HAL
open science

Du venin au médicament : exemple du Bothrops jararaca et du Captopril

Antoine Martin

To cite this version:

Antoine Martin. Du venin au médicament : exemple du Bothrops jararaca et du Captopril. Sciences du Vivant [q-bio]. 2020. dumas-03115281

HAL Id: dumas-03115281

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03115281

Submitted on 19 Jan 2021

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.

U.F.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 2020 Thèse n°152

THESE POUR L'OBTENTION DU

DIPLOME D'ETAT de DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

Par MARTIN Antoine Né le 06 octobre 1994 à Bordeaux
Le 15 décembre 2020

DU VENIN AU MEDICAMENT

Exemple du Bothrops jararaca et du Captopril

Sous la direction de : Loïc RIVIERE

Membres du jury :

M. RIVIERE Loïc (Président/Rapporteur/Examinateur)
Mme PASSAGNE Isabelle (Examinateur)
Mme CASTAY Marie-Laure (Examinateur)

Titre : DU VENIN AU MEDICAMENT : Exemple du Bothrops jararaca et du Captopril.

Résumé : Le Captopril, ambassadeur des Inhibiteurs de l'Enzyme de Conversion, médicaments plus qu'utilisés aujourd'hui dans le traitement de l'hypertension artérielle a une histoire bien singulière. En effet c'est à partir d'un venin de serpent que sa synthèse fut possible. C'est le Bothrops jararaca, un serpent des plus meurtriers d'Amérique du Sud qui a permis, après de nombreuses analyses de son venin, la synthèse de ce remède. Mais comment à partir d'un venin qui engendre la mort en quelques heures, a-t-on pu synthétiser un médicament ? C'est toute l'histoire de cette thèse

Mots clés : Vipères, Bothrops jararaca, Venin, Captopril, IEC, Hypertension artérielle.

Title : FROM VENOM TO MEDICINE : Bothrops jararaca and Captopril exemple.

Abstract : Captopril, the ambassador of Converting Enzyme Inhibitors, drugs more than used today in the treatment of high blood pressure has a very singular history. Indeed it is from a snake venom that its synthesis was possible. It is the Bothrops jararaca, one of the deadliest snakes in South America, which, after numerous analyzes of its venom, allowed the synthesis of this remedy. But how from a poison that causes death in a few hours, could a drug be synthesized? That's the whole story of this thesis.

Keywords : Vipera, Bothrops jararaca, Venom, Captopril, IEC, High blood pressure.

REMERCIEMENTS

- **A MON JURY**

Merci Monsieur Loïc RIVIERE d'avoir accepté de présider ma thèse, merci pour votre patience et votre soutien. Merci surtout pour votre réactivité, votre disponibilité et pour tous vos conseils. Merci aussi pour vos enseignements en parasitologie et en zoologie qui ont guidé mon choix vers ce sujet.

Merci également à Madame Isabelle PASSAGNE pour avoir accepté de faire partie de ce jury, pour sa lecture et son attention, sa gentillesse et sa disponibilité.

Un grand merci à Madame Marie-Laure CASTAY d'avoir accepté de faire partie de ce jury, mais surtout merci de me guider au quotidien dans ce métier passionnant qu'est celui de pharmacien. Merci de m'avoir fait confiance malgré un certain manque d'expérience, il me tarde de découvrir tous les côtés de ce métier à vos côtés.

- **A MA FAMILLE**

Merci à mes parents, qui ont toujours été et seront toujours un éternel soutien pour moi. Merci de m'avoir toujours poussé à persévérer et de ne jamais m'avoir lâché. Merci de m'aimer dans les bons comme dans les mauvais moment.. moerci pour tout.
J'embrasse également Alice, qui en plus d'être une sœur admirable et une amie proche que je compte garder à mes côtés toute ma vie.

Merci à mon grand-père et à ma grand-mères qui, en tant qu'ancien pharmacien m'ont guidé vers ces études. Je leur en suit très reconnaissant. Mais merci aussi pour être à mes côtés au quotidien, c'est une chance pour moi de partager ces moments avec vous.
Cette thèse est aussi pour ma Mamou qui malgré la distance possède une place particulière dans ma vie et dans mon cœur.
Merci à tous les membres de ma famille qui représentent un soutien inépuisable.

Merci surtout à Caroline qui, en plus de vivre à mes côtés, fait tout, depuis des années pour faire de moi un homme comblé, ainsi qu'un pharmacien responsable. Cette thèse est pour nous, pour que nous puissions passer à autre chose, toujours ensemble. Je t'aime.

Je remercie également tous mes amis : Chalana, Arthur, Yoan, et à tous mes futurs confrères : Sacha, Floflo, Paulo et j'en passe malheureusement. Merci à tous pour ces belles années et vivement la suite.
Merci à Maïder et Benoit, ainsi qu'à toute l'équipe de la pharmacie Saint-Pierre pour m'avoir fait découvrir un magnifique visage de la Pharmacie.

Pour mon Papou, je sais que tu es avec moi, avec nous.

INTRODUCTION

Le serpent, animal fascinant, occupe une place particulière aux côtés de l'Homme, et ce depuis la nuit des temps. Parmi plus de 3 500 espèces de serpents répertoriées, beaucoup inspirent la crainte, certains poussent à l'admiration. Outre le danger potentiel qu'il représente, c'est son aspect qui fascine du fait de son originalité et de sa singularité par rapport aux autres vertébrés. L'absence de membre, une peau recouverte d'écaille, une langue filiforme, des crochets venimeux ou une taille fulgurante, autant de particularités qui font que dans les meurs collectives, le serpent est un des animaux les plus redoutés de la planète.

Cependant au cours de l'histoire, il a souvent tenu une place particulière, demandez à Adam et Ève. Demandez aussi aux Aztèques avec leur QuetzalCoatl ou « Serpent à plume », dieu de la mort et de la résurrection. Demandez également aux Égyptiens avec leurs cobras protecteurs de pharaons, ou aux bouddhistes qui voient leur Bouddha protégé par un cobra géant quand ils méditent. Symbole de maternité, de fécondité, de puissance protectrice, ou envoyé du diable, les serpents font l'objet de nombreuses légendes et croyances.

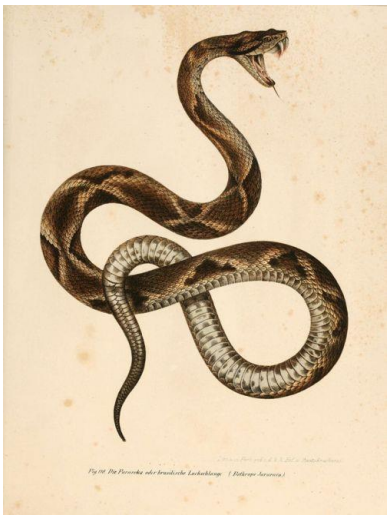
Dans le monde médical également le serpent a sa place depuis des millénaires. Dès l'Antiquité, Esculape, dieu de la médecine, arbore le serpent comme attribut, appelé caducée qui n'est autre que le symbole de la Pharmacie. La légende raconte qu'Esculape en se promenant vit un serpent s'avancer vers lui, il lui frappa alors sur la tête avec son bâton et tua le reptile. Plus tard, un autre serpent se présenta à lui avec cette fois une herbe mystérieuse, il s'avança vers le bâton d'Esculape et grâce à l'herbe réanima son congénère. Esculape eu alors une révélation sur les effets médicinaux des plantes, et parcourut l'Europe Antique en divulguant son nouveau savoir. Aujourd'hui ce serpent d'Esculape est à l'origine des emblèmes des Sciences Médicales.

Dans le monde contemporain, le serpent n'a guère d'intérêt à entretenir l'image pieuse, ou cauchemardesque que l'Homme se fait de lui. En effet, sur les milliers d'espèces de serpents qui peuplent notre planète, à peine 400 sont venimeuses. D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), on compte dans le monde, environ un million de morsure par an, et seulement 3% d'entre elles sont mortelles. On répertorie ainsi dans les années 2010, environ 30 000 morts par an en Asie, dont 40% en Inde, (zone très dense de population), 1 000 en Amérique et en Afrique. En Europe, où les espèces dangereuses sont moins présentes, les données ne sont pas comparables, on a en effet compté en 2012 seulement 3 morts dus à une morsure de vipère. Outre ses chiffres, il est important de concevoir que le serpent ne cherche, dans la majorité des cas, qu'à protéger son territoire, ou son habitat, en aucun cas il n'attaquerait volontairement l'Homme. Seules les activités humaines sont responsables de ces morsures.

Les craintes fondées sur le serpent ne sont dues qu'à l'ignorance de sa véritable nature. Francesco Redi au XVIIe siècle va être le premier à montrer que les liquides s'écoulant des crochets de certaines espèces de serpents provoquent une mortalité chez l'hôte. Ce sont ensuite les chimistes du XIXe siècle, et notamment un français Lucien Bonaparte, qui vont réaliser les premières études rationnelles sur les venins. On découvre alors que le venin des

serpents s'avère être, outre une substance mortelle, une ressource précieuse et exceptionnelle de médicaments et offre des débouchés particulièrement intéressants sur la recherche médicale et la thérapeutique moderne.

Le but de cette thèse, va être de montrer le potentiel thérapeutique du venin des serpents et plus particulièrement de celui du Bothrops jarraraca, une vipère brésilienne particulièrement dangereuse. A la fois létal, mais aussi fournisseur de médicament, voilà tout le paradoxe de cette vipère qui me fait penser à celui de la médecine même, décider de la vie ou de la mort.



Dans un premier temps je vous présenterai donc cette vipère, sa place dans le règne animal et parmi les autres serpents. Nous verrons aussi son anatomie, son mode de vie, ses caractéristiques afin d'essayer de vous montrer qu'il s'agit plus d'une bête hors du commun que d'un démon sorti tout droit des enfers. Nous verrons dans un second temps que la composition de son venin est responsable d'un syndrome particulièrement complexe. En effet, même si la morsure entraine dans une grande majorité des cas la mort, de très nombreuses substances de ce venin vont être à l'origine de médicament pour traiter des troubles de la coagulation ou de la tension artérielle.

Dans le cadre de cette thèse j'ai choisi de ne pas faire une revue de toute ces substances, mais d'insister sur une en particulier, qui sera à l'origine d'une famille de médicaments les plus utilisés du monde contre l'hypertension artérielle (HTA) : les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC).

En France, d'après l'Observatoire Thalès-Cegedim, on compte en 2010, plus d'1 million de nouveaux cas d'HTA qui est un facteur de risque important d'infarctus du myocarde ou de troubles vasculaires et rénaux. Il s'agit donc d'un véritable enjeu de Santé Publique, puisque selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), l'HTA est responsable de 18% de décès dans les pays riches en 2004 (2e facteur de risque responsable de décès après le tabac) et de 45% des troubles vasculaires à l'origine de 30% de l'ensemble des décès en France en 2008. Des chiffres effrayants, et la prise en charge de ces maux va être basée sur des traitements ayant pour origine un serpent d'Amérique du Sud. Si ce serpent tue au Brésil, on peut donc dire qu'il sauve des vies dans le reste du Monde.

PARTIE 1 :
LE *BOTHROPS JARARACA*

1 LES SERPENTS

1.1 Les Reptiles

Les premiers reptiles seraient apparus au Carbonifère il y a environ 250 millions d'années. Ils se diffèrent des autres mammifères par leur crâne dit Diapside (Lee et al. 2004), c'est à dire avec 2 grandes fenestrations en région temporale du crâne. [1]

Cependant cette grande et ancienne famille, qui contenait plus de vingt ordres différents au Secondaire, n'en compte aujourd'hui plus que 4 :

- Les Crocodiliens (crocodiles, caïmans, alligators, gavials) se composant d'environ 23 espèces.
- Les Rhynocéphales (Sphénodons de Nouvelle-Zélande) n'ayant que deux espèces distinctes.
- Les Chéloniens (tortues) composés d'environ 300 espèces.
- Les Squamates (*Sauriens* et *Ophidiens*), le plus grand des ordres avec environ 7 900 espèces. [1]

C'est ce dernier ordre, communément appelé celui des serpents, qui nous intéressera au cours de cette thèse.

Les reptiles sont aujourd'hui répartis dans le monde entier, excepté les régions glaciales des Pôles et des hautes montagnes. La majorité des espèces est terrestre, mais un grand nombre vit, au moins de façon partielle, en milieu aquatique. Cette famille regroupe des individus très variés. Certains proliférent en milieu arboricole, d'autres fouisseurs se cachent sous le sol. Certains sont à écailles, d'autres ornés de plaque cornée ou même osseuse. Ils peuvent avoir des pattes, des nageoires, ou même l'absence totale de membre. Cette multitude d'espèces traduit les différents modes d'adaptation des reptiles au cours de l'histoire. [2]

Nous avons aujourd'hui trop tendance à mélanger les termes Reptiles et Serpents. Si ces derniers sont effectivement des reptiles, ils sont loin de constituer l'ensemble de cette classe.

Beaucoup de ces animaux inspirent la crainte sinon la peur, soit par leur aspect, soit par leur propriétés venimeuse, soit par leur taille démesurée. Et pourtant l'Homme leur a toujours porté un intérêt surprenant. [2]

La classification des diverses espèces s'appelle la systémique, ou taxonomie. Existant depuis des siècles, cette science a évolué au fil des années et a récemment franchi un cap en utilisant la biologie moléculaire. Cependant, malgré le fait qu'on puisse désormais déterminer le degré de similitude dans la composition de l'ADN de certains gènes chez différentes espèces, les interprétations restent encore délicates. Il est sûr désormais, qu'il y a une convergence entre les ressemblances morphologiques et génétiques chez différents spécimens, cependant des différences persistent. [3]

La biologie moléculaire constitue donc une nouvelle arme importante pour la systématique. Cependant elle ne peut que être corrélée à d'autres disciplines comme l'anatomie, la paléontologie ou la physiologie pour pouvoir être interprétée. [3]

1.2 Les Squamates

Les Squamates comptent environ 8 000 espèces vivantes et constituent un composant majeur du monde des vertébrés terrestres. En se basant sur l'étude de 9 gènes, des scientifiques ont ainsi pu établir une classification précise des 19 taxons composants l'ordre des *Squamates*. Les paléontologues ont défini ces reptiles dans un groupe à part en raison de la présence sur leur peau d'écailles. [4]

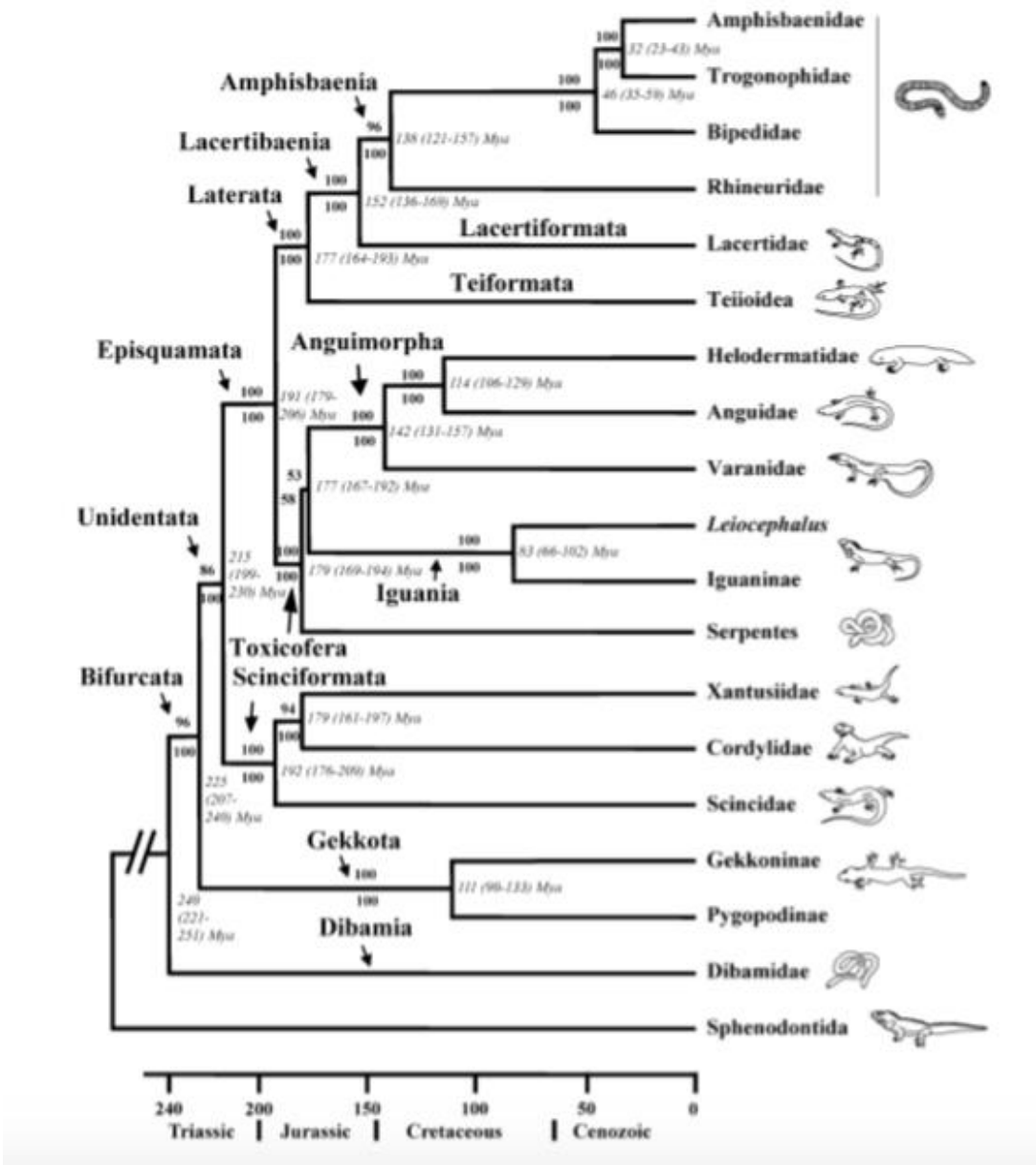


Figure 1 : Classification détaillée des Squamates. [4]

On regroupe donc les squamates dans le genre *Bifurcata*, c'est-à-dire toutes les espèces avec la langue fendue en deux. Parmi eux, on retrouve les *Dibamidae* (les vers) et les *Gekkoninae* (geko) qui représentent les formes les plus basales de squamate. [4]
Hormis ces 2 lignées, tous les squamates sont des *Unidentata*, une superfamille qui est divisée en 2 groupes : les *Scinciformata*, et les *Episquamata*. Ce sont ces derniers qui vont nous intéresser. Ils sont répartis en deux, d'un côté les *Laterata* et les *Toxicofera* (Iguanes, Serpents, Anguimorphes). Les plus proches parents des serpents ne sont donc pas les lézards, ni les varans, mais plutôt les iguanes. En effet, ces derniers constituent une lignée spécialisée qui est riche en ressemblance avec les serpents (langue filiforme, méthode de chasse à l'affut, thermo-sensibilité). [4]

1.3 Les Serpents

D'après *Lee et al.* en 2007, se basant sur des données morphologiques et moléculaires, les Ophidiens sont répartis en 2 superfamilles.

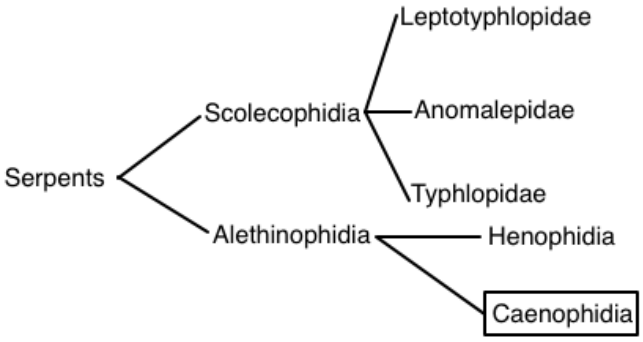


Figure 2 : Phylogénie des serpents modernes. [4]

On retrouve donc les *Scolecophidia* qui regroupes les « serpents aveugles » et les *Alethinophidia* (serpents communs). Cette famille regroupe, en fait, tous les serpents avec un système de vision développé (attention on ne peut cependant pas dire que les serpents voient à proprement parler).
Ce groupe des *Alethinophidia* est réparti en deux clades :

- Les *Henophidia* ou « serpents constricteurs ». Ce sont donc pour la plupart des cas des serpents non-venimeux qui attrapent leurs proies via un processus de strangulation. Ce clade est très hétérogène d'un point de vue morphologique et chimique mais regroupe environ 200 espèces parmi lesquelles on retrouve les pythons ou les boas. [4]

Photo 1 : Boa constrictor. [5]

- Les *Caenophidia* ou « serpents avancés ». On y retrouve la majorité des serpents que nous connaissons aujourd'hui. On y recense en effet plus de 2800 espèces et toutes les espèces de serpents venimeux. [4]

Cette immense superfamille de serpents se répartie en différents clades selon les études. On y retrouve notamment les *Colubroidea*. [6]

Ce groupe est vaste, avec des avis qui divergent quant à leur classification réelle au sein de la communauté scientifique. En étudiant donc différents points de vues, on peut classer cette famille en 4 groupes : les *Elapidae* (cobras), les *Viperidae* (vipères), les *Colubridae*

(couleuvres) et les *Atractaspididae*. Les Elapidae et les Viperidae regroupent la totalité des espèces venimeuses de serpents. [6], [7], et [8]

2 LES VIPERES

2.1 Phylogénie

La superfamille des Vipères est composée de 4 sous-familles distinctes :

- Les *Azemiopinae* et les *Causinae*, qui ne regroupent que très peu d'espèces.
- Les *Crotalinae*, qui nous intéresseront plus tard puisqu'on y retrouve le genre Bothrops. Cette sous-famille est composée de 16 genres.
- Les *Viperinae* qui regroupe 9 genres de serpents. [9]

Toutes les espèces de ces familles possèdent des caractéristiques anatomiques et physiologiques communes que nous allons étudier.

2.2 Répartition géographique

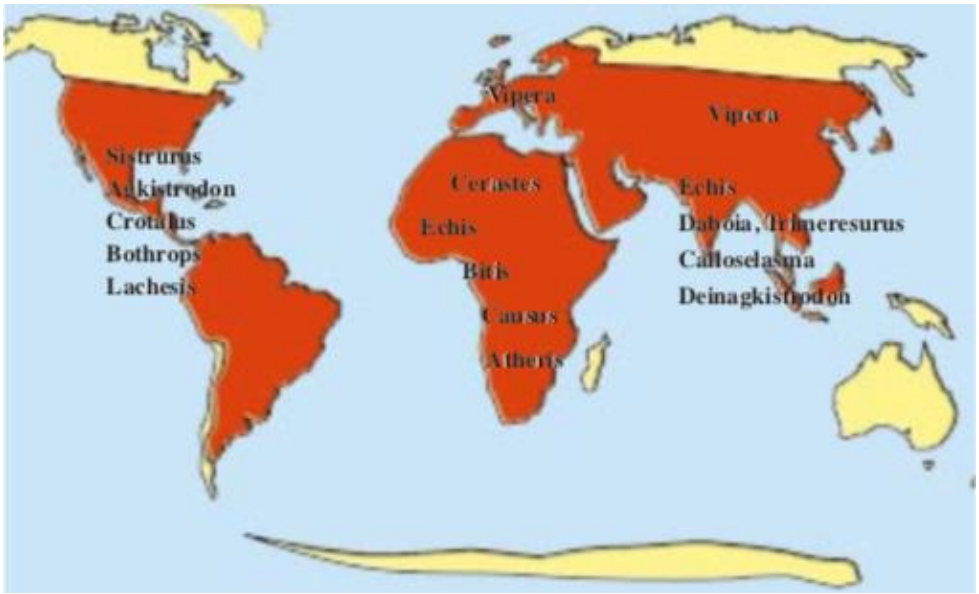


Figure 3 : Carte de la répartition des *Viperidae* à travers le monde. [10]

On retrouve donc des serpents appartenant à la famille des *Viperidae* sur tout le globe excepté : les deux pôles, les régions froides du Canada, les régions de la Cordillère des Andes, Madagascar et l'Australie. [11]

En fonction des différentes régions, on retrouve différentes espèces de vipères. Cette partie va donc nous permettre de mettre en lumière la variabilité de ces espèces et aussi leurs principaux traits communs. [11]

On retrouve par exemple les *Bothrops* essentiellement sur le continent Sud-américain (forêt amazonienne).

2.3 Exemples de Vipères

Sur notre territoire français, on retrouve 4 types de vipères appartenant toutes au genre *Vipera* :

- La vipère Aspic (*Vipera aspis),* la plus commune dans les plaines de la moitié sud du pays. Elle s'adapte particulièrement bien à l'activité humaine, tant qu'elle dispose d'un bon ensoleillement et d'un couvert végétal lui permettant de se dissimuler. C'est une espèce très polymorphe arborant une robe rouge brique, orangée ou brune, avec des tâches noires. Cette vipère n'attaque pas l'Homme, cependant elle peut se montrer agressive si elle se sent menacée. [11]

Photo 2 : *Vipera aspis.*

- La vipère Peliade (*Vipera berus*), qu'on retrouve dans les grandes plaines du Nord de la France, mais aussi dans des massifs montagneux comme le Massif-Central ou le Jura. Ceci démontre la faculté des Vipères à s'adapter à différents types d'environnement. Ce type de vipère est plus uniforme d'un point de vue de leur robe. Le mâle est gris clair ou gris-brun. La femelle brun-jaune ou brun-rouge. Cette espèce est plus vive et plus agressive que la précédente et vit la nuit. Il est donc plus rare de la croisée. [11]

Photo 3 : *Vipera berus*.

- La vipère d'Orsini (*Vipera ursinii*), que l'on retrouve qu'à partir de 900m d'altitude dans la région des Alpes. Cette espèce, plus rare, et agressive quand elle se sent attaquée mais son venin et bien moins riche en toxine que celui de ces 2 précédentes congénères. [11]

Photo 4 : *Vipera ursinii*.

