



**HAL**  
open science

# Venins de serpent et hémostase : revue bibliographique et mesure de l'activité de protéases ophidiennes

Gabrielle Le Guyadec

► **To cite this version:**

Gabrielle Le Guyadec. Venins de serpent et hémostase : revue bibliographique et mesure de l'activité de protéases ophidiennes. Sciences pharmaceutiques. 2022. dumas-03843985

**HAL Id: dumas-03843985**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03843985v1>**

Submitted on 8 Nov 2022

**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.

## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance.

La propriété intellectuelle du document reste entièrement celle du ou des auteurs. Les utilisateurs doivent respecter le droit d'auteur selon la législation en vigueur, et sont soumis aux règles habituelles du bon usage, comme pour les publications sur papier : respect des travaux originaux, citation, interdiction du pillage intellectuel, etc.

Il est mis à disposition de toute personne intéressée par l'intermédiaire de [l'archive ouverte DUMAS](#) (Dépôt Universitaire de Mémoires Après Soutenance).

Si vous désirez contacter son ou ses auteurs, nous vous invitons à consulter en ligne les annuaires de l'ordre des médecins, des pharmaciens et des sages-femmes.

Contact à la Bibliothèque universitaire de Médecine Pharmacie de Grenoble :

[bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr](mailto:bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr)

Année : 2022

**VENINS DE SERPENT ET HÉMOSTASE : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE ET MESURE  
DE L'ACTIVITÉ DE PROTÉASES OPHIDIENNES**

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

SPÉCIALITÉ : BIOLOGIE MÉDICALE

Par Mme Gabrielle LE GUYADEC

*[Données à caractère personnel]*

THÈSE SOUTENUE PUBLIQUEMENT À LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Le 19/10/2022

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE :

Président du jury :

M. le Pr Pascal MOSSUZ

Membres :

M. le Dr Étienne BRUDIEU

M. le Dr Jean-Philippe CHIPPAUX

Mme le Dr Claire FLAUJAC

M. le Dr Raphaël MARLU (directeur de thèse)

*L'UFR de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs*

## ENSEIGNANTS - CHERCHEURS Année 2022 / 2023

Doyen de la Faculté - Pr Michel SÈVE  
Vice-Doyen Pédagogie - Dr Pierre CAVAILLÈS  
Vice-Doyen Recherche – Pr Walid RACHIDI

STATUT	NOM	PRÉNOM	LABORATOIRE	HDR
MCF	ALDEBERT	DELPHINE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheREx	Oui
PU-PH	ALLENET	BENOÎT	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, THEMAS	Oui
AHU	AMEN	AXELLE		
Professeur Emérite	BAKRI	ABDELAZIZ	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS	
MCF	BARDET	JEAN-DIDIER	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, THEMAS	
MCF	BATANDIER	CÉCILE	LBFA – INSERM U1055	
PU-PH	BEDOUCHE	PIERRICK	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, THEMAS	Oui
MAST	BELLET	BÉATRICE	-	
MCF	BOUCHERLE	BENJAMIN	DPM - UMR 5063 CNRS	
PU	BOUMENDJEL	AHCENE	LRB /INSERM U 1039	Oui
MCF	BOURGOIN	SANDRINE	TIMC	
MCF	BRETON	JEAN	LCIB – UMR E3 CEA	Oui
MCF	BRIANÇON-MARJOLLET	ANNE	HP2 – INSERM U1042	Oui
PU	BURMEISTER	WILHEM	UVHCI- UMI 3265 EMBL CNRS	Oui
MCU-PH	BUSSER	BENOÎT	Institute for Advanced Biosciences, UGA / Inserm U 1209 / CNRS 5309	Oui
Professeur Emérite	CALOP	JEAN		
MCF	CAVAILLÈS	PIERRE	IAB	
MCU-PH	CHANOINE	SÉBASTIEN	CR UGA - INSERM U1209 - CNRS 5309	
MCF	CHOISNARD	LUC	DPM – UMR 5063 CNRS	
MCU-PH	CHOVELON	BENOIT	DPM – UMR 5063 CNRS	
MAST	COMBE	JÉRÔME	-	
PU-PH	CORNET	MURIEL	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheREx	Oui
Professeur Emérite	DANEL	VINCENT	-	
ATER	DARRACQ GHITALLA CIOCK	MARIE		
Professeur Emérite	DECOUT	JEAN-LUC	DPM – UMR 5063 CNRS	
MCF Emérite	DELÉTRAZ-DELPORTE	MARTINE	LPSS – EAM 4129 LYON	
MCF	DEMEILLERS	CHRISTINE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS	Oui
PU-PH	DROUET	CHRISTIAN	GREPI EA7408	Oui
PU	DROUET	EMMANUEL	IBS – UMR 5075 CEA CNRS HIV & virus persistants Institut de Biologie Structurale	Oui
MCF	DURMORT	CLAIRE	IBS – UMR 5075 CEA CNRS	Oui
PU-PH	FAURE	PATRICE	DPM – UMR5063	Oui
MCF	FAURE-JOYEUX	MARIE	HP2 – INSERM U1042	Oui

STATUT	NOM	PRÉNOM	LABORATOIRE	HDR
PRCE	FITE	ANDRÉE	-	
MCU-PH	GARNAUD	CÉCILE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheReX	
PRAG	GAUCHARD	PIERRE-ALEXIS	-	Oui
PU-PH	GERMI	RAPHAËLE	IBS – UMR 5075 CEA CNRS HIV & virus persistants Institut de Biologie Structurale	Oui
MCF	GÈZE	ANNABELLE	DPM – UMR 5063 CNRS	
MCF Émérite	GILLY	CATHERINE	DPM – UMR 5063 CNRS	Oui
MCF	GONINDARD	CHRISTELLE	LECA – UMR CNRS 5553	
Professeure Émérite	GRILLOT	RENÉE	-	
MCF	GUIEU	VALÉRIE	DPM – UMR 5063 CNRS	Oui
MCU-PH	HENNEBIQUE	AURÉLIE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheReX	
MCF	HININGER-FAVIER	ISABELLE	LBFA – INSERM U1055	
MCF	KHALEF	NAWEL	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS	Oui
MCF	KOTZKI	SYLVAIN	HP2 – UMR 51042	
MCF	KRIVOBOK	SERGE	DPM – UMR 5063 CNRS	Oui
AHU	LEENHARDT	JULIEN	INSERM – U1039	Oui
PU	LENORMAND	JEAN-LUC	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheReX	
AHU	LEO	CAROLINE		
PU	MARTIN	DONALD	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS	
PRCE	MATTHYS	LAURENCE	-	
AHU	MINOVÉS	MÉLANIE	HP2 – INSERM U1042	Oui
PU	MOINARD	CHRISTOPHE	LBFA - INSERM U1055	Oui
PU-PH	MOSSUZ	PASCAL	IAB – INSERM U1209	Oui
MCF	MOUHAMEDOU	BELLO	LECA – UMR 5553 CNRS	Oui
MCF	NICOLLE	EDWIGE	DPM – UMR 5063 CNRS	
MCF	OUKACINE	FARID	DPM – UMR 5063 CNRS	Oui
ATER	OZCAN	BILGEHAN		
MCF	PERES	BASILE	DPM – UMR 5063 CNRS	Oui
AHU	PERRIER	QUENTIN		
MCF	PEUCHMAUR	MARINE	DPM – UMR 5063 CNRS	Oui
PU	PEYRIN	ERIC	DPM – UMR 5063 CNRS	
PU	RACHIDI	WALID	BGE/BIOMICS/ CEA	Oui
PU	RAVELET	CORINNE	DPM – UMR 5063 CNRS	Oui
PU	RIBUOT	CHRISTOPHE	HP2 – INSERM U1042	
Professeure Émérite	ROUSSEL	ANNE-MARIE	-	Oui
PU-PH	SÈVE	MICHEL	TIMC	Oui
MCF	SOUARD	FLORENCE	DPM – UMR 5063 CNRS	Oui

STATUT	NOM	PRÉNOM	LABORATOIRE	HDR
MCF	SPANO	MONIQUE	IBS – UMR 5075 CEA CNRS	
MCF	TARBOURIECH	NICOLAS	IBS – UMR 5075 CEA CNRS	
AHU	TRUFFOT	AURÉLIE		
MCF	VANHAVERBEKE	CÉCILE	DPM – UMR 5063 CNRS	Oui
AHU	VITALE	ELISA		
MCF	WARTHER	DAVID	DPM	
Professeur Emérite	WOUESSIDJEWÉ	DENIS	-	

**AHU** : Assistant Hospitalo-Universitaire  
**ATER** : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches  
**BCI** : Biologie du Cancer et de l'Infection  
**CHU** : Centre Hospitalier Universitaire  
**CIB** : Centre d'Innovation en Biologie  
**CRI** : Centre de Recherche INSERM  
**CNRS** : Centre National de Recherche Scientifique  
**DCE** : Doctorants Contractuels Enseignement  
**DPM** : Département de Pharmacochimie Moléculaire  
**HP2** : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire  
**IAB** : Institute for Advanced Biosciences  
**IBS** : Institut de Biologie Structurale  
**LAPM** : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes  
**LBFA** : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée  
**LCBM** : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux  
**LCIB** : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie  
**LECA** : Laboratoire d'Ecologie Alpine  
**LPSS** : Laboratoire Parcours Santé Systémique  
**LR** : Laboratoire des Radio pharmaceutiques  
**MAST** : Maître de Conférences Associé à Temps Partiel  
**MCF** : Maître de Conférences des Universités  
**MCU-PH** : Maître de Conférences des Universités et Praticiens Hospitaliers  
**PAST** : Professeur Associé à Temps Partiel  
**PRAG** : Professeur Agrégé  
**PRCE** : Professeur certifié affecté dans l'enseignement  
**PU** : Professeur des Universités  
**PU-PH** : Professeur des Universités et Praticiens Hospitaliers  
**SYMMES** : Systèmes Moléculaires et nanoMatériaux pour l'Energie et la Santé  
**TIMC-IMAG** : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation  
**UMR** : Unité Mixte de Recherche  
**UVHCI** : Unit of Virus Host Cell Interactions

## REMERCIEMENTS

***A mon président de thèse, le Professeur Pascal MOSSUZ,***

Pour m'avoir fait l'honneur de présider ce jury de thèse.

***A mon directeur de thèse, le Docteur Raphaël MARLU,***

Je vous remercie d'avoir accepté de diriger ma thèse.

Merci de m'avoir proposé ce sujet de thèse passionnant et captivant, de m'avoir soutenue et de m'avoir accompagnée de manière bienveillante dans ce travail. Merci pour vos conseils, votre investissement, vos corrections et votre disponibilité qui m'ont permis de travailler dans la sérénité et la bonne humeur.

***A mes juges,***

***le Professeur Jean-Philippe CHIPPAUX, le Docteur Etienne BRUDIEU, le Docteur Claire FLAUJAC,***

Pour avoir aimablement accepté de participer à ce jury de thèse. Soyez assurés de l'honneur que vous me faites.

***A Landry,***

Merci pour ton aide précieuse sur la partie expérimentale de ma thèse, pour ta gentillesse, ta bonne humeur et ton efficacité.

***Au laboratoire d'hémostase,***

Merci pour votre accueil, votre disponibilité et votre gentillesse,

Merci à l'ensemble des personnes bienveillantes rencontrées lors de mes stages d'internat dans les différents services, à vous qui m'avez accompagnée, formée et encadrée, je vous remercie chaleureusement.

## **REMERCIEMENTS PERSONNELS :**

Merci à tous pour le soutien que vous m'avez apporté durant ces dernières années d'études parfois intenses et éprouvantes, et aux apprentissages de la vie à vos côtés, à vous qui m'avait faite grandir et devenir celle que je suis mais surtout celle que je souhaite être,

### ***À ma Famille***

*Maman* : à ton courage, ton altruisme, ta sensibilité,

*Papa* : à ta force tranquille

Merci à vous 2 pour votre soutien moral et votre confiance indéfectible,

*Mathias* : à ta sérénité, ta bienveillance, ta fidélité, j'ai grandi dans tes traces, je suis telle que je suis aujourd'hui aussi grâce à toi.

*À mes grands-mères, Mamie et Nanou* : à votre détermination,

*À mes grands-pères, Papi et Papic* : à votre créativité et votre ouverture d'esprit

### ***À mes amis***

*Marine* : ton écoute, ta compréhension, tes challenges et ton amour pour les chamois

*Emilie* : ton énergie, ta folie, ta confiance, ton attraction pour les sautes mouton

*Colette* : ton ouverture d'esprit, ton indépendance, ta bonté, et nos fous rires en cours ("protéines pas sortir du boudin")

*Marion* : ton courage, ta motivation sans faille et *Seb* à tout jamais reconnaissante de tes talents de conducteur sur les routes corses

*Noëline* : ta douceur, ton altruisme, tes doutes qui rendent les choix d'autant plus précieux

A nos moments partagés et à tous ceux à venir,

*PL et Orlane*: votre humour, et la fascination de PL pour la mousse

### ***À mes amis d'enfance et nos coups de soleil annuels,***

*Marine R.* : ta persévérance, ton sourire et ton optimisme

*Salomé* : ton rire, ta façon de rendre chaque histoire passionnante,

### ***À mes amis rencontrés au cours de l'internat,***

*Amélie* : ta douceur, ton calme, ton soutien sans faille

*Giang* : ta gentillesse, ta complicité, ta compréhension,

*Imad* : ta bonne humeur, ta perspicacité, ton écoute,

*Marine P.* : ta transmission d'énergie positive et de passion, ta créativité

*Morgan* : ton énergie, ta spontanéité

*Oriane* : ta sérénité, ta bienveillance et ta force intérieure

*Julien* : ta complicité, ta sensibilité artistique, ta transmission de confiance

*Edouard* : ton soutien, ton aura douce et puissante

*Mathilde et Marie H.* : votre bonne humeur, votre enthousiasme et votre fraîcheur

*Marie K.* : ta patience, ton sourire qui réchauffe le cœur, ta douceur et ton amour de la montagne

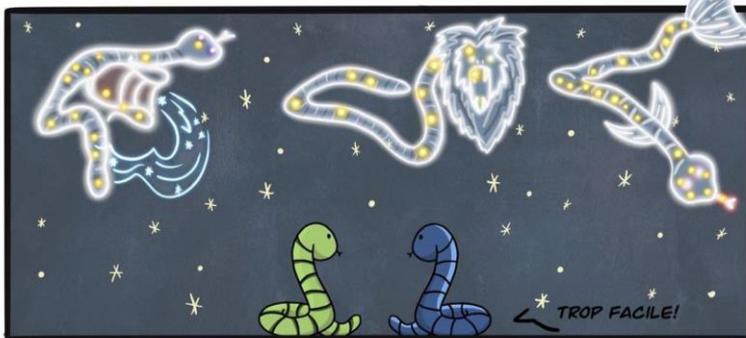
*Eve, Alexia et Alice* : votre bienveillance, votre rayonnement, votre motivation,

A tous les internes ayant croisé mon chemin et tout particulièrement : *Charlotte, Lydie, Jeanne,*

*Sébastien, Laura, Joris, Vincent, Arthur, ...*

Merci d'avoir égayé toutes ces années par votre présence, vos sourires et votre éclat.

