogreffe orthotopique chez la souris, a révélé que la contortrostatine **possède de puissantes activités antitumorales et anti-angiogéniques**. Des injections quotidiennes de contortrostatine dans la tumeur greffée chez des souris, **montrent une inhibition de la croissance des cellules tumorales, de l'angiogenèse et du processus métastatique** en réduisant le nombre de micro- et macro-métastases pulmonaires. **La contortrostatine démontre aussi une bonne tolérance par l'absence d'effets indésirables majeurs** [264] [267] [70].

La contortrostatine se lie aux intégrines et bloque l'adhérence des cellules cancéreuses humaines du sein à la matrice extracellulaire (ECM) des protéines, y compris la fibronectine et la vitronectine, mais il n'a aucun effet sur l'adhérence des cellules à la laminine et le matrigel. La contortrostatine empêche également l'invasion de cellules cancéreuses du sein à une membrane basale artificielle (in vitro).

**L'intégrine  $\alpha v\beta 3$  importante dans la médiation de la motilité cellulaire et l'invasion tumorale, a été identifiée comme l'un des sites de liaison de la contortrostatine sur les cellules cancéreuses du sein (MDA-MB-435) [267]. La contortrostatine n'est pas cytotoxique pour les cellules cancéreuses, et ne limite pas la prolifération des cellules cancéreuses du sein in vitro. Cependant elle inhibe l'angiogenèse induite par le cancer du sein.**

La méthode d'administration intraveineuse sous forme liposomale de la contortrostatine plus adapté pour une application clinique a été étudié dans les mêmes conditions. En comparaison à l'administration de la contortrostatine non encapsulé, cette méthode présente plusieurs avantages dont une demi-vie circulatoire significativement prolongée, une accumulation passive dans la tumeur et une diminution des effets secondaires, il n'y a aucune réactivité plaquettaire et elle n'est pas reconnu par le système immunitaire. Ainsi, sous forme liposomale, la contortrostatine conserve une activité biologique anti angiogénique complète [268].

## **2. Tumeur ovarienne ( $\alpha$ V $\beta$ 3 négatif, $\alpha$ v $\beta$ 5 positive).**

Une autre étude effectuée chez des souris sur lesquelles une tumeur ovarienne humaine a été greffée a permis à nouveau de mettre en évidence la propriété d'inhibition de la propagation lors de l'administration intrapéritonéale de la contortrostatine : La contortrostatine bloque efficacement l'adhérence des cellules OVCAR-5 à plusieurs protéines de la matrice extracellulaire et inhibe l'invasion des cellules tumorales à travers une membrane basale artificielle. Elle a non seulement inhibé de manière significative la dissémination du cancer des ovaires chez le modèle de souris, mais elle a aussi considérablement empêché le recrutement des vaisseaux sanguins vers les tumeurs au niveau des sites secondaires [269].

Cependant l'administration intra-tumorale n'étant pas transposable pour une application clinique, un procédé d'administration plus pertinent a été développé. Ce procédé est l'administration intraveineuse de la contortrostatine sous forme liposomale. La forme liposomale permet de maintenir un effet thérapeutique sur une longue période, de diminuer la fréquence des prises, d'augmenter la demi-vie de la contortrostatine et de diminuer la réponse immunitaire chez un individu donné [266].

Des études chez des souris sur lesquelles une tumeur humaine ovarienne a été greffée, démontrent que l'administration intraveineuse de la contortrostatine sous forme liposomale a la même efficacité anti-tumorale et anti-angiogénique que l'administration intra-tumorale de la contortrostatine et présente en plus les avantages liés à cette forme [264] [268].

A partir de ces résultats encourageant des études sur la contortrostatine liposomale ou non, une version recombinante chimérique de la contortrostatine a été synthétisée : La vicrostatine.

### 3. Vicrostatine.

La vicrostatine est une protéine de fusion formée de la contortrostatine et de la partie C-terminale de l'échistatine une autre désintégrine issue du venin de Viperidae. Cette dernière permet d'améliorer l'affinité de la contortrostatine pour les intégrines. Facilement reproductible, la vicrostatine est capable d'inhiber de multiples cibles d'intégrine (différentes), réalisant ainsi un puissant effet anti-angiogénique et pro-apoptotique [270].

Une étude réalisée *in vitro* sur des cellules de cancer du sein et des cellules endothéliales de la veine de cordon ombilical humain, a permis de démontrer que la vicrostatine, tout comme la contortrostatine, possède un effet d'inhibition sur la motilité de ces cellules. La vicrostatine exerce un effet inhibiteur dose-dépendante sur la migration des cellules endothéliales en forçant ces cellules à subir une importante réorganisation du cytosquelette d'actine. En outre, VCN a un effet direct sur les cellules cancéreuses du sein inhibant leur motilité *in vitro* [270].

De la même façon que la contortrostatine, l'administration intraveineuse de la forme liposomale de la vicrostatine a été étudié *in vivo*. La première étude effectuée chez des souris sur lesquelles une tumeur humaine du sein a été greffée, a démontré que la forme liposomale de la vicrostatine retardait la croissance de la tumeur tout en exerçant un effet anti-angiogénique [271]. Par ailleurs une deuxième étude a permis de confirmer un retard de croissance de la tumeur et de démontrer une augmentation de la survie des souris chez lesquelles la forme liposomale de la vicrostatine a été administrée. L'étude démontre que la vicrostatine sous forme liposomale est bien tolérée, son administration par voie intraveineuse induisant un retard important dans la croissance tumorale et une augmentation de la survie des animaux, des résultats qui peuvent être partiellement expliquée par une tumeur à effets apoptotiques puissants [270]. Il a ainsi été démontré *in vitro* et *in vivo* que la vicrostatine administrée sous sa forme liposomale ou non, conserve les mêmes propriétés anti-tumorale et anti-angiogénique que la contortrostatine.

Outre ces études précliniques effectuées *in vitro* et *in vivo* chez la souris, la vicrostatine ainsi que sa forme liposomale n'ont actuellement pas fait l'objet d'étude clinique proprement dite. Néanmoins, les résultats obtenus lors de ces études précliniques démontrent que les désintégrines ophidiennes ainsi que leur forme recombinante sont des molécules qui peuvent constituer un point de départ pour le développement de nouvelles thérapies anti-cancéreuses chez l'homme.

### c) Eristostatine.

Les résistances développées par les mélanomes malins aux différentes chimiothérapies ont incité les chercheurs à expérimenter des voies thérapeutiques toujours nouvelles. Depuis plusieurs années, l'attention de la recherche se porte sur les propriétés particulières de l'éristostatine : une désintégrine anticoagulante à motif RGD extraite du Viperidae désertique *Eristicophis macmahoni* qui inhibe l'agrégation plaquettaire en **interagissant avec l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3** situé à la surface des plaquettes [272].

L'éristostatine s'est avérée être un inhibiteur puissant des métastases du mélanome humain et murin dans les systèmes modèles de souris **par inhibition de la liaison entre l'intégrine  $\alpha$ 4 $\beta$ 1** et la protéine d'adhésion des cellules vasculaires VCAM1. L'éristostatine **n'a aucun effet sur la prolifération cellulaire ou l'angiogenèse mais agit sur la motilité des cellules de mélanome**. Elle **inhibe** en particulier la **migration cellulaire de la fibronectine** qui est un **composant important** de la **matrice extracellulaire part un effet à médiation des intégrines** liant la fibronectine. Elle ne réagit ni avec le récepteur intégrine de la vitronectine  $\alpha$ V $\beta$ 3, ni avec celui de la fibronectine  $\alpha$ 5 $\beta$ 1, du collagène IV ou de la laminine chez toutes les lignées cellulaires testées à une exception près [273] [260].

Il est supposé que l'éristostatine inhibe la métastase de mélanome par inhibition de migration cellulaire sur fibronectine [273]. En effet à des concentrations nano molaire la molécule permet d'induire une destruction des cellules des métastases du mélanome sans action cytotoxique directe. En adjoignant aux traitements existants de très faibles quantités d'éristostatine chez des souris atteintes d'une catégorie particulière de mélanome, les scientifiques sont parvenus à **réduire significativement la prolifération des cellules cancéreuses vers les poumons et le foie** et donc les métastases.

L'éristostatine a provoqué une protection significative des souris immunodéficientes (47-57%). Les cellules de mélanome peuvent modifier l'expression du ligand NKG2D afin d'échapper au ciblage des cellules tueuses naturelles. Les tests de cytotoxicité suggèrent que l'éristostatine rend les cellules de mélanome une meilleure cible pour la lyse par des cellules tueuses naturelles humaines [272].

Pour déterminer les cas dans lesquels une thérapie par éristostatine pourrait être généralisée, des chercheurs ont évalué avec une rigueur micrométrique les interactions existantes entre l'éristostatine et six types de mélanomes. Les essais de liaison directe utilisant la microscopie à force atomique montrent que l'éristostatine lie la surface des six lignées cellulaires de mélanome testées de manière spécifique. L'affinité est réalisée dans les six cas étudiés, et sur bien plus de marqueurs de surface jusqu'alors. La liaison à l'éristostatine semble être médiée par des interactions intégrines mais cela ne semble pas être le seul récepteur de surface impliquée. L'hypothèse initiale ne concernait en effet qu'un seul type de liaison, quatre familles d'interactions sont en réalité en jeu. **Cette double découverte démontre la possibilité d'utiliser de faibles quantités de venin pour cibler très précisément l'immense majorité des mélanomes. L'éristostatine confirme ainsi peu à peu son statut de médicament dans la lutte contre les mélanomes malins** [258].

#### d) Salmosine.

La salmosine est une désintégrine comprenant une séquence RGD isolée du venin d'*Agkistrodon brevicaudus* qui **inhibe** de manière significative l'**agrégation plaquettaire**, la **prolifération** des **cellules endothéliales** induites par le facteur de croissance des fibroblastes et supprime la progression des tumeurs en **inhibant** fortement l'**angiogenèse**, l'**adhésion**, la **prolifération** des **cellules tumorales** et les métastases. Elle exerce ses effets antitumoraux en bloquant la fonction des intégrines  **$\alpha 2\beta 3$**  et  **$\alpha v$  ( $\alpha v\beta 3$ )** [274].

La salmosine ne présente pas de cytotoxicité dans une plage de dose efficace où la croissance tumorale est efficacement supprimée, sans effet indésirable sur les vaisseaux sanguins préexistants et une angiogenèse normale. Ainsi, la salmosine peut être utilisée pour le développement de médicaments antitumoraux puissants, efficaces contre divers types de cancers [275].

Etant donné qu'il est très difficile de maintenir un niveau thérapeutique de salmosine dans le sang par administration systémique quotidienne de la protéine, **une autre stratégie de thérapie anti angiogénique contre le cancer, basée sur l'expression *in vivo* du gène de la salmosine administrée avec des liposomes cationiques, a été proposée et étudiée.**

Les peptides de salmosine exprimés *in vitro* ont inhibé la prolifération des cellules endothéliales capillaires bovines de manière dose-dépendante, probablement en raison de l'inhibition de l'adhésion cellulaire médiée par l'intégrine  $\alpha\beta3$ . L'administration sous-cutanée du gène de la salmosine a donné lieu à une expression systémique du produit du gène et à une inhibition concomitante de la croissance des cellules de mélanome B16BL6. La suppression spontanée des métastases pulmonaires, vérifiée par des modèles de métastases expérimentaux, chez la souris, est aussi le résultat du traitement des gènes de la salmosine. **Ces résultats suggèrent que l'administration du gène de la salmosine complexé aux liposomes cationiques est efficace pour maintenir la salmosine anti angiogénique à un niveau thérapeutique efficace et peut être cliniquement applicable à la thérapie génique anticancéreuse [276] [258].**

#### e) Rhodostomine.

La rhodostomine est une désintégrine contenant un motif RGD extraite du venin de *Calloselasma rhodostoma rhodostoma*. In vivo, elle inhibe sélectivement l'angiogenèse induite par le facteur basique de croissance des fibroblastes (bFGF) mais n'inhibe pas celle associée au facteur de croissance vasculaire endothélial (VEGF), elle supprime aussi la croissance de la tumeur du mélanome murin B16-F10, ce qui conduit à une survie prolongée des souris traitées. **L'effet anti-angiogénique de la rhodostomine est lié à l'inhibition de l'intégrine  $\alpha\beta3$  [277].**

L'effet de la rhodostomine a été étudié sur la lignée cellulaire d'ostéosarcome, ROS 17/2.8. L'ostéosarcome est une tumeur osseuse maligne qui a un haut potentiel métastatique et habituellement de mauvais pronostic. L'incubation avec de faibles concentrations de thrombine a élevé l'activité d'adhérence de ROS 17/2.8 à la fois aux cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (HUVEC) et à la fibronectine de la matrice extracellulaire par une régulation positive des intégrines  $\beta3$ . La rhodostomine est alors capable de bloquer l'adhésion des cellules d'ostéosarcome (ROS 17/2.8). L'adhésion des cellules tumorales à l'endothélium ou à la matrice extracellulaire (ECM) est une étape essentielle du processus métastatique. **En conclusion la rhodostomine peut servir d'agent anti-métastatique puissant par le blocage des effets de la thrombine qui augmente le potentiel d'adhérence cellulaire [101] [258] [278].**

## **2) Les métallo-protéases, la jararhagine.**

Le domaine désintégrine de certaines métallo-protéases se lie aux récepteurs intégrine des cellules tumorales, bloquant la migration, l'invasion et la métastatisation [279]. Une métalloprotéase en particulier, la jararhagine représente aujourd'hui une véritable alternative potentielle au traitement déjà existant en tant qu'agent thérapeutique pour le traitement des mélanomes avancés.

La jararhagine est une métalloprotéase principalement hémorragique extraite du venin de serpent *Bothrops jararaca*. Elle agit sur plusieurs processus biologiques dont la coagulation sanguine et l'agrégation plaquettaire en agissant sur l'endothélium vasculaire, les facteurs de coagulation et les plaquettes. Elle exerce également une action sur d'autres systèmes cellulaires comme les cellules inflammatoires et leurs médiateurs, la signalisation cellulaire, la douleur ainsi que **le cancer en agissant sur la prolifération cellulaire et l'apoptose.**

De récentes études ont démontré l'action de la jararhagine sur les cellules de mélanome. La jararhagine exerce des effets apoptotiques et nécrotiques et diminue le taux de prolifération des cellules. Elle induit des changements morphologiques des cellules tumorales (acquisition de formes rondes, perte des extensions cytoplasmiques, formation de grappes en suspension, etc.), une augmentation de l'activité Caspase-3 tandis que la phase du cycle cellulaire G0 / G1 est en déclin. **Chez les souris injectées avec des cellules prétraitées, elle diminue la viabilité des cellules de mélanome murin (B16F10) (in vivo) et humain (SK-Mel-28) (in vitro) ainsi que le nombre de métastases.** Le traitement à des doses sub-toxiques induit des altérations morphologiques similaires dans les cellules normales et tumorales, avec des valeurs de CI 50 plus élevées pour les fibroblastes. A une concentration appropriée, la jararhagine peut avoir des effets apoptotiques et suppressifs sur les cellules SK-Mel-28, plutôt que sur les fibroblastes, et peut être utilisée pour développer des médicaments anticancéreux potentiels [279].

Le traitement in vivo des toxines a été observé dans une réduction de l'incidence des nodules et des métastases et une capacité d'inhibition antiproliférative. Ces données renforcent l'utilisation potentielle de jararhagine comme médicament antinéoplasique [280].

### 3) Lectine de type C.

La découverte de nouvelles activités antitumorales et anti-angiogéniques chez certaines lectines de type C (tel que la lébécétine, lébectine, BJcuL, etc.) ouvrent de nouvelles perspectives thérapeutiques dans le domaine de traitement des cancers [77]. Ces lectines de types C bloquent **l'adhérence**, la **migration**, la **prolifération** et **l'invasion** des différentes lignées de cellules cancéreuses. Elles ont également un puissant **effet anti-angiogénique** in vivo et in vitro en **interagissant avec les intégrines des cellules endothéliales** [77] [255]. **Ce sont des agents anticancéreux potentiels en raison de leur capacité à reconnaître, tuer et supprimer des caractéristiques communes aux lignées cellulaires tumorales lors de la progression du cancer.**

**Les lectines de type C agissent sur ces processus biologiques via les intégrines ( $\alpha\alpha3$  et  $\alpha5\beta1$ ). Certaines lectines de type C présentent une cytotoxicité spécifique envers des lignées de cellules tumorales.** Les altérations génétiques dans les cellules tumorales malignes sont associées à des changements dans leurs schémas de glycosylation par rapport aux cellules normales, qui comprennent une expression accrue de séquences glucidiques terminales inhabituelles. **Certaines lectines sont capables d'induire une toxicité contre une grande variété de lignées de cellules tumorales par la reconnaissance des motifs glycoconjugués de la membrane.** Pour la plupart la mort cellulaire a été induite par des signaux apoptotiques.

#### a) BIL.

BIL, une lectine de type C à liaison au galactose isolée du venin de *Bothrops leucurus*, présente une activité anticancéreuse. **Elle provoque une mort cellulaire sélective du mélanome B16-F10 par dysrégulation de l'homéostasie cellulaire calcique et de l'ouverture induite par le  $Ca^{2+}$  des pores de transition de perméabilité mitochondriale (MPT).** En effet, la nécrose B16-F10 induite par BIL a été précédée d'une augmentation significative (2 fois) des concentrations de calcium cytosolique et d'une augmentation significative (3 fois) de la production de superoxyde mitochondrial. Il est probable que le traitement par BIL déclenche la mort de la cellule B16-F10 via l'ouverture des pores de transition de perméabilité mitochondriale (MPT) car les inhibiteurs pharmacologiques ont fortement atténué la mort cellulaire induite par BIL.

Le traitement par BIL augmente les niveaux de calcium cytosolique et provoque la mort nécrotique de manière dose-dépendante dans les cellules de mélanome B16-F10 par la transition de perméabilité mitochondriale. À l'inverse, la viabilité des cellules (kératinocytes) HaCaT non-tumorigènes ne sont pas été affectée par des doses similaires de BIL [281].

### **b) Lebécétine et Lébectine.**

**La lebécétine et lébectine purifiées à partir du venin de *Macrovipera lebetina*, sont pourvues d'un effet antitumoral évident, en plus de leur effet antiagrégants sur les plaquettes, ce qui pourrait en faire un agent efficace dans les thérapies anti angiogéniques ciblant les tumeurs cérébrales [300]. Ces deux lectines inhibent l'adhésion de diverses lignées de cellules cancéreuses : cellules de mélanome (IGR39), d'adénocarcinome (HT29-D4), de fibrosarcome (HT1080) et des cellules leucémiques (K562) sur différentes protéines de la MEC. Elles inhibent également leur prolifération leur migration et leur invasion en agissant sur les intégrines  $\alpha v$  et  $\alpha 5\beta 1$ . L'effet de ces 2 lectines, ne se limite pas aux plaquettes et aux cellules cancéreuses, elles bloquent aussi l'angiogenèse tumorale en interagissant directement avec les intégrines des cellules endothéliales. Observé à la fois in vitro et in vivo, ces effets requièrent une interaction directe avec les intégrines  $\alpha v\beta 3$ ,  $\alpha v\beta 5$  et  $\alpha 5\beta 1$ , principaux récepteurs de la vitronectine et de la fibronectine essentielle à l'angiogenèse [77].**

En ce qui concerne les mécanismes de signalisation intracellulaire de la mort cellulaire la lectine augmente la perméabilité de la membrane mitochondriale externe et induit une diminution de la respiration, ce qui induit une augmentation des concentrations de calcium dans le cytosol et la génération de superoxyde mitochondriale, favorisant l'ouverture de pores de transition mitochondriales et conduisant à terme à la mort cellulaire par nécrose.

La lébectine fait l'objet de recherche pour lutter contre le cancer et en particulier dans le développement de traitement des tumeurs cérébrales. La lébectine inhibe très efficacement l'adhérence et la migration des cellules endothéliales cérébrales humaines HBMEC sur la fibronectine et la vitronectine. Elle bloque aussi la tubulogenèse des cellules HBMEC sur Matrigel™, et ce, à des concentrations de l'ordre du nanomolaire. Du point de vue moléculaire, la lébectine interagit spécifiquement avec les intégrines  $\alpha v$  et  $\alpha 5\beta 1$  à la surface des cellules HBMEC. Cette interaction bloque les fonctions d'adhérence de ces intégrines, ce qui explique les effets anti angiogéniques de la lébectine. L'angiogenèse est très fortement inhibée in vivo.

### c) BJcuL.

La BjcuL issue du venin de *Bothrops jararacussa*, a été également décrite pour son pouvoir antitumoral, mais le récepteur ou l'intégrine mis en jeu n'est pas encore élucidé. Cette protéine, homodimérique de 29 kDa, inhibe la prolifération de plusieurs lignées cellulaires d'origine rénale, pancréatique, prostatique et de mélanome mais aucun effet n'a été observé sur les cellules de cancer de colon ou du sein. BJcuL semble capable d'inhiber l'adhérence aux tissus de nombreuses lignées de cellules cancéreuses. La BjcuL affecte aussi la viabilité de certaines lignées de cellules tumorales d'origines diverses conduisant à l'apoptose. Elle est toxique à des concentrations supérieures à 1µM [77].

### d) Rhodocétine, EMS16 et VP12.

L'intégrine  $\alpha 2\beta 1$  (GPIa/IIa) est un récepteur du collagène. Elle est présente au niveau des plaquettes et certaines lignées de cellules cancéreuses. Plusieurs lectines de type C (Rhodocétine, EMS16 d'*Echis multisquamatus*, VP12) agissent via cette intégrine en empêchant son interaction avec le collagène. Elles inhibent ainsi l'agrégation plaquettaire et l'adhésion de certaines lignées de cellules cancéreuses (HUVEC par exemple) à leur MEC ainsi que leur migration [77].

La rhodocétine, qui possède une structure hétérodimérique est un antagoniste sélectif de l'intégrine  $\alpha 2\beta 1$ . Elle se lie au récepteur GPIb, cependant, sa cible principale est le domaine I de la sous-unité  $\alpha 2$  de l'intégrine  $\alpha 2\beta 1$ , entraînant une inhibition de l'agrégation plaquettaire [77]. Avec la EMS16 et la VP12, la rhodocétine inhibe la liaison du collagène au domaine  $\alpha 2A$ . Ces antagonistes spécifiques de l'intégrine sont des structures de plomb pour le développement de médicaments anti-métastatiques et anti angiogéniques [80].

### e) Rhodocytine.

La rhodocytine (appelée également aggrétine) est une lectine de type C isolée du venin de la vipère asiatique *Calloselasma rhodastoma*. Il s'agit d'une protéine pro-agrégante plaquettaire qui requiert, en plus de l'intégrine  $\alpha 2\beta 1$ , le récepteur GPIb pour activer les plaquettes. **Cette lectine ne possède pas de propriétés anti-cancéreuses ou anti-angiogéniques, bien au contraire, elle possède des activités pro-angiogéniques (in vivo et in vitro), et active la**

**prolifération et la migration des cellules endothéliales de type HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cell).** Cependant **la rhodocytine a permis de découvrir une interaction moléculaire importante d'une part pour la coagulation, et d'autre part pour la propagation de certains cancers.** Ces activités pourraient également être exploitées pour élucider l'implication de **l'intégrine  $\alpha 2\beta 1$**  dans le processus de l'angiogenèse [77].

La rhodocytine est capable d'induire l'agrégation des plaquettes via un récepteur à la surface des plaquettes sanguines nommé CLEC-2 (C-type lectin receptor-2), cela a permis d'identifier une interaction entre CLEC-2 et une protéine qui aide à la propagation du cancer nommé « podoplanine ». **Exprimée à la surface des cellules cancéreuses, la podoplanine recrute les plaquettes, créant une sorte de bouclier autour de la cellule tumorale qui la protège du système immunitaire.** La cellule peut ainsi se fixer aux parois du vaisseau sanguin, puis former des métastases et finalement se propager à l'ensemble de l'organisme.

La podoplanine est aussi connue pour être exprimée à la surface des cellules épithéliales lymphatiques (formant les parois des vaisseaux lymphatiques). Son absence chez des souris génétiquement modifiées mène à la non formation des vaisseaux lymphatiques. Également, l'absence de gène codant pour le récepteur CLEC-2 provoque chez la souris une anomalie de développement des vaisseaux sanguins et lymphatiques durant le développement fœtal, menant au décès prématuré des souris au stade embryonnaire. Ces résultats suggèrent que **l'interaction entre le récepteur CLEC-2 et la podoplanine est indispensable à la différenciation des vaisseaux lymphatiques.** A l'image de ce que l'on sait sur la néogenèse des vaisseaux sanguins induite par les tumeurs, les cellules tumorales pourraient également induire la formation des vaisseaux lymphatiques pour favoriser la propagation des cellules cancéreuses dans l'organisme. Cette induction pourrait se faire par le biais de l'interaction CLEC-2-podoplanine.

Une molécule qui bloque l'interaction « CLEC-2/podoplanine » serait en mesure d'inhiber tout au moins partiellement la propagation du cancer. Expérimentalement, **le blocage de la fixation de la podoplanine sur les plaquettes, grâce à un anticorps spécifique, a permis d'empêcher la propagation des métastases dans les poumons de souris.**

#### **4) Les phospholipases A2.**

Très abondante dans les venins ophidiens notamment chez les Viperidae, certaines PLA<sub>2</sub> montrent des activités anti-cancéreuses, anti-tumorale et anti-angiogénique par des mécanismes indépendants de leurs activité enzymatique. Les PLA<sub>2</sub> en général sont des enzymes prenant part à différentes voies biologiques telles que la croissance et la différenciation des cellules, mais alors que les PLA<sub>2</sub> des mammifères augmentent principalement la prolifération des cellules tumorales, certaines PLA<sub>2</sub> ophidiennes (svPLA<sub>2</sub>) sont capables de l'inhiber. Cet effet antiprolifératif des svPLA<sub>2</sub> a été découvert il y a près de deux décennies, cependant, sa base biochimique n'a jusqu'à présent pas été complètement élucidé [30] [282] [283].

##### **a) Mode d'action, généralités.**

Comme ce qu'on a pu voir précédemment, les PLA<sub>2</sub> catalysent directement l'hydrolyse des phospholipides cellulaires qui génèrent des lysophospholipides et des acides gras libres qui, à leur tour, provoquent des dommages à la membrane. Les lysophospholipides sont importants dans la signalisation cellulaire, le remodelage des phospholipides et la perturbation de la membrane. Certaines preuves indiquent que les PLA<sub>2</sub> hydrolysent la membrane cellulaire de diverses cellules cancéreuses [284]. La Bth-A-I-PLA<sub>2</sub> extraite du venin de *Bothrops jararacussu* exerce par exemple un effet anti-tumorale qui semble être lié avec le site enzymatique [30]. Cependant, l'effet antiprolifératif de certaines autres PLA<sub>2</sub> ne présente aucune corrélation directe avec la cytotoxicité et l'activité enzymatique de svPLA<sub>2</sub>. C'est le cas par exemple de la MVL-PLA<sub>2</sub> et CC-PLA<sub>2</sub> 1- et 2- extraite respectivement des vipères *Macrovipera lebetina* et *Ceraste ceraste*.

Bien que les produits de l'hydrolyse des phospholipides par les PLA<sub>2</sub> et leurs métabolites influencent plusieurs processus cellulaires, y compris la prolifération, les effets antiprolifératifs des svPLA<sub>2</sub> peuvent donc être réalisés par d'autres mécanismes dans lesquels les protéines de la membrane de surface cellulaire et les voies de transduction du signal intracellulaire participent [285]. Il a aussi été montré que les svPLA<sub>2</sub> antiprolifératives peuvent réaliser leurs effets par interaction avec les récepteurs du facteur de croissance nerveux NGF endogène.

Les svPLA<sub>2</sub> agissent sur l'angiogenèse par leur capacité à agir avec les intégrines exprimées dans les cellules endothéliales angiogéniques de la vascularisation tumorale.

L'application des svPLA<sub>2</sub> pour l'étude des effets antiprolifératifs peut stimuler la découverte d'un nouveau mécanisme biochimique pour l'inhibition de la croissance des cellules tumorales [285]. De plus, comme la carcinogenèse et l'hypercoagulation sont des phénomènes liés, les svPLA<sub>2</sub> possédant à la fois des propriétés antiprolifératives et anticoagulantes seraient des candidats prometteurs dans la recherche contre le cancer. Les PLA<sub>2</sub> peuvent être à l'origine du développement d'une nouvelle classe d'agents anticancéreux et fournir de nouvelles connaissances moléculaires et biologiques du développement du cancer [189].

**b) DssPLA<sub>2</sub> extraite du venin de *Daboia siamensis*.**

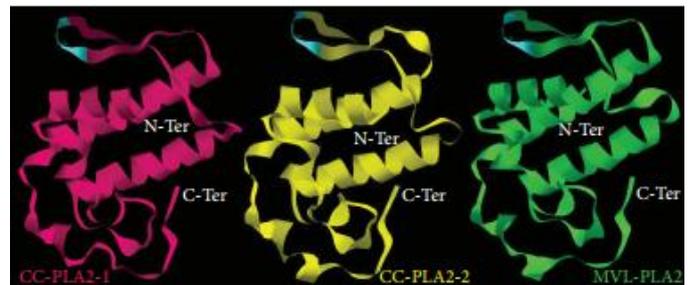
Les propriétés pharmacologiques de la PLA<sub>2</sub> extraite à partir du venin de *Daboia siamensis siamensis* (dss-PLA<sub>2</sub>) ont été explorées sur la lignée cellulaire de mélanome de peau humaine (SK-MEL-28). La dss-PLA<sub>2</sub> a présenté des propriétés cytotoxiques et anti-migratoires en plus de ses activités hémolytiques et anticoagulantes indirectes. En effet, elle a inhibé la migration des cellules de mélanome cutané humain SK-MEL-28 et réduit la colonisation des cellules de mélanome hautement métastatique (B16F10) dans les poumons de souris d'environ 65%. La dss-PLA<sub>2</sub> n'a en revanche montré aucune toxicité vis-à-vis des cellules normales de la peau. Ces résultats concordent avec un travail antérieur qui suggère que les toxines du venin ciblent spécifiquement les cellules cancéreuses sans affecter les normales. Ils indiquent aussi une différence de membranes cellulaires entre le cancer et les cellules normales, ce qui révèle la variation des domaines phospholipides dans différents types de cellules. De plus, les propriétés anticoagulantes de dss-PLA<sub>2</sub> peuvent également être utiles en empêchant la thrombose récurrente, qui est la deuxième cause de décès la plus commune chez des patients atteints de cancer [282] [255] [284].

**c) *Macrovipera lebetina* et *Ceraste ceraste* effet anti tumoral et anti-angiogénique via les intégrines.**

**Les deux isoformes de PLA<sub>2</sub> extraits de la vipère cornue *Cerastes cerastes*, CC- PLA<sub>2</sub> -1 (121aa, 14cyst, 13,7kDa) et CC- PLA<sub>2</sub> -2 (120aa, 14cyst, 13,7kDa) ; ainsi que la MVL- PLA<sub>2</sub> (122aa, 13,6kDa) extraite du venin de *Macrovipera lebetina*, possèdent des propriétés antitumorales et anti-angiogéniques puissantes et prometteuses (in vitro et in vivo). Les 3 PLA<sub>2</sub> ciblent et inhibent spécifiquement les intégrines  $\alpha 5\beta 1$  et  $\alpha v$  ( $\alpha v\beta 3$  en particulier) exprimées dans les cellules endothéliales angiogéniques de la vascularisation tumorale. Étant donné que les récepteurs d'intégrines  $\alpha 5\beta 1$  et  $\alpha v\beta 3$  sont des acteurs clés de l'angiogenèse tumorale, les 3 PLA<sub>2</sub> possèdent donc de puissantes propriétés anti-angiogéniques [30] [286] [259] [255].**

**1. Etude structure fonction.**

Les 3 PLA<sub>2</sub> présentent une structure fortement similaire. La présence d'une boucle contenant un motif RGD-like semblable aux désintégrines est fortement soupçonné :



- **La MVL-PLA<sub>2</sub> contient une séquence NGD similaire qui peut être responsable de l'inhibition de la fonction intégrine.** Le remplacement du résidu R par le résidu N qui est plus hydraulique et polaire mène vraisemblablement à une amélioration de l'affinité envers l'intégrine  $\alpha v\beta 3$ . Le résidu D favoriserait la reconnaissance de  $\alpha v\beta 3$  et  $\alpha 5\beta 1$ .
- **La CC- PLA<sub>2</sub>-1 et CC-PLA<sub>2</sub>-2 contiennent respectivement les motifs NQD et NQI qui peuvent aussi être responsable des effets sur les intégrines.** La présence de nombreuses cystéines favorise les interactions avec les intégrines. De plus la présence de 7 ponts disulfure stabilise la structure et les motifs RGD-like.

D'autres études de structure-fonction doivent être effectuées pour vérifier cette hypothèse [259] [30]. Cependant, en inactivant le site enzymatique de la MVL- PLA<sub>2</sub>, il a été montré une nette dissociation de l'effet antitumoral de MVL-PLA<sub>2</sub> et de son activité catalytique. La même observation a été faite pour l'activité anti-angiogénique de MVL- PLA<sub>2</sub>. Cela confirme

fortement le concept de modèle cible selon lequel, les interactions protéines-protéines à haute affinité entre PLA<sub>2</sub> et protéines membranaires des cellules cibles déterminent les effets pharmacologiques spécifiques des enzymes PLA<sub>2</sub> [169].

**Les 3 PLA<sub>2</sub> ont inhibé l'adhésion et la migration** de cellules tumorales de mélanome humain IGR39, fibrosarcome (HT1080), de **cellules endothéliales microvasculaires cérébrales humaines (HBMEC) et de cellules endothéliales microvasculaires humaine (HMEC-1)** en interférant avec la fonction intégrine. Aucune des 3 PLA<sub>2</sub> n'a démontré d'activité cytotoxique jusqu'à une concentration de 2µM [287] [286] [259].

## **2. Cible les nouveaux vaisseaux.**

**L'intégrine α5β1** est importante dans les processus de l'angiogenèse, elle **est exprimée dans les vaisseaux sanguins en croissance, mais son expression disparaît dans les vaisseaux matures. Les PLA<sub>2</sub> réduisent donc le nombre de nouveaux capillaires et de ramifications vasculaires, sans affecter les vaisseaux sanguins mûrs, stables et établis.** Comme nous venons de le voir, l'effet anti-angiogénique des PLA<sub>2</sub> peut être dû en partie au blocage des intégrines αVβ3 et α5β1. Cependant, **l'inhibition de l'angiogenèses peut aussi résulter du blocage des facteurs de croissance ou de leurs récepteurs.** En effet, CC-PLA<sub>2</sub>-1 et CC-PLA<sub>2</sub>-2 inhibent l'angiogenèses spontané aussi bien que l'angiogenèses induite par des facteurs de croissance comme VEGF ou bFGF [259] [30] [30].

**La mobilité cellulaire est le résultat d'une série complexe d'événements qui doivent être intégrés spatialement et temporellement. Une motilité efficace nécessite une régulation coordonnée de l'actine, des microtubules et des sites d'adhérence tout au long du processus de migration. La MVL-PLA<sub>2</sub> élimine efficacement l'adhésion et la migration des cellules endothéliales et la formation de tubes capillaires.** Ces processus sont tous liés et dépendent de la réorganisation du cytosquelette **d'actine et des adhérences focales.** Les contraintes de traction sont censées provenir du cytosquelette d'actine et transmises à la matrice extra cellulaire par les faisceaux d'actines. **Le traitement par MVL-PLA<sub>2</sub> perturbe le cytosquelette d'actine. Il induit une réduction radicale de la taille des faisceaux d'actines et leur redistribution dans toute la surface ventrale des cellules.**

Cela correspond et s'explique par le fait que **la MVL-PLA<sub>2</sub> perturbe la distribution de l'intégrine  $\alpha\beta 3$  qui est un régulateur critique de l'angiogenèse et un composant majeur des adhérences focales.** Le traitement empêche l'intégration du clustering  $\alpha\beta 3$  et sa localisation dans les lamellipodes. Ces résultats concordent avec le travail de Castel et al., montrant que le traitement des cellules de mélanome M21 avec des antagonistes de l'intégrine  $\alpha\upsilon$ , notamment des peptides RGD, perturbe le cytosquelette d'actine, redistribue les intégrines  $\alpha\upsilon$  et induit le désassemblage moléculaire des contacts focaux

Fait intéressant, **le traitement par MVL-PLA<sub>2</sub> inactivé ou enzymatiquement inactivé, a considérablement augmenté la dynamique des microtubules dans les cellules endothéliales HMEC-1 (40%). L'amélioration de la dynamique des microtubules pourrait aussi expliquer les altérations de la formation d'adhésions focales, conduisant à une inhibition de l'adhésion et de la migration des cellules.** Les agents de ciblage des microtubules (MT) sont connus pour avoir des effets anti-angiogéniques par la modulation de la dynamique des MT. Les MT sont essentielles dans l'orchestration de la motilité des cellules endothéliales. Il est donc probable que le mécanisme spécifique d'action de MVL-PLA<sub>2</sub> (c'est-à-dire l'interférence avec la dynamique du cytosquelette) soit responsable de l'inhibition du processus angiogénique.

**Les cellules traitées avec MVL-PLA<sub>2</sub> ont présenté des faisceaux d'actines désorganisés et ont perdu leur forme migratoire.** Les fibres de stress d'actine sont clairement visibles dans les cellules migrantes mais sont plus minces ou absentes dans les cellules traitées par MVL-PLA<sub>2</sub>. Dans ce cas, le développement de faisceaux d'actine est circonférentiel au lieu de fibres droites. En outre, il a été récemment signalé que **l'altération de la dynamique du MT est associée à des changements dans le cytosquelette d'actine et l'assemblage FA défectueux dans les cellules de carcinome endothélial et mammaire [259] [30].**

En conclusion, le mécanisme anti-angiogéniques de MVL-PLA<sub>2</sub> sur la cellule endothéliale est original et aboutit en effet à une **augmentation de la dynamique des microtubules (MT), une désorganisation du réseau de F-actine et les changements dans la formation FA [259].** MVL-PLA<sub>2</sub> pourrait représenter un nouveau médicament potentiel anti-angiogéniques et anti-métastatique., De nouvelles études devraient néanmoins être effectuées afin d'élucider complètement le mécanisme anti-angiogéniques de la MVL-PLA<sub>2</sub>.