- La vipère de Seoane (*Vipera seoani*), on la retrouve surtout en Espagne. En France, il faut arpenter les alentours du massif pyrénéen pour l'apercevoir. On y retrouve à peine une centaine d'individus. Tapis dans les landes de bruyères ou de fougères, elle quitte rarement sa couverture.[11]

2.4 Caractéristique anatomique

Les principales caractéristiques anatomiques des vipères ne seront pas vraiment traité ici. En effet, on en parlera dans la partie suivante en décrivant l'anatomie de notre Bothrops. Il faut cependant retenir que l'anatomie générale du Bothrops est à quelques détails près la même que celle des autres vipères.
J'ai cependant trouvé intéressant de traiter dans cette partie les principales caractéristiques externes des vipères venimeuses qui permettent de différencier ces dernières des couleuvres. [1]

	VIPERES	COULEUVRES
ECAILLES	- Tête recouverte de petites écailles (pouvant se répartir en 3 plaques) - 2-3 rangées d'écailles entre l'œil et la lèvre sup.	- Tête recouverte de 9 plaques - 1 rangée d'écailles entre l'œil et la lèvre sup.
PUPILLES	- Fuseau vertical	- Ronde
FORMES	- Corps massif - Taille max : 0,75-0,85m	- Corps filiforme - Taille max : 2,40m
QUEUE	- Courte FAMILLES - Plaque précloacale simple	- Longue - Plaque précloacale double
DENTURES	- Solénoglyphes	- Aglyphes - Opisthopglyphes (couleuvre de Montpellier)

Tableau 1 : Comparaison des principales caractéristiques morphologiques entre couleuvres et vipères. [1]

Plus petites, et surtout beaucoup plus agressives avec leurs crochets hautement venimeux, les vipères coexistent dans certaines régions avec leurs cousines les couleuvres. Arborant des traits bien particuliers, ces deux familles de serpents diffèrent énormément rendant leur reconnaissance plutôt évidente. Ce petit tableau s'avère bien pratique pour savoir qu'elle est le type de serpent qui arpente vos jardins. [1]

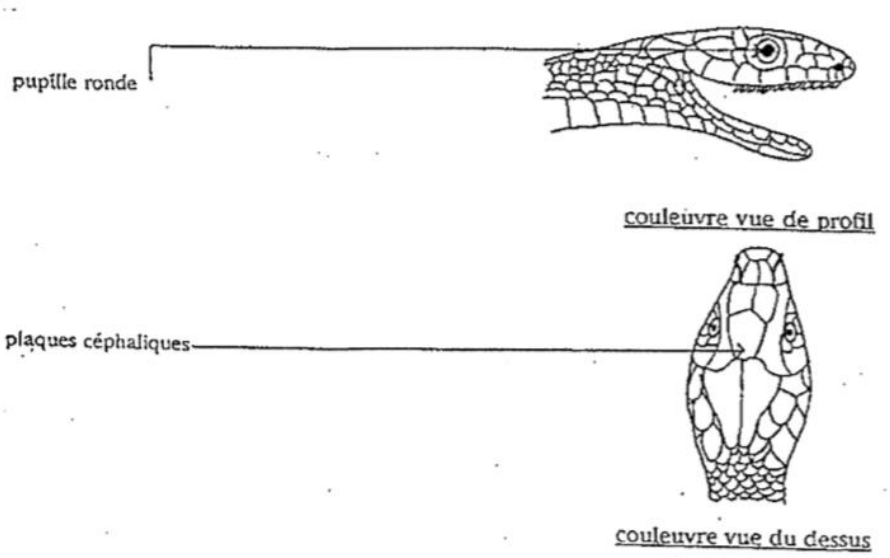


Figure 4 : Dessin simplifié de la tête d'une couleuvre. [1]

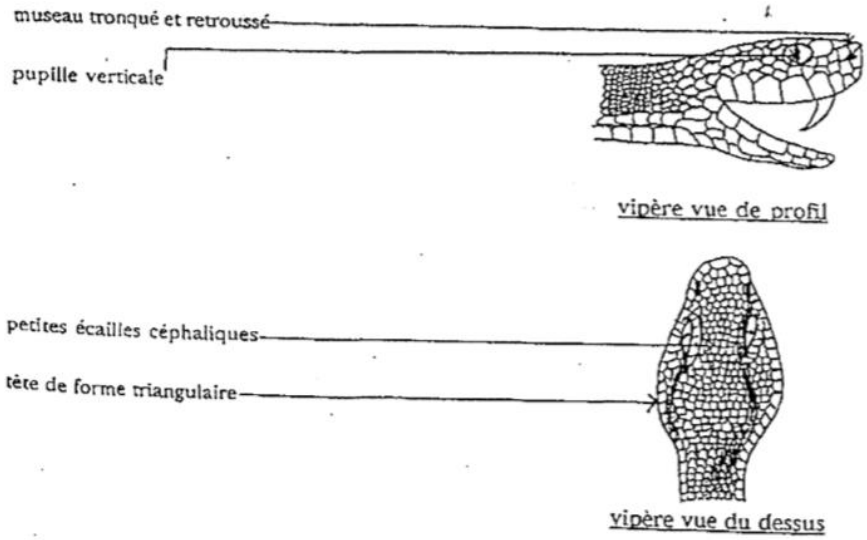


Figure 5 : Dessin simplifié de la tête d'une vipère. [1]

3 LE BOTHROPS JARARACA

3.1 Généralités et mode de vie

3.1.1 Répartition géographique et habitat

Figure 6 : Répartition géographie des *Bothrops jararaca*. [12]

On retrouve donc principalement ce genre de vipère dans le Sud-Est du Brésil, d'où son surnom de Vipère rouge du Brésil. On les retrouve en effet dans les forêt brésiliennes au bord de l'Océan Atlantique, une région qui a subi de nombreux changements écologiques au cours de l'histoire et qui en subit encore aujourd'hui (déforestation). Les régions de Sao Paulo et de Rio de Janeiro sont les plus touchées par les morsures du Jararaca, du fait de leur forte population. [12]

Ces vipères aiment vivre dans les régions très denses en végétation et jusqu'à 1000 mètres d'altitude. Outre les forêts, on les retrouve dans la broussaille, dans les savanes et même dans certains champs cultivés. Ils sont considérés comme semi-arboricoles. En effet les adultes sont plus terrestres, mais on retrouve des spécimens juvéniles dans les arbres, vraisemblablement pour se protéger des prédateurs. [12]

3.1.2 Reproduction et développement

Les *Bothrops jarraraca* femelles sont ovovivipares, c'est-à-dire qu'elles portent les œufs qui vont incuber et éclore dans le ventre de la mère sans relation nutritive avec celle-ci

(que des échanges d'ions ou de gaz). On peut donc dire que l'embryon se nourrit dans l'œuf et éclot juste avant la naissance. [13]

A la naissance les petits jarraraca sont déjà venimeux (effet anticoagulant supérieur à celui des adultes) et chassent donc seuls principalement dans les arbres. Les nouveau-nés femelles mesurent entre 23,5 et 26,5 cm pour 7 à 8 grammes, tandis que les mâles mesurent 24 à 27,9 cm pour 6 à 9 grammes . [13]

Les deux sexes grandissent à des rythmes similaires durant la première année de vie. Après un an, la croissance des femelles va être beaucoup plus importante, ci-bien qu'à l'âge adulte elles sont plus grandes et plus lourdes que les mâles.

Au cours de cette croissance, le venin des serpents va perdre certaines de ses capacités anticoagulantes mais également développer des toxines et des enzymes spécifiques très active (voir partie 2). [13]

Des études ont montré que les mâles s'accouplaient avec plusieurs femelles au cours de leurs vies. Les femelles, prêtes à s'accoupler, sécrètent des stéroïdes sexuels comme les androgènes ou les œstrogènes pour attirer les mâles. Ce procédé donne souvent lieu à des combats mâle-mâle pour s'arracher la femelle. En effet les hormones sont ressenties par les mâles sur de longues distances. Certaines études montrent cependant que ces duels sont moins fréquents chez cette espèce de vipère par rapport aux autres du fait de la taille des femelles qui décide souvent elle-même de leur partenaire avant la copulation. [14]

3.1.3 Habitudes alimentaires

Le *Bothrops jararaca* se nourrit exclusivement d'espèces ectothermes (75% de grenouille type Anoure, et des arthropodes), quand il est jeune, puis d'espèces endothermes (80% de petits mammifères comme des rongeurs).

C'est un prédateur redoutable du fait de son venin très toxique et de son système de camouflage très développé. Deux atouts que nous développerons plus tard.

Il possède également un appât, sa queue. En effet cette dernière, plus claire que le reste du corps, ressemble beaucoup à des larves d'insecte quand le serpent l'agite doucement. Un appât redoutable. Cependant ces serpents ne se nourrissent pas souvent, sûrement en raison de leur grande sédentarité. [14]

Les études ont défini deux grandes stratégies de chasse chez le Jararaca. La première est principalement utilisée contre des proies de grande taille, ou avec lesquelles le serpent est moins familier. Le serpent envenime sa proie grâce à ses crochets puis se retire et laisse tranquillement mourir sa proie tout en restant à distance. Une fois morte la proie sera dévorée. Face à des proies plus habituelles pour le serpent, ce dernier ne se retirera pas et gardera ses crochets enfouis dans sa proie jusqu'à ce qu'elle décède sous l'action du venin.

Ces vipères chassent principalement la nuit. Pendant les journées elles se reposent dans les feuillages. Leurs activités de chasse, et de reproduction, sont moindres dans les moments les plus froids de l'année. [14]

3.2 Anatomie

3.2.1 Anatomie externe

3.2.1.1 Généralités

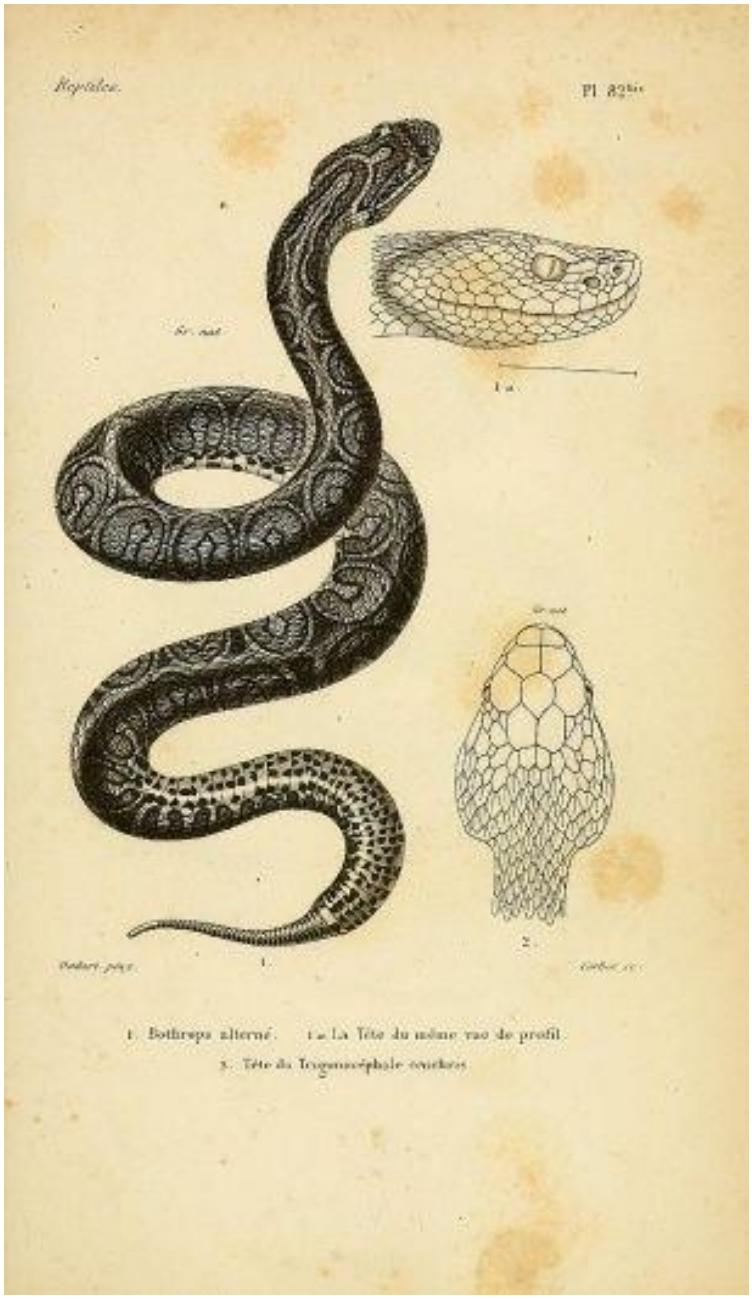


Figure 7 : Dessin général du *Bothrops jararaca*. A gauche le Bothrops en entier, en haut à droite sa tête vue de profil, et en bas à droite sa tête vue de dessus. [15]

Les Bothrops jarraraca mesurent environ 160 cm de long pour 60 cm de large. Dans l'ordre des *Viperidae*, ils sont considérés comme de grands serpents.

Ils peuvent vivre de 15 à 20 ans à l'état sauvage. En captivité, leur espérance de vie est réduite de moitié. [12]

3.2.1.2 Les écailles et la peau

Les écailles des serpents recouvrent leur épiderme. Bien que solide, la peau des serpents et très extensible grâce à son épiderme en constant renouvellement. C'est cette fonction qui va assurer leur locomotion ou même leur permettre d'avaler des proies imposantes. En effet cette souplesse est due au fait que les écailles ne sont pas individualisées comme chez les poissons, elles font parties intégrantes de la peau. [2]

De plus les écailles offrent un rôle de protection mécanique contre l'usure de la peau. Le déplacement en rampant des serpents irriterait de façon conséquente leur épiderme sans ses écailles.

Enfin, les écailles des serpents contiennent différents types de cellules qui vont donner une coloration à la peau du serpent. Elles ont donc également un rôle de camouflage indispensable aux Bothrops pour pouvoir se saisir de leurs proies. [2]

La composition des écailles va permettre d'assurer un processus bien propre à certains reptiles : la mue.

En effet, les écailles de tous les serpents sont divisées en 2 couches. Une couche externe, au contact de l'environnement extérieur, qui va avoir la capacité de se détacher. Et une couche interne en continuelle multiplication qui prendra la place de la couche externe à chaque mue. [16]

Entre ces 2 couches, on retrouve de petites cellules transparentes qui vont avoir un rôle primordial. En effet, elles sécrètent une substance visqueuse et opaque caractéristique quelques jours avant le début du processus pour faciliter la séparation des deux couches d'écailles. Des études ont montré qu'en effet le serpent se prépare à cet épisode de mue en diminuant son métabolisme (il se nourrit moins). Cela se traduit par des yeux bleuté ou laiteux, et une coloration du corps qui devient terne. [16]

Une fois prêt le serpent va se frotter le museau contre un objet rugueux jusqu'à ce que les petites écailles se décollent. Puis le serpent détache l'ancienne peau appelée exuvie en rampant sur de la végétation, des écorces, des roches…

La mue se déroule de la tête vers la queue du serpent. Elle est totale, c'est à dire que le serpent perd toutes ses écailles. D'ailleurs l'exuvie est souvent composée d'une seule pièce. [16]

Photo 5 : Exuvie d'une vipère dans une prairie en France. [17]

La fréquence des mues dépend de multiples facteurs comme l'espèce de serpent, son âge, son sexe, sa taille, mais aussi sa nutrition, la température et l'humidité de son environnement. Ainsi chez certaines espèces la mue a lieu tous les 20 jours, chez d'autre une seule fois par an. La 1e mue d'un serpent à lieu rapidement après sa naissance. Au long de sa croissance le processus de mue devient de moins en fréquent. En effet tout serpent grandit tout le long de sa vie, mais de moins en moins vite. [16]

Il est enfin intéressant de noter que des études ont montré que des blessures physiques sur la peau du serpent ou même la volonté de s'accoupler peuvent entraîner une mue. [16]

3.3 Anatomie interne

Voici un schéma montrant tous les organes des Vipères ainsi que leurs position. L'anatomie interne du Bothrops est sensiblement la même.

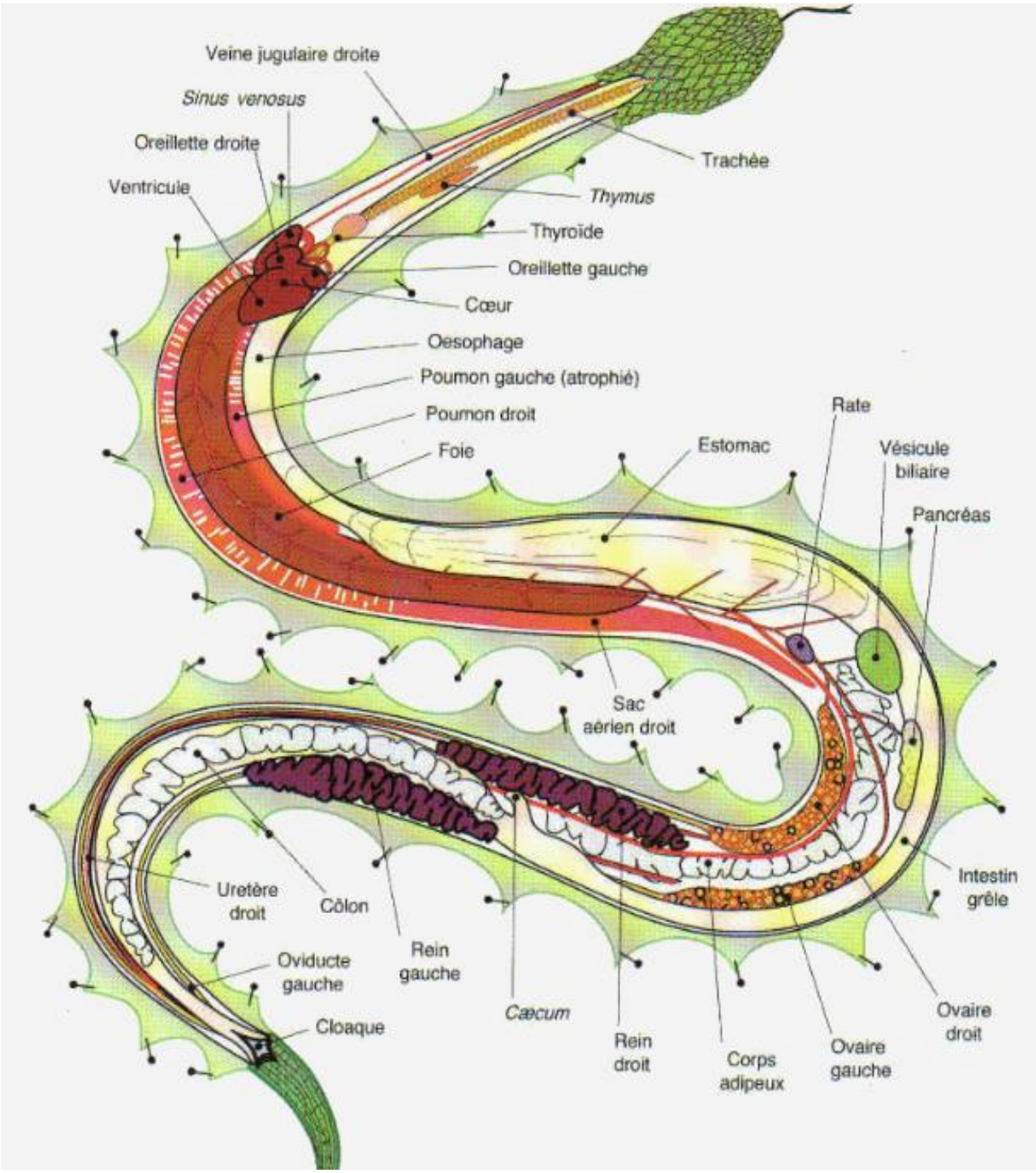


Figure 8 : Anatomie interne générale des *Viperidae*. [18]

On s'aperçoit donc que l'anatomie interne des serpents est ressemblante à celle des autres vertébrés. La seule grande différence est la disposition longitudinale des différents organes due à leur forme étirée. Des organes, comme le pancréas, les reins et les ovaires, sont donc allongés et d'autres comme le poumon gauche se retrouve atrophié tandis que le poumon droit représente près d'un quart de la longueur du corps des vipères. Ce poumon est peu alvéolé, il y a donc peu d'oxygénation ce qui explique en partie le faible métabolisme des serpents qui sont donc résistants à l'anoxie. Pour idée, une vipère peut suspendre sa respiration pendant près de 95 minutes. [11]

Autre particularité anatomique des serpents : l'excrétion des selles et des urines se fait par un conduit commun appelé cloaque. Cette singularité résulte de l'anastomose entre l'uretère et les intestins. A noter que les serpents ne possèdent pas de vessie. [11]

Au niveau cardiaque, comme chez la plupart des reptiles, les Bothrops possèdent deux oreillettes totalement asymétriques et un unique ventricule divisé par une membrane incomplète. Chez les vipères le cœur se trouve dans le tiers antérieur du corps pour assurer un bon équilibre de la pression artérielle dans toutes les positions adoptées. [11]

Enfin pour les organes reproducteurs, ils sont allongés, pairs et généralement situés l'un derrière l'autre. Chez les mâles, on parle d'hémipenis. Au repos ils sont logés dans la queue et possèdent un corps caverneux permettant l'érection. A l'extrémité des hémipenis on retrouve des tubérosités qui vont faciliter le maintien de l'organe lors de l'accouplement. Chez la femelle, l'organe reproducteur se nomme hémiclitoris. [11]

3.3.1 Ostéologie

Dans cette partie, nous aurons pu parler de la denture des serpents. Cependant par choix, j'en parlerai dans la partie concernant l'appareil venimeux des serpents, puisque les crochets sont la voie d'entrée du venin dans le sang des proies du Bothrops. Nous parlerons donc du squelette céphalique du Bothrops sans aborder sa denture.

3.3.1.1 Squelette céphalique

C'est ce squelette céphalique qui définit le règne des *Ophidiens*. En effet, ces derniers ont un crâne d'une simplicité évidente par rapport aux *Sauriens*. On ne retrouve pas par exemple d'arc temporal, on retrouve une boîte crânienne fermée en position antéro-inférieure par le pariétal et les frontaux. Tout de même le crâne des serpents est divisé en deux parties : le neurocrâne et le splanchnocrane. [19]

- Le neurocrâne :

Cette partie caractérise les os qui vont protéger la boîte crânienne (os pariétal, basisphenoïdes, prootiques) et l'encéphale. On retrouve aussi tous les os du museau, qu'ils soient protecteurs (prémaxillaire en forme de T), ou qu'ils aient un rôle dans l'ouverture buccale. Cette dernière est assurée par un système d'articulations particulièrement développé chez les vipères. En effet, elles possèdent 2 os frontaux qui vont établir une articulation mobile, d'une part avec 2 os préfrontaux (disjoints et réduits par rapport aux autres serpents pour augmenter le mouvement d'ouverture), et d'autre part avec les deux os nasaux (également raccourcis) et les deux os septo-maxillaires. [19]

On retrouve aussi des os importants pour la protection du condyle olfactif, assurant la protection et le passage des nerfs (exoccipitaux, basiocciptal, supraoccipital). Il est intéressant de noter que les *Bothrops* possèdent deux os post-orbitaux qui limitent postérieurement les orbites, qui ne sont pas présents chez tous les *Viperidae*. [19]

- Le splanchnocrane :

Il est composé de différentes parties. Il regroupe les os du palet (2 maxillaires, 2 palatins, 2 pterygoïdes, 2 ectopterygoïdes et 2 quadratas). Les quadratas (os nasal sur la figure ci-dessous) sont particulièrement développés et sont inclinés vers l'arrière chez les *Viperidae*. En effet ce sont des serpents solénoglyphes et la disposition particulière de ces dex os permet le recul de l'articulation mandibulaire. Autrement dit ils permettent aux vipères de sortir leurs deux grands crochets antérieurs pour injecter le venin. Le splanchnocrane est également composé des os mandibulaires, reliés élastiquement par un muscle et un ligament intermandibulaire qui vont accompagner l'articulation des quadratas. On retrouve également les os de l'oreille moyenne (arc hyoïde). [19]

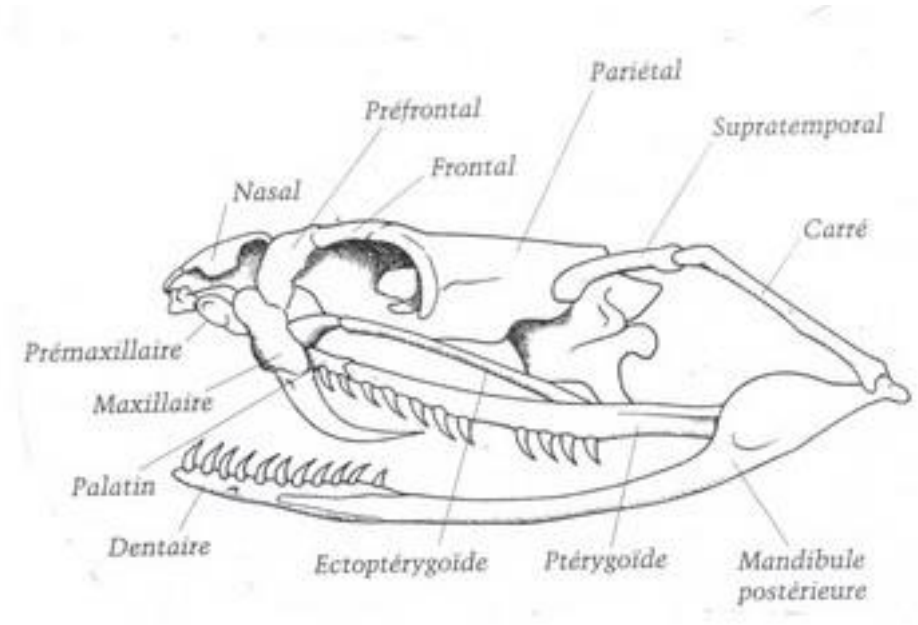


Figure 9 : Vue latérale d'un crâne de vipère. [11]

3.3.1.2 Squelette axial

Les reptiles, et tous les vertébrés en général possèdent un système de squelette axial complexe. De nombreuses études morphologiques sur le squelette axial des Ophidiens ont été réalisées. C'est le cas de R.OWEN (1866) ou de A.T. De ROCHEBRUNE (1881). Cependant leurs études sont anciennes, et aujourd'hui il est sûr que la structure vertébrale de certains serpents, notamment les Viperidae et notre Bothrops, est plus complexe. Cependant voici les principaux composants du squelette axial des serpents. [20]

- Les vertèbres :

Comme chez tous les Amniotes, les vertèbres de tous les serpents sont de types gastrocentriques. Elles sont composées de deux pièces principales : l'arc neural et le centrum (ou corps vertébral, avec une hypapophyse qui porte sa face inférieure. A.CLIGNY (1899) va mener une étude sur les vertèbres de la queue des Viperidae. Il en conclut que vers l'anus, l'hypapophyse réalise une bifurcation progressive et est remplacé dans les vertèbres de la queue par deux apophyses parallèles. Les apophyses caudales sont nommés haemophyses. Ces structures plus fines vont avoir un rôle pour la mobilité de la queue des serpents. [19]

Voici le schéma de vertèbres dorsales d'un genre particulier de *Vipera natiensis*, très proche de la structure des vertèbres des Bothrops. Il existe beaucoup de types de vertèbres différents chez les serpents, mais voici leur aspect global. [21]

Ces vertèbres vont composer ensemble la colonne vertébrale. Comme chez tous les vertébrés elle est subdivisée en différentes parties.

- Région cervicale :

L'**atlas** et l'**axis**, sont les deux premières vertèbres en partant de la tête. L'atlas est une vertèbre incomplète alors que l'axis est plus complexe. Les deux sont articulés ensemble par 3 facettes qui se prolongent latéralement et inférieurement sur l'axis. La morphologie de cet axis est particulière chez les *Viperidae*, avec une hypapophyse dirigée vers l'avant pour permettre la verticalisation de ces serpents. [19]

Figure 10 : Atlas de *Coluber jugularis* (vue face latérale). [19]
(Légende : **n** = neurépine, **an** = arc neural, **ptz** = postzyhapophyse, **pl** = pleurapophyse, **hc** = hypocentrum).

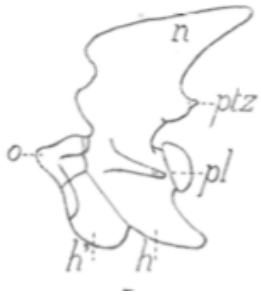


Figure 11 : Axis de *Coluber jugularis* (vue face latérale). [19]
(Légende : **o** = apophyse odontoïde, **h** = hypapophyse, **h'** = hypapophyse de l'axis. Pour les autres lettres voir *Figure 10*).

- Région dorsale :

Cette région s'étend de l'axis jusqu'à l'anus des serpents. Cette limite postérieure correspond à la dernière vertèbres munit de côtes libres. Les vertèbres qui la composent sont globalement comme décrites plus haut. Les hypapophyses, soudées en arrière du centrum sont présentes dans les premières vertèbres, puis celles en région postérieure se réduisent chez les *Viperidae* notamment.

Les vipères comptent environ 150 à 250 vertèbres dorsales selon les espèces. A noter que certains spécimens d'*Archaeophis* (anaconda) chez les pythons peuvent posséder plus de 400 vertèbres. [19]

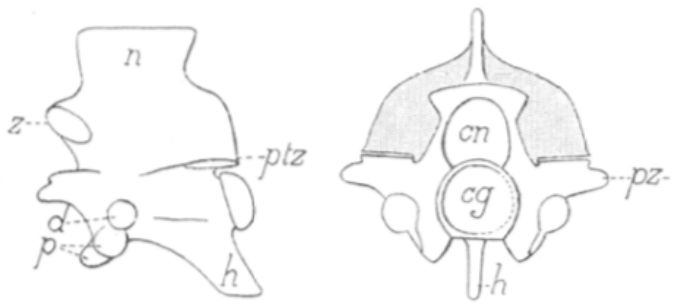


Figure 11 : Vertèbre dorsale antérieure de *Coluber jugularis* (à gauche vue latérale droite et à droite vue antérieure). [19]
(Légende : **z** = zygosphène, **d** = diapophyse, **p** = parapophyse, **cn** = canal neural, cg = canal glénoïde. Pour les autres lettres voir *Figure 10* et *Figure 11*).