Et à tous les autres,



*A mes grands-pères,  
Papi et Papic,  
Aux feux d'artifices et aux lettres*

**VENINS DE SERPENT ET HÉMOSTASE :**  
**REVUE BIBLIOGRAPHIQUE ET MESURE**  
**DE L'ACTIVITÉ DE PROTÉASES**  
**OPHIDIENNES**

# Table des matières

<b>Table des illustrations .....</b>	<b>15</b>
<b>Liste des abréviations, acronymes.....</b>	<b>18</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>19</b>
<b>Partie 1 : Venins de serpent et hémostase.....</b>	<b>22</b>
1. Classification des serpents .....	22
<b>1.1 Classification phylogénétique des serpents .....</b>	<b>22</b>
1.1.1 Scolécophidiens .....	23
1.1.2 Aléthinoophidiens.....	24
1.1.2.1 Colubridae .....	24
1.1.2.2 Atractaspididae .....	26
1.1.2.3 Viperidae .....	26
1.1.2.4 Elapidae.....	29
<b>1.2 Classification selon le type d'appareil venimeux.....</b>	<b>30</b>
1.2.1 Les Aglyphes .....	31
1.2.2 Les Opisthoglyphes.....	31
1.2.3 Les Protéroglyphes.....	32
1.2.4 Les Solénoglyphes.....	33
2. Physiologie de l'hémostase.....	34
<b>2.1 Hémostase primaire.....</b>	<b>34</b>
2.1.1 Vasoconstriction réflexe .....	34
2.1.2 Adhésion plaquettaire .....	34
2.1.3 Activation plaquettaire.....	35
2.1.4 Agrégation plaquettaire .....	35
<b>2.2 Les grandes étapes de la coagulation plasmatique.....</b>	<b>36</b>
2.2.1 Initiation .....	36
2.2.2 Amplification .....	37
2.2.3 Synthèse des facteurs de la coagulation .....	38
2.2.4 Phase contact .....	38
2.2.5 Fibrinof ormation.....	38
<b>2.3 Rôle de la thrombine.....</b>	<b>39</b>
<b>2.4 Inhibiteurs physiologiques de la coagulation.....</b>	<b>41</b>
2.4.1 Antithrombine .....	41

2.4.2	<i>Protéine C et S</i> .....	41
2.4.3	<i>Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI)</i> .....	41
<b>2.5</b>	<b><i>Fibrinolyse</i></b> .....	<b>42</b>
<b>3.</b>	<b>Comprendre les envenimations : type de protéines et effets</b> .....	<b>44</b>
<b>3.1</b>	<b><i>Conséquences de l'envenimation</i></b> .....	<b>44</b>
3.1.1	<i>Différents types de syndromes</i> .....	46
3.1.1.1	Le syndrome cobraïque.....	46
3.1.1.2	Le syndrome vipérin.....	46
3.1.2	<i>Stadification clinico-biologique des envenimations</i> .....	47
3.1.3	<i>Hématotoxicité</i> .....	48
3.1.3.1	Syndromes hémorragiques.....	49
3.1.3.2	Thromboses.....	49
3.1.4	<i>Neurotoxicité</i> .....	49
3.1.5	<i>Toxicité musculaire</i> .....	51
3.1.6	<i>Cytotoxicité</i> .....	51
3.1.7	<i>Traitement de l'envenimation par antivenin</i> .....	51
<b>3.2</b>	<b><i>Protéines enzymatiques</i></b> .....	<b>52</b>
3.2.1	<i>Métalloprotéinases (SVMP)</i> .....	52
3.2.1.1	Classe 1 des SVMPs : P-I.....	53
3.2.1.2	Classe 2 des SVMPs : P-II.....	53
3.2.1.3	Classe 3 des SVMPs : P-III.....	54
3.2.2	<i>Serine protéinase (SVSP)</i> .....	54
3.2.2.1	Snake venom thrombin-like enzymes (SVTLs).....	54
3.2.2.2	Kallikrein-like enzymes.....	54
3.2.3	<i>Phospholipase A2 (PLA2)</i> .....	54
3.2.4	<i>L-amino-acid-oxydase (LAAO)</i> .....	55
3.2.5	<i>Autres enzymes</i> .....	56
3.2.5.1	Hyaluronidase.....	56
3.2.5.2	Acétylcholine estérase.....	56
<b>3.3</b>	<b><i>Protéines non enzymatiques</i></b> .....	<b>56</b>
3.3.1	<i>Lectines de type C</i> .....	56
3.3.2	<i>Désintégrines</i> .....	57
3.3.3	<i>Three finger toxine (TFT)</i> .....	59
3.3.4	<i>Inhibiteurs de protéase</i> .....	59
3.3.5	<i>Autres protéines sans effet sur l'hémostase</i> .....	61
3.3.5.1	Cystéine-rich secretory proteins (CRISPs).....	61
3.3.5.2	Peptide natriurétique.....	61
3.3.5.3	Bradykinine Potentiating Peptides (BPPs).....	61
3.3.5.4	Défensines.....	62

<b>3.4 Répartition des protéines dans les venins de serpents .....</b>	<b>67</b>
<b>4. Intérêt thérapeutique : développement de nouveaux médicaments dérivés des venins de serpent.....</b>	<b>70</b>
<b>4.1 Médicaments de l'hémostase .....</b>	<b>70</b>
4.1.1 <i>Antiagrégants plaquettaires.....</i>	70
4.1.1.1 Tirofiban (Agrastat®) .....	70
4.1.1.2 Eptifibatide (Integrilin®) .....	72
4.1.1.3 Vipégitide .....	74
4.1.1.4 Anfibatide.....	76
4.1.2 <i>Traitements défibrinants .....</i>	77
4.1.2.1 Viprinex (Ancrod®) .....	77
4.1.2.2 Batroxobine (Defibrase®) .....	78
4.1.3 <i>Sutures biologiques.....</i>	78
4.1.3.1 Batroxobine : Plateltext-Act® .....	79
4.1.3.2 Batroxobine : Vivostat® .....	79
4.1.3.3 Hemocoagulase® (Hémogoaculase agkistrodon HCA) .....	79
4.1.3.4 Haempatch (Q8009).....	80
4.1.4 <i>Traitements pro-coagulants .....</i>	81
4.1.4.1 CoVase (V0801).....	81
4.1.5 <i>Traitements anticoagulants .....</i>	81
4.1.5.1 Ximelagatran (Exanta®).....	81
4.1.6 <i>Traitements thrombolytiques .....</i>	82
4.1.6.1 Alfimeprase .....	82
4.1.7 <i>Traitements antifibrinolytiques .....</i>	82
4.1.7.1 Textilinine-1 (Q8008).....	82
<b>4.2 Autres traitements sans effet sur l'hémostase.....</b>	<b>86</b>
4.2.1 <i>Antihypertenseurs Inhibiteurs de l'Enzyme de Conversion (IEC) .....</i>	86
4.2.1.1 Captopril.....	86
4.2.1.2 Enalapril .....	88
4.2.2 <i>Autres traitements.....</i>	88
<b>5. Intérêt diagnostique : tests biologiques en hémostase.....</b>	<b>89</b>
<b>5.1 Tests de coagulation .....</b>	<b>89</b>
5.1.1 <i>Temps de Reptilase.....</i>	89
5.1.1.1 Principe du temps de Reptilase .....	89
5.1.1.2 La Batroxobine .....	89
5.1.1.3 Indications du temps de Reptilase .....	90
5.1.2 <i>Dosage de la protéine C.....</i>	91
5.1.2.1 Indications des dosages de protéine C.....	91
5.1.2.2 Le Protac®.....	91

5.1.2.3	Dosage coagulométrique de la protéine C.....	91
5.1.2.4	Dosage chromogénique de la protéine C.....	92
5.1.3	<b>Test de résistance de la protéine C activée (RPCa).....</b>	<b>93</b>
5.1.3.1	Mesure d'un temps Noscarine en présence de RVV-V.....	94
5.1.3.2	Mesure d'un dRVVT en présence de Protac®.....	96
5.1.3.3	Mesure d'un dRVVT en présence de PCa.....	97
5.1.4	<b>Temps d'écarine et test chromogénique basé sur l'écarine.....</b>	<b>98</b>
5.1.4.1	L'écarine.....	98
5.1.4.2	Ecarin clotting time (ECT).....	99
5.1.4.3	Ecarin chromogen assay (ECA).....	99
5.1.5	<b>Tests impliqués dans la recherche de lupus anticoagulant.....</b>	<b>100</b>
5.1.5.1	Temps de venin de vipère Russel dilué dRVVT.....	101
5.1.5.2	Temps de textarine.....	104
5.1.5.3	Temps de venin de Taipan.....	104
5.1.6	<b>Dosage du facteur X.....</b>	<b>105</b>
5.1.7	<b>Test de génération de thrombine pour caractériser de nouvelles protéases ophidiennes d'intérêt.....</b>	<b>105</b>
5.2	<b>Tests sur les plaquettes.....</b>	<b>107</b>
5.2.1	Mesure de l'activité Willebrand avec la Botrocétine.....	107
5.2.2	Test d'agrégation plaquettaire avec la convulxine.....	108

## **Partie 2 (expérimentale) : évaluation et quantification de l'activité de 5 protéines de venins de serpents.....111**

1.	Introduction.....	111
2.	Matériel et méthodes.....	112
2.1	<b>Généralités.....</b>	<b>112</b>
2.2	<b>Matériel.....</b>	<b>112</b>
2.3	<b>Organisation.....</b>	<b>113</b>
2.4	<b>Analyses des données.....</b>	<b>113</b>
3.	Tests réalisés avec les 5 protéases.....	113
3.1	<b>Batroxobine.....</b>	<b>113</b>
3.1.1	Objectifs.....	113
3.1.2	Protocole.....	114
3.1.3	Résultats.....	114
3.2	<b>RVV-V.....</b>	<b>116</b>
3.2.1	Objectifs.....	116
3.2.2	Protocole.....	116
3.2.3	Résultats.....	117
3.3	<b>RVV-X.....</b>	<b>119</b>

3.3.1	<i>Objectifs</i> .....	119
3.3.2	<i>Protocole</i> .....	119
3.3.3	<i>Résultats</i> .....	119
<b>3.4</b>	<b><i>Protac</i></b> .....	<b>121</b>
3.4.1	<i>Objectifs</i> .....	121
3.4.2	<i>Protocole</i> .....	121
3.4.3	<i>Résultats</i> .....	122
<b>3.5</b>	<b><i>Ecarine</i></b> .....	<b>123</b>
3.5.1	<i>Objectifs</i> .....	123
3.5.2	<i>Protocole</i> .....	123
3.5.3	<i>Résultats</i> .....	123
4.	Discussion.....	125
	<b>Conclusion</b> .....	<b>126</b>
	<b>Bibliographie</b> .....	<b>127</b>
	<b>Annexes</b> .....	<b>138</b>

## TABLE des ILLUSTRATIONS

### LISTE des FIGURES

Figure 1 : Arbre phylogénétique des serpents .....	23
Figure 2 : Tête d'un Colubridae .....	25
Figure 3 : Tête d'un Viperidae .....	26
Figure 4 : Mécanisme d'inoculation du venin de serpent par les crochets.....	30
Figure 5 : Appareil maxillaire des serpents aglyphes .....	31
Figure 6 : Appareil maxillaire des serpents opisthogyphes.....	31
Figure 7 : Appareil maxillaire des serpents protéroglyphes.....	32
Figure 8 : Appareil maxillaire des serpents solénogyphes .....	33
Figure 9 : Résumé de l'activation à l'adhésion plaquettaire .....	36
Figure 10 : Schéma de la coagulation plasmatique in vivo .....	37
Figure 11 : Schéma de la fibrinoformation.....	39
Figure 12 : Schéma global de l'hémostase .....	40
Figure 13 : Schéma des mécanismes d'action des inhibiteurs de la coagulation.....	42
Figure 14 : Distinction des morsures de serpents venimeux et non venimeux .....	45
Figure 15 : Site d'action des neurotoxines sur la jonction neuromusculaire .....	50
Figure 16 : Mode d'action des différentes protéines ophidiennes sur l'hémostase .....	62
Figure 17 : Effets des différentes protéines de venins de serpents sur l'hémostase.....	63
Figure 18 : Actions des toxines de venins de serpents sur l'agrégation plaquettaire et la coagulation.....	66
Figure 19 : Répartition des classes de protéines entre les différents venins de serpents Elapidae et Viperidae .....	68
Figure 20 : Distribution des familles de toxines les plus abondantes dans différents venins d'espèces de serpents des familles Viperidae (sous-familles Viperinae et Crotalinae) et Elapidae (sous-familles Elapinae et Hydrophiinae).....	69
Figure 21 : Formule chimique de l'échistatine et sa boucle RGD.....	71
Figure 22 : Molécule de tirofiban avec sa séquence mimant RGD issue de la protéase échistatine....	71
Figure 23 : Interaction de la molécule de fibrinogène avec son récepteur membranaire plaquettaire activé, la glycoprotéine GP IIb/IIIa .....	72
Figure 24 : Structure chimique de la barbourine et de l'eptifibatide avec leur séquence KGD.....	73
Figure 25 : Molécule d'eptifibatide avec sa séquence mimant KGD issue de la protéase barbourine.	74

Figure 26 : Médicaments antiagrégants plaquettaires développés à partir des protéines ophidiennes de type désintégrines et lectines de type C .....	75
Figure 27 : Différents types de veinombines.....	77
Figure 28 : Mécanisme d'action de l'hydrogel associant écarine et textilinine .....	84
Figure 29 : Chronologie de découverte des inhibiteurs de l'ECA modélisés à partir de protéines de venin de serpent .....	86
Figure 30 : Structure chimique du teprotide et du captopril .....	87
Figure 31 : Mécanisme d'action de la batroxobine sur le fibrinogène en comparaison à la thrombine .....	90
Figure 32 : Principe du dosage coagulométrique de la protéine C .....	92
Figure 33 : Principe du dosage chromogénique pour la mesure de l'activité de la protéine C .....	93
Figure 34 : Mécanismes moléculaires de RPCa du FV Leiden .....	93
Figure 35 : Schéma d'activation du facteur V par la thrombine et par RVV-V.....	95
Figure 36 : Principe du test de résistance de la protéine C activée par la mesure d'un temps de noscarine .....	96
Figure 37 : Principes des tests de RPCa.....	97
Figure 38 : Activation de la prothrombine .....	98
Figure 39 : Principes des tests de coagulation et chromogénique faisant intervenir l'écarine .....	100
Figure 40 : Schéma du facteur X avec site d'activation par RVV-X.....	101
Figure 41 : Structure de RVV-X.....	102
Figure 42 : Principe des tests de dRVVT de screening et de confirmation.....	103
Figure 43 : Paramètres mesurés à partir du thrombogramme .....	106
Figure 44 : Test d'agrégation plaquettaire avec la convulxine.....	108
Figure 45 : Semi-automate START-4 (Diagnostica Stago®).....	113
Figure 46 : Résultats des temps de reptilase réalisés avec la batroxobine de référence Bx-G et de Latoxan® Bx-D.....	115
Figure 47 : Résultats du test réalisé sur échantillon RVV-V A, B et C.....	118
Figure 48 : Résultats des tests chronométriques réalisés avec RVV-X 4 et RVV-X 3 (référence).....	120
Figure 49 : Résultats des tests chronométriques avec les échantillons de Protac (Pr-3 et Pr-4 et Pr-6) et la référence commerciale.....	122
Figure 50 : Résultats des tests chronométriques réalisés avec les échantillons d'Ecarine (Ecarine-2 à -6) et la référence commerciale (Ecarine-1).....	124

## LISTE des TABLEAUX

Tableau 1 : Répartition des Scolécophidiens.....	23
Tableau 2 : Répartition des Aléthinothidiens .....	24
Tableau 3: Espèces des Colubridae .....	26
Tableau 4 : Espèces des Atractaspididae.....	26
Tableau 5 : Espèces des Viperinae .....	27
Tableau 6 : Espèces de la tribu des Crotalini .....	28
Tableau 7 : Espèces de la tribu des Lachesini.....	28
Tableau 8 : Espèces de la tribu des Agkistrodontini.....	28
Tableau 9 : Espèces des Elapidae .....	30
Tableau 10 : Gradation clinique des envenimations ophidiennes .....	48
Tableau 11 : Lectines de type C et fonctions .....	57
Tableau 12 : Classification des désintégrines selon leur motif .....	58
Tableau 13 : Inhibiteurs de protéases de venins de serpents .....	61
Tableau 14 : Résumé des principales activités des protéines ophidiennes .....	65
Tableau 15 : Médicaments issus de protéines de venins de serpent ayant un effet sur l'hémostase .	85
Tableau 16 : Résumé des principales protéines de venins de serpents utilisées pour des tests de laboratoire.....	110

## LISTE des ANNEXES

Annexe 1 : Résultats des tests Batroxobine (comparant la batroxobine de référence (Bx-G) à la Bx-D) .....	138
Annexe 2 : Résultats des tests RVV-V (comparant la référence (RVV-V C) à 2 autres échantillons (RVV-A et B)).....	139
Annexe 3 : Résultats des test RVV-X (comparant la référence (RVV-X 3) à RVV-X 4) .....	140
Annexe 4 : Résultats des tests Protac (comparant le Protac® commercial à la Pr-3, Pr-4 et Pr-6).....	141

## LISTE DES ABREVIATIONS, ACRONYMES

3FTx : Toxine à trois doigts (3-Finger Toxine)  
ADP : Adénosine diphosphate  
AOD : Anticoagulants Oraux Directs  
AT : Antithrombine  
ATP : Adénosine triphosphate  
AVK : Anti-Vitaminique K  
CHUGA : Centre Hospitalier Universitaire Grenoble Alpes  
CPK : Créatine phosphokinase  
CRISP : Protéine sécrétoire riche en cystéine  
CTL/SNACLEC : Lectine de type C et protéine semblable à la lectine de type C  
DEF : Défensine  
DIS : Désintégrine  
GFHT : Groupe Français d'Études sur l'Hémostase et la Thrombose  
Gla : Acide carboxy-glutamique  
HBPM : Héparine de Pas Poids Moléculaire  
HNF : Héparine Non Fractionnée  
INR : International Normalized Ratio  
KHPM : Kininogène de Haut Poids Moléculaire  
KSPI : Inhibiteur de la sérine protéase de type Kunitz  
LAAO : L-aminoacide oxydase  
LDH : Lactate déshydrogénase  
MTEV : Maladie thromboembolique veineuse  
PLA2 : Phospholipase A2  
PPP : Plasma Pauvre en Plaquettes  
PRP : Plasma Riche en Plaquettes  
SVMP : Métalloprotéinase du venin de serpent (Snake Venom Metalloproteinase)  
SVSP : Sérine protéase du venin de serpent (Snake Venom Serin Protease)  
TCA : Temps de Céphaline Activée  
TFPI : Tissue Factor Pathway Inhibitor  
TGT : Test de Génération de Thrombine  
t-PA : Tissue Plasminogen Activator  
TQ : Temps de Quick  
VWF : Facteur Willebrand

## Introduction

De tout temps, les serpents ont suscité plusieurs types de réactions chez les humains dont les principales sont la méfiance, la crainte et la peur. Ce sont en effet des animaux venimeux qui ont pour réputation de pouvoir provoquer la mort. Ils sont également source de fascination chez l'homme comme en témoignent les nombreux mythes et légendes à leur sujet. Cette capacité qu'ils ont de produire une petite quantité de venin a pour objectif d'assurer, d'une part, la prédation pour répondre à leurs besoins alimentaires via l'immobilisation de leur proie et d'autre part, d'assurer leur protection et leur défense s'ils se sentent menacés.