### **5) Les sérine-protéases thrombine-like.**

Le potentiel antitumoral des sérine-protéases n'est toujours pas bien exploré, peu d'études sur leurs effets et mécanismes d'action ont été publiées. Néanmoins il semblerait que les enzymes thrombine-like joueraient un rôle intéressant dans l'inhibition de la prolifération et propagation des cellules cancéreuses. En effet, le dépôt de fibrine est une caractéristique d'un type particulier de tumeur.

Les cellules malignes exposent une variété de facteurs qui modulent le microenvironnement de la tumeur. Cela abouti entres autres à l'extravasation de fibrinogène des vaisseaux sanguins environnants et à la déposition de fibrine autour des cellules tumorales. Les dépôts de fibrine formés par des cellules tumorales métastatiques aideraient à la dissémination de ces cellules cancéreuses. De plus, il a été suggéré que la déposition de fibrine jouerait un rôle important et distinct aux niveaux des différentes étapes de la croissance et dissémination tumorale. En effet le dépôt de fibrine autour de la tumeur pourrait former une barrière protectrice qui masquerait la tumeur des attaques du système de surveillance immunitaire de l'hôte. Le thrombus formé à partir de l'accumulation de fibrine mène également à différentes pathologies secondaires telles que l'infarctus du myocarde ou d'autres maladies cardiovasculaires. La présence de thromboembolisme veineux est une complication commune dans des patients atteints de cancer. Basées sur ces hypothèses, les enzymes thrombine-like fibrinolytiques (tel que la batroxobine, la crotalase, etc..) pourrait réduire le taux de fibrinogène, rendant ainsi les cellules de tumeurs malignes plus vulnérables. Des tentatives ont été faites pour inhiber la croissance et l'invasion tumorale en inhibant le dépôt de fibrine et/ou l'accumulation plaquettaire avec l'aide d'enzymes fibrinolytique. Ces agents pourraient en parallèle réduire les effets indésirables graves lié aux traitements anticancéreux (tels que l'aplasie médullaire ou la cardiotoxicité) et devenir de nouveaux médicament [101] [253].

### a) Crotalase.

La crotalase (33,7 kDa) est une sérine-protéase thrombine-like isolée du venin de *Crotalus adamanteus*. L'activité de défibrinogénération de la crotalase a été utilisée pour évaluer le rôle du fibrinogène dans la croissance et la dissémination tumorale. Il a été suggéré qu'en inhibant la formation du gel de fibrine autour d'une cellule de tumeur, la crotalase pourrait créer des conditions plus favorables à l'élimination des tumeurs.

Les effets de la crotalase ont été évalués in vitro sur plasma humain et in vivo sur la croissance des **cellules de mélanome B16 chez les souris C57BL/6**. Les résultats obtenus suggèrent que, **bien qu'elle ne présente pas d'effets cytotoxiques ou cytostatiques sur les cellules de mélanome B16 et n'a eu aucun effet significatif sur l'augmentation du temps de survie des animaux, la crotalase retarde considérablement la croissance tumorale in vivo** : 50% des animaux traités par la crotalase ne développent pas la tumeur, contre 10% dans le groupe témoin [101] [288] [289] [253].

### b) Batroxobine.

La batroxobine, une enzyme thrombine-like extraite du venin de *Bothrops atrox moojeni*, (actuellement *Bothrops moojeni*) a été rapportée pour être **efficace dans la suppression de la propagation et prolifération des tumeurs malignes et de leurs métastases**. L'effet de la défibrinogénération de la batroxobine, a été étudié sur les métastases pulmonaires artificielles chez la souris. L'administration de batroxobine n'a eu aucun effet sur l'activité NK des lymphocytes de la rate. **Les résultats indiquent que la défibrinogénération due à la batroxobine inhibe bien la métastase pulmonaire et ces effets dépendent de l'activité NK de l'hôte**. Il n'existe cependant pas d'exemples signalés sur la connexion de batroxobine et de réduction des effets secondaires des médicaments [290].

## **6) Les L-amino-acide-oxydases.**

Les enzymes LAAOs isolées des venins de serpent possèdent un potentiel prometteur dans le développement de nouveaux agents d'antitumoraux. **Elles exercent des effets cytotoxiques, pro-apoptotiques, et induisent des altérations dans les processus du cycle cellulaires.** Ces dommages peuvent être induits sur différentes lignées de cellules cancéreuses (S180, SKBR-3, Jurkat, AET, B16F10, PC12, etc..), ce qui souligne le potentiel antitumoral de cette classe de toxines [37] [46]. **Bien que les mécanismes de cytotoxicité ne soient pas encore totalement clarifiés, on sait que les lipides présents dans les membranes cellulaires peuvent être endommagés par les espèces réactives de l'oxygène (ROS).** Considérant que les membranes des cellules tumorales présentent des concentrations plus élevées de lipides que les cellules normales, il est supposé que le peroxyde d'hydrogène produit par LAAOs exerce une action directe sur la membrane des cellules tumorales, avec une plus faible toxicité sur les cellules normales. **Les dégâts dans les cellules normales sont donc généralement négligeables par rapport aux dommages causés dans les cellules tumorales ce qui représente un avantage pour le développement d'une thérapie.**

Les SV-LAAOs isolées à partir de venins issus de différentes espèces de serpents exercent leurs effets antitumoraux (cytotoxique et pro-apoptotique) par des mécanismes différents, à des concentrations différentes et cela exposé à des durées de traitement différentes. **La mort cellulaire provoquée par les SV-LAAOs peut être due à un effet apoptotique ou nécrotique voire les deux. Ils sont fonction de la dose administrée et fonction de lignée cellulaire concernée.** Certaines LAAOs peuvent par exemple induire l'apoptose à basse concentration et provoquer une nécrose à plus forte concentration. Par exemple : la VB-LAAO isolée du venin de *Vipera berus berus* provoque l'apoptose des cellules leucémiques myélogènes K562 à des concentrations faibles d'enzymes, tout en induisant la nécrose de ces cellules à des concentrations relativement élevées. La Batrox LAAO isolée de *Bothrops atrox* induit la mort par apoptose chez les lignées cellulaire B16F10 et PC12, tandis que les cellules JURKAT affichent une mort par nécrose.

**Les mécanismes par lesquels les SV-LAAOs induisent l'apoptose ne sont pas toujours bien connus, mais des études suggèrent que la production de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) au cours de la réaction enzymatique, l'activation des caspases et/ou l'interaction de LAAOs avec les récepteurs membranaires peuvent être quelques-uns des mécanismes d'action possibles des LAAOs impliquées dans le processus de mort cellulaire [255].**

**Les effets sont principalement dus à la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Il est communément admis que la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> joue un rôle important dans l'activité pro-apoptotique des SV-LAAOs. La LAAO se lie directement à la surface des cellules, le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> libéré est alors accumulé dans des zones localisées avec des concentrations relativement élevées conduisant à une cytotoxicité puis l'apoptose est déclenchée par le stress oxydatif de la membrane à partir du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cependant, lorsque les cellules ont été traitées simultanément avec la catalase connue pour sa capacité à dégrader le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O et O, la viabilité cellulaire n'a pas été complètement restaurée, ce qui indique que l'activité apoptotique de LAAOs ne peut pas être complètement expliquée par la production de peroxyde d'hydrogène. En d'autres termes l'effet pro-apoptotique des SV-LAAOs n'est pas uniquement déclenché par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produit lors de la réaction enzymatique.

**Les SV-LAAOs et leur effet apoptotique par activation des voies intrinsèques (mitochondriale) et/ou extrinsèques (récepteur de la mort) de l'apoptose** : La voie des caspases est potentiellement impliquée dans le processus apoptotique. Les LAAOs extraites des venins de *Agkistrodon acutus* et *Bothrops atrox* par exemple induisent l'apoptose de différentes lignées cellulaires par la production des espèces réactives d'oxygène (ROS) pour activer les caspase-3 et -9 à la suite de la libération de cytochrome c produit par voie mitochondriale. Il est largement admis que l'augmentation des concentrations de ROS favorise les troubles mitochondriaux entraînant la mort cellulaire. Il est aussi supposé que le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pourrait réguler l'expression de Fas des cellules endothéliales humaines par l'activation de la tyrosine kinase.

**Tous les résultats suggèrent que l'apoptose induit par les SV-LAAOs est soit déclenchée par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, soit activée par l'intermédiaire de la voie mitochondriale ou la voie des récepteurs de mort.**

**Certaines SV-LAAOs peuvent perturber l'état du cycle cellulaire des cellules cancéreuses bloquant ainsi la prolifération cellulaire des cellules tumorales :**

Le cycle cellulaire est un ensemble de processus par lequel une cellule durant sa division. Ce procédé est divisé en deux phases : interphase et la mitose. L'interphase étant subdivisée en G0, G1, S et G2. Selon la SV-LAAO impliquée, le cycle cellulaire est inhibé au niveau de différentes phases du cycle (G0, G1...). La LAAO de *Bothrops atrox* par exemple bloque la transition de G0 à G1 et retarde la progression de la cellule de la phase S et la phase G2/M. Ce retard dans la phase G0/G1 peut empêcher l'initiation de la synthèse de l'ADN et par conséquent, la réplication des cellules tumorales. La LAAO d'*Agkistrodon acutus* (ACTX-6) induit nettement une forte accumulation à la phase Sub-G1, ce qui pourrait induire l'apoptose et inhiber efficacement la croissance tumorale. D'autres SV-LAAOs comme la LAAO de *Naja naja atra*, présentent une activité apoptotique en arrêtant la cellule à la phase G1 qui inhibe la prolifération cellulaire de tumeur solide en bloquant le passage des cellules de la phase S à la phase G2.

**Si ces enzymes peuvent être utilisées comme modèles pour le développement de chimiothérapie plus efficaces et le développement de nouveaux agents antitumoraux, l'effet cytotoxique des SV-LAAOs sur les cellules normales reste cependant encore controversée :** certain chercheur pense que les SV-LAAO sont inoffensives pour les cellules normales tandis que d'autres suggèrent qu'elles possèdent un effet cytotoxique sur les cellules normales. **De plus, bien qu'un grand nombre d'études ait démontré une action anticancéreuse *in vitro*, très peu ont encore démontré l'action anticancéreuse *in vivo* des LAAOs ophidiennes sur les tumeurs.**

**De nouvelles études plus approfondies sont nécessaires afin de mieux comprendre les mécanismes d'actions (cytotoxicité et d'induction de l'apoptose) des SV-LAAOs et développer de nouvelles stratégies thérapeutiques avec des actions plus ciblées, qui se traduirait par des agents chimiothérapeutiques et antitumoraux plus efficaces.**

a) **LAAO isolée du venin du cobra roi *Ophiophagus hannah*.**

Contrairement à d'autres SV-LAAOs, la LAAO extraite du venin du cobra royal *Ophiophagus hannah* (130 kDa), possède une cytotoxicité sélective contre les cellules tumorigènes ainsi qu'une stabilité inhabituellement plus importante. Elle n'est pas inactivée par congélation et reste stable dans des conditions alcalines (après incubation à 37°C pendant 5 jours à pH 7,4, l'enzyme garde 100% de son activité. **Ces effets sur la mort cellulaire résultent principalement de la production de peroxyde d'hydrogène pendant la réaction catalytique. L'enzyme présente également des activités (antiadhésives ainsi que des activités) antiprolifératives extrêmement puissantes par rapport aux autres LAAOs ophidiennes.** Etudiée *in vivo* chez les animaux et *in vitro* avec le plasma humain, la cytotoxicité et les différents effets de la LAAO ont notamment été observés sur le cancer du sein, le cancer du poumon, le cancer de l'estomac, le mélanome murin, le fibrosarcome, le cancer colorectal et les lignées de cellules ovariennes de hamster chinois. Dans un modèle de xénogreffe de tumeur chez la souris, la LAAO a notamment induit une apoptose des cellules d'adénocarcinome de la prostate (PC-3) et a réprimé la croissance tumorale, sans aucune anomalie sur le tissu d'un organe normal. **En raison de ces propriétés de stabilité favorables, cette LAAO présente un plus grand potentiel pour être développée comme un agent thérapeutique anti-cancéreux** [16] [291] [292] [253].

7) **Toxines du venin de *Crotalus durissus terrificus*.**

a) **Le venin.**

Le venin du crotale *Cascabelle terrificus* (CV) possède un puissant effet antitumoral sur les tumeurs bénignes (adénome hypophysaire) et malignes (glioblastome). Cet effet antitumoral est spécifique du cycle cellulaire et dépendant du calcium extracellulaire qui est un facteur important pour l'activité de la phospholipase A2 crotoxine. L'effet antitumoral de ce crotale peut donc être attribué, au moins partiellement, à la crotoxine qui a également induit la mort cellulaire d'une tumeur au cerveau. En dépit de la néphrotoxicité et neurotoxicité connu de CV, le traitement aigu avec sa dose antitumorale établie *in vitro* n'a pas été toxique pour les animaux analysés. Ces résultats indiquent le potentiel biotechnologique de ce venin en tant que source de modèles pharmaceutiques pour le traitement du cancer [293].

## b) Crotoxine.

La crotoxine est une neurotoxine phospholipasique  $\beta$  présynaptique extraite du venin de *Crotalus durissus terrificus* qui semble être potentiellement utile pour le traitement des cancers. Elle est aussi applicable comme agent analgésique et pourra éventuellement réduire la douleur cancéreuse ou liée au traitement ou chimiothérapie.

### 1. Structure.

La crotoxine est un complexe non covalent formé de 2 sous-unités différentes :

- **La sous-unité B ou « crotoxine B »** est une **phospholipase A2 basique** (14,5kDa), formée par une seule chaîne, de 122 résidus d'acides aminés, réticulée par sept liaisons disulfures. Elle semble être responsable des effets cytotoxiques.
- **La sous-unité A ou « crotoxine A »** est un **peptide acide** (9,5kDa), formée de trois chaînes polypeptidiques réticulées par sept ponts disulfures. Elle est dépourvue d'activité catalytique (enzymatique). Elle n'a pas d'affinité pour les membranes et est non toxique (DL<sub>50</sub> IV souris > 20 mg / kg.) [294].

### 2. Mécanisme d'action.

La crotoxine produit des effets cytotoxiques sur les cellules normales et tumorales lors de son interaction avec la membrane cellulaire en raison de la perturbation structurelle qu'elle induit, ainsi que de l'augmentation locale de la concentration des produits de l'hydrolyse des phospholipides. Le complexe de crotoxine (Crotoxine A et B) semble cependant présenter une action cytotoxique assez sélective, du moins plus intense, sur les cellules tumorales que sur les cellules normales. La crotoxine circule sous forme de complexe jusqu'à ce qu'elle reconnaisse un « site accepteur » spécifique sur les membranes cibles.

Il existe alors 2 hypothèses, à proximité ou à distances de ces « sites de haute affinité »,

- Soit il existe un ensemble de conditions physico-chimiques (à proximité de la membrane) qui favorisent la dissociation du complexe de crotoxine et la liaison ultérieure de crotoxine B à la membrane.
- Soit des complexes ternaires transitoires (crotoxine A- crotoxine B- "site") sont formés conduisant finalement à la stabilisation de la crotoxine B (avec son "site" de haute affinité) et à la libération de la crotoxine A dans le milieu.

La première hypothèse semble être vérifiée. L'hydrolyse des phospholipides sous forme d'agrégats ou de membranes biologiques nécessite la liaison de la crotoxine B (phospholipase A<sub>2</sub>) basique à l'interface phospholipides-eau et cette liaison ne peut être produite qu'après la dissociation du complexe. En effet, l'interaction de la phospholipase A<sub>2</sub> basique (crotoxine B) avec son substrat agrégé dépend de l'exposition d'une zone spécifique à la surface de l'enzyme fonctionnelle et topographiquement différente de l'endroit actif. Cette région spécifique de la surface de l'enzyme est la région couverte par la formation du complexe avec la crotoxine A. **Seule l'enzyme libre, avec cette surface exposée, sera capable de se lier aux interphases et d'hydrolyser les phospholipides membranaires. La sous-unité A** semble être impliquée dans la reconnaissance de la cible, **agissant comme un "chaperon" et empêchant la liaison non spécifique de la sous-unité B de membrane.** Ayant une forte affinité pour la phospholipase de base A<sub>2</sub> (crotoxine B). La sous-unité acide A peut empêcher l'adsorption non spécifique de crotoxine B à de nombreux constituants des tissus acides, préservant ainsi la crotoxine B pour le « site de haute affinité » spécifique et qui affichera une affinité pour la crotoxine B supérieure à celle de la crotoxine A.

La liaison de crotoxine B à la membrane et à la crotoxine A semble être des phénomènes mutuellement exclusifs. La formation du complexe AB empêche l'interaction de l'enzyme avec les membranes. De même, l'interaction de la crotoxine B (phospholipase A<sub>2</sub> basique) avec les membranes empêche la formation du complexe [294].

**Certaines cellules tumorales sont plus sensibles à l'action cytotoxique du complexe de crotoxine.** Plusieurs possibilités ont été émises :

- La membrane de ces cellules tumorales peut contenir un plus grand ensemble d'éléments structurels capables de fonctionner comme « **sites de haute affinité** » **pour crotoxine B.**
- Ces cellules peuvent établir dans leur voisinage un ensemble de conditions physico-chimiques qui favorisent la **dissociation du complexe et la liaison ultérieure de la crotoxine B à la membrane.**
- Ces cellules tumorales peuvent avoir une capacité réduite pour compenser la perturbation structurelle de la membrane induite par la liaison de l'enzyme et l'augmentation de la concentration locale de produits d'hydrolyse des phospholipides.

L'explication la plus plausible de cette action cytotoxique différenciée du complexe crotoxine envers les cellules tumorales doit résider dans **l'existence de conditions physicochimiques locales au niveau des membranes tumorales favorisant la dissociation du complexe.** On sait en effet, que les agents oncogènes modifient de nombreuses fonctions des membranes plasmiques en créant par conséquent des changements pléiomorphes [294]. Les conditions physico-chimiques qui favorisent la dissociation du complexe de crotoxine et la liaison ultérieure de crotoxine B à la membrane présentes dans les cellules tumorales ne doivent pas être suffisantes à proximité des cellules normales pour provoquer la dissociation du complexe de la crotoxine.

### **3. Applications.**

**Ces dernières années, de nombreuses études ont montré que la crotoxine présente des actions pharmacologiques antitumorales et d'autres activités pharmacologiques *in vivo* et *in vitro*. Elle inhibe la croissance de plusieurs lignées de cellules tumorales, responsables du cancer du poumon, du côlon, du rein, de l'ovaire, de l'œsophage, du carcinome canalaire du sein, du mélanome, de la leucémie et de lignées de cellules tumorales cérébrales. Des études ont montré que des injections quotidiennes intra musculaire de crotoxine inhibent la croissance du carcinome pulmonaire de Lewis (83%) et MX-1 carcinome mammaire humain (69%). La crotoxine provoque également l'effondrement du**

potentiel de membrane mitochondriale, la libération de cytochrome c et l'activation de la caspase 3 dans la lignée cellulaire de leucémie myéloïde chronique (K562). Le brevet américain US 5164196-A a proposé en 1992 l'utilisation du complexe crotoxine comme agent cytotoxique. En 2002, une étude sur les activités cytotoxiques et antitumorales de la crotoxine par le National Cancer Institute USA (Developmental Therapeutics Program, NSC 624244) a montré qu'elle était efficace contre les **mélanomes humains, les tumeurs du système nerveux central et des carcinomes pulmonaires** [295]. **Le brevet EP0246861A2 a été déposé pour l'utilisation de compositions à base de crotoxine pour l'obtention d'un médicament destiné au traitement des carcinomes** [294].

**Un essai clinique de phase I approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) a été effectué sur des patients atteints de tumeurs solides réfractaires au traitement conventionnel** [296]. La crotoxine a été administré en IM pendant 30 jours consécutifs à des doses allant 0,03 à 0,22 mg/m<sup>2</sup>. Le profil de sécurité a montré une neurotoxicité comme principal effet toxique. Les faibles concentrations de crotoxine produisent un blocage incomplet qui se reflète *in vivo* par parésie, celle-ci est totalement réversible dans les 24-40 h. L'activité neurotoxique de la crotoxine peut expliquer la diplopie, qui est apparue chez tous les patients à partir d'une dose de 0,18 mg/m<sup>2</sup> en raison de la parésie des muscles oculaires externes dose. La diplopie n'est pas permanente et disparaît progressivement, elle est donc considérée comme non limitative en terme de toxicité. Une toxicité plus importante est apparue à la dose de 0,22 mg/m<sup>2</sup>, la diplopie a parfois été accompagnée de strabisme et ptosis indiquant une insuffisance neuromusculaire accrue. Deux des six patients avaient des incoordinations et nystagmus accompagné d'anxiété. Tous sont des signes de grave toxicité. D'autres effets toxiques, tels que la sialorrhée, la miction et la diarrhée sont des **symptômes cholinergiques, qui ont été rapportés dans des études précliniques chez le chien**. Une ataxie et des incoordinations ont été également signalées. En outre, lors de l'injection IM, la crotoxine présente une activité myotoxique. Les études de toxicité précliniques chez les chiens ont révélé une augmentation des taux plasmatiques de CK, ALT, AST, et une déshydrogénase lactique dans les 2h, atteignant un pic à 18-40h après l'injection et le retour à des valeurs normales les 3 à 4 jours sans pathologie supplémentaire ou **preuves biochimiques de lésions du foie**. **Cependant, les données cliniques, pathologiques et biochimiques dans les études précliniques ont montré systématiquement que les signes de toxicité induite par crotoxine ont diminué ou disparu sur la poursuite du traitement**. Cela semble être lié à l'induction de la tolérance neuro- induite crotoxine et effets myotoxiques

**La crotoxine est donc une nouvelle classe d'agent anticancéreux agissant par le biais d'un nouveau mécanisme d'action. La neurotoxicité est le principal effet toxique et semble être gérable. La dose maximale tolérée a été fixée à 0,21 mg/m<sup>2</sup>. La réponse thérapeutique obtenue chez certains patients est très prometteuse et mérite le développement supplémentaire de ce composé dans un essai clinique de phase II. La dose recommandée pour les études de phase II est de 0,18 mg/m<sup>2</sup> [296].**

Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires de la mort cellulaire induite par la crotoxine et d'apporter un nouvel éclairage pour le développement de traitements contre le cancer à base de crotoxine, les scientifiques ont étudié *in vitro* les effets antitumoraux de la crotoxine sur les cellules de carcinome pulmonaire humain SK-MES-1 [295]. **La crotoxine induit un effet cytotoxique et supprime la croissance et la formation de colonies de cellules SK-MES-1 *in vitro* d'une manière dose et temps dépendants.** Elle supprime la prolifération des cellules par inhibition de la synthèse de l'ADN suivie par l'induction de l'arrêt en phase S, ce qui est en corrélation avec une diminution de l'expression de l'antigène nucléaire cellulaire proliférateur (PNCA). **La crotoxine augmente aussi la proportion de cellules apoptotiques :** Les cellules SK-MES-1 traitées avec CRTX ont montré la condensation et la fragmentation des noyaux, qui sont caractéristiques des cellules apoptotiques. Le niveau de la caspase-3 clivée, considérée comme une enzyme clé dans la pathogénèse de l'apoptose cellulaire, a été augmenté ce qui suggère que le traitement par CRTX induit l'apoptose dans SK-MES-1 cellules.

**De plus, la crotoxine augmente de manière dose-dépendante l'expression de protéines liées à l'autophagie : LC3-II** (qui est impliquée dans la formation des autophagosomes) **et Beclin (1)** (qui joue un rôle essentiel dans l'initiation de l'autophagie) **et diminue le niveau de protéine p62** (un substrat de l'autophagie observée lorsque l'activité d'autophagie est augmentée), **ce qui suggère que l'autophagie peut être impliqué dans les effets inhibiteurs de la crotoxine sur les cellules SK-MES-1.** De même, il a été observé que la crotoxine améliore l'autophagie dans les cellules tumorales de cancer du sein MCF-7 par d'autres mécanismes tels que l'activation des cathepsines B, D et L, la libération de cytochrome c et la relocalisation d'AIF (Apoptosis Inducing Factor : molécules pro-apoptotiques libérées de la mitochondrie) dans le noyau. L'autophagie est un mécanisme par lequel les cellules améliorent le métabolisme des organites endommagés ou recycler les matériaux indispensables pour survivre dans des conditions difficiles. Le rôle de l'autophagie dans le cancer est à double face. La perte de l'autophagie peut augmenter la propension des cellules vers la transformation oncogénique. Dans ce cas, l'induction de l'autophagie semble être bénéfique pour la prévention du cancer. Dans les

tumeurs établies, cependant, l'autophagie peut être promotion tumorale, et les cellules cancéreuses peuvent utiliser l'autophagie améliorée pour survivre sous stress métabolique et thérapeutique. Ainsi, la modulation de l'autophagie rationnelle en fonction de son état fonctionnel dans les tumeurs est très importante dans la thérapie antitumorale.

**En outre, la crotoxine (50  $\mu\text{mol/L}$ ) augmente significativement la phosphorylation p38MAPK dans les cellules.** Le prétraitement des cellules avec SB203580, un inhibiteur spécifique de p38MAPK, bloque l'inhibition de la prolifération cellulaire, la cytotoxicité, l'autophagie et l'apoptose induite par CrTX et l'expression de caspase-3 clivée. En revanche, il n'a eu aucune influence sur le blocage du cycle cellulaire en phase S, ce qui suggère que p38MAPK ne participe pas à cette action et qu'il existe donc d'autres mécanismes d'action.

**En conclusion, la CRTX inhibe la prolifération des cellules SK-MES-1 en induisant l'apoptose et l'autophagie et en bloquant leur cycle cellulaire en phase S. La voie de signalisation p38MAPK est au moins partiellement responsable de l'apoptose et de l'autophagie induite par la crotoxine dans les cellules SK-MES-1 de carcinome pulmonaire humain in vitro et ne participe apparemment pas à l'arrêt de la phase S, il y a donc d'autres mécanismes impliqués : CRTX peut être associée à d'autres voies, comme les dommages de l'ADN et la réplication. Son mécanisme doit encore être exploré [295].**

### c) Crotamine.

La crotamine est une petite protéine basique (4,8kDa) extraite du venin du serpent à sonnette sud-américain *Crotalus durissus terrificus* qui appartient à la famille des myotoxines. Elle présente un large spectre d'activités biologiques avec des applications biotechnologiques et thérapeutiques potentielle. La présence de neuf résidus lysine et trois ponts disulfures rend sa structure très compacte, stable et chargée positivement. Il s'agit de l'un des composants les plus abondants du venin correspondant à environ 10% du poids sec du venin, et se caractérise par une légère toxicité (DL50 = 820 $\mu\text{g}$  par 25g de poids corporel, injection IP) par rapport à d'autres membres de la même famille [65].

Les premières études sur les activités anticancéreuses de la crotamine datent de 2004. La crotamine a été caractérisée comme une protéine de **pénétration cellulaire et de localisation nucléaire** in vitro et in vivo. La localisation nucléaire de la crotamine a été observée dans les

cellules fixées et non fixées. En tant que peptide pénétrant dans les cellules (CPP) la crotamine présente une activité biologique sélective pour certains types de cellules lors d'une phase du cycle cellulaire donnée. Après son addition au milieu de culture cellulaire, elle pénètre rapidement (environ 5 minutes) et de manière efficace à des concentrations micromolaires et non toxique comprise entre 0,1 $\mu$ M et 1 $\mu$ M dans les cellules en phases de proliférations. Elle interagit à l'intérieur de la cellule avec des structures subcellulaires et sous-nucléaires, comme les compartiments vésiculaires, les chromosomes et les centrioles. In vivo, après administration intrapéritonéale chez les souris, elle se retrouve localisée dans les cellules de la rate, du fluide péritonéal et de la moelle osseuse, **ce qui démontre une localisation nucléaire et périnucléaire préférentielle.**

En outre, la crotamine a la capacité de pénétrer dans les cellules non différenciées, elle se localise dans le noyau, et peut servir de marqueur de prolifération active des cellules vivantes. **Dans le noyau, elle se lie aux chromosomes lors de la phase S/G2, lorsque les centrioles commencent à se diviser. Dans le cytoplasme, la crotamine s'associe spécifiquement aux centrosomes ce qui permet de suivre le processus de duplication et de séparation de centriole lors du cycle cellulaire.**

**La crotamine pénètre in vitro et in vivo les cellules qui prolifèrent rapidement, couplé à une sonde elle pourrait être utilisée en imagerie médicale comme outil de diagnostic en tant que marqueur biologique de ces cellules hautement répliquantes dont fait partie les cellules tumorales [65]. En tant qu'adjuvant chimiothérapeutique, la crotamine pourrait aussi être utilisée pour la délivrance intracellulaire de gènes ou d'agents anticancéreux.** Elle possède en effet la capacité de transporter des molécules vers la cellule que ce soit vers la surface externe de la cellule, dans le cytoplasme ou même dans son noyau. A des concentrations submicromolaire non toxiques la crotamine est **capable de se lier à l'ADN plasmidique électrostatiquement et former des complexes d'ADN-peptide dont la stabilité surmonte la nécessité d'une conjugaison chimique pour transporter des acides nucléiques dans les cellules [62] [297] [298].**

## 1. Mécanisme de pénétration cellulaire et de la délivrance cellulaire.

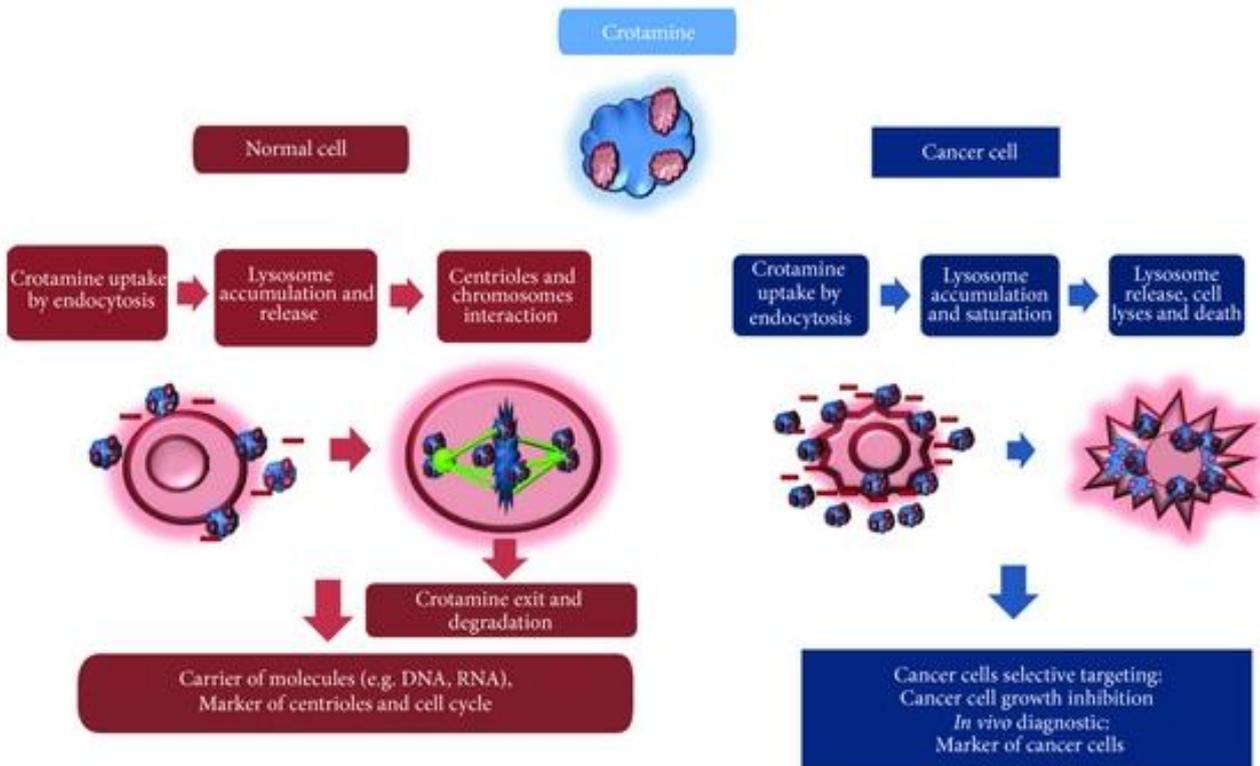


Figure 80 : Mécanisme d'action de la Crotamine

Le mécanisme de pénétration et de la délivrance cellulaire de la crotamine a été étudié. La crotamine pénètre à la fois dans les cellules normales (en rouge sur la figure) et dans les cellules cancéreuses (en bleues sur la figure). Cependant, dans des cellules cancéreuses, la concentration de crotamine intracellulaire semble être plus haute que celle observée dans des cellules normales. Cela est probablement dû au fait que la crotamine est une protéine chargée positivement. Les cellules cancéreuses sont chargées plus négativement sur leur surface moléculaire comparée aux cellules normales, elles attirent donc d'avantage la crotamine. **Les concentrations élevées de la crotamine dans les cellules cancéreuses induisent à terme la lyse et la mort cellulaire.** La crotamine représente aussi un bon outil potentiel pour l'identification de cellules cancéreuses in vivo. Dans des cellules normales, la crotamine interagit électrostatiquement avec les centrioles des chromosomes et peut être utilisée comme **outil biotechnologique de transport de molécules bioactive et comme un marqueur de cycle cellulaire** [63].

Pour entrer dans la cellule (normale ou cancéreuse), la crotamine interagit avec les chaînes des protéoglycanes de sulfate d'héparane (HSPG) de la membrane et est endocytée dans les

vésicules qui sont transportées dans la cellule à l'aide de la clathrine [299]. A l'intérieur de la cellule, la crotamine s'accumule dans les vésicules lysosomales. Dès que le peptide s'accumule dans les vésicules des endosomes/lysosomes, ces compartiments sont perturbés et leur contenu est libéré dans le cytosol des cellules. Cette perte de contenu lysosomique à des concentrations élevées induit la mort cellulaire, ou favorise la distribution de la crotamine dans les compartiments cytoplasmiques, ce qui constitue un pas avant l'absorption nucléaire de la crotamine.

## **2. Essai préclinique in vivo.**

Les résultats d'une étude préclinique réalisée à l'Institut Butantan, à São Paulo ont révélé l'efficacité de la crotamine in vivo dans le traitement de cellules cancérigènes. Les tests ont été menés sur des souris atteintes de cancer de la peau. L'expérience a permis d'augmenter la survie de l'animal de 70%. La toxine a aussi retardé le développement de la tumeur et, dans certains cas, elle a même inhibé sa croissance. **La crotamine a donc la capacité d'induire l'apoptose des cellules cancéreuses in vitro, ainsi que de retarder voire inhiber la formation de mélanomes in vivo chez la souris** [63] [300].

## **3. Avantages de la crotamine et perspective.**

La crotamine se montre plus efficace que d'autres molécules car elle ne présente pas les mêmes effets collatéraux. Elle est soluble dans différents solvants, n'entraîne pas de réaction allergique et n'interfère pas dans l'immunité. La crotamine n'affecte pas les cellules normales, mais tue les cancérigènes. En marquant les cellules cancéreuses, la crotamine peut servir à identifier celles qui sont affectées.

La substance a été brevetée au Brésil (EP 1866332 B1) [298]. Après les tests, le traitement sera administré à des humains. **Il peut être injecté et reste 24 heures dans la cellule, ce qui facilite le traitement pour le patient. L'implant sous-cutané** est une autre possibilité d'utiliser le médicament, par laquelle des doses quotidiennes pourront être libérées dans l'organisme. Avant d'être testée sur les humains, les chercheurs travaillent à la **création de crotamine synthétique**. A partir de là, les tests cliniques pourront commencer si tous les résultats sont positifs. Et cela dans le but d'obtenir un **médicament pour le mélanome ou pour d'autres types de cancer**.

La filiale Celtic Biotech de Spotlight Innovation Inc a conclu en 2015 un **accord de licence de brevet exclusif**, applicable en Amérique du Nord, avec Sao Paulo, basée au Brésil Instituto Butantan pour l'utilisation de **Crotamine, comme un agent d'imagerie potentiel pour le cancer et la thérapie génique vecteur de délivrance**. Celtic Biotech a l'intention de lancer des études de validation **dans le but d'entrer dans les études de Phase I pour l'utilisation de la Crotamine comme agent d'imagerie radiopharmaceutique** de tomographie par émission de positons (PET) approprié pour les tumeurs du cancer du poumon. L'Université Emory d'Atlanta conçoit et réalise ces études et essais cliniques ultérieurs dans le cadre d'un accord de recherche avec Celtic Biotech [301].

#### 4. Optimisation de la crotamine : "NrTPs".

Afin de réduire la longueur et la toxicité de la crotamine, tout en conservant ses propriétés anti-cancéreuses, **deux peptides courts** de ciblage nucléolaire (**NrTPs**) **dérivée de la crotamine ont été synthétisés et sont à l'étude**. Les peptides de ciblage nucléolaire sont des séquences de 14 à 15 résidus, conçues par minimisation structurelle d'une toxine de serpent [300].

Crotamine : « YKQCHKKGGHCFPKEKICLPPSSDFGKMDCRWRWKCKKGS »



Le peptide synthétique NrTP1 combine les extrémités N- et le C-terminal de la crotamine. Les 9 premiers résidus sont liés avec les derniers résidus 38-42, qui sont représentés en noir dans la figure de la molécule crotamine ci-contre (**YKQCHKKGG KKGSG**) [63].

Les NrTPs conservent certaines propriétés de la crotamine, telles que **l'absorption cellulaire efficace et la localisation nucléaire préférentielle, mais sont améliorés sur d'autres propriétés**. Les NrTPs, **plus petites** que la crotamine, présentent une **localisation nucléolaire supérieur**, et permettent d'encore mieux faciliter la localisation des protéines thérapeutiques [65].

Les peptides tels que NrTP1 et les analogues sont capables de pénétrer les cellules de carcinome épithélial du col de l'utérus humain et de se diriger vers leur nucléole. Le NrTP1 pénètre et se localise de manière similaire dans le nucléole des cellules tumorales dérivées des carcinomes du pancréas humains (BxPC-3) et des glandes mammaires canalaire humaines (BT-474). L'absorption de NrTP1 et le couplage nucléaire sont indépendants de la phase du cycle

cellulaire. Le principal mécanisme d'internalisation de NrTP1 semble lié à la voie de la chlatrine. L'absorption de peptide est considérablement réduite à basse température [299].