- Région caudale :

Troisième et dernière région du squelette axial des serpents, elle est caractérisée par la suture des côtes à la vertèbre. Comme vu précédemment l'hypapophyse des vertèbres laisse place à des haemapophyse dont la forme varie selon les espèces. Dans la région caudale antérieure on compte de 5 à 10 vertèbres, selon les espèces de vipères, qui sont très raccourcies. Derrière on a une région caudale moyenne et postérieure avec des vertèbres qui s'allongent progressivement, en même temps que leur taille diminue. Il y aura autant de vertèbre que la queue du serpent est longue. Il est intéressant que chez les *Crotalinae*, les neurépines des dernières caudales sont plus élevée, plus courte, et sont soudées les unes aux autres. Elles forment donc une structure plus rigide caractéristique de la queue des crotales. [19]

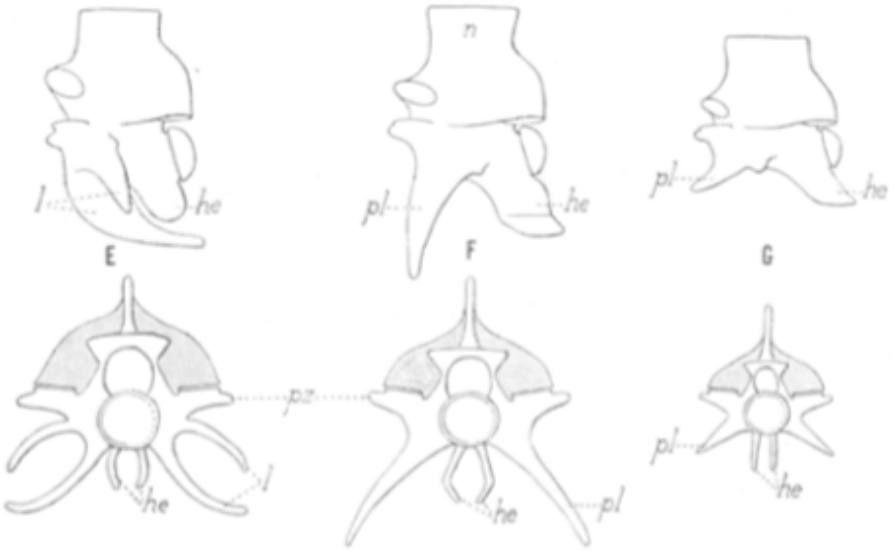


Figure 12 : Vertèbres caudales antérieure (E), moyenne (F), et postérieure (G) de *Coluber jugularis* (vue de face latérale droite en haut, et vue de face antérieure en bas). [19]
(Légende : he = haemapophyse, l = lymphapophyse, pz = prézygapophyse, pl = pleurapophyse).

3.3.2 Organes sensoriels

3.3.2.1 L'ouïe

Nombreux sont ceux qui pensent que le serpent est un animal sourd. Certes il ne possède pas d'oreille externe, mais grâce à son oreille interne, il peut capter et analyser toute sorte de vibrations. Longtemps les études ont assuré que seules les vibrations du sol étaient captées par des mécanorécepteurs répartis le long du corps du reptile. Cependant il est prouvé aujourd'hui que les vibrations aéroportées sont également analysées. Il est également très intéressant d'observer que le serpent adopte un comportement différent (prédateur ou défensif) en fonction des vibrations qu'il perçoit. [22]

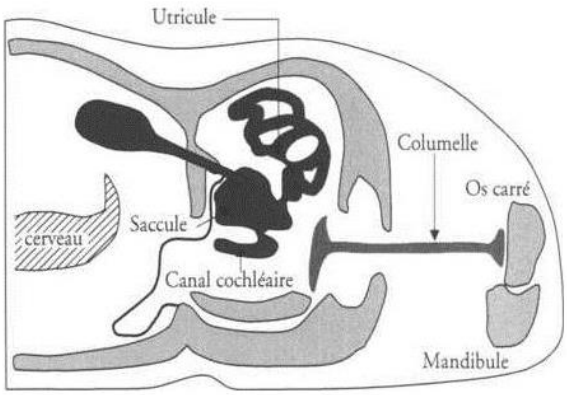


Figure 13 : Schéma de l'oreille interne d'un *Bothrops jararaca*. [11]

Comme on le voit sur le schéma ci-dessus, l'oreille moyenne est très rudimentaire. Elle n'est composée que de la columelle. Cette dernière assurent le rôle du tympan des mammifères en captant tout type de vibrations extérieures et en les transmettant à l'oreille interne. [23]
Cette oreille interne est organisée de façon particulière :
- le canal cochléaire est fortement développé chez les serpents du fait de l'absence d'oreille externe. C'est le seul organe du serpent qui permet l'audition à proprement parler. En effet sa membrane basilaire capte les vibrations captées par la columelle et transmise par l'os carré. [11]
- les canaux semi-circulaires, le saccule et l'utricule assurent l'équilibration du serpent. Ce système est particulièrement important lors de l'attaque des vipères afin qu'elles puissent conservées leur équilibre malgré une brève verticalisation de leur corps. [23]

3.3.2.2 La vue

L'œil des Bothrops ne possède pas de paupière, c'est une écaille transparente fixe qui assure le rôle de protection. [11]

La rétine des Bothrops est bien plus développée que celle de certains serpents. Tous les serpents ont une rétine au moins composée de bâtonnets qui assurent la vision achromatique crépusculaire. Les serpents qui possèdent une vision diurne, possèdent en plus des cônes qui

captent la lumière et la réfléchissent. Quasiment toutes les vipères, possèdent elles une structure et un agencement de la rétine encore plus développés avec un agencement de bâtonnets et de cônes très complexe. [11]

Le cristallin du Bothrops, et de tous les serpents, est relié aux muscles ciliaires qui assurent un déplacement du cristallin d'avant en arrière. A l'image de l'objectif d'un appareil photo, cette fonction permet aux serpents une accommodation visuelle et une mise au point de l'image sur la rétine.

Enfin la pupille est de forme elliptique et peut se dilater ou se rétrécir en fonction de la luminosité. [11]

La vue a un rôle prépondérant pour la chasse des vipères, c'est sans doute pour cela que la rétine de ces dernières est particulièrement développée. En effet une étude a prouvé que la vue permettait à *Vipera aspis* de traquer ses proies non encore mordues. Et cela de jour comme de nuit. [23]

3.3.2.3 Le goût et le « toucher »

Les serpents ne possèdent pas les sens du goût. Entre un mulot ou une musaraigne, ils ne feront pas la différence.
Pour le sens du toucher, je serai moins catégorique. Certes ils ne l'ont pas vraiment, ils n'ont même pas de membre. Cependant ils sont composés de divers organes bien particuliers qui vont permettre à cet Apode de reconnaître et d'évaluer son environnement proche.

L'organe de Jacobson est situé juste sous les fosses nasales. Cependant il permet aux serpents (et à de nombreux autres mammifères) d'établir une voie de communication bien différente de celle de l'olfaction. [24]

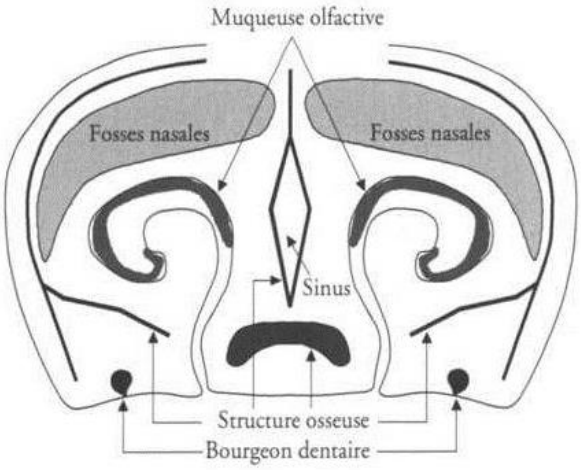


Figure 14 : Coupe sagittale de l'organe de Jacobson. [11]

On l'appelle également organe voméronasal et il ne va pas avoir un rôle dans l'odorat à proprement parlé. Il est relié à la langue du serpent et va capter des signaux chimiques grâce aux nombreuses cellules neuroréceptrices qui le tapissent. On retrouve principalement deux types de récepteurs : les voméro-récepteurs 1 et 2 (VR1 et VR2) qui sont réparties dans de très nombreuses microvillosités afin d'établir une surface de communication tout à fait singulière et très importante pour la survie des serpents. [24]

Cette communication n'a pas qu'un rôle important pour la quête de proie, en effet VR1 et VR2 peuvent également capté des signaux chimiques (phéromones par exemple), assurant ainsi un rôle primordial pour l'accouplement des serpents, ou leur puberté. En effet les récepteurs, une fois stimulés, induisent la transmission de divers neurotransmetteurs. Ces derniers vont activer des neurones dont les axones proximaux forment le nerf vomeronasal. Ce nerf est directement relié au système limbique (système « émotionnel ») directement connecté à l'hypothalamus. Cette communication aboutira à la sécrétion d'hormones avec des fonctions bien différentes. [25]

La langue, qui est bien particulière chez les serpents : longue et bifide. Elle assure bien sur un rôle de système d'alerte face aux prédateurs ou entre congénères. Elle a également un rôle tout à fait particulier dans la reconnaissance de l'environnement pour le serpent. Notamment au cours de la chasse. Une étude a montré qu'elle était prépondérante après morsure, une fois le venin injecté dans la proie. Elle permet en effet aux Bothrops de poursuivre sa proie jusqu'à ce que le venin face son effet. [23]

3.3.2.4 Les fossettes thermosensibles

Les crotales (et donc les Bothrops), les boas et les pythons ont développé des organes supplémentaires, uniques dans le règne animal, qui sont en réalité des capteurs de chaleur.
Les Bothrops possèdent une paires de fossettes (entre les yeux et les narines) appelées loréales qui sont bordées par de minuscules écailles s'ouvrant sur l'avant. On a d'ailleurs longtemps cru que c'était une paire de narines supplémentaires. [26]
Ces loréales sont plus développées que les fossettes des boas et des pythons. En effet le Bothrops jararaca peut détecter des variations de chaleur de 0,001°C.

Les fossettes sont constituées de deux cavités séparées par une fine membrane et tapissées par des cellules épithéliales très fines. Cette membrane concentre de nombreux thermorécepteurs qui vont détecter d'infimes variations de chaleur dans l'environnement du Bothrops. [16]
Concrètement, la fossette est constituée d'une chambre interne remplie d'air qui est reliée à l'environnement extérieur via un étroit canal qui s'ouvre juste devant l'œil. Ceci va permettre au Bothrops d'équilibrer la pression de l'air de chaque côté de la membrane afin d'enregistrer la chaleur extérieure. [26]

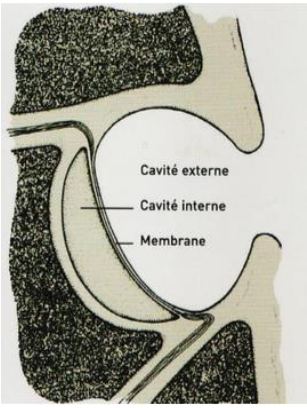


Figure 15 : Fossettes thermosensibles d'un Bothrops. [10]

- Fonctionnement des fossettes :

La chaleur émise par les animaux à sang chaud est captée par les récepteurs les plus externes de la membrane. La différence de température de part et d'autres de la membrane va permettre au Bothrops de savoir si il s'agit de la chaleur émise par une proie, ou un prédateur, ou s'il s'agit de la radiation d'un objet chaud, ou simplement d'un courant d'air chaud. [16]

Comme mentionné précédemment, les fossettes des crotales sont plus développées que les autres. Ceci est dû au fait que leur chambre à air (absente chez les boas et les pythons) limite considérablement les pertes de chaleur améliorant ainsi la détection des rayonnement infrarouge. De ce fait, la proie en mouvement dégage de la chaleur qui est perçu par la fossette thermique elle-même relié à l'œil. Donc le Bothrops perçoit si la source de chaleur est en mouvement ou au repos. [26]

En effet, le trajet des voies nerveuses issues des fossettes aboutit dans une zone spécifique de l'encéphale qui va décoder les informations visuelles superposant ainsi la fonction visuelle avec la sensibilité thermique. Ce sont des neurones particulières qui vont traiter et additionner les deux types d'informations ce qui permet au Bothrops d'établir une image quasi-visuelle de sa proie. Ceci permettra au serpent de mordre efficacement sa proie sans réellement l'avoir vue au préalable. [26]

Pour résumer, le Bothrops jarraraca va être tout d'abord alerté par des vibrations. L'identification de la proie se fait via sa langue et les organes de Jacobson. Dès qu'il s'en rapproche, ce sont ensuite les fossettes qui vont lui fournir les informations nécessaire à l'attaque. En fonctionnant conjointement, les deux fossettes vont analyser les variations thermiques de chaque côté de sa tête, ce qui va lui permettre de détecter sa proie, ou le danger, à plusieurs mètres de distance et ceux même dans l'obscurité la plus totale, ou même si la proie est cachée derrière un objet.

Des études ont en effet montré qu'un crotale aveugle (c'est-à-dire avec les yeux cachés) est capable de capturer sa proie 48 fois sur 49 essais. Par contre un crotale avec les fossettes recouvertes et les yeux intacts ne va capturer sa proie que 4 fois sur 15. [16]

CONCLUSION

Au cours de cette partie, je vous ai donc présenté le Bothrops jararaca, une vipère bien singulière appartenant à la famille des crotales. Ce serpent, très développé parmi ses congénères, constitue dans son habitat, une véritable arme de chasse, ou de défense.
Dans certains villages du Sud-Est brésilien, il représente une grande menace pour les habitants puisque sa morsure peut rapidement être létale. Mais les effets létaux de son venin vont également permettre, après des années d'études et de recherches, de mettre au point des traitements pour différentes pathologies humaines comme l'hypertension artérielle ou certaines anomalies de la coagulation.

Après avoir présenté l'appareil venimeux du serpent, ce sont les composants et les effets du venin du Bothrops jararaca que nous allons étudier dans la deuxième partie de cette thèse.

PARTIE 2 :
VENIN ET ENVENIMATION

4 L'APPAREIL VENIMEUX

Chez les Serpents, l'appareil venimeux est un système complexe. Il est composé, entre autre, d'une glande spécialisée, qui a pour rôle de sécréter une substance toxique : le venin, et de crochets venimeux capable d'injecter le venin chez une proie ou un agresseur.
Historiquement, il est admis que la fonction venimeuse est apparue relativement tard chez les serpents et s'est faite à partir d'une évolution des glandes salivaires. Initialement, il permettait aux serpents de lubrifier les aliments et d'entamer le processus de digestion. Ce n'est que par la suite que les serpents auraient développé des toxines spécialisées pour immobiliser ou encore tuer leurs proies. On pourrait donc penser que le rôle du venin est accessoire mais c'est celui qui nous concerne le plus. [27]

4.1 La denture

Il existe 4 groupe de serpents répartis selon leurs dentures :

- Les **aglyphes** sont démunis de crochets et de glande à venin. Cependant il est intéressant de noter que quelques couleuvres sécrètent une salive plus ou moins toxique alors qu'elles sont dépourvues de crochets. Aussi surprenant que cela puisse paraître, cette disposition n'est pas la plus primitive puisqu'on peut considérer que certains couleuvres aurait perdu leur capacité venimeuse au cours de l'évolution. [28]

- Les **opistoglyphes** ont une de leurs dents située en arrière de la mâchoire supérieure. Souvent plus grande que les autres, elle est creusée d'un sillon qui assure le passage du venin. A côté de cette dent, on en retrouve d'autres plus petites, parfois creusées d'un canal qui n'est pas relié à une glande venimeuse. On retrouve cette denture sur la couleuvre de Montpellier par exemple. [28]

- Les **protéoglyphes** possèdent un ou plusieurs crochets en avant des os maxillaires. Ces crochets sont souvent accompagnés de dents dont la taille décroit progressivement

vers l'arrière. L'ouverture du sillon au niveau des crochets permet notamment à certains cobras de cracher leur venin à une certaine distance pour toucher leur proie. [28]

- Les **solénoglyphes** possèdent le système venimeux le plus élaboré de l'ordre des serpents. C'est la denture du Bothrops jarraraca. Le crochet est ici une dent très longue avec un canal venimeux clos sur toute la longueur. Ce crochet se rattache à un os maxillaire court et articulé à l'avant de la mâchoire permettant l'injection en profondeur du venin ainsi que le repliement des crochets quand ils sont au repos. [28]

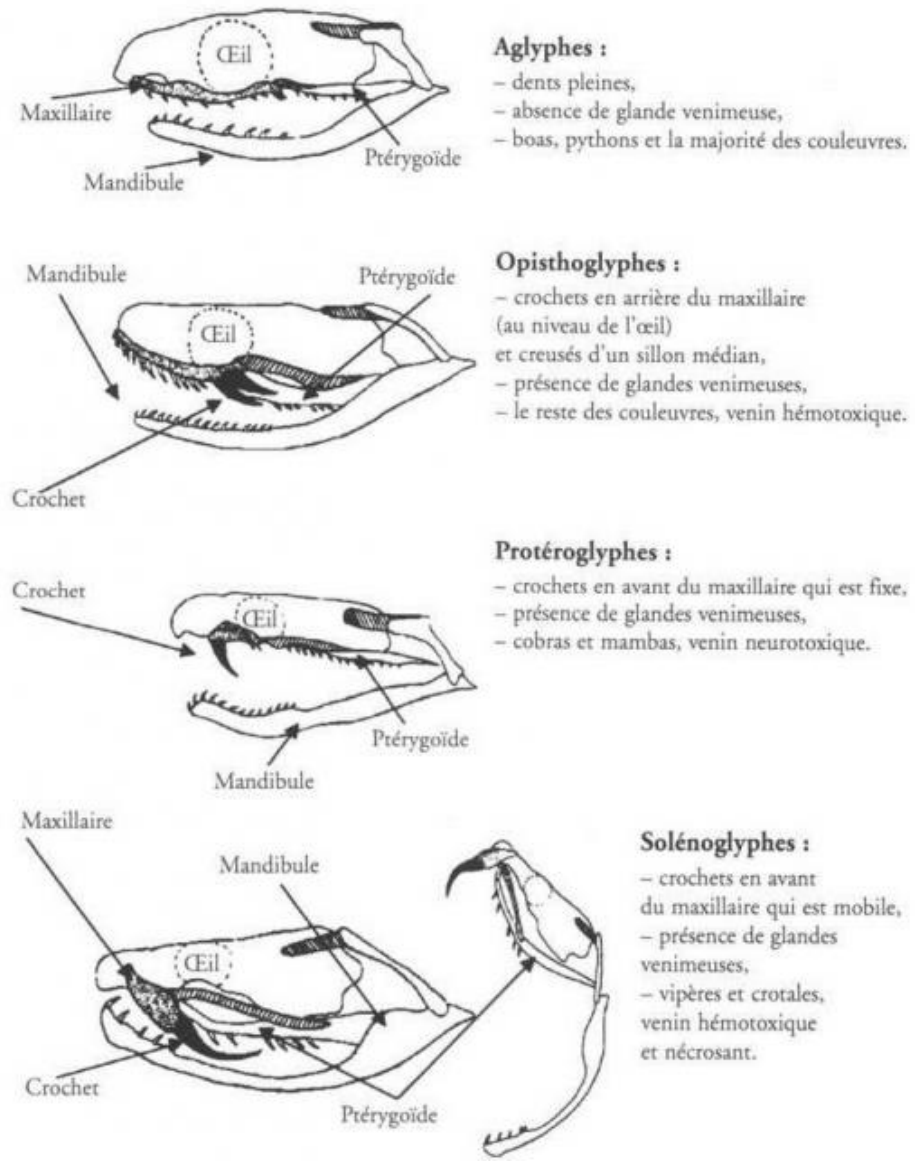


Figure 16 : Les dentures des différents Serpents.[27]

L'articulation caractéristique des os du crâne des *Viperidae*, et tout autant du Bothrops Jarraraca, lui permet de mordre et d'avaler des proies de grande taille. Le maxillaire est court et il pivote autour de l'ectoptérygoïde animé par le ptérygoïde. Cette articulation permet au

crochet venimeux de se dresser prodigieusement vers l'avant en position d'attaque. Ce dernier possède une gaine muqueuse qui l'entoure et permet l'affrontement du canal issu de la glande venimeuse avec la canalicule à la base du crochet. La forte musculature entourant la glande à venin permet une injection sous pression. Une véritable arme. [27]

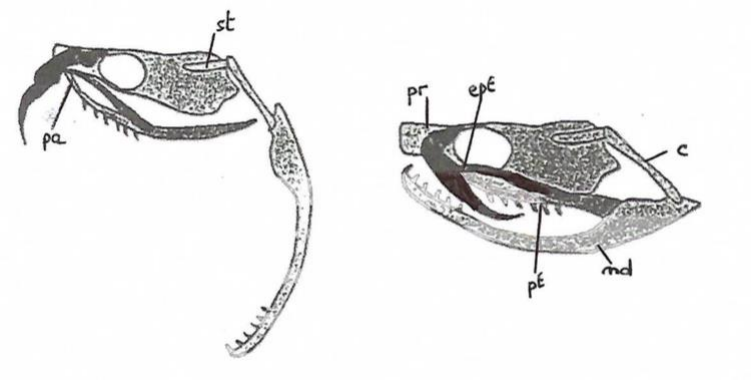


Figure 17 : Squelette d'un Solénoglyphe. [28]
(Légende : (mx) = os maxillaire, (ept) = ectoptérygoïde, (pa) = os palatin, (pr) = os préfrontal, (pt) = ptérygoïde, (c) = carré, (st) = supratemporal, (md) = os mandibulaire).

D'après la figure ci-dessus, on peut dire que la mâchoire supérieure comporte 4 os : le maxillaire, le ptérygoïde, l'ectoptérygoïde qui unit les deux précédents, et le palatin qui est souvent caché par le maxillaire. On a également deux os qui relient la mâchoire supérieure avec la boîte crânienne : l'os préfrontal et le carré. Le carré s'articule avec le mandibulaire qui forme la mâchoire inférieur et avec l'os supratemporal relié à la mâchoire supérieure. [28]

4.2 La glande à venin

Le venin des serpents est produit chez toutes les espèces par une glande spécialisée. On retrouve la glande de Duvernoy chez certaines espèces (*Colubridae* notamment), et des glandes plus spécialisées. Ces glandes se situent le long de la mâchoire supérieure en arrière de l'orbite. Elle est reliée au crochet venimeux via un canal excréteur. Il est assuré, qu'au cours de l'histoire, c'est l'évolution de cette glande qui entrainera la spécialisation du venin. Les premières substances actives synthétisées par la glande étaient vraisemblablement des enzymes dont le but étaient de digérer une proie. [27]
Avec le temps et l'évolution, la salive s'enrichit de toxine d'origine pancréatique. En effet on retrouve de nombreuses enzymes pancréatiques dans le venin des serpents (amylases, phospholipases, protéases). Avec ses enzymes, le venin du serpent permet à certaines espèces d'immobiliser voire même de tuer leurs proies. Cette évolution des glandes, d'abord labiales, puis plus complexes en arrière de la mâchoire supérieure se fait en même temps que la modification des os du crâne et de la dentition. [27]
L'origine pancréatique de ses toxines permettrait également d'expliquer la présence d'inhibiteur enzymatique (des alpha-globulines de haut poids moléculaire pas entièrement

identifiées) dans le sang qui protège le serpent des effets de son propre venin si celui-ci rejoint le compartiment sanguin. [29]
Des études ont cependant montrées que d'autres facteurs entrent en jeu pour neutraliser la toxicité du venin. En effet, la régulation du pH, la chélation de métaux cofacteurs des enzymes du venin, ainsi que des protéines de l'épithélium qui tapisse la glande assurent un rôle protecteur. [29]

Chez les *Viperidae*, mais aussi chez les *Elapidae* et les *Actractaspidinae*, les glandes venimeuses et leurs toxines ont ainsi évolué pour produire de puissants venins. En effet la glande venimeuse, initialement précaire en position labiale supérieure ,va s'entourer d'une gaine fibreuse et migrer en arrière de l'œil en région temporale. [27]
Chez les B*othrops*, et chez la totalité des *Viperidae*, il y a deux glandes. Une glande séreuse dite « principale » qui synthétise et stock le venin, et une glande muqueuse dite « accessoire » ou « secondaire » qui active le venin au moment de son passage avant d'être injecté. La glande principale est composé d'un très grand nombre de cellules plus ou moins différenciées, appelées chondrocites, qui ont un rôle clé dans la synthèse des toxines du venin. Elle possède une lumière centrale et est divisée en lobes qui permettent le stockage du venin.
La glande accessoire se retrouve donc au bout du canal excréteur juste avant son ouverture. Elle est à la base du crochet venimeux. [27]

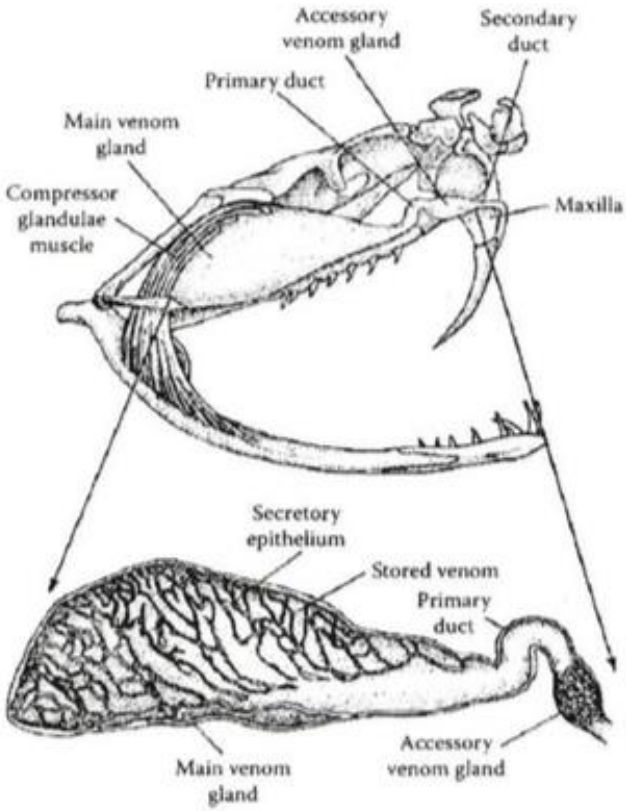


Figure 18 : Glande venimeuse des *Viperidae*. [2]

5 LE VENIN

5.1 Composition du venin

La composition du venin de serpent, que cela soit la structure biochimique ou la composition en enzymes ou toxines, est très variable. Cela est clair étant donné que la morsure de tel ou tel serpent aura des effets cliniques différents. C'est la grande diversité d'espèces de serpents venimeux qui est à l'origine de cette diversité de composition du venin. Par exemple, les *Viperidae* vont avoir un venin riche en enzymes, alors que le venin des *Elapidae* aura plutôt une forte concentration en toxines.
D'importante variation peuvent même être observées au sein de deux serpents d'une même espèce et même au sein d'une fratrie. [30]

5.1.1 Les enzymes

5.1.1.1 Les hydrolases

On retrouve plusieurs types d'hydrolases qui ont un rôle dans l'action du venin.
La phospholipase A2 (PLA2) a un rôle essentiel. Elle permet de transformer la lécithine en lysolécithine qui va modifier la perméabilité des globules rouges. Cela induit une hémolyse qui induit à son tour un syndrome œdémateux et une hypotension favorisant la diffusion du venin.
Cette enzyme a également un rôle anticoagulant en hydrolysant des lipides présents dans la chaine de la coagulation. [31]
Il s'agit d'une petite protéine (12-15 kDa) de 119 à 134 acide aminés. Les phospholipases des vipères, et du Bothrops, sont de type II, et on peut elles-mêmes les classer en deux groupes : les Asp_{49}PLA2 et les PLA2 homologues (l'aspartate en position 49 est substitué par un autre acide-aminé). Cette substitution va entrainer une diminution de la liaison au cofacteur de l'enzyme, le calcium qui va entrainer à son tour une diminution voir une perte de l'activité enzymatique de la PLA2 et une augmentation de son activité nécrotique sur la peau. [32]

La phospholipase A2 va également hydrolyser des lipides membranaire formant ainsi de l'acide archidonique qui est précurseur de substances de l'inflammation comme les prostaglandines et les leucotriènes. [30]

On retrouve également chez les Bothrops des kininogénases qui va provoquer la libération de bradykinine responsable de phénomènes inflammatoires et vasculaires ayant les mêmes conséquences que l'action des phospholipases. [33]
On a aussi des hyaluronidases qui dépolymérisent l'acide hyaluronique entrainant une perte de la viscosité du tissu conjonctif. Cette enzyme très présente chez les Bothrops et chez les

autres serpents puisqu'elles vont permettre la diffusion du venin dans les tissus de l'organisme contaminé. [30]

On a enfin des protéases qui dérèglent le processus de coagulation par deux types d'actions :

- Une enzyme fibrinolytique entraine une inhibition de la coagulation.
- Des activateurs de facteurs V (proaccélérine) et X (Stuart) entraine une exacerbation de cette coagulation, et ce à faible dose. On retrouve ces activateurs chez le Bothrops, on les reverra plus tard.

Ces mécanismes d'actions et ces enzymes seront primordiaux pour renforcer l'action des toxines du *Bothrops jarraraca.* [30]

On retrouve ,de façon générale, d'autres hydrolases dans les différents venins des différentes espèces de serpent. On a, par exemple des phosphodi- et monoestérases qui clivent l'ADN et l'ARN des cellules où le venin s'épand, provoquant ainsi la lyse cellulaire. [1]

5.1.1.2 Les oxydoréductases

On a par exemple la L-aminoacide oxydase qui transforme les acide aminés en corps cétoniques. C'est cette enzyme qui entraine la couleur du venin parfois jaunâtre chez certains serpents grâce à son groupe flavine-adénine-dinucléotide. La coloration du venin ainsi que son pouvoir nécrosant sont proportionnelles à la concentration de cette enzyme.
Chez le *Bothrops jararaca*, on retrouve diverses catalases qui assurent la décomposition des peroxydes, et la formation de radicaux libres cytotoxiques. [1]

5.1.2 Les toxines

Chez les serpents venimeux, on retrouve différents types de toxines synthétisées par les glandes venimeuses. On réalise ici un état des lieux des différentes toxines qu'on retrouve chez l'ensemble des espèces de serpents. Elles ne sont donc pas propres aux Viperidae, ni au Bothrops qui possède une toxine bien spécifique que nous étudierons plus tard.