Aujourd'hui sur Terre, on dénombre plus de 3500 espèces de serpents mais seulement 600 sont venimeuses. Elles appartiennent aux familles des *Atractaspididae*, des *Elapidae*, des *Colubridae* et des *Viperidae* (1) et environ 50 à 70% de leurs morsures provoquent une envenimation. Parmi ces espèces venimeuses, on considère que 200 vont être responsables d'envenimations sévères engendrant un risque de décès ou de graves comorbidités associées. Les morsures de serpent sont de réelles urgences médicales lorsqu'il s'agit de serpents venimeux du fait de la possible issue fatale. Le risque de morsure par un serpent venimeux est plus élevé dans les pays tropicaux et subtropicaux d'Afrique, d'Asie et d'Amérique Latine. 5,8 milliards des humains sont exposés à un tel risque. Au cours de l'année 2021, 5,4 millions de personnes ont été victimes de morsures de serpents dont 2,7 millions d'envenimations. Entre 81 000 et 138 000 personnes en meurent chaque année selon l'OMS soit environ 8% des victimes. C'est près de 400 000 personnes par an qui vivront avec des comorbidités consécutives à ces envenimations (mobilité restreinte voire amputation, cécité, déficit neurologique, stress post-traumatique)(2). Les envenimations par les serpents sont donc un réel problème de santé publique. Mais au-delà des effets néfastes des venins de serpent sur les organismes par de multiples toxicités touchant différents organes, ces toxines ont également des propriétés curatives dont l'étude peut engendrer des avancées sur les plans médicaux, pharmacologiques et biologiques.

On peut comprendre les craintes provoquées par de tels animaux, mais le pouvoir de ces serpents est tout autre si l'on l'étudie avec plus de précision. En effet, ce n'est pas par hasard que les sigles de la pharmacie et de la médecine comportent tous deux un serpent. Ces emblèmes sont issus de la mythologie grecque. Le secteur de la pharmacie est représenté par un caducée, il est composé du serpent d'Asklépios, dieu grec de la médecine, s'enroulant et se dressant vers la coupe d'Hygie, fille d'Asklépios et déesse de la santé. Tandis que l'emblème de la médecine est le caducée du dieu grec Hermès. Sur ce dernier, on retrouve deux serpents s'enroulant autour d'un bâton ailé. Ces deux caducées comportent des serpents inoffensifs : les couleuvres d'esculape (*Elaphe longissima*, famille

des Colubridés). Ces serpents étaient considérés comme des animaux saints (3). Le serpent avait une forte symbolique dans le domaine de la santé au temps de l'Antiquité. Ses nombreuses mues étaient considérées comme une marque de régénération et de renouvellement de la vie. C'était aussi le symbole du savoir et de la prudence, en lien avec les connaissances et l'expérience dont il fallait être dotés pour pouvoir extraire le venin sans danger et l'utiliser avec sagesse (4).

Ce venin n'est pas constitué d'une seule toxine mais est en réalité composé de nombreuses protéines aux effets divers (5) mélangées à des nucléosides, glucides, lipides, acides aminés et ions métalliques. Sa composition est variable selon l'espèce de serpent, sa localisation géographique, son âge, son sexe, son alimentation, le stress auquel il est exposé. Le résultat en est l'existence d'une multitude de protéines aux propriétés diverses réparties dans les différents venins. Certaines ont déjà été purifiées et analysées mais il reste encore de nombreuses protéines non étudiées. Si l'on considère que les venins de serpents contiennent en moyenne 100 à 500 composants pharmacologiquement actifs, on peut dire que seulement 0,01% d'entre eux ont été étudiés (5) ce qui laisse une vaste étendue pour de nouvelles découvertes médicales. Cependant, les chercheurs se heurtent parfois à des difficultés comme par exemple les faibles quantités purifiables de venins, limitant les tests et les études pour caractériser avec précision ces molécules (6).

L'étude de ces venins de serpents a été dans un premier temps motivée afin de comprendre l'action de ces toxines sur le corps humain. En connaissant les différents effets des protéines des venins, on peut rechercher comment les contrer pour soigner les envenimations. La physiopathologie des envenimations est vaste et dépend des différentes espèces de serpent. Comprendre l'action de ces protéines peut permettre de mieux appréhender les envenimations et de les traiter avec plus de spécificité. De plus, l'étude de ces protéines participant à la composition du venin a un réel intérêt pharmaceutique. Il réside dans la découverte de médicaments reposant sur la structure de ces protéines. Historiquement, on retrouve l'utilisation de venins de serpents dans plusieurs cultures. Dès l'antiquité, on s'était rendu compte du pouvoir thérapeutique de certaines protéines contenues dans les venins de serpent. *C'est la dose qui fait le poison, Paracelse*. On peut citer par exemple la médecine Ayuverda, pratique traditionnelle originaire de l'Inde, dans laquelle le venin de Cobra était utilisé pour guérir les arthrites et autres affections des articulations depuis plusieurs milliers d'années (7).

Aujourd'hui, c'est un vaste challenge pour l'industrie pharmaceutique de développer de nouveaux médicaments. La recherche actuelle permet de découvrir certains candidats médicamenteux dérivant de ces protéines ophidiennes. Ces découvertes reposent sur les connaissances acquises en étudiant les propriétés et les mécanismes d'action de ces protéines de venins de serpent. On peut alors sélectionner différents candidats pour leurs effets sur la coagulation, sur le système cardiovasculaire...

Le premier médicament développé à partir d'une protéine de venin de serpent a été commercialisé dès 1981 aux Etats-Unis. À compter de cette avancée, d'autres molécules ont également vu le jour. L'agence européenne du médicament (EMA) compte actuellement sur le marché une dizaine de médicaments issus de la structure de protéases de venins de serpent. Et la tendance verrait plutôt ce chiffre augmenter avec une hausse du nombre de groupes de recherche étudiant ce secteur. Une nouvelle dynamique verrait le jour avec des firmes pharmaceutiques s'orientant à nouveau vers ce type de recherche (5,8).

Finalement, l'étude de ces venins de serpent a permis également, en comprenant les fonctions de différentes protéines, de développer des tests diagnostiques. Dès la fin du XVIII<sup>ème</sup> siècle, les propriétés des venins de serpent sur l'hémostase ont été découvertes. Cela fait des protéines ophidiennes des outils moléculaires précieux pour mieux comprendre l'hémostase mais aussi des candidats ingénieux pour réaliser des examens biologiques de la coagulation. Nous verrons qu'elles occupent une place non négligeable dans les tests de coagulation de routine et/ou spécialisés dans les laboratoires d'analyse médicale.

## **Partie 1 : Venins de serpent et hémostasie**

### **1. Classification des serpents**

Afin de mieux comprendre les propos tenus dans la suite de cet ouvrage, il nous faut tout d'abord aborder la classification des serpents.

Les serpents appartiennent à la classe des reptiles, tout comme les lézards, les crocodiles et les tortues. Ce sont des vertébrés mais à la différence des mammifères leur température corporelle n'est pas constante et est dépendante de la température extérieure : on parle de vertébrés ectothermes. Le rayonnement solaire, permettant leur réchauffement interne, est donc indispensable pour leur survie.

Au sein des reptiles, les serpents avec les lézards, les amphibènes et les sphénodons constituent la sous-classe des Lépidosauriens. Les serpents, ou Ophidiens, constituent avec les lézards et les amphibènes l'ordre des Squamates, nommé ainsi car leur peau est écailleuse (9). Les serpents sont apparus au milieu du Crétacé, il y a un peu plus de 100 millions d'années. Ces animaux carnivores ont pour principales caractéristiques une absence de pattes, une paupière fixe transparente recouvrant l'œil, une absence d'orifice auditif, une langue bifide et de larges plaques ventrales recouvertes d'écailles. Depuis, leur évolution n'a cessé leur conférant de nouvelles capacités et caractéristiques permettant de les classer en diverses familles.

#### **1.1 Classification phylogénétique des serpents**

On retrouve plusieurs familles de serpents [Figure 1].

L'évolution complexe des serpents s'est effectuée sur plusieurs milliers d'années. De nos jours, certaines familles de serpents ne comportent plus d'espèces vivantes, elles se sont éteintes et sont qualifiées de familles fossiles (Palaeophiidae, Nigerophidae...).

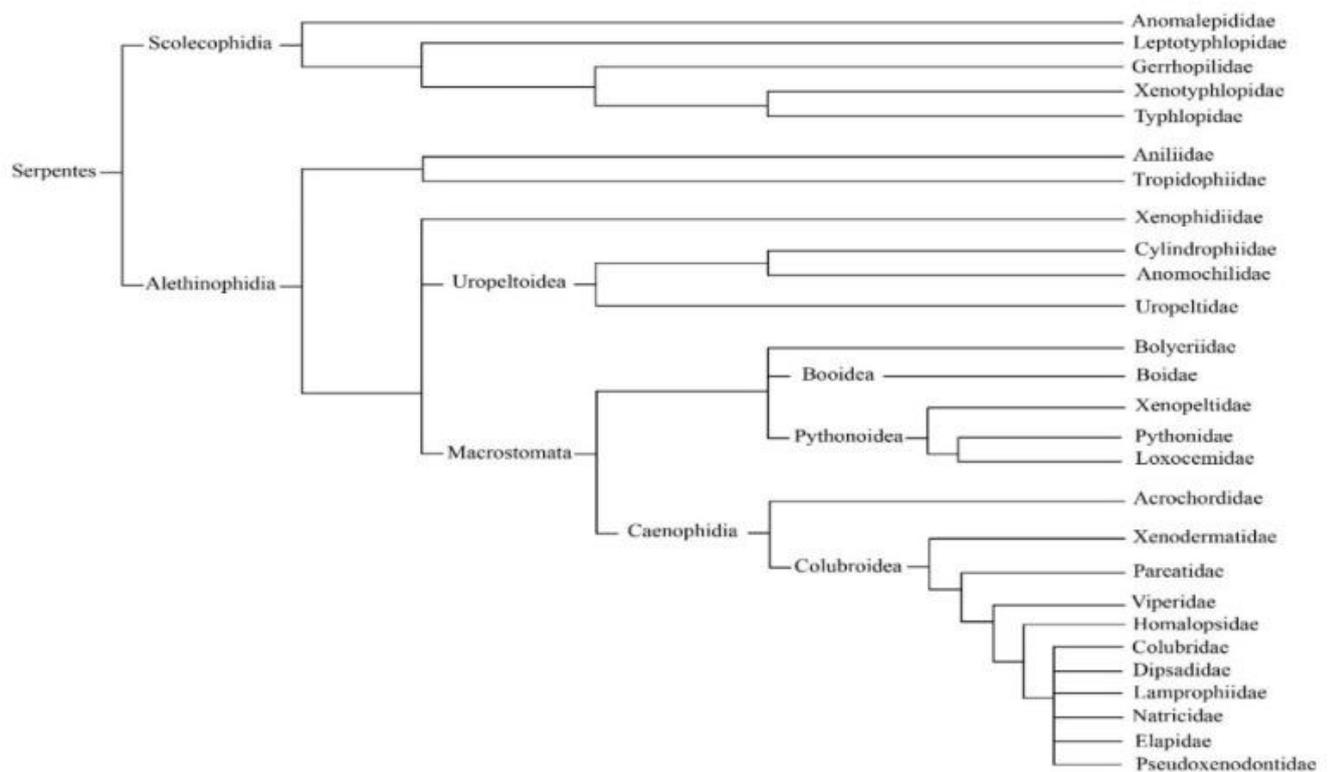


Figure 1 : Arbre phylogénétique des serpents (d'après Elb Ab-Adiz et al (5,10))

Tout d'abord, il est important de distinguer les deux infra-ordres des serpents : les Scolécophidiens et les Aléthiniophidiens.

### 1.1.1 Scolécophidiens

Ces serpents sont considérés comme les plus primitifs. On les appelle serpents fouisseurs. Ils sont de petite taille et considérés comme inoffensifs. Ils sont de mœurs terricoles et sont aveugles. En effet, leurs yeux sont situés sous une ou plusieurs écailles céphaliques. Leur corps est couvert de petites écailles brillantes, identiques sur le dos et le ventre, le corps et la queue. De même, ces serpents sont totalement dépourvus d'appareil venimeux.

Trois familles appartiennent à cet infra-ordre : les Leptotyphlopidae, les Anomalepididae et les Typhlopidae [Tableau 1].

	Famille	Genres	Espèces	Répartition
<b>Scolécophidiens</b>	Leptotyphlopidae	2	87	Cosmopolite
	Anomalepididae	4	15	Amérique latine
	Typhlopidae	6	203	Cosmopolite

Tableau 1 : Répartition des Scolécophidiens (d'après McDiarmid, in SEIGEL et al. (9))

### 1.1.2 Aléthino-phidiens

Ce groupe correspond aux serpents dit « typiques » (alethinus signifie « vrai », et ophis, désigne « serpents »). Il comprend des serpents de toutes tailles (quelques dizaines de centimètres à plusieurs mètres) et aux modes de vies variables (terrestres, arboricoles, fousseurs, aquatiques,...) (11).

Morphologiquement, les yeux de ces serpents sont quant à eux complets, avec une rétine constituée de cônes et de bâtonnets. Ils ont une face ventrale recouverte de plaques larges qui se différencient des petites écailles de forme triangulaire ou losangique recouvrant le dos.

De plus, il se distingue des Scolécophidiens par leur capacité à capturer des proies de grande taille notamment plus grande que le diamètre de leur corps. Cela est permis grâce à diverses évolutions comme la séparation des 2 mandibules augmentant par conséquent leur largeur d'ouverture buccale.

Quatorze familles appartiennent à cet infra-ordre dont les principales sont : les Acrochordidae, les Aniliidae, les Uropeltidae, les Xenopeltidae, les Boidae, les Colubridae, les Atractaspidae, les Elapidae et les Viperidae [Tableau 2]. Seules les Colubridae, les Atractaspidae, les Elapidae et les Viperidae possèdent des espèces venimeuses. Ce sont ces 4 familles que nous allons détailler.

	<b>Famille</b>	<b>Genres</b>	<b>Espèces</b>	<b>Répartition</b>
<b>Aléthino-phidiens</b>	Anomochilidae	1	2	Sumatra
	Uropeltidae	8	47	Sud de l'Inde et Sri Lanka
	Cylindrophidae	1	8	Asie du Sud-Est
	Aniliidae	1	1	Amérique latine
	Xenopeltidae	1	2	Asie du Sud-Est
	Loxocemidae	1	1	Amérique centrale
	Boidae	16	67	Cosmopolite
	Bolyeriidae	2	2	Sud de l'océan Indien
	Tropidophiidae	4	21	Amérique centrale et Caraïbes
	Acrochordidae	1	3	Asie du Sud-Est, Australasie
	Colubridae	255	1 405	Cosmopolite
	Atractaspidae	6	55	Afrique, Moyen-Orient
	Elapidae	60	298	Cosmopolite (tropical)
	Viperidae	33	235	Cosmopolite

Tableau 2 : Répartition des Aléthino-phidiens (d'après McDiarmid, in SEIGEL et al. (10))

#### 1.1.2.1 Colubridae

Les Colubridae comptent plus de 250 genres et 1 400 espèces [Tableau 3]. C'est la famille numériquement la plus importante qui constitue une grande partie de la faune de serpents. Une majorité des espèces appartenant à cette famille est sans danger et comprend notamment les couleuvres qui sont inoffensives pour l'humain. Cette famille est peu homogène et il est donc compliqué de classer les espèces la composant.