**L'activité pro-apoptotique de ces deux peptides composés par les deux séquences dérivées de la crotamine, a été analysée en 2015 dans les cellules du mélanome et du cancer du sein in vitro en comparaison avec la crotamine et BAX, une protéine pro-apoptotique de la famille BCL2.** Des changements morphologiques, tels que le détachement à partir du substrat, la contraction cellulaire, la perte d'allongement inter-cellules et plusieurs autres effets ont été observés dans les cellules cancéreuses après 24 heures d'incubation avec les peptides. Durant cette période, les peptides présentent une activité cytotoxique. L'analyse du cycle cellulaire a démontré qu'ils diminuent les phases G2/M, tout en augmentant la sous-phase G0/G1 [300]. **Les deux peptides augmentent le potentiel mitochondrial des cellules cancéreuses. L'augmentation de l'expression des protéines pro-apoptotiques, tels que caspase 3 et la PARP a été mise en évidence dans les cellules cancéreuses après l'addition du peptide 1, alors que phospho-BAD est augmentée après addition du peptide 2. Les deux peptides sont efficaces pour déclencher la mort cellulaire dans les cellules de mélanome et de cancer du sein in vitro. En comparaison, la crotamine seule n'a pas été capable d'induire de tels changements dans les cellules cancéreuses [300].**

#### **IV Applications neurologiques.**

De nombreuses toxines issues du venin de serpents, essentiellement issu des venins d'Elapidae et quelques Viperidae présentent une remarquable spécificité sur toute une gamme de récepteurs cellulaires neuromusculaires ou cérébraux. Ces toxines qui agissent sur le système nerveux présentent un grand potentiel thérapeutique vis-à-vis des maladies neurodégénératives telle que **la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson la sclérose en plaque, l'épilepsie, l'amyotrophie, névralgies, schizophrénie etc.** Les venins de cobra (neurotoxine postsynaptique), et plus rarement ceux de crotales (neurotoxine présynaptique), ont notamment été prescrits comme anticonvulsifs. C'est en 1908 que les venins de cobra ou de crotales dans le traitement de l'**épilepsie**.

### **A) Découverte et analyse du récepteur cholinergique.**

Les toxines, se sont montrées très utiles pour comprendre le fonctionnement de notre appareil neuromusculaire [130]. Historiquement, c'est l'utilisation de la neurotoxine- $\alpha$ , une toxine à 3 doigts extraite du venin du cobra *Naja nigricollis* qui, marquée radioactivement au tritium a permis d'isoler et caractériser une partie des propriétés du récepteur nicotinique de l'acétylcholine [1] [99].

La neurotoxine- $\alpha$  qui provoque la paralysie et l'arrêt respiratoire caractéristique des morsures de cobra reconnaît et se lie spécifiquement aux récepteurs cholinergiques. Situés au niveau des synapses, ces récepteurs assurent le passage de l'influx nerveux entre le nerf et le muscle produisant ainsi la contraction musculaire. En les bloquant, la toxine provoque une paralysie, notamment celle des muscles du diaphragme, ce qui conduit un à l'asphyxie.

Les neurobiologistes ont rapidement trouvé un grand intérêt à cette toxine. Elle a permis par exemple, dans les années 1970, à Jean-Pierre Changeux, de l'Institut Pasteur, de comprendre la structure et le fonctionnement du récepteur cholinergique. La neurotoxine- $\alpha$  présente en effet de subtiles différences avec l'acétylcholine, le médiateur qui se lie normalement aux récepteurs cholinergiques. Mais tandis que l'acétylcholine se lie une fraction de seconde au récepteur pour permettre le transfert de l'influx nerveux, la neurotoxine- $\alpha$  s'y accroche de façon définitive en interdisant tout passage de l'influx. En comparant le mode d'action de ces deux substances sur des muscles isolés de grenouilles, les neurobiologistes ont compris certaines étapes du fonctionnement de notre appareil neuromusculaire. La forte affinité de la neurotoxine- $\alpha$  avec le récepteur cholinergique a également permis d'isoler le récepteur [130]. Grâce à cela, il a été possible de purifier le récepteur cholinergique de la membrane post synaptique et de décrire précisément sa structure moléculaire. Les diverses toxines remarquablement spécifiques obtenues à partir des venins d'Elapidae a permis de montrer la complexité de ce récepteur et la diversité de ses sites actifs. La stimulation de chacun d'entre eux explique les effets inhibiteurs compétitifs de certaines substances utilisables en pharmacologie comme en thérapeutique.

## **B) La maladie d'Alzheimer.**

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative incurable du tissu cérébral qui entraîne la perte progressive et irréversible des fonctions mentales et notamment de la mémoire. Le plus souvent lié à l'âge, la maladie conduit à un dysfonctionnement cognitif et comportemental [302]. C'est la cause la plus fréquente de démence chez l'être humain, elle touche plus de 800 000 personnes en France [303].

### **1) K49-P1-20.**

Une équipe de chercheurs australiens de l'Université de Monash, à Melbourne, viennent de réaliser des travaux potentiellement très prometteurs dans la recherche et la lutte contre la maladie d'Alzheimer. Une nouvelle molécule baptisée « K49-P1-20 » a récemment été isolée du venin de *Bothrops asper*, un Viperidae présent en Amérique Centrale et Amérique du Sud. Cette nouvelle toxine pourrait empêcher tout au moins interrompre la progression de maladie d'Alzheimer grâce à la mise au point d'une nouvelle stratégie thérapeutique. La découverte de cette toxine représente un véritable espoir.

La maladie d'Alzheimer se caractérise par deux types de lésions : les plaques amyloïdes (dite pathologie amyloïde) et les dégénérescences neurofibrillaires (dite pathologie de tau).

La pathologie dite amyloïde se définit par une accumulation anormale et toxique dans le cerveau, de peptide bêta-amyloïde. Les peptides-amyloïde (A $\beta$ ) sont essentiels pour la survie des cellules neuronales, le maintien de la plasticité synaptique et le transfert de l'information quotidienne à travers les réseaux nerveux dans le cerveau. Chez les personnes en bonne santé, le peptide bêta-amyloïde est dégradé par des enzymes. Cependant, chez les patients atteints de la maladie selon différents facteurs (génétique et environnementaux), ces enzymes semblent incapables d'exécuter correctement leurs actions, ce qui provoque l'accumulation de la protéine toxique, l'apparition de dépôts et à terme la formation des plaques amyloïdes. Ces plaques ont un effet toxique sur les neurones : elle provoque la mort progressive, aboutissant à des troubles cognitifs associé à la maladie d'Alzheimer. Ainsi, l'inhibition du processus de formation d'agrégats à partir du monomère A $\beta$  et la déstabilisation de l'agrégat pourrait être utile pour la prévention de la propagation de la maladie respectivement. **La néprilysine (NEP) et l'enzyme de conversion de l'endothéline-1 (ECE-1) sont deux enzymes (métallo-protéases)**

**impliquées dans la dégradation les peptides bêta-amyloïdes dans le cerveau.** Des études antérieures utilisant des modèles animaux de la maladie d'Alzheimer ont montré que l'augmentation de l'expression de la CEE-1 et NEP peut avoir des effets bénéfiques. Cependant, les approches basées sur l'ADN peuvent poser des problèmes pour la traduction clinique. Les molécules qui peuvent stimuler directement l'activité de la CEE-1 et NEP, ou augmenter leur expression sont des alternatives plus intéressantes. Actuellement, il n'existe pas de molécules pour stimuler l'activité de ces deux enzymes. L'un des objectifs de l'industrie pharmaceutique a été de trouver un médicament qui stimule ces enzymes chez les personnes atteinte de la maladie d'Alzheimer, en particulier celles qui sont dans les premiers stades de la démence, lorsque les plaques amyloïdes commencent à peine à s'accumuler [303].

Plusieurs études ont rapporté la présence de molécules augmentant l'expression ou l'activité de la NEP. Cependant, **aucune molécule stimulant l'activité de la ECE-1 n'avait encore été trouvée jusqu'à la découverte de K49-P1-20 extraite de *Bothrops asper* (2016).** Ce peptide (20aa) améliore considérablement l'activité des enzymes ECE-1 et NEP, accélérant ainsi la dégradation des  $\beta$ -amyloïdes, favorisant l'élimination des plaques amyloïdes [303].

#### a) Etudes structurales.

**Le K49-P1-20 est constitué du domaine N-terminal de la myotoxine II extraite du venin de *Bothrops asper*, une phospholipase A2 de type lysine 49 (K49) qui induit une myonécrose lors de l'envenimement.** La substitution Asp en Lys à la position 49 est une caractéristique structurelle clé de ces toxines et leurs effets toxiques sont indépendants de l'activité de phospholipase A2. Les effets myotoxiques de la myotoxine II étant médiés par le domaine C-terminal le K49-P1-20 n'a montré aucune myotoxicité. Le développement et l'utilisation de différents peptides synthétiques de longueur variable correspondant à cette région ont confirmé que ces effets étaient effectivement médiés par ses 20 premiers acides aminés. De plus, la séquence inversée de K49-P1-20 n'a pas réussi à induire une augmentation de l'activité ECE-1, ce qui indique que la séquence spécifique de K49-P1-20 est critique (indispensable) pour les effets observés. Enfin, un raccourcissement supplémentaire de ce peptide a entraîné une perte d'effet stimulant de l'ECE-1. **K49-P1-20 semble donc posséder la séquence optimale la plus courte requise pour la stimulation ECE-1** et a été utilisée dans toutes les études en aval [303].

## b) Mécanisme.

Il est intéressant de signaler qu'en plus des enzymes ECE-1 et NEP, K49-P1-20 améliore également l'activité de deux autres métallo-protéases, ACE-2 et IDE. Le niveau de stimulation ACE-2 et IDE étant toutefois significativement moins élevé, ce qui indique un degré de spécificité vis-à-vis de l'ECE-1 et du NEP.

**K49-P1-20 entraîne une augmentation de l'activité de l'ECE-1 et de la NEP de manière dose dépendante.** L'augmentation de l'activité des deux enzymes devient évidente à une concentration de K49-P1-20 de 0,23  $\mu$ M.

**K49-P1-20 augmente également la Vmax des deux enzymes, CEE-1 et NEP,** à une vitesse respective de 2 et 5 fois la Vmax reflétant ainsi une vitesse accrue du clivage du substrat. Et cela tout en augmentant l'affinité entre le substrat et ECE-1, comme en témoigne la réduction de Km. Cependant, dans le cas du NEP, une augmentation de Vmax et de Km a été observée.

Contrairement aux molécules rapportées dans des études antérieures qui augmentent l'expression cellulaire et l'activité de NEP, **K49-P1-20 semble réguler de manière allostérique l'activité de la CEE-1 et NEP.** L'interaction des K49-P1-20 avec la CEE-1 ou la NEP induit en effet un changement de la conformation de l'enzyme conduisant à une augmentation de son activité [303].

L'amélioration de la décomposition des peptides  $\beta$ -amyloïdes (A $\beta$ ) confirme une nouvelle fois, non seulement l'augmentation de l'activité des enzymes CEE-1 et NEP induite par K49-P1-20, mais indique également le potentiel de K49-P1-20 comme composé pharmaceutique chef de file pour la gestion clinique des dépôts  $\beta$ -amyloïdes A $\beta$ . Les applications potentielles de la découverte du K49-P1-20 pour la maladie d'Alzheimer sont particulièrement mises en évidence par l'aptitude du K49-P1-20 à stimuler l'activité ECE-1 dans le liquide céphalo-rachidien diminuant le taux de  $\beta$ -amyloïdes soluble [220] [303].

L'identification des résidus d'acide aminé spécifiques de K49-P1-20 importants pour la stimulation de l'activité enzymatique facilitera le développement d'analogues stables et actifs dans les systèmes biologiques. Il semblerait que la Leu2 et l'Ile9 soient des résidus déterminants pour la stimulation de l'ECE-1, tandis que les Leu2, Phe3, Glu4, Leu10, Glu12, Thr13, Lys15, Lys19 et Ser20 seraient essentiels pour la stimulation du NEP [303].

### c) Conclusion.

En conclusion, cette découverte est intéressante et ouvre de nouveaux champs d'exploration. Pour l'heure cette molécule n'a été testée qu'en biologie fondamentale, avec succès mais uniquement sur des cellules. **Les études futures devraient se concentrer sur la compréhension du mécanisme d'action précis de K49-P1-20.** Cela impliquerait **l'identification des sites d'interaction entre K49-P1-20 et les enzymes**, des changements conformationnels précis et comment ceux-ci se traduisent par une augmentation de l'efficacité catalytique. La compréhension du mécanisme d'action facilitera la synthèse d'activateurs ciblant d'autres protéases impliquées dans la répartition des  $\beta$ -amyloïdes. En outre, **la stimulation de l'activité enzymatique de protéases est un domaine peu étudié** en biologie. La découverte du peptide K49-P1-20, premier à exprimer une double stimulation de l'activité de la CEE-1 et NEP, **ouvre un large éventail d'études dans ce domaine de l'enzyme de la biologie qui a à ce jour été largement négligé.**

K49-P1-20 a donc le potentiel de servir à la fois comme un excellent outil de recherche pour l'étude des mécanismes de stimulation des enzymes et à la fois comme un très bon candidat-médicament dans le cadre de la lutte contre la progression de la maladie d'Alzheimer. La favorisation de l'élimination des plaques amyloïdes par la molécule K49-P1-20 serait particulièrement intéressante dans les premiers stades de la démence, lorsque les dépôts commencent à peine à s'accumuler. On est encore assez loin d'une application thérapeutique. La prochaine étape sera de tester la molécule sur un modèle de souris atteint de la maladie d'Alzheimer, **afin de déterminer si cette molécule peut empêcher efficacement l'accumulation de bêta-amyloïde dans le cerveau.** Et ainsi s'assurer d'effet de K49-P1-20 la sur l'amélioration clinique des symptômes de la maladie [304] [303].

## 2) RVV-V.

**Le venin de la vipère de Russell *Daboia russelli russelli* contient des protéines qui déstabilisent les agrégats d'A $\beta$ . Le composant actif a été identifié comme l'activateur du facteur V (RVV-V).** Dans une étude expérimentale, six petits peptides ont été synthétisés en utilisant le RVV-V comme modèle et trois peptides non apparentés ont été synthétisés pour servir de témoins. La déstabilisation de l'agrégat A $\beta$  par ces peptides a été étudiée. Parmi les mécanismes possibles de déstabilisation, la protéolyse médiée par RVV-V a été exclue. L'hypothèse alternative selon laquelle les petits peptides dérivés de RVV-V déstabilisent l'agrégat amyloïde pour le convertir en état monomérique et ainsi prévenir la cytotoxicité est mieux soutenue par les résultats expérimentaux. Parmi les peptides, le CTNIF et le mélange des six peptides ont été les plus puissants pour convertir les agrégats en état monomérique et ainsi prévenir la cytotoxicité dans les cellules de neuroblastome humain SH-SY5Y. Les peptides témoins n'ont pas montré d'effets similaires. En outre, certains de ces peptides sont stables dans le sang durant 24h. Ces peptides dérivés du venin offrent une opportunité encourageante de prévenir l'amyloïdose et peuvent fournir des informations pour lutter contre la maladie d'Alzheimer [302].

## 3) Dendrotoxines.

Certaines toxines ophidiennes sont actives sur le canal potassium favorisant le passage du potassium à travers la membrane du neurone pour assurer la propagation de l'influx nerveux entre le cerveau et le muscle [99]. Les dendrotoxines extraites du venin de mamba (*Dendroaspis*), **bloquent les sous-types particuliers de canaux potassiques voltage-dépendants de la sous-famille Kv1 dans les neurones** impliqués dans les mécanismes de nervosité cellulaire et transmission synaptique [101]. En raison de leur forte puissance et sélectivité pour les sous-types de canaux potassiques kv1, les dendrotoxines sont largement utilisées comme outils pharmacologiques pour étudier la structure ainsi que le fonctionnement de ces canaux.

**Les modifications structurales et mutations des dendrotoxines ont notamment aidé à définir les propriétés de reconnaissance moléculaire de différents types de canaux potassique,** bien que plus de travaux d'investigations soient nécessaire pour définir les

caractéristiques chimiques des toxines qui sous-tendent leur sélectivité aux différents sous-types particuliers de canaux.

**En tant que marqueur biologique (sonde moléculaire), les dendrotoxines ont permis d'ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques en montrant la disparition progressive de récepteurs kv1.1 des canaux potassium lors du processus de sénescence et leur réduction significative et précoce dans la maladie d'Alzheimer [99].** Des analogues de dendrotoxines pourraient avoir un certain potentiel thérapeutique dans les pathologies associées à un dysfonctionnement de ces canaux [56] [305].

#### **4) Haditoxine.**

L'haditoxine est une neurotoxine extraite du venin du cobra royal *Ophiophagus hannah*. Cette nouvelle molécule présente un véritable potentiel thérapeutique pour la médecine dans le développement de traitement pour les maladies neurodégénératives, telle que la maladie d'Alzheimer et la dépendance au tabac.

L'haditoxine présente une structure particulière. Il s'agit d'un complexe composé de deux molécules de protéine identiques, connues sous le nom de toxine à trois doigts, liées entre elles. L'haditoxine existe sous la forme d'un homodimère semblable à la famille  $\kappa$ -neurotoxine (qui cible le récepteur neuronal  $\alpha 3/\beta 2$  et  $\alpha 4/\beta 2$ -nAChRs). Les sous-unités monomères ressemblent cependant étroitement à une  $\alpha$ -neurotoxines à chaîne courte, à la différence des monomères  $\kappa$ -neurotoxine, qui ressemblent à une  $\alpha$ -neurotoxines à chaîne longue.

**L'haditoxine agit en bloquant les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine (nAChRs). En empêchant la fixation de la nicotine elle protège les neurones de la dégénérescence.**

L'haditoxine présente une nouvelle pharmacologie antagoniste des récepteurs nACh des muscles ( $\alpha\beta\gamma\delta$ ) et des neurones ( $\alpha 7$ ,  $\alpha 3\beta 2$  et  $\alpha 4\beta 2$ ) avec une affinité et efficacité maximale pour l' $\alpha 7$ -nAChRs. En dépit de sa similitude structurale avec les  $\alpha$ -neurotoxine à chaîne courte et les  $\kappa$ -neurotoxine, l'haditoxine est la seule à présenter le blocage des récepteurs  $\alpha 7$ -nAChR neuronaux. En effet, les récepteurs  $\alpha 7$ -nAChR neuronaux ne sont reconnus ni par les  $\alpha$ -neurotoxines à chaîne courte, ni par les kappa-neurotoxines. Il s'agit de la première  $\alpha$ -neurotoxine à chaîne courte dimérique interagissant avec les récepteurs  $\alpha 7$  - nAChR neuronaux ainsi que la première toxine homodimère à trois doigts à interagir avec les nAChR musculaires.

Compte tenu de cette pharmacologie diversifiée et unique, l'haditoxine pourrait avoir de nombreuses utilisations futures dans le développement d'agents thérapeutiques. Cette toxine hautement spécifique pourrait également servir de sonde moléculaire pour étudier le rôle des récepteurs de neurotransmetteurs et ainsi de comprendre leur rôle dans la maladie. Ces récepteurs sont en effet importants dans les maladies neurodégénératives. A ce jour les propriétés thérapeutiques de la toxine n'ont été expérimentées que sur des rongeurs, il faudra attendre encore plusieurs années avant qu'un traitement soit mis sur le marché [306].

### C) Les facteurs de croissances des nerfs NGF.

Depuis leurs découvertes, les chercheurs s'intéressent à la fonction possible des facteurs de croissance des nerfs (NGF) isolés des venins ophidiens qui semblent être une nouvelle source naturelle du NGF [307]. Découvert par hasard dans le venin de cobra, **le NGF favorise la multiplication rapide des fibres nerveuses périphériques. Ce peptide a une fonction protectrice sur les neurones et oriente la connexion des fibres neuronales entre elles.** Utilisé dans les cultures cellulaires, **le NGF favorise le développement des synapses et a permis d'en expliquer le mécanisme.** Aujourd'hui, le NGF et ses apparentés, désignés collectivement neurotrophines, sont bien reconnus comme étant des médiateurs de multiples phénomènes biologiques dans la santé et la maladie, allant des effets neurotrophiques aux immunotrophes et épithéliotrophes aux effets métabotrophes. Par conséquent, **le NGF et d'autres neurotrophines sont impliqués dans la pathogenèse d'un large spectre de maladies neuronales et non neuronales, de la maladie d'Alzheimer et d'autres maladies neurodégénératives à l'athérosclérose et d'autres maladies cardiométaboliques.**

## 1) Mécanisme d'action.

L'action biologique du NGF est médiée par :

- **Le récepteur de haute affinité TrkA** (liée tropomyosine-récepteur de kinase A, également connu sous le nom de récepteur de la tyrosine kinase).
- **Le récepteur de faible affinité appelée pan75 récepteur de neurotrophine (p75<sup>NTR</sup>)** [82].

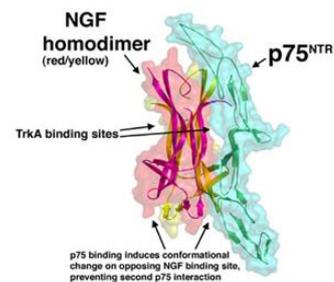


Figure 81: Structure relation NGF / p75.

Dans la plupart des cas, **l'expression de TrkA exerce des actions protectrices sur des maladies impliquant la dégénérescence de cellules cibles de NGF**. Dans ces maladies, le solde de TrkA et p75<sup>NTR</sup> des voies de signalisation est altéré par différents mécanismes, y compris la modulation du corécepteur. **Les agonistes des récepteurs TrkA peuvent fournir des alternatives dans la thérapie des maladies neurodégénératives et psychiatriques**. Les NGF jouent en effet un rôle central dans les comportements agressifs et l'anxiété [82].

En plus de sa fonction neurotrophique, cette molécule influence la survie et l'activité d'un grand nombre de cellules non neuronales « imprévisibles » telles que des cellules immunitaires, des fibroblastes, des cellules épithéliales, des cellules bêta pancréatiques, des cellules de tissu adipeux et cardiomyocytes. Ces actions non-neuronales des NGF et d'autres facteurs neurotrophiques découverts ultérieurement, apporte de nouvelles données dans l'étude de la neurobiologie, à savoir, neuro-immunologie et, récemment, neuro-adipology [82].

**Le traitement de la polyneuropathie diabétique était l'une des premières indications recherchées pour l'essai clinique de NGF**. Les premiers résultats de ces études sont actuellement controversés. Des études ultérieures sur l'effet de l'administration de NGF dans les neurones cholinergiques du cerveau antérieur du rongeur et les performances comportementales et mémoire ont conduit à **l'hypothèse que le NGF peut être utile pour protéger ces neurones de la dégénérescence dans le cerveau de sujets atteints de la maladie d'Alzheimer**. Bien que le potentiel thérapeutique de NGF dans le traitement des ulcères de la cornée neurotrophiques, les ulcères de la peau, le glaucome et la maladie d'Alzheimer paraissent clairement démontré, **l'utilisation du NGF en tant que médicament est limitée en raison de sa pharmacocinétique incomplètement établie et le coût élevé associé à la production de NGF recombinant humain**. Ces obstacles ont également conduit la communauté scientifique vers l'identification de petites molécules (mimétiques de NGF) avec des propriétés semblables

à des médicaments. Ces molécules peuvent lier directement aux récepteurs NGF provoquant leur activation, améliorer la libération de NGF endogène, et/ou influencer les voies de signalisation intracellulaires [82].

Plusieurs stratégies thérapeutiques pour l'administration de NGF dans des modèles animaux et dans des maladies humaines ont été explorées. Des étapes cliniques ont été tentées alors que d'autres sont actuellement en cours pour évaluer si les agonistes des récepteurs NGF et/ou TrkA peuvent prévenir ou protéger contre la dégénérescence cellulaire dans le système nerveux, le système visuel cutané et le tissu myocardique exerce très probablement des effets thérapeutiques sur les maladies cardiaques telles que l'athérosclérose, l'obésité, le diabète de type 2 et le syndrome métabolique. En revanche, les antagonistes du récepteur NF TrkA sont apparus comme de nouveaux médicaments potentiels pour le cancer de la prostate et du sein, le mélanome malin, les syndromes de la vessie et diverses conditions de la douleur [82].

#### **D) Sclérose en plaque et encéphalomyélite allergique.**

Autrefois controversée, l'utilisation des effets bénéfiques du venin de serpent dans le traitement de la sclérose en plaques est aujourd'hui confirmée par de récentes preuves scientifiques. Le venin de cobra se montre notamment prometteur pour le traitement de la sclérose en plaques (SEP) dans un modèle d'encéphalomyélite allergique expérimentale (EAE). Dans cette pathologie, le système immunitaire attaque la gaine isolante des cellules nerveuses (la myéline), ce qui altère progressivement les fonctions sensorielles et cognitives ainsi que le mouvement.

##### **1) $\alpha$ -cobratoxine.**

La cobratoxine, une neurotoxine extraite du venin du cobra de Thaïlande *Naja kaouthia*, pourrait en effet permettre de remettre le système immunitaire à l'équilibre. Elle a démontré **plusieurs activités pharmacologiques qui soutiennent fortement son utilisation dans le traitement de la sclérose en plaque**. En employant une étape de désintoxication chimique, la neurotoxine peut être rendue sûre pour l'administration chez l'homme avec des effets secondaires minimales. Cette  $\alpha$ -neurotoxine modifiée (appelée « MCTX ») a démontré une activité **neuromodulatrice, antivirale et analgésique, des éléments associés à la condition de la sclérose en plaques. Elle a également démontré une activité immunosuppresser**

**puissante dans les modèles animaux de la maladie aigus et chroniques. Dans une étude, le développement de la toxine de cobra modifié ( $\alpha$ -cobratoxine) « MCTX » s'est révélé avantageuse dans l'inhibition des symptômes de l'EAE.** L'encéphalomyélite auto-immune expérimentale, ou encéphalomyélite allergique expérimentale, est un modèle animal de sclérose en plaques utilisé en laboratoire. Comparée à des toxines oxydées capables d'inhiber la réplication virale et agissant comme des agents antiviraux, les toxines de cobra modifiées (MCTX) ont montré des résultats prometteurs dans le soulagement des symptômes dans les modèles animaux de EAE établie. Les résultats montrent que la **MCTX est capable d'inhiber le développement, ainsi que la phase de rechute de l'EAE chez les rats plus efficacement que des toxines oxydées. Il est possible qu'une toxine cobra puisse être développée avec une efficacité thérapeutique pour le traitement de la sclérose en plaques ou le développement de vaccins** [308] [309].

## **2) RPI-78M.**

RPI-78M est en cours de développement pour le traitement de la sclérose en plaques (SEP). Les autres troubles neurologiques pouvant être atteints par le RPI-78M comprennent la myasthénie grave (MG), la dystrophie musculaire (MD) et la sclérose latérale amyotrophique (SLA).

**Le RPI-78M dérivé d'un extrait de venin de cobra est un antagoniste du récepteur nicotinique.** Le médicament présente une toxicité remarquablement faible avec une large gamme d'applications thérapeutiques. **Des études ont démontré que les neurotoxines natives et modifiées peuvent protéger les cellules nerveuses de la mort cellulaire précoce.** En outre, le RPI-78M peut être bénéfique dans chez les patients atteint de troubles neuromusculaires tels que, la SEP, la myasthénie, la dystrophie musculaire et la sclérose latérale amyotrophique (SLA), lorsque (où) l'activité des nAChR a été compromise. Administré chez l'homme et chez l'animal, le RPI-78M n'a pas montré d'effets secondaires graves. Les études ont révélé que le RPI-78M était une molécule très stable qui peut être administrée par voie orale, ce qui élimine le besoin d'injection. Le traitement peut être utilisé dans une large gamme de doses à faible toxicité, éliminant ainsi le risque de surdosage. La technologie brevetée est couverte par les brevets décrivant l'application et l'utilisation du RPI-78M dans le traitement des maladies auto-immunes et virales.

Sur la base des études précliniques le RPI-78M semble être prometteur pour l'élaboration d'un nouveau médicament pour le traitement de la sclérose en plaque pédiatrique.

**En septembre 2015, le médicament candidat RPI-78M développé par la corporation Nutra Pharma a obtenu le statut de médicament orphelin par la FDA (Food and Drug Administration) des États-Unis pour le traitement de la sclérose en plaques pédiatrique.**

Cette désignation est conçue pour encourager le développement de médicaments qui peuvent fournir des avantages significatifs aux patients souffrant de maladies rares. En effet, la sclérose en plaques pédiatrique est un besoin médical urgent et non satisfait. Bien qu'il soit distinct de la forme adulte de la maladie, il n'y a pas de médicaments approuvés pour le traitement de la sclérose en plaque pédiatrique. Ces enfants n'ont pas d'autre choix que de compter sur l'utilisation de l'étiquette hors AMM des médicaments adultes pour contrôler leur maladie.

**En septembre 2016, Nutra Pharma créer une alliance avec la société Omnia Biologics pour cloner et produire des alpha-cobratoxine pour la fabrication de RPI-78M en préparation pour les essais cliniques à venir la sclérose en plaques pédiatrique.**

#### **E) Myasthénie grave-Dystrophie.**

La myasthénie grave (MG) (du latin myasthenia gravis) est le trouble de la jonction neuromusculaire le plus fréquent, affectant 20 pour 100000 personnes dans diverses populations. Elle touche environ 3500 personnes en France. Les patients MG présentent une faiblesse fatigante caractéristique des muscles volontaires, y compris les muscles oculaires, bulbaires et des membres, la perte de poids, de la dysphagie et dans les cas graves, un décès par difficulté respiratoire. Chez la majorité des patients, la MG semble provenir d'une réponse auto-immune contre les récepteurs de l'acétylcholine (AChR), qui sont essentiels pour la neurotransmission. Les anticorps pathogènes dirigés contre AChR peuvent être détectés chez 80% à 85% des patients MG [310].

### 1) $\alpha$ -bungarotoxine.

L' $\alpha$ -bungarotoxine ou «  $\alpha$ -BTX » est une  $\alpha$ -neurotoxine composée de 74 acides aminés extraite du venin de *Bungarus multicinctus*. Cet antagoniste compétitif de l'acétylcholine se lie de manière spécifique et irréversible avec le récepteur nicotinique de l'acétylcholine de type musculaire induisant une paralysie musculaire généralisée allant jusqu'à l'arrêt respiratoire.

La découverte de l' $\alpha$ -bungarotoxine en 1963 a joué un rôle primordial dans la recherche sur la myasthénie grave [101] [311]. **L'utilisation de l' $\alpha$ -bungarotoxine marquée à l'iode radioactif ( $I^{135}$ ) a permis de comprendre l'étiologie auto-immune de la myasthénie.** La myasthénie grave est en effet une maladie auto-immune qui se traduit par une sévère insuffisance des contractions musculaires conduisant à une paralysie motrice complète. Le nombre de récepteurs cholinergiques est considérablement réduit à la suite d'une destruction progressive par les anticorps synthétisés contre eux par le patient. La transmission de l'influx nerveux gouvernant la commande musculaire est alors diminuée proportionnellement à la quantité de récepteurs détruits par ces anticorps.

**L' $\alpha$ -Bungarotoxine a également joué un grand rôle dans la détermination de beaucoup de détails structurels des récepteurs nicotinique de l'acétylcholine.** Conjugué à un fluorophore ou à une enzyme pour immunohistochimie elle se fixe aux tissus et permet la caractérisation morphologique des jonctions neuromusculaire par visualisation via la microscopie de fluorescence ou la lumière.

**L' $\alpha$ -bungarotoxine a en outre conduit, à la fin des années 1990, à l'élaboration d'un test pour le diagnostic et de suivi de la myasthénie grave [311].** La sévérité de cette maladie et son évolution est évaluée en mesurant le taux de ces anticorps dans le sang du malade, à l'aide d'un test mettant en jeu la neurotoxine- $\alpha$ . La forte liaison covalente entre les neurotoxine- $\alpha$  et le récepteur cholinergique est exploitée pour doser le taux d'anticorps contre les récepteurs produits par le patient souffrant de myasthénie. La toxine couplée à un marqueur radioactif, est fixée sur des récepteurs cholinergiques de torpille, un poisson doté d'organes électriques particulièrement riches en récepteurs de ce type. Cette préparation est ensuite mélangée au sérum du patient. Les anticorps antirécepteurs cholinergiques présents se fixent alors sur les récepteurs de torpille. Après élimination des réactifs en excès, il est possible de doser la quantité de récepteurs saturés par les anticorps et de mesurer la concentration de ces derniers [130].

## 2) Notexine.

La notexine est une neurotoxine- $\beta$  présynaptique isolée du venin du serpent tigre *Notechis scutatus*, un Elapidae australien. Il s'agit d'une phospholipase A2 de 119 acides aminés (13,574 kDa) douée d'une activité neurotoxique présynaptique et d'une puissante myotoxicité. Elles inhibent en effet la transmission neuromusculaire en bloquant la libération d'acétylcholine des terminaisons nerveuses et est également directement toxique pour le muscle squelettique lors de l'application locale in vivo (effet dystrophique). Facilement disponible, elle est relativement sûre d'emploi en dépit de ses propriétés neurotoxiques et néphrotoxiques directs.

Les propriétés de la notexine présentent un grand intérêt dans l'étude physiopathologique de la dégénérescence-régénération musculaire et dans l'étude de l'expression de la myosine lors de la régénération. Détruisant les terminaisons nerveuses, elle est utilisée en traitement local pour éliminer les neurones altérés observés dans les myopathies congénitales et permettre ainsi une régénération à partir de cellules nerveuses saines. Elle aurait également été prescrite comme anticonvulsifs [3] [312].

### a) Action myotoxique et étude sur le mécanisme de régénération musculaire.

Le muscle strié squelettique est doué d'un fort potentiel de régénération après une lésion musculaire. Ils sont composés de cellules contractiles entourées de tissu conjonctif. Ces cellules multinucléées sont organisées sous forme de fibres dont la longueur peut atteindre plusieurs centimètres. Après une lésion musculaire avec destruction de fibres, celles-ci peuvent se régénérer à partir de cellules mononucléées appelées « cellules satellites » présentes entre leur membrane plasmique et la lame basale. L'agression des fibres entraîne une prolifération puis une fusion des cellules satellites, soit avec leur fibre parentale permettant ainsi de les réparer, soit entre elles pour former de nouvelles fibres musculaires (myotubes). Les cellules satellites représentent la principale source de cellules précurseurs musculaire, bien qu'un recrutement de cellules médullaires à potentiel myogénique soit également possible en cas de lésions musculaires chroniques. Les études sur des modèles lésionnels expérimentaux ont en effet montré qu'une destruction étendue de fibres musculaires pouvait se reconstituer en quelques semaines, exclusivement à partir des cellules satellites intrinsèques.

## **b) Mécanisme de la notexine.**

Ainsi, il existe théoriquement dans un muscle strié une quantité de cellules satellites (myoblaste) minime mais suffisante pour générer la formation d'un volume de muscle identique à celui dont elles sont issues [313]. **En effectuant une destruction locale du muscle on active le processus régénératif.** Il y a alors prolifération des myoblastes et formation de nouvelles fibres musculaires. Les cellules satellites quiescentes, en réponse à un stimulus comme une lésion musculaire, une dénervation ou un exercice, vont s'activer. Après une phase de multiplication intense, elles vont fusionner entre elles ou avec des fibres préexistantes et reconstituer le tissu musculaire après leur différenciation terminale [312].

Le déclenchement de la régénération musculaire est étroitement lié aux événements qui se produisent pendant la phase de dégénérescence. Les événements cellulaires de la régénération du muscle lésé dépendent de la nature de la blessure [314]. Parmi les différentes techniques de destruction musculaire ou d'induction de nécrose, il y a l'injection de notexine. Elle agit sur le muscle en détruisant les fibres musculaires. L'injection de notexine dans le muscle strié squelettique de la patte chez la souris, entraîne une destruction quasi immédiate (quelques heures) de la totalité des fibres musculaires présentes dans l'espace de diffusion de la toxine. Ceci déclenche un ensemble de mécanismes complexes, faisant intervenir des facteurs de croissance (IGF, PDGF, FGF), des facteurs chimiotactiques (HGF), des facteurs de différenciation, etc., qui conduisent à l'activation, la prolifération puis à la fusion des cellules satellites, aboutissant à une récupération intégrale du nombre initial de fibres en 3 semaines sans fibrose [8] [314]. L'activation et la régulation des cellules satellites nécessitent ainsi de nombreux facteurs, dont font partis la réponse inflammatoire et des facteurs provenant de la vascularisation et de l'innervation (cytokines, growth factors) [312]. Après une lésion musculaire, on constate aussi une infiltration très rapide des cellules de l'immunité, les lymphocytes neutrophiles, qui initient l'activation des cellules satellites. Les macrophages migrent dans le site lésé très rapidement et vont rester les cellules prédominantes pendant 48 heures. Elles jouent non seulement un rôle de détergence des débris nécrotiques mais aussi dans la sécrétion de facteurs mitogènes, favorisant la prolifération des cellules satellites.

**L'injection de la notexine dans le muscle squelettique entraîne une lésion toxique.** Par rapport à une lésion de type ischémique, la lésion toxique induite par notexine est caractérisée par un infiltrat inflammatoire plus large et une phase raccourcie de la phagocytose des fibres musculaires endommagées. Cela permet à la prolifération et la différenciation des précurseurs

de cellules musculaires d'avoir lieu plus tôt, favorisée par des facteurs de croissance libérés par les cellules inflammatoires. Par rapport à la lésion ischiémique, la lésion toxique a également montré une plus grande conservation des membranes basales des myofibres nécrotiques, qui peuvent soutenir la fusion des précurseurs de cellules musculaires en myotubes, et une meilleure micro vascularisation [231].

Lorsque l'injection de notexine est effectuée après irradiation, on optimise les conditions nécessaires au processus régénératif en favorisant la formation de nouvelles fibres à partir des myoblastes nouvellement transplantés.