5.1.2.1 Les neurotoxines

Chez certains, on retrouve des neurotoxines capables d'immobiliser rapidement une proie. Il y a plusieurs types de neurotoxines : celles qui inhibent la transmission synaptique et celles qui l'augmentent de façon excessive (dendrotoxine, fasciculine).
Pour ces toxines, leurs actions est dose-dépendante et non temps-dépendant. En effet, l'action du venin est extrêmement rapide.
Les toxines synaptiques vont, comme le curare, bloquer la transmission en se fixant sur les récepteurs cholinergiques présents sur les fibres musculaires squelettiques (action post-

synaptique), ou vont bloquer la libération d'acétylcholine dans la fente (action présynaptique). [34]

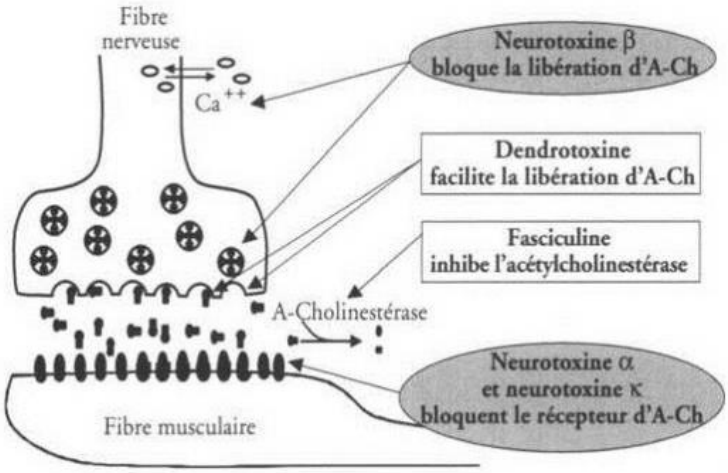


Figure 19 : Mode d'action des différentes neurotoxines. [10]

On retrouve ces toxines chez la plupart des *Elapidae* et chez quelques *Viperidae*, notamment chez *Vipera ammodytes* présente en Europe. Ces toxines sont responsables d'un tableau clinique pouvant être fatale selon la concentration en venin. C'est une urgence thérapeutique, d'autant que la fixation irréversible des toxines rend incertain l'immunothérapie antivenimeuse après quelques heures seulement dans certains cas. [34]

5.1.2.2 Les myotoxines

On les retrouve principalement chez les *Viperidae* et les *Colubridae*. On a par exemple la crotamine du *Crotalus durissus terrificus*, que nous étudierons plus tard.
Ces myotoxines ont pour rôle également d'inhiber la transmission acétylcholinergique. Mais pour cela elles vont bloquer les canaux potassiques et calciques en pré et post-synaptique sans altérer les récepteurs cholinergiques. Pour bloquer ses canaux, les toxines ont besoin de leur pouvoir nécrosant. On parle d'action indirecte car c'est la nécrose du muscles squelettiques qui entraine le blocage des canaux sodiques. [10]

5.1.2.3 Les cytotoxines (cardiotoxines)

Elles sont majoritairement présentes dans le venin des *Elapidae* et provoquent la lyse des membranes cellulaires. Elles fonctionnent en synergie avec les phospholipases vues précédemment.

5.1.2.4 Toxines de l'appareil cardiovasculaire

Il est important de bien comprendre que la majorité des effets cardiovasculaires sont secondaires de l'action du venin sur l'inflammation, la coagulation, ou sur la jonction neuromusculaire.
Cependant il est certain que certains venins possèdent des protéines qui vont avoir une action direct sur le système cardiovasculaire et en particulier sur la pression artérielle.
On retrouve par exemple la dendropeptine ou la safarotoxine qui ont une analogie structurale avec des hormones physiologiques impliquées dans la régulation de la pression artérielle. La dendropeptine mime ainsi l'action des facteurs cardiaques natriurétiques, tandis ce que des études montrent que les safarotoxines ont une analogie avec des endothélines et entrainent une contraction des muscles lisses vasculaires. [30]

Le *Bothrops jarraraca* possède une toxine, la toxine téprotidique, qui va libérer dans la circulation un peptide bien particulier qui va inhiber l'enzyme de conversion responsable de la transformation de l'angiotensine I en angiotensine II. Cela entraine une diminution, d'une part de l'angiotensine qui ne peut plus exercer son action vasoconstrictrice, et d'autre part de l'aldostérone qui assure la rétention du capital sodé. De plus l'inhibition de cet enzyme va dans un second temps entrainer l'accumulation de bradykinine et de prostaglandines qui vont initier une puissante vasodilatation et une réaction inflammatoire.
La conséquence de ce mécanisme toxique, est une baisse brutale des résistances périphériques qui se traduit par une chute de la pression artérielle sans toxicité cardiaque directe. Cet effet peut être létal et est rapide d'installation chez le Bothrops (quelques minutes seulement). [10]
Nous étudierons cette toxine plus précisément dans la partie 3 de cette thèse.

Après avoir fait un état général des différents composants des venins des serpents, afin de voir leur diversité. Nous allons maintenant plus nous attarder sur les toxines spécifiques du Bothrops. Principalement celles ayant des effets sur l'hémostase.

5.1.2.5 Toxines inflammatoires

Certaines toxines du Bothrops jarraraca, stimulent la dégranulation des mastocytes et des macrophages permettant la libération de facteurs pro-inflammatoires (interleukines, TNF-alpha, histidine, sérotonine…) déclenchant une réaction inflammatoire locale comme les enzymes vues précédemment. [2]

5.1.2.6 Toxines de l'hémostase

5.1.2.6.1 Rappel

L'hémostase est un processus physiologique désignant l'ensemble des phénomènes déclenchés par une lésion vasculaire et destinés à limiter les pertes sanguines au niveau d'une brèche vasculaire. Il s'agit d'une balance de phénomène aussi bien pro-thrombotiques ou pro-coagulants, comme anticoagulant. Cette hémostase se compose de deux étapes simultanées

et complémentaires : l'hémostase primaire et la coagulation, puis une dernière étape de fibrinoformation. [10]

- Hémostase primaire :

La première étape de l'hémostase primaire, c'est **l'adhésion des plaquettes** au niveau de l'endothélium vasculaire lésé. Ce sont les protéines pro-thrombotiques (collagène et facteur de Willebrand) de l'endothélium qui vont recruter ces plaquettes. Ceci permet la formation d'un agrégat plaquettaire. La liaison au collagène est directe via des glycoprotéines et des intégrines. Celle au facteur Willebrand est indirecte car les glycoprotéines du facteur ne sont disponibles qu'en cas de liaison vasculaire. [10]

La deuxième étape de l'hémostase, c'est **l'activation plaquettaire**. Dans cette étape, les plaquettes se contractent grâce à leurs microtubules, et émettent des pseudopodes qui vont permettre aux plaquettes de décharger leur contenu dans le milieux extracellulaire. Parmi ce contenu on retrouve notamment le fibrinogène et le facteur V (important pour l'étape suivante), l'ADP (rôle de pro-agrégant en activant les plaquettes), et la sérotonine (rôle vasoconstricteur pour limiter le saignement).
En parallèle de cette activation plaquettaire, les récepteurs au fibrinogène GpIIb/IIIa changent de conformation et deviennent fonctionnels. De plus, l'acide archidonique (phospholipide membranaire) se transforme en thromboxane A2 (TXA2) pro-agrégant.
On a donc pour terminer une amplification de l'agrégat plaquettaire par recrutement de nouvelles plaquettes, qui est lui-même renforcé par la vasoconstriction de la sérotonine. [10]

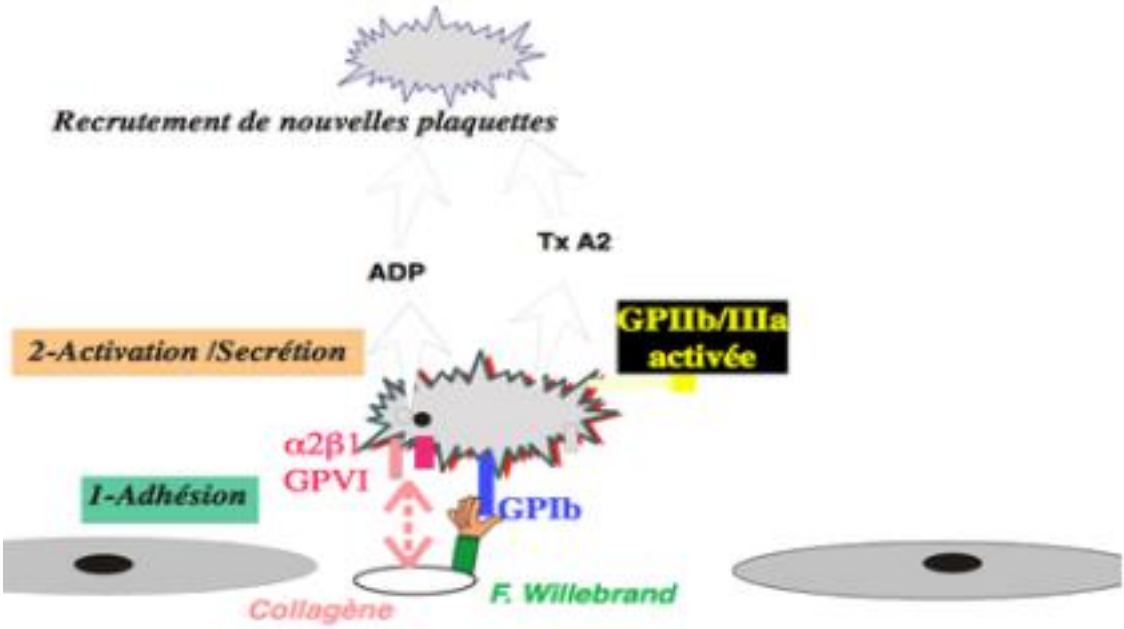


Figure 20 : Schéma simplifié des 3 étapes de l'hémostase primaire. [35]

- La coagulation :

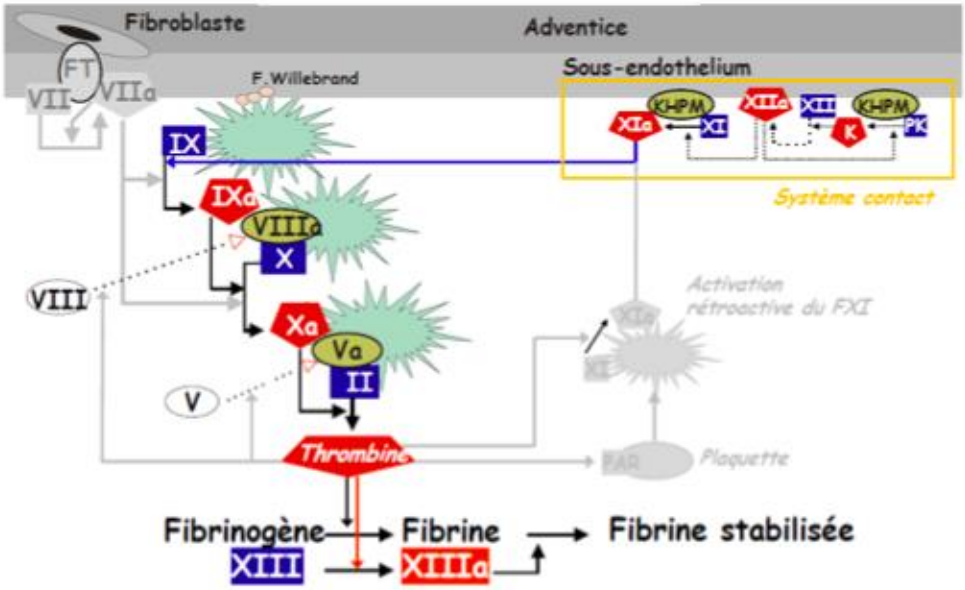
Il s'agit, à proprement parler, d'une série de réactions enzymatiques qui vont aboutir à la formation de réseau de fibrine qui va venir consolider (comme un ciment) l'agrégat

plaquettaire. Les facteurs de coagulation et les inhibiteurs plasmatiques sont les principaux protagonistes de cette étape. [35]

Cette coagulation va commencer par l'arrivée du facteur tissulaire (FT), protéine membranaire portée notamment par les fibroblastes qui vient au contact du tissu vasculaire lésé. Ce FT va interagir et activer le facteur VII qui devient facteur VIIa et va à son tour activer les facteurs IX et X. Le facteur Xa, va lui activer la prothrombine (facteur II) en thrombine (facteur IIa) qui est la molécule centrale de l'hémostase. En effet cette dernière va pouvoir transformer le fibrinogène en fibrine qui va stabiliser l'agrégat plaquettaire. [35]
Cependant ces premières traces de thrombines sont insuffisantes pour créer suffisamment de fibrine, elles vont donc réaliser une auto-amplification. Pour cela elle va activer des cofacteurs (V et VIII). Ceci va aboutir à la formation de complexes tenase (plaquettes activées, facteur IXa et VIIIa) qui vont activer le facteur X en quantité plus importante.
Le système contact va également amplifier la formation de thrombine. Il constitue la voie endogène de l'hémostase et est mineure par rapport à la voie du FT (voie exogène). Il résulte du contact du sous-endothélium lésé avec, 3 protéines dites zymogènes : la prékallikréine (PK), et les facteurs XII et XI, et un cofacteur kininogène de haut poids moléculaire (KHPM). [35]

- <u>La fibrinoformation :</u>

C'est la conversion du fibrinogène soluble en fibrine insoluble. Ce fibrinogène est physiologiquement composé de 6 chaines polypeptidiques. En présence de thrombine, il y a protéolyse de ces chaines libérant des fibrinopeptides (A et B). Ces peptides sont ensuite polymérisés grâce à des liaisons hydrogènes donnant un polymère de fibrine compact mais instable. C'est le facteur XIIIa (activé par la thrombine) qui stabilise ce polymère par des liaisons covalentes. [35]



<u>Figure 21</u> : Schéma de la coagulation et de la fibrinoformation. [35]

Ces différentes étapes permettent donc, au niveau d'un tissu vasculaire lésé, de former un agrégat plaquettaire consolider par un réseau de fibrine compact, qui permettra une fermeture de la brèche en vue d'une future cicatrisation. [35]

Comme le montre la figure ci-dessous, on voit que énormément de venin ont des actions sur l'hémostase. Que cela soit en l'inhibant ou en l'exacerbant cela se traduit souvent par un syndrome hémorragique clinique, parfois brutal, souvent progressif, mais se traduisant souvent par un décès. [10]

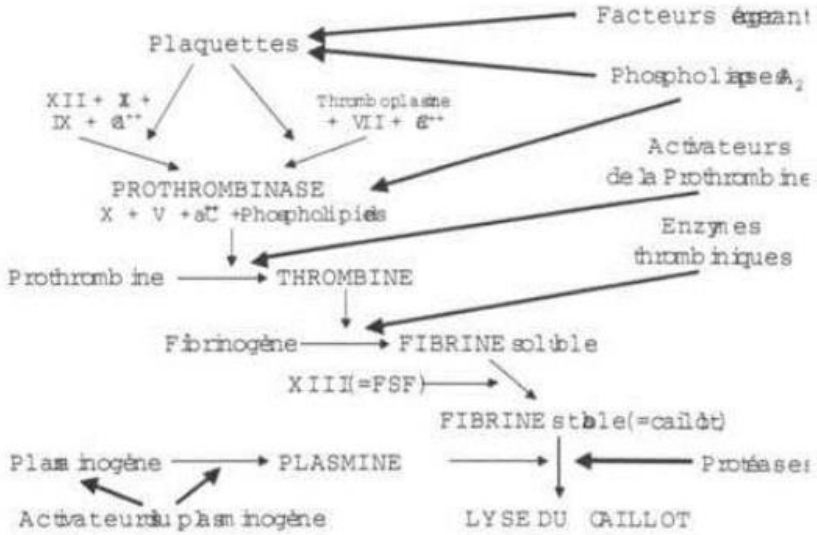


Figure 22 : Différentes actions des composants des venins de Serpents sur la coagulation. [10]

5.1.2.6.2 Action sur les facteurs coagulant

Il existe une multitude de toxines qui causent des troubles de la coagulation dans les différents venins des différentes espèces de serpents. Face à cette diversité, j'ai choisi de m'arrêter ici, et dans les sous-parties suivantes, essentiellement sur les toxines du *Bothrops jararaca*.

Chez le B*othrops jarraraca* donc, le venin, une fois au contact de la circulation sanguine va libérer une substance capable d'activer la prothrombine.
Physiologiquement la prothrombine est hydrolysée au niveau de deux liaisons peptidiques, Arg_{271}-Thr_{272} puis Arg_{320}-Ile_{321}, par le facteur X activé (c'est-à-dire fixé sur le facteur V et sur un phospholipides en présence de calcium). [10]

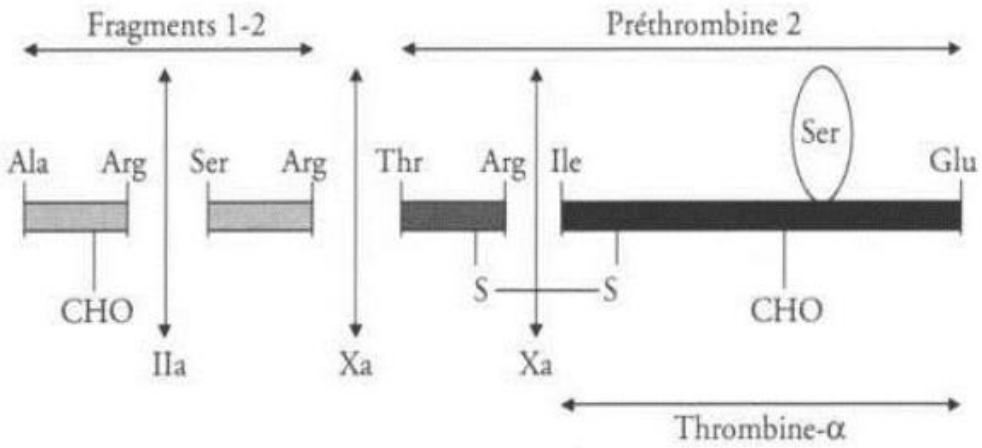


Figure 23 : Site d'hydrolyse de la prothrombine en thrombine-alpha. [10]

Pour faire cela, le venin du Jararaca possède de l'écarine (extraite *d'Echis carnatus* mais présente chez les Bothrops). Cette enzyme de type hydrolase va seulement hydrolyser la liaison Arg_{320}-Ile_{321} ce qui conduit à la formation de meizothrombine. Cette thrombine particulière a des propriétés bien différentes de celles de la thrombine-alpha normalement synthétisée. De plus elle ne nécessite ni cofacteurs, ni calcium pour s'activer et faire basculer la cascade de coagulation sur une voie très toxique pour l'organisme. [10]

5.1.2.6.3 Action anti-thrombinique

Le Bothrops jararaca possède une enzyme bien caractéristique, la Bothrojaracine.
Cette enzyme va inhiber partiellement la thrombine en bloquant les récepteurs du fibrinogène, bloquant ainsi la cascade de coagulation. La séquence peptidique de la Bothrojaracine indique qu'elle appartient à une vaste famille de protéines de venin appelées lectines de type c. [36]

Ces lectines de type c (CTL), sont des glycoprotéines capable de se lier de façon réversible à certaines glucides, hydrate de carbone, ou glycoconjugués. Il existe de nombreux type de lectines avec chacune des activités bien spécifiques dépendantes de leurs cibles.
Outre la Bothrojaracine, on retrouve dans cette famille la Botrocétine qui a une activité un peu différente.

5.1.2.6.4 Action sur les plaquettes

La botrocétine induit la liaison du facteur Willebrand au récepteur GpIb présents au niveau des plaquettes. On a ainsi une augmentation de l'agrégation plaquettaire pouvant aboutir à une hypercoagulation.

L'exemple de cette toxine est particulièrement intéressant. En effet la botrocétine va être utilisée pour le diagnostic de plusieurs maladies hémorragiques d'origine génétique.

5.1.2.7 Exemple de la botrocétine

La maladie de von Willebrand, est caractérisée par une anomalie quantitative ou qualitative du facteur de Willebrand (FW). Ce FW est indispensable pour l'adhésion des plaquettes sanguines durant l'étape de coagulation.

Ce facteur est une glycoprotéine multimérique de très haut poids moléculaire. On le retrouve dans le plasma et au niveau des plaquettes sanguines après avoir été synthétisé par les cellules endothéliales vasculaires. Au cours de l'hémostase primaire, le FW permet l'adhésion des plaquettes sanguines au niveau du sous-endothélium vasculaire lésé, et aussi la formation du thrombus. Ce n'est pas tout, le FW agit également comme transporteur du facteur VIII, limitant ainsi son élimination rapide par dégradation protéolytique.

La botrocétine du Bothrops jararaca, est un hétérodimère composé d'une sous unité alpha composé d'environ 130 acides aminés, et d'une sous-unités béta composée de 125 acide aminés. In vitro, les études pharmacologiques ont montré que cette botrocétine a la capacité d'activer le FW. Ce qui est intéressant, c'est que ce FW, quasiment inactif en condition physiologique, nécessite un activateur pour être dosé. Vous comprenez à présent l'importance de cette toxine. [37]

Pour doser le FW, on prélève le sang d'un patient sous anticoagulant, on centrifuge et on récupère le plasma contenant le FW. On ajoute alors les plaquettes d'un sujet témoin ainsi que la botrocétine, et on mesure l'agrégation plaquettaire induite par le FW du patient sur les plaquettes du témoins via un automate.

Les études pharmacologiques, via des automates sophistiqués, vont montrer que la botrocétine agit au niveau du disulfide du domaine de fixation du GpIb du FW. Une fois fixée, on voit que la botrocétine entraine l'activation du FW qui est reconnu par les récepteurs GpIb plaquettaires. La botrocétine peut se fixer sur le FW, et cela peu importe la conformation spatiale de ce dernier. [38]

Il s'agit donc d'un outil de diagnostic particulièrement important et intéressant notamment pour différencier les différentes formes de la maladie de Willebrand.

6 ETUDE DES VENINS DE SERPENTS

6.1 Extraction du venin

Les méthodes d'extraction des venins de serpents à travers l'histoire et selon les civilisations s'avèrent très diverses.

Par exemple les membres de la tribu Irula en Inde ont une technique qui leur est propre. L'article suit Kali, un jeune homme de 26 ans qui doit capturer des Vipères des Pyramides et de Russel, 2 des 4 espèces de serpents les plus dangereuses du pays. Kali capture les serpents à mains nues avant de les mettre dans un sac en toile. Les serpents sont alors conservés 1 mois au sein d'une coopérative locale. Durant ce mois leur venin sera extrait 4 fois avant de les relâcher dans la nature. [39]

Pour l'extraction Kali place sa vipère dans un pot en terre. Il doit maintenant sortir le serpent en le tenant juste sous la tête puis l'approche d'un verre sur lequel a été tendu un morceau de cuir qui imite la peau des proies. L'animal doit mordre, alors il plonge ses crochets et le liquide mortel s'écoule le long des parois du récipient. [39]

Photo 6 : Extraction du venin d'une vipère. [39]

Cette petite anecdote est fort intéressante et permet à un pays comme l'Inde, qui compte le plus de morts par an dus à une morsure de serpent, de se défendre. En effet grâce au venin donné, qui est ensuite étudié par des organismes spécialisés, cette coopérative d'attrapeurs de serpent a permis de produire une quantité suffisante en anti venin pour approvisionner la plupart des hôpitaux du pays. [39]

Dans le reste du monde, les herpétologues sortent les serpents de leurs cages à l'aide d'un long crochet métallique, les protégeant ainsi de la morsure. Ils le déposent ensuite au sol et l'immobilise grâce à ce crochet. Il est intéressant de noter que, comme Kali en Inde, certains spécialistes préfèrent manipuler le serpent à main nue pour mieux ressentir les réactions de l'animal. [2]

La méthode d'extraction par morsure, comme en Inde, se pratique toujours. On peut également le faire en massant directement la glande à venin ou par stimulation électrique.
Le venin est alors directement utilisé après dessèchement ou alors il est lyophilisé. Il peut ainsi être conservé en ampoule scellée à basse température environ 10 ans. Cependant il est certain que l'action de certaines toxines ou enzymes s'altèrent plus ou moins rapidement. [2]

6.2 Identification des différents constituants

Après avoir extrait, purifié et préparé notre venin, il va falloir séparer ses différents constituants afin de les identifier d'une part, puis de les étudier. Il existe plusieurs procédés de séparation comme l'électrophorèse et la chromatographie.

6.2.1 L'électrophorèse

6.2.1.1 Principe

Il s'agit d'une technique qui va permettre de déplacer et de séparer des ions (atomes chargées), sous l'effet d'un champ électrique. Cette technique nécessite donc que les composants à analyser soit dotés de charges positives ou négatives.
Le principe est simple, un courant électrique est émis entre deux électrodes : une cathode (potentiel positif), et une anode (potentiel négatif). Les différents ions présents dans l'échantillon à analyser vont se déplacer vers leurs électrodes respectives. En effet les anions (chargés négativement) migrent vers la cathode, alors que les cations (chargés positivement) migrent vers l'anode. Les molécules non chargées elles, ne migrent pas.
Selon leurs caractéristiques propres (charge, poids moléculaire…) et les conditions de l'électrophorèse, les différents composants vont donc migrer à des distances différentes, et à des vitesses différentes. Ceci permettra de les séparer et de les identifier.[40]

6.2.1.2 Méthode

Il existe deux grands types d'électrophorèse. L'électrophorèse libre (ou en veine liquide) découverte par Tisélius en 1937 ne permet pas d'assurer une séparation totale des composants. Cependant associée à des méthodes d'optiques (fluorescence, indice de réfraction, absorption…) elle va être utilisée dans certains laboratoires pour mesurer la mobilité électrophorétique et vérifier la pureté des protéines. [41]
L'autre technique d'électrophorèse qui nous intéresse plus c'est l'électrophorèse sur support (ou électrophorèse de zone). Elle est plus précise car elle va utiliser un support poreux, imprégné d'une solution tampon, qui va stabiliser la phase liquide et assurer une séparation quasi-totale des différents composants de cette même phase. [41]

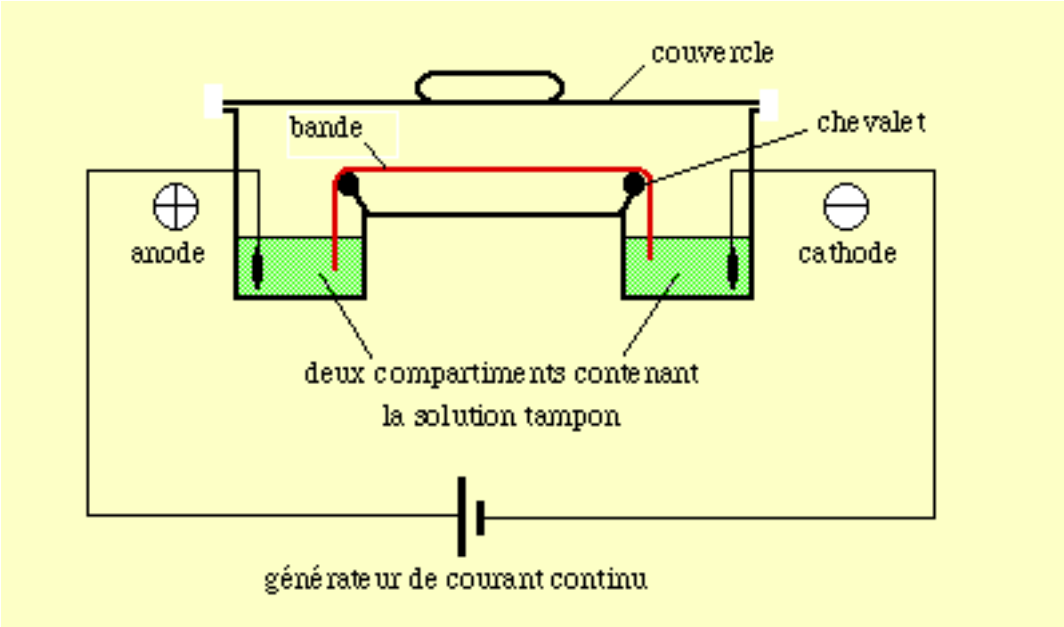


Figure 24 : L'électrophorèse sur support ou électrophorèse de zone. [41]

Pour cette méthode, l'appareillage doit être précis. Le support doit être poreux, homogène et inerte (cette condition n'est jamais totalement respectée). Il peut s'agir

d'acétate de cellulose, de gel d'agarose ,d'acétate ou de silice, ou encore de papier. C'est cette méthode que nous décrirons dans la partie suivante.
La migration des différents composants va donc dépendre de plusieurs facteurs : la charge de la particule (elle-même dépendante du pH isoélectrique de la particule et de celui du solvant), l'intensité du champ électrique , les courants liquidiens, la durée de migration et enfin les facteurs liés à la nature du support. [41]
Les premières études électrophorétiques sur les venins de serpents ont été réalisées par P.König et D.Von Klobusitzky en 1937. Ils ont utilisé la méthode de l'électrophorèse sur papier. [40]

6.2.1.3 Immunoélectrophorèse

L'étude qualitative des différents composants du serpent ne peut être faite précisément qu'à l'aide d'un support sous forme de gel. Cela est dû au fait que ces composants présentent des constantes de diffusion bien trop proches les unes des autres. La technique de l'immunoélectrophorèse va permettre, pour faire claire, de diffuser la source primaire d'un mélange en autant de sources secondaires qu'il y a de composants possédant une charge différente. [42]
Pour cette technique il faut préparer un antisérum, c'est-à-dire un sérum composé d'anticorps qui sont spécifiques des composants du venin à séparer. Le principe de diffusion nécessite une réaction antigène-anticorps. [42]

Pour cela, on va donc utiliser comme support 2 grammes d'Agarose introduit dans un tampon véronal-véronal-sodium à pH = 8,6. On maintient le support et le gel en contact pendant 30 minutes, puis on place le flacon dans un bain-marie froid qu'on va porter doucement à ébullition jusqu'à liquéfaction du gel. On place ensuite le liquide sur une plaque de 13x18 cm qui doit être neuve et sans ébréchure pour éviter les fuites de gel. La re-gélification du contenu se fait pendant environ 10 minutes à température ambiante.
Avec un emporte-pièce on réalise ensuite des puits de 5 micromètres de diamètre dans le gel pour assurer la migration des contenants de notre venin à analyser. On verse nos échantillon avec une concentration en venin bien déterminé pour pouvoir interpréter les résultats. On installe ensuite le circuit électrique avec une cathode et une anode puis on lance le courant. Dans cette expérience la migration a duré 1h30 minutes avec un gradient électrique de potentiel 1,5V/cm. [42]
Pour l'antisérum , on trace une rigole dans le gel, avec un outil spécialisé. On verse l'antisérum et on lance le champ électrique.