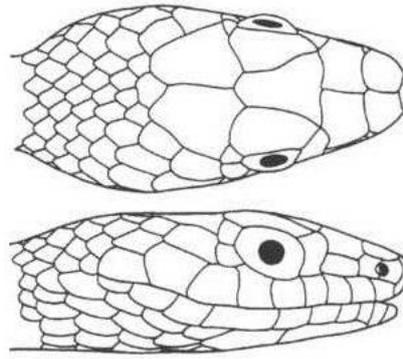


Figure 2 : Tête d'un Colubridae (d'après Chippaux et al (9))

Anatomiquement, ces serpents ont une pupille ronde bien reconnaissable [Figure 2]. De larges écailles se trouvent sur la partie ventrale de leur corps. Leur mandibule est élargie comme tous les Colubroïdes. Les morsures de Colubridae sont fréquentes mais présentent peu de complications car ce sont des espèces majoritairement aglyphes (page 31) ou opisthoglyphes (page 31). Toutefois, certaines espèces restent dangereuses voir mortelles pour l'homme. On retrouve par exemple, le boomslang arboricole d'Afrique tropicale et australe (*Dispholidus typus*) produisant un venin fortement toxique et dont la mandibule est raccourcie entraînant par conséquent un avancement des crochets. Les raisons qui peuvent expliquer le nombre élevé de morsures sont l'abondance des espèces de cette famille ainsi que leur vaste répartition géographique et probablement l'engouement des terrariophiles pour les serpents.

■ <b>Boiga</b> . Genre asiatique et australien : <i>Boiga dendrobila</i> , <i>B. cynodon</i> et <i>B. irregularis</i> .
■ <b>Clelia</b> . Genre de l'Amérique latine : <i>Clelia clelia</i> .
■ <b>Dipsas</b> . Genre sud-américain et d'Amérique centrale : <i>Dipsas indica</i> , <i>D. variegata</i> , <i>D. catesbyi</i> , <i>D. albifrons</i> .
■ <b>Dispholidus</b> . Genre africain : <i>Dispholidus typus</i>
■ <b>Malpolon</b> . Genre de la région méditerranéenne, représenté dans le sud de l'Europe par la couleuvre de Montpellier, <i>Malpolon monspessulanus</i> , et en Afrique saharienne par <i>M. moilensis</i> .
■ <b>Oxybelis</b> . Genre sud-américain: <i>Oxybelis fulgidus</i> , <i>O. aeneus</i> .
■ <b>Philodryas</b> . Genre sud-américain : <i>Philodryas olfersii</i> , <i>P. aestiva</i> , <i>P. nattereri</i> , <i>P. patagoniensis</i> , <i>P. psammophidea</i> et <i>P. viridissima</i> .
■ <b>Phrynonax</b> . Genre sud-américain : <i>Phrynonax poecilonotus</i> , <i>P. polylepis</i> , <i>P. sexcarinatus</i> , <i>P. shropshirei</i>
■ <b>Rhabdophis</b> . Genre asiatique : <i>Rhabdophis subminatus</i> , <i>R. cbrysargos</i> , <i>R. himalayanus</i> , <i>R. nigrocinctus</i> , <i>R. nuchalis</i> et <i>R. tigrinus</i> .
■ <b>Spilote</b> . Genre sud-américain et d'Amérique centrale : <i>Spilotes sulphureus</i> , <i>S. pullatus</i>
■ <b>Tachymenis</b> . Genre sud-américain : <i>Tachymenisperuviana</i> ,

■ ***Thelotornis***. Genre africain: *Thelotornis capensis*, *T. kirtlandii*.

■ ***Toxicodryas***. *Toxicodryas blandingii*.

Tableau 3: Espèces des Colubridae (d'après Chippaux et al. (9))

### 1.1.2.2 *Atractaspididae*

Il s'agit de la seconde famille de serpents venimeux. Ces serpents sont aussi appelés vipères fousseuses ou vipères-taupes. Cependant, il s'agit d'une famille particulière car elle ne comprend qu'un seul genre [Tableau 4] et celui-ci possède un appareil venimeux de type solénoglyphe (en page 33).

Ces serpents sont des serpents fousseurs d'environ 1 mètre de long. Ils ont une pupille ronde comme les Colubridae. La tête ne se découpe pas du corps et l'extrémité du corps se termine en une queue courte et pointue (11).

La toxicité des venins des *Atractaspis* est majoritairement cardiaque avec une production de toxines à fort tropisme cardiaque, les sarafotoxines. Ainsi, les envenimations par de telles espèces sont souvent accompagnées de troubles du rythme cardiaque sévères, parfois mortels.

■ ***Atractaspis*** (vipère taupe ou vipère fousseuse): *Atractaspis bibronii*, *A. aterima*, *A. dahomeyensis*, *A. engaddensis*, *A. irregularis*, *A. microlepidota*.

Tableau 4 : Espèces des Atractaspididae (d'après Chippaux et al. (9))

### 1.1.2.3 *Viperidae*

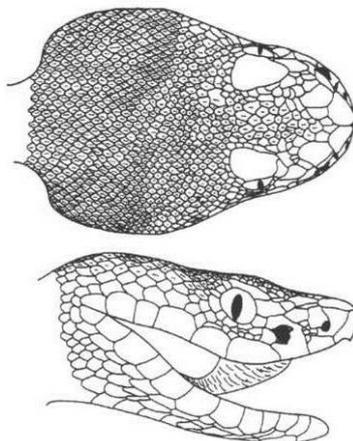


Figure 3 : Tête d'un Viperidae (9)

Cette troisième famille de serpents venimeux compte 33 genres et 235 espèces.

Leurs pupilles sont verticales [Figure 3]. Ces serpents sont adaptés aux zones sableuses grâce à leur locomotion à type de déroulement latéral facilitant leur déplacement. Les Vipéridés regroupent tous les serpents solénoglyphes escompté *Atractaspis*. Dans l'ensemble, la famille regroupe des serpents plus petits que les Elapidae, plus trapus avec une tête élargie postérieurement et une queue courte.

Cette famille se divise en deux sous-familles : les Vipérinés et les Crotalinés.

#### 1.1.2.3.1 *Viperinae*

Ces serpents possèdent un corps robuste, une queue courte et une tête dite triangulaire avec un cou fortement marqué. L'écaillure céphalique est constituée de petites écailles identiques aux écailles qui recouvrent le dos, les dorsales.

En Europe, seul un genre est présent et largement distribué : *Vipera* [Tableau 5].

■ <b>Atheris</b> (vipère arboricole). Genre africain: <i>Atheris squamigera</i> et <i>A. chlorechis</i> .
■ <b>Bitis</b> . Genre africain: <i>Bitis arietans</i> (vipère heurtante), <i>B. gabonica</i> (vipère du Gabon), et <i>B. nasicornis</i> (vipère rhinocéros).
■ <b>Causus</b> (vipère du cap). Genre africain : <i>Causus rhombeatus</i> et <i>C. maculatus</i> .
■ <b>Cerastes</b> (vipère cornue). Genre nord-africain et proche-oriental : <i>Cerastes cerastes</i> (vipère à corne du Sahara) et <i>C. vipera</i> .
■ <b>Daboia</b> (vipère de Russell). Genre asiatique : <i>Daboia russelii</i> était inclus dans le genre <i>Vipera</i> dont il a été séparé, <i>Daboia siamensis</i> .
■ <b>Echis</b> (échide). Genre de l'Afrique occidentale au Sri Lanka et à l'Asie centrale, <i>Echis carinatus</i> (échide carénée), <i>E. coloratus</i> (échide colorée), <i>E. pyramidum</i> (échide ou vipère des pyramides), <i>E. leucogaster</i> (échide à ventre blanc), <i>E. ocellatus</i> (échide ocellée).
■ <b>Macrovipera</b> . Genre du Maroc à l'Asie centrale, <i>Macrovipera lebetina</i> (vipère lébétine ou levantine).
■ <b>Montivipera</b> . Genre de l'Europe orientale et du Moyen-Orient : <i>M. xanthina</i> , <i>M. raddei</i> , <i>M. bornmuelleri</i> .
■ <b>Vipera</b> .: <i>Vipera aspis</i> (vipère aspic) en Europe occidentale, <i>V. ammodytes</i> (vipère ammodyte) et <i>V. ursinii</i> (vipère d'Orsini) en Europe centrale, <i>V. berus</i> (vipère péliade) en Europe septentrionale, <i>V. latastei</i> (vipère de Lataste) en Europe méridionale et Afrique du Nord, <i>V. renardi</i> (vipère des steppes) en Europe orientale et Asie septentrionale, <i>V. palestinae</i> (vipère de Palestine), <i>V. raddei</i> (vipère d'Arménie) et <i>V. xanthina</i> (vipère ottomane) au Proche et Moyen-Orient.

Tableau 5 : Espèces des *Viperinae* (d'après Chippaux et al. (9))

#### 1.1.2.3.2 *Crotalinae*

Ces serpents appelés crotales présentent un aspect similaire aux *Viperinae* mais sont caractérisés par leur fossette faciale loréale thermosensible : on parle de vipère à fossette. Cet organe présent sur leur tête entre l'œil et la narine est sensible aux différences de température, leur permettant de repérer tout animal à sang chaud à proximité et ainsi de chasser même de nuit.

Cette sous-famille se compose de trois tribus bien caractéristiques.

La tribu des Crotalini [Tableau 6] se caractérise par la présence d'un bruiteur caudal. Cette sonnette ou ce grelot présent à l'extrémité de leur corps est composé d'un enchainement d'anneaux cornés emboîtés dont l'agitation produit un son permettant de repérer le serpent.

<p>■ <b>Crotalus</b> (serpent à sonnette). Genre américain : <i>Crotalus borridus</i>, <i>C. adamanteus</i>, <i>C. atrox</i>, <i>C. scutulatus</i> et <i>C. viridis</i> et en Amérique latine, <i>C. durissus</i> (cascavelle)</p>
<p>■ <b>Sistrurus</b> (crotale pygmée ou serpent à sonnette pygmée). Genre strictement nord-américain : <i>Sistrurus catenatus</i> et <i>S. miliaris</i>.</p>

Tableau 6 : Espèces de la tribu des Crotalini (d'après Chippaux et al. (9))

La tribu des Lachesini [Tableau 7] possède une écaillure céphalique toujours composée de petites écailles carénées, c'est-à-dire constituées d'une arête surélevée qui s'étend dans le sens de la longueur et qui diffuse la lumière différemment, donnant une apparence terne et non réfléchissante au serpent.

<p>■ <b>Bothrops</b> (fer de lance, trigonocéphale). Genre sud-américain : <i>Bothrops asper</i> (terciopelo), <i>B. atrox</i> (trigonocéphale/fer de lance commun ou grage carreaux), <i>B. bilineatus</i> (crotale arboricole), <i>B. brazili</i>, <i>B. jararaca</i>, <i>B. jararacussu</i>, <i>B. lanceolatus</i> (espèce endémique de Martinique)</p>
<p>■ <b>Lachesis</b> (maître de la brousse). Genre d'Amérique latine, <i>Lachesis muta</i> en Amérique du Sud et <i>L. stenophrys</i> en Amérique centrale.</p>
<p>■ <b>Protobothrops</b> (fer de lance asiatique). <i>Protobothrops flavoviridis</i> et <i>P. mucrosquamatus</i></p>
<p>■ <b>Trimeresurus</b> (crotale des bambous) : <i>Trimeresurus albolabris</i>, <i>T. gramineus</i>, <i>T. popeiorum</i>, <i>T. purpureo maculatus</i>, <i>T. stejnegeri</i>.</p>

Tableau 7 : Espèces de la tribu des Lachesini (d'après Chippaux et al. (9))

Enfin, la tribu des Agkistrodontini [Tableau 8] qui était auparavant réunie au sein du genre *Agkistrodon sensu lato* ; ils sont répartis en Asie et en Amérique du Nord.

<p>■ <b>Agkistrodon</b> (mocassins). Genre d'Amérique du Nord et centrale : <i>Agkistrodon contortrix</i> et <i>A. piscivorus</i>.</p>
<p>■ <b>Calloselasma</b> (crotale de Malaisie). Genre extrême-oriental monospécifique : <i>Calloselasma rhodostoma</i>.</p>
<p>■ <b>Deinagkistrodon</b> (crotale cent pas). Genre extrême-oriental monospécifique : <i>Deinagkistrodon acutus</i>. Son nom commun provient d'une légende selon laquelle, après une morsure, la victime ne pouvait faire plus de cent pas avant de s'effondrer.</p>
<p>■ <b>Gloydus</b> (mocassin asiatique). Genre distribué de l'Afghanistan au Japon : <i>Gloydus blomhoffi</i> et <i>G. halys</i>.</p>
<p>■ <b>Hypnale</b>. Genre présent au Sri Lanka : <i>Hypnale hypnale</i></p>

Tableau 8 : Espèces de la tribu des Agkistrodontini (d'après Chippaux et al. (9))

#### 1.1.2.4 Elapidae

Cette quatrième famille est composée uniquement d'espèces venimeuses. Elle comprend 60 genres et environ 300 espèces [Tableau 9], et comporte des serpents marins. Anatomiquement, elles se rapprochent des Colubridae.

Cette famille est constituée de tous les colubroïdes protéroglyphes. De fait de la position de leurs crochets et de la haute toxicité de leur venin, ces espèces sont redoutables. De plus, diverses évolutions au sein de ce groupe font que certaines espèces sont également capables de cracher leur venin (cobras « cracheurs ») entraînant la projection du liquide sur plusieurs mètres.

On peut distinguer les Elapinés, une sous-famille composée des serpents corail, des cobras et des taipans. Les serpents corail sont recouverts d'écailles avec une alternance de couleurs (blanc, noir, rouge, jaune) offrant un aspect de rayures : ils appartiennent aux genres *Micrurus*, *Micruoides* et *Leptomicrurus*. Les cobras sont un des genres de serpent les plus connus. Ils intimident leurs adversaires en relevant leur tête et la partie antérieure de leur corps et en écartant leurs côtes étalant une coiffe à la base de leur cou.

De plus, une autre sous-famille existe, celle des Hydrophiinés ou serpents marins. Leur adaptation aquatique s'explique par l'aplatissement latéral d'au moins une partie de la région postérieure du corps pour leur permettre un déplacement efficace dans l'eau.

■ <b>Acanthophis</b> (vipère de la mort). Genre australien, <i>Acanthophis antarcticus</i> .
■ <b>Boulengerina</b> (cobra aquatique). Genre africain, <i>Boulengerina annulata</i> .
■ <b>Bungarus</b> (bongare). Genre asiatique : <i>Bungarus candidus</i> , <i>B. fasciatus</i> , <i>B. caeruleus</i> , <i>B. multicinctus</i> .
■ <b>Dendroaspis</b> (mamba). Genre strictement africain : <i>Dendroaspis angusticeps</i> (mamba vert), <i>D. jamesoni</i> , <i>D. viridis</i> (mamba vert), <i>D. polylepis</i> (mamba noir),
■ <b>Hemachatus</b> (cracheur du Cap). Genre sud-africain, <i>Hemachatus haemachatus</i> .
■ <b>Micrurus</b> (serpent corail). Genre américain : <i>Micrurus corallinus</i> , <i>M. julvius</i> , <i>M. hemprichii</i> , <i>M. lemniscatus</i> , <i>M. narduccii</i> , <i>M. nigrocinctus</i> et <i>M. surinamensis</i> .
■ <b>Naja</b> (cobra). Ce genre est présent en Afrique et en Asie. en Afrique, <i>Naja haje</i> , <i>N. nigricollis</i> (serpent cracheur), <i>N. mossambica</i> , <i>N. melanoleuca</i> (cobra forestier) et en Asie <i>Naja naja</i> , <i>N. kaouthia</i> , <i>N. oxiana</i> , <i>N. sputatrix</i> .
■ <b>Notechis</b> (serpent tigre). Genre australien <i>Notechis scutatus</i> .
■ <b>Ophiophagus</b> (cobra royal). Genre asiatique, <i>Ophiophagus hannah</i> .
■ <b>Oxyuranus</b> (taipan). Genre australien : <i>Oxyuranus scutellatus</i> , <i>O. microlepidotus</i> .
■ <b>Pseudechis</b> (serpent noir ou mulga). Genre australien, <i>P. papuanus</i> , <i>P. australis</i> ; <i>P. butleri</i>
■ <b>Pseudonaja</b> (pseudonaja ou serpent brun). Genre strictement australien, <i>Pseudonaja textilis</i> .

■ **Walterinnesia** (cobra du désert). Genre du Moyen-Orient : *Walterinnesia aegyptia*, *W. morgani*

■ **Serpents marins : Hydrophiinae** (sous famille parfois considérée comme une famille à part des Elapidae) Quinze genres de serpents marins sont décrits (*Aipysurus*, *Enhydrina*, *Lapemis*, *Pelamis*), dont certains comprennent de nombreuses espèces.