La notexine présente l'avantage **d'entraîner une nécrose de part et d'autre du site de l'injection musculaire. L'importance de la nécrose est proportionnelle à la dose**, le niveau de destruction musculaire peut donc facilement être modulé. De plus, **la nécrose entraîne une régénération musculaire rapide et complète, avec préservation de la lame basale. Elle n'endommage pas les cellules satellites et permet une restauration rapide de l'innervation. Elle n'a pas d'effet sur la microcirculation et la fibrose post-régénération est faible.**

### c) Aspect histologique.

**Une heure après injection de la notexine en sous-cutanée chez le rat, on remarque des lésions physiques sur les nerfs terminaux : mitochondrie à morphologie anormale, structure lysosomale, absence de vésicules synaptiques. Entre 3 et 6 heures, certains nerfs sont dépourvus d'architecture interne et on note des débris de mitochondries. Rapidement après injection de notexine, une réaction inflammatoire s'installe.** A 4 heures, la moitié des myofibres sont séparées entre elles par un œdème avec une infiltration importante de polynucléaires neutrophiles. **Au bout de 24 heures après l'injection, la destruction des nerfs terminaux et des axones intra-musculaires est totale. La nécrose est nette (75 % des myofibres) et l'inflammation s'amplifie.** Le tissu musculaire est infiltré par des macrophages qui nettoient le muscle des débris cellulaires nécrosés. Une augmentation importante du taux de calcium intracellulaire est notée dans de nombreuses myofibres. La notexine provoque en effet une rupture de la membrane plasmique musculaire et une entrée massive de calcium responsable à son tour d'une hyper contraction et d'une activation de protéases calcium-dépendantes [241]. **Trois jours post-injection, l'architecture du fascicule commence à se restaurer avec l'apparition des premiers myotubes à la périphérie des fibres nécrotiques, sous la lame**

**basale.** On note une grande cellularité avec une multiplication des cellules satellites. Les macrophages sont encore très nombreux. Le rétablissement de l'innervation a lieu entre le 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> jour. Dès le 4<sup>ème</sup> jour, la réinnervation est entamée mais on constate rapidement la présence de réinnervations collatérales (innervation de fibres musculaires voisines par le même axone). Aucune innervation multiple n'est constatée (innervation de fibre par plusieurs axones) [312]. Dès le 7<sup>ème</sup> jour, les myofibres sont de petites tailles et immatures, avec un tissu interstitiel abondant séparant les fibres néoformées. De rare cas de centralisation nucléaire sont notés. **14 jours après l'injection, le diamètre des fibres augmente et l'espace interstitiel diminue. La morphologie musculaire est restaurée. Des colorations oxydatives permettent la distinction entre les fibres rapides et lentes. Au bout de 21 jours, le muscle est totalement régénéré et est morphologiquement identique au témoin. On peut juste noter certaines fibres plus petites et la présence de noyaux centraux.**

La myosine néonatale est la première détectable dès le troisième jour de régénération. Elle va être présente jusqu'au 21<sup>ème</sup> jour post lésionnel mais uniquement dans certaines fibres. La myosine lente est détectée dès le 4<sup>ème</sup> jour de régénération, mais en co-expression avec la myosine néonatale et rapide. Les 1<sup>ères</sup> fibres lentes apparaissent vers le 7<sup>ème</sup> jour, les fibres rapides vers le 10<sup>ème</sup> jour, et la distinction des fibres est nette le 14<sup>ème</sup> jour.

**La régénération du muscle débute rapidement et est totale en 21 jours. Cette régénération est de bonne qualité car la notexine entraîne une nécrose musculaire, mais ne détériore pas les cellules endothéliales des capillaires, préservant la microcirculation. La lame basale et les cellules satellites restent intactes et la réinnervation est précoce [312].**

#### **d) Conclusion.**

Ainsi, la régénération musculaire peut être induite par injection de myotoxine dans le muscle, entraînant une nécrose intense. La régénération du muscle est rapide et complète faisant intervenir les cellules satellites qui reforment de nouvelles fibres. La maturation des fibres néoformées peut être suivie par la synthèse des isoformes de myosines qui montrent la restauration progressive des types de fibres musculaires.

Les expériences de nécrose sont très utilisées afin d'induire une régénération musculaire et d'en étudier la physiologie. De plus, certaines expériences de nécrose/régénération, facilement reproductibles, permettent d'obtenir des modèles expérimentaux de maladies dégénératives, d'en étudier la physiopathogénie, et d'envisager des perspectives thérapeutiques. Ces découvertes ont apporté de l'espoir dans les traitements par thérapie cellulaire pour certaines myopathies génétiquement déterminées et acquises, au premier rang desquelles figure l'insuffisance cardiaque, et plus récemment, l'incontinence urinaire par ISU le sphincter strié urétral contenant également des cellules satellites capables de le régénérer après une lésion [313].

#### **3) Crotamine et néostigmine.**

Les effets de la crotamine, myotoxine, extraite du serpent à sonnette sud-américain *Crotalus durissus terrificus* et les effets de la néostigmine sur la transmission neuromusculaire chez des rats myasthéniques ont été comparés. La néostigmine est un parasymphomimétique, par son effet inhibiteur des cholinestérases, elle prolonge et augmente les effets muscariniques et nicotiniques de l'acétylcholine. Elle augmente l'intensité et le rythme des contractions des fibres musculaires lisses, normalise la force des contractions des muscles striés (action antimyasthénique) en favorisant la transmission de l'influx nerveux et enfin elle antagonise le bloc neuromusculaire des curares non dépolarisants. **Il a été montré que la crotamine est plus efficace que la néostigmine pour améliorer la performance musculaire chez les rats myasthéniques, éventuellement en améliorant le facteur de sécurité de la transmission neuromusculaire** [315]. A faible concentration la crotamine améliore la neurotransmission dans les préparations neuromusculaires isolées en modulant les canaux sodiques [101].

## **F) Action sur les récepteurs GABA de type A (Epilepsie, schizophrénie, douleur chronique, etc.).**

Le système nerveux des vertébrés est sous le contrôle dual de courants électriques excitateurs et inhibiteurs générés par de nombreuses protéines hautement spécialisées appelées canaux ioniques. Le récepteur GABA<sub>A</sub> est le principal responsable des courants inhibiteurs. Sa dérégulation génère de nombreuses pathologies invalidantes telles que les épilepsies et les convulsions, les troubles de l'anxiété et du sommeil, les états bipolaires et dépressifs, la schizophrénie, l'autisme, la douleur [52].

Les récepteurs GABA de type A (GABA<sub>A</sub>) sont des canaux ioniques perméables aux ions chlorures et présents au niveau des membranes des neurones qui sont activés par fixation de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA). Il se compose de cinq sous-unités glycoprotéiques ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\pi$  et  $\theta$ ), délimitant en son centre le canal

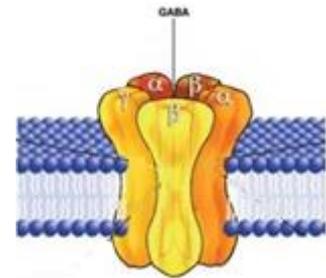


Figure 82 : Récepteur GABA [377].

ionique. Chaque sous-unité comporte un domaine extra-membranaire contenant les sites de fixation du GABA et d'autres effecteurs, et un domaine hydrophobe membranaire qui définit le pore. La fixation de deux molécules de GABA à leur site de reconnaissance respectif (une à la sous-unité  $\alpha$  et une à la sous-unité  $\beta$ ) provoque un changement de conformation du récepteur permettant l'ouverture du pore. L'ouverture du canal chlore laisse passer les ions Cl<sup>-</sup> dans la cellule, ce qui produit une hyperpolarisation cellulaire. Le potentiel du neurone s'éloigne du seuil d'activation des canaux sodiques voltage-dépendant rendant la transmission du potentiel d'action plus difficile. Un excès de GABA peut cependant désensibiliser le récepteur. La désensibilisation ou l'inhibition de ce récepteur conduit à une augmentation de l'activité électrique du cerveau, entraînant ainsi des convulsions.

Les récepteurs GABA<sub>A</sub> sont très importants chez les mammifères car ils jouent un rôle indispensable dans la communication entre le cerveau et la moelle épinière. Ils sont d'ailleurs la cible de plusieurs traitements pharmacologiques importants sur le plan de la santé humaine tel que : Des médicaments anxiolytiques comme le diazépam (Valium®) ou tranquillisant comme l'alprazolam (Xanax®), fixent différemment les récepteurs GABA<sub>A</sub> et provoquent la relaxation au lieu de crises d'épilepsie [316].

## 1) Micurotoxines.

Les « Micurotoxines » (MmTX1 et MmTX2) ont été découvertes et extraites du venin d'un serpent corail du Costa Rica, *Micrurus mipartitus* très récemment (2015) par l'équipe de Pierre Bougis au centre de recherche en neurobiologie et neurophysiologie de Marseille, en association avec d'autres instituts internationaux. Particulièrement puissante, ces toxines sont impliquées dans les mêmes mécanismes que ceux de l'épilepsie, la schizophrénie ou encore les douleurs chroniques. Leur action **s'apparente à celle des benzodiazépines en ciblant avec haute affinité le récepteur de type A de l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA<sub>A</sub>)** [52] [316] [53].

### a) Mécanisme d'action.

Les micurotoxine 1 (MmTX1) et micurotoxine 2 (MmTX2) se lient avec une forte affinité aux récepteurs GABA à des concentrations sub nanomolaires. **Contrairement aux traitements existant (BZD) qui cibles l'interface situé entre les sous unité  $\alpha$  et  $\gamma$ , il semblerait que le site de liaison des micurotoxines soit l'interface situé entre les sous-unités  $\alpha$  et  $\gamma$  du récepteur GABA.** En effet des études ont montrées que la présence de la sous-unité  $\gamma$  connue comme étant indispensable à l'action des benzodiazépines, ne semble pas nécessaire à l'action des micurotoxines. En revanche, une mutation ciblée de la sous-unité  $\alpha$  du récepteur GABA<sub>A</sub> montre un effet délétère sur l'activité des Micurotoxines [52] [53].

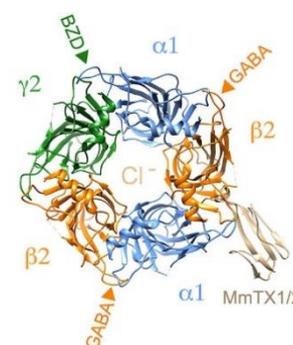


Figure 83: Schéma d'un récepteur GABA A en interaction avec une Micurotoxine [233].

Testé in vivo chez la souris, l'injection des micurotoxines (MmTX1/MmTX2) par voie intraveineuse, ne révèle aucun effet. En revanche inoculées directement dans le cerveau de souris, les micurotoxines provoquent **initialement une période d'activité réduite, suivie par des étapes de saisies intenses.** Dans un premier temps, la toxine se lie au récepteur GABA<sub>A</sub> pour en augmenter de manière allostérique la sensibilité à l'agoniste, potentialisant ainsi l'ouverture du récepteur [53] ce qui augmente le flux des ions chlorures créant une hyperpolarisation. Puis dans un second temps, elle va accélérer la désensibilisation du récepteur. L'hyperpolarisation initiale du neurone diminue son activité. La désensibilisation accélérée du récepteur GABA<sub>A</sub> à long terme l'empêche d'exercer son rétrocontrôle négatif, ce qui aboutit à une activité électrique accrue. Les cellules montrent alors une augmentation importante de la fréquence de leur potentiel d'action qui se produisent en rafales. Les micurotoxines provoquent une succession de **relaxations** et de **tétanisations** des muscles,

**similaires à une crise d'épilepsie.** Le venin agissant de manière permanente les symptômes observés ne peuvent pas être arrêtés [316].

**Sur le plan de l'activité neuronale spontanée** enregistrée en observant les oscillations du calcium intracellulaire de neurones d'hippocampe en culture (in vitro), les micrurotoxines n'ont aucune activité. Mais, en présence de GABA<sub>A</sub> les oscillations sont inhibées substantiellement, soutenant ainsi l'activation des récepteurs GABA<sub>A</sub> qui, à son tour, inhibe l'activité du réseau neuronal. Cette période d'inhibition courte est suivie par une large augmentation de la fréquence des oscillations. **Les mesures de l'excitabilité des neurones hippocampique (in vitro) révèlent ainsi une inhibition de l'activité du réseau neuronal transitoire, suivie d'une augmentation de l'activité spontanée** [53].

Ainsi, l'action des micrurotoxines n'est pas simple à appréhender et mérite des études plus approfondies. Au-delà d'une découverte fondamentale montrant l'existence de toxines d'origine animale ciblant spécifiquement les récepteurs GABA<sub>A</sub>, ces travaux ont pour perspective la définition d'une nouvelle classe de composés actifs sur ces récepteurs.

Les micrurotoxines sont utilisées comme un outil de recherche pour étudier les récepteurs GABA<sub>A</sub> tant fonctionnellement que structurellement. Il est important de mieux comprendre le fonctionnement des récepteurs GABA<sub>A</sub>, dans la mesure où leurs dysfonctionnements peuvent provoquer différentes pathologies telles que l'épilepsie, la schizophrénie et des douleurs chroniques. Grâce aux micrurotoxines, les scientifiques espèrent dans l'avenir apporter de nouveaux éléments sur ces maladies.

Dans un contexte plus large, la production synthétique et recombinante réussie de ces toxines devrait améliorer leur sélectivité de sous-type et leur puissance. Les micrurotoxines pourraient être utilisé comme candidat médicament pour le développement de futurs traitements. En effet, la pharmacologie des micrurotoxines s'apparentant à celle des benzodiazépines, tout en ciblant un site d'action différent de ces dernières, cela ouvre de nouvelles perspectives dans le développement pharmacologique de nouvelles thérapies [53] [52] [316].

### **G) Actions antidépressives nootropiques et antipsychotiques.**

Des actions antidépressives ont été découvertes dans les venins de *Vipera russelli* et *Enhydrina schistosa* et *Echis carinatus*. Des réactions de désintoxication photochimiques sensibilisées au bleu de méthylène catalysées par des rayons ultraviolets ont été utilisées sur leurs venins afin de générer des trois produits photo-oxydés appelés venoïdes de serpent (SV) : nommés POVRVP, POESVP et POECVP. Ces produits photographiques ont été conçus en exposant les protéines de venin aux rayonnements UV en présence de bleu de méthylène à 37°C pendant 15, 30 et 90 minutes respectivement en fonction de la toxicité des marqueurs biologiques et de l'antigénicité.

Dans l'évaluation préclinique dans des modèles animaux expérimentaux, le **produit de venin de *Vipera russelli* photo-oxydé (SV-1) nommé « POVRVP » (RUV, 37°C, 15min)** a présenté des activités de sédation réversibles, des effets analgésiques, anti-inflammatoires, de coagulation et de stimulation cardiaque. Il entraîne également un prolongement de l'apparition de la convulsion, une activité relaxante du muscle squelettique, avec une diminution de l'activité locomotrice et un métabolisme hépatique induit par le barbiturate amélioré chez la souris. Les études de stabilité et de toxicité subaiguë ont montré que POVRVP est viable pendant 3 mois [317]. Le **produit de venin d'*Echis carinatus* photo-oxydé (SV-2) nommé « POECVP » (RUV, 37 ° C, 90 min)** présentait des propriétés antidépressives et nootropiques qui pourrait se montrer intéressante pour le traitement des troubles d'hyperactivité psychotiques chroniques [318]. **Les effets de POECVP ont été évalués sur l'apprentissage, la mémoire et le stress chez les rats.** Dans les études de dose unique et chronique, le POECVP a en effet considérablement diminué le temps nécessaire pour atteindre les aliments dans le labyrinthe en T, réduit la latence des transferts dans le labyrinthe plus élevé et a diminué le temps d'immobilisation dans le test de nage forcé. Le **produit de venin d'*Enhydrina schistosa* photo-oxydé (SV-3) « POESVP » (RUV, 37 ° C, 30 min)** présentait des propriétés stimulantes sur le système nerveux central, analgésiques et anticoagulants ainsi que des propriétés nootropiques [319].

Du fait de leur nombreuses propriétés neuro- et psychopharmacologiques, POECVP et POESVP et POVRVP sont de potentiels candidats médicaments qui pourraient être proposés comme traitement alternatif des troubles dépressifs et psychotiques chroniques. Cependant des recherches supplémentaires sont encore nécessaires [132].

## **V Applications antalgiques et analgésiques.**

Certains composés isolés des venins de serpent possèdent des propriétés analgésiques ce qui représente un réel potentiel pour le développement de nouveaux médicaments dans la lutte contre la douleur [320].

Selon la définition officielle de l'association internationale pour l'étude de la douleur (International Association for the Study of Pain) la douleur est « **une sensation et une expérience émotionnelle désagréable en réponse à une atteinte tissulaire réelle ou potentielle ou décrites en ces termes** » [321]. La douleur peut être ressentie de façon plus ou moins intense selon les individus et leur degré de sensibilité. Elle est le produit d'un message nociceptif transmis à l'encéphale par les nerfs périphériques via la moelle épinière.

Deux principaux types de douleurs peuvent être décrits :

- La **douleur aiguë (ou symptomatique)** est intense mais souvent brève. C'est un signal d'alarme qui protège l'organisme en induisant des réponses réflexes et comportementales dont la « finalité » est d'informer l'organisme d'un danger pour son intégrité et de supprimer les causes qui ont déclenché cette sensation.
- La **douleur chronique (ou pathologique)**, représente la sensation douloureuse qui excède trois mois et devient récurrente. Elle peut subsister un temps indéfini et apparaît dans un but et par des moyens mal déterminés. Lorsqu'elle devient chronique, la douleur perd sa « finalité » de signal d'alarme et devient une maladie. Il existe différents types de douleurs chroniques, la douleur inflammatoire, neuropathique, dysfonctionnelle ou cancéreuse selon les mécanismes physiologiques qui la supportent [252].

Bien que la douleur soit une réponse physiologique d'une importance cruciale, il en résulte aussi de la souffrance et de l'agonie inutile. La douleur peut se produire selon différentes raisons, elle peut être simplement gênante ou devenir très invalidante, s'accompagnant d'anxiété, de détresse émotionnelle et/ou de dépression. Dans tous les cas, il est important de la soulager autant que possible de manière à permettre au patient d'avoir une vie normale [320].

Le contrôle et le soulagement de la douleur sont une priorité. Le traitement de la douleur aiguë ou chronique représente encore aujourd'hui un besoin médical non ou mal satisfait et ce malgré le fait qu'il existe de grandes familles d'analgésiques qui restent bien souvent inefficaces. À ce

titre, la gestion efficace de la douleur nécessite de nouveaux produits thérapeutiques. Les traitements actuels ont leur limite : Ils n'agissent pas de manière égale sur tous les patients et sur tous les types de processus douloureux. Ils sont souvent d'efficacité limitée et produisent des effets indésirables importants, notamment des effets addictifs. Au cours de ces dernières années il n'y a eu que peu d'avancés, cela est en partie dû à une mauvaise connaissance des mécanismes physiopathologiques de la douleur. C'est pour cela que la découverte de nouvelles cibles moléculaires représente une opportunité pour le développement de nouvelles stratégies pharmaceutique contre la douleur [322]. L'identification de nouvelles classes de composés issues du milieu naturel pourra aider à la compréhension des mécanismes complexes de la transmission de la douleur dans le système nerveux et pourra ainsi potentiellement conduire à l'identification de composés pharmacologiques sans effets indésirables [323].

#### **A) Utilisation du venin de serpent.**

**Les venins de serpents sont des sources incontestables de nouveaux principes actifs pour le développement d'antidouleurs.** En se basant sur la simple observation de l'amélioration de l'état de la personne, les Indiens ont utilisé instinctivement le venin de cobra en association à l'opium pour le traitement de la douleur aiguë. Au début des années 1900, Calmette a étudié l'utilisation du venin de cobra dans le traitement du cancer chez les souris. Il a ensuite été appliqué cliniquement à des sujets atteints de cancer où il a établi une réputation en France pour soulager la douleur. Commercialisées à partir des années trente, les préparations analgésiques contenant des venins de *Naja* ou de *Crotalus durissus terrificus* ont disparu dans les années soixante. **Le but principal de ces préparations était d'éviter la dépendance que l'on observe avec les morphiniques.** Des études réalisées durant cette période ont démontré que **le venin de cobra était plus puissant que la morphine et qu'il pouvait donc être utilisé comme analgésique.** De même, il a été démontré des propriétés anti-inflammatoires pouvant ralentir la dégénérescence des articulations dans la polyarthrite rhumatoïde. Par la suite, le venin de serpent fut utilisé dans différentes indications telles que les maux de dos, les douleurs menstruelles, les maux de tête, les douleurs arthritiques ou encore la névralgie du trijumeau. Il a permis le contrôle à long terme des douleurs chroniques sans problèmes de dépendance. Une caractéristique de ce produit était la lente apparition de l'activité analgésique mais son activité est prolongée. Lors de la réalisation de certaines préparations à base de venin de serpent, il a pu être observé des propriétés **anti-œdémateuses, anti-inflammatoires, voire antitumorales.**

Ces préparations, pourtant prometteuses, présentaient néanmoins des effets indésirables relativement importants (maux de tête, bouche sèche, nausées, vomissements, étourdissements, hémiparésie, palpitations, etc.). Outre que les propriétés des venins sur la sédation de la douleur étaient contestées par de nombreux praticiens, l'amélioration des autres traitements analgésiques a finalement conduit à leur retrait du marché [138] [172].

Le venin de cobra est aujourd'hui étudié pour le traitement de diverses formes de douleur, des cancers, des maladies auto-immunes et des troubles neurologiques. **Il a été définitivement prouvé que le venin de cobra contient des constituants qui contrôlent la douleur et l'inflammation. L'intérêt du développement de ces nouveaux agents thérapeutiques est l'absence de tolérance au cours d'une longue période de traitement et l'absence de symptômes d'abstinence après la cessation de traitement.** En Chine, les chercheurs examinent la possibilité d'une utilisation du venin de cobra pour traiter la toxicomanie. L'Institut national du cancer en Italie a participé à des essais cliniques chinois pour évaluer l'efficacité des toxines de cobra dans le contrôle de la douleur postopératoire et de la douleur modérée à sévère du cancer.

## **B) Toxines analgésiques d'Elapidae.**

### **1) Mambalgine : toxines actives sur les canaux ASICs « Acid- Sensing Ion Channels ».**

Certains canaux ioniques (tel que les canaux ASICs) jouent un rôle central dans le mécanisme de la douleur. Dans les venins se trouve un certain nombre de peptides actifs contre ces canaux ioniques. En recherche fondamentale, ces peptides sont utilisés comme outil pharmacologique afin de mieux comprendre les mécanismes de la douleur et de la physiologie associée. Ils ont permis l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques et présentent un grand potentiel dans le développement de nouvelles thérapies médicamenteuses.

### a) La MiTx : identification d'une nouvelle cible biologique.

La contribution inattendue des canaux ionique ASIC1 dans la nociception a récemment été mise en évidence par l'étude des effets de la MiTx extraite du venin du serpent corail du Texas *Micrurus tener tener*. La MiTx n'est pas une toxine analgésique mais au contraire une toxine hyperalgésique. C'est-à-dire qu'elle ne soulage pas la douleur mais au contraire la provoque. Cette toxine a joué un rôle fondamental dans la compréhension des mécanismes de la douleur et la découverte d'une nouvelle cible pharmaceutique jusqu'alors ignorée des scientifiques et a ouvert une nouvelle approche pharmaceutique [324] [74].

### b) Les canaux ASICs (canaux ioniques de détection acide).

**Situés au sein de la membrane des neurones, les canaux ASIC, sont des médiateurs clés de la douleur inflammatoire.** Ils forment une classe de canaux cationiques dépolarisant excitateur. Essentiellement considérés comme des capteurs de protons extracellulaire, les canaux ASICs sont impliqués dans divers processus associés à l'acidification des tissus. Les variations de pH extracellulaires sont considérées comme le principal signal endogène qui déclenche l'activation des canaux ioniques ASICs.

La douleur ressentie dans certaines situations physiopathologiques est associée à une **acidification tissulaire** qui active les canaux ASIC. Lorsqu'un stimulus de douleur externe est reçu par le corps, **les cellules endommagées libèrent différents agents inflammatoires.** Les ions et autres produits chimiques libérés par les cellules endommagées sont détectés par les canaux ASIC qui s'ouvrent en raison d'un **changement dans les niveaux de pH** que les ions provoquent. En s'ouvrant ces canaux déclenchent une impulsion électrique. Le courant électrique généré va transmettre le message nerveux de la douleur du site initial jusqu'au cerveau, où il sera analysé puis intégré en tant que sensation de douleur. Les ASICs **s'activent à pH 6,9 une valeur proche de la valeur physiologique.** Le pH pouvant baisser jusqu'à 5,5 il en résulte que **le moindre phénomène inflammatoire ou lésionnel s'accompagnera d'une activation de ces récepteurs** [322] [325] [326] [252].

### c) Mambalgines.

Les mambalgines sont des toxines à trois doigts récemment découvertes (par l'équipe du Dr Éric Lingueglia à l'institut de pharmacologie moléculaire et cellulaire (IPMC) de Sophia Antipolis près de Nice) dans les venins de mamba noir *Dendroapsis polylepis polylepis* où elles représentent moins de 0,5% des composants du venin.

**Les mambalgines sont capables de supprimer la sensation de douleur en inhibant spécifiquement et de façon réversible les canaux ASICs du système nerveux central et périphérique.** Elles se lient dans le senseur de pH de ces canaux lorsqu'ils sont dans leur état fermé pour les bloquer à travers un mécanisme dit de « **pH-sensor trapping** ». **Elles empêchent ainsi leur ouverture, bloquant la transmission des messages de la sensation douleur jusqu'au cerveau.**

Il est important de signaler que les mambalgines ne bloquent pas tous les canaux ioniques ASIC, mais sont très spécifiques. Il existe 7 sous-unités différentes de canaux ASIC (ASIC 1a, 1b, 1b2, 2a, 2b, 3 et 4). Les canaux fonctionnels sont composés de 3 sous-unités qui peuvent être homologues ou hétérologues. Les chercheurs ont constaté que les mambalgines ont un effet puissant, rapide et réversible sur les canaux ASIC1 homomériques et les (ASIC1a/ASIC2a) ou (ASIC1a/ASIC2b) hétéromériques, qui sont des sous-types de canaux ASIC trouvés dans le système nerveux central. Ainsi que les canaux ASIC1b et ASIC1a/ASIC1b retrouvés dans les neurones sensoriels périphérique. En revanche, ils n'ont aucun effet sur les autres sous type de canaux ASIC (ASIC2a, ASIC3, ASIC1/ASIC3 et ASIC1b/ASIC3). Ces interactions sont probablement médiées en partie par le potentiel électrostatique positif de mambalgines facilitant la liaison aux ASIC chargés négativement [327] [328] [1] [252] [326].

## 1. Structure.

Les mambalgines sont classées comme appartenant à la famille des toxines à trois doigts. Les deux isoformes de cette toxine nommées « mambalgine-1 » et « mambalgine-2 » sont composés d'une chaîne peptidique **de 57 à 60 acides aminés** et 8 cystéines formant **4 ponts disulfures**. **Ils ne diffèrent que par le résidu situé dans la quatrième position de la chaîne** [1].



Figure 84: structure d'une mambalgine [10].

Les mambalgines présentent un potentiel électrostatique élevé qui est nécessaire pour la sélection des canaux ioniques ASIC, qui sont chargés négativement. Le domaine fonctionnel par lequel la toxine exerce son activité inhibitrice sur les canaux ASICs a été identifié dans sa boucle II et plus précisément dans la portion contenant les acides aminés Phe27, leu32 et Leu34 [329].

On connaît aujourd'hui le gène et la séquence de la mambalgine ce qui permet de reproduire la molécule artificiellement. La première synthèse complète en une seule étape de la mambalgine-1 a permis de résoudre sa structure 3D et de cartographier par une analyse de structure-fonction le pharmacophore pour l'inhibition des canaux ASIC [330].

## 2. Activité biologique.

L'activité biologique et l'efficacité des mambalgines inoculées dans le système nerveux central et/ou périphérique chez la souris a été confirmée à la fois in vitro et in vivo grâce à des modèles de tests de douleur bien calibrés (tests comportementaux de sensibilité thermique ou mécanique). Les scientifiques ont pu confirmer **les propriétés fortement analgésiques sans effet toxique** des mambalgines chez les souris. En mettant en parallèle les effets des mambalgines avec ceux produits par la morphine, dans le cadre des mêmes expériences, il s'est avéré que les effets des mambalgines sont aussi puissants et rapides que ceux de la morphine, mais alors que la morphine agit sur la voie opioïde du cerveau causant la dépendance et l'addiction, des maux de tête, une difficulté à penser, des hallucinations, une dépression respiratoire, des troubles digestifs des nausées et des vomissements, etc. la mambalgine calme la douleur en utilisant une voie différente potentiellement capable de provoquer beaucoup moins d'effets indésirables ce qui représente un avantage. Comme pour la morphine, il y a un phénomène d'accoutumance quand le traitement est répété, l'efficacité diminue pour une même

dose, mais une fois encore il est moins prononcé pour les mambalgines [74] [331] [332] [1] [326].

L'administration systémique (IV) des mambalgines a aussi un effet analgésique sur la **douleur inflammatoire qu'elle soit mécanique ou thermique, ainsi que sur la douleur neuropathique**, démontrant par la même occasion **la participation des canaux ASIC dans la douleur neuropathique** [330]. Les effets analgésiques IV de ces peptides contre la douleur inflammatoire impliquent des canaux périphériques ASIC1b, avec une contribution des canaux ASIC1a.

L'effet analgésique puissant sur la douleur neuropathique implique 2 mécanismes différents selon la voie d'administration : un effet indépendant de la naloxone et indépendant de l'ASIC1a associé à l'injection IV et un effet partiellement sensible à la naloxone et ASIC1a-dépendant associé à l'injection intrathécale. Ces données confirment le rôle des canaux ASIC1 périphériques et centraux dans la douleur, ce qui démontrent leur participation à la douleur neuropathique et soulignent les différences dans le répertoire des canaux impliqués dans différentes conditions de douleur [333].

### **3. Conclusion.**

**La découverte de leurs activités analgésiques extrêmement puissantes, activent dans une variété de modèles de douleur et ne créant pas de dépendance a grandement suscité l'intérêt des chercheurs.** Ces différentes études permettent de mieux comprendre l'inhibition des canaux ASIC par les mambalgines et donnent de précieuses informations pour le développement de variants optimisés de ces peptides. Même si l'on ignore encore l'essentiel sur les canaux ASIC, ces protéines laissent entrevoir la possibilité d'une voie d'action alternative aux traitements classiques et l'émergence d'une nouvelle classe de médicaments analgésiques.

**Testées avec succès chez la souris sur le système central et périphérique, ces molécules sont aussi efficaces que la morphine avec moins d'effets indésirables.** Le développement des mambalgines serait d'une grande utilité pour le traitement analgésique des douleurs chroniques car elles induisent **peu de phénomènes de dépendance (addiction) ou de tolérance**. Le développement des mambalgines pourraient également être utiles dans les

traitements analgésiques des patients souffrant de maladies respiratoires chroniques car **leurs effets ne semblent pas influencer sur le système respiratoire et ne provoquent pas de détresse respiratoire**. Les mambalgines sont actives dans une large gamme de modèles expérimentaux de la douleur, ce qui renforce leur potentiel thérapeutique. En fonction de la voie d'administration des mambalgines, les sous-types de canaux ASIC inhibés ne seraient pas les mêmes. **Ainsi, en fonction du lieu d'administration, on pourrait obtenir des effets différents voire complémentaires.**

La transposition de la souris à l'homme reste un obstacle difficile à franchir. Les scientifiques sont toutefois optimistes, car les protéines agissent effectivement sur les pores membranaires de tissu humain in vitro. De nouvelles études sont encore nécessaires chez l'animal avant de se lancer dans les essais cliniques (chez l'homme) [330] [332] [333].

Les mambalgines ont permis aux scientifiques de découvrir une nouvelle molécule aux propriétés analgésiques représentant **un candidat médicament contre la douleur, de confirmer les canaux ioniques (ASIC) comme nouvelle cible pharmacologique et de se procurer de nouvelles informations sur la structure et le fonctionnement de ces canaux**, leur permettant ainsi de progresser dans la compréhension de leur mécanisme d'activation. Cela afin de développer à terme d'autres molécules capables de les moduler et d'avoir des effets intéressants contre la douleur.

Les équipes de recherche poursuivent aujourd'hui, l'identification et la caractérisation à partir de venins animaux de nouveaux bloqueurs peptidiques spécifiques des canaux ASIC pouvant servir d'outils pharmacologiques et susceptibles d'avoir un intérêt thérapeutique, l'étude des propriétés et des relations structure-fonction des canaux ASIC, l'étude des rôles physiologiques et physiopathologiques des canaux ASIC périphériques et spinaux dans des douleurs d'étiologies différentes [330].

**Les mambalgines devaient être développées en tant que nouveau médicament par Theralpha cependant la société se trouve actuellement en liquidation judiciaire...** [74] [334].

#### d) Hannalgésine.

Actuellement en phase de développement clinique, l'hannalgésine est une toxine à trois doigts ( $\alpha$ -neurotoxine) extraite du venin du cobra royal *Ophiophagus hannah* et composée de 70 acides aminés [124] [74] [335] [1] [252].

#### 1. Premières études pharmacologiques.

Les effets pharmacologiques de cette toxine ont été découverts et analysés dès 1995 par une équipe de chercheur de Singapour. L'action antalgique de l'hannalgésine a été étudiée dans un premier temps par l'utilisation du test de la plaque chauffante, de la tige tournante et des électrochocs chez la souris. Ces différents tests ont permis de démontrer que **l'hannalgésine, aux doses comprises entre 16 et 32ng/g, est une neurotoxine à effet analgésique dose-dépendante sans provoquer de déficit de type neurologique ou musculaire.** Il n'a été observé aucune relaxation musculaire, sédation, troubles de l'activité motrice ou de la coordination, augmentation du seuil de convulsion [335].

	Témoins négatif	Témoins Morphine	Souris Hannalgésine
<b>Temps de réaction pour test plaque chauffante</b>	↘ (rapide)	↗ (lente) dose dépendante	↗ (lente) dose dépendante
	<b>Quel que soit la voie d'administration (intra péritonéale, per os ou intra cérébro ventriculaire), les résultats ont démontré une augmentation du temps de latence (dose dépendante) par rapport au témoin négatif et similaire aux témoins sous morphine.</b>		
<b>Tige tournante</b>		Relaxation musculaire +++ Déficit neurologique +++ Sédation +++ Troubles de l'activité motrice ou coordination +++	Relaxation musculaire - - - Déficit neurologique - - - Sédation - - - Troubles de l'activité motrice ou coordination - - -
<b>Test électrochoc</b>		Seuil de convulsion ↗	Seuil de convulsion →

Tableau 9 : Comparaison de l'efficacité de l'Hannalgésine avec la Morphine et un témoin.

Afin de mettre en évidence le mécanisme d'action de la toxine, l'équipe de scientifiques a procédé à d'autres essais en administrant :

- De la L-NG-Nitro-Arginine-Méthyl-Ester (L-NAME) qui inhibe la NOs. Ce qui a eu pour conséquence (les scientifiques ont observé : l'abolition totale de l'effet analgésique de l'hannalgésine.
- De la naloxone qui inhibe de manière non sélective les récepteurs aux opioïdes. Celle-ci diminue le temps de latence de la douleur.

Ce qui montre la possible implication des opioïdes et du système de l'oxyde nitrique (NO) dans l'effet antalgique de la toxine [335].

## 2. Prohanine.

La Prohanine est un petit peptide (5 à 50 acides aminés) conçu sur la base de l'hannalgésine avec laquelle elle possède 60% d'homologie. Il s'agit en réalité de la partie strictement active de l'hannalgésine capable d'induire ou de faciliter une analgésie et qui **comprend la séquence NPFPT**. La prohanine active le système neuronal de l'oxyde nitrique dans le cerveau qui à son tour active le système de peptides opioïdes conduisant à l'effet antalgique. **Non toxique, la prohanine possède une activité antalgique cent fois plus puissante que la morphine.**

Le brevet US Pat. N ° 6613745 B1 décrit essentiellement une injection par voie intraveineuse ou intrapéritonéale ou à l'administration anale du peptide pour induire une analgésie. Cependant ces voies d'administrations ne sont pas les plus efficaces. En effet, il est largement reconnu que l'administration de médicaments par injection peut être à la fois inconfortable et désagréable pour le patient, en particulier lorsque l'administration doit être répétée à intervalles réguliers pendant de longues périodes. Ainsi, il est nécessaire d'administrer un médicament par d'autres voies non invasives plus acceptables qui fournissent un soulagement rapide et pratique de la douleur, en particulier pour la douleur aiguë qui survient souvent rapidement, et dure un temps relativement court, par rapport à la douleur chronique à long terme [336] [334] [258].

### 3. THA 903.

Isolée par des équipes de l'université Nationale de Singapour, la prohanine a été rachetée par la société biopharmaceutique Theralpha basé à Sophia Antipolis, spécialisé dans le développement de nouvelles thérapies contre la douleur. **Renommée THA903, elle a fait l'objet d'une demande de brevet américain en 2012 n° US20120183580 A1 dans lequel la prohanine est sous une forme galénique appropriée pour une administration sublinguale.** La voie sublinguale est une voie non-invasive qui présente plusieurs avantages pour l'administration du médicament. Grâce à l'évitement du métabolisme de premier passage hépatique, la voie sublinguale permet **l'administration d'une dose efficace plus faible** de médicament. Elle permet également **d'éviter la tolérance** de la composition pharmaceutique par le patient, et présente une **action thérapeutique plus rapide et d'effet prolongé** ainsi qu'une **meilleure observance** du patient. L'un des inconvénients à l'administration sublinguale de médicaments macromoléculaires tels que des peptides et qu'elle se traduit souvent par une faible biodisponibilité (moins de 1%) dû au mauvais passage du médicament au travers de la muqueuse buccal. L'administration de prohanine par voie sublinguale a montré une bien meilleure biodisponibilité (44%) que l'administration par voie orale (4%) ou intrapéritonéale (0,5%). En outre, il a été observé que la concentration plasmatique du peptide était encore supérieure à 100 ng/mL 1 heure après l'administration alors qu'elle était presque indétectable pour d'autres voies d'administration [74] [337].