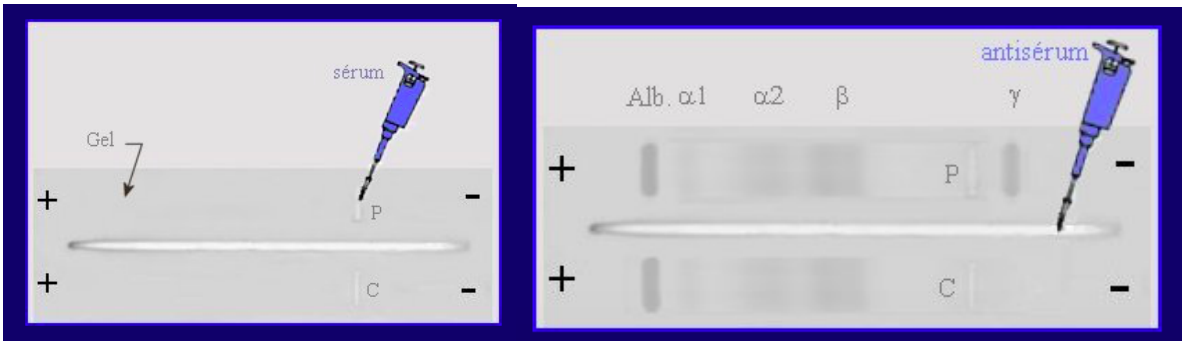


Figure 25 : Schéma d'une immunoélectrophorèse sur protéiques sériques humaines. [43]

Pour pouvoir interpréter les migrations des différents constituants du venin, il faut utiliser une coloration adaptée. Celle de choix est la coloration au Vert de Lissamine – acide acétique – eau (10:100:1000). On réalise également 3 ou 4 rinçages à l'acide acétique 10% pour rendre le fond de l'image blanche.
Cette expérience va permettre d'obtenir des immunogrammes de venins de serpents. [42]

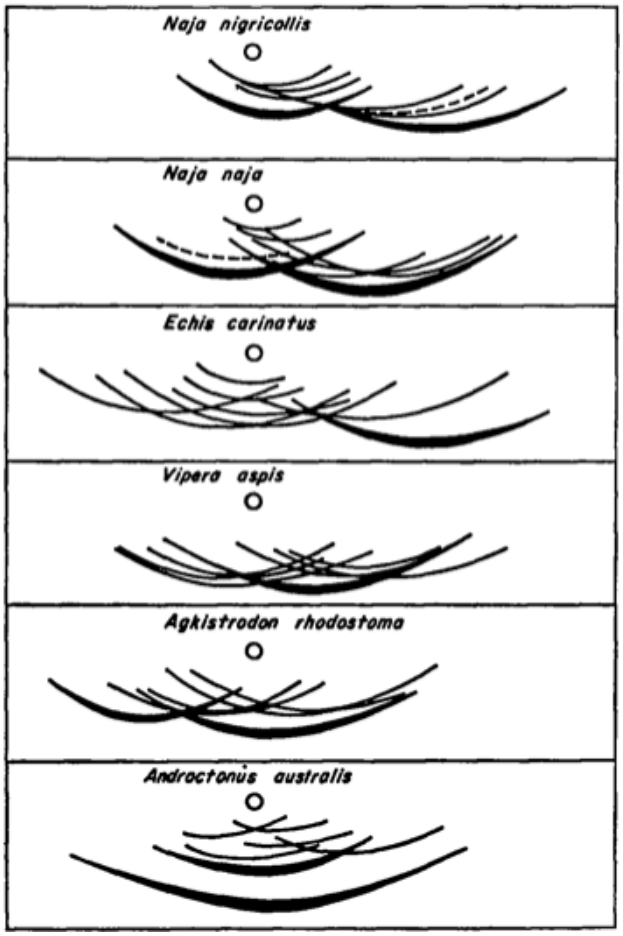


Figure 26 : Exemples d'immunogrammes de venin de serpents et d'un scorpion. [42]

Ces immunogrammes, depuis leur découverte, vont permettre de séparer les différents constituants des venins de serpents. Une autre méthode aussi largement utilisée assure également cette fonction.

6.2.2 La chromatographie

6.2.2.1 Principe

La chromatographie est une méthode physique de séparation basée sur les affinités des différents composants à analyser avec deux phases ; l'une est dite stationnaire, et l'autre est dite mobile.

L'échantillon, ici le sérum de venin, est entrainé par la phase mobile au travers de la phase stationnaire qui va plus ou moins retenir les composants à analyser selon leur affinité. Cette technique va permettre d'analyser des sérums, de séparer ou de purifier leurs composants, ou encore de les doser. [44]

Il existe différents types de chromatographie, certaines se font en phase liquide, et d'autres en phase gazeuss. Parfois deux ou trois modes de chromatographie différents sont nécessaires pour séparer, purifier, et doser les composés d'un solvant. Nous ne détaillerons dans cette partie que les chromatographies qui seront utilisées au cours de cette thèse.

6.2.2.2 Chromatographie échangeuse d'ions

Dans ce type de chromatographie, la phase stationnaire comporte des groupements ionisés (+ ou -) fixes, associés à des ions mobiles de charge opposée et assurant l'électroneutralité. Les ions retenus, au voisinage des charges fixes, sont échangeable avec les ions présents dans la phase mobile. La séparation des différents composants de l'échantillon n'est possible que grâce à ses échanges d'ions. Cette chromatographie ne peut s'appliquer donc seulement sur soluté ionisable. [45]

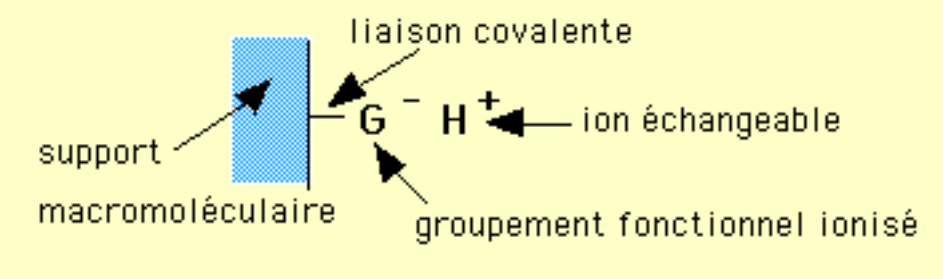


Figure 27 : Schéma de la phase stationnaire d'une chromatographie échangeuse d'ions. [45]

La phase stationnaire est donc constituée d'un support qui doit être insoluble dans l'eau. Ce support peut être minéral (silice), ou organique (résine polystyrénique, cellulose, dextrane). Sur ce support on vient greffer des groupements fonctionnels ionisables adaptés aux différents composants à analyser. Ces groupements fonctionnels sont fixés par des liaisons covalentes au support. Ils sont de deux types : des anions qui seront échangeurs de cations, et les cations qui seront échangeurs d'anions. [45]

L'affinité d'un échangeur pour un composant chargé va dépendre de plusieurs facteurs :

- De la charge des groupements fonctionnels, qui elle-même dépend de leur nature et du pH de la solution.
- De la densité de la charge du composant à échanger, qui dépend également du pH de la solution et de la nature de ce composant. La taille de ce composant rentre également en compte.
- De la concentration en ions à échanger dans le solvant.
- De la granulosité et de la porosité du support qui rendent plus ou moins accessible les groupements fonctionnels. [45]

En prenant en compte tous ces facteurs, on peut schématiser la réactions d'échange d'ions par l'équation :

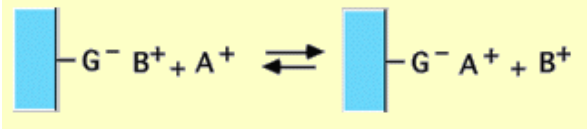


Figure 28 : Schéma simplifié de la réaction d'échange d'ions. [45]

6.2.2.3 Chromatographie Liquide Haute Performance (HPCL)

- **Les phases :**

Dans ce type de chromatographie, la phase stationnaire peut être de deux types :

- Une phase stationnaire « normale » généralement constituée d'un gel de silice très polaire. On va donc utiliser des éluants apolaires pour que, quand la phase mobile sera en contact de cette phase normale, les constituants polaires seront retenus alors que les apolaires sortiront en premier.
- Une phase stationnaire « inverse » qui est composée de silice greffée par des chaines linaires de 8 ou 18 carbones (C_8 ou C_{18}). Cette phase est apolaire, nécessite donc un éluant polaire, et fonctionne à l'inverse de celle décrite antérieurement. [46]

L'interaction entre la phase mobile et la phase stationnaire, qu'elle soit normale ou inversée, se répercute sur les temps de rétention des composés qui seront analysés par la suite.
Les silices greffées conduisent en général à une baisse importante de la polarité de la phase stationnaire. L'ordre d'élution des composés est donc l'opposé de celui auquel on est habitué en phase normale.
Le choix de la phase mobile est donc très important. On peut même choisir plusieurs solvants pour ajuster le pouvoir d'élution de la phase mobile. [46]

- **L'appareillage :**

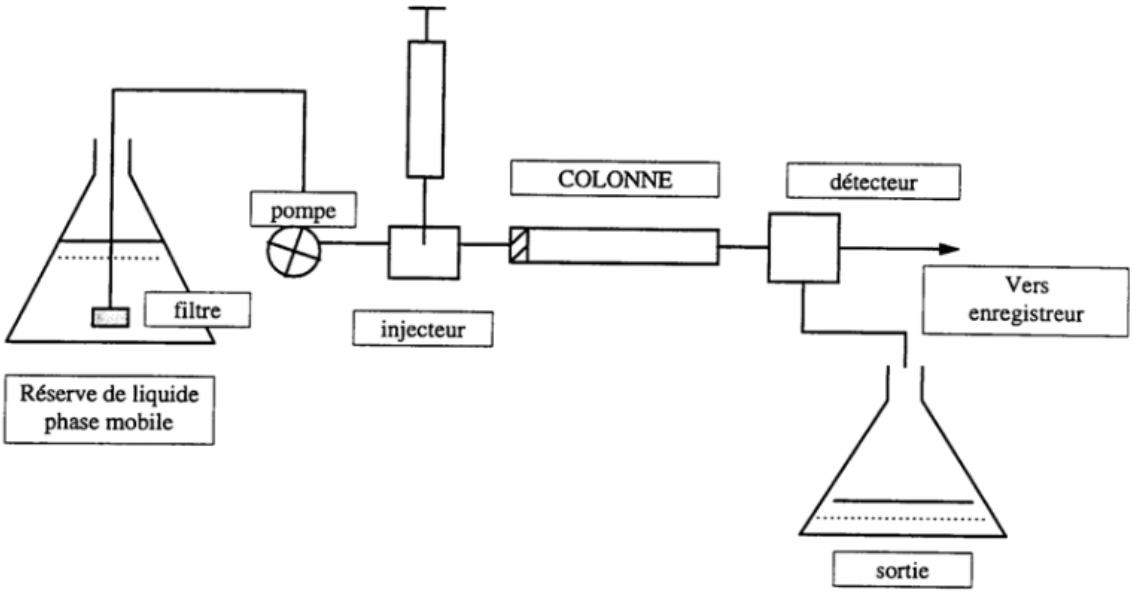


Figure 29 : Les différents composants d'une HPLC. [46]

Ces HPLC nécessite pour la migration et l'interprétation, un appareillage complexe.

On a d'abord un réservoir de liquide qui contient le solvant (éluant) et la phase mobile en quantité suffisante. La pompe doseuse va permettre d'utiliser plusieurs flacons d'éluants (souvent de polarité différente et toujours de concentration variable) pour pouvoir réaliser des gradients d'élution. Cela est important pour pouvoir ensuite doser nos composants identifiés. [46]

La pompe va donc permettre de travailler sur deux modes distincts : le mode isocratique où on utilise 100% du même solvant tout au long de l'étude, et le mode gradient avec une variation de la concentration des constituants d'un mélange d'éluants.

On a ensuite une vanne d'injection (ou injecteur) de différent volume selon la taille de la colonne et la concentration supposée de produits à analyser. Ce système permet d'injecter une quantité constante de volume afin d'éviter le biais lors de l'étude quantitative. [46]

On retrouve ensuite la colonne, qui est en fait un tube composé d'un matériau inerte face aux solvant (inox ou verre majoritairement). Son diamètre varie entre 4 et 20 mm et sa longueur entre 15 et 30 cm, car au-delà, les pertes de charges excessives exigeraient des pressions de liquide trop élevées. C'est dans cette colonne qu'on verse la phase stationnaire.

On a ensuite un détecteur qui peut être de différent type. Celui utilisé dans l'expérience ci-après est un détecteur de type UV – Visible. Il mesure en fait l'absorption de la lumière par les différents composants du solvant à la sortie de la colonne. La colonne est donc traversée par un laser lumineux opérant à longueur d'onde constante. Pour identifier les absorptions des composés, il faut une lampe adaptée, comme la lampe Deuterium qui permet de détecter des produits absorbants entre 190 et 35 nm. Pour le bon fonctionnement d'un détecteur, il faut donc que les composants analysés absorbent la lumière à une longueur d'onde accessible pour l'appareil. [46]

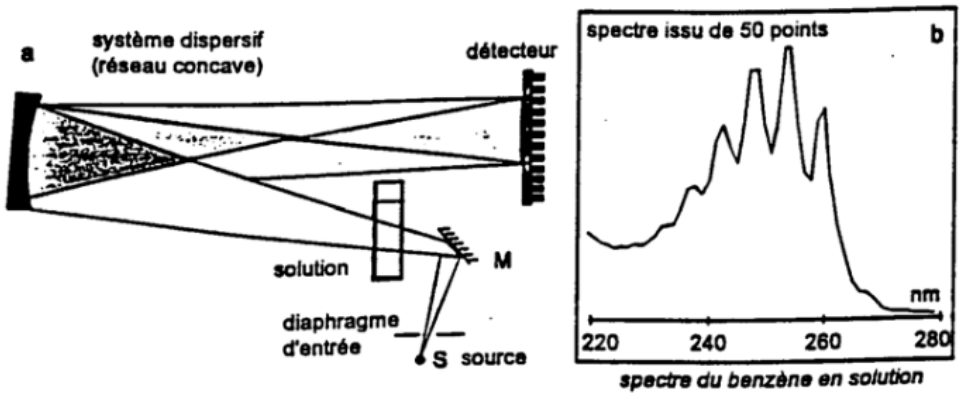


Figure 30 : Schéma d'un détecteur UV-Visible. [46]

- **Résultats :**

Comme pour les autres types de chromatographie, l'HPLC va permettre de séparer les différents constituants d'un solvant. De plus couplée à différentes techniques elle va permettre de doser ces mêmes constituants. [46]

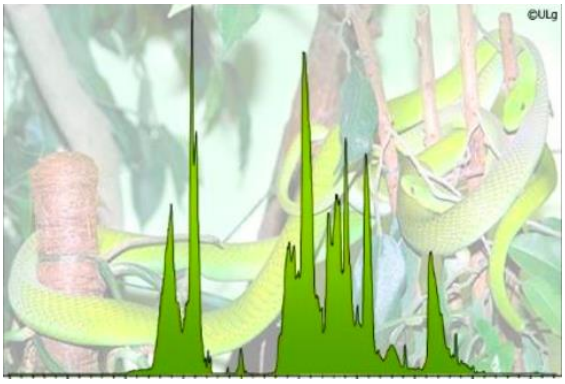


Figure 31 : Chromatographie HPLC du venin de mamba vert. [2]

Grâce à cette techniques, on peut voir sur la figure ci-dessus qu'on a séparé plus de 150 constituants dans le venin du mamba vert.

6.2.2.4 Chromatographie d'exclusion

- Principe :

Cette méthode de chromatographie est particulière, elle va permettre la séparation de molécules en fonction de leur taille et cela, sans tenir compte de leurs propriétés chimiques. Il n'y a, en effet, aucune interaction entre le soluté à analyser et la phase stationnaire de la colonne. [47]

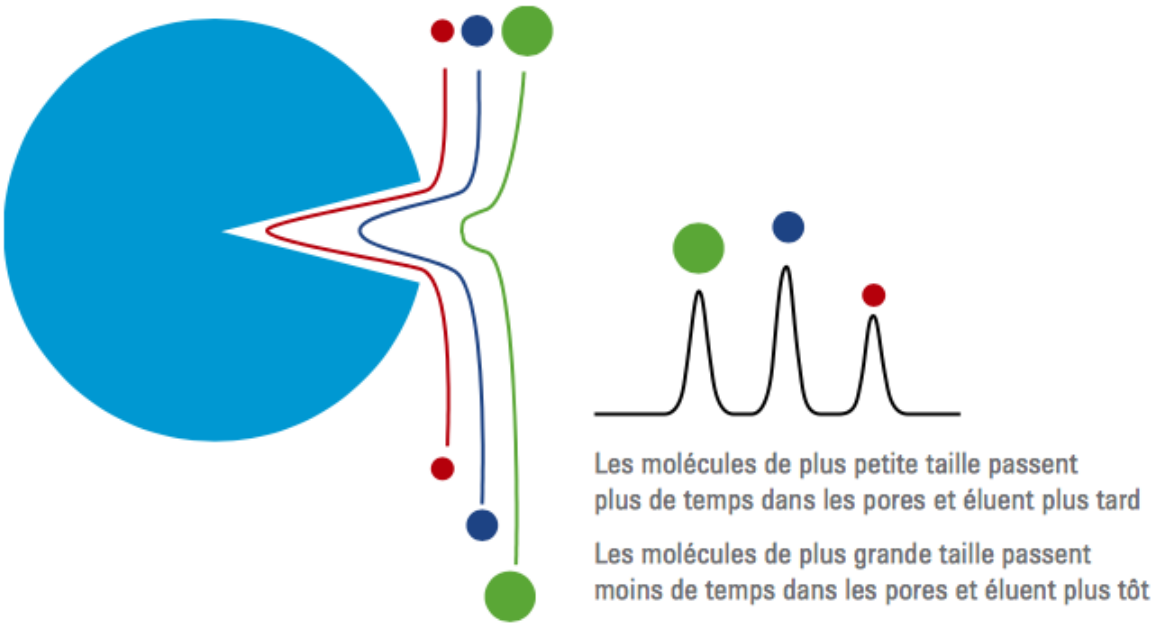


Figure 32 : Schéma de la chromatographie d'exclusion. [47]

Selon ce principe, les molécules vont pénétrer dans les pores de la phase stationnaire selon leur taille, et à des degrés différents. En effet, comme on le voit sur la figure ci-dessus, les molécules les plus grandes (tout dépend de la colonne choisie) sont exclues, c'est-à-dire qu'elles vont éluer dans le volume mort alors que les molécules les plus petites éluent en dernier. [47]

La chromatographie d'exclusion stérique (CES) est donc une méthode de référence, à la fois pour séparer, et quantifier des mélanges de protéines. Il s'agit également d'une méthode précieuse pour contrôler la qualité de la fabrication des protéines recombinantes. [47]

- Méthode :

La méthode de la SEC va dépendre du soluté à analyser. D'abord il faut préparer l'échantillon. Cette préparation d'échantillon ressemble beaucoup à celle réalisée pour les HPLC. En effet, l'échantillon doit être dissous dans la phase mobile. Ce qui diffère, c'est que les volumes d'échantillons doivent être plus importants que pour une HPLC, car la colonne d'une SEC est plus grande et donc le débit d'élution plus faible. Avant de réaliser une SEC on prépare notre échantillon en réalisant une étape de filtration, afin qu'il n'y est pas de trop grosses particules qui risqueraient d'endommager la colonne. Enfin, pour une préparation optimale de l'échantillon, il est important de veiller à ce que l'échantillon lui-même ne modifie pas les propriétés des éléments à doser. En effet, certaines protéines, sous certaines conditions, peuvent s'agréger (formant des dimères ou des multimères de taille plus élevée que la normale) ou se dissocier. [47]

Dans un second temps, il faut choisir la colonne adaptée. Les dimensions standards des colonnes de SEC sont de 7,8x300 mm et fonctionnent à un débit de 1mL/min. Pour améliorer la vitesse de séparation, on peut utiliser des colonnes plus petites. Enfin il est important de tenir compte du matériau de la colonne et bien évidemment du diamètre de ses pores.

La phase mobile doit contenir un tampon pour surmonter les interactions ioniques. Elle ne doit également surtout pas interagir avec la molécule à analyser pour éviter toute dégradation de ce dernier. [47]

6.2.3 Spectrométrie de masse

Il s'agit d'une technique d'analyse physico-chimique permettant de détecter, d'identifier et de quantifier des molécules d'intérêts par mesure de leur masse. Son principe est basé sur la séparation (en phase gazeuse) de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). De plus, cette méthode va permettre de caractériser la structure chimique de ses molécules en les fragmentant. [48]

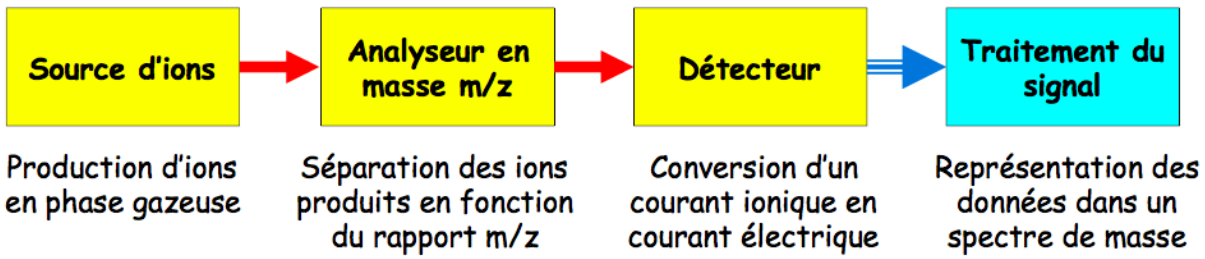


Figure 33 : Schéma d'un spectromètre de masse. [48]

Dans un premier temps il faut donc une ionisation de la source pour avoir des molécules chargées. Plusieurs techniques peuvent être utilisées :

- Ionisation chimique pour des composés volatiles, apolaires, et stables à la chaleur.

- Ionisation Laser assistée par Matrice (ou désorption) pour les composés apolaires et peu volatiles (peptides et protéines).
- Electronébulisation se servant d'un champ électrique. [48]

On a ensuite l'analyseur et le détecteur, qui vont séparer, puis analyser les ions en fonction du rapport m/z. Il en existe également plusieurs types :

- Analyseur à temps de vol (TOF), qui permet d'analyser des protéines entières. En effet le temps de vol enregistré par deux détecteurs est fonction du rapport m/z de la molécule.
- Analyseur quadripolaire, dans lequel les ions vont avoir une trajectoire oscillante. Ces oscillations sont proportionnelles du rapport m/z.
- La trappe à ions, qui impose également une trajectoire oscillantes aux ions au centre de la trappe. Par application d'une rampe de radiofréquences, la trajectoire des ions va être modifiée et ces derniers vont être éjectés de la trappe en fonction de leur rapport m/z. [48]

Ces spectromètres de masses sont ensuite reliés à des logiciels informatiques pour traiter les informations.