Tableau 9 : Espèces des Elapidae (d'après Chippaux et al. (9))

## 1.2 Classification selon le type d'appareil venimeux

On peut classer les serpents selon leur type d'appareil venimeux. Les serpents ont en effet développé des maxillaires de différentes morphologies ce qui leur a conféré des systèmes d'inoculation du venin variés.

L'appareil venimeux [Figure 4] est un dispositif complexe qui est composé :

- d'une glande spécialisée synthétisant le venin,
- et d'un dispositif vulnérant, le crochet venimeux, capable d'injecter le venin dans l'organisme de la proie ou de l'agresseur.

Ce dispositif vulnérant correspond à un sillon qu'on retrouve le long d'une ou plusieurs dents ; il existe soit sous forme de gouttière (crochets cannelés) ou de conduit isolé (crochets canaliculés).

Pour une majorité d'espèces, l'expulsion du venin est consécutive à la contraction de muscles entourant la glande venimeuse permettant l'excrétion sous pression. Il n'y aurait pas de volume injecté prédéfini puisque la morphologie des muscles permettrait au serpent de contrôler le volume de venin injecté lors d'une morsure.

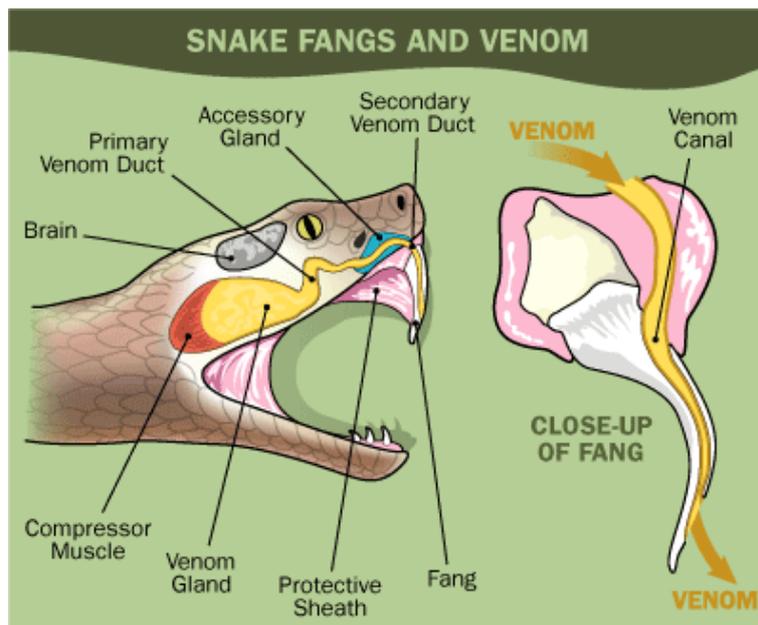
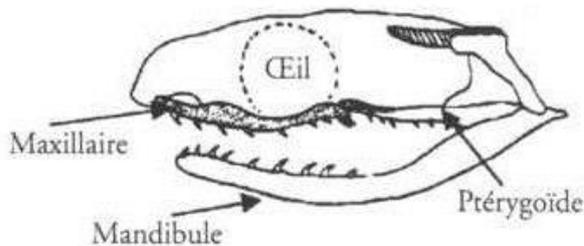


Figure 4 : Mécanisme d'inoculation du venin de serpent par les crochets (d'après Young et al (12))

Une classification existe reposant sur la morphologie et l'implantation du système d'inoculation du venin et comprend 4 groupes.

### 1.2.1 Les Aglyphes



#### Aglyphes :

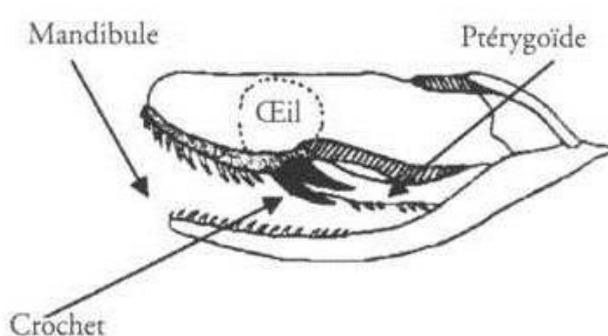
- dents pleines,
- absence de glande venimeuse,
- boas, pythons et la majorité des couleuvres.

Figure 5 : Appareil maxillaire des serpents aglyphes (d'après Chippaux et al (13))

Ce groupe de serpents n'est pas responsable d'envenimations. Il ne possède ni crochet ni dent spécialisé dans l'inoculation de venin à une proie [Figure 5].

On retrouve au sein de ce groupe les Boas et Pythons (famille des Boidés) qui sont des serpents constricteurs, c'est-à-dire capable d'emprisonner et de tuer leur proie par constriction. Les couleuvres font également parties des serpents aglyphes. Elles sont responsables de morsures blanches c'est-à-dire sans envenimation dont la gravité va être liée au type et à la taille du tissu délabré.

### 1.2.2 Les Opisthoglyphes



#### Opisthoglyphes :

- crochets en arrière du maxillaire (au niveau de l'œil) et creusés d'un sillon médian,
- présence de glandes venimeuses,

Figure 6 : Appareil maxillaire des serpents opisthoglyphes (d'après Chippaux et al (13))

Les serpents opisthoglyphes possèdent des crochets postérieurs sillonnés ne permettant pas d'inoculer de grandes quantités de venin [Figure 6]. Seul un nombre restreint de serpents appartenant à ce groupe possède un venin assez toxique et des crochets suffisamment antérieurs et massifs pour pouvoir infliger des morsures sévères, voire mortelles. Ces envenimations peuvent arriver lors d'une

manipulation volontaire de l'animal (13). Les espèces appartenant à ce groupe sont surtout des Colubridae.

Les envenimations par de telles espèces sont souvent moins graves car la quantité de venin produite et stockée au niveau de la glande venimeuse est faible. D'autre part, l'inoculation du venin n'a pas lieu par pression car aucun muscle n'est directement associé à la glande. C'est donc par gravité ou capillarité que le venin peut pénétrer dans la plaie de morsure ce qui réduit également sa quantité (13).

### 1.2.3 Les Protéroglyphes

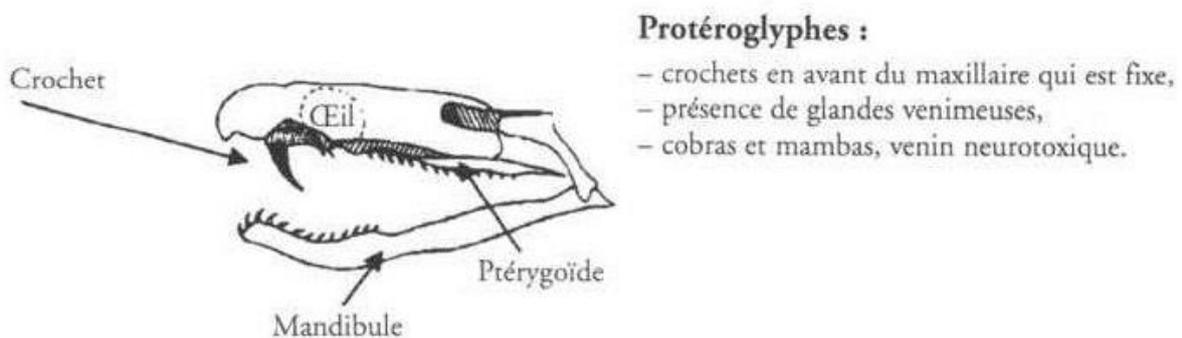


Figure 7 : Appareil maxillaire des serpents protéroglyphes (d'après Chippaux et al (13))

Ces serpents protéroglyphes sont munis de crochets cannelés, non mobiles, situés en avant de la mâchoire [Figure 7]. Ce sont également des serpents ayant la capacité de cracher leur venin à distance et ainsi d'aveugler leur adversaire. Ces serpents possèdent en effet des muscles entourant la glande venimeuse permettant de mettre en pression le liquide qu'il contient et de l'éjecter à distance.

Parmi les serpents protéroglyphes, on retrouve les serpents de la famille des Elapidae. Il n'y a pas de serpents de ce genre en France.

### 1.2.4 Les Solénoglyphes

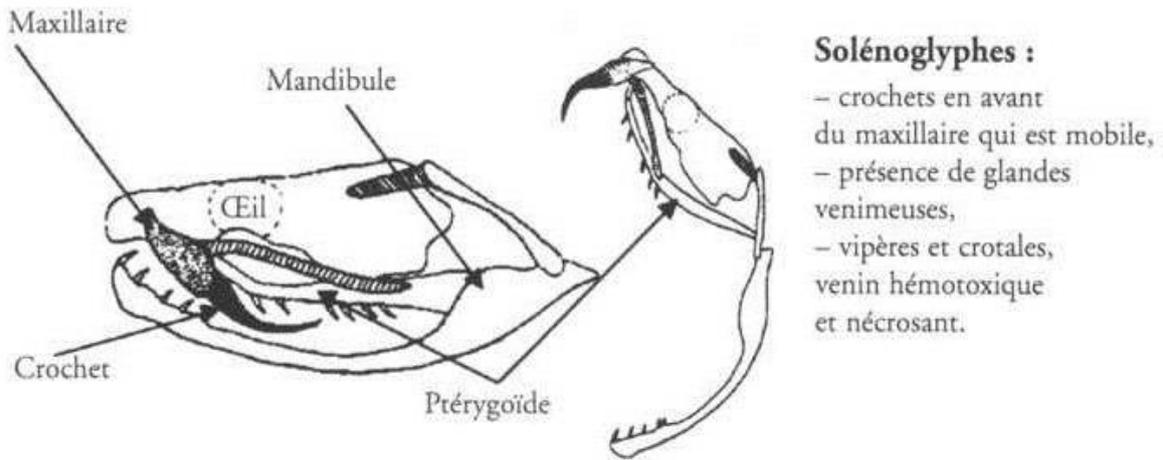


Figure 8 : Appareil maxillaire des serpents solénoglyphes (d'après Chippaux et al (13))

Ce sont ces serpents qui possèdent l'appareil venimeux le plus perfectionné. En effet, ils présentent des crochets longs, canaliculés mobiles et rétractibles [Figure 8]. Ainsi, au repos, le crochet est horizontal et est capable de se redresser au moment de la morsure. Il existe des crochets de remplacement prêts à prendre la place du crochet fonctionnel si celui-ci tombe. En complément d'une grande laxité des os temporaux et de la mandibule, une meilleure pénétration du venin et une injection au niveau des tissus profonds chez la proie est possible rendant l'envenimation plus redoutable. Avec ce type d'appareil venimeux, l'injection de venin est réalisée sous pression grâce aux nombreux muscles entourant la glande venimeuse. Parmi les serpents solénoglyphes, on retrouve les serpents de la famille des Viperidae et *Atractaspis*.

## 2. Physiologie de l'hémostase

L'hémostase est un ensemble de phénomènes physiologiques dont l'objectif est d'arrêter un saignement à la suite d'une effraction vasculaire. Pour cela, plusieurs mécanismes existent mettant en jeu des effecteurs divers à la fois cellulaires, enzymatiques, peptidiques...

On répartit habituellement ces mécanismes en 3 grandes étapes interdépendantes [Figure 12] :

- l'hémostase primaire, processus rapidement mis en jeu afin d'obturer la brèche vasculaire à l'aide d'un clou plaquettaire ;

- la coagulation plasmatique, dont l'objectif est de renforcer le clou plaquettaire à l'aide de fibrine produit grâce à une cascade enzymatique complexe faisant intervenir les facteurs de la coagulation ;

- et la fibrinolyse, dernier processus visant à dégrader lentement le caillot parallèlement au processus de réparation et de cicatrisation des tissus.

### 2.1 Hémostase primaire

Le processus d'hémostase est activé à la suite d'une effraction vasculaire entraînant un saignement. L'homéostasie est rompue et il faut rapidement stopper les pertes sanguines. Différents mécanismes se mettent alors en place [Figure 9].

#### 2.1.1 *Vasoconstriction réflexe*

Le premier de ces mécanismes est une vasoconstriction réflexe des vaisseaux lésés. La vasoconstriction est tout d'abord passive grâce à l'élasticité de la paroi puis active par contraction réflexe (mécanisme sympathique) des cellules musculaires lisses de la paroi vasculaire. Cette vasoconstriction va être prolongée dans le temps et renforcée suite à la libération de certains effecteurs par les plaquettes: sérotonine, thromboxane A<sub>2</sub>, ... Il peut s'en suivre une diminution du diamètre des vaisseaux pouvant aller jusqu'à 40%. Le flux sanguin est ainsi ralenti, diminuant les quantités de sang perdu et favorisant les interactions entre plaquettes et endothélium.

#### 2.1.2 *Adhésion plaquettaire*

Le second mécanisme se mettant en place est l'adhésion plaquettaire. Le sous-endothélium composé de collagène est maintenant exposé aux éléments sanguins puisqu'il n'est plus recouvert par l'endothélium (surface non thrombogène). Le facteur Willebrand peut donc s'y lier, changer de conformation pour fixer les plaquettes via des glycoprotéines plaquettaires de surface Gp Ib/IX. Les plaquettes peuvent également se lier directement au collagène via d'autres récepteurs (GPVI). C'est l'étape d'adhésion des thrombocytes au sous-endothélium.

### 2.1.3 *Activation plaquettaire*

Les plaquettes vont s'activer via les signaux cellulaires émis consécutivement à leur fixation au sous-endothélium. Plusieurs phénomènes vont avoir lieu :

- une modification morphologique des plaquettes : les plaquettes vont s'arrondir et émettre des pseudopodes abandonnant leur forme discoïde de repos suite à la réorganisation du cytosquelette.

- la sécrétion des granules alpha plaquettaires entraînant notamment la libération de fibrinogène, de facteur Willebrand et de facteur V.

- la sécrétion des granules denses : ces granules contiennent de l'ADP capable d'amplifier l'activation plaquettaire, et de la sérotonine capable de contracter les cellules musculaires lisses et maintenir une vasoconstriction.

- la production de thromboxane A2 à partir de l'acide arachidonique à l'aide de la cyclooxygénase 1. Le thromboxane A2 se fixera aux récepteurs plaquettaires au thromboxane pour les activer et recruter d'autres plaquettes (effet paracrine).

- la surexpression et le changement de conformation du récepteur au fibrinogène Gp IIb/IIIa ( $\alpha_2\beta_3$ ) devenant fonctionnel.

- l'exposition des phospholipides anioniques (phosphatidylsérine) à la surface plaquettaire via un mécanisme de flip-flop les faisant basculer du feuillet interne vers le feuillet externe et offrant une surface privilégiée à la fixation des facteurs de la coagulation et aux mécanismes de la coagulation en se liant à des ions calcium.

### 2.1.4 *Agrégation plaquettaire*

Finalement, les plaquettes finissent par s'agréger grâce à la formation de ponts interplaquettaire constitués de fibrinogène se fixant sur les glycoprotéines Gp IIb/IIIa. Cela permet de former un thrombus blanc ou clou plaquettaire, premier rempart aux pertes sanguines.

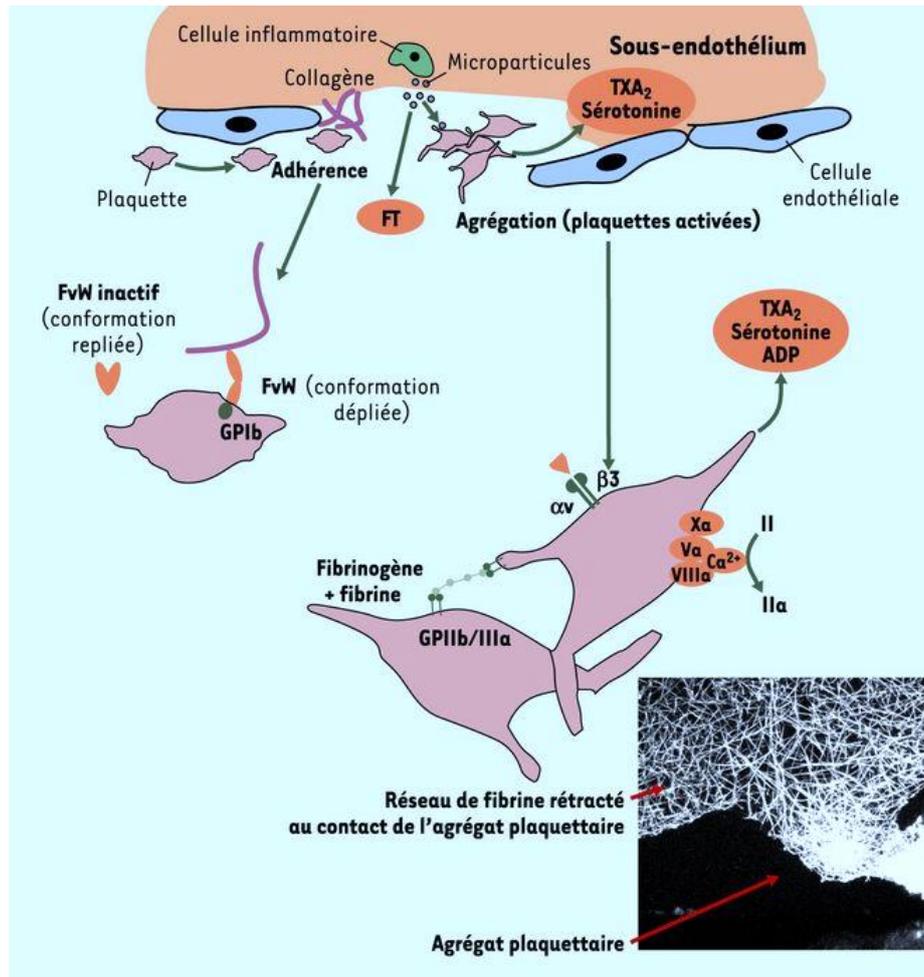


Figure 9 : Résumé de l'activation à l'adhésion plaquettaire (d'après Collet et al (14))

## 2.2 Les grandes étapes de la coagulation plasmatique

La coagulation plasmatique est la seconde étape de l'hémostase. Son rôle est de consolider le caillot plaquettaire formé lors de la première étape en formant un réseau de fibrine.