**Le THA 903 a déjà montré une grande efficacité et une excellente tolérance lors d'essais préclinique sur des modèles animaux après administration sublinguale. Il reste encore à démontrer l'efficacité et à déterminer les doses réponses via une première étude de phase I.**

**Malgré le lancement d'un consortium collaboratif : le programme « SubAgic »** labélisé par le pôle Eurobiomed dans le cadre du 12<sup>ème</sup> FUI (Fonds unique interministériel), également composé de la société Synprosis (une société basée à Aix en Provence spécialiste dans la synthèse, la formulation et l'optimisation des peptides), de l'IPMC (institut de pharmacologie moléculaire et cellulaire, basé à Sophia Antipolis, reconnu pour ces recherches en neurosciences), et du centre d'investigation clinique de Clermont Ferrand (un des leaders européen des essais cliniques sur la douleur) et un soutien financier 2,55 millions d'euros à la société Theralpha en 2001, **le développement de THA903 représentant un potentiel traitement innovant dans la douleur aiguë s'est arrêté. La société s'est fermée pour cause**

**de liquidation judiciaire** [334]. Le programme était destiné à mettre en place le développement préclinique et une première étude clinique chez l'homme (en phase II) et à terme de licencié la molécule à l'industrie pharmaceutique. Les perspectives commerciales du composé étaient importantes et estimées à 10 milliards de dollars dans le monde, (c'est-à-dire 10 à 15 % du marché de la douleur aigue en alternative au morphinique) [338].

### e) Cobrotoxine.

La cobrotoxine est une toxine à trois doigts extraite du venin du cobra Taiwan, *Naja naja atra*. Il s'agit plus précisément d'une  **$\alpha$ -neurotoxine à chaîne courte** [73]. Cette petite protéine basique est constituée d'une seule chaîne polypeptidique de 62 acides aminés, dont 8 résidus cystéine formant quatre ponts disulfures [339]. Cette toxine possède de puissantes propriétés analgésiques sans déficit neurologique ou musculaire [101]. La cobrotoxine agirait sur les **récepteurs nicotiniques post-synaptiques neuromusculaires**. Elle se lie avec une haute affinité au peptide dérivé de la sous-unité  $\alpha 7$  du récepteur à l'acétylcholine de torpille (Torpedo) par son domaine situé à l'extrémité de la boucle-2 [340].

#### 1. Voie intra nasale.

La cobrotoxine présente les **avantages de « petite dose »**, sécurité, capacité de l'administration par voie orale, injectable, administration par la muqueuse buccale, nasale et de la peau, et analogues. Une équipe de scientifique a cherché à démontrer l'utilité de la voie intra nasale (IN) pour administrer la toxine car cette voie permet de faire diffuser les composés dans le cerveau en contournant la barrière hématoencéphalique. Outre cette caractéristique, la voie intra nasale permet d'éviter le passage hépatique contrairement à la voie orale et facilite l'observance grâce à sa facilité de réalisation. En revanche, les principaux inconvénients sont la dégradation enzymatique locale, l'élimination par l'appareil mucociliaire et la faible perméabilité des muqueuses pour les peptides hydrophiles dont fait partie la cobrotoxine. Ce dernier point **nécessite la mise au point de composés qui vont faciliter le passage de la muqueuse.**

La résistance à la dégradation a donc été étudiée et **l'utilisation de microsphères** composées d'un mélange de Poly-(Lactide-co-Glycolide) (**PLGA**) et de Poly [1,3-bis ( $\rho$ -Carboxy-

Phenoxy) Propan-co-p Carboxy-Ethyl-Formamido) BenzoïcAnhydride] ou **P (CPP : CEFB)** a paru un bon compromis. Comparé à l' $\alpha$ -cobrotoxine libre et aux microsphères PLGA, les microsphères PLGA/P (CPP : CEFB) ont en effet montré une augmentation apparente dans l'intensité et la durée de l'effet antinociceptif à la même dose de  $\alpha$ -cobrotoxine (80  $\mu$ g/kg).

L'absorption de cobrotoxine marquée avec de l'iode 125 en IV ou additionnée à un mélange de bornéol et de menthol à la dose de 105  $\mu$ g/kg dans le bulbe olfactif et dans le cervelet a été comparé. Lors d'une administration par voie IN, il a été noté une augmentation de la concentration durable dans les deux régions lors d'administration IN. Par voie IV, la concentration augmente rapidement mais de façon plus furtive, les scientifiques ont supposé que l'absorption se faisait de manière paracellulaire [252] [341] [73] [342].

## **2. Traitement de la douleur cancéreuse.**

Des investigations scientifiques se sont faites dans le but d'une utilisation de la cobrotoxine dans le traitement de la douleur cancéreuse. Il a été cependant montré que la cobrotoxine produit une analgésie qui débute 1-3 h seulement après son administration ce qui pose un problème pour son utilisation clinique dans le traitement de la douleur cancéreuse. **Une formulation analgésique combinant la cobrotoxine avec du chlorhydrate de tramadol et de l'ibuprofène appelé « composé Keluoqu, CKLQ » est actuellement commercialisée en Chine pour ses propriétés analgésiques** [343] [344]. Le nouveau médicament posséderait des effets plus rapides, de longue durée et serait sans danger. Il serait aussi utilisé pour le traitement de la toxicomanie dans la province chinoise du Yunnan. En 2006 une étude a été menée pour évaluer l'efficacité clinique de **CKLQ dans la douleur modérée à sévère du cancer** [344]. Deux essais multicentriques ont été réalisés sur une série consécutive de 230 patients. 119 patients ont été affectés à une étude croisée randomisée en double aveugle, et 111 sont entrés dans une étude ouverte, 11 patients ont arrêté l'étude en cours.

Dans l'étude en cross-over : Le taux global de soulagement de la douleur était de :

- 83,7% des patients pour CKLQ.
- 68,2% pour le chlorhydrate de tramadol
- 35,1% pour le placebo.

**La durée moyenne de soulagement de la douleur avec CKLQ était significativement plus longue que celle des deux autres agents.** Au cours de l'étude, sur les 35 patients qui ne répondaient pas au chlorhydrate de tramadol, 27 ont répondu à CKLQ.

**Dans l'étude ouverte :** Les patients ont seulement reçu CKLQ et ont eu la possibilité de continuer jusqu'à 7 jours aussi longtemps que le soulagement de la douleur était satisfaisant. **Après administration d'une dose unique de CKLQ 89,2% des patients ont été soulagés.** La fréquence des événements indésirables pour CKLQ était similaire à celle du chlorhydrate de tramadol.

**Les résultats en double-aveugle, cross-over randomisé et l'étude ouverte de CKLQ chez les patients atteints de cancer avec des douleurs modéré à sévère suggèrent que le CKLQ peut être utile pour le traitement de la douleur cancéreuse modéré à sévère. Toutefois, la tolérance des CKLQ doit encore être définie.**

### **3. Traitement de l'arthrite.**

Il a été montré que la cobrotoxine (dans la gamme de 1-600µg/kg) a un effet intéressant dans le traitement de l'arthrite rhumatoïde en soulageant par exemple les symptômes de arthrocèle, arthralgie, etc. Un brevet (WO 2011026362 A1) (CN101648000 A) a été déposé en 2010 concernant une utilisation de la cobrotoxine dans la fabrication d'un médicament pour le traitement de l'arthrite [345]. **Le médicament est sans danger et faiblement dosé. Les formes pharmaceutiques comprennent le liquide oral, les capsules, les baumes, les cataplasmes, les sprays, les injections, etc.**

### **4. Nyloxine (homéopathie).**

L'effet analgésique de la cobrotoxine a été approuvé par la FDA pour une application clinique. En plus de ces propriétés analgésiques la cobrotoxine possède des effets antitumoraux qui sont actuellement en cours d'étude [346]. **Bien que les formes analgésiques actuelles Cobrotoxine et Nyloxine, soient commercialisées et développées comme les remèdes homéopathiques elles ne sont pas soumises aux normes rigoureuses exigées pour l'approbation FDA [74].**

Le Nyloxine Oral Spray est un médicament fabriqué en Amérique. Il est préparé selon les exigences de la pharmacopée homéopathique des États-Unis (HPUS) et ses textes à l'appui. **Le principe actif** se compose du venin de **Cobra asiatique**. La Nyloxine agit en bloquant l'action de l'acétylcholine, neurotransmetteur stimulant majeur dans le système nerveux et activateur des voies inflammatoires. En conséquence, les voies de la douleur et de l'inflammation sont temporairement arrêtées. D'après le laboratoire, Nyloxine est un produit naturel sûr et efficace qui fonctionne sur plusieurs types de douleurs chroniques grâce à sa longue durée d'action. Il possède des propriétés antalgiques et anti-inflammatoires mais non-narcotiques et non addictives [347].

#### f) Cobratoxine.

La  $\alpha$ -cobratoxine (CTX) est une toxine à trois doigts examinée pour ses effets analgésiques. Il s'agit d'une  $\alpha$ -neurotoxine à chaîne longue extraite du venin de cobra du *Naja siamensis* ou *Naja kaouthia*. Elle exerce son **action curarisante** sur le système nerveux périphérique et central en se fixant sur le **récepteur à l'acétylcholine des muscles squelettiques  $\alpha_1\beta\gamma\delta$**  et sur les **récepteurs à l'acétylcholine neuronaux  $\alpha_7$**  grâce à sa structure à trois doigts. Elle reconnaît de façon spécifique des acides aminés sur la face interne et externe du site de fixation à l'acétylcholine. Sa fixation sur ces récepteurs y est permanente [74] [72] [348] [252].

#### 1. Mécanisme d'action.

L'étude de la liaison de la toxine sur des récepteurs à l'acétylcholine de *Lymnaea stagnalis* (AcetylCholine Binding Protein = AChBP) a permis d'obtenir un modèle tridimensionnel de la toxine fixée sur sa cible et d'en étudier les effets. La modélisation de ce complexe moléculaire a aidé les scientifiques à une meilleure connaissance structurelle et fonctionnelle des récepteurs nicotinique ainsi qu'à la conception de futur médicament. L'AChBP est une protéine homologue à la partie extracellulaire du récepteur nicotinique. Elle est utilisée comme modèle pour étudier la fixation de différents ligands.

Dans ce modèle, l'AChBP se présente sous la forme d'une molécule constituée de cinq chaînes identiques (homopentamère). Cinq molécules de cobratoxines sont fixées sur les chaînes de

l'AchBP au niveau des sites de liaison de l'acétylcholine. La structure révèle les positions et l'orientation de l'ensemble des cinq molécules de toxines à trois doigts insérées au niveau des interfaces des sous-unités AChBP et les changements conformationnels associés à la liaison de la toxine. Ce modèle de plomb ressemble à un état de repos du récepteur nicotinique [348]. **La cobratoxine présente une action inhibitrice irréversible vis à vis des récepteurs nicotinique.** Elle forme une pince autour du domaine « boucle-Cys » des chaînes d'AchBP, augmentant ainsi l'ouverture du domaine de fixation à l'acétylcholine. Les scientifiques supposent qu'en maintenant le domaine de fixation à l'acétylcholine en configuration ouverte, elle bloque le changement de conformation transmembranaire du récepteur ce qui empêche la transmission du signal.

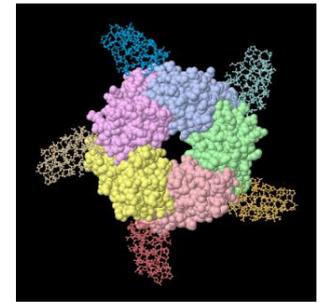


Figure 85: Illustration de 5 cobratoxines fixées au récepteur pentamérique de l'AchBP [348].

La cobratoxine se fixe sur les récepteurs nicotiniques musculaires au repos, inhibant leur activation [72]. Elle possède aussi une haute affinité pour les récepteurs encéphaliques mais pas pour ceux de la moelle épinière or le passage de la barrière hémato-encéphalique n'est pas démontré [343].

## 2. Action analgésique.

L'action de la toxine administrée par la voie IP (intra péritonéal), ICV (intra cérébrale ventriculaire) et injectée dans la SGPA (substance grise périaqueducale) a été étudiée avec le test de la plaque chauffante et le test des crampes abdominales (contorsions à l'acide acétique). L'effet maximal de l'analgésie a été vu 3 h après l'administration. Il a été mis en évidence une **action analgésique dose-dépendante par les voies intrapéritonéale (IP) et intra-ventriculaire cérébral (ICV) mais pas lorsque la toxine est injectée dans la substance grise périaqueducale (SGPA).** La CTX possède donc bien des effets analgésiques, qui sont induits dans le système nerveux central, mais pas à travers le PAG.

Il a été montré que l'effet antinociceptif est inhibé par une forte dose d'atropine (10mg/kg IP) alors que ni la naloxone, ni une faible dose d'atropine (0,5mg/kg IP) n'ont eu d'effets sur l'action de la cobratoxine. Ce qui indique que **la toxine agirait sur le système cholinergique central et serait indépendante du système opioïdérique.** L'acide acétylsalicylique (300mg/kg) n'a pas amélioré les effets analgésiques du CTX. A la dose efficace la plus élevée

de 68µg/kg la neurotoxine ne change pas la mobilité spontanée de la souris. (Pas de toxicité musculaire et neurologique) [343].

**L'action sur le système cholinergique se fait en partie par l'activation de récepteurs à l'acétylcholine de type M4** car le traitement de neurones isolés de ganglions rachidiens de rat par 1µmol/L de tropicamide bloque l'effet analgésique de la cobratoxine. **L'activation, du récepteur M4 conduit à une inhibition des canaux calcium de type T produite par l'activation d'une PKA par la sous-unité βγ d'une protéine G0** [349]. **En comparaison avec la morphine, l'effet de la cobratoxine est apparu plus long.** L'administration d'une dose de 4,50µg/kg de cobratoxine inhibe la douleur durant plus de 2h, alors qu'avec l'administration d'une dose de 40µg de morphine l'effet ne persiste pas plus de 30min.

**L'effet de l'oxyde nitrique (NO)** impliqué dans les mécanismes de génération de la douleur dans le système nerveux **sur l'action de la cobratoxine** a aussi été exploré. L'analgésie a été **déterminée avec les tests de contorsion de l'acide acétique et de la plaque chaude.** Lors de l'injection intrapéritonéale (IP) de CTX, les résultats ont montré **des effets analgésiques dose-dépendants renforcée par L -NMMA** (5,10 mg/kg, IP) 2 heures après l'exposition à la CTX (45 µg/kg, IP), **ce qui indique que les effets analgésiques de CTX peuvent être affectés par la NOS.**

Une équipe de chercheur est allée plus loin en étudiant l'effet inhibiteur de la CTX sur **la décharge de potentiels d'action provoqué par la douleur dans les neurones du noyau para fasciculaire du thalamus.** L'administration intracérébraux ventriculaire (ICV) de cobratoxine chez le rat provoque, toujours de façon **dose dépendante**, une **diminution de la fréquence et de la durée des trains de potentiels d'action à la suite d'une stimulation électrique du nerf sciatique.**

**L'implication partielle du système sérotoninergique** dans l'effet analgésique de la CTX a également été démontré en prétraitant pendant trois jours un lot de rats avec de la para-ChloroPhénylAlanine (pCPA) un inhibiteur spécifique de la tryptophane-hydroxylase ce qui permet de diminuer d'au moins 90% la quantité de sérotonine dans le cerveau. L'injection (de 4,50 µg/kg) de toxine chez un rat traité par pCPA a inhibé l'activité électrique des neurones du thalamus mais de manière moins importante, et significativement différente, des neurones non traités par la pCPA confirmant l'implication partielle du système sérotoninergique [350].

En résumé ces résultats suggèrent que :

- **Le CTX à un effet inhibiteur dose-dépendant sur les décharges provoquées par la douleur des neurones Pf, confirmant électrophysiologiquement l'action anti nociceptive du CTX.**
- **L'effet inhibiteur de CTX a une durée plus longue comparée à celle de la morphine.**
- **Les systèmes cholinergiques et sérotoninergiques centraux sont impliqués dans l'effet inhibiteur du CTX, mais pas le système opioïdérique.**

**Un brevet a été déposé en 2005, publié en 2011 (US 7902152 B2) pour l'utilisation de la cobratoxine dans le traitement de la douleur chronique, en particulier pour le traitement de la douleur intraitable jusqu'ici associée à un cancer avancé.** La douleur associée à des troubles neurologiques, la polyarthrite rhumatoïde, les infections virales et les lésions est également envisagée. Le potentiel thérapeutique de  $\alpha$ -cobratoxine est important, d'autres études sont en cours, avec un espoir dans lutte contre la sclérose en plaque notamment [252].

### **3. La réceptine.**

La réceptine est une forme de cobratoxine modifiée chimiquement par l'action du peroxyde d'hydrogène catalysée par du cuivre. Administré par voie intrapéritonéale (IP) ou intracérébral ventriculaire (ICV), ce composé possède toujours une action analgésique dose-dépendante mais sans intervention du système cholinergique central ou du système opioïdérique. **L'activité de la réceptine semble être médiée par le système nerveux périphérique, bien que le système nerveux central puisse contribuer à des effets analgésiques.** De plus, la réceptine ne semble pas présenter de toxicité neurologique ou musculaire ; A sa dose efficace la plus élevée (10mg/kg) la réceptine ne modifiait pas la mobilité spontanée de la souris. **L'intérêt de cette molécule provient de la forte augmentation de la dose létale 50% (DL 50) qui passe de 80 $\mu$ g/kg IP pour la cobratoxine à plus de 100mg/kg IP pour la réceptine [351] [252].**

## C) Toxine du Viperidae *Crotalus durissus terrificus*.

### 1) Le venin brut.

Le venin du serpent à sonnettes sud-américain *Crotalus durissus terrificus*, aussi nommé *Crotalus cascabelle* a démontré des actions analgésiques de longue durée dans des modèles expérimentaux d'animaux, par administration orale. De même les médecins qui ont soigné des patients mordus par ce serpent ont signalé que, même si ces patients étaient dans un état mettant leur vie en danger, ils ne ressentaient aucune douleur [352]. L'effet analgésique du venin-brut du crotale a été mesuré par la méthode de contorsion induite par l'acide acétique et le test de la plaque chaude. Administré par voie sous-cutanée (SC), intrapéritonéale (IP) ou orale (PO) le venin provoque un effet antinociceptif chez la souris. L'activité anti nociceptive est dose et temps dépendants. Administré par voie orale, le venin **induit un effet de longue durée qui persiste même après sa neutralisation par un antivenin spécifique** [252] [353].

Le fait que la morphine augmente l'effet analgésique du venin alors que la naloxone l'antagonise suggère une activité de type endorphine. **L'action inhibitrice de la naloxone a démontré l'implication des récepteurs opioïdes** dans l'effet analgésique central et périphérique. Les études réalisées par la suite **en 2000** [354], **2003** [355], **et 2004** [356] mettent en évidence **l'implication à la fois des récepteurs opioïdes K et δ dans le mécanisme hyperalgésique du venin, lors de tests de douleur inflammatoire induite par la carragénine (carraghénane) ou la PGE2**. Le venin agirait, tout au moins partiellement, par activation des canaux potassiques sensibles à l'ATP au niveau des neurones afférents périphériques [355], **par l'intermédiaire de la voie NO-GMPc** [356]. **En dépit d'être médiée par des récepteurs opioïdes, un traitement prolongé avec le venin crotalidé n'entraîne pas le développement de symptômes de tolérance ou d'abstinence** [354] [353]. Ces observations sont à l'inverse d'une autre étude réalisée en 2001 dans laquelle sur le seuil de la douleur a été évalué en utilisant le test de la plaque chauffante. Cette étude a montré que l'administration prolongée (14j) par voie orale chez la souris d'une dose unique de (200µg/kg) de venin ne cause pas de symptômes du syndrome d'abstinence mais conduisait cependant au développement de la tolérance à l'effet antinociceptif. Les mécanismes pharmacodynamiques sont impliqués dans la genèse de ce phénomène [357].

Chez le rat, le venin de crotale provoque une analgésie prolongée dans les modèles inflammatoires, neuropathiques ou oncologiques [358].

## 2) Crotalphine.

En séparant les différents constituants du venin de *Crotalus durissus Terrificus* par chromatographie liquide haute performance, il a été montré l'existence d'un composé de 14 acides aminés réticulés par un pont disulfure possédant un effet analgésique et nommé crotalphine (3kDa). Il s'est avéré que cette molécule possédait la même séquence que la chaîne  $\gamma$  qui compose, avec les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ , la crotapotine ou sous unité CA de la crotoxine. Il est intéressant de noter que la crotapotine ne possède pas d'effet analgésique [353] [252].

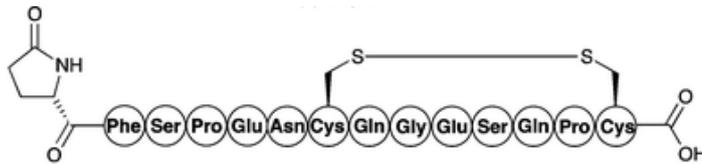


Figure 86 : Molécule possédant la même séquence d'acides aminés que la sous unité CA de la crotoxine.

**La crotalphine agit sur les douleurs inflammatoires au niveau périphérique** : son action inhibitrice, (à la dose de 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  PO) sur l'installation d'une hyperalgésie par l'induction d'une inflammation lors d'injection de PGE2 ou de carragénine été démontré [353]. **De même, la crotalphine** agit sur les douleurs chroniques d'origines nerveuses [359]. La douleur neuropathique est un problème clinique important car elle est habituellement résistante à la thérapie actuelle. L'effet antinociceptif de crotalphine a été évalué dans un modèle expérimental de la douleur neuropathique induite chez le rat par constriction chronique du nerf sciatique. Administrée par voie orale 14 jours après la chirurgie, la crotalphine (0,2-5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) et le venin brut (400-1600  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) ont inhibée la douleur neuropathique (hyperalgésie, allodynie et douleur spontanée) induite par la constriction de nerf. L'effet antinociceptif du peptide et du venin brut était de longue durée, étant donné qu'il a été détecté jusqu'à 3 jours après le traitement. L'effet du peptide comparé à celle induite par le venin brut a confirmé que la crotalphine est responsable de l'effet antinociceptif du venin de crotalidé sur la douleur neuropathique [359].

**L'inhibition de l'effet antinociceptif de la crotalphine par l'utilisation de la naloxone montre l'implication du système opioïdérique dans ce phénomène** [359]. Il a été montré **que la crotalphine induit un effet analgésique médié par l'activation des récepteurs kappa et delta opioïdes** [353], **avec une participation du monoxyde d'azote** [360] **et cannabinoïdes** [361]. Elle agit sur les récepteurs kappas présents dans les centres supra spinaux du système nerveux central. En périphérie, elle se lie aux récepteurs kappa et delta et implique également la voie de la NO-GMPc et les canaux  $\text{K}^+$  sensibles à l'ATP [358] [360].

**La crotalphine induit un effet antinociceptif opioïde puissant et de longue durée dans la douleur neuropathique qui surpasse celui observé avec des médicaments analgésiques standards [359].**

La crotalphine provoque une analgésie puissante chez des rats soumis à des modèles inflammatoires, neuropathiques ou oncologiques de la douleur. Les essais précliniques avec la crotalphine chez les rongeurs ont permis de vérifier une analgésie puissante et persistante sans effets secondaires graves. **Aucune tolérance** n'a été observée après 75 jours de traitement quotidien. L'action de la crotalphine peut aussi **être centrale**, son injection par voie IT augmente la latence du test de retrait de la queue alors qu'aucun effet sur ce dernier test n'est observée lors d'administration orale ce qui serait un argument pour dire **qu'il n'y a pas de passage de la barrière hémato-encéphalique [358].**

Une étude réalisée en 2016 sur des chevaux a évalué les effets cliniques, comportementaux et antinociceptifs causés par crotalphine chez les chevaux, employant 18 chevaux arabes. L'injection intraveineuse d'une dose unique de crotalphine (3.8ng/kg) n'a pas provoqué de changements cliniques ou comportementaux importants et a favorisé l'effet antinociceptif sur la région ischiatique des chevaux soumis au modèle incisional de la douleur inflammatoire pendant plusieurs jours. En revanche, elle n'a pas provoqué d'effet analgésique pertinents sur la région scapulaire (ou sur la peau des chevaux) [358].

**L'effet analgésique de la crotalphine est aujourd'hui bien établi, en revanche son mécanisme d'action directe reste encore à élucider.** Une étude a été menée en 2016 dans le but **d'analyser l'effet de la crotalphine sur les canaux ioniques dans les voies périphériques de la douleur.** Les résultats suggèrent que **la crotalphine soulagerait l'hyperalgésie inflammatoire par activation des canaux TRPA1 sensible au froid nociceptif.** Les canaux ioniques TRP (*Transient Receptor Potential*) appartiennent à une famille de récepteurs-canaux sensibles à la température identifiée très récemment. La crotalphine serait le premier peptide découvert à agir en ciblant les canaux ioniques TRPA1 sensible au froid nociceptif de manière sélective et à des concentrations picomolaires. L'activation de TRPA1 par la crotalphine nécessite des résidus de cystéine N-terminaux intacts et est suivie d'une désensibilisation forte et prolongée du canal [362].

**L'activité de la crotalphine pourrait être également liée aux activités inflammatoires, la grande efficacité de la crotalphine étant observée seulement en présence d'une inflammation. La crotalphine induit un effet antinociceptif puissant et de longue durée qui est médiée par l'activation des récepteurs opioïdes périphériques** et on sait aujourd'hui que l'inflammation améliore l'efficacité analgésique périphérique des médicaments opioïdes. Les mécanismes impliqués dans ce phénomène n'ont pas été complètement élucidé [363].

La crotalphine est traitée comme un candidat de développement possible et est actuellement en phase préclinique avec l'entreprise brésilienne Biolab Farmaceutica.

### **3) Crotoxine.**

La crotoxine est la toxine principale du venin du crotale Sud-américain *Crotalus durrisus terrificus*. Il s'agit d'une **une phospholipase A<sub>2</sub> neurotoxique (ou β-neurotoxine)**. Ce β-hétérodimère se compose d'une phospholipase A<sub>2</sub> basique faiblement toxique et d'un composant non-enzymatique, acide non toxique appelé crotapotine. Parmi ses nombreuses activités biologiques (neurotoxique, myotoxique, néphrotoxique, cardiotoxique, immunomodulatrice, anti-inflammatoire, anti-tumorale, anti-microbienne), la crotoxine possède également une action analgésique qui a été révélé au cours de ces dernières années [252] [364] [55]. Administrée chez des patients cancéreux, elle réduirait aussi la consommation d'analgésiques.

En 2002, la crotoxine a fait **l'objet d'un essai clinique en Phase I dans un protocole thérapeutique antitumoral effectuée sur des patients atteints de tumeurs solides réfractaires au traitement conventionnel et dans lequel l'effet analgésique a été montré par la diminution de la consommation de la morphine par 18 patients sur 23 traités sans corrélation directe avec la diminution de la taille des tumeurs**. La crotoxine a été administré en IM pendant 30 jours consécutifs à des doses allant 0,03 à 0,22 mg/m<sup>2</sup>. Sur les 23 patients évaluable 18 ont rapporté une diminution ou disparition de la douleur progressive mais significative à partir de la deuxième ou troisième semaine de traitement. Cet effet n'a pas montré de fluctuations quotidiennes ou diminué sur la poursuite du traitement. La dose recommandée pour une étude de phase II est de 0,18 mg/m<sup>2</sup> [365].

Des études entreprises en 2006 ont mis en évidence l'**effet analgésique dose-dépendante de la toxine** sur la souris lors du test de la plaque chauffante et du test des crampes abdominales.

De même, la crotoxine augmente le seuil de réaction au test de retrait de la queue chez le rat. Un puissant effet analgésique est observé lors d'injection intra cérébrale ventriculaire ou dans la SGPA à des concentrations bien plus faibles. **Le mécanisme d'action est vraisemblablement indépendant des systèmes opioïdiques et muscariniques**, car ni l'administration de naloxone, ni d'atropine à dose faible ou élevée n'a permis d'inhiber l'effet analgésique de la crotoxine. **Bien que le passage de la barrière hémato-encéphalique ne soit pas démontré ces résultats suggèrent que la crotoxine a des effets analgésiques médiés par une action sur le système nerveux central** [366].

En 2008, une étude a été réalisée pour étudier électrophysiologiquement l'effet de la crotoxine sur la libération de la douleur évoquée par la douleur des neurones dans le noyau parafasciculaire thalamique (Pf) et les mécanismes sous-jacents de son effet. La crotoxine injectée par la voie intracérébroventriculaire (ICV) a entraîné un effet inhibiteur dose-dépendant sur la formation de potentiels d'action dans le noyau parafasciculaire du thalamus à la suite d'une stimulation électrique de courte durée du nerf sciatique. La fréquence et la durée de décharge ont significativement diminué. L'injection intraveineuse d'atropine (antagoniste des récepteurs muscariniques) ou de naloxone (antagoniste des récepteurs opioïdes,) n'a pas eu d'effet sur l'inhibition de la libération des neurones Pf par la crotoxine. En revanche, cet effet inhibiteur sur les neurones Pf thalamique a été significativement atténué après prétraitement par la para-chlorophénylalanine (pCPA) et par lésion électrolytique du noyau du raphé dorsal (DR). **Ces résultats suggèrent que la crotoxine a un effet analgésique, qui est indépendant des récepteurs aux opioïdes et muscariniques mais qui est médié, au moins partiellement, par le système sérotoninergique central** [367].

D'autres études menées en 2008, afin de mieux **comprendre l'effet de la toxine sur les douleurs d'origines neuropathiques** ont montré que, lors de sections du nerf sciatique, le trempage des abouts nerveux dans la toxine provoquait non seulement une abolition de l'hyperalgésie observée dans le groupe non traité mais aussi une analgésie car les seuils de réactions étaient supérieurs à ceux du groupe non opéré.

Il a également été montré que **la crotoxine induit un effet antinociceptif de longue durée dans la douleur neuropathique**, l'effet est détecté 2h après traitement et persiste durant 64 jours. En utilisant plusieurs inhibiteurs ou antagonistes de récepteur, **cette étude a mis en évidence l'implication de récepteurs muscariniques centraux dans le mécanisme d'action de la toxine mais aussi l'implication partiel des récepteurs noradrénergiques ( $\alpha$ -**

**adrénergique) et sérotoninergiques centraux (5-HT)** contrairement à l'étude précédente [368].

**En résumé, la crotoxine inhiberait les douleurs aiguës et la décharge des neurones thalamiques en activant les récepteurs à la sérotonine centraux et inhiberait les douleurs chroniques d'origine nerveuse par l'activation des récepteurs muscariniques et de la sérotonine centraux** [366] [367] [368].

#### **4) Crotamine.**

La crotamine (4,88 kDa) est une myotoxine extraite isolée du venin de *Crotalus durissus terrificus* **caractérisée par une légère toxicité** par rapport aux autres membres de la sa famille. Sa DL 50 est de 3,4 mg/kg par voie intra veineuse (IV), ce qui est très supérieur à celle de la crotoxine qui est de 110 µg/kg par IV. Cette toxine possède un large éventail de fonctions biologiques et de potentiels thérapeutiques différents. En plus d'être capable **de modifier spécifiquement les canaux Na<sup>+</sup> voltage-dépendant**, elle présente des activités analgésiques, myonécrotiques, antimicrobiennes et antitumorales sélectives potentielle. Elle a notamment été proposée comme adjuvant chimiothérapeutique [62].

Lorsqu'elle est injectée intra-péritonéal (IP) ou sous-cutanée (SC) chez des souris, la crotamine induit un **effet analgésique dépendant de la dose et du temps**. Cet effet est **inhibé par la naloxone, ce qui suggère un mécanisme d'action opioïdes**. Cependant l'effet direct ou indirect reste à démontrer. L'absence de la séquence Tyr-Gly-Gly-Phe commune aux principaux opioïdes endogènes laisse penser qu'elle agirait indirectement. Les effets antinociceptifs de la crotamine et de la morphine ont été analysés par le test de la plaque chaude et par la méthode de contorsion induite par l'acide acétique. En comparaison avec la morphine (4 mg/kg), **l'effet analgésique de la crotamine, même à très faibles doses** (133,4 µg/kg IP, environ 0,4% de la DL50) est environ **30 fois plus puissant que la morphine**. Sur une base molaire, il est 500 fois plus puissant que la morphine. Ces deux tests ont permis de mettre en évidence un **effet à la fois au niveau central et au niveau périphérique**. L'analyse histopathologique du cerveau, le foie, les muscles squelettiques, de l'estomac, les poumons, la rate, le cœur, les reins et l'intestin grêle a révélé que la crotamine injecté chez les souris n'a entraîné aucune lésion visible dans l'un de ces organes par microscopie optique [252].

## CONCLUSION

La biodiversité de la planète est une ressource fondamentale pour l'Humanité. Toutes les maladies et poisons détiennent leurs remèdes dans la Flore, la Faune et les micro-organismes. " La diversité du vivant se retrouve dans le monde des toxines qu'il engendre ", particulièrement au niveau des venins d'animaux. La variabilité et l'efficacité des toxines, des venins et des appareils venimeux proviennent de la multitude d'espèces qui les produisent, de leur évolution et de leur adaptation à l' environnement. Les venins permettent aux espèces venimeuses de se nourrir et de se défendre, en paralysant leurs proies, en modifiant le fonctionnement cardiaque et la pression artérielle ou encore en induisant des hémorragies internes. Cela améliore leur capacité de survie et leur procure un avantage sélectif dans les milieux hostiles.

Inoculé chez l'homme, les venins occasionnent de fortes douleurs et des perturbations physiologiques qui peuvent être dangereuses, parfois mortelles. Pourtant, bien maîtrisées, les toxines peuvent être utiles et précieuses à l'espèce humaine par leurs propriétés thérapeutiques. Longtemps sous-estimé, l'abondance et la diversité des venins est aujourd'hui reconnu comme un large éventail de substances bioactives représentant un immense potentiel pharmacologique pour le développement de nouveaux médicaments.

Dans la recherche fondamentale, les venins contribuent considérablement à l'analyse de nombreux mécanismes biologiques allant de la physiologie humaine à la compréhension des pathologies. Ce sont aussi d'importants modulateurs utilisés comme outils pharmacologiques de diagnostic ou de surveillance de différentes constantes et facteurs physiologiques. Plus important encore, en thérapeutique médicale ils mènent à la découverte et à l'élaboration de nouveaux médicaments qui ont un impact positif significatif sur la santé humaine. En raison de leurs fonctions pharmacologiques très diversifiées, couplées à une forte spécificité de cible, les toxines ophidiennes suscitent un très grand intérêt des chercheurs pour le développement de nouveaux agents thérapeutiques dans le traitement de diverses pathologies telles que les troubles cardiovasculaire, l'hypertension artérielle, le cancer, la douleur, les troubles hématologiques (thrombose), les maladies nerveuses, (neuromusculaires et psychotiques), les maladies inflammatoires (arthrite), les maladies infectieuses, etc. Ainsi, durant la dernière

décennie, beaucoup de protéines et toxines ophidiennes ont été isolées, purifiées et caractérisées. Cependant pour beaucoup d'entre elles des études complémentaires sont nécessaires avant la mise sur le marché de ces médicaments. Il semble que l'on ne soit encore qu'au commencement des possibilités qui nous sont offertes. Actuellement, l'industrie pharmaceutique investit de plus en plus dans l'élaboration de médicaments à base de venin.

Depuis l'approbation du captopril, le premier médicament à base de protéines de venin de serpent et sa mise sur le marché il y a plus de 30 ans, l'attention des chercheurs pour les molécules ophidiennes n'a cessé de grandir. Un certain nombre de nouveaux médicaments sont constamment en train d'émerger de cette corne d'abondance.

L'exploration des venins et des tissus venimeux est en plein essor, en particulier grâce au progrès des méthodologies « omiques » à haut débit qui apportent une contribution importante à l'identification et à la caractérisation de nouveaux composés « hit » servant de modèles pour la conception de médicaments. Ainsi, grâce aux avancées combinées en protéomique et transcriptomique, le projet « VENOMICS » permet désormais la consultation de la plus grande bibliothèque mondiale de toxines de venins, tout en s'affranchissant de la disponibilité de produits naturels.

Ces méthodologies offrent un certain nombre d'avantages pour le développement de nouveaux outils pour la recherche fondamentale, le diagnostic clinique et les nouveaux médicaments. Cependant, le processus allant de la découverte de la toxine à l'approbation d'un nouveau médicament reste long, couteux et parsemé de déceptions.

Sur plus de 3000 espèces de serpents existants sur Terre, 600 environ, notamment les cobras, les vipères et les crotales sont dotés de crochets venimeux. Mais plus de 2000 autres espèces, colubridés ou couleuvres, ne possédant pas ces crochets, sont généralement sans danger pour l'Homme, ce qui a longtemps laissé imaginer qu'elles n'avaient pas de venins. Ces centaines d'espèces ont ainsi été négligées pendant longtemps dans la recherche pharmacologique, or des recherches dans la systématique démontrent qu'elles s'avèrent tout aussi utiles pour la création de nouveaux médicaments. Les scientifiques redoublent d'efforts pour déceler les secrets que détiennent leurs venins.

Comme beaucoup d'autres espèces animales et végétales, de nombreuses espèces de serpents sont actuellement menacés d'extinction par les activités humaines, la modification de leur habitat (déforestation, pollution...) et le dérèglement climatique. Il s'agit d'une véritable course

contre la montre. Systématiciens, écologues, pharmacologistes et cliniciens s'unissent afin de préserver la biodiversité de ces « couleuvres » tant pour la place qu'elles occupent dans le maintien des écosystèmes que pour leur chimio-diversité et le potentiel médical qu'elles représentent.

Même si aujourd'hui les technologies modernes nous permettent de recenser, stocker et conserver un grand nombre de données contribuant à recréer artificiellement des composés d'origine naturels, il est impossible de reconstituer l'ensemble de l'immense biodiversité de notre terre mère.

La survie de l'Homme est étroitement liée à la survie de la biodiversité puisque chaque organisme vivant peut constituer une ressource vitale encore inconnue. Chaque jour des espèces disparaissent privant l'Homme d'une inestimable Pharmacopée.