Cette technique va donc permettre une analyse rapide d'une molécule. Elle peut se coupler facilement à des techniques de séparation chromatographique et constitue donc une étape d'analyse indispensable. C'est de plus, une technique très sensible qui va générer de nombreuses données qui renseignent sur la structure d'une molécule. On peut même s'en servir pour analyser un protéome entier. [48]

6.2.4 Séquençage

On pourrait définir le séquençage comme une technique, permettant une description systématique des séquences nucléotidiques d'un génome.
Historiquement, c'est Maxam et Gilbert qui ont inauguré cette technique qui n'est aujourd'hui plus utilisé.
Vient ensuite Sanger qui va développer une technique aujourd'hui universellement employée. [49]

6.2.4.1 La méthode de Sanger

Cette technique repose sur l'utilisation d'une enzyme, l'ADN polymérase monobrin en se servant d'un ADN comme matrice. L'ADN polymérase va pouvoir s'allonger à partir d'une amorce, et en présence de 4 désoxyribonucléotides triphosphatés (dATP, dTTP, dGTP, et dCTP), et des analogues (ddNTP) correspondant, qui jouent le rôle de terminateur de chaine.
En présence d'un brin d'ADN servant de matrice, et des 4 désoxyribonucléotides, l'ADN polymérase va allonger un brin d'ADN complémentaire. Mais lorsque qu'un ddNTP est incorporé par la polymérase, celui-ci agit comme un terminateur de chaine et bloque cet allongement. Cette incorporation se produit de manière aléatoire. On aboutit donc à

l'obtention d'un mélange de fragments qui se terminent en fonction de l'incorporation du ddNTP. [49]

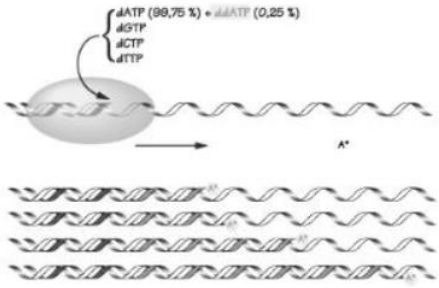


Figure 34 : Principe général de la Méthode de Sanger. [49]

Quatres réactions en parallèles vont, en fait, être effectuées. Chacune avec l'un des 4 ddNTP. Puis on sépare les différents fragments obtenus par électrophorèse. Cette étape va permettre, d'une part d'identifier les fragments d'ADN synthétiser par la polymérase, et d'autre part de les distinguer d'un brin d'ADN matrice. Pour cela on va utiliser un marqueur fluorescent. [49]

Les séquenceurs modernes, utilisent un système de détection in situ pendant l'électrophorèse en se servant d'un faisceau laser émettant dans la bande d'absorption du fluorophore, et qui traverse le gel. Pendant la migration, lorsqu'une bande d'ADN passe devant le faisceau, un signal de fluorescence est émis, capté par une photodiode, puis transmis à un ordinateur de contrôle et analysé par un logiciel spécialisé.
Grâce à cette technique, on peut étudier environ 500 nucléotides par expérience. [49]

6.2.4.2 Séquençage Nouvelle Génération (NGS)

Depuis 2005, de nouvelles techniques ont vu le jour. Avec le progrès scientifique, on peut maintenant séquencer avec des débits de plus en plus important et un coût de plus en plus faible. [51]

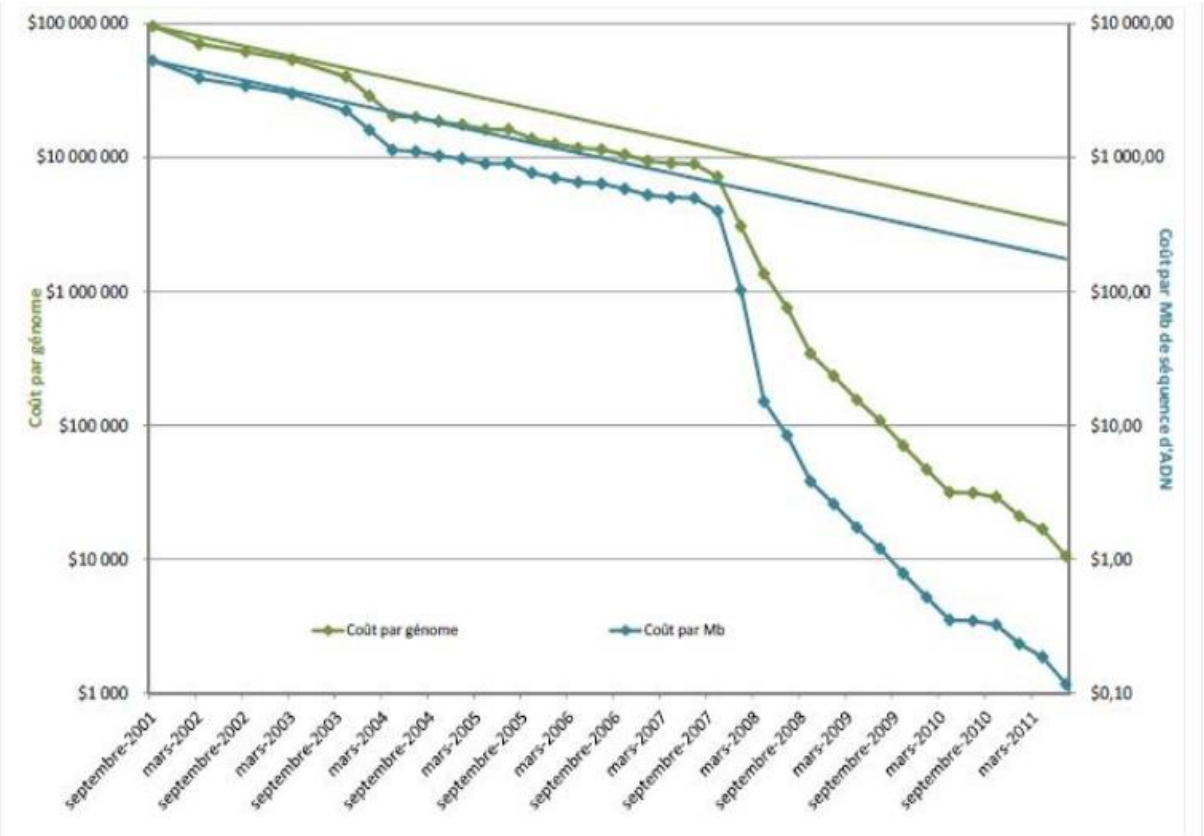


Figure 35 : Graphique représentation l'évolution du coût d'un séquençage en fonction du temps. [50]

Il existe aujourd'hui 3 grandes formes de NGS. Elles proposent différentes sortes de logiciels d'exploitation, et utilisent des chimies qui leurs sont caractéristiques. Le choix d'investir dans l'une ou l'autre de ces technologies reposera, en partie sur l'application finale, et devra prendre en considération les caractéristiques physico-chimiques intrinsèques à chacune. [51]

6.2.4.3 Amplification des séquences nucléotidiques par PCR

La réaction de PCR (Polymerase Chain Reaction), dont nous ne détaillerons pas le principe et la méthode, va permettre d'amplifier in vitro une région spécifique d'un acide nucléique donné afin d'en avoir en quantité suffisante pour le détecter et surtout l'analyser. Pour se faire une série de réactions est effectuée, permettant simplement la réplication d'une matrice double brin. Ces opérations sont réalisées en boucle, afin d'en obtenir une quantité suffisante. [49]
L'amplification est exponentielle, car les séquences obtenues à la fin de chaque cycle, servent de matrice pour la polymérase lors des cycles suivants. Cette réplication du brin d'ADN se fait toujours en 3 étapes :

- Dénaturation de l'ADN pour obtenir une matrice simple brin.
- Hybridations des amorces spécifiques de l'ADN monocaténaire préalablement choisies.
- Polymérisation du brin complémentaire par l'ADN polymérase. [49]

Voici donc les principales méthodes qui permettent d'isoler, d'identifier et d'étudier l'action des différents composants du venin des serpents. Il en existe d'autres, pleins d'autres, mais ce sont ces différentes techniques qui seront évoquées dans la suite de cette thèse.

CONCLUSION

Au cours de cette partie, je vous ai donc présenté l'appareil venimeux des serpents en général. Un appareil aussi sophistiqué que passionnant. La compréhension de cet appareil est encore au cours d'étude. D'après de nombreux chercheurs l'étude de la biologie et de la biochimie de la glande à venin est la clé de nombreuses découvertes sur les composants du venin.

Malgré une perpétuelle recherche pour améliorer les connaissances de l'Homme, ce dernier a tout de même déjà éclairci de nombreuses zones d'ombres et découvert certaines toxines spécifiques de tel ou tel serpent. Certaines de ces toxines sont à l'origine des effets toxiques des venins et fournissent également des connaissances sur la physiologie et la thérapeutique humaines. On a également vu que certaines toxines spécifiques du Bothrops jararaca comme la botrocétine, sont à la frontière entre la thérapeutique et la toxicité.

Mais alors, comment l'un de ses composants va éclairer la voie de la découverte d'une famille de médicaments commercialisés dans le monde entier : les IEC.

PARTIE 3 :
DU VENIN AU CAPTOPRIL

Dans la partie précédente nous avons donc mis en avant les différents composants du venin du Bothrops qui entrent en jeu lors d'une envenimation. Ils sont nombreux et très divers, tous n'ont pas été étudié. Dans cette partie, nous nous concentrerons sur les composants du venin qui ont un rôle dans la découverte des médicaments contre l'hypertension artérielle.

Dans un premier temps je vais vous montrer comment on isole, on sélectionne et on analyse un composant spécifique du venin du *Crotalus durissus terrificus*, un crotale proche parent de notre Bothrops. Il sera important de cette partie de comprendre les méthodes utilisées aux différentes étapes de l'étude. En effet la crotamine étudiée n'est pas la substance à l'origine de la découverte des IEC, mais le principe de cette étude sera le même pour celles, moins détaillées faute de littérature européenne, qui permettront la découverte du téprotide, précurseur du Captopril.

7 Exemple d'étude du venin et d'isolement d'une molécule

7.1 Éthique

Pour cette étude, il faut savoir que les échantillons de serpents ont été fournis par le Laboratoire d'Herpétologie de l'Institut Butantan à São Paulo (Brésil). On a deux types d'échantillons : le sang du *Bothrops jarraraca*, et le venin du *Crotalus durissus terrificus*. Ce même institut a également fournit des souris suisses pour l'expérience.
Ces démarches ont été approuvées par le Comité d'Éthique de l'Institut Butantan, qui a donc autorisé leur utilisation. Après l'expérience les souris suisses ont été sacrifiées avec du CO_2, selon les principes d'éthiques de la Convention de Washington et du Collège Brésilien d'Expérimentation Animale (COBEA). [32]

7.2 Exemple d'étude de la crotamine de *Crotalus durissus terrificus*

7.2.1 Purification de la crotamine

La crotamine, est un peptide d'environ 4,5-5 kDa qui a pour rôle d'activer les canaux sodiques (Na^+) du muscle squelettique. Elle est composée de 42 acide-aminés avec 3 ponts disulfures (d'après Bertrand et al. 1990). L'activation de ces canaux entraine une contracture musculaire suivi d'une paralysie du muscle squelettique chez les mammifères mordus par le crotale. [52]

7.2.1.1 Chromatographie d'exclusion

- Matériel et méthode :

Pour isoler cette crotamine du venin du *Crotalus durissus*, les scientifiques brésiliens ont d'abord réalisé une chromatographie d'exclusion sur colonne Sephadex G75 pré-équilibrée avec un tampon de bicarbonate d'ammonium à 0,1M (pH = 8,0). Le débit d'élution est de 0,2mL/min et on étudie le profil d'élution à 280 nm. Les fractions récupérées par cette expérience sont immédiatement lyophilisées. [52]

- Résultats :

Le profil d'élution du venin de *Crotalus terrificus* sur Sephadex G75 montre l'existence de 4 pics principaux. [52]

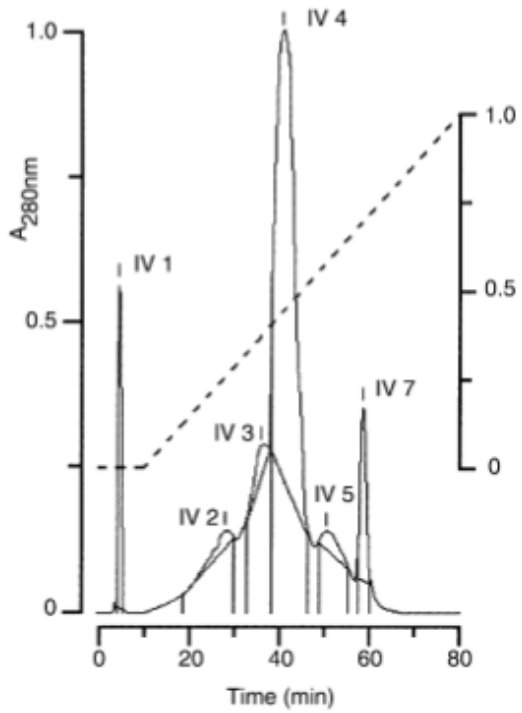


Figure 36 : Résultats de la chromatographie d'exclusion réalisée sur le venin de *Crotalus durissus terrificus*. [52]

Chaque pic correspond à une protéine du venin du crotale. On peut donc en déduire que le venin de *Crotalus terrificus* contient une convulxine (pic I), la gyroxine (pic II), la crotoxine en question (pic III), et la crotamine (pic IV). [52]

Il est ici important de noté que, l'étude de Toyama et de son équipe a été réalisé sur la fraction de crotoxine. J'ai trouvé intéressant de détailler cette expérience pour pouvoir montrer le principe d'isoler, caractériser, et analyser l'action pharmacologique d'une protéine issue d'un venin de serpents. Je vais donc détailler l'expérience de Toyama, mais il faudra retenir que la même chose a été réalisé avec téprotide du Bothrops jararaca. Cependant il n'y avait pas d'articles sur cette expérience. [52]

Pour identifier la crotoxine, il a fallu préparer des sérums contenants chacun une protéine. Ces sérums ont ensuite été injectés en IV à des souris de laboratoire. Seul la protéine correspondant au pic IV a réalisé l'action prévue de la crotamine, c'est-à-dire une contraction drastique des muscles squelettiques chez la souris immédiatement après son injection. [52]

7.2.1.2 HPLC et HPLC phase inverse

- Matériel et méthode :

Dans un second temps, à partir des différentes fractions isolées précédemment, les scientifiques vont réaliser une HPLC avec une colonne Protein-Pak SP 5PW pré-équilibrée avec le même tampon que précédemment mais à 0,05 molaire (M) cette fois (tampon B). Les différentes fractions de l'étapes précédentes vont donc être éluées pendant 30 min avec un débit de 1mL/min à 20°C, puis les nouvelles fractions obtenues seront analysées encore à 280 nm. On lyophilise ensuite encore une fois les différentes fractions obtenues.
Pour purifier ces derniers échantillons obtenus, une étape d'HPLC en phase inverse est indispensable. Pour cela, il va donc falloir traiter séparément ces différents échantillons avec une colonne m-Bondapack C18. [52]

- Résultats :

La seconde chromatographie (HPLC) réalisée sur la fraction IV correspondant à la crotamine va produire 6 pics, avec trois d'entre eux principaux : le troisième pic (IV-3), le quatrième (IV-4), et le septième (IV-7) sont donc retenus comme intéressants. Ils ont donc réalisés une HPLC phase inverse pour purifier ces pics. [52]

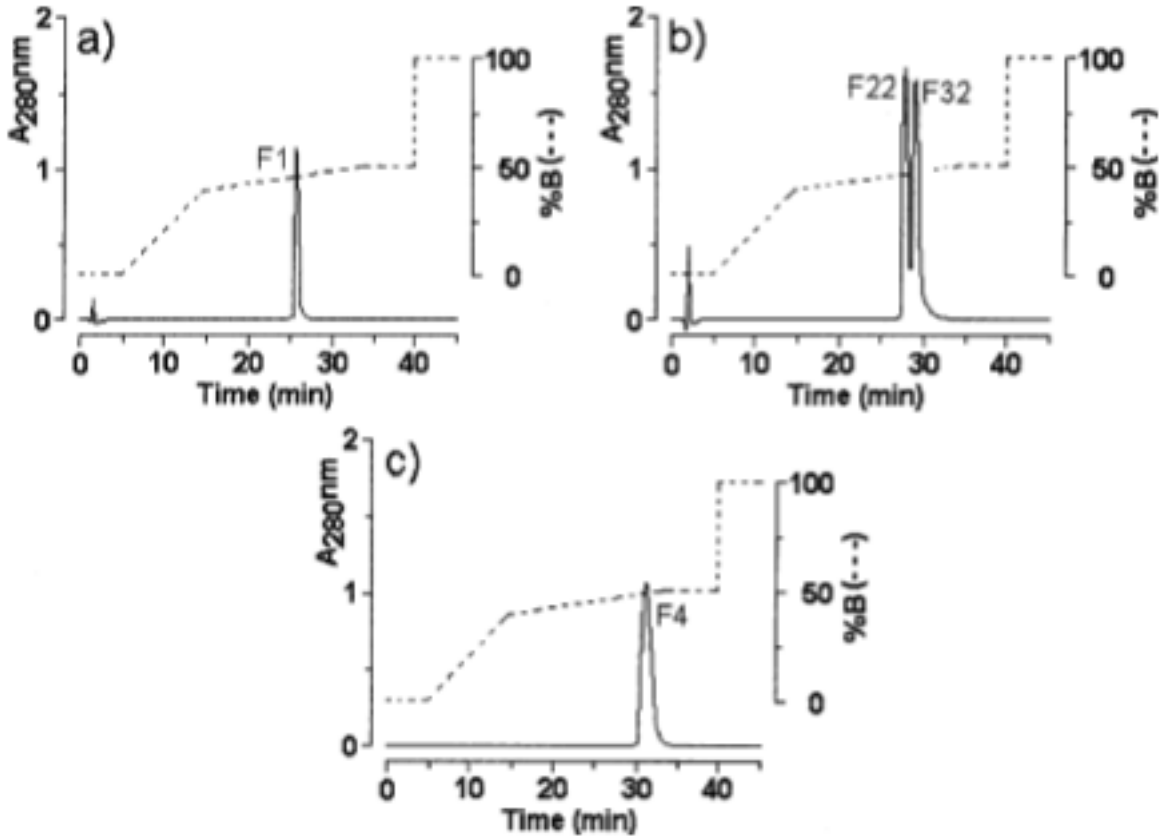


Figure 37 : Résultats de l'HPLC phase inverse réalisée à partir de trois fractions de crotamines. Fraction IV-3 (figure a), fraction IV-4 (figure b), et fraction IV-7 (figure c). [52]

On voit donc que IV-3 a fourni un pic majeur. On appellera pour la suite cette fraction de crotamine F1. IV-4 a lui fournit 2 pics : les fractions F22 et F32. Et enfin IV-7 a fourni un seul pic correspondant à F4.

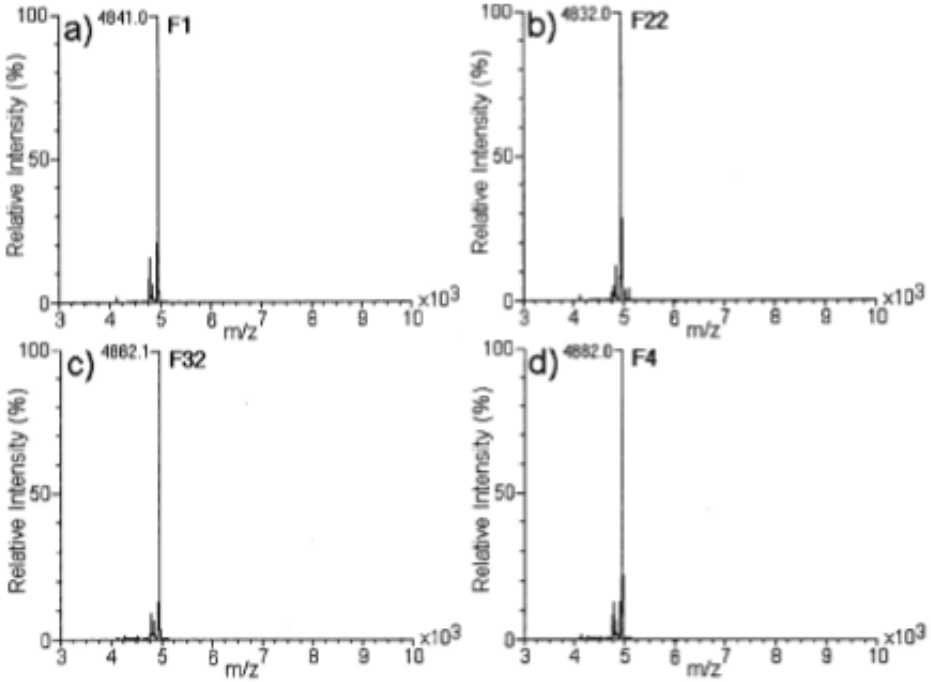
7.2.1.3 Spectrométrie de masse

- Matériel et méthode :

Pour caractériser et comparer ces échantillons obtenus, il faut ensuite réalisé une spectrométrie de masse.
Pour cela on dissout les protéines des échantillons obtenus précédemment dans une phase mobile d'acétonitrile, qui est préalablement acidifié par de l'acide formique 0,5% pour ionisés les échantillons. Ce mélange est ensuite injecté dans la source du spectromètre de masse à un débit de 5mL/min. Avant cette expérience les scientifiques avaient préalablement dilués les différentes isoformes de crotamine (20 à 30mM). La spectrométrie est réalisée, et obtient différents pics qui seront analysés avec un logiciel adapté (Mass-Linx). [52]

- Résultats :

On voit que les 4 isoformes de crotamines possèdent des masses moléculaires voisines d'environ 4,8 kDa. De plus, d'après le profil spectrométrique, elles semblent avoir des structures voisines. [52]



Crotamine isoform	Molecular mass kDa
F1	4841.1 ± 0.039
F22	4832.47 ± 0.24
F32	4882.16 ± 0.03
F4	4882.03 ± 0.022

Figure 38 : Résultats de la spectrométrie de masse réalisée sur F1, F4, F22 et F32. [52]

7.2.1.4 Analyse des séquences N-terminales

- Matériel et méthode :

Les 4 isoformes étudiées possèdent des profils similaires comme nous le verrons plus tard, il faut donc étudier leur séquence d'acide aminés. Les scientifiques vont analyser en fait 2 des 4 isoformes obtenues : F22 et F32. Pour cela ils vont réaliser un séquençage directement en région N-terminal au niveau du 25e acide aminé avec un séquenceur gaz-liquide. Les acides aminés de cette séquence sont ensuite identifiés par comparaison avec des standards appropriés (utilisation d'un analyseur PTH modèle ABI 120A). [52]

- Résultats :

L'analyse des séquences N-terminales des isoformes F22 et F32 démontre 96% d'analogie structurelle. On a seulement 1 acide aminé qui varie entre les deux : la leucine en position de 6 chez F22 est remplacée par une lysine chez F32. [52]

Figure 39 : Résultat du séquençage des régions N-terminale de F22 et F32. [52]

7.2.2 Effets pharmacologiques

Pour étudier les effets pharmacologiques de ces fractions protéiques précédemment obtenues, Toyama et son équipe vont devoir réaliser des expériences sur des souris de laboratoire.
Les équipes de Toyama réalisent donc l'étude pharmacologique de F22 et F32 sur le diaphragme de souris. [52]

- Matériel et méthode :

Les équipes de Toyama ont donc prélevé l'hémi diaphragme gauche de souris anesthésiées puis tuées par exsanguination. Ce bout de diaphragme est monté dans un bain d'organe de 10 mL contenant une solution de Tyrode à pH = 7,4 et à 38°C, accompagnée de glucose et gazée avec 95% d'O_2 / 5% de CO_2.
La tension du diaphragme, mesurée par un transducteur de déplacement de force (Gould RS 3400) était de 2 grammes au repos. On parle ici de préparation-témoin.
Un stimulateur va délivrer au nerf phrénique du diaphragme (via des électrodes polaires), un stimuli de 0,1 Hertz (Hz) pendant 0,2 seconde. On mesure une première fois la tension musculaire sous l'impact du stimuli.
Ensuite on laisse la préparation se stabiliser pendant 30 minutes, pus on ajoute F22 ou F32 (seuls) avec des concentrations uniques (0,1 ou 0,5 ou 1,0 mg/mL). On laisse en contact pendant 120 minutes.
Dans un dernier temps, on co-incube les 2 isoformes dans la même préparation , pendant 30 minutes et toujours avec le solution de Tyrode. [52]

- Résultats :

On peut voir que les 2 isoformes seules F22 et F32 provoque une contraction des muscles lisses du diaphragme.[52]

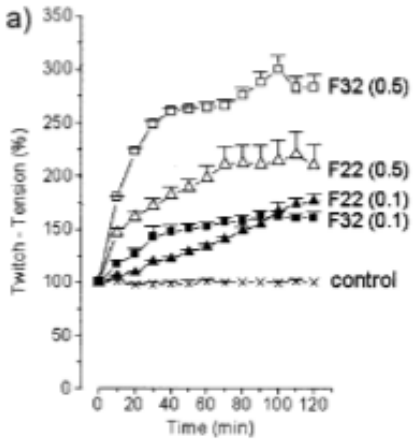


Figure 40 : Effets de F32 et F22 seuls, sur la tension du diaphragme en fonction du temps. [52]

On voit donc que la contraction induite par F22 et F32 sur le diaphragme est dose-dépendante. On peut également conclure sur le fait que F32 et 3 fois plus active que les

préparations-témoins et F22 deux fois plus active. On observe également un plateau, qui correspond à l'effet maximal. On peut donc en déduire que la dose maximale efficace (DME) de F32 et de F22 et de 0,5 mg/mL. Les études aux concentrations 1,0 mg/mL sont donc inutiles. [52]

Lorsque les 2 isoformes sont incubées ensemble à même proportions et avec une concentration finale de 0,5 mg/mL, on observe ceci :

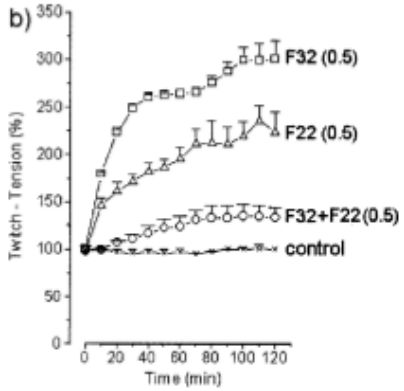


Figure 41 : Effets de F32 et de F22 sur la tension du diaphragme de souris en fonction du temps. [52]

La réponse engendrée sur la tension du diaphragme est donc plus faible quand les deux isoformes sont co-administrées.
Les scientifiques ont donc réussi à identifier, caractériser et analyser deux molécules actives du venin de *Crotalus terrificus*, F22 et F32. [52]

On voit donc que la crotamine, protéine du venin d'un serpent, peut être fractionnée en différentes isoformes par HPLC phase inverse. Ces isoformes sont structurellement similaire, surtout F32 et F22. On peut donc en déduire que ces différentes isoformes ont donc une action similaire sur la contraction des muscles squelettiques.
Elles agissent sur des canaux sodiques voltage dépendants situés à la jonction neuromusculaire.
Dans tous les cas la crotamine induit la vacuolisation des cellules musculaires et leurs nécroses. On peut voir cela en réalisant une observation au microscope optique de coupes de diaphragmes préalablement incubées avec F22 et F32. [52]
C'est cette nécrose qui sera à l'origine du blocage des canaux sodiques voltage dépendants.

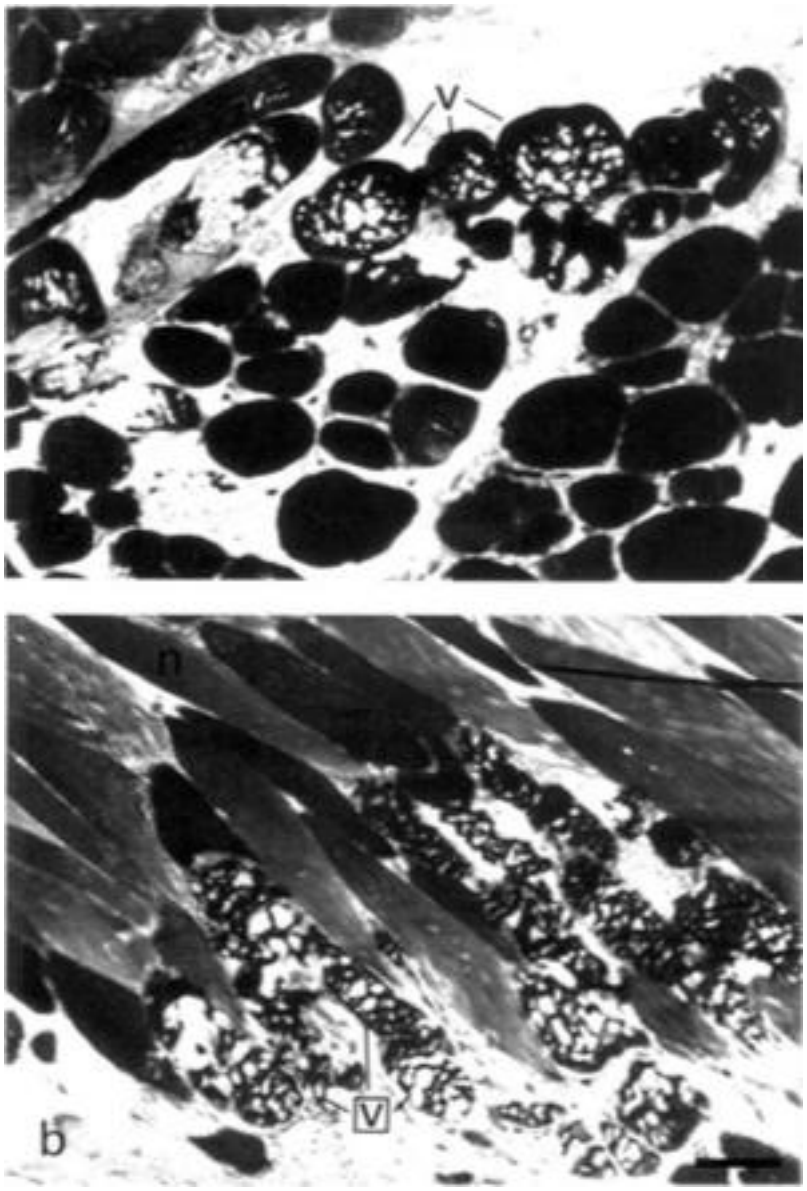


Figure 42 : Observations microscopiques d'une coupe de diaphragme de souris en présence de F22 et F32. Figure a = coupe transversale, figure b = coupe longitudinale.
Légende : v = vacuolisation des cellules musculaires.