La formation de fibrine est possible grâce à la thrombine, produite en aval d'une cascade enzymatique complexe et finement régulée. Cette cascade de la coagulation [Figure 10] est capable après clivage protéolytique d'activer les facteurs de la coagulation inactifs (zymogènes), synthétisés par le foie, en enzymes. Une fois activés, les facteurs sont à leur tour capables d'activer d'autres facteurs de la coagulation. Ces réactions sont essentiellement localisées au niveau de la surface des plaquettes où les phospholipides membranaires chargés négativement (phosphatidylsérines) vont pouvoir interagir avec les facteurs de la coagulation (chargés eux aussi négativement) par l'intermédiaire d'ions calcium.

### 2.2.1 Initiation

La cascade de la coagulation est initiée lorsque le sang circulant entre en contact avec le facteur tissulaire (FT). Ce facteur tissulaire n'est pas exposé en condition physiologique. En revanche, lors

d'une effraction vasculaire ou d'une activation de l'endothélium, le facteur tissulaire provenant essentiellement des fibroblastes des couches sous-endothéliales entre en contact avec le sang. Le facteur VII activé (FVIIa) présent en faible quantité dans le plasma peut alors se fixer au FT pour former le complexe initiateur FT/FVIIa. Le FVIIa activera le facteur X (FX) et le facteur IX (FIX). Ensuite, le FXa va activer la prothrombine (Facteur II) en thrombine (FIIa). Dans un premier temps, de faibles quantités de thrombine sont générées permettant la fibrinofomation et l'activation des plaquettes. A cette étape succède une étape d'amplification.

### 2.2.2 Amplification

La thrombine initialement produite est capable d'activer les facteurs V, VIII et XI par clivage protéolytique.

Le complexe prothrombinase associant le FXa et son cofacteur le FVa à la surface des plaquettes est capable en présence d'ions calcium d'activer la prothrombine en thrombine de façon bien plus efficace que le FXa seul.

De même, le FVIIIa s'associe au FIXa dont il est le cofacteur au niveau des surfaces procoagulantes des plaquettes pour former le complexe ténase capable d'activer le FX. Quant au FXIa, il active le facteur IX en facteur IXa qui intègre le complexe ténase.

Tous ces processus permettent la génération d'une plus grande quantité de thrombine nécessaire à la constitution d'un caillot de fibrine de bonne qualité.

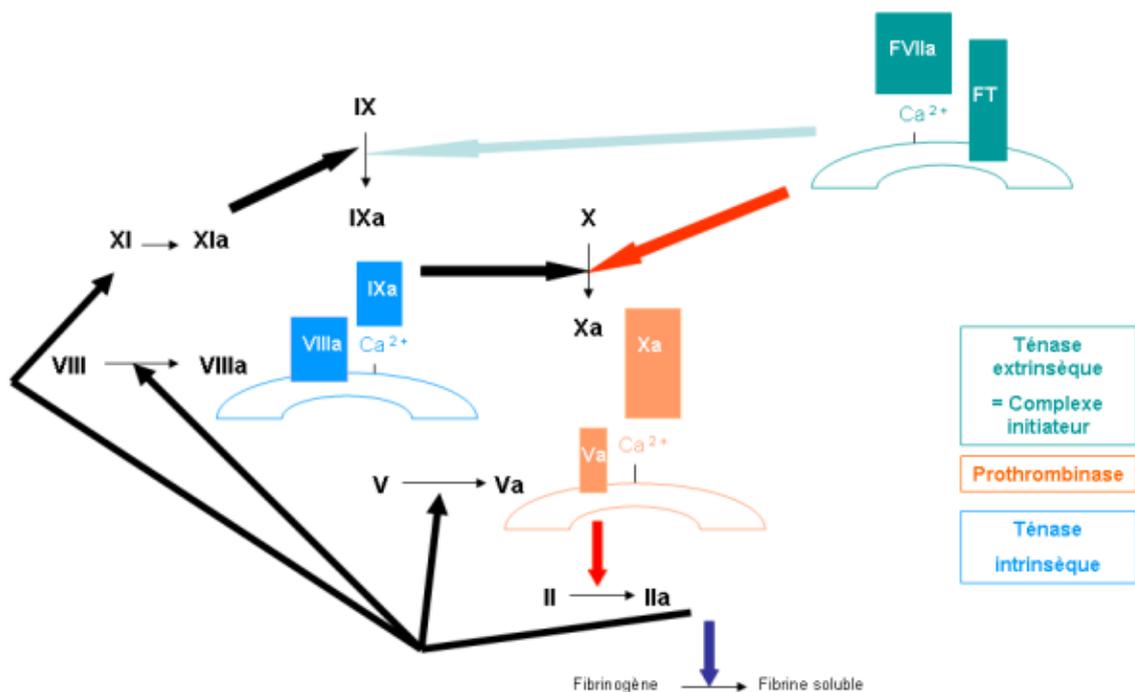


Figure 10 : Schéma de la coagulation plasmatique in vivo (d'après R. Marlu et al (15))

### 2.2.3 *Synthèse des facteurs de la coagulation*

La totalité des facteurs de la coagulation ainsi que certains inhibiteurs (protéines C/S et antithrombine) ont une synthèse hépatique. Une insuffisance hépatique entraîne ainsi des perturbations des systèmes de la coagulation. De plus, certaines protéines de la coagulation nécessitent de la vitamine K pour être fonctionnelles : ce sont les facteurs vitamine K dépendants (facteurs X, IX, VII, II) ainsi que les protéines C/S. La vitamine K (sous forme réduite KH<sub>2</sub>) agit en tant que cofacteur d'une gamma-carboxylase hépatique qui, en carboxylant des acides glutamiques de ces protéines, génère des acides gamma-carboxyglutamiques (Gla) chargés négativement et pouvant interagir avec les ions calcium. Cette maturation post-traductionnelle permet par la suite la fixation des facteurs vitamine K dépendants aux phospholipides par l'intermédiaire d'ions calcium chargés positivement.

### 2.2.4 *Phase contact*

Une autre voie d'activation de la coagulation existe et fait intervenir des facteurs de la phase contact : le kininogène de haut poids moléculaire (KHPM), la prékallikréine (PK) et le facteur XII (FXII). Le facteur XII s'auto-active au contact de surfaces chargées négativement et est capable d'activer la prékallikréine en kallikréine qui elle-même va activer le FXII créant une boucle d'auto-amplification. Cette activation du facteur XII est amplifiée par la fixation du KHPM à la kallikréine. Le facteur XIIa généré est capable d'activer le facteur XI, lui-même activant le facteur IX intervenant dans le complexe ténase. Toutefois, la voie du facteur tissulaire reste largement prédominante dans le processus de coagulation physiologique.

### 2.2.5 *Fibrinoformation*

La cascade de la coagulation a permis de produire de grandes quantités de thrombine (FIIa) primordiale à la fibrinoformation. La thrombine est responsable du clivage des fibrinopeptides A et B du fibrinogène. Il en résulte la formation de monomères de fibrine pouvant se lier les uns aux autres via des liaisons électrostatiques pour former un polymère soluble [Figure 11].

Enfin, la thrombine active le facteur XIII qui a la capacité de rendre insoluble le polymère de fibrine. Pour cela, le facteur XIII crée des liaisons covalentes solides entre ces monomères de fibrine. On obtient alors la formation d'un réseau de fibrine insoluble qui vient consolider le clou plaquettaire et qui emprisonne les globules rouges. L'extrasation des éléments sanguins à la suite d'une brèche vasculaire est ainsi limitée et le thrombus rouge définitif est formé.

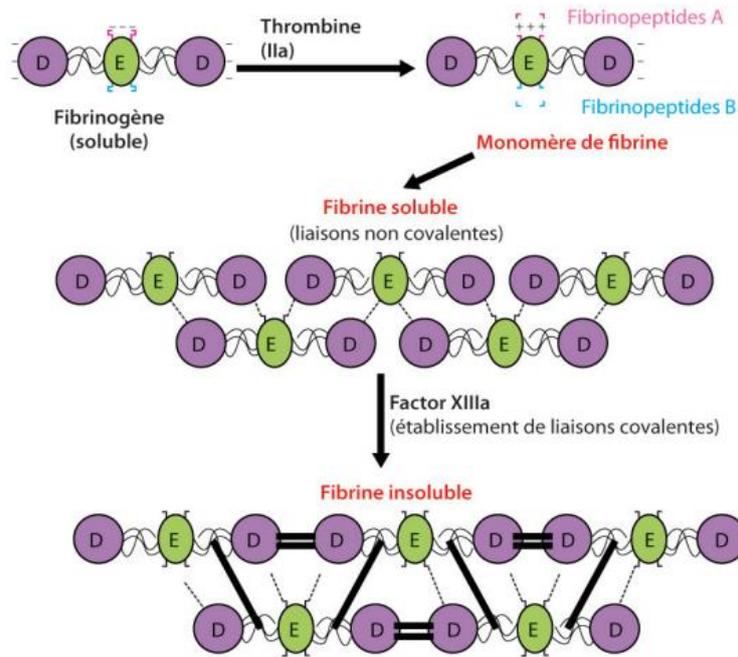


Figure 11 : Schéma de la fibrinogenèse (d'après R. Marlu et al (15))

## 2.3 Rôle de la thrombine

La thrombine joue plusieurs rôles à la fois dans l'activation plaquettaire, l'amplification de la coagulation, la fibrinogenèse et les processus de régulation de la coagulation.

En effet, la thrombine est capable d'activer les co-facteurs de la coagulation comme le facteur V, facteur VIII et le facteur XI afin de générer les complexes ténase et prothrombinase. La thrombine est également un puissant activateur plaquettaire en se fixant aux récepteurs PAR-1 et PAR-4.

Une autre propriété de la thrombine est l'activation de la protéine C, permettant de réguler négativement la cascade de la coagulation. La PC activée (PCa) en présence de son cofacteur, la protéine S clive les facteurs V et VIII activés, inhibant ainsi la boucle d'amplification de la génération de thrombine. Finalement, la thrombine intervient également dans la modulation de la fibrinolyse en activant le TAFI (Thrombin Activable Fibrinolysis Inhibitor).



## 2.4 Inhibiteurs physiologiques de la coagulation

La cascade de la coagulation est régulée par différents mécanismes faisant intervenir des effecteurs variés dans le but de limiter sa propagation dans la circulation sanguine. On connaît trois principaux systèmes effecteurs physiologiques de la coagulation ayant des cibles différentes : l'antithrombine, les protéines C/S, et le TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor) [Figure 13].

### 2.4.1 Antithrombine

L'antithrombine, une glycoprotéine de synthèse hépatique, fait partie de la famille des serpins (serine protease inhibitor) et agit comme un substrat suicide. L'antithrombine est un inhibiteur de plusieurs facteurs de la coagulation (sérine protéases) et plus particulièrement des facteurs IIa et Xa. Son activité est lente et progressive mais est considérablement amplifiée par l'héparane sulfate libéré par les cellules endothéliales suite à une effraction vasculaire ou par l'héparine.

### 2.4.2 Protéine C et S

Ces protéines ont une synthèse hépatique vitamine K dépendante. La protéine S correspond au cofacteur de la protéine C. La protéine C est activée par l'intermédiaire de la thrombine liée à la thrombomoduline. Une fois activée, la protéine C est capable de cliver et d'inactiver les facteurs V ou Va et VIII ou VIIIa permettant une régulation négative de la phase d'amplification de la coagulation plasmatique.

### 2.4.3 Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI)

Le TFPI a une synthèse majoritairement endothéliale mais on le retrouve également dans d'autres types cellulaires (plaquettes, monocytes...). C'est un inhibiteur de protéase à sérine multivalent, de type Kunitz. On retrouve plusieurs isoformes de TFPI qui sont produites à la suite d'un épissage alternatif de l'ARNm: TFPI $\alpha$ , TFPI $\beta$  et TFPI $\delta$ . La production in vivo de TFPI $\delta$  n'est cependant pas démontrée. Ces isoformes diffèrent par leur structure, leur affinité pour le facteur V/Va et la protéine S, leur expression tissulaire, et leur mécanisme d'association aux surfaces cellulaires (16).

Le TFPI agit comme inhibiteur des complexes facteur tissulaire-facteur VIIa et de la prothrombinase qui initie la coagulation (17). Il inhibe à la fois la génération du facteur Xa dépendant du FT-FVIIa et le FXa libre. Les deux isoformes (TFPI $\alpha$  et TFPI $\beta$ ) inhibent le complexe FT-FVIIa, mais seul le TFPI $\alpha$  peut inhiber les formes précoces de la prothrombinase (18). De même, la protéine S serait un cofacteur du TFPI $\alpha$  et permettrait de renforcer l'inhibition du FXa. La formation du complexe quaternaire facteur Xa - TFPI - facteur VIIa - facteur tissulaire bloque l'activation du facteur IX et du facteur X par le facteur VIIa. Ces deux activités anticoagulantes permettent au TFPI de réguler efficacement l'initiation de la coagulation et de limiter la formation diffuse de thrombus.

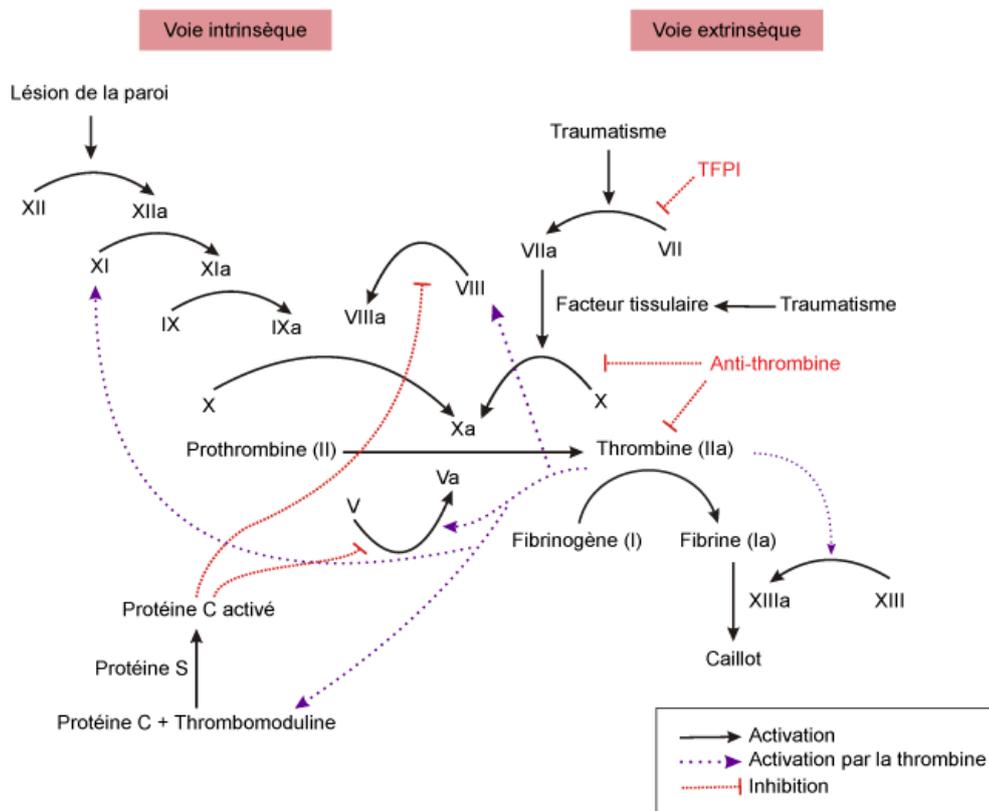


Figure 13 : Schéma des mécanismes d'action des inhibiteurs de la coagulation (19)

## 2.5 Fibrinolyse

La fibrinolyse est la troisième étape de l'hémostase. Elle tend à détruire le caillot formé parallèlement à la cicatrisation vasculaire.