Pour empêcher la disparition des espèces vivant sur notre Terre, il est important de protéger nos ressources naturelles et d'agir pour le maintien de notre biodiversité avant qu'il ne soit trop tard.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] G. BLANCHET, J.-P. CHIPPAUX, L. CHIRIO, F. DUCANCEL, M. GOYFFON, C. ROLLARD et N. VIDAL, *La fonction venimeuse*, Paris: Lavoisier, 2015, pp. 275-353.
- [2] C. J.P., *Les serpents d'Afrique occidentale et centrale.*, Paris: IRD Editions, 2006.
- [3] J.-P. CHIPPAUX, *Venins de serpent et envenimations.*, Paris: DIFFUSION IRD, 2002, p. 288.
- [4] B. FRY, N. VIDAL, J. NORMAN, F. VONK, H. SCHEIB, S. RAMJAN, S. KURUPPU, K. FUNG, S. HEDGES, M. RICHARDSON, W. HODGSON, V. IGNJATOVIC, R. SUMMERHAYES et E. KOCHVA, «Early evolution of the venom system in lizards and snakes.,» *Nature*, vol. 439, pp. 584-588, 2006.
- [5] N. VIDAL et S. B. HEDGES, «The molecular evolutionary tree of lizards, snakes, and amphisbaenians,» *Science Direct Compte Rendu Biologie*, vol. 332, pp. 129-139, 2009.
- [6] M. GOYFFON et I. INEICH, «Conférence: Nouveau regard sur les serpents venimeux,» *Medecine Tropicale*, vol. 68, pp. 329-333, 2008.
- [7] C. MATTISON, *Tous les serpents du monde*, Paris: DELACHAUX et NIESTLE, 2008, p. 271.
- [8] P. R. A., B. F. T., C. G. R., D. O. A. N., V. L. J., K. C. A. et W. J. J., «The phylogeny of advanced snakes (Colubroidae), with discovery of a new subfamily and comparison of support methods for likelihood trees.,» *Science Direct Moleculare Phylogenetics And Evolution*, vol. 58, pp. 329-342, 2011.

- [9] V. N., D. A.S., D. P., C. C., C. A. et H. S.B., «The phylogeny and classification of caenophidian snakes inferred from seven nuclear protein-coding genes.» *Comptes Rendus Biologie*, vol. 330, pp. 182-187, 2007.
- [10] T. R. Database, «Higher Taxa in Extant Reptiles,» The reptile database., 8 FEVRIER 2016. [En ligne]. Available: <http://www.reptile-database.org/db-info/taxa.html#Ser>. [Accès le 21 03 2016].
- [11] R. PYRON, F. BUBRINK et J. WIENS, «A phylogeny and revised classification of Squamata, including 4161 species of lizards and snakes,» *BMC Evolutionary Biology*, vol. 13, p. 93, 2013.
- [12] C. KELLY, N. BARKER, M. VILLET et D. BROADLEY, «Phylogeny, biogeography and classification of the snake superfamily Elapoidea: a rapid radiation in the late Eocene,» *Cladistic*, vol. 25, pp. 38-63, 2009.
- [13] E. KOCHVA, «Atractaspis (Serpentes, Atractaspididae) the burrowing asp; a multidisciplinary minireview,» *Bulletin of the Natural History Museum of London*, vol. 68, pp. 91-99, 2002.
- [14] F. DUCANCEL, «Les venins des Atractaspis,» *Medecine tropicale*, vol. 68, pp. 340-347, 2008.
- [15] T. Y., S. K., J. TN., S. H, F. R., V. M., B. G., A. A. et D. F., «Atractaspis aterrima toxins: the first insight into molecular evolution of venom in side-stabbers,» *toxins*, vol. 11, pp. 1948-1964, 2013.
- [16] H. H. W. et P. M. S., «Identification and characterization of a taxon-specific three-finger toxin from the venom of the Green Vinesnake (*Oxybelys fulgidus* Colubridae),» *Biochimie*, vol. 95, pp. 304-310, 2013.
- [17] M. IVANOV, J. RAGE, Z. SZYNDLAR et M. VENCZEL, «Histoire et origine géographique des faunes de serpent en Europe,» *Bulletin de la Société Herpétologique de France*, vol. 96, pp. 15-24, 2000.

- [18] F. DUCANCEL et G. BLANCHET, «Venins et toxines de serpents.,» chez *La fonction venimeuse.*, Paris, Lavoisier Tec &Doc, 2015, pp. 299-328.
- [19] W. W., P. L. et P. C. W. DE., «A nesting of vipers: phylogeny and historical biogeography of the Viperidae (Squamata: Serpentes),» *Molecular Phylogenetics and Evolution*, vol. 49, pp. 445-459, 2008.
- [20] R. BAUCHOT, C. BON, P. DAVID et J.-P. GASC, *Serpents*, Edition Artemis, 2005.
- [21] S. WEINSTEIN, T. SMITH et K. KARDONG, «Reptile venom glands form, function, and future,» chez *Handbook of venoms and toxins of reptiles. MACKESSY SP.*, Boca Raton, Taylor & Francis, CRC Press, 2009, pp. 76-84.
- [22] M. SP. et B. LM., «Bioweapons synthesis and storage: The venom gland of front-fanged snakes.,» *Zoologischer Anzeiger*, vol. 245, pp. 147-159, 2006.
- [23] R. MARQUES-PORTO, I. LEBRUN et D. PIMENTA, «Self-proteolysis regulation in the Bothrops jararaca venom: the metallopeptidases and their intrinsic peptidic inhibitor.,» *Comparative Biochemistry Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology.*, vol. 147, pp. 424-433, 2008.
- [24] B. YOUNG, K. ZAHN, M. BLAIR et J. LALOR, «Functional subdivision of the venom gland musculature and the regulation of venom expulsion in rattlesnakes,» *Journal of Morphology*, vol. 246, pp. 249-259, 2000.
- [25] I. K. T. N. W. J. M. H. Y. T. N. R. BRYAN G. FRY et E. A. B. U. I. V. S. A. A. D. H. W. L. K. S. CASEWELL, «(Chap1) Seeing the Woods for the Trees: Understanding Venom Evolution as a guide for Biodiscovery,» chez *Venoms to Drugs/ Venom as a Source for the Development of Human Therapeutiqu.*, Cambridge, Royal society of chemistry / Gleenn F. King, 2015, pp. 1-36.
- [26] U. d. Liège, «Venins, Poisons et Toxines,» 28 JANVIER 2016. [En ligne]. Available: [http://reflexions.ulg.ac.be/cms/c\\_14566/venins-poisons-et-toxines](http://reflexions.ulg.ac.be/cms/c_14566/venins-poisons-et-toxines).
- [27] J. ALMEIDA, L. RESCENDE, A. SILVA, R. RIBEIRO, A. SOARES, L. CALDERON, S. MARANGONI et S. DA SILVA, «Biochemical and functional

- studies of ColTx-I, a new myotoxic phospholipase A2 isolated from *Crotalus oreganus lutosus* (Great Basin rattlesnake) snake venom.,» *Toxicon*, vol. 117, pp. 1-12, 2016.
- [28] A. M. K. R. D.-S. S. S. S. F. B. Z. c. J. P. Z. d. N. B. M. e. J. R. A. L. M. R. S. M. S. L. d. S. A. M. S. Edailson A. Corrêa, «Isolation, structural and functional characterization of a new Lys49 phospholipase A2 homologue from *Bothrops neuwiedi* urutu with bactericidal potential,» *Toxicon*, vol. 115, pp. 13-21, 2016.
- [29] R. R. R. ., A. C. O. C. ., M. A. S. ., R. D. M. A.-P. ., L. T. M. F. ., S. V. S. ., V. H. A. Vanessa Danielle Menjon Muller, «Crotoxin and phospholipases A 2 from *Crotalus durissus terri* fi cus showed antiviral activity against dengue and yellow fever viruses.,» *Toxicon*, vol. 59, n° %14, pp. 507-515, 2012.
- [30] N. S.-A. A. B. M. E. A. J. L. ., N. M. Raoudha Zouari-Kessentini, «Antitumoral Potential of Tunisian Snake Venoms Secreted Phospholipases A2,» *BioMed Research International*, p. (9pages), 2013.
- [31] T. S. K. R. M. K. RYAN J. R. McCLEARY, «Chap5: Reptile Venoms as a Platform for Drug Development,» chez *Venoms to Drugs, Venom as a Source for the Development of human Therapeutics*, Cambridge, Royal Society of Chemistry / Glenn F. King, 2015, pp. 129-162.
- [32] B. C. Cousin X, «Acetylcholinesterase from snake venom as a model for its nerve and muscle counterpart.,» *J Nat Toxines* ., vol. 8, n° %12, pp. 285-294, juin 1999.
- [33] B. e. V. B. e. D. C. J. Dhananjaya, «Snake Venom Nucleases, Nucleotidases, and Phosphomonoesterases,» *Handbook of venins et toxines de reptiles*, pp. 155-172, 2009.
- [34] D. C. S. Dhananjaya BL, «An overview on nucleases (DNase, RNase, and phosphodiesterase) in snake venoms.,» *Biochimie (Mosc)*, vol. 75, n° %11, pp. 1-6, 2010.

- [35] S. M. B. ., D. L. M. F. A. d. C. S. V. S. Tassia R Costa, «Snake venom L-amino acid oxidases: an overview on their antitumor effects.,» *Journal of Venomous Animals et les toxines , y compris les maladies tropicales*, vol. 20, n° %123, 2014.
- [36] C. B. F. M. ., M. R. ., E. F. S. Élide Cleyse Gomes da Mata, «Antiviral activity of animal venom peptides and related compounds,» *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*, vol. 23, n° %13, 2017.
- [37] Z. Abdelkafi-Koubaa, M. Morjen, N. Srairi-Abid, M. El Ayeb et N. Marrakchi, «LES-AMINO ACIDES OXYDASES DES VENINS DE SERPENTS ET LEURS POTENTIELLES APPICATIONS BIOMEDICALES,» *Archives de l'Institut Pasteur de Tunis*, 01 01 2014.
- [38] L. S. Y. Y. Z. Q. S. M. Guo C, «Past decade study of snake venom L-amino acid oxidase.,» *Toxicon*, pp. 302-311, 01 Septembre 2012.
- [39] G. K. Kemparaju K, «Snake venom hyaluronidase: a therapeutic target.,» *Cell Biochem Funct.*, vol. 24, n° %11, pp. 7-12, 2006.
- [40] R. R. B.-F. J. F. F. H. S.-F. H.-B. M. R. V. Castanheira LE, «Molecular cloning of a hyaluronidase from Bothrops pauloensis venom gland.,» *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, vol. 20, n° %125, 2014.
- [41] S. SM, «The long road of research on snake venom serine proteinases.,» *Toxicon*, vol. 62, pp. 19-26, 2013.
- [42] F. Y. T. K. Matsui T, «Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis.,» *Biochim Biophys Acta.*, vol. 1477, n° %11-2, pp. 146-156, 2000.
- [43] C. RENARD, «THESE: L'action des venins ophidien sur l'hémostase.,» [http://docnum.univ-lorraine.fr/public/SCDPHA\\_T\\_2006\\_RENARD\\_CHRISTELLE.pdf](http://docnum.univ-lorraine.fr/public/SCDPHA_T_2006_RENARD_CHRISTELLE.pdf), Vols. %1 sur %2Thèse de pharmacie de l'université Henry Poincare-Nancy, p. Université de Lorraine / université henri poincare, 2006.

- [44] I. LIMAM, M. EL AYEB et N. MARRAKCHI, «Les métalloprotéases des venins de serpents : structure, biosynthèse et fonction(s).», *Archive de l'Institut Pasteur de Tunis*, 2010.
- [45] R. M. Kini et C. Y. Koh, «Metalloproteases Affecting Blood Coagulation, Fibrinolysis and Platelet Aggregation from Snake Venoms: Definition and Nomenclature of Interaction Sites.», *Toxins*, vol. 284, n° 18, pp. 1-27, 2016.
- [46] F. O. ., E. H. ., Y.-N. M. ., A.-S. V. ., M. G. G. Mion, «Action des venins sur la coagulation sanguine : diagnostic des syndromes hémorragiques.», *Bull Soc Pathol Exot*, vol. 95, n° 13, pp. 132-138, 2002.
- [47] A. GALAT, G. GROSS, P. DREVET, A. SATO et A. MENEZ, «Conserved structural determinants in three-fingered protein domains.», *The FEBS Journal*, vol. 275, n° 112, pp. 3207-3225, 2008.
- [48] G. GROSS et P. DREVET, «Les toxines à trois doigts : même structure, même mécanisme de repliement ?», chez *Rencontres en Toxinologie*, SFET Société Française pour l'Etude des Toxines, 2008.
- [49] K. RM. et D. R., «Structure, function and evolution of tree-finger toxins: mini proteins with multiple targets.», *Toxicon*, vol. 6, pp. 855-867, 2010.
- [50] G. M. P. C. B. D. D. W. M. G. S. Larréché, «Neurotoxines ophidiennes/ Neurotoxine from snake venom.», *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, vol. 27, n° 14, pp. 310-316, 2008.
- [51] A. M. D. Servent, «Snake Neurotoxins that Interact with Nicotinic Acetylcholine Receptors.», *Handbook of Neurotoxicology*, vol. 1, pp. 385-425, 2002.
- [52] CNRS, «Des benzodiazépines dans les venins de serpent !», Institut des sciences biologiques CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique)/, fev 2016. [En ligne]. Available: <http://www.cnrs.fr/insb/recherche/parutions/articles2015/pe-bougis.html>. [Accès le 16 05 2016].

- [53] J. R. S. M. D.-B. B. C. J. M. G. M. K. O. P. F. B. P. E. B. Jean-Pierre Rosso, «MmTX1 and MmTX2 from coral snake venom potently modulate GABAA receptor activity.,» *Proc Natl Acad Sci US A. (PNAS)*, vol. 12, n° %18, pp. 891-900, fev 2015.
- [54] G. Mion et S. Larréché, «Conférence: Syndrome cobraïque,» *Médecine Tropical*, vol. 68, n° %14, pp. 348-358, 2008.
- [55] H. S. ., F. M. ., P.-F. J. ., Z. V. ., M. A. ., B. P. ., G. V. ., C. Y. .. Sampaio SC, «Crotoxin: novel activities for a classic beta-neurotoxin.,» *Toxicon* , vol. 55, n° %16, pp. 1045-1060, 2010.
- [56] R. B. Harvey AL, «Dendrotoxins: Structure-Activity Relationships and Effects on Potassium Ion Channels,» *Current medicinal Chemistry.*, vol. 11, n° %123, pp. 3065-3072, 2004.
- [57] E. KARISSON, P. MIMI et D. RODRIGUEZ-ITHURRALDE, «Fasciculins, anticholinesterase toxins from the venom of the green mamba *Dendroapsis angusticeps.*,» *Journal de physiologie*, vol. 79, n° %14, pp. 232-240, 1984.
- [58] R. K. D. ., E. D. R. Sardar E Gasanov, «Snake Venom Cytotoxins, Phospholipase A2s, and Zn<sup>2+</sup>-dependent Metalloproteinases: Mechanisms of Action and Pharmacological Relevance.,» *J Clin Toxicol.*, vol. 4, n° %11, 2014.
- [59] S. LEE, C. LIN, C. WANG, P. WU, H. HUANG, C. CHANG et W. WU, «Endocytotic Routes of Cobra Cardiotoxins Depend on Spatial Distribution of Positively Charged and Hydrophobic Domains to Target Distinct Types of Sulfated Glycoconjugates on Cell Surface.,» *The Journal of biological chemistry*, vol. 289, n° %129, pp. 20170- 20181, 2014.
- [60] N. OGUIURA, M. BONI-MITAKE et G. RADIS-BAPTISTA, «New view on crotamine, a small basic polypeptide myotoxin from South American rattlesnake venom.,» *Toxicon*, vol. 46, n° %14, pp. 363-370, 2005.
- [61] V. FADEL, P. BETTENDORFF, T. HERRMANN, X. J. DE AZERVEDO, E. OLIVEIRA , T. YAMANE et K. WUTHRICH, «Automated NMR structure

- determination and disulfide bond identification of the myotoxin crotamine from *Crotalus durissus terrificus*.» *Toxicon*, vol. 46, n° %17, pp. 759-767, 2005.
- [62] F. L. ., d. C. C. ., M. A. ., G. J. ., S. A. .. Nicastro G, «Solution structure of crotamine, a Na<sup>+</sup> channel affecting toxin from *Crotalus durissus terrificus* venom.» *Eur J Biochem.* , vol. 270, n° %19, pp. 1969-1979, 2003.
- [63] M. A. F. H. ., A. R. B. P. d. S. ., A. P. ., P. L. D. S. J. A. J. Z. G. R.-B. A. K. ., T. Y. Irina Kerkis, «State of the Art in the Studies on Crotamine, a Cell Penetrating Peptide from South American Rattlesnake.» *BioMed Research International*, 2014.
- [64] C. E. ., M. S. ., B. R. ., C. G. ., B. A. .. Toyama MH, «Biochemical characterization of two crotamine isoforms isolated by a single step RP-HPLC from *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom and their action on insulin secretion by pancreatic islets.» *Biochim Biophys Acta.* , vol. 1474, n° %11, pp. 56-60., 2000.
- [65] K. I. .. Radis-Baptista G, «Crotamine, a small basic polypeptide myotoxin from rattlesnake venom with cell-penetrating properties.» *Curr Pharm Des.*, vol. 17, n° %138, pp. 4351-4361, 2011.
- [66] K. ., R.-B. G. ., O. E. ., V.-M. A. ., P. L. ., Y. T. Kerkis A 1, «Crotamine is a novel cell-penetrating protein from the venom of rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*.» *FASEB J.* , vol. 18, n° %112, pp. 1407-1409, 2004 .
- [67] D. F et G. M, «Les venins des AtractaspiS.» *Medecine tropicale*, vol. 68, pp. 340-347, 2008.
- [68] D. W. JR., S. H., M. P., T. A. et L. M., «Calciceptine, a peptide isolated from black mamba venom, is a specific blocker of the L-type calcium channel.» *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, vol. 6, pp. 2437-2440, 1991.
- [69] R. Kini, R. A. Caldwell, Q. Y. Wu et H. J. Evans, «Flanking Proline Residues Identify the L-Type Ca<sup>2+</sup> Channel Binding Site of Calciseptine and FS2+.» *Biochemistry*, vol. 37, n° %125, pp. 9058-9063, 1998.

- [70] J. L. ., E. A. ., N. M. O. KALLECH-ZIRI, «Les désintégrines issues des venins de serpents: Classification et potentiel thérapeutique.,» *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, vol. 84, n° %11-4, pp. 29-37, 2007.
- [71] M. FS, «Snake venoms and the hemostatic system.,» *Toxicon.*, vol. 36, n° %112, pp. 1749-1800, 1998.
- [72] J.-P. C. ., A. T. Maria Konstantakaki, «Docking of  $\alpha$ -cobratoxin suggests a basal conformation of the nicotinic receptor.,» *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 359, n° %13, pp. 413-418, 2007.
- [73] H. J. ., K. Z. J. L. Y. H. Y. Li, «Preparation, characterization and nasal delivery of  $\alpha$ -cobrotoxin-loaded poly(lactide-co-glycolide)/polyanhydride microspheres.,» *J. Control. Release*, vol. 108, n° %11, pp. 10-20, 2005.
- [74] E. A. B. U. S. S. P. A.-H. J. V. L. B. G. F. R. J. L. P. F. A. G. F. K. S. DUTERTRE, «Venoms-Based Drug Discovery: Proteomic and Transcriptomic Approaches,» chez *Venoms to drugs/ Venoms as a Source for the Development of Human Therapeutics*, Cambridge, Royal Society of Chemistry / Glenn F.King, 2015, pp. 80-96.
- [75] Y. BANERJEE, J. MIZUGUCHI, R. IWANAGA et S. KINI, «Hemextin AB Complex, a Unique Anticoagulant Protein Complex from Hemachatus haemachatus (African Ringhals Cobra) Venom That Inhibits Clot Initiation and Factor VIIa Activity.,» *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, pp. 42601- 42611, 2005.
- [76] M. A. A. d. S. ., A. F. d. M. V. ., G. M. d. S. S. ., F. S. G. ., L. C. B. B. C. ., P. M. G. P. ., R. M. L. d. S. Erika dos Santos Nunes, «Purification of a lectin with antibacterial activity from Bothrops leucurus snake venom,» *Comparative Biochemistry and Physiology Partie B: Biochimie et Biologie Moléculaire*, vol. 159, n° %11, pp. 57-63, 2011.
- [77] J. L. ., M. E. A. ., N. M. S. SARRAY, «LES LECTINES DE T YPE C DE VENINS DE SERPENTS.,» *Archives. Institu. Pasteur Tunis.*, vol. 82, n° %11-4, pp. 69-80, 2008.

- [78] M. A. S. e. S. V. Sampaio, «Snake venom galactoside-binding lectins: a structural and functional overview,» *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*, vol. 21, n° %115, 2015.
- [79] M. T, «Structures and functions of snake venom CLPs (C-type lectin-like proteins) with anticoagulant-, procoagulant-, and platelet-modulating activities.,» *Toxicon.* , vol. 45, n° %18, pp. 1099-1114, 2005.
- [80] J. E. Arlinghaus FT, «C-type lectin-like proteins from snake venoms.,» *Toxicon.*, vol. 60, n° %14, pp. 512-519, 2012.
- [81] L. Q. ., C. J. .. Clemetson KJ, «Snake C-type lectin-like proteins and platelet receptors.,» *Pathophysiol Haemost Thromb.* , vol. 34, n° %1(4-5), pp. 150-155, 2005.
- [82] L. Aloe et G. N. Chaldakov, «The Multiple Life of Nerve Growth Factor: Tribute to Rita Levi-Montalcini (1909–2012).,» *Balkan Med J.* , vol. 30, n° %11, pp. 4-7, 2013.
- [83] L. G. ., J. G. ., A. C. ., A. R. ., P. G. e. D. T. SH Farsky, «Bothrops asper snake venom and its metalloproteinase BaP-1 activate the complement system.,» *Médiateurs inflamm.*, vol. 9, n° %15, pp. 213-221, 2000.
- [84] E. A. B. U. S. S. P. A.-H. J. V. L. B. G. F. R. P. F. A. e. G. F. K. Sébastien Dutertre, «(chap3) Venoms-Based Drug Discovery: Proteomic and Transcriptomic Approaches,» chez *Venoms to Drugs/ Venom as a Source for the Development of Human Therapeutique*, Cambridge, Royal Society of Chemistry / Glenn F. King, 2015, pp. 80-96.
- [85] J.-P. Largillet, «Sophia : les venins historiques de Pasteur dans la collection de VenomeTech,» 8 déc 2010. [En ligne]. Available: <http://www.webtimemedias.com/article/sophia-les-venins-historiques-de-pasteur-dans-la-collection-de-venometech>.
- [86] J. ECHTERBILLE, «Les venins d'animaux nouvelle panacée?,» *ATHENA Le mag scientifique*, n° %1291, pp. 13-15, 2013.

- [87] L. QUINTON, *Thèse Polytechnique : Caractérisation de toxines peptidiques par spectrométrie de masse à haute résolution*, <https://pastel.archives-ouvertes.fr/file/index/docid/503568/filename/Quinton.pdf>: HAL , 2006.
- [88] R. LEBRUN, «La spectrométrie de masse : une technique d'étude structurale des protéines.», FR3479 CNRS-AMU Plate-forme Protéomique de l'Institut de Microbiologie de la Méditerranée cours 2013. [En ligne]. Available: [https://sciences.univ-amu.fr/files/coursl2\\_20fevrier2013\\_r\\_lebrun.pdf](https://sciences.univ-amu.fr/files/coursl2_20fevrier2013_r_lebrun.pdf).
- [89] V. Hibou, «Spectrométrie de masse en Tandem MS/MS,» *Analytical TOXICOLOGY*, 02 04 2017. [En ligne]. Available: <https://www.analyticaltoxicology.com/spectrometrie-de-masse-tandem-ms-ms/>. [Accès le 02 05 2017].
- [90] A. f. d. s. s. d. p. d. s. affsaps, «Le séquençage à haut débit, méthodes et enjeux en medecine, pharmacologie et toxicologie. Version 1.,» p. [http://ansm.sante.fr/var/ansm\\_site/storage/original/application/0edd877424b6f7301df42c2aff2a9a5a.pdf](http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/0edd877424b6f7301df42c2aff2a9a5a.pdf), 8 12 2011.
- [91] «La synthèse peptidique en phase solide,» [En ligne]. Available: <http://fdanieau.free.fr/cours/bts/A1/biochimie/SynthesePeptidique.pdf>. [Accès le 04 05 2016].
- [92] W. C. H. D. J. A. P. M. I. VETTER, «(chap 4) Venoms-Based Drug Discovery: Bioassays, Electrophysiology, High-Throughput Screens and Target Identification,» chez *Venoms to Drugs/ Venom as a Source for the Development of Human Tgerapeutics*, Cambridge, Royal Society of Chemistry / Glenn F. King, 2015, pp. 97-128.
- [93] L. S. H. J. LIU B, «Technological advances in high-throughput screening,» *Am J Pharmacogenomics.*, vol. 4, n° %14, pp. 263-276, 2004.
- [94] E. collective, «Méthodes d'études in silico.,» chez *Reproduction et environnement*, Paris, Les éditions Inserm, 2011, pp. 187-191.

- [95] K. MEZHOU, «Prédiction des structures 3D des protéines.,» [En ligne]. Available: <https://wiki.ubuntu.com/kmezhou/Bioinformatics?action=AttachFile&do=get&target=structure-3D-prediction.pdf>. [Accès le 18 04 2016].
- [96] M. LIMDSTROM, «Protéines :Modélisation, Prédiction, Conception.,» 19-25 03 2007. [En ligne]. Available: <http://student.ulb.ac.be/~mlindstr/slides.pdf>. [Accès le 18 04 2016].
- [97] C. Koh et R. Kini, «From snake venom toxins to therapeutics – Cardiovascular examples,» *Toxicon*, vol. 59, n° 14, pp. 497-506, 2012.
- [98] F. NAVARRO, *Les toxines d'origine animale possédant des propriétés analgésiques : mode d'action et application médicale humaine.*, LYON: École nationale vétérinaire d'Alford, 2012.
- [99] J.-P. Chippaux, «Venins animaux dans la recherche biologique.,» *Ethnologie française*, vol. 34, p. 192, 2004.
- [100] A. A. ., J. K. .. Rajendra W, «Toxins in anti-nociception and anti-inflammation. Rajendra W , Armugam A , Jeyaseelan K .,» *Toxicon* . , vol. 44, n° 11, pp. 1-17, 2004.
- [101] D. S. R. T. Ashis K. Mukherjee, «Medical and diagnostic application of snake venom proteomes.,» *Journal of proteins and proteomics*, vol. 2, n° 11, pp. 31- 40, 2011.
- [102] R. Joseph, S. Pahari, W. C. .. Hodgson et R. Kini, «Hypotensive Agents from Snake Venoms,» *Current Drug Targets - Cardiovascular & Hematological Disorders*, vol. 4, n° 14, pp. 437-459, 2004.
- [103] C. Y. Koh et R. Kini, «From snake venom toxins to therapeutics - Cardiovascular examples,» *Toxicon*, vol. 59, n° 12, pp. 497-506, 2011.
- [104] P. MAY, «CAPTOPRIL (the treatment for high blood pressure derived from snake venom),» [En ligne]. Available: <http://www.chm.bris.ac.uk/motm/captopril/captoprilh.htm>. [Accès le 28 05 2016].

- [105] N. TOURNEUR, «Du venin de vipère au Captopril. (Le Quotidien du Pharmacien du : 02/05/2013),» [En ligne]. Available: <http://www.pharmacie-rullier.fr/du-venin-de-vipere-au-captopril.html>.
- [106] N. VERAN, «ETUDE DE STABILITE DE GELULES DE CAPTOPRIL A USAGE PEDIATRIQUE,» *Thèse FACULTE DE PHARMACIE Université de Nancy Henri Poincaré*, pp. 8-17, 2009.
- [107] S. H. FERREIRA, «A bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of bothrops jararaca.,» *British Journal of Pharmacology Chemother*, vol. 24, n° %11, pp. 163-169, 1965.
- [108] D. W. C. a. M. A. Ondetti, «History of the Design of Captopril and Related Inhibitors of Angiotensin Converting Enzyme,» *Hypertension* , vol. 17, n° %14, pp. 589-592, 1991.
- [109] «Inhibiteur de l'enzyme de conversion (IEC),» [En ligne]. Available: [http://www.med.univ-montp1.fr/Enseignement/cycle\\_2/MIA/Ressources-locales/Cardio/250\\_pharmaco\\_traitement\\_insuf\\_cardiaq/cours/cours5-1.htm](http://www.med.univ-montp1.fr/Enseignement/cycle_2/MIA/Ressources-locales/Cardio/250_pharmaco_traitement_insuf_cardiaq/cours/cours5-1.htm).
- [110] E. G. Erdös, «The ACE and I: how ACE inhibitors came to be,» *Le FASEB Journal*, vol. 20, n° %18, pp. 1034-1038, 2006.
- [111] F. d. m. d. c. e. d. l'AVC, «Inhibiteurs de l'ECA (enzyme de conversion de l'angiotensine),» [En ligne]. Available: [http://www.fmcoeur.com/site/c.ntJXJ8MMIqE/b.4026293/k.C74B/Maladies\\_du\\_coeur\\_\\_Inhibiteurs\\_de\\_18217ECA\\_enzyme\\_de\\_conversion\\_de\\_18217angiotensine.htm](http://www.fmcoeur.com/site/c.ntJXJ8MMIqE/b.4026293/k.C74B/Maladies_du_coeur__Inhibiteurs_de_18217ECA_enzyme_de_conversion_de_18217angiotensine.htm). [Accès le 1 06 2016].
- [112] F. d. m. d. c. L'AVC, «Inhibiteurs de l'ECA (enzyme de conversion de l'angiotensine),» [En ligne]. Available: [http://www.fmcoeur.com/site/c.ntJXJ8MMIqE/b.4026293/k.C74B/Maladies\\_du\\_coeur\\_\\_Inhibiteurs\\_de\\_18217ECA\\_enzyme\\_de\\_conversion\\_de\\_18217angiotensine.htm](http://www.fmcoeur.com/site/c.ntJXJ8MMIqE/b.4026293/k.C74B/Maladies_du_coeur__Inhibiteurs_de_18217ECA_enzyme_de_conversion_de_18217angiotensine.htm). [Accès le 1 06 2016].

- [113] J. A. ., P. K. ., H. G. ., A. P. Vink S, «Natriuretic peptide drug leads from snake venom.,» *Toxicon*, vol. 59, n° %14, pp. 434-445, 2012.
- [114] B. K. H. ., D. J. M. ., P. A. K. ., J. C. B. J. ., M. Ondrej Lisy, «Design, Synthesis, and Actions of a Novel Chimeric Natriuretic Peptide: CD-NP,» *J Am Coll Cardiol.* , vol. 52, n° %11, pp. 60-68, 2008.
- [115] «Peptides natriurétiques, ANP, BNP et CNP,» Pharmacorama Connaissance des médicaments, [En ligne]. Available: <https://www.pharmacorama.com/pharmacologie/mediateurs/medicaments-impact-peptides-vaso-actifs/peptides-natriuretiques-anp-bnp-cnp/>.
- [116] K. R. ., M. J. ., F. M. ., D. A. .. Singh G, «Novel snake venom ligand dendroaspis natriuretic peptide is selective for natriuretic peptide receptor-A in human heart: downregulation of natriuretic peptide receptor-A in heart failure.,» *Circ Res.* , vol. 99, n° %12, pp. 183-190, 2006.
- [117] T. G. v. Lueder, S. J. Sangaralingham, B. H. Wang, D. A. Andrew R. Kompa, J. John C. Burnett et H. K. ., «Renin-Angiotensin Blockade Combined With Natriuretic Peptide System Augmentation: Novel Therapeutic Concepts to Combat Heart Failure,» *Circ Coeur Fail*, vol. 6, n° %13, pp. 594-605, 2013.
- [118] C. H. ., L. O. ., S. S. ., C. C. ., L. H. ., B. J. J. Lee CY, «Pharmacodynamics of a novel designer natriuretic peptide, CD-NP, in a first-in-human clinical trial in healthy subjects.,» *J Clin Pharmacol.* , vol. 49, n° %16, pp. 668-673, 2009.
- [119] L. H. B. J. J. Lee CY, «Designer natriurétique Peptides,» *J Investig Med.*, vol. 57, n° %11, pp. 18-21., 2009.
- [120] J. Neutel, W. Rolston, S. Maddock, S. Goldsmith, M. Koren, V. A. Bill, J. Burnett et H. D. Lieu, «Initial experience with subcutaneous infusion of Centeretide in patients with chronic heart failure.,» *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 59, n° %113, 2012.

- [121] E. A. B. U. S. S. P. A.-H. J. V. L. B. G. F. R. P. F. A. e. G. F. K. Sébastien Dutertre, «Venoms-Based Drug Discovery: Proteomic and Transcriptomic Approaches,» chez *Venoms to Drugs/ Venom as a Source for the Development of Human Therapeutique*, Cambridge, Royal Society of Chemistry / Glenn F. King, 2015, pp. 80-96.
- [122] I. Y. ., K. H. ., C. Y. ., K. T. ., S. S. Watanabe TX, «Smooth muscle relaxing and hypotensive activities of synthetic calciseptine and the homologous snake venom peptide FS2,» *Jpn J Pharmacol.* 1995 juillet; 68 (3): 305-13., vol. 68, n° %13, pp. 305-313, 1995.
- [123] O. R. ., O. K. ., K. A. ., K. M. ., W. T. ., K. H. ., K. K. .. Teramoto N, «Effects of calciseptine on unitary barium channel currents in guinea-pig portal vein.,» *Pflugers Arc*, vol. 432, n° %13, pp. 462-470, 1996.
- [124] R. M. Kini, «Molecular moulds with multiple missions : functional sites in tree-finger toxins.,» *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, vol. 29, n° %19, pp. 815-822, 2002.
- [125] R. M. Kini, «Proline brackets and identification of potential functional sites in proteins: Toxins to therapeutics.,» *Toxicon*, vol. 36, n° %111, pp. 1659-1670, 1998.
- [126] S. C. ., S. P. Das B, «Pretreatment with sarafotoxin 6c prior to coronary occlusion protects against infarction and arrhythmias via cardiomyocyte mitochondrial K(ATP) channel activation in the intact rabbit heart during ischemia/reperfusion.,» *Cardiovasc Drugs Ther.* , vol. 21, n° %14, pp. 243-251, 2007.
- [127] T. Sajevic, A. Leonardi et I. Križaj, «Haemostatically active proteins in snake venoms,» *Toxicon*, vol. 57, n° %15, pp. 6627-645, 2011.
- [128] C. J. ., C. K. .. Lu Q, «Snake venoms and hemostasis.,» *J Thromb Haemost.* , vol. 3, n° %18, pp. 1791-1799, 2005.
- [129] G. S. P, «Therapeutic alternatives from venoms and toxins.,» *Indian Journal of Pharmacology.*, vol. 39, n° %16, pp. 260-264, 2007.

- [130] J.-P. CHIPPAUX, «Les venins du diagnostic,» *LA RECHERCHE, L'actualité des sciences.*, n° %1408, p. 50, mai 2007.
- [131] A. M. Perchuc et M. Wilmer, «Diagnostic Use of Snake Venom Components in the Coagulation Laboratory,» chez *Toxins and Hemostasis*, 2010, pp. 747-766.
- [132] S. P. Gawade, «Therapeutic alternatives from venoms and toxins,» *Indian J Pharmacol*, vol. 39, n° %16, pp. 259-264, 2007.
- [133] K. J. Clemetson, «Snalec (Snake C-Type Lectins) that activate platelet,» *Toxin and hemostasis*, pp. 621-636, 2010.
- [134] S. Sarray, J. Luis, M. Elayeb et N. Marrakchi, «Snake venom C-type lectins and their receptor on platelets an cancerous cells,» *Archive de l'institut Pasteur de Tunis*, vol. 85, n° %1(1-4), pp. 69-80, 2008.
- [135] N. A. Marsh, «Procoagulant Proteins and Diagnostic Agents/ Diagnostic Uses of Snake Venom,» *Haemostasis*, vol. 31, pp. 211-221, 2001.
- [136] A. R. K., B. M. C. et W. L. C., «Snake venom probes of platelet adhesion receptors and their ligands.,» *Toxicon*, vol. 45, n° %18, pp. 1051-1061, 2000.
- [137] M. A. S. e. S. V. Sampaio, «Snake venom galactoside-binding lectins: a structural and functional overview,» *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*, vol. 21, n° %115, sept 2015.
- [138] D. B. Payel Bhattacharjee, «Therapeutic Use of Snake Venom Components: A Voyage from Ancient to Modern India,» *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, vol. 11, n° %11, pp. 45-54, 2014.
- [139] K. J. R. e. G. N. Segers, «Structural models of the snake venom factor V activators from *Daboia russelli* and *Daboia lebetina*.,» *Proteins*, vol. 64, n° %14, pp. 968-984, 2006.

- [140] G. a. F. Nicolaes et R. Jan, «Activation of factor V by venom proteases,» *Toxin reviews*, vol. 25, n° 13, pp. 217-234, 2008.
- [141] G.-R. J. ., Y. L. ., T. G. Rosing J, «Factor V activation and inactivation by venom proteases,» *Haemostasis* ., vol. 31, n° 13-6, pp. 241-246, 2001.
- [142] D. B. Payel Bhattacharjee, «Therapeutic Use of Snake Venom Components: A Voyage from Ancient to Modern India.,» *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, vol. 11, n° 11, pp. 45-54, 2014.
- [143] Cryopep, «PEFAKIT® PICT®,» Cryopep, [En ligne]. Available: <https://translate.google.fr/translate?hl=fr&sl=en&u=http://www.cryopep.com/product/pefakit-pict-2/&prev=search>. [Accès le 21 11 2016].
- [144] P. D. ., H. S. ., S. M. ., R. K. ., W. M. Calatzis A, «Prothrombinase-induced clotting time assay for determination of the anticoagulant effects of unfractionated and low-molecular-weight heparins, fondaparinux, and thrombin inhibitors.,» *Am J Clin Pathol.* , vol. 130, n° 13, pp. 44--454, 2008.
- [145] D. A. Hoppensteadt, J. Cunanan, J. M. Walenga et J. Fareed, «Development of Prothrombinase Induced Clotting Time (Pefakit, PiCT) Assay and it Validation in the Monitoring of Anti-Xa and Anti-FIIa Drugs.,» *Blood*, vol. 104, n° 11, p. 1858, 2005.
- [146] P. M. Wilmer, C. Stocker, B. Bühler, M. B. Conell et M. A. Calatzis, «A Novel Prothrombin-Based APC-R / Improved Distinction of Factor V Wild-Type and Factor V Leiden Using a Novel Prothrombin-Based Activated Protein C Resistance Assay.,» *Am J Pathol*, pp. 836-842, 2004.
- [147] a. d. Gmbh, «ACTICLOT Protein C Resistance,» [En ligne]. Available: [http://www.sekisuidiagnostics.com/writable/product\\_documents/files/CEADG840.pdf](http://www.sekisuidiagnostics.com/writable/product_documents/files/CEADG840.pdf). [Accès le 03 2017].