8 Des BPP du Bothrops jarraraca au Captopril

L'identification et la compréhension de nouvelles molécules endogènes ou exogènes entrant en jeu dans le mécanisme complexe de la physiopathologie humaine a toujours été d'un grand intérêt. Dans les années 1950, différents chercheurs du monde entier vont se

pencher de plus en plus dans la compréhension du tonus vasculaire et ses conséquences sur la tensions artérielle. La découverte de la bradykinine en 1949 et des peptides potentialisant la bradykinine (BPP) en 1965 ont eu une importance cruciale dans la compréhension de la physiopathologie cardiovasculaire de l'homme et dans le développement du Captopril. Ce médicament est le premier inhibiteur dirigé vers un site actif de l'angiotensine et a été utilisé dans le monde entier pour traiter l'hypertension artérielle. [53]

8.1 Découverte de la bradykinine

Tout commence en 1949 quand Rocha e Silva et son équipe découvre la bradykinine après avoir injecté du venin de Bothrops jarraraca à des lapins. [54]

Pour rappel, la bradykinine est une substance qui va, après activation de ses récepteurs, entrainer une diminution des résistances périphériques totales sanguines par vasodilatation, et entrainer donc une diminution de la pression artérielle. Bien que cette molécule possède d'autre activité, notamment sur l'inflammation ou sur le rein, c'est cette action anti-hypertensive qui nous intéresse ici. [55]

Après injection, Rocha e Silva et son équipe, observaient quelles enzymes ou autres produits chimiques étaient générés par les lapins, après injection du venin. En étudiant cela, les chercheurs brésiliens se sont rendu compte que le venin du Bothrops jarraraca induisait la synthèse d'un nonapeptide qu'ils appelèrent « bradykinine ». Après isolation, ils ont découvert que ce peptide, qui circule dans le sang, produit une puissante vasodilatation entrainant une chute brutale de la pression artérielle. Cette découverte a permis de mieux comprendre la physiologie de l'appareil circulatoire chez l'Homme, on a même cru découvrir la première gamme de médicament contre l'hypertension artérielle. [54]

Cependant l'utilisation directe de la bradykinine s'avère impossible. En effet après injection chez l'Homme,elle est rapidement rendue inactive par trois enzymes, avec une action kinase :

- L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) qui clive la bradykinine en position 7-8.
- L'aminopeptidase P (APP) qui clive elle en position 1-2.
- Les carboxypeptidase N et A (CPN et CPA) qui clivent en position 8-9. [56]

8.2 L'Enzyme de conversion à l'angiotensine (ECA)

8.2.1 Historique et rappels

L'ECA fut découverte en 1956 par L. T. Skeggs. Il découvre qu'il s'agit de l'enzyme qui assure la conversion de l'angiotensine I en angiotensine II vasoconstrictrice. Quelques années plus tard le docteur S. H. Ferreira découvre dans le venin du Bothrops jararaca le « Bradykinin Potentiating Facteur » (BPF ou BPP). Des études plus poussées montrent que ce peptides va potentialiser à la fois l'intensité, mais aussi la durée d'action des effets vasodilatateurs hypotensifs de la bradykinine. Cette découverte va donner l'idée d'une nouvelle gamme de médicaments pour lutter contre l'hypertension artérielle. [54]

En 1968, un autre chercheur, le docteur Y. S. Bakhle démontre que l'ECA extraite d'un poumon de chien, va être inhibée par un mélange de BPF issus du venin de Bothrops jarraraca. Ils se rendent alors compte que l'ECA est directement responsable de l'inactivation de la bradykinine, puisque les chiens envenimés n'en synthétisent pas.
En testant ces mélanges de BPF, les scientifiques vont alors se rendre compte que ces peptides, roche en proline, vont agir contre l'effet hypertenseur à deux niveaux :

- En augmentant la concentration en bradykinine.
- En diminuant la concentration en angiotensine II. [57]

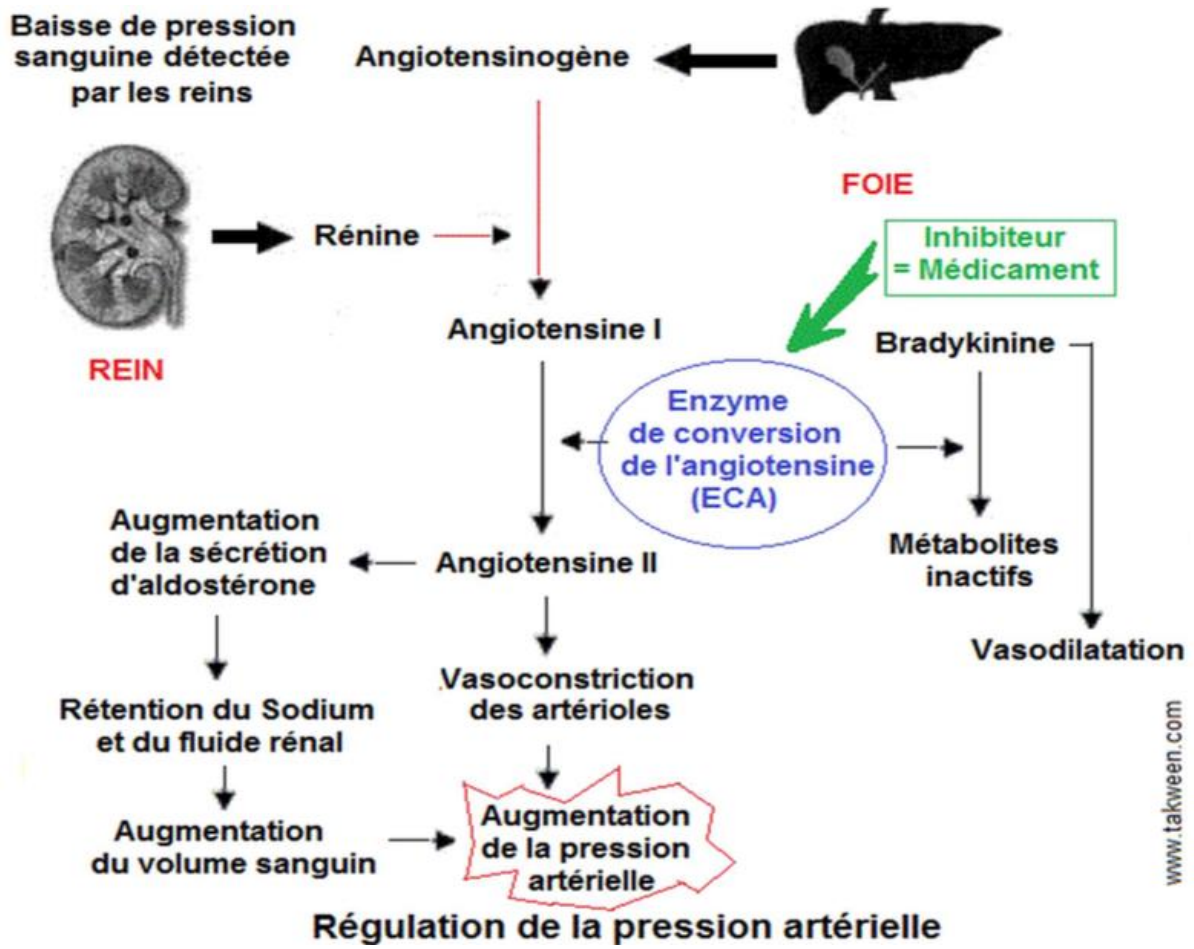


Figure 43 : Rôle du système rénine-angiotensine-aldostérone et de la bradykinine dans la régulation de la pression artérielle. [58]

8.2.2 Études structurelles de l'ECA

Comprendre parfaitement la structure de cette enzyme, véritable cible thérapeutique s'avère indispensable pour pouvoir synthétiser un inhibiteur hautement spécifique et efficace dans le traitement de l'hypertension artérielle.

L'enzyme de conversion est une metallopeptidase au zinc, transmembranaire, et possédant deux sites actifs. L'un en position N-terminale, et l'autre en position C-terminale. Il existe des différences entre ces deux sites.
Par exemple l'extrémité N-terminale est plus sensible que l'autre vis-à-vis du peptide Serine-Aspartate-Proline hémorégulateur ou de l'hormone LHRH. [59]
Cette extrémité est également la plus sensible au Captopril. [60]

Les données graphiques de l'enzyme indiquent que les sites actifs de l'enzyme sont situés dans une sorte de cavité. En effet les deux chaines terminales sont en fait des hélices qui vont former une sorte de couvercle qui couvre partiellement ce site actif et limite donc l'action des inhibiteurs, ou des substrats. Ces derniers doivent avoir une conformation particulière pour être actif. [61]
Ces exigences structurelles des inhibiteurs, vont être retrouvé parmi les BPP du Bothrops jarraraca. Par exemple le téprotide va être 400 fois plus actif sur domaine C que sur le domaine N-terminale. Alors que le 12-BPP (BPP du Bothrops composé de 12 acides-aminés) va être, au contraire, 30 fois plus actif sur le domaine N-terminale. [62]

Il est important d'avoir en tête qu'in vivo, c'est-à-dire physiologiquement, l'angiotensine I est majoritairement hydrolysée au niveau de son site actif C, alors que la bradykinine est hydrolysée par les deux sites actifs. Donc avoir un inhibiteur sélectif du site C serait préférable à deux niveaux :

- d'une part il réduirait l'effet hypertenseur de l'angiotensine II en inhibant sa formation.
- d'autre part l'activité préservée du site N diminuerait la formation de bradykinine et donc son accumulation qui est responsable des effets indésirables des IEC (voir partie suivante). [53]

8.3 Le téprotide

Parmi ce mélange de peptides utilisés dans la partie précédente, par le Dr. Y. S. Bakhle sur l'ECA, deux vont retenir notre attention. Un pentapeptide BPP-5a, et un nonapeptide appelé « téprotide ».

Le BPP5a, est composé de cinq acides aminés : Glutamate-Lysine-Tryptophane-Alanine-Proline. Des études ont été réalisé sur des animaux et confirment son effet antihypertenseur. Cependant, cet effet a une très courte durée d'action car le BPP5a est sensible aux dégradations enzymatiques. [53]

Le téprotide, enrichit en proline est beaucoup plus stable que son cousin, de plus comme on l'a vu dans partie précédente, sa grande sélectivité pour le site actif C de l'ECA est d'un grand intérêt thérapeutique. Le téprotide va donc constitué la première pierre à l'édification du Captopril. Par voie intraveineuse, ce peptide est actif il n'en fait aucun doute. Cependant il faut encore le développer par voir orale. [53]

Le Laboratoire Pharmaceutique Squibb réalise des études à partir du téprotide, et en déduit que c'est la séquence Phénylalanine-Alanine-Proline de ce dernier qui va être optimale pour se fixer sur le site actif C de l'ECA.
Pour comprendre et étudier l'effet hypertenseur du téprotide, des études vont être réalisées sur des rats spontanément hypertendus (RSH). Pour cela on leur injecte des faibles doses de téprotide (de 0,47 à 71 nmol/kg), et on se rend compte que la pression artérielle des RSH va diminuer. [53]

Chronologiquement, après avoir donc compris le rôle de l'ECA et de la bradykinine dans le système cardiovasculaire de l'Homme, on a compris que le venin d'un serpent, le Bothrops jarraraca, utilisait ce système pour exécuter ses effets toxiques.
Après des études plus approfondies sur ce venin, on se rend compte que certains peptides potentialisent en effet l'effet physiologique de la bradykinine jusqu'à le rendre hautement toxique pour l'Homme. Ces peptides appelées BPP sont nombreux dans le venin du serpent, mais un a su retenir notre attention par sa grande activité anti-hypertensive : le téprotide. C'est ce peptides qui servira de base pour la découverte du Captopril.

8.4 La découverte du Captopril

Dans cette partie, nous allons présenter la conception du médicament, c'est-à-dire ce que l'on pourrait appeler le processus logique qui aboutit à la formation du Captopril. Cette conception va nécessiter une connaissance directe de la nature du récepteur qui est dans ce cas une peptidase connue historiquement : l'ECA.
Le Captopril a été développé avant tout comme un inhibiteur spécifique de l'ECA aboutissant à une activité anti-hypertensive.

Ces études ont été réalisé par le Docteur Cushman et son équipe. La première étape fut donc d'isoler les BPP à partir du venin de Bothrops jarraraca. En effet le développement d'inhibiteurs spécifiques de l'ECA à partir de ce venin fournirait enfin l'outil pharmacologique nécessaire pour lutter contre l'hypertension. [63]

Les études ont donc permis d'isoler et de synthétiser tout d'abord un pentapeptide le BPP-5a qui, comme nous l'avons vue précédemment est trop sensible à la dégradation enzymatique physiologique du corps humain. Un nonapeptide plus stable a donc également été isolé et synthétisé, c'est le téprotide. Ce téprotide et certains de ces analogues ont donc été caractérisés in vivo et in vitro pour montrer que ce sont les 4 molécules de proline qui offre peptides une meilleure action et surtout une meilleure stabilité. [64]

Cushman et son équipe ont alors développé plusieurs systèmes de tests pour évaluer les inhibiteurs de l'ECA. Puis plusieurs travaux ont été réalisés. De tous ces travaux deux résultats émergent :

- Le téprotide a bien une activité anti-hypertensive efficace mais son usage est limité du fait de son coup et de son manque d'activité par voie orale.
- C'est la séquence Tryptophane-Alanine-Proline des BPP-5a et du téprotide qui interagit avec le site actif C de l'ECA. Une séquence synthétisée est même encore plus stable : Phénylalanine-Alanine-Proline. C'est cette dernière séquence qui sera utilisée ensuite pour les autres études sur les inhibiteurs de l'ECA. [64]

Des essais cliniques sont donc menés et les résultats obtenus démontrent bien que le téprotide est un antihypertenseur. Mais il faut encore trouver un médicament avec des propriétés pharmacocinétiques appropriées, notamment au niveau de l'absorption par voie orale. A partir des années 1970, Cushman et son équipe vont tester au hasard environ 2000 structures chimiques diverses , toutes inhibitrices de l'ECA, et ils ont testés leurs propriétés pharmacocinétiques. Après de nombreux essais, ils ont se rendre compte qu'un analogue du téprotide s'avère efficace. C'est l'acide L-benzylsuccinique qui est le plus puissant inhibiteur du site actif C et aussi de la carboxypeptidase A (enzyme qui rappelons le dégrade les BPP dans le sang).

A partir de cet acide, ils vont synthétiser un analogue qui est un composé aromatique, comme le téprotide, mais avec un groupement succinylcarboxyl, qui va avoir une grande spécificité d'action sur la fonction acide carboxylique du site actif C de l'ECA. Cette spécificité va permettre, d'une part d'inhiber comme voulu l'ECA spécifiquement au niveau de son site actif C, et, d'autre part d'inhiber la carboxypeptidase A augmentant ainsi la concentration de l'analogue après administration. [64]

Parallèlement Byers et Wolfenden vont signaler justement que les sites actifs de la carboxypeptidase A et le site C de l'ECA sont sensiblement identiques, et mettent tous les deux en jeu un atome de zinc pour fixer leurs récepteurs. Ils émettent alors l'hypothèse qu'un simple dipeptide suffirait pour se fixer sur ces sites actifs et inhiber leurs actions.

En en se fiant aux études de Cushman sur les BPP du Bothrops jarraraca, c'est la séquence Alanine-Proline qui est retenue pour servir de dipeptide de base, ou plutôt d'analogue plus facilement synthétisable : la succinyl-L-proline. [64]

Les premiers résultats de ce composé sont décevants, en effet l'activité inhibitrice de l'ECA de la succinyl-L-proline est 30 000 fois inférieure à l'activité des BPP du Bothrops jarraraca. C'est le Docteur Rubin qui va apporter des résultats concluants.

Il réalise des tests sur des iléons de souris et se rend compte que la succinyl-L-proline, contrairement aux quelques 2000 analogues de BPP qui avaient été testés jusque-là, inhibent les actions contractiles de l'angiotensine I et potentialisent celles de la bradykinine, sans avoir d'effets sur l'angiotensine II. A partir de ça, on va synthétiser une nouvelle molécule la D-2-méthyl succinyl-L-proline, et il s'avère que cette molécule est 15 fois plus active que la simple succinyl-L-proline. Cette activité est encore insuffisante mais c'est cette molécule qui va enfin débloquer la situation afin de découvrir un inhibiteur actif par voie orale. [65]

Cette première démonstration qu'un inhibiteur de l'ECA (IEC) est actif par voie orale, va intervenir le 31 mars 1975. C'est Byers et Wolftenden, encore eux, qui à partir du D-2-

méthyle succinyl-L-proline vont réaliser une nouvelle série de tests pour identifier clairement la ou les interactions entre l'ECA et cette molécule qui aboutissent à l'inhibition de l'enzyme. La principale interaction mise en évidence, c'est celle entre le groupement succinyl et le zinc de l'ECA. Il va falloir cependant améliorer l'activité, pour cela les chercheurs vont essayer de trouver un groupement plus actif que le succinyl. Ils vont en tester environ soixante, comme des groupements phophonates qui vont augmenter cette activité mais toujours pas suffisamment. Les chercheurs vont finalement se rendre compte que c'est le groupement carboxyl de la succinyl-L-proline qui diminue son affinité pour le site actif de l'enzyme, limitant ainsi son activité. [63]

Cette découverte est cruciale, puisque les tests vont maintenant se tourner vers cette fonction carboxyle. Finalement le groupement carboxyl est remplacé par un simple groupement thiol, et l'activité inhibitrice est augmentée d'un facteur 2000, suffisant pour rendre la molécule active même après une administration par voie orale. C'est de ce groupement que nait le Captopril. [63]

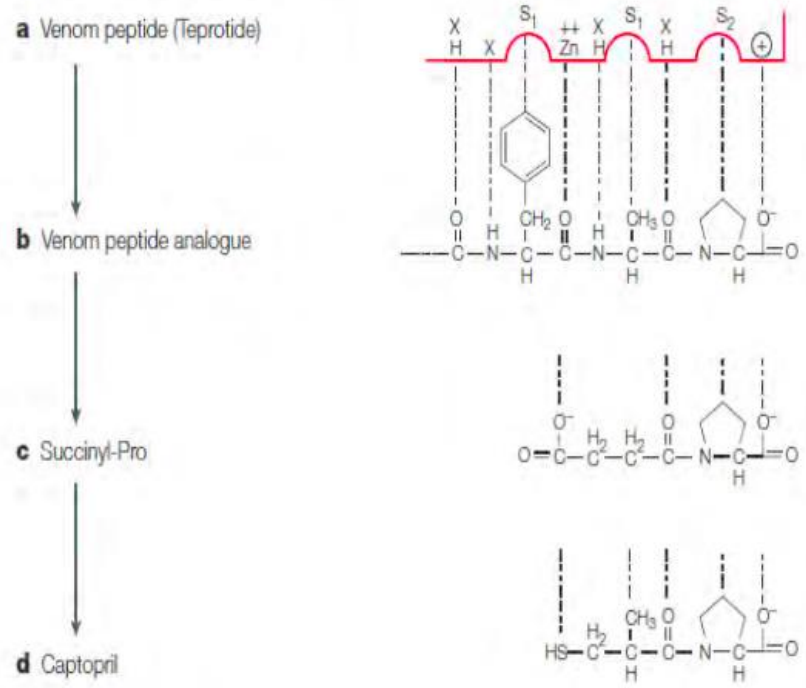


Figure 44 : Schéma récapitulatif, du téprotide au Captopril (R. J. Lewis et al. 2003). [66]

Le schéma ci-dessus nous permet de faire le récapitulatif de cette partie, on voit en a) le téprotide, nonapeptide extrait du venin du Bothrops jararaca, et qui est un IEC naturel mais non administrable chez l'Homme. En b) on voit la relation structure-activité entre le téprotide et le site actif de l'enzyme de conversion. Ces études permettront au Dr. Cushman et à son équipe de synthétiser un analogue du téprotide, la succinyl-L-proline (figure c)). Le problème de ce composé est que son activité n'est pas encore optimale, de plus il possède une faible affinité avec le site de liaison de l'ECA, malgré une très bonne sélectivité pour cette dernière.

Enfin, en d), le Captopril, IEC administré chez l'Homme par voie orale avec un groupement thiol qui remplace le carboxyle de la succinyl-L-proline permettant ainsi une meilleure affinité et une augmentation de l'activité inhibitrice, le tout en conservant la grande affinité. Mais quelles sont réellement les propriétés de ce médicament.
[66]

9 Le Captopril

D'un venin d'une vipère mortelle brésilienne, nous voici maintenant au Captopril, le premier des IEC. Ce médicament a été mis sur le marché le 6 avril 1981, mais quelles sont réellement ses indications, et surtout ses effets indésirables qui seront la cause de la recherche de nouveaux IEC.

9.1 Monographie

Dans la Pharmacopée Européenne, on retrouve la monographie du Captopril.

Nom chimique : (2S)-1-[(2S)-2-méthyl-3-sulfanylpropanoyl]pyrrolidine-2- carboxylique.

Dénomination Commune Internationale (DCI) : Captopril.

Formule brute : $C_9H_{15}NO_3S$.

Formule développée :

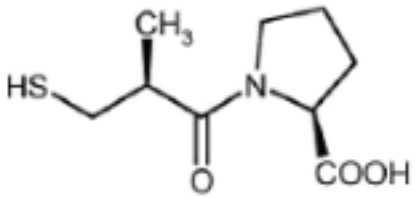


Figure 45 : Structure chimique du Captopril. [67]

Poids moléculaire : 217,3 g/mol.

Caractères :
- Aspect : poudre cristalline blanche (ou sensiblement blanche).
- Solubilité : facilement soluble dans l'eau, dans le chlorure de méthylène, dans le méthanol, et dans des solution diluées d'hydroxydes alcalins. [67]

9.2 Principales indications

Il est important de noter que chez l'enfant, l'utilisation du Captopril ne fait pas l'objet d'une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM). Cependant, il existe de nombreuses publications sur l'utilisation du Captopril chez l'enfant pour l'insuffisance cardiaque et l'hypertension artérielle notamment. Ces résultats sont prometteurs et vont entrainer de nombreuses utilisations de cette molécule pour traiter des formes sévères d'insuffisance cardiaque congestive et d'hypertension chez les enfants. [68], [69], [70]

Voici donc un tableau récapitulatif des principales indications du Captopril, ainsi que sa posologie.

INDICATIONS	POSOLOGIE de l'ADULTE	POSOLOGIE de l'ENFANT
Hypertension artérielle (HTA) et Insuffisance cardiaque (ICC) chroniques	• HTA : Instauration : 50 mg/j en 2 prises. Augmentation de dose possible par palier. • ICC : Instauration progressive : 6,25mg/j puis 12,5mg/j et enfin 25mg/j. Dose recommandée : 50 et 100mg/j réparti en 2 ou 3 prises.	• Nouveaux-nés : Instauration : 0,01mg/kg/prise. Augmentation à 0,05-0,1mg/kg/prise toutes les 8 à 24h. Jusqu'à 0,5mg/kg/prise toutes les 6h. • Nourrissons : Instauration : 6mg/kg en 2 à 4 prises par 24h. Usuellement : 2,5 à 6 mg/kg/jour. • Enfants Instauration : 0,3-0,5 mg/kg/prise 4 à 6 fois par jour. Usuellement : 6mg/kg/jour en 2 à 4 prises. • Adolescents (>13 ans) : Instauration : 12,5-25 mg/kg/prise toutes les 8h. Augmentation par palier de 25mg jusqu'à un maximum de 450mg/jour.
INFARCTUS AIGU DU MYOCARDE	Instauration : 6,25mg puis 12,5mg 2h après puis 25mg 12h après. Entretien : 100mg par jour réparti en 2 prises sur 4 semaines.	
POST INFARCTUS DU MYOCARDE	Usuellement : 75 à 150mg/j en 2 ou 3 prises.	
NEPHROPATHIE DIABETIQUE	Usuellement : 50 à 100 mg/j en 2 ou 3 prises.	

Tableau 1 : Principales indications et posologies du Captopril chez l'enfant et chez l'adulte. [71], [72], [69]

9.3 Mécanisme d'action

Comme on l'a vu précédemment, c'est la compréhension du système rénine-angiotensine-aldostérone qui a permis de découvrir et de synthétiser le Captopril. Ce dernier agit donc comme un inhibiteur de l'enzyme de conversion (IEC) puisqu'il va être reconnu par l'ECA grâce à sa séquence peptidique qui mime celle de l'angiotensine I, substrat naturelle de l'ECA. L'ECA va donc reconnaître par défaut l'IEC et ce dernier va l'inhiber car l'angiotensine ne peut plus s'y fixer. [73]
Cette inhibition a deux effets :

- Accumulation de bradykinine, un vasodilatateur puissant à la fois direct (stimulation de la synthèse de monoxyde d'azote (NO) et de guanosine monophosphate cyclique (GMPc), et indirect (libération de vasodilatateur comme la prostaglandine E2).
- Arrêt de la synthèse d'angiotensine II. [73]

L'angiotensine II possède physiologiquement de nombreux effets à différents niveaux :

- Au niveau vasculaire, elle a une action vasopressive, c'est-à-dire qu'elle induit la contraction des cellules musculaires lisses au niveau vasculaire.
- Au niveau de la surrénal, elle stimule la production d'aldostérone par les cellules glomérulées. Ceci entraine une réabsorption tubulaire du sodium au niveau du tube contourné distal en échange de potassium et de protons.
- Au niveau rénal, elle régule le débit sanguin et la filtration glomérulaire par son action vasopressive.
- Au niveau cérébral, elle va activer la sécrétion de la vasopressine, hormone de la soif, participant à la régulation centrale de la pression artérielle. [73]

C'est grâce à cette double action que les IEC sont très efficaces dans le traitement de l'hypertension artérielle (HTA).

9.4 Pharmacocinétique

9.4.1 Absorption

Grâce aux modifications de la structure chimique qu'on a vu dans la partie précédente, on a réussi a créer un médicament qui est résorbé entre 60 et 75%, après administration par voie orale, par le tractus gastro-intestinal. Si la prise du Captopril se fait pendant le repas, cette résorption est réduite d'environ 30%. Il est donc indiqué de prendre ce médicament le matin à jeun généralement.

Le pic plasmatique lui est atteint en 30 à 45 minutes après administration de 100 mg par voie orale. L'effet du médicament commence environ 15 minutes après sa prise. [72]

9.4.2 Distribution

La liaison aux protéines plasmatiques du Captopril varie entre 25 et 30% selon les sources. Le Volume de Distribution est lui de 7 L/kg de poids corporel.

Vu que l'angiotensine II et l'ECA sont présents à plusieurs niveau dans l'organisme, il est important de noter que le Captopril va se diffuser assez largement dans tous l'organisme, sauf au niveau du système nerveux central. En effet, il ne franchit quasiment pas la barrière hémato-encéphalique, d'ailleurs il diffuse également que très peu dans le lait maternel. Par contre il franchit la barrière foetoplacentaire, il est donc contre-indiqué en cas de grossesse et fortement déconseillé en cas d'allaitement. [74], [75]

9.4.3 Métabolisation

Le Captopril est rapidement métabolisé, essentiellement au niveau hépatique à hauteur de 44%. [72]

9.4.4 Élimination

La demi-vie du Captopril est d'environ deux heures. C'est l'IEC avec la plus courte demi-vie. Elle est augmentée en cas d'insuffisance rénale ou cardiaque, augmentant ainsi le risque de surdosage. Cette demi-vie est, au contraire, diminué chez les enfants (1,5h) qui ont donc besoin de doses adaptées.
L'élimination de tous les IEC est majoritairement rénale (95%) sous forme inchangée. [75]

9.5 Effets indésirables et précautions d'emplois

9.5.1 Effets indésirables

Les effets indésirables du Captopril, et des IEC en général, sont aujourd'hui bien connus. Les principaux effets indésirables (en terme de fréquence d'apparition) sont dus à l'accumulation de bradykinine. Il s'agit principalement d'effets indésirables au niveau respiratoire avec une toux sèche (plus fréquente chez la femme et chez les non-fumeurs), l'enrouement et les maux de gorge (1%). Ces troubles respiratoires peuvent aller jusqu'à la

crise d'asthme voir la détresse respiratoire, ils entrainent donc l'arrêt du traitement même s'ils sont très rares (0,01%).

Autre effet indésirable très important du Captopril, et des autres IEC c'est l'insuffisance rénale. Le nouveau-né du fait de son faible débit de filtration glomérulaire est très à risque. Du fait de sa faible demi-vie, le Captopril est donc principalement indiqué en tant qu'IEC pour inaugurer un traitement chez le nouveau-né car c'est l'IEC qui présente le moins de risque à ce niveau là.

Du fait de son action sur le sodium et le potassium au niveau rénal, une hyperkaliémie dangereuse est possible. De rares cas d'hyponatrémie ont également été observés. [71], [76]

Ces effets indésirables, principalement dus à la structure chimique même du Captopril, vont entrainer au fil des années la multiplication des recherche autour de nouveaux IEC possédant la même action que le Captopril, mais entrainant moins d'effets indésirables.

9.5.2 Interactions médicamenteuses

9.5.2.1 Associations déconseillées

Elles sont principalement dues aux effets rénaux du Captopril. Ce sont les mêmes pour tous les IEC :

- Diurétiques hyperkaliémiant, et les sels de régime (formule sans sodium mais avec un renfort en potassium), augmentent le risque d'hyperkaliémie, surtout en cas d'insuffisance rénale.
- Le lithium, car le Captopril entraine une diminution de son élimination rénale et donc une augmentation de sa concentration sanguine (lithiémie), qui est donc à surveiller régulièrement en cas d'association.