La plasmine est la principale enzyme intervenant lors de cette étape. Elle est issue du plasminogène, protéine synthétisée par le foie, circulante sous forme inactive dans le plasma et pouvant s'activer en plasmine à la surface de la fibrine sous l'influence d'activateurs notamment le t-PA (activateur tissulaire du plasminogène). Cette substance est synthétisée par la cellule endothéliale qui la libère lorsqu'elle est en état d'hypoxie, de stress ou lors de tout phénomène d'agression.

L'u-PA (urokinase) peut également activer le plasminogène mais de manière indépendante de la fibrine. Toutefois, son rôle est minoritaire dans le plasma comparativement au t-PA.

La plasmine ainsi formée est une sérine protéase qui est capable de dégrader le caillot de fibrine en rompant les ponts peptidiques et en lysant les liaisons plus lâches situées entre les domaines D et E. La fibrinolyse est également finement régulée par des inhibiteurs naturels ( $\alpha$ 2-antiplasmine, PAI-1 et -2, TAFI).

En conclusion, l'hémostase correspond à un équilibre permanent entre, d'un côté, des mécanismes prohémostatiques (hémostase primaire, coagulation) et de l'autre des mécanismes antihémostatiques (antiagrégants, anticoagulants et profibrinolytiques).

Certains événements peuvent interférer et entraîner une rupture de l'équilibre hémostatique; c'est le cas des morsures de serpent qui peuvent induire des coagulopathies (Snake Venom induced Coagulopathies).

### 3. Comprendre les envenimations : type de protéines et effets

Dans un premier temps, il est primordial de comprendre les effets des envenimations. Pour cela, il faut étudier avec attention les protéines contenues dans les venins. Le venin est composé d'un mélange de protéines variables selon les espèces de serpents et dont la composition fluctue en fonction de l'âge, du sexe, de la localisation géographique, des habitudes alimentaires du serpent, et de l'épigénétique. Ces protéines peuvent avoir des fonctions enzymatiques ou non. Elles sont accompagnées par d'autres éléments tels que des ions métalliques (calcium, cadmium, aluminium, zinc), des phospholipides, des glucides, des lipides, des acides aminés... dont certains peuvent jouer le rôle de cofacteur nécessaire à l'activité de certaines enzymes. Ces protéines ont un panel d'activités pharmacologiques qu'il est intéressant d'étudier afin d'appréhender davantage les envenimations.

#### **3.1 Conséquences de l'envenimation**

L'envenimation correspond à l'inoculation de venin dans l'organisme par un animal venimeux. Chez le serpent, cette injection a lieu lors d'une morsure. Le dispositif vulnérant ou crochet permet de faire pénétrer le venin dans l'organisme de la proie ou de l'agresseur. Il s'agit d'un sillon qu'on retrouve le long d'une ou plusieurs dents sous forme de gouttière (crochets cannelés) ou de conduit isolé (crochets canaliculés). L'expulsion du venin est, le plus fréquemment, consécutive à la contraction de muscles entourant la glande vénéreuse permettant l'excrétion sous pression. Il n'y aurait pas de volume injecté prédéfini puisque la morphologie des muscles permettrait au serpent de contrôler le volume de venin injecté lors d'une morsure. L'inoculation de venin à sa proie permet de l'immobiliser. Ce sont les toxines qu'il contient qui vont permettre au serpent dépourvu de membres de faciliter la contention et l'ingestion de sa proie.

Les protéines sont fabriquées et stockées par la glande venimeuse qui correspond à une glande spécialisée, localisée le long de la mâchoire supérieure en arrière de l'œil et reliée par un canal excréteur à la base du crochet venimeux. L'épithélium glandulaire détient l'information génétique nécessaire à la production des sécrétions de la glande (13). Toutes les cellules de la glande venimeuse sont capables de produire l'ensemble des protéines composant le venin du serpent. Afin d'avoir un venin comportant une multitude de toxines, les cellules de la glande vont en produire différents types à des moments distincts du cycle sécrétoire.

Différents facteurs peuvent modifier l'effet toxique suite à une envenimation et sont donc à prendre en compte :

- la quantité de venin injecté. Un serpent peut injecter entre 10% à 50% de sa capacité glandulaire lors d'une morsure. La quantité injectée varie elle-même selon différents facteurs (l'espèce de serpent, les circonstances de la morsure (attaque ou défense), la taille du serpent et la taille de la proie, le nombre de morsures déjà réalisées par le serpent).
- la localisation de la morsure : les morsures touchant la tête ou le tronc sont plus létales que celles touchant les membres.
- le poids et l'âge de la victime : les morsures ophidiennes sont plus graves chez les enfants en raison de leur masse corporelle plus faible.
- les sensibilités et comorbidités : la sensibilité au venin est variable d'un individu à un autre.
- le type de venin : la virulence du venin d'une même espèce de serpent varie selon la région géographique, l'envenimation est généralement plus grave en zone exotique.

Les manifestations cliniques sont variables selon l'espèce. Dans tous les cas la douleur est constante. Il est important de rechercher les traces de morsure notamment afin d'identifier si elle a été réalisée par un serpent possédant des crochets et possiblement venimeux [Figure 14]. Pour cela, on repère deux plaies ponctiformes séparées d'environ 1 cm, fréquemment entourées d'un œdème et/ou d'ecchymoses. En absence de venin, l'évolution est favorable. Dans le cas contraire, des signes cliniques vont apparaître dans les heures qui suivent.

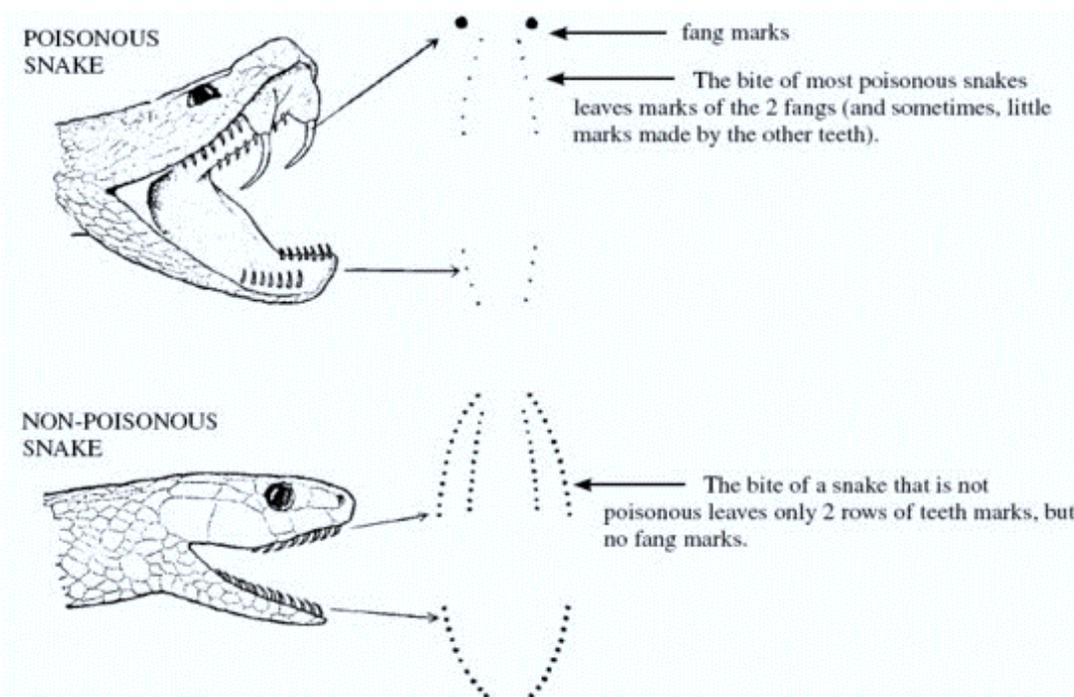


Figure 14 : Distinction des morsures de serpents venimeux et non venimeux (d'après Pereira et al (20))

- 1- Serpents venimeux : 2 traces de crochets
- 2- Serpents non venimeux : absence de crochet

On oppose fréquemment deux types de syndromes majeurs consécutifs à une envenimation. On identifie le syndrome vipérin et le syndrome cobraïque en référence aux espèces responsables de la morsure. Tous deux se caractérisent par une symptomatologie distincte qu'il est intéressant de comprendre. On note aussi qu'il existe d'autres syndromes moins décrits (21).

### *3.1.1 Différents types de syndromes*

#### **3.1.1.1 Le syndrome cobraïque**

Le syndrome cobraïque ou neurotoxique est typique des envenimations par des espèces du groupe Elapidae. Les principales espèces de ce groupe sont les cobras.

Il se caractérise par un syndrome muscarinique et des signes neurologiques. Le syndrome muscarinique se définit par un ensemble de signes d'hypertonie vagale. Il associe différents symptômes tels que des vomissements, une hypersudation, une sialorrhée, des diarrhées, un myosis, un bronchospasme, et des trémulations. En association à ce syndrome, on retrouve des signes neurologiques particuliers à titre de paresthésies (au niveau du membre touché), et également une atteinte des paires crâniennes : ptose palpébrale bilatérale, troubles de la déglutition, dysphonie, rictus (paralysie de la bouche), dysphagie, diplopie, et ophtalmoplégie. Sur le plan musculaire, on peut observer des fasciculations ou trémulations, des tremblements, des crampes ou des contractures.

L'évolution de ce syndrome peut être gravissime allant vers une détresse respiratoire par paralysie du diaphragme et des muscles respiratoires conduisant à une mort par asphyxie. Ce syndrome est donc une réelle urgence thérapeutique car l'évolution peut être fatale en quelques heures, elle dépend de la morsure (localisation, quantité de venin inoculée) et de la victime (22). On remarque également un défaut d'efficacité des immunothérapies (antidotes) si son administration est trop tardive notamment à cause de l'action irréversible de certaines toxines.

De plus, certains cobras cracheurs sont dotés de la capacité de projeter leur venin dans les yeux de leur adversaire. Les symptômes alors associés sont une kérato-conjonctivite, se compliquant parfois de cécité transitoire ou permanente. Le passage à la circulation systémique n'a jamais été documenté (23).

#### **3.1.1.2 Le syndrome vipérin**

Le syndrome vipérin est consécutif à des morsures par des espèces de la famille des Viperidae. Ce toxidrome correspond à un double syndrome qu'on dit inflammatoire et hémorragique puisqu'il associe une atteinte locale à des troubles de l'hémostase. Suite à l'inoculation du venin, la douleur est immédiate et souvent très intense. Elle est irradiante en direction de la racine du membre et précède les signes inflammatoires (24). Le syndrome inflammatoire se caractérise par un œdème local parfois

extensif au membre et/ou au tronc, des phlyctènes voire une nécrose cutanée. La douleur persiste lors de cette étape, maintenue par ces processus inflammatoires. Le syndrome hémorragique, quant à lui, s'accompagne d'ecchymoses, d'hématomes et d'autres saignements (épistaxis, gingivorragies, hémorragies digestive, obstétricale, rétinienne, péritonéale, méningée). Il peut se compliquer d'anémie aigue, de syndrome des loges, et de nécroses cutanées localisées (21).

Les envenimations ophidiennes peuvent présenter des tableaux très polymorphes. C'est le cas notamment lorsque les deux syndromes majeurs (cobraïques et vipérins) sont associés (*Crotalus durissus terrificus*, *Vipera aspis*).

### 3.1.2 Stadification clinico-biologique des envenimations

Le polymorphisme des envenimations ophidiennes justifie le recours à une gradation clinico-biologique. Cette gradation repose sur l'identification de symptômes locaux, de signes hémorragiques et généraux apparaissant au cours des syndromes vipérins et/ou cobraïque ainsi que sur les résultats biologiques [Tableau 10]. La gradation clinique des morsures et des envenimations est importante pour l'évaluation de chaque victime et l'adaptation de la prise en charge.

Le grade 0 représente entre un tiers et la moitié des morsures de serpents en Europe. On parle de morsures sèches ou blanches sans injection de venin. Le grade 1 correspond à une envenimation minime. Le recours à une immunothérapie n'est pas nécessaire dans ces 2 situations sauf en cas de grossesse ou d'antécédents médicaux faisant suspecter des lésions internes potentiellement hémorragiques, de morsures au visage, et d'âges extrêmes de la victime (25).

Les grades 2 et 3 correspondent à une envenimation modérée ou sévère. Ces situations peuvent être graves et nécessitent le recours à l'immunothérapie de manière systématique lorsqu'elle est disponible. Elle permet de limiter les complications générales, l'aggravation clinique, ainsi que la durée d'hospitalisation.

SYNDROME VIPERIN					
GRADES	SYNDROME		SYNDROME COBRAÏQUE	SIGNES GENERAUX	BIOLOGIE
	Syndrome inflammatoire	Hémorragies			
<b>Grade 0</b> <b>Morsure blanche</b>	Douleur modérée Traces des crochets Absence d'œdème ou de réaction locale				
<b>Grade 1</b> <b>Mineure</b>	Douleur importante Œdème local ne dépassant pas le coude ou le genou				<b>Trouble mineur de l'hémostase</b> NP > 80 G/L TP > 45% Fibrinogène > 1 g/L
<b>Grade 2</b> <b>Modérée</b>	Œdème régional du membre, <b>dépassant le coude ou le genou</b> Phlyctène Nécrose mineure	Saignement modéré de la morsure Gingivorragies Hématurie	<b>Signes neurologiques d'alerte</b> (ptosis...)	<b>Hypotension</b> modérée Malaise Vomissements, diarrhées, douleurs abdominales	<b>Coagulopathie patente</b> NP < 80 G/L TP < 45% Fibrinogène < 1 g/L TCA allongé Créatinine > 120 µmol/L
<b>Grade 3</b> <b>Sévère</b>	Œdème <b>atteignant ou dépassant la racine du membre</b> Nécrose étendue	Epistaxis Hémoptysie Saignement digestif Autres	<b>Détresse respiratoire Coma, convulsions</b>	<b>Etat de choc</b> Hypotension prolongée, choc, réaction anaphylactoïde, atteintes viscérales	<b>Coagulopathie</b> Hb < 90 g/L

Tableau 10 : Gradation clinique des envenimations ophidiennes (d'après S. Larréché et al (25))

NP : numération plaquettaire

Hb : hémoglobine

### 3.1.3 Hématotoxicité

Certaines protéines de venins ophidiens ont un effet majeur sur la coagulation. De nombreuses toxines ont pour cible des protéines de la coagulation ayant pour conséquence cette hématotoxicité. Selon les espèces de serpents, on peut retrouver des protéines aux effets anticoagulants et/ou pro-coagulants responsables de phénomènes hémorragiques et plus rarement de thromboses. Parfois des molécules pro- et anti-coagulantes peuvent coexister dans un même venin.

### **3.1.3.1 Syndromes hémorragiques**

L'hémorragie est due à une toxicité touchant à la fois les vaisseaux, les plaquettes et la cascade de la coagulation.

Lors d'une morsure de serpent, il y a des dégâts liés à la morsure elle-même : le tissu est endommagé suite à l'abrasion mécanique. A cela s'ajoute les effets liés à l'inoculation de toxines. Certaines toxines contenues dans les venins de serpents vont être responsables de la destruction de la membrane basale des vaisseaux. L'association des forces de cisaillements du flux sanguin et de la pression hydrostatique entraîne une fuite du sang ou extravasation (26). D'autres toxines vont également inactiver la coagulation en jouant sur différents effecteurs compromettant la mise en place de phénomènes hémostatiques servant à limiter la perte sanguine et à la réparation de la brèche vasculaire.

L'hémorragie peut être superficielle ou plus profonde selon l'effet des toxines, la quantité de venin inoculé, la sensibilité de la victime au venin...

La plupart du temps, la victime présente un écoulement sanguin par la morsure qui sera dans un premier temps discret et localisé. L'installation d'un syndrome hémorragique est insidieuse et les saignements visibles vont apparaître par la suite à distance de la morsure notamment au niveau d'une plaie récente ou des muqueuses. Les principaux signes hémorragiques sont des ecchymoses, des hématuries, des hématoméses, puis des hémorragies internes.