- [148] Pentapharm, «Facteur V de Pefakit® APC-R,» [En ligne]. Available: <https://translate.google.fr/translate?hl=fr&sl=en&u=http://www.pentapharm.com/content.cfm%3Fnav%3D28%26content%3D45&prev=search>. [Accès le 21 11 2016].
- [149] H. S. M. C. P.-F. ... S. W. Quehenberger P., «Evaluation of a highly specific functional test for the detection of factor V Leiden.,» *Int. J. Clin. Lab. Res.*, vol. 30, pp. 113-117, 2000.
- [150] G. Freyburger et S. Labrouche, «Facteur V Leiden (VL) et Résistance à la Protéine C activée (PCA), Facteur II Leiden (G20210 G>A), aspects physiopathologiques et stratégies diagnostiques.,» *SPECTRA BIOLOGIE*, n° %1162, pp. 60-74, 2007.
- [151] T. G et R. J., «Snake Venom Activators of Factor X: An Overview.,» *Haemostasis : Procoagulant Proteins and Diagnostic Agents.*, vol. 31, pp. 225-233, 2001.
- [152] R. J. Tans G, «Snake venom activators of factor X: an overview,» *Hémostase.* , vol. 31, n° %13-6, pp. 225-233, 2001.
- [153] S. Takeda, «Structural Aspects of the Factor X Activator RVV-X from Russell's Viper Venom,» *Toxins and Hemostasis*, pp. 465-484, 2010.
- [154] S. BNL, «RVV-factor X,» Stago BNL, [En ligne]. Available: [http://www.microsofttranslator.com/bv.aspx?ref=SERP&br=ro&mkt=fr-FR&dl=fr&lp=EN\\_FR&a=http%3a%2f%2fcatalog.stago-bnl.com%2fen%2fproduct%2fhemostasis%2fsnake\\_venoms\\_inhibitors%2f338%2frvv\\_factor\\_x](http://www.microsofttranslator.com/bv.aspx?ref=SERP&br=ro&mkt=fr-FR&dl=fr&lp=EN_FR&a=http%3a%2f%2fcatalog.stago-bnl.com%2fen%2fproduct%2fhemostasis%2fsnake_venoms_inhibitors%2f338%2frvv_factor_x). [Accès le 21 11 2016].
- [155] R. M. Hardisty et R. A. Hutton, «Platelet Aggregation and the Availability of Platelet Factor 3.,» *bjh*, vol. 12, n° %16, pp. 764-776, 1966.
- [156] [http://www.jle.com/fr/revues/hma/e-docs/diagnostic\\_des\\_anticoagulants\\_circulants\\_de\\_type\\_lupique\\_140501/article.php?tab=texte](http://www.jle.com/fr/revues/hma/e-docs/diagnostic_des_anticoagulants_circulants_de_type_lupique_140501/article.php?tab=texte), «Diagnostic des anticoagulants circulants de type lupique,» *John Libbey, (hématologie)*, vol. 2, n° %13, 1996.

- [157] «Anticoagulant lupique,» [En ligne]. Available: <http://www.labtestsonline.fr/tests/LupusAnticoagulant.html?mode=print>. [Accès le 01 04 2017].
- [158] H. /. S. é. d. a. professionnels, «Biologie des anomalies de l'hémostase, Tome VI : détection d'un anticoagulants de type lupique.,» 2011.
- [159] G. W. Moore, A. P. Culhane, J. C. Maloney et B. J. Hunt, «Taipan snake venom time coupled with ecarin time enhances lupus anticoagulant detection in nonanticoagulated patients,» *Blood Coagulation and Fibrinolysis* , vol. 27, n° %14, 2015.
- [160] Stago, «Syndrome des antiphospholipides – Comment le diagnostiquer ?,» [En ligne]. Available: <http://www.stago.fr/l-hemostase/tests-clinique/syndrome-des-antiphospholipides/comment-diagnostiquer-le-sapl/>.
- [161] «510(k) SUBSTANTIAL EQUIVALENCE DETERMINATION/DECISION SUMMARY /DECISION SUMMARY,» [En ligne]. Available: [https://www.accessdata.fda.gov/cdrh\\_docs/reviews/K061805.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/reviews/K061805.pdf). [Accès le 07 04 2017].
- [162] Stago, «Diagnostica Stago, Inc. Introduces STA® Staclot® DRVV Lupus Anticoagulant Assays,» [En ligne]. Available: <http://www.stago-us.com/products-services/product-service-news/detail/article/diagnostica-stago-inc-introduces-staR-staclotR-drvv-lupus-anticoagulant-assays/>. [Accès le 07 04 2017].
- [163] m. S. ., M. C. ., K. P. ., S. W. Quehenberger P, «The Factor V (Leiden) test: evaluation of an assay based on dilute Russell Viper Venom Time for the detection of the Factor V Leiden mutation.,» *Thrombosis Research*, vol. 96, n° %12, pp. 125-133, 1999.
- [164] T. J. I. J. B. R. Ivey LM, «Determination of activated protein C resistance in anticoagulated and lupus positive patients.,» *Blood Coagul Fibrinolysis.*, vol. 11, n° %15, pp. 439-445, 2000.

- [165] H. A. S. R. S. D. C. R. Solano C., «The use of two different APC resistance assay systems provides optimal sensitivity and specificity for diagnosing genetic APC resistance.,» *Blood Coagul. Fibrinolysis*, vol. 8, n° %15, pp. 268-273, 1997.
- [166] E. Oger, C. Leroyer, B. Mercier et D. Mottier, «Assessment of activated protein C resistance using a new and rapid venom-based test : STAT Staclot APC-R,» *Blood coagulation and fibrinolysis*, vol. 9, n° %14, pp. 355-359, 1998.
- [167] D. Herak, M. Milos et R. Zadro, «Improvement of STA : STACLOT APC-R Test for the Detection of Facteur V Leiden by Using APCR ration.,» *Thrombosis and Haemostasis*, vol. 3, n° %11, 2005.
- [168] T. G. Rosing J, «Structural and functional properties of snake venom prothrombin activators.,» *Toxicon*, vol. 30, n° %112, pp. 1515-1527, 1992.
- [169] R. V. S, S. Sanjay et M. K. R., «The catalytic subunit of pseutarin C, a group C prothrombin activator from the venom of Pseudonaja textilis, is structurally similar to mammalian blood coagulation factor Xa,» *Thrombosis and haemostasis* , vol. 92, n° %13, pp. 509-521, 2004.
- [170] Pentapharm, «Ecarin (Fiche technique),» [En ligne]. Available: [http://www.pentapharm.com/files/116-01\\_DSed\\_Ecarin\\_Ecarin-Assaybed.pdf](http://www.pentapharm.com/files/116-01_DSed_Ecarin_Ecarin-Assaybed.pdf).
- [171] Practical-Haemostasis.com, «Ecarin Clotting Time,» A Practical Guide to Laboratory Haemostasis, 09 01 2013. [En ligne]. Available: [http://www.microsofttranslator.com/bv.aspx?ref=SERP&br=ro&mkt=fr-FR&dl=fr&lp=EN\\_FR&a=http%3a%2f%2fpractical-haemostasis.com%2fMiscellaneous%2fMiscellaneous%2520Tests%2fecarin\\_ct.html](http://www.microsofttranslator.com/bv.aspx?ref=SERP&br=ro&mkt=fr-FR&dl=fr&lp=EN_FR&a=http%3a%2f%2fpractical-haemostasis.com%2fMiscellaneous%2fMiscellaneous%2520Tests%2fecarin_ct.html). [Accès le 20 11 2016].
- [172] J.-P. CHIPPAUX, Venins de serpent et envenimations, DUNKERQUE: DIFFUSION IRD, 2002, p. 288.
- [173] G. Nowak, «The ecarin clotting time, a universal method to quantify direct thrombin inhibitors.,» *Pathophysiol Haemost Thromb.*, vol. 33, n° %14, pp. 173-183, 2003.

- [174] E. d. M. S. G. A. F. W. M. H. A. M. D. L. J. C. T. L. J. Devignes, «Utilisation du temps de coagulation par l'écarine en sang total pour la surveillance d'un traitement anticoagulant par lépirudine (Refludan®) au cours de circulation extracorporelle dans un contexte de thrombopénie induite par l'héparine.,» *Ann Biol Clin*, vol. 63, n° %12, pp. 201-208, 2005.
- [175] I. G. M.-M. S. Kher, «Surveillance du traitement par les inhibiteurs directs de la thrombine : temps de céphaline avec activateur ou temps d'écarine.,» *John Libbey (Annales de biologie clinique)*, vol. 58, n° %15, pp. 275-279, 2000.
- [176] A. Angelillo-Scherrer, «Les anticoagulants oraux directs dans la pratique médicale: implications pour le laboratoire de l'hémostase.,» *pipette - Swiss laboratory Medicine*, n° %16, 2014.
- [177] O. A. ., N. G. ., B. E. Lange U, «Ecarin chromogenic assay: an innovative test for quantitative determination of direct thrombin inhibitors in plasma,» *Hamostaseologie.* , vol. 25, n° %13, pp. 293-300, 2005.
- [178] «Textarin: Ratio Ecarin,» Pratique-Haemostasis.com / Guide pratique de l'hémostase en laboratoire, 2013. [En ligne]. Available: [https://translate.google.com/translate?hl=fr&sl=en&u=http://www.practical-haemostasis.com/Thrombophilia%2520Tests/APS/t\\_e\\_ratio.html&prev=search](https://translate.google.com/translate?hl=fr&sl=en&u=http://www.practical-haemostasis.com/Thrombophilia%2520Tests/APS/t_e_ratio.html&prev=search).
- [179] D. A. Triplett, K. F. Stocker, G. A. Unger et L. k. Barna, «The Textarin/Ecarin Ratio: a confirmatory test for lupus anticoagulants,» *Thrombosis and haemostasis*, vol. 70, n° %16, pp. 925-931, 1993.
- [180] J. FRANCIS, «A new chromogenic assay for the specific determination of prothrombin,» *Journal of Clinical Pathology*, vol. 32, pp. 651-654, 19979.
- [181] V. Rao et R. Kini, «Pseutarin C, a prothrombin activator from Pseudonaja textilis venom: Its structural and functional similarity to mammalian coagulation factor Xa-Va complex.,» *Thrombosis and Haemostasis*, vol. 88, n° %14, pp. 611-619, 2002.

- [182] P. P. M. ., J. d. J. ., M. F. L. ., J. D. Stephen TH Earl, «Drug development from Australian elapid snake venoms and the Venomics pipeline of candidates for haemostasis: Textilinin-1 (Q8008), Haempatch (TM) (Q8009) and CoVase (TM) (V0801).», *Toxicon.*, vol. 59, n° %14, pp. 456-463, 2012.
- [183] UnitProt, «UnitProtKB-Q7SZN0 (FA5V\_PSETE) Venom prothrombin activator pseutarin-C non catalytic subunit.,» [En ligne].
- [184] Uniprot, «UniProtKB-Q56VR3 (FAXC\_PSETE) Venom prothrombine activator pseutarin-C catalytic subunit.,» 2017. [En ligne].
- [185] M. S. ., B. A. ., d. I. I. F. .. Warner RL, «Hemostatic properties of a venomous protein in rat organ trauma.,» *Exp Mol Pathol.* 2009 décembre; 87 (3): 204-11, vol. 87, n° %13, pp. 204-211, 2009.
- [186] K. R. ., M. N. C. ., P. M. A. ., U. R. Ashok K. Shenoy, «Effects of botropase on clotting factors in healthy human volunteers.,» *Perspect Clin Res.* , vol. 5, n° %12, pp. 71-74, 2014.
- [187] S. Fati, «Contribution à l'étude ethnotoxicologique d'un gecko communément appelé salamandre : le genre Hemidactylus. Légende mythe ou réalité ?,» *facult de Médecine, de –Portail malien d'information de santé*, 29/11/2005.
- [188] Doctissimo, «REPTILASE 1 UK/mL Solution injectable et pour application locale Boîte de 10 Ampoules de 1 mL,» Doctissimo, 22 09 2016. [En ligne]. Available: <http://www.doctissimo.fr/medicament-REPTILASE.htm>. [Accès le 10 11 2016].
- [189] «Fiche analyse : TEMPS DE REPTILASE,» Institut de biologie clinique, Université libre de bruxelles. [En ligne]. [Accès le 09 11 2016].
- [190] B. Boutière-Albanèse, «Temps de reptilase,» EM- consulte , Elsevier, 16 05 2007. [En ligne]. Available: [www.em-consulte.com/article/61209/resume/temps-de-reptilase](http://www.em-consulte.com/article/61209/resume/temps-de-reptilase). [Accès le 09 11 2016].

- [191] I. d. B. C. U. I. d. Bruxelles, «Fiche Analyse: Temps de Reptilase,» [En ligne]. Available: [http://www.ulb-ibc.be/Analyses/Liste\\_analyses/Tps\\_reptilase.html](http://www.ulb-ibc.be/Analyses/Liste_analyses/Tps_reptilase.html) .
- [192] M. ., H. R. T. M. Henrik K. Kjaergard, «Vivostat system autologous fibrin sealant: preliminary study in elective coronary bypass grafting,» *The Annals of Thoracic Surgery*, vol. 66, n° %12, p. 482–486, 1998.
- [193] A. Barna, E. Charpentier, B. Fahlgren, V. Looten et P. L. Guillevin, «Avis du CEDIT : Intérêt de l'hémostatique chirurgicale autologue Vivostat®,» *Assistance Publique Hopitaux de Paris*, n° %1 <http://alpha-recherche.aphp.fr/wp-content/blogs.dir/85/files/2015/01/Vivostat-avis-CEDIT.pdf>, Dec 2014.
- [194] A. Barna, E. Charpentier, B. Fahlgren, V. Looten et L. Guillevin, «Interet de l'hémostatique chirurgicale autologue Vivostat®,» *Assistance Hopitaux Publique de Paris*, Avis du CEDIT 2014. [En ligne]. Available: <https://recherche.aphp.fr/wp-content/blogs.dir/85/files/2015/01/Vivostat-avis-CEDIT.pdf>.
- [195] «Vivostat \_Colle de fibrine autologue,» CEDIT Assistance Hopitaux Publique de Paris, [En ligne]. Available: <http://cedit.aphp.fr/hospital-based-hta-levaluation-de-technologies-de-sante-a-lhopital/vivostat-colle-de-fibrine-autologue/>.
- [196] « Système Vivostat®,» Vivostat®, [En ligne]. Available: <http://www.microsofttranslator.com/bv.aspx?from=en&to=fr&a=http%3A%2F%2Fwww.vivostat.com%2Fproducts%2Fvivostat-fibrin-sealant%2Fproduct-characteristics>.
- [197] M. Williams, «Snake venom helps hydrogels stop the bleeding,» Rice University News & Media, 26 oct 2015. [En ligne]. Available: <https://translate.google.fr/translate?hl=fr&sl=en&u=http://news.rice.edu/2015/10/26/snake-venom-helps-hydrogels-stop-the-bleeding/&prev=search>.
- [198] T. S. ., M. E. ., S. R. ., K. S. ., V. J. ., G. M. .. Zulys VJ, «Ancrod (Arvin) as an alternative to heparin anticoagulation for cardiopulmonary bypass,» *Anesthesiology*, vol. 71, n° %16, pp. 870-877, 1989.

- [199] M. U.-W. ., G. R. ., D. B. ., G. F. ., E. J. H. Robin R. Kanagasabaya, «Cardiopulmonary bypass with danaparoid sodium and ancrod in heparin-induced thrombocytopenia,» *The Annals of Thoracic Surgery*, vol. 66, n° %12, p. 567–569, 1998.
- [200] A. R. ., C. T. ., L. K. ., N. K. ., F. N. ., H. C. ., L. D. .. Sherman DG, «Intravenous ancrod for treatment of acute ischemic stroke: the STAT study: a randomized controlled trial. Stroke Treatment with Ancrod Trial.,» *JAMA*, vol. 283, n° %118, pp. 2395-2403, 2000.
- [201] M. D. ., W. G. ., L. D. .. Samsa GP, «Cost-effectiveness of ancrod treatment of acute ischaemic stroke: results from the Stroke Treatment with Ancrod Trial (STAT).,» *J Eval Clin Pract.* , vol. 8, n° %11, pp. 61-70, 2002.
- [202] K. R. ., B. J. ., L. G. ., V. M. ., O. J. Hennerici MG et L. e. d'ESTAT, «Intravenous ancrod for acute ischaemic stroke in the European Stroke Treatment with Ancrod Trial: a randomised controlled trial.,» *Lancette*, vol. 368, n° %19550, pp. 1871-1878, 2006.
- [203] K. C. S. S. S. E. B. S. R. K. K. H. P. G. T. I. P. H. Markland FS, «Kallikrein-like activity of crotalase, a snake venom enzyme that clots fibrinogen.,» *Proc Natl Acad Sci U S A.* , vol. 79, n° %16, pp. 1688-1692, 1982.
- [204] T. I. ., E. B. ., P. H. Henschen-Edman AH, «Crotalase, a fibrinogen-clotting snake venom enzyme: primary structure and evidence for a fibrinogen recognition exosite different from thrombin,» *Thromb Haemost.*, vol. 81, n° %11, pp. 81-86, 1999.
- [205] K. E. ., B. T. ., S. K. Niewiarowski S, «Thrombocytin, a serine protease from *Bothrops atrox* venom. 2. Interaction with platelets and plasma-clotting factors.,» *Biochimie.* , vol. 18, n° %116, pp. 3570-3577, 1979 .
- [206] N. S. ., S. K. ., K. C. ., S. E. ., B. T. .. Kirby EP, «Thrombocytin, a serine protease from *Bothrops atrox* venom.1. Purification and characterization of the enzyme.,» *Biochimie.* , vol. 18, n° %116, pp. 3564-3570., 1979.

- [207] P. Kubisz, A. Arabi, F. Seghier et S. Cronberg, «Investigations on the effect of thrombocytin on platelets,» *Thrombosis Research*, vol. 33, n° 12, pp. 225-227, 1984.
- [208] G. E. B. H et S. K., «Endothelium-dependent relaxant effect of thrombocytin, a serine proteinase from Bothrops atrox snake venom, on isolated pig coronary arteries.,» *Toxicon*, vol. 29, n° 16, pp. 725-732, 1991.
- [209] B. LC, S. AM, C. FL, R. VM, F. AL, G. JR, G. M, T.-S. IA, B. SRCS, B. B et F. j. RS, «Biochemical and biological evaluation of gyroxin isolated from Crotalus durissus terrificus venom,» *Journal of Venomous Animals et les toxines , y compris les maladies tropicales*, vol. 17, n° 11, 2011.
- [210] O. K. ., C. M. .. Alves da Silva JA, «Gyroxin increases blood-brain barrier permeability to Evans blue dye in mice.,» *Toxicon*, vol. 57, n° 11, pp. 162-167, 2011.
- [211] S. P. ., C. M. ., d. L. V. da Silva JA, «Gyroxin and its biological activity: effects on CNS basement membranes and endothelium and protease-activated receptors.,» *Curr Med Chem*, vol. 19, n° 12, pp. 281-291, 2012.
- [212] K. M. ., N. M. ., G. I. ., O. D. ., A. D. ., d. S. J. ., P. d. S. A. ., Y. T. ., J. M. J. L. ., L. A. ., H. M. ., L.-L. M. Yonamine CM, «Enzyme specificity and effects of gyroxin, a serine protease from the venom of the South American rattlesnake Crotalus durissus terrificus, on protease-activated receptors,» *Toxicon. 2014 mars; 79: 64-71.*, vol. 79, pp. 64-71, 2014.
- [213] H. T. Chang MC, «Characterization of a thrombin-like enzyme, graminin, from the venom of Trimeresurus gramineus and its in vivo antithrombotic effect.,» *Toxicon.* , vol. 33, n° 18, pp. 1087-1098, 1995.
- [214] E.-K. I. Millers, M. Trabi, P. P. Masci, M. F. Lavin, J. d. Jersey et L. W. Guddat, «Crystal Structure of Textilinin-1, a Kunitz-Type Serine Protease Inhibitor From the Venom of the Australian Common Brown Snake (Pseudonaja Textilis),» *FEBS J* , vol. 276, n° 111, pp. 3163-3175, 2009.

- [215] S. Flight, L. A. Johnson, M. Trabi et L. P. Masci, «Comparison of Textilinin-1 with Aprotinin as Serine Protease Inhibitors and as Antifibrinolytic Agents,» *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis* 34(4-5):188-93, vol. 34, n° %13-5, pp. 188-193, 2005.
- [216] S. M. Vol, L. A. Johnson, Q. S. Du, R. L. Warner, M. Trabi, P. J. Gaffney, M. F. Lavin, J. D. Jersey et P. P. Masci, «Textilinin-1, an alternative anti-bleeding agent to aprotinin: Importance of plasmin inhibition in controlling blood loss.,» *British Journal of Haematology*, vol. 145, n° %12, pp. 207-211, 2009.
- [217] X. Z. e. al, «Recombinant textilinin-1 with plasmin inhibition activity, and preparation method and application thereof». Chine Brevet CN102850451 B, 7 mai 2014.
- [218] F. M. A. M. F. F. M. R. Zingali RB, «Bothrojaracin, a Bothrops jararaca snake venom derived (Pro) Thrombin inhibitor, as an antithroboic molecule.,» *Pathophysiol Haemost Thromb* 2005;34:160-3., vol. 34, pp. 160-163, 2005.
- [219] Z. R.B, M. Jandrot-Perrus, G. M.C et C. BON, «Bothrojaracin, a new thrombin inhibitor isolated from Bothrops jararaca venom : caracterization and mecanism of thrombin inhibiton,» *Biochimie*, vol. 40, n° %132, pp. 10794-10802, 1993.
- [220] R. J. ., W. A. ., J. G. ., B. C. ., Z. R. Monteiro RQ, «Allosteric changes of thrombin catalytic site induced by interaction of bothrojaracin with anion-binding exosites I and II.,» *Biochem Biophys Res Commun* , vol. 262, n° %13, pp. 819-822, 1999.
- [221] A. Veronique et J. P. Martine, «LA BOTHROJARACINE : CLONAGE, SEQUENCAGE, EXPRESSION ET ETUDES FONCTIONNELLES = BOTHROJARACIN : MOLECULAR CLONING, SEQUENCING, EXPRESSION, AND FUNCTIONAL STUDIES,» *Travaux Universitaires - Thèse nouveau doctorat*, 1997.
- [222] «A better way to prevent blood clots? A drug derived from cobra venom offers an alternative to warfarin, although liver problems temper its benefits.,» *Harv Coeur Lett. 2005 Mai; 15 (9): 3*, vol. 15, n° %19, p. 3, 2005.

- [223] F. Markland, «Fibrolase, an Active Thrombolytic Enzyme in Arterial and Venous Thrombosis Model Systems,» *Regardez à l' intérieur Obtenez l' accès*, vol. 391, pp. 427-438, 1996.
- [224] C. Toombs, «Alfimeprase: Pharmacology of a Novel Fibrinolytic Metalloproteinase for Thrombolysis,» *Haemostasis (fibrinolysis)*, vol. 31, pp. 141-147, 2001.
- [225] A. D. R. G. N. H. ., F. S. M. J. Alex L. Guan, «Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme from venom of the southern copperhead snake (*Agkistrodon contortrix contortrix*),» *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 289, n° 11, pp. 197-207, 1991.
- [226] S. S. Markland FS, «Fibrolase: trials and tribulations.,» *Toxins (Basel).*, vol. 2, n° 14, pp. 793-808, 2010.
- [227] S. B. ., S. C. ., V. V. D. ., M. J. ., M. M. .. Pretzer D, «Fibrolase. A fibrinolytic protein from snake venom,» *Pharm Biotechnol.*, vol. 5, pp. 287-314, 1993.
- [228] F. G. ., P. S. ., L. B. .. Markland FS, «Thrombolytic effects of recombinant fibrolase or APSAC in a canine model of carotid artery thrombosis.,» *Circulation.* , vol. 90, n° 15, p. 2448\_2456, 1994.
- [229] H. L. ., M. B. M. Thomas C. Boone, «Methods for the treatment of thrombosis». Etats-Unis Brevet US7195903 B2, 27 03 2007.
- [230] «Alfimeprase,» *Drugs R D.*, vol. 9, n° 13, pp. 185-190, 2008.
- [231] M. S. ., B. P. ., B. D. Maity G, «Thermal detoxification of the venom from *Daboia russelli russelli* of Eastern India with restoration of fibrinolytic activity.,» *Toxicon*, vol. 57, n° 15, pp. 747-754, 2011.
- [232] «Russell's Viper Venom & Blood Clots,» Herpetological natural history with an emphasis on snakes, 27 03 2011. [En ligne]. Available: <http://translate.google.fr/translate?hl=fr&sl=en&u=http://squamates.blogspot.com/>

2011/03/russells-viper-venom-blood-clots.html&prev=search. [Accès le 20 11 2016].

- [233] D. P. Gomes A, «Hannahpep: A novel fibrinolytic peptide from the Indian King Cobra (*Ophiophagus hannah*) venom.,» *Biochem Biophys Res Commun* , vol. 266, n° 12, pp. 488-491, 1999.
- [234] W. A. ., M. R. ., C. V. ., X. Y. ., B. C. .. Zhang Y, «*Trimeresurus stejnegeri* snake venom plasminogen activator. Site -directed mutagenesis and molecular modeling.,» *J Biol Chem.*, vol. 272, n° 133, pp. 20531-20537, 1997.
- [235] U. J. R. H. A. W. C. B. W. B. Marina AA Parry, «The crystal structure of the novel snake venom plasminogen activator TSV-PA: a prototype structure for snake venom serine proteinases.,» *Structure.*, vol. 6, n° 19, pp. 1195-1206, 1998.
- [236] S. S. Y. S. U. K. J. H. H. E. J. S. H. S. C. J S Kim, «Treatment of Acute Cerebral Infarction With Arginine Esterase: A Controlled Study With Heparin.,» *Cerebrovascular diseases*, vol. 11, n° 13, pp. 251-256, 2001.
- [237] S. P. G. B. M. A. M. D. B. P. K. V. C. D. Girolami A, «A novel dysfunctional protein C (Protein C Padua 2) associated with a thrombotic tendency : substitution of Cys for Arg-1 results in a strongly reduced affinity for binding Ca<sup>++</sup>.,» *bjh*, vol. 85, n° 13, pp. 521-527, 1993.
- [238] B. N. V. W. D. W. L. H. Lee T.K., «Activation of recombinant human protein C.,» *Thromb. Res.*, vol. 82, n° 13, pp. 225-234, 1996.
- [239] E. V. H. H. D. L. A. M. Robert A, «Anticoagulant response to *Agkistrodon contortrix* venom (AGVtest): a new global test to screen for defects in the anticoagulant protein G pathway.,» *Thromb. Haemost* , vol. 75, n° 14, pp. 562-566, 1996.
- [240] T. P., H. W.M., H. G., S. Y., R. B., O. M., V. d. E. C. et W. C., «Screening for abnormalities of the protein C anticoagulant pathway using the ProC Global assay. Results of a European multicenter evalua.,» *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, vol. 11, n° 15, pp. 447-454, 2000.

- [241] V. T. G. P. K. Heilmann L., «ProC Global assay in the evaluation of women with history of severe preeclampsia or HELLP syndrome.,» *Clin. Appl. Thromb. Hemost.*, vol. 8, n° % 14, pp. 319-324, 2002.
- [242] T. Y. Y. A. D. J. M. D. Girma JP, «Ristocetin and botrocetin involve two distinct domains of von Willebrand factor for binding to platelet membrane glycoprotein Ib.,» *Thromb Haemost.* , vol. 64, n° %12, pp. 326-332, 1990.
- [243] K. D. F. ., P. A. M. ., J. S. W. ., J. P. S. ., R. R. M. Veronica H. Flood, «Limitations of the Ristocetin Cofactor Assay in Measurement of VWF Function.,» *J Thromb Haemost.* , vol. 7, n° %111, 2009.
- [244] D. Dormann, J. M. Clemetson, A. Navdaev, B. E. Kehrel et K. J. Clemetson, «Alboaggregin A activates platelets by mechanism involving glycoprotein VI as well as glycoprotein Ib.,» *Blood*, vol. 97, n° % 14, pp. 929-936, 2001.
- [245] Y. Usami, M. Suzuki, E. Yoshida et K. Titani, «Primary structure of Alboaggregin-B purified from the venom of *Trimeresurus albolabris*.,» *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 219, n° %13, pp. 727-733, 1996.
- [246] M. Peng, W. Lu et K. E. P., «Alboaggregin-B : a new platelet agonist that binds to platelet membrane glycoprotein Ib.,» *Biochemistry*, vol. 30, n° % 149, pp. 11529-11536, 1991.
- [247] E. Yoshida, Y. Fujimura, S. Miura, M. Sugimoto, H. Fukui, N. Narita, Y. Usami, M. Suzuki et K. Titani, «Alboaggregin-B and botrocetin, two snake venom proteins with highly homologous amino acid sequences but totally distinct functions on Von Willebrand factor binding to platelets.,» *Biochemical and biophysical research communication*, vol. 191, n° %13, pp. 1386-1392, 1993.
- [248] Y. E., F. Y., I. Y., T. ., Y. Y., N. K., M. K., O. M., K. T. et K. M., «Impaired high-shear-stress-induced platelet aggregation in patients with chronic renal failure undergoing dialysis,» *Bjh*, vol. 89, n° %14, pp. 861-867, 1995.

- [249] CRYOPEP, «Venom protéase,» [En ligne]. Available: [http://www.cryopep.com/wp-content/themes/cryopep/images/familles\\_pdf\\_routine/recherche\\_VENOM\\_PROTEASES.pdf](http://www.cryopep.com/wp-content/themes/cryopep/images/familles_pdf_routine/recherche_VENOM_PROTEASES.pdf).
- [250]
- [251] C. H. ., H. T. .. Swaim MW, «Characterisation of platelet aggregation induced by PC-3 human prostate adenocarcinoma cells and inhibited by venom peptides, trigramin and rhodostomin.,» *Eur J Cancer.* , vol. 32a, n° %14, pp. 715-721, 1996.
- [252] F. NAVARRO, *Thèse: Les toxines d'origine animale possédant des propriétés analgésiques : mode d'action et application médicale humaine.*, LYON: École national vétérinaire d'Alford, 2012.
- [253] L. A. Calderon, J. C. Sobrinho, K. D. Zaqueo, A. A. d. Moura, A. N. Grabner, M. V. Mazzi, S. Marcussi, A. Nomizo, C. F. C. Fernandes, J. P. Zuliani, B. M. A. Carvalho, S. L. d. Silva, R. G. Stábeli et A. M. Soares, «Antitumoral Activity of Snake Venom Proteins: New Trends in Cancer Therapy.,» *Biomed Res Int* , 2014.
- [254] K. B. ., H. B. ., U. P. Vivek Kumar Vyas, «Therapeutic potential of snake venom in cancer therapy: current perspectives,» *Asian Pac J Trop Biomed.* 2013 février; 3 (2): 156-162., vol. 3, n° %12, pp. 156-162, 2013.
- [255] V. K. L. Shanbhag, «Applications of snake venoms in treatment of cancer,» *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, vol. 5, n° %14, pp. 275-276, 2015.
- [256] V. H. ., Z. A. ., S. F. ., N. M. Ebrahim K, «Anticancer Activity a of Caspian Cobra ( Naja naja oxiana ) snake Venom in Human Cancer Cell Lines Via Induction of Apoptosis,» *Iran J Pharm Res.*, vol. 15, pp. 101-112, 2016.
- [257] K. S. Jain D, «Snake venom: a potent anticancer agent,» *Asian Pac J Cancer Préc.* , vol. 13, n° %110, pp. 4855-4860., 2012 .

- [258] F. J. ., d. S. C. M. Arruda Macêdo JK, «Disintegrins from snake venoms and their applications in cancer research and therapy.,» *Curr Protéine Pept Sci.* , vol. 16, n° %16, pp. 532-548, 2015.
- [259] E. P. ., ñ. C. D. ., I. L. ., R. K.-Z. ., O. K.-Z. ., A. E. B. ., D. B. ., M. E. A. ., N. M. ., J. L. Amine Bazaa, «MVL-PLA2, a Snake Venom Phospholipase A2, Inhibits Angiogenesis through an Increase in Microtubule Dynamics and Disorganization of Focal Adhesions.,» *PLoS One* ., vol. 5, n° %14, 2010.
- [260] C. L. P. ., C. F. M. ., A. C. B. M. Heloisa S. Selistre-de-Araujo, «Snake Venom Disintegrins and Cell Migration,» *Toxines*, vol. 2, n° %111, pp. 2606-2621, 2010.
- [261] J. S. ., C. T. TF Huang, «A potent antiplatelet peptide, triflavin, from *Trimeresurus flavoviridis* snake venom.,» *Biochem J.* , vol. 277, n° %12, pp. 351-357, 1991.
- [262] J. R. Sheu et T. F. Huang, «Triflavin, an Arg-Gly-Asp-containing peptide, inhibits B16-F10 mouse melanoma cell adhesion to matrix proteins via direct binding to tumor cells,» *Journal of Biomedical Science*, vol. 3, n° %15, pp. 359-364, 1996.
- [263] L. C. ., C. J. ., T. C. ., H. T. Sheu JR, «Triflavin, an Arg-Gly-Asp-containing antiplatelet peptide inhibits cell-substratum adhesion and melanoma cell-induced lung colonization.,» *Jpn J Cancer Res.*, vol. 83, n° %18, pp. 885-893, 1992.
- [264] C. F. E. W. F. G. M. F. Swenson S, «Contortrostatin, a Snake Venom Disintegrin with Anti-Angiogenic and Anti-Tumor Activity.,» *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*, vol. 34, n° %14-5, pp. 169-176, 2005.
- [265] S. S, M. FS et C. TC, «Anti-invasive effect of contortrostatin, a snake venom disintegrin, and TNF- $\alpha$  on malignant glioma cells,» *Anticancer research*, vol. 20, n° %16B, pp. 4227-4233, 2000.
- [266] C. F. M. R. S. R. E. W. F. G. Y. D. M. F. J. Swenson S, «Intravenous liposomal delivery of the snake venom disintegrin contortrostatin limits breast cancer progression.,» *Molecular Cancer Therapeutics.*, vol. 3, n° %14, pp. 499-511, 2004.

- [267] S. R. P. C. R. V. G. S. T.-W. D. M. F. Zhou Q, «Contortrostatin, a dimeric disintegrin from *Agkistrodon contortrix contortrix*, inhibits breast cancer progression.,» *Breast Cancer Res Treat.*, vol. 61, n° %13, pp. 249-60., 2000.
- [268] F. C. ., R. M. ., R. P. S. ., W. E. ., G. F. ., D. Y. e. F. S. M. J. Stephen Swenson, «Intravenous liposomal delivery of the snake venom disintegrin contortrostatin limits breast cancer progression,» *Molecular Cancer Therapeutics*, vol. 3, n° %14, pp. 499-511, 2004.
- [269] S. K. Z. Q. G. V. S. R. R. V. S. R. Markland FS, «A novel snake venom disintegrin that inhibits human ovarian cancer dissemination and angiogenesis in an orthotopic nude mouse model.,» *Haemostasis*, vol. 31, n° %13-6, pp. 183-91, 2001.
- [270] H. C. R. B. B. K. S. S. M. F. J. Minea R, «Development of a chimeric recombinant disintegrin as a cost-effective anti-cancer agent with promising translational potential.,» *Toxicon* ., vol. 59, n° %14, pp. 472-486, 2012.
- [271] S. S. C. F. C. T. M. F. Minea R, «Development of a Novel Recombinant Disintegrin, Contortrostatin, as an Effective Anti-Tumor and Anti-Angiogenic Agent,» *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis* , vol. 34, n° %14-5, pp. 177-183, 2005.
- [272] A. E. ., P. R. ., W. A. ., M. M. Hailey S, «Effect of the disintegrin eristostatin on melanoma-natural killer cell interactions.,» *Toxicon*, vol. 61, pp. 83-93, 2013.
- [273] X. Z. C. P.-S. a. M. M. Jing Tian, «Eristostatin, an RGD-containing disintegrin, inhibits melanoma cell migration,» *Proc Amer Assoc Cancer Res*, vol. 47, 2006.
- [274] K. S. ., H. K. ., S. Y. ., C. S. ., B. K. ., J. Y. ., K. D. ., K. I. .. Chung KH, «Inhibitory effect of salmosin, a Korean snake venom-derived disintegrin, on the integrin alphav-mediated proliferation of SK-Mel-2 human melanoma cells.,» *J Pharm Pharmacol*, vol. 55, n° %111, pp. 1577-1582, 2003.
- [275] C. K. H. ., K. I.-C. KIM DOO-SIK, «Anti-tumor agent comprising salmosin as an active ingredient». Brevet US-6537551-B2, 28 mars 2003.

- [276] K. S. K. ., H. S. K. ., D. S. K. ., Y. J. ., K. H. C. ., Y. S. P. Soo In Kim, «Inhibitory effect of the salmosin gene transferred by cationic liposomes on the progression of B16BL6 tumors.,» *Cancer Research*, vol. 63, n° %119, 2003.
- [277] P. H. ., Y. R. ., H. T. .. Yeh CH, «Rhodostomin, a snake venom disintegrin, inhibits angiogenesis elicited by basic fibroblast growth factor and suppresses tumor growth by a selective alpha(v)beta(3) blockade of endothelial cells.,» *Mol Pharmacol.* , vol. 59, n° %15, pp. 1333-1342, 2001.
- [278] C. H. ., T. C. ., Y. C. ., H. T. .. Yang RS, «Rhodostomin inhibits thrombin-enhanced adhesion of ROS 17/2.8 cells through the blockade of alphavbeta3 integrin.,» *Toxicon*, vol. 46, n° %14, pp. 387-393, 2005.
- [279] C. J. ., M. D. ., R. I. Klein A, «Gene expression in SK-Mel-28 human melanoma cells treated with the snake venom jararhagin.,» *Toxicon*, vol. 57, n° %11, pp. 1-8, 2011.
- [280] d. S. M. ., C. J. M. ., R. I. .. Maria DA, «Antiproliferative effect of the jararhagin toxin on B16F10 murine melanoma.,» *BMC Complement Altern Med.* , vol. 14, p. 446, 2014.
- [281] F. A. R. ., R. A. C. ., T. R. F. ., R. F. C. ., M. C. G. ., E. S. N. ., L. C. C. ., M. T. C. ., A. E. V. Mary A Aranda-Souza, «A lectin from Bothrops leucurus snake venom raises cytosolic calcium levels and promotes B16-F10 melanoma necrotic cell death via mitochondrial permeability transition.,» *Toxicon* , vol. 82, pp. 97-103, 2014.
- [282] P. N. ., K. O. ., C. L. ., S. V. ., S. M. ., L. S. ., P. J. ., S. E. .. Khunsap S, «Purification of a phospholipase A(2) from Daboia russelii siamensis venom with anticancer effects.,» *J Venom Res. 2011; 2: 42-51*, vol. 2, pp. 42-51, 2011.
- [283] I. L. ., d. O. R. J. ., S. S. ., S. A. ., R. V. .. Rodrigues RS, «Snake venom phospholipases A2: a new class of antitumor agents.,» *Protein Pept Lett.* , vol. 16, n° %18, pp. 894-898, 2009.