9.5.2.2 Précautions d'emplois

- Antidiabétiques :

Ceci concerne principalement les insulines et les sulfamides hypoglycémiants. En effet le Captopril peut entrainer une majoration de l'effet hypoglycémique chez le patient diabétique traité, pouvant être létal. Ceci nécessite donc une bonne éducation du patient à l'officine pour lui apprendre à reconnaître rapidement et à réagir face aux signes de l'hypoglycémie.

- Baclofène, antidépresseurs :

Le Baclofène peut majorer l'effet antihypertenseur des IEC. Ceci peut être responsable d'hypotension orthostatique augmentant significativement le risque de chute chez les personnes âgées.

- Diurétiques :

Comme on l'a vu dans la partie précédente avec un risque de dyskaliémie. De plus la prise concomitante de ces 2 molécules entraine une augmentation du risque d'insuffisance rénale, nécessitant une surveillance régulière de la fonction rénale chez le sujet traité.

- AINS et salicylés à forte dose :

Augmentation du risque d'insuffisance rénale, en particulier chez les sujets à risque (sujet âgé ou déshydraté).

- Corticoïdes :

Le traitement par corticothérapie chez un sujet traité par IEC nécessite une augmentation des prises de tensions chez le patient. En effet les corticoïdes sont naturellement hyperkaliémiant et hypertenseurs.

Voici donc les principales précautions d'emplois à connaître pour un patient traité par un IEC. Il y en a d'autres mais, plus rare, elles ne seront pas cité ici. [76], [71], [72]

9.5.2.3 Contre-indications

Ces contre-indications découlent de ce qu'on a vu précédemment. Ainsi la grossesse est contre-indiquée en cas de traitement par un IEC. Les antécédents d'hypersensibilité (œdème de Quincke) sous IEC entraine leur contre-indication à vie. L'hyperkaliémie et l'allaitement nécessite une discussion approfondie et une étude des rapport bénéfice/risque par le médecin pour voir si il n'y a pas de traitement plus adapté. [72], [77]

Après la découverte du Captopril, dès les années 1980, les laboratoires pharmaceutiques vont effectuer des recherches pour développer de nouveaux IEC basés sur la structure du Captopril. Le but étant de diminuer les effets indésirables et d'améliorer l'efficacité du traitement.

10 Les Inhibiteurs de l'Enzyme de Conversion

En 1983, suite à l'accélération des recherches sur le Captopril, un deuxième IEC voit le jour : l'Enalapril.

10.1 L'Enalapril

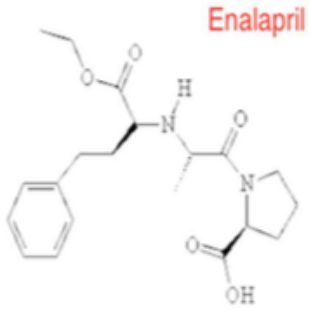


Figure 46 : Structure chimique de l'Enalapril. [63]

Chimiquement, on voit que la fonction thiol du Captopril a été supprimé. On garde le groupement proline chez l'Enalapril, qui est un carboxyalkylpeptids non soufré. Les ligands à l'ECA sont une fonction ester et une fonction acide comme on le voit sur la figure ci-dessous. [78]

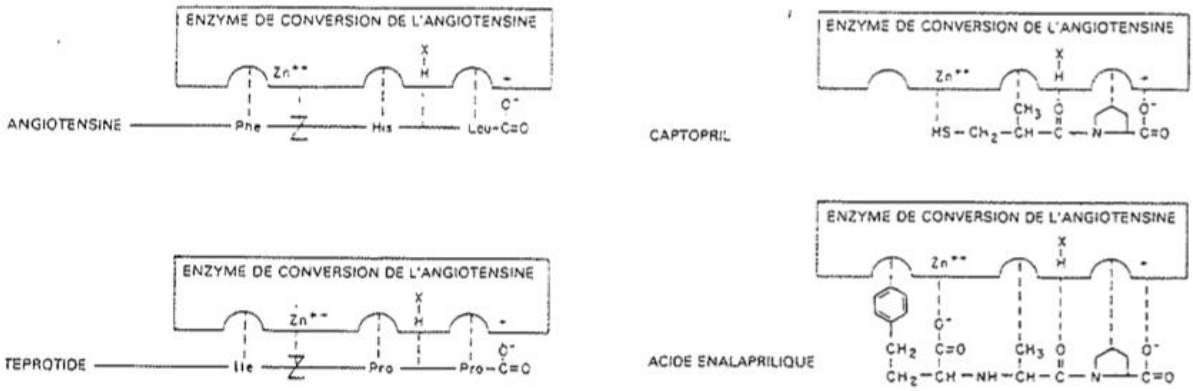


Figure 47 : Représentation de la liaison hypothétique entre le site actif de l'ECA avec l'Enalapril, le Captopril, le téprotide, et l'angiotensine. [79]

Ces modifications chimiques ont-elles réellement un intérêt thérapeutique ? Pour répondre à cette problématique une étude multicentrique de comparaison va être réalisé, à la fois à Ljubljana (Slovénie), à Split et à Zagreb (Croatie), sur les effets antihypertenseurs du Captopril et de l'Enalapril.

Cette étude a été réalisé sur 69 hypertendus des deux sexes, ayant une pression artérielle diastolique (PAS) après 2 semaines sous placebo comprise entre 110 et 130 mm Hg. 35 de ces 69 patients sont sous Enalapril (20 ou 40mg), et 34 sous Captopril (50 ou 100mg). Après deux semaines de traitement, la PAD des deux groupes de patients à significativement baisé. A la fin de l'essai (9 semaines), le Captopril avait diminué la PAD de 180,3 +/- 15,3mmHg, soit une réduction moyenne de 16,9%. Pour l'Enalapril on a une diminution de la PAD de 182,7 +/- 16,7 mm Hg, soit une réduction moyenne de 20,9%. Pour aucun des deux groupes il n'ya eu de modifications significatives de la fréquence cardiaque, ni l'apparition d'effets secondaires importants.

Pour conclure, ces études ont donc montré que l'efficacité sur l'hypertension est comparable pour ces deux molécules, cependant l'Enalapril est jugé plus puissant, car nécessite une plus faible dose administrée (20mg contre 50mg pour le Captopril. [80]

10.2 Les IEC de 2e génération

En raison du grand succès thérapeutique, et économique bien entendu, le développement des IEC devient un objectif pour de nombreux laboratoires pharmaceutiques en Europe et en Amérique. C'est ainsi qu'une deuxième génération d'IEC va naître dès le début des années 1990, avec comme molécules phares le Lisinopril et le Ramipril.

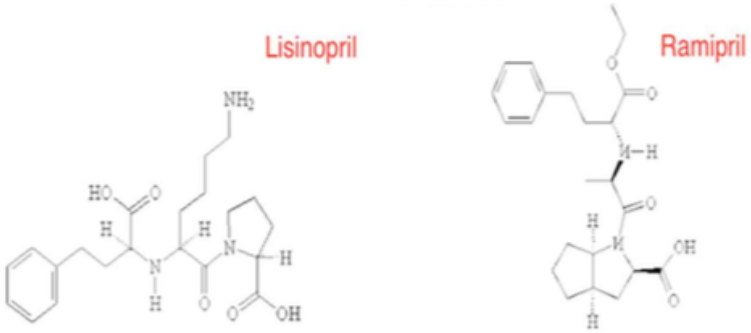


Figure 48 : Représentation du Ramipril et du Lisinopril, IEC de 2e génération. [63]

C'est par la nature chimique de leur ligand au site actif de l'ECA que tous ces IEC vont différer.

ligand au zinc	DCI	*spécialité(s)®*
fonction **thiol**	**captopril**	*captolane, lopril*
carboxyalkyldipeptides non soufrés : - avec une fonction **ester** et une fonction **acide**	**bénazépril** **cilazapril** **énalapril** **périndopril** **quinapril** **ramipril** **trandolapril**	*Cibacène, Briem* *Justor* *Rénitec* *Coversyl* *Acuitel, Korec* *Triatec* *Gopten, Odrik*
- avec **deux** fonctions **acides**	**lisinopril**	*Prinivil, Zestril*
groupement **phosphoré**	**fosinopril**	*Fozitec*

Tableau 2 : Classification des IEC en fonction de leur ligand au zinc de l'ECA. [79]

Les modifications apportées à ces nouvelles molécules vont permettre de diminuer la fréquence d'apparition des effets indésirables, d'augmenter l'efficacité des traitements avec

sans cesse de nouvelles améliorations. Ils vont également permettre une meilleure tolérance et une meilleure observance en diminuant le nombre de prise quotidienne nécessaire. Chaque cas d'HTA possède aujourd'hui un IEC qui lui va, et en cas d'échec thérapeutique sur l'un deux, on peut le substituer par un de ses cousins.

Voici un tableau récapitulatif de tous les IEC existants sur le marché, afin de comparer leurs posologies et leurs dosages.

DCI	SPÉCIALITÉS	DOSAGE	POSOLOGIE
Bénazépril	Cibacène	5 ou 10 mg	2.5 à 10 mg / jour en 1 prise
Captopril	Lopril	12.5, 25 ou 50 mg	25 à 150 mg / jour en 2 à 3 prises en dehors des repas
Cilazapril	Justor	0.5, 1 mg ou 2.5 mg	1 à 2.5 mg en 1 prise
Enalapril	Renitec	5 ou 20 mg	2.5 à 20 mg en 1 prise
Fosinopril	Fozitec	10 ou 20 mg	10 à 20 mg / jour
Imidapril	Tanatril	5 ou 10 mg	2.5 à 10 mg en dehors des repas
Lisinopril	Zestril	5 ou 20 mg	5 à 20 mg
Moexipril	Moex	7.5 ou 15 mg	3.75 à 15 mg
Périndopril	Coversyl	2.5, 5 mg ou 10 mg	2.5 à 5 mg / jour en dehors des repas
Quinalapril	Korec	5 ou 20 mg	5 à 20 mg / jour en 1 ou 2 prises
Ramipril	Triatec	1.25, 2.5, 5 ou 10 mg	1.25 à 10 mg / jour
Trandolapril	Odrik	0.5, 2 ou 4 mg	0.5 à 4 mg par jour en 1 prise
Zofénopril	Zofénil	15 ou 30 mg	7.5 à 30 mg / jour

Tableau 3 : Les principaux IEC, leurs dosages et leurs posologies. [81]

A partir du téprotide du venin du Bothrops jararaca, on a donc réussi à synthétiser un antihypertenseur administrable chez l'Homme par voie orale et efficace pour traiter les pathologies, c'est le Captopril. Face aux effets indésirables et pour profiter de l'apport économique de cette nouvelle famille de médicaments, les laboratoires pharmaceutiques ont développées de nombreuses molécules qui diffèrent par leur site de liaison à l'ECA. Cependant il n'y pas d'IEC « mieux que l'autre », chacun répond à des attentes variables en fonction des patients à traiter, et tous sont efficaces. Leurs diversité, leur efficacité et leur excellent rapport bénéfice/risque est donc un atout pour la thérapeutique actuelle et explique le fait que cette famille de médicament et en première ligne pour traiter l'hypertension artérielle ainsi que les insuffisances cardiaques. Merci le Bothrops !

CONCLUSION GENERALE

Au-delà du mythe, le Bothrops jararaca, « serpent-tueur » du Sud-Est brésilien, possède un véritable intérêt thérapeutique. On a vu au cours de cette thèse que des années d'études, menées par différents pays sur différents continents, ont permis d'isoler un peptide, le téprotide, à partir de son venin, directement à l'origine de la famille de médicaments antihypertenseurs les plus utilisés par l'Homme. Au-delà de ça, certaines toxines sont utilisées aujourd'hui pour dépister des maladies génétiques et pour traiter des anomalies de la coagulation. Alors oui, le Bothrops jararaca tue des centaines d'individus tous les ans dans l'Amazonie brésilienne, mais en contrepartie il sauve des vies en évitant à des millions de personnes traitées par IEC de trépasser.

Dans la recherche fondamentale, et cela depuis plusieurs siècles, l'étude des différents venins d'animaux ont permis de comprendre de nombreux principes médicaux, allant de la compréhension de la physiologie humaine, aux mécanismes de certaines pathologies. Plus important encore, comme on l'a vu, l'étude des venins a mené à la découverte de nombreux médicaments ayant un impact significatif sur la santé humaine. Depuis la découverte du Captopril, et du fait de leur grande diversité, les toxines des serpents ont suscité le grand intérêt des chercheurs du monde entier. Aujourd'hui encore, l'Industrie Pharmaceutique investit de plus en plus dans l'élaboration de médicaments à base de venins. Cependant comme on l'a vu au cours de cette thèse, le processus est long et couteux. De plus l'obtention d'un résultats n'est jamais garanti.

A l'image du Bothrops, la biodiversité de notre planète est une ressource fondamentale pour l'Humanité, notamment en médecine. Il est acté que quasiment toutes les maladies, tous les poisons détiennent leurs remèdes dans la faune et la flore. C'est ainsi que la déforestation, l'urbanisation en générale, représente une menace pour l'ensemble de cette biodiversité et donc pour nous. Protégeons la, protégeons nous. Outre les serpents, les anémones de mer, victimes de la dégradation des massifs coralliens dans le Monde, via leurs venins, ont fourni des traitements efficaces pour le psoriasis. Le monstre de Gila, espèce redoutée et rebutante, à pourtant, via son venin toujours, instruit l'Homme sur le traitement de certaines anomalies pancréatiques. Ne voyons pas que le côté effrayant, repoussant ou même dangereux de certains animaux, pour la plupart ils étaient là avant nous. Apprenons plutôt à vivre en osmose avec eux, afin de perpétuer une éternelle tradition, la recherche médicale. Ils ont encore pleins de choses à nous offrir.
Comme beaucoup d'espèces animales et végétales, de nombreuses espèces de serpents sont actuellement en voie d'extinction. Hors la survie de notre espèce est étroitement liée à la survie de cette biodiversité. Chaque organisme vivant peut constituer une ressource vitale encore inconnue. Hors chaque jour, sous l'impact de l'activité humaine (déforestation, pollution, urbanisation), des espèces entières disparaissent, nous privant ainsi d'une immense Pharmacopée. Alors protégeons nos espèces, et protégeons nous, avant qu'il ne soit trop tard.

CREDITS PHOTOGRAPHIES

- Photo 1 : *Boa constrictor*. Par Boris Klusmeyer (20/04/2001) : www.herprocus.com
- Photo 2 : *Vipera aspis*. Par Petr Balej (21/12/2003) : www.reptarium.cz/en/ vipera-aspis
- Photo 3 : *Vipera berus*. Par Petr Meduna (14/04/2008) : www.reptarium.cz/en/vipera-berus
- Photo 4 : *Vipera ursinii*. Par Premysl Hala (07/07/2008) : www.reptarium.cz/en/vipera-ursinii
- Photo 5 : Exuvie d'une vipère dans une prairie en France. Photographe inconnu : www.serpentsdefrance.fr
-

BIBLIOGRAPHIE

[1] L. Delhoume, « Le traitement actuel des morsures de vipères en France », p. 104.
[2] A. PERRIMOND, « Le Serpent, son venin et ses applications. These de Docteur en Pharmacie. Univeristé Aix-Marseile », p. 463, 2019.
[3] V. VIVALLI, « Actualisation des connaissances sur la sytématique et la phylogénie des serpents. Thèse de Docteur en Vétérinaire. Univeristé de Toulouse. » 2007.
[4] N. VIDAL et SB. HEDGES, « The phylogeny of squamate reptiles inferred from nine nuclear protein-coding genes. Department of Biology and Astrobiology Research Center. Pennysylvanie State University. Vol 328. p.1000-1008 ». oct. 2005.
[5] B. KLUSMEYER, « Boa constrictor. Reptile-DATAbase. Online : http://reptile-database.reptarium.cz/species?genus=Boa&species=constrictor. » .
[6] R. PYRON et F. BURBRINK, « The phylogeny of advanced snake (Colubroidae). Article de Moleculare Phylogenetics and Evolution. Vol.58. 2011 ». .
[7] F. G. GRAZZIOTIN *et al.*, « Molecuar phylogeny of the New World Dipsadidae (Serpentes : Colubroidae). Article de Cladistics. 2011 ». .
[8] M. E. ALFARO, D. R. KARNS, H. K. VORIS, C. D. BROKS, et B. L. STUART, « Phylogeny, evolutionary history, and biogeography of Oriental-Australian rear-fanged water snake (Colubroidae) inferred from mitochondrial and nuclear DNA sequences. Article de Moleculare Phylogenetics and Evolution. Vol.46. 2008. » .
[9] « Reptile-Database (en ligne) : http://www.reptile-database.org/db-info/taxa.html#Ser ». .
[10] J.-P. Chippaux, *Venins de serpent et envenimations. p.87-133*. IRD Éditions, 2002.
[11] J. P. CHIPPAUX, *Venins de Serpents et envenimation. IRD Edition. p.27-57*, IRD. 2002.
[12] A. MURPHY, « Bothrops jararaca. Animal Diversity Web. University of Michigan. Museum of Zoology. » .
[13] M. FURTADO, S. TRAVAGLIA-CARDOSO, et M. ROCHA, « Sexual dimorphism in venom of Bothrops jararaca. Toxicon. Volume 48. p.401-410. » 2014, [En ligne]. Disponible sur: http://www.ecoevo.com.br/publicacoes/alunos/silvia_cardoso/toxiconsexualdimorphismbjararaca_2006.pdf.
[14] J. CAMPBELL et W. LAMAR, « The Venomous Reptiles of Western Hemisphere. Ithaca & London Compstock Publishing Associates. » 2004.
[15] M. JAMROZ, « Bothrops alterné. Online : https://ar.pinterest.com/pin/548172585877910555/ ». .
[16] C. MATTISON, *Tous les Serpents du Monde. p.271.*, Editions Niestlé. 2008.
[17] « La mue. Online : http://www.serpentsdefrance.fr/lamue.php ». .
[18] « online : https://serpent.cheloniophilie.com/Anatomie/ ». .
[19] R. HOFFSTETTER, « Contribution à l'étude des Elapidae atuels et fossiles et de l'ostéologie des ophidiens. Archives du Museum d'Histoire Naturelle de Lyon. Editions Percée. p.9-78. », p. p.9-78, 1939.
[20] R. BAUCHOT, C. BON, P. DAVID, et J.-P. GASC, « Serpents ». Editions Artémis, 2005, [En ligne]. Disponible sur: ISBN 9782844164100.
[21] S. BAILON, J. GARCIA-PORTA, J. QUINTANA-CARDONA, et C. R. PALEVOL, « Première découverte de Viperidae dans les îles Baléares (Espagne) : des vipères du Néogène de Minorque. description d'une nouvelle espèce du Pliocène. Académie des Sciences. p.277-234 ». Editions scientifiques et médicales Elsevier SAS., 2002.

[22] B. A. YOUNG, « Snake Bioacoustics : Toward a richer understanding of the behavioral ecology of snake. Article de The Quarterly Review of Biology. Volume 3. » 2003.
[23] G. NAULLEAU, « Premières observations sur le comportement de chasse et de capture chez les vipères et les couleuvres. Laboratoirer de Psychophysiologie. Faculté de Sciences de Nancy. » .
[24] Y. LEROY, « L'Univers odorant de l'animal. Editions Boubée. p.375. » 1987.
[25] R. BROSSUT, « Phéromones : la communication chimique chez les animaux. CNRS. p.143 ». 1996.
[26] J.-P. CHIPPAUX, *Venins de Serpents et envenimation. p.288*, IRD Editions. 2002.
[27] J. CHIPPAUX, *Venins de serpents et envenimation. p.61-86*, IRD Editions. 2002.
[28] J. RAGE, *L'appareil venimeux des serpents*, Bordas. 1994.
[29] S. P. Mackessy et L. M. Baxter, « Bioweapons synthesis and storage: The venom gland of front-fanged snakes », *Zoologischer Anzeiger - A Journal of Comparative Zoology*, vol. 245, nº 3- 4, p. 147- 159, nov. 2006, doi: 10.1016/j.jcz.2006.01.003.
[30] A. Cyrielle, « Venins de serpents : entre toxicité et intérêt en thérapeutique humaine », *Diplome d'Etat de Docteur en Pharmacie*, p. 98, 2015.
[31] C.-Y. Lee, *Snake Venoms.* Berlin/Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1979.
[32] C. SERINO-SILVA *et al.*, « Purification and characterization of the gamma-phospholipase inhibitor from Bothrops jarraraca snake serum. », *PLoS One*, 2018.
[33] M. SOKRINE et C. BON, *Réanimations des Intoxications Aigues; Envenimation par les Vipères françaises*, Editions Masson. 1995.
[34] S. Larréché, G. Mion, P. Clapson, B. Debien, D. Wybrecht, et M. Goyffon, « Neurotoxines ophidiennes », *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, vol. 27, nº 4, p. 310- 316, avr. 2008, doi: 10.1016/j.annfar.2008.02.010.
[35] D. FAILLE, « Physiologie et explorationde l'hémostase (Partie 1). Cours TIssu Sanguin. Univeristé de Paris ». 2017.
[36] « These medicaments issus des venins.pdf ». .
[37] S. LARRECHE, G. MION, et M. GOYFFON, « Troubles de l'hémostase induits par les venins de serpents. Article de Anesth Réanimation. Volume 27. 2008. p302-309. » 2008.
[38] N. A. MARSH, « Diagnostic Uses of Snake Venom. Article de PHT. Volume 31. 2001. p.211-217. » 2001.
[39] « AFP. Leur métier : attraper des serpents. Article du Dauphiné. Décembre 2014. » .
[40] « L'électrophorèse - biotechnologie.webarchive ». .
[41] « Techniques électrophorétiques.webarchive ». .
[42] « M. JOUANNET. Analyse immuno-électrophorétique appiquée aux venins de serpents. Toxicon. Vol.5. p.191-199 ». .
[43] JJ. AUCLAIR, « Principe de l'immunoélectrophorèse ». online.
[44] E. ZYSMAN, « Techniques et principes de la chromatographie. Université de Sherbrooke ».
[45] « René LAFONT. Techniques chromatographiques. BMedia. 2016 ». .
[46] « HPLC.pdf ». .
[47] « Guide Pratique d'Agilent pour "La chromatographie d'exclusion stérique pour l'analyse de biomolécules". The Mesure Of Confidence. Agilent Technologies. 2015 ». 2015.
[48] R. LEBRUN, « La spectrométrie de masse : une technique d'étude structurale des protéines. Plateforme protéomique de Microbiologie de la Méditerranée. FR3479 CNRS_AMU. » 2013.
[49] M. AHAKOUD, « Le séquencage d'acide désoxyribonucléique : principe, technique,

indications médicales et experience du CHU Hassane II de Fès.Thèse de Docteur en Médecine. Université de Fès. » 2015.
[50] K. WESTERAND, « DNA Sequencing cost. NHGRI Large-Scale Genome Sequencing Program. »
[51] T. Glenn, « Field guide to next-generation DNA Sequencers. », *MolEcolREsour*, vol. 11, p. p.759-769, 2011.
[52] M. TOYAMA *et al.*, « Biophysical, histopathological and pharmacological characterization of crotamine isoforms F22 and F32 ». Department of Physiology and Biophysics, 2002.
[53] A. C. M. CAMARGO, D. IANZER, J. R. GUERREIRO, et S. M. T. SERRANO, « Bradykinin-potentiating peptides : Beyond captopril. », *Department of Cell Biology and Development, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Brazil. Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada – CAT/CEPID, Instituto Butantan, Brazil*, 2010.
[54] B. J. HAGWOOD et M. ROCHA E SILVA, « Snake venom, bradykinin and the rise of autopharmacology. Toxicon. 1997 ». 1997.
[55] J. L. BASCANDS, J.-P. SCHANSTRA, J.-P. GIROLAMI, et R. COUTURE, « Les récepeteurs de la bradykinine : de nouveaux rôles physio-pathologiques. Article de Medecine/sciences. Volume 19. » 2003.
[56] M. W. PENNINGTON, A. CZERWINSKI, et R. S. NORTON, « Peptide therapeutics from venom : Current status and potential. Article de Bioorg MedChem. Vol. 26. p.2738-2758. » 2018.
[57] Y. S. BAKHLE, « Conversion of angiotensin I to angiotensin II by cell-free extracts of dog lung. Nature. 1968;220:919-921 ». .
[58] « Système rénine-angiotensine-aldostérone. Online : http://www.takween.com/enzymologie/enzymes-inhibiteurs-exercices.html. Consulté le 14/08/2020. » .
[59] A. ROUSSEAU, A. MICHAUD, M.-T. CHAUVET, M. LENFANT, et P. CORVOL, « The hemoregulatory peptide N-acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro is a natural and specific substrate of the N-terminal active site of human angiotensin- converting enzyme. p.270 ». 1995.
[60] L. WEI, E. CLAUSER, F. ALHENC-GELAS, et P. CORVOL, « The two homologous domains of human angiotensin I-converting enzyme interact differ- ently with competitive inhibitors. » 1992.
[61] R. NATESH, S. L. SCHWAGER, E. D. STURROCK, et K. R. ACHARYA, « Crystal structure of the human angiotensin-converting enzyme-lisinopril complex. p.551–554. » 2003.
[62] « Hayashi, M.A., et al.The C-type natriuretic peptide precursor of snake brain contains highly specific inhibitors of the angiotensin- converting enzyme. J. Neurochem. p.969–977. 2003 ». .
[63] D. W. CUSHMAN et M. A. ONDETTI, « History of the design of Captopril and related inhibitors of angiotensin converting enzym. Article de Ahajournals at Tulane University. 2015. Vol17. p.589-592. » .
[64] L. D. BYERS et R. WOTFENDEN, « Binding of the biproduct analog benzylsuccinic acid by carboxypeptidase A. Biochemistry 1973; 12:2070-2078 ». .
[65] M. A. ONDETTI, B. RUBIN, et D. W. CUSHMAN, « Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: New class of orally active antihypertensive agents. Article de Science. 1977. Volume 196. p.441-444. » .
[66] C. AHKONG, « Venins de serpents : entre toxicité et intérêt en thérapeutique humaine. », Thèse de Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie, Université de Nantes, 2015.

[67] Strasbourg. Conseil de l'Europe. p.6499, « Pharmacopée Européenne, le Captopril. » 2008.
[68] B. L. MIRKIN et T. J. NEWMAN, « Efficacy and safety of captopril in the treatment of severe childhood hypertension : report of the International Study Group. Article de Pediatric 1985. Volume 75. p.1091. » .
[69] J. FLYNN, « Pharmacologic management of childhood hypertension : current status, future challenges. American Journal of Hypertension. 2002. Volume 15. p.30-33. » .
[70] F. CACHAT, « New drug approaches of the treatment of heart failure in infants and children. Drugs. 1990. p.388-393. » .
[71] « Guide Pratique des Médicaments Dorosz. Editions Maloine. 2009, 28ème édition. Paris. p.1893 ». .
[72] « Dictionnaire VIDAL. Editions Vidal, 92ème édition. Paris. 2016. p.2322. » .
[73] A. MIMRAN, « HTA et système rénine-angiotensine-aldostérone. La Revue de médecine interne. 2007. p.11 ». .
[74] R. G. DEVLIN et P. M. FLEISS, « Captopril in human blood and breast milk. Journal of Clinical Pharmacology. 1981. p.110-113. » .
[75] K. KRIPALANI, D. McKINSTRY, S. SINGHVI, D. WILLARD, R. VUKOVIC, et B. MIGDALOF, « Disposition of Captopril in normal subjects. Clinical Pharmacology and Therapeutics. 1980. Volume 27. p.636-641. » .
[76] « Base de données Thériaque. CNHIM. En ligne : http://theriaque.org consulté le 22/08/2020. » .
[77] C. TAKETOMO, J. HODDING, et D. KRAUS, « Pediatric dosage handbook. Editions Hudson : Lexi-comp. p.1600. » .
[78] C. RICHER, A. SCHWEBIG, J. F. GIUDICELLI, et J. MENARD, « Les IEC. Pharmacologie clinique, bases de thérapeutique. 2e edition. 1988. p.334. » .
[79] C. GOURBIERE, « Des systèmes rénine-angiotensine tissulaires au bénéfice thérapeutique des inhibiteurs de l'enzyme de conversion. », Univeristé Paris XIII, 1996.
[80] Z. RUMBOLDT, M. MARINKOVIC, et J. DRINOVEC, « Enalapril versus Captopril : a double-blind multicentre comparison in essential hyertension. National Library of Medicine. PMID : 2841251. 1988 ». .
[81] A. BUISSART, « Le conseil officinal dans le bon usage des médicaments à visée anti-hypertensive : Chronothérapie et optimisation thérapeutique. », Thèse de Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie, Univeristé de Lille, 2013.