- [284] a. c. O. K. , S. B. , S. S. , S. P. , S. B. Suchitra Khunsap, «Anticancer properties of phospholipase A 2 from Daboia siamensis venom on human skin melanoma cells.,» *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* , vol. 22, p. 7, 2016.
- [285] A. V. Osipov et Y. N. Utkin, «Antiproliferative Effects of Snake Venom Phospholipases A 2 and Their Perspectives for Cancer Treatment.,» *Toxins and Drug Discovery*, p. Toxins and Drug Discovery, 2015.
- [286] J. J. , T. S. , S.-A. N. , M. M. , K.-Z. O. , B. S. , M. J. , E. A. M. , M. N. , L. J. Kessentini-Zouari R, «CC-PLA2-1 and CC-PLA2-2, two Cerastes cerastes venom-derived phospholipases A2, inhibit angiogenesis both in vitro and in vivo.,» *Lab Invest.* , vol. 90, n° % 14, pp. 510-519, 2010.
- [287] L. J. , S.-A. N. , K.-Z. O. , K.-Z. R. , D. C. , L. J. , E. A. M. , M. N. Bazaa A, «MVL-PLA2, a phospholipase A2 from Macrovipera lebetina transmediterranea venom, inhibits tumor cells adhesion and migration.,» *Matrix Biol.*, vol. 28, n° % 14, pp. 188-193, 2009.
- [288] M. F. Jr, «Antitumor action of crotalase, a defibrinogenating snake venom enzyme.,» *Semin Thromb Hemost.*, vol. 12, n° % 14, pp. 284-290, 1986.
- [289] D. F. , B. B. RJ DA SILVA, «ANTITUMOR EFFECT OF SNAKE VENOMS.,» *J. Venom. Anim. Toxines*, vol. 2, n° % 12, 1996.
- [290] A. , P. , Z. , M. J. Chmielewska, «Effect of defibrination with batroxobin on growth and metastasis of JW sarcoma in mice.,» *European Journal of Cancer (1965)*, vol. 16, n° % 17, pp. 919-923, 1980.
- [291] A. N. K. M. K. S. T. N. P. D. Sanjesh Kumar, «A NOVEL BIOCHEMICAL AND PHARMACOLOGICAL AGENT: L-AMINO ACID OXIDASE WITH CORRELATION TO CANCER MANAGEMENT: AN OVERVIEW.,» *IOSR Journal Of Pharmacy*, vol. 4, n° % 110, pp. 33-38, 2014.

- [292] L. B. ., K. Y. Ahn MY, «Characterization and cytotoxicity of L-amino acid oxidase from the venom of king cobra (*Ophiophagus hannah*)» *Int J Biochem Cell Biol.* , vol. 29, n° %16, pp. 911-919, 1997.
- [293] S. MA, P. PB, F.-D. CL, L. antonelli et S. RG, «*Crotalus durissus terrificus* venom as a source of antitumoral agents» *J. Venom. Anim. Toxines incl. Trop. Dis vol.16 no.3* , vol. 16, n° %13, 2010.
- [294] L. A. C. ., P. G. J. H. ., M. C. M. C. Juan Carlos Vidal, «Use of compositions based on crotoxin, for the manufacture of a medicament for the treatment of carcinomas». (Brésil) Brevet EP0246861 A2, 25 10 1987.
- [295] H. L. ., Z.-h. Q. e. C.-y. L. Rong Han, «Crotoxin induces apoptosis and autophagy in human lung carcinoma cells in vitro via activation of the p38MAPK signaling pathway» *Acta Pharmacologica Sinica* , vol. 35, pp. 1323-1332, 2014.
- [296] B. D. ., B. C. ., C. M. ., C. R. ., L. L. ., M. C. ., S. J. ., S. J. ., T. E. ., R. A. ., V. J. .. Cura JE, «Phase I and pharmacokinetics study of crotoxin (cytotoxic PLA(2), NSC-624244) in patients with advanced cancer.» *Clin Cancer Res.*, vol. 8, n° %14, pp. 1033-1044, 2002.
- [297] K. I. ., R.-B. G. ., O. E. ., V.-M. A. ., P. L. ., Y. T. Kerkis A, «Crotamine is a novel cell-penetrating protein from the venom of rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*» *FASEB J.*, vol. 18, n° %112, pp. 1407-1409 , 2004.
- [298] I. K. ., A. K. ., G. R. B. ., M. A. F. H. ., K. K. ., S. A. R. B. D. ., L. D. V. P. ., O. E. B. D. Tetsuo Yamane, «Use of Crotamine and Composition». Sao Paulo Brevet EP 1866332 B1, 17 09 2014.
- [299] d. I. T. B. ., A. D. Rádis-Baptista G, «Insights into the uptake mechanism of NrTP, a cell-penetrating peptide preferentially targeting the nucleolus of tumour cells.» *Chem Biol Drug Des.*, vol. 79, n° %16, pp. 907-915, 2012.
- [300] P. L. D.-S.-J. J. ., A. K. F. ., R. A. A. ., D. A. C. ., I. K. S. Nicole Caroline Mambelli, «Abstract A50: Crotamine derived fusion short-peptides and their effect on

melanoma and breast cancer cells cultured in vitro,» *Drug Sensitivity and Resistance: Improving Cancer Therapy*, vol. 21, n° 14, 2015.

- [301] S. Innovation, «Spotlight Innovation,» 2015. [En ligne]. Available: <https://translate.google.fr/translate?hl=fr&sl=en&u=http://www.spotlightinnovation.com/press-releases/spotlight-innovation-subsiary-celtic-biotech-retains-exclusive-license-for-use-of-crotamine-as-cancer-imaging-gene-therapy-technology-from-instituto-bu>. [Accès le 12 12 2017].
- [302] B. d. D. Payel Bhattacharjee, «Factor V Activator from *Daboia russelli russelli* Venom Destabilizes  $\beta$ -Amyloid Aggregate, the Hallmark of Alzheimer Disease,» *J Biol Chem* ., vol. 288, n° 142, pp. 30559-30570, 2013.
- [303] N. W. R. O. K. B. L. N. L. S. A. J. S. W. C. H. P. J. C. D. H. P. D. M. K. H. C. P. J. C. W. S. K. A. Ian Smith, «N-terminal domain of *Bothrops asper* Myotoxin II Enhances the Activity of Endothelin Converting Enzyme-1 and Nephilysin.,» *Scientific Reports*, vol. 6, n° 122413, 02 03 2016.
- [304] N. R. O. K. D. H. S. J. W. ., A. I. S. Sanjaya Kuruppu, «N-terminal domain of *Bothrops asper* Myotoxin II Enhances the Activity of Endothelin Converting Enzyme and Nephilysin,» *The FASEB Journal*, vol. 30, n° 11, 2016.
- [305] A. HARVEY et B. ROBERTSON, «Dendrotoxins: Structure-Activity Relationships and Effects on Potassium Ion Channels,» *Current medicinal Chemistry*., vol. 11, n° 123, pp. 3065-3072, 2004.
- [306] X. Z. M. Z. C. D. D. C. S. F. N. R. S. N. D. B. J. S. a. R. M. K. Amrita Roy, «Structural and Functional Characterization of a Novel Homodimeric Three-finger Neurotoxin from the Venom of *Ophiophagus hannah* (King Cobra),» *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, n° 111, pp. 8302- 8315, 2010.
- [307] M. J. Kostiza T, «Nerve growth factors from snake venoms: chemical properties, mode of action and biological significance.,» *Toxicon*., vol. 34, n° 17, pp. 787-806, 1996.

- [308] R. PF, «Alpha-cobratoxin as a possible therapy for multiple sclerosis: a review of the literature leading to its development for this application.,» *Crit Rev Immunol.* , vol. 27, n° %14, pp. 291-302, 2007.
- [309] R. P. ., R. L. ., D. T. Mohamed A, «Amelioration of acute and relapsing stages of the experimental allergic encephalomyelitis by cobra toxins,» *Biomed Sci Instrum.*, vol. 42, pp. 399-404, 2006.
- [310] Y. L. ., B. Z. ., D. F. ., J. B. ., J. J. ., H. W. ., A. B. ., D.-M. Y. ., W.-C. X. ., L. M. Chengyong Shen, «Antibodies against low-density lipoprotein receptor-related protein 4 induce myasthenia gravis,» *J Clin Invest.* , vol. 123, n° %112, pp. 5190-5202, 2013.
- [311] C. NS, «Contribution of a snake venom toxin to myasthenia gravis: the discovery of alpha-bungarotoxin in Taiwan.,» *J Hist Neurosci.*, vol. 14, n° %12, pp. 138-148, 2005.
- [312] N. CERDAN, «Prédominance des fibres musculaires lentes chez le chien CNM : Analyse en situation de régénération provoquée,» *Thèse*, pp. 27-32, 2003.
- [313] R. Yiou, «Traitement de l'incontinence urinaire par injection des cellules précurseurs musculaires : analyse des résultats préliminaires,» *John Libbey (Eurotext)*, vol. 15, n° %13, 2009.
- [314] S. A. Lefaucheur JP, «The cellular events of injured muscle regeneration depend on the nature of the injury.,» *Neuromuscul Disord*, vol. 5, n° %16, pp. 501- 509, 1995.
- [315] R.-F. S. ., T. R.-e.-S. ., P. R.-M. ., C. D.-B. ., S. E. ., B.-O. C. ., R.-S. L. Hernandez-Oliveira et Silva S, «Beneficial effect of crostamine in the treatment of myasthenic rats.,» *Muscle Nerve.*, vol. 47, n° %14, pp. 591-593, 2013.
- [316] a. A. L. Galanopoulo, «Un venin de serpent pour traiter l'épilepsie et la schizophrénie ?,» 10 02 2015. [En ligne]. Available: [http://www.allodocteurs.fr/se-soigner/recherche/un-venin-de-serpent-pour-traiter-lepilepsie-et-la-schizophrénie\\_15538.html](http://www.allodocteurs.fr/se-soigner/recherche/un-venin-de-serpent-pour-traiter-lepilepsie-et-la-schizophrénie_15538.html).

- [317] P. S. Gawade SP, «Pharmaco-photodynamics of photo-oxidised Russell's Viper venom product generated using UV radiation in the presence of methylene blue,» *Indian journal of pharmaceutical education* 41 (2): 121-128 • Avril 2007, vol. 41, n° %12, pp. 121-128, 2007.
- [318] R. CM et G. SP, «Evaluation of the effects of photooxidized Echis carinatus venom on learning, memory and stress,» *J. Venom. Anim. Toxines incl. Trop. Dis*, vol. 12, n° %14, 2006.
- [319] S. P. Gawade, «Pharmaco-photodynamics of photo-oxidised snake venom products: Comparative evaluation,» *RGUHS Journal of Pharmaceutical Sciences* , vol. 1, n° %13, pp. 180-185, 2011.
- [320] A. S. Naftali Primor, «Analgesic from snake venom». Brevet US 7208150 B1, 14 Juillet 1999.
- [321] S. F. d. e. T. d. l. D. (SFETD), «La Douleur, définition.,» Société Française d'Etude et Traitement de la Douleur (SFETD), 2016. [En ligne]. Available: <http://www.sfetd-douleur.org/definition>. [Accès le 11 oct 2016].
- [322] E. d. D. E. Lingueglia, «Canaux ionique et douleur,» IPMC "Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire", [En ligne]. Available: Tous les articles sur : <https://www.ipmc.cnrs.fr/cgi-bin/ipmcx.cgi?menu=1&ssmenu=13>. [Accès le 14 06 2016].
- [323] M. CR et S. S. ., «Analgesic substances derived from natural products (natureceuticals).,» *Life Sei*, vol. 78, n° %15, pp. 476-484, 2005.
- [324] C. A. ., S. N.-R. ., M. K. ., Z. S. ., r. D. ., S. E. ., B. A. ., B. A. ., J. D. .. CJ Bohlen, «A heteromeric Texas coral snake toxin targets acid-sensing ion channels to produce pain.,» *Nature.* , vol. 479, n° %17373, pp. 410-414, 2011.
- [325] F.-C. R. ., B. V. ., D. A. ., C. M. ., a. V. ., S. S. ., C. C. ., F. T. ., R. C. ., E.-Z. L. ., N. J. ., L. E. ., D. E. .. Marra S, «Non-acidic activation of pain-related Acid-Sensing Ion

Channel 3 by lipids.,» *EMBO J.* 2016 15 février; 35 (4): 414-28, vol. 35, n° % 14, pp. 414-428, 2016.

- [326] «The dark side and the bright one of Black Mamba venom,» [En ligne]. Available: <http://flipper.diff.org/app/items/5369>. [Accès le 11 avril 2015].
- [327] L. Ronat, Réalisateur, *Mambas noirs et Mambalgines*. [Film]. France: CNRS Images, 2013.
- [328] B. A. S. M. D. D. S. S. D.-G. A. D. D. F. V. A. A. L. M. L. E. Diochot S, «Black mamba venom peptides target acid-sensing ion channels to abolish pain.,» *Nature*, vol. 490, n° % 17421, pp. 552-555, 2012.
- [329] S. M. ., K. P. ., S. E. ., L. M. ., T. L. ., B. T. ., D. S. ., B. A. ., D. D. ., L. E. ., S. D. Mourier G, «Mambalgin-1 Pain-relieving Peptide, Stepwise Solid-phase Synthesis, Crystal Structure, and Functional Domain for Acid-sensing Ion Channel 1a Inhibition.,» *J Biol Chem.* , vol. 291, n° % 16, pp. 2616-2629, 2016.
- [330] ANR, «Exploration pharmacologique du rôle des canaux ASIC dans la douleur.,» ANR (Agence Nationale de la Recherche), [En ligne]. Available: <http://www.agence-nationale-recherche.fr/?Projet=ANR-13-BSV4-0009>. [Accès le 01 12 2016].
- [331] S. TEBOULE, «Le venin du mamba noir: meilleur antalgique que la morphine?,» 04 10 2012. [En ligne]. Available: [http://www.allodocteurs.fr/actualite-sante-le-venin-du-mamba-noir-meilleur-antalgique-que-la-morphine-\\_8334.html](http://www.allodocteurs.fr/actualite-sante-le-venin-du-mamba-noir-meilleur-antalgique-que-la-morphine-_8334.html).
- [332] J. Chaput, «Antidouleur : le venin du black mamba, analgésique du futur ?,» Futura Sciences, 5 Octobre 2012. [En ligne]. Available: <http://www.futura-sciences.com/magazines/sante/infos/actu/d/medecine-antidouleur-venin-black-mamba-analgesique-futur-41685/>. [Accès le 30 Janvier 2016].
- [333] A. A. ., R. P. ., D. M. ., a. V. ., A. Y. ., E. A. ., L. E. ., B. A. .. Diochot S, «Analgesic effects of mambalgin peptide inhibitors of acid-sensing ion channels in inflammatory and neuropathic pain.,» *Douleur.* , vol. 157, n° % 13, pp. 552-559, 2016.

- [334] A. L. Harvey, «Toxins and drug discovery,» *Toxicon* , vol. 92, pp. 193-200, 2014.
- [335] X. PU, P. WONG et P. GOPALAKRISHNAKONE, «A novel analgesic toxin (hannalgesin) from the venom of king cobra (*Ophiophagus hannah*).,» *Toxicon*, vol. 33, n° %111, pp. 1425-1431, 1995.
- [336] U. n. d. Singapour, «Therapeutic molecules derived from snake venom». US Brevet US6613745 B1, 2 sept 2003.
- [337] M. L. (. Theralpha), «Analgesic Composition for Transbuccal Administration». US Brevet US20120183580 A1, 19 juillet 2012.
- [338] J. Badina, «Un venin de cobra contre la douleur,» Pharmaceutiques, l'information de référence du secteur pharmaceutique, 9 09 2011. [En ligne]. Available: [www.pharmaceutiques.com/biopharma/archive/bp\\_3049.html](http://www.pharmaceutiques.com/biopharma/archive/bp_3049.html). [Accès le 15 06 2016].
- [339] Y. CC, «Cobrotoxin: structure and function.,» *J Nat Toxines.*, vol. 8, n° %12, pp. 221-233, 1999.
- [340] K. T. ., Y. C. Hsieh HC, «Clonage, surexpression et la caractérisation des cobrotoxin.,» *Biochem Biophys Res Commun* , vol. 320, n° %14, pp. 1374-1381, 2004.
- [341] C. Y. ., L. S. ., W. B. ., L. J. ., H. E. ., S. Y. ., H. C. .. Chang LS, «A novel neurotoxin, cobrotoxin b, from *Naja naja atra* (Taiwan cobra) venom: purification, characterization, and gene organization.,» *J Biochem.*, vol. 122, n° %16, pp. 1252-1259., 1997 .
- [342] F. J. ., C. Q. ., Z. W. ., J. Y. Li F, «Delivery of 125I-cobrotoxin after intranasal administration to the brain: A microdialysis study in freely moving rats.,» *Int. J. Pharm.*, vol. 328, n° %12, pp. 161-167, 2007.

- [343] Z. H. ., G. Z. ., C. B. ., H. R. ., R. P. ., R. L. ., Q. Z. Chen ZX, «A longform  $\alpha$ -neurotoxin from cobra venom produces potent opioid-independent analgesia.,» *Acta Pharmacol Sin.*, vol. 27, n° %14, pp. 402-408, 2006.
- [344] c. S. ., F. F. ., H. F. ., Y. Y. ., X. G. ., X. L. ., Z. C. ., B. M. ., P. A. .. Xu JM, «Cobrotoxin-containing analgesic compound to treat chronic moderate to severe cancer pain: results from a randomized, double-blind, cross-over study and from an open-label study.,» *Oncol Rep* , vol. 16, n° %15, pp. 1077-1084, 2006.
- [345] L. Yanli, Q. Zhenghong et R. Zou, «Use of cobrotoxin for manufacturing a medicament for the treatment of arthritis.» Université de Suzhou (Chine) Brevet CN101648000A, CN101648000B, WO 2011026362 A1, 10 03 2011.
- [346] J. Shen, Y. Xie, M.-L. Sun, R. Han, Z.-H. Qing et J.-K. He, «Antitumor activity of cobrotoxin in human lung adenocarcinoma A549 cells and following transplantation nude mice.,» *Oncology Letters*, pp. 1961-1965, 2014.
- [347] «Nyloxin Chronic Pain Relief,» [En ligne]. Available: <https://nyloxin.com/>.
- [348] T. T. ., H. S. ., T. P. ., M. P. ... Bourne Y, «Crystal structure of a Cbtx-AChBP complex reveals essential interactions between snake alpha-neurotoxins and nicotinic receptors.,» *EMBO J.* , vol. 24, n° %18, pp. 1512-22, 2005.
- [349] Z. Y. J. D. R. P. J. X. Q. Z. T. J. Zhang L, «Alpha-cobrotoxin inhibits T-type calcium currents through muscarinic M4 receptor and G o-protein  $\beta\gamma$  subunits-dependent protein kinase A pathway in dorsal root ganglion neurons,» *Neuropharmacology*, vol. 62, n° %12, pp. 1062-1072, 2012.
- [350] Z. X. ., Z. Q. ., G. S. ., Q. Z. ., R. P. ., R. L. ., Y. Q. ., J. X. .. Cheng BC, «Cobrotoxin inhibits pain-evoked discharge of neurons in thalamic parafascicular nucleus in rats: involvement of cholinergic and serotonergic systems.,» *Toxicon* , vol. 54, n° %13, pp. 224-32, 2009.

- [351] H. R. ., C. Z. ., G. Z. ., R. P. ., R. L. ., Q. Z. Zhang HL, «Analgesic effects of receptin, a chemically modified cobratoxin from Thailand cobra venom.,» *Neurosci Bull.* , vol. 22, n° %15, pp. 267-273, 2006.
- [352] M. B. Y. C. R Giorgi, «Résumé R. Giorgi, MM Bernardi et Y. Cury. L'effet analgésique évoqué par faible poids moléculaire,» *Toxicon*, vol. 31, n° %110, pp. 1257-1265, 1993.
- [353] P. G. ., G. V. ., B. P. ., Z. V. ., C. A. ., C. Y. Konno K, «Crotalphine, a novel potent analgesic peptide from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus.*,» *Peptides.*, vol. 29, n° %18, pp. 1293-1304, 2008.
- [354] P. G, G. R et C. Y, «delta-opioid receptors and nitric oxide mediate the analgesic effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom.,» *Eur J Pharmacol.* , vol. 391, n° %11-2, pp. 55-62, 2000.
- [355] P. G, C. AC et C. Y, «Activation of peripheral ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels mediates the antinociceptive effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom.,» *Eur J Pharmacol.* , vol. 469, n° %11-3, pp. 57-64, 2003.
- [356] P. G et C. Y, «Peripheral neuronal nitric oxide synthase activity mediates the antinociceptive effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom, a delta- and kappa-opioid receptor agonist.,» *Life Sci.*, vol. 75, n° %15, pp. 559-573, 2004.
- [357] H. F. ., B. M. ., G. R. ., F. I. ., T. H. ., B. S. ., A. M. ., C. Y. .. Brigatte P, «Tolerance to the antinociceptive effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom in mice is mediated by pharmacodynamic mechanisms.,» *Toxicon.*, vol. 39, n° %19, pp. 1399-1410., 2001.
- [358] J. H. P. ., M. d. P. ., Y. C. ., C. A. A. V. Erica Cristina Bueno do Prado Guirro, «Clinical, behavioral and antinociceptive effects of crotalphine in horses.,» *Cienc. Rural vol.46 no.4 Santa Maria Apr. 2016*, vol. 46, n° %14, 2016.

- [359] K. K. ., C. M. ., S. S. ., P. G. ., B. P. ., Z. V. ., C. Y. .. Gutierrez VP, «Crotalphine induces potent antinociception in neuropathic pain by acting at peripheral opioid receptors.,» *Eur J Pharmacol* , vol. 594, n° %11-3, pp. 84-92, 2008.
- [360] Z. V. ., P. G. ., C. M. ., S. S. ., P. B. ., K. K. ., C. Y. Gutierrez VP, «The peripheral L-arginine-nitric oxide-cyclic GMP pathway and ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels are involved in the antinociceptive effect of crotalphine on neuropathic pain in rats.,» *Behav Pharmacol.* , vol. 23, n° %11, pp. 14-24, 2012.
- [361] Z. V. ., F. A. ., H. A. ., C. Y. ., P. G. Machado FC, «Peripheral interactions between cannabinoid and opioid systems contribute to the antinociceptive effect of crotalphine.,» *Br J Pharmacol.* , vol. 171, n° %14, pp. 961-972., 2014.
- [362] E. Bressan, F. Touska, I. Vetter, K. Kistner, T. I. .. Kichko, N. B. .. Teixeira, G. Picolo, Y. Cury, R. J. .. Lewis, M. J. Fischer, K. Zimmermann et P. W. Reeh, «Crotalphine desensitizes TRPA1 ion channels to alleviate inflammatory hyperalgesia.,» *PAIN.*, 2016.
- [363] F. A. ., G. V. ., F. J. ., P. C. ., M.-R. D. ., C. Y. .. Zambelli VO 1, «Peripheral sensitization increases opioid receptor expression and activation by crotalphine in rats.,» *PLoS One.*, vol. 9, n° %13, 2014.
- [364] S. SAMPAIO, S. HYSLOP, M. FONTES , J. PRADO-FRANCESCHI, V. ZAMBELLI, A. MAGRO, P. BRIGATTE, V. GUTIERREZ et Y. CURY, «Crotoxin: Novel activities for a classic  $\beta$ -neurotoxin.,» *TOXICON*, vol. 55, n° %16, pp. 1045-1060, 2010.
- [365] D. P. B. C. B. M. A. C. R. C. L. L. C. M. J. C. S. J. S. S. E. T. A. R. d. R. e. J. C. V. Jorge E. Cura, «Phase I and Pharmacokinetics Study of Crotoxin (Cytotoxic PLA 2 , NSC-624244) in Patients with Advanced Cancer.,» *Clin cancer resarch*, vol. 8, n° %14, pp. 1033-1041, 2002.
- [366] H. R. ., C. Z. ., C. B. ., G. Z. ., R. P. ., R. L. ., Q. Z. .. Zhang HL, «Opiate and acetylcholine-independent analgesic actions of crotoxin isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom.,» *Toxicon.* , vol. 48, n° %12, pp. 175-182, 2006.

- [367] W. D. ., Z. X. ., G. S. ., C. B. ., Q. Z. ., R. P. ., Y. Q. ., J. X. .. Zhu Q, «Inhibitory effect of crotoxin on the pain-evoked discharge of neurons in thalamic parafascicular nucleus in rats.,» *Toxicon.*, vol. 51, n° %11, pp. 102-111, 2008.
- [368] R. L. A. P. B. G. P. W. A. F. J. V. P. G. I. M. C. M. S. D.-C. R. K. T. J. L. M. N. Y. C. Francisco de Sousa Nogueira-Neto, «The analgesic effect of crotoxin on neuropathic pain is mediated by central muscarinic receptors and 5-lipoxygenase-derived mediators.,» *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, vol. 91, n° %12, pp. 252-260, 2008.
- [369] Wikipedia, «Paraphylie,» [En ligne]. Available: <https://fr.wikipedia.org/wiki/Paraphylie>. [Accès le 25 03 2016].
- [370] «Anatomie et morphologie des serpents.,» [En ligne]. Available: <http://serpent.cheloniophilie.com/Anatomie/>. [Accès le 25 03 2016].
- [371] J.-P. CHIPPAUX et M. GOYFFON, «Venin,» [En ligne]. Available: <http://www.universalis.fr/encyclopedie/venins/2-des-appareils-venimeux-tres-divers/>. [Accès le 25 03 2016].
- [372] A. GUYARD, «Ballades naturalistes,» [En ligne]. Available: <http://baladesnaturalistes.hautetfort.com/herpetologie/>. [Accès le 31 Mars 2016].
- [373] A. péliade, «La denture des serpents,» 2008. [En ligne]. Available: <http://associationpeliade.e-monsite.com/pages/les-serpents/la-denture-des-serpents.html>. [Accès le 31 03 2016].
- [374] J. L. ., M. E. A. ., N. M. S. SARRAY, «Snake venoms C-type lectins and their receptors on platelets and cancerous cells.,» *Archives. Institut. Pasteur Tunis.*, vol. 85, n° %11-4, pp. 69-80, 2008.
- [375] S. M. ., S. G. Moore GW, «The Ecarin time is an improved confirmatory test for the Taipan snake venom time in warfarinized patients with lupus anticoagulants.,» *Blood Coagul Fibrinolysis.*, vol. 14, n° %13, pp. 307-312, 2003.

- [376] M.-E. M. ., M. G. ., M. P. .. Laraba-Djebari F, «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.* , vol. 233, n° %13, pp. 756-765, 1995.
- [377] «Le CERVEAU fabrique son propre Valium, pourquoi ne pas l'exploiter,» 07 06 2013. [En ligne]. Available: <https://www.santelog.com/actualites/le-cerveau-fabrique-son-propre-valium-pourquoi-ne-pas-lexploiter>. [Accès le 26 11 2018].
- [378] Z. H. ., G. Z. ., C. B. ., H. R. ., R. P. ., R. L. ., Q. Z. Chen ZX, «A long-form alpha-neurotoxin from cobra venom produces potent opioid-independent analgesia.,» *Acta Pharmacol Sin.* , vol. 27, n° %14, pp. 402-408, 2006.

# TABLES DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Phylogénie des Vertebrata [369]. .....	43
Figure 2 : Phylogénie et radiation des Squamates [1]. .....	44
Figure 3 : Phylogénie et radiation des serpents [1]. .....	45
Figure 4: Phylogénie des Hénophidia .....	47
Figure 5 : Phylogénie et radiation des Colubroidea [1]. .....	48
Figure 6 : Systématique. ....	49
Figure 7 : Répartition mondiale des .....	50
Figure 8: Répartition mondiale des Elapidae terrestre [7]. .....	57
Figure 9: Répartition mondiale des Viperidae [7]. ....	66
Figure 10: Coupes transversales de serpents [7]. .....	77
Figure 11: Disposition des écailles céphalique [370]. ....	80
Figure 12: Serpent groin, <i>Heterodon simus</i> [7]. ....	81
Figure 13: Vipère à corne du désert africain [7]. .....	81
Figure 14: Vipère rhinocéros, <i>Bitis nasicornis</i> [7]. .....	81
Figure 15: Couleuvre d'eau douce <i>Erpeton tentaculatum</i> [7]. .....	81
Figure 16: Organisation de l'oreille d'un serpent [3]. .....	87
Figure 17: Organe de Jacobson [370]. .....	88
Figure 18: Serpent liane du .....	91
Figure 19: Fossette d'un crotale [7]. ....	93
Figure 20: Anatomie interne d'un serpent [370]. ....	96
Figure 21: Crâne d'un serpent [373] [7]. .....	99
Figure 22 : Crâne de couleuvre [372]. ....	100
Figure 23: Evolution de l'appareil venimeux .....	107
Figure 24: <b>Maxillaire Aglyphe</b> (sans crochet venimeux) [371]. ....	108
Figure 25: <b>Maxillaire Opistoglyphe</b> (un ou plusieurs crochets venimeux à l'arrière de la mâchoire et orientés vers l'arrière) [371]. ....	109
Figure 26: <b>Maxillaire Protéroglyphe</b> (crochet venimeux situés à l'avant de la mâchoire et fixes) [371]. .....	110

Figure 27: <b>Maxillaire Soléno glyphe</b> (crochets venimeux situés à l'avant de la mâchoire et mobiles) [371].	111
Figure 28: Glande de Duvernoy [20].	115
Figure 29: Glande à venin des Elapidae [20].	117
Figure 30: Glande à venin des Viperidae [20].	118
Figure 31: Glande à venin des Atractaspis [20].	118
Figure 32 : Les différentes glandes à venin.	119
Figure 33: Schématisation du	123
Figure 34: Schématisation du processus d'évolution convergent.	123
Figure 35: Schéma de la réaction phospholipasique.	125
Figure 36: Types de phospholipase en fonction de leur site d'hydrolyse.	125
Figure 37 : Structure de la PLA2.	126
Figure 38: Action de l'acétylcholinestérase.	128
Figure 39 : L-amino acide oxydase	130
Figure 40: Schéma général de la réaction catalytique de la L-amino-acide-oxidase.	131
Figure 41: Structure d'une sérine-protéase (TSV-PA).	134
Figure 42: Structure d'une métalloprotéase (P III) (Bothrops jaraca).	137
Figure 43: Structure d'une toxine à doigts.	143
Figure 44: Structure moléculaire d'une neurotoxine- $\alpha$ ( $\alpha$ -bungarotoxine extraite de Bungarus multicinctus) [32].	146
Figure 45: $\beta$ -bungarotoxine.	151
Figure 46: Crotoxine, extraite de Crotalus durissus terrificus.	152
Figure 47: Structure d'une dendrotoxine extraite de Dendroaspis.	153
Figure 48 : Structure d'une cardiotoxine III extraite de Naja naja atra.	155
Figure 49: Crotamine extraite de Crotalus dirissus terrificus.	157
Figure 50: Structure d'une sarafotoxine [14].	158
Figure 51: Comparaison structurale de la sarafotoxine avec une endothéline [67].	159
Figure 52: Calcipsetine extraite de Dendroapsis.	160
Figure 53: Structure tridimensionnelle de quelques désintégrines et leur motif RGD.	161
Figure 54: Diagramme de la famille des intégrines et les différents motifs inhibiteurs trouvés dans les désintégrines [70].	162
Figure 55 : Structure moléculaire du NGF.	169
Figure 56 : Schéma de l'élaboration du médicament à partir du venin.	179
Figure 57 : Prélèvement de venin.	181

Figure 58 : Chromatographie RP-HPLC du venin de mamba vert ( <i>Dendroaspis angusticeps</i> ) révélant plus de 150 composés différents.....	183
Figure 59 : Composition du spectromètre de masse .....	185
Figure 60: Représentation schématique de l'ionisation par méthode MALDI. ....	187
Figure 61: Représentation schématique de l'ionisation par électrospray.....	188
Figure 62 : Diagramme de fragmentation .....	192
Figure 63 : Principe d'un appareil MS/MS à 3 quadripôles en série [89].....	193
Figure 64 : Diffraction aux rayons X .....	201
Figure 65 : Criblage haut débit.....	202
Figure 66 : BPF5 .....	215
Figure 67 : Structure moléculaire du Teprotide. Chaîne peptidique constituée de 9aa : Pyr-Trp- Pro-Arg-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro). [11] .....	217
Figure 69 : Structure chimique du Succinyl-L-proline sulfide [11].....	217
Figure 68 : Structure chimique du Succinyl-L-proline [11].....	217
Figure 70 : Structure du captopril [11].....	218
Figure 73 : Lisinopril.....	219
Figure 73 : Enalapril.....	219
Figure 73 : Ramipril .....	219
Figure 74 : Peptides natriurétiques humains [23].....	227
Figure 75 : Représentation schématique du peptide chimérique : CD-NP [29].....	230
Figure 76 : Hémostase primaire .....	238
Figure 77 : Cascade de la coagulation sanguine. ....	241
Figure 78 : Mode d'action des venins sur l'hémostase .....	249
Figure 79 : Mécanisme d'action sur la cellule tumorale [165] .....	322
Figure 80 : Mécanisme d'action de la Crotonamine .....	358
Figure 81: Structure relation NGF / p75. ....	370
Figure 82 : Récepteur GABA [377]. ....	380
Figure 83: Schéma d'un récepteur GABA A en interaction avec une Micurotoxine [233]..	381
Figure 84: structure d'une mambalgine [10].....	389
Figure 85: Illustration de 5 cobratoxines fixées au récepteur pentamérique de l'AchBP [348]. .....	399
Figure 86 : Molécule possédant la même séquence d'acides aminés que la sous unité CA de la crotoxine.....	403

Tableau 1 : Toxines à 3 doigts et mécanismes d'actions .....	145
Tableau 2 : Famille de désintégrines et toxines associées. ....	162
Tableau 3 : Différences entre protéines naturelles et de synthèses .....	197
Tableau 4 : Effets physiologiques des peptides natriurétiques. ....	228
Tableau 5 : Effets des protéines sur les différentes cibles de l'hémostase .....	250
Tableau 6 : Diagnostic d'une mutation du Facteur V. ....	256
Tableau 7 : Classes des inhibiteurs de l'activation plaquettaire .....	314
Tableau 8 : Effets des extraits du venin ophidien sur les cellules cancéreuses (Sarray S et al. 2013).....	326
Tableau 9 : Comparaison de l'efficacité de l'Hannalgésine avec la Morphine et un témoin..	392

## **MOTS CLES**

*Serpents / Anatomie / Phylogénie / Systématique / Appareil venimeux / Venin / Médicaments  
/ Application thérapeutiques / Tests de diagnostics / Recherche fondamentale / Hématologie  
/ Cardiologie / Neurologie / Douleur / Anesthésie / Oncologie / Enzymes / Toxines /  
Vénothérapie / Protéomique / Transcriptomique / Génomique /*

## RESUME

Depuis la nuit des temps, le serpent suscite crainte et fascination chez l'Homme. Outre son pouvoir destructeur ou le danger potentiel qu'il représente, il charme par son apparence et l'altérité qui l'oppose aux autres vertébrés terrestres. Les venins de serpents se sont développés au cours des millions d'années en agissant sur les processus physiologiques essentiels et vitaux de leurs proies avec une grande spécificité et une grande puissance. C'est en observant les effets et les réactions produits lors d'une morsure de serpent que l'Homme a commencé l'étude sur les composants du venin afin de mieux en comprendre ses mécanismes. Les morsures des serpents peuvent être mortelles, mais les composants du venin possèdent également une valeur médicale et biotechnologique, ce qui constitue une source inépuisable d'exploration appliquée à la recherche fondamentale, clinique, diagnostic ainsi que pour la découverte et la mise au point de nouveaux médicaments.

Longtemps sous-estimé, on sait aujourd'hui que l'abondance et la diversité des venins ophidiens représentent un potentiel pharmacologique énorme. Depuis l'approbation du captopril, le premier médicament à base de protéines de venin de serpent et sa mise sur le marché il y a plus de 30 ans, l'attention des chercheurs pour les molécules ophidiennes n'a cessé de grandir. Les toxines de venin de serpent sont devenues une pharmacopée naturelle précieuse de molécules bioactives qui fournissent des composés de plomb pour le développement de nouveaux médicaments. Il semble que l'on ne soit encore qu'au commencement des possibilités qui nous sont offertes. Actuellement, l'industrie pharmaceutique investit de plus en plus dans les médicaments à base de venin. Grâce à une maîtrise parfaite de la purification des constituants actifs, la limite principale de l'utilisation des venins n'est plus leur toxicité ou leurs effets indésirables. Un certain nombre de nouveaux médicaments sont constamment en train d'émerger de cette corne d'abondance. De nombreuses toxines contenues dans les venins pourraient être utilisées pour développer de nouveaux agents pour le traitement et la prévention des maladies humaines. Apanages du XX<sup>ème</sup> siècle, promis au XXI<sup>ème</sup> à un avenir fructueux, les venins ophidiens offrent des débouchés particulièrement féconds à la recherche médicale et à la thérapeutique moderne.

Cette thèse bibliographique rappelle dans une première partie la classification, l'anatomie et la physiologie des serpents et plus particulièrement leur appareil venimeux avant de développer dans une seconde partie les différents composants des venins et leurs modes d'action variés. Nous développerons ensuite les processus mis en œuvre pour transformer une toxine animale en médicament efficace et les nouvelles avancées technologiques. Plusieurs de ces composés ophidiens sont à l'origine de nouvelles familles pharmacologiques. Ainsi, nous terminerons par énumérer dans une troisième partie les différentes applications thérapeutiques des venins de serpent, les médicaments déjà sur le marché ainsi que tous les espoirs et potentielles applications futures des molécules ophidiennes.