### **3.1.3.2 Thromboses**

La formation de thromboses est déclenchée par les protéines de venins ophidiens qui activent la génération de thrombine, mais aussi facilitée par l'altération des vaisseaux sanguins suite à la morsure. Ces thromboses vont limiter la perfusion de certains tissus comme les muscles entraînant des ischémies et des nécroses musculaires pouvant se compliquer d'infections. On retrouve aussi des ischémies d'autres organes et des collapsus vasculaires (26).

Le syndrome thrombotique inaugural est rare, sauf chez certaines espèces (*Bothrops lanceolatus* et peut-être *B. brazili*). Le venin de ces espèces peut être responsable d'embols et d'infarctus disséminés dans l'organisme touchant le cœur (infarctus du myocarde), le cerveau (accident vasculaire cérébral), les reins, le poumon ... Finalement, ce processus thrombotique s'auto entretient car les toxines sont responsables d'une inflammation qui active elle aussi le processus de coagulation.

### **3.1.4 Neurotoxicité**

La neurotoxicité est une des toxicités principales. C'est d'ailleurs la complication majeure des morsures des serpents de la famille des Elapidae. Son action est principalement dirigée sur le système nerveux

périphérique et vise à bloquer l'influx nerveux au niveau de la jonction neuromusculaire ou plaque motrice, l'objectif étant alors d'immobiliser la proie.

On classifie les neurotoxines selon leur action sur la transmission synaptique (neurotoxines post- et pré-synaptiques) ou sur la dépolarisation (neurotoxines dépolarisantes) [Figure 15]. Les toxines post-synaptiques sont appelées les alpha neurotoxines tandis que les toxines pré-synaptiques sont les beta neurotoxines. Parmi ces deux groupes, les neurotoxines post-synaptiques agissent le plus rapidement. Les neurotoxines présynaptiques ont un mécanisme d'action différent qui conduit à la même finalité mais de façon plus retardée.

Les neurotoxines  $\alpha$  ont un effet curare-like en se fixant spécifiquement sur les récepteurs nicotiniques de type 2 post-synaptiques de la jonction neuromusculaire. Elles entraînent un blocage quasi-irréversible de la transmission neuromusculaire. L'antagoniste le plus connu est l' $\alpha$ -bungarotoxine.

Les neurotoxines  $\beta$  quant à elles, ont pour fonction d'inhiber le recyclage de l'acétylcholine dans les vésicules synaptiques. Ce mécanisme d'action conduit au même titre que les neurotoxines  $\alpha$  à une perte de transmission de l'influx nerveux au niveau de la jonction neuromusculaire (23).

Enfin, il existe des neurotoxines dépolarisantes. Ce sont les dendrotoxines qui sont des inhibiteurs des canaux potassiques voltage dépendants favorisant la libération d'acétylcholine, et les fasciculines qui sont des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase limitant la dégradation de l'acétylcholine dans la fente synaptique. Ces toxines prolongent la durée d'action de l'acétylcholine dans la fente synaptique et sont à l'origine de signes cliniques tels que les fasciculations musculaires, ou la paralysie respiratoire.

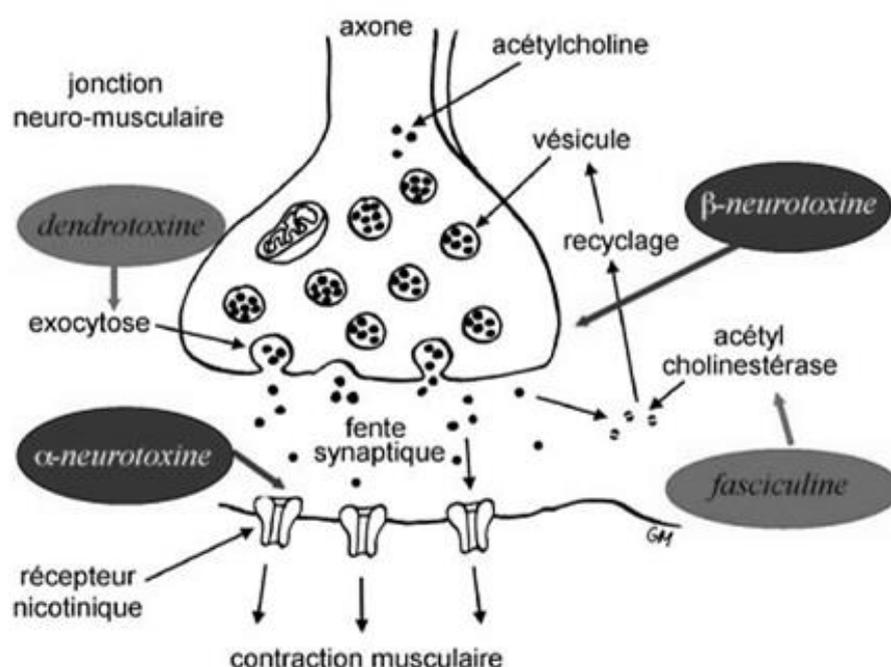


Figure 15 : Site d'action des neurotoxines sur la jonction neuromusculaire (d'après S. Larréché et al (21))

### 3.1.5 Toxicité musculaire

La toxicité musculaire est consécutive à l'action des myotoxines. Ces toxines sont notamment retrouvées dans les venins d'Hydrophidae et d'Elapidae australiens, on les rencontre aussi chez certains cobras et crotales (*Crotalus durissus*, *Bothrops brazili*). Ces protéines sont capables de se fixer sur les canaux potassiques ou calciques des cellules musculaires, et sont à l'origine d'une rhabdomyolyse. Elle se manifeste par des myalgies diffuses, et une myoglobinurie et peut évoluer vers des tableaux d'insuffisance rénale aiguë et d'hyperkaliémie. Des séquelles musculaires importantes sont parfois décrites. On observe sur le bilan biologique une augmentation des CPK et LDH proportionnelle à la quantité de venin inoculée (21).

### 3.1.6 Cytotoxicité

Cette toxicité s'explique par l'action de cytotoxines capables d'affecter sans spécificité l'intégrité des membranes cellulaires. Elles agissent notamment via l'activation de la phospholipase C qui hydrolyse les lipides membranaires (21). Au niveau local, la cytotoxicité entraîne des douleurs pulsatiles ou à type de brûlure accompagnées d'un gonflement local ou d'un œdème et de nécrose tissulaire (27). Ces nécroses sont à distinguer de celles induites par le syndrome vipérin, ce qui parfois peut être compliqué. Les nécroses des Viperidae sont d'aspect humides, et étendues au contraire des nécroses par cytolysse qui sont d'évolution plus lente et d'extension plus limitée (28).

### 3.1.7 Traitement de l'envenimation par antivenin

La prise en charge des patients repose sur l'utilisation d'un traitement symptomatique mais aussi d'un traitement spécifique dit antivenin dans certains cas. Il s'agit d'une immunothérapie hautement spécifique considérée comme un antidote efficace des envenimations par serpent permettant de limiter le risque de décès et de complications. Pour la préparation d'antivenin, des chevaux, moutons ou chameaux sont hyperimmunisés par les venins de serpents les plus représentés dans une zone géographique donnée et les anticorps qu'ils produisent sont ensuite purifiés. Ces immunoglobulines peuvent être traitées d'une part, par la pepsine pour produire des fragments F(ab')<sub>2</sub> excluant la fraction Fc dans l'objectif de limiter les réactions indésirables. D'autre part, la papaine peut être aussi utilisée et permet de produire des fragments Fab plus petits (29). On retrouve deux types d'antivenins : les antivenins polyvalents ou polyspécifiques efficaces sur plusieurs espèces de serpents et les antivenins monovalents ou monospécifiques dirigés contre le venin d'une seule espèce (par exemple : European ViperaTab® contre le venin de *Vipera berus*).

La décision d'utiliser de tels traitements dépend de différents facteurs. Le grade de l'envenimation aide à décider du recours à l'immunothérapie ainsi que la présence d'autres symptômes tels qu'un choc avec ou sans hypovolémie, une hémorragie systémique à distance de la morsure, un défaut de

coagulation sanguine, une neurotoxicité, une hématurie, un risque élevé d'atteinte rénale aiguë, un œdème local majeur ou un risque élevé de nécrose tissulaire. Du fait de sa haute spécificité, le médicament ne sera efficace que chez les victimes d'une envenimation par une espèce ayant participé à la production de l'antivenin. De plus, le coût de ce traitement restant très élevé, ces traitements ne sont pas accessibles en quantité suffisante dans toutes les régions du globe. La prise en charge du patient ne se limite pas à l'utilisation ou non d'antivenin. D'autres traitements seront mis en place notamment symptomatiques et une surveillance hospitalière et biologique régulière est également recommandée.

Les toxines qui composent le venin de serpents sont donc responsables d'un vaste panel de symptômes et cela en relation avec leur mécanisme d'action. Nous allons maintenant décrire plus précisément ces protéines en nous focalisant sur les protéines enzymatiques et non enzymatiques qui interfèrent avec les processus d'hémostase et la coagulation particulièrement.

## **3.2 Protéines enzymatiques**

La plupart des venins de serpents contiennent des protéines enzymatiques et notamment des protéines protéolytiques comme les métalloprotéinases et sérine protéases. Ces enzymes sont capables de lyser des protéines et de libérer des acides aminés.

### *3.2.1 Métalloprotéinases (SVMP)*

Les Snake Venom Metalloproteases (SVMPs) sont un groupe de protéines enzymatiques qu'on retrouve principalement chez 2 sous-familles de serpents : les Viperidae et les Crotalinae. On peut également les retrouver dans le venin d'espèces appartenant aux familles des Elapidae, Atractaspididae et Colubridae mais à des concentrations beaucoup plus faibles. Ces protéases ont une activité dépendante d'ions zinc.

Leurs actions sont diverses pouvant aller de l'hémorragie à la nécrose tissulaire. Elles peuvent agir sur la dégradation du fibrinogène, l'inhibition de l'agrégation plaquettaire, l'activation de la prothrombine, l'inactivation des inhibiteurs de sérine-protéases et aussi sur l'apoptose cellulaire (5).

Initialement, ces protéases étaient réparties en 4 groupes selon la complexité de leur structure soit par rapport à la séquence nucléotidique (ARN/ADN) (N-classification) soit par rapport à la séquence protéidique et leur structure tertiaire (P-classification). L'ajout de nouvelles métalloprotéinases à cette classification peut être actuellement controversée du fait de l'importante influence de l'épigénétique sur ce type de protéine modifiant les rapports structure/fonction des toxines. On parle de problème de recombinaison de classes de SVMPs lorsque la structure n'est pas en adéquation avec la fonction

de la protéase (30). La classification a finalement été actualisée en 2008 par Fox et Serrano et comporte 3 grandes familles de métalloprotéinases selon le type de domaines qu'elles contiennent.

### **3.2.1.1 Classe 1 des SVMs : P-I**

Cette classe correspond à la structure la plus simple des SVMs : on retrouve seulement un domaine métalloprotéinase (M domaine).

Ce domaine métalloprotéinase correspond au domaine comportant l'activité catalytique zinc dépendante. Cette classe de protéase est responsable de l'hydrolyse des protéines de la membrane basale (laminine, collagène de type IV) sur laquelle repose les cellules endothéliales, et entraîne une extravasation sanguine pouvant dans les cas les plus graves évoluer vers l'hémorragie (31). Il faut s'avoir que l'activité hémorragique des protéines appartenant à cette classe peut être variable et serait due à leur structure intrinsèque. Toutes les métalloprotéinases ne sont donc pas forcément des hémorragines.

Concernant les saignements, leur effet est moins « toxique » que les classes P-II ou P-III du fait d'une localisation plus diffuse dans les tissus et moins concentrée dans les capillaires et artéριοles.

D'autres activités sont également en rapport avec ce domaine métalloprotéinase : dégradation du fibrinogène, apoptose...

### **3.2.1.2 Classe 2 des SVMs : P-II**

Concernant cette classe de SVMs, on retrouve en plus du domaine M commun avec la classe P-I, un domaine D correspondant à une désintégrine. Les SVMs P-II sont divisées en 5 sous-classes (P-IIa à P-IIe).

Les domaines désintégrines ont pour propriété de se fixer aux intégrines. Cette fixation est hautement spécifique et fonction de leur motif (enchaînement d'acides aminés capable d'interagir avec l'intégrine). Les SVMs P-II bloquent alors l'interaction des intégrines avec leur cible endogène. On trouve ainsi différents types d'activité selon le type de désintégrines.

Le domaine désintégrine peut conférer une activité supplémentaire d'inhibition de l'agrégation plaquettaire. Grâce à son motif RGD, tripeptide constitué d'arginine, de glycine et d'acide aspartique (ou autre motif proche), la protéine est capable de se fixer à des intégrines telles que la GpIIb/IIIa présente à la surface des plaquettes et nécessaire à l'interaction avec le fibrinogène pour former le caillot fibrino-plaquettaire.

Il est décrit également d'autres motifs qui peuvent interagir avec d'autres types d'intégrines. Le motif MGD bloque l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  endothéliale ayant un rôle dans l'angiogenèse physiologique et tumorale

(32). D'autres motifs peuvent limiter l'interaction inter-cellulaire et cellules-matrice extracellulaire perturbant l'équilibre et inhibant la migration de certaines cellules.

### **3.2.1.3 Classe 3 des SVMPS : P-III**

Cette classe de SVMPS comporte comme les 2 précédentes un domaine métalloprotéinase auquel s'ajoute un domaine D (desintégrine-like), et un domaine C (cystein-rich) qui potentialisent leur activité hémorragique. Certaines de ces SVMPS P-III comportent aussi un domaine C-type lectin-like.

Plusieurs activités ont été rattachées à ce domaine C : inhibition de l'agrégation plaquettaire, inhibition du facteur Willebrand, inflammation (migration des leucocytes, libération de peptides pro-inflammatoires...).

Les SVMPS P-III sont divisées en 4 sous-classes (P-IIIa à P-IIIId).

### **3.2.2 Serine protéinase (SVSP)**

Les serine protéinases sont retrouvées chez les serpents appartenant aux familles des Viperinae, Crotalinae, Elapidae, et Colubridae.

#### **3.2.2.1 Snake venom thrombin-like enzymes (SVTLEs)**

Ces protéines appartenant aux sérine protéinases possèdent des similitudes fonctionnelles avec la thrombine avec la présence de la même triade catalytique. Les SVTLEs ont une activité pro-coagulante *in vitro* en clivant le fibrinogène en fibrine. Les différences par rapport à la thrombine endogène sont leur absence d'inhibition par l'héparine et leur incapacité à activer le facteur XIII dont le rôle est de rendre insoluble le polymère de fibrine via des liaisons covalentes. On comprend alors qu'*in vivo*, les SVTLEs agissent comme des anticoagulants en épuisant le fibrinogène plasmatique et en formant des caillots solubles rapidement éliminés par la fibrinolyse après clivage par la plasmine (33). On peut citer pour exemple la batroxobine issu du venin de *Bothrops atrox*. Le mode d'action de cette dernière sera détaillé dans le chapitre 5.1.1.2 (page 89).

#### **3.2.2.2 Kallikrein-like enzymes**

Les kallikrein-like serine protéinases protéolysent le kininogène de haut poids moléculaire (KHPM) pour libérer la bradykinine qui augmente la perméabilité vasculaire. De plus, ces enzymes peuvent protéolyser l'angiotensine I limitant la formation d'angiotensine II, un puissant agent vasoconstricteur.

### **3.2.3 Phospholipase A2 (PLA2)**

La phospholipase A2 est une protéine enzymatique que l'on retrouve dans une majorité des venins de serpents (Viperidae, Elapidae, Hydrophidae).

Son mode d'action est l'hydrolyse des glycérophospholipides de membrane libérant un mélange d'acide arachidonique et de lysophospholipides. Cette activité est  $\text{Ca}^{2+}$  dépendante. Ces enzymes ont des effets divers dus à la multitude de sites fonctionnels interagissant avec plusieurs types de ligands. En libérant l'acide arachidonique, précurseur du thromboxane A2 qui est un activateur plaquettaire, la PLA2 engendre un climat proagrégant. L'enzyme est également capable de dégrader les phospholipides présents dans le complexe prothrombinase et d'entrer en compétition avec le facteur Va pour se lier au facteur X dans ce complexe (34) ce qui lui confère des propriétés anticoagulantes (35,36). De plus, l'hydrolyse des phospholipides membranaires est responsable de changement de la perméabilité cellulaire.

Ces enzymes auraient également d'autres effets tels que l'inflammation, une toxicité musculaire, une neurotoxicité et hypotension consécutive à la vasodilatation.

#### 3.2.4 *L-amino-acid-oxydase (LAAO)*

Cette enzyme est majoritairement retrouvée dans les venins des serpents de la famille des Crotalidae. On la retrouve aussi chez les Viperidae ou les Elapidae.

Les LAAO sont des flavoenzymes (classe des oxydoréductases) qui catalysent la désamination oxydative stéréospécifique des acides L-aminés. Ces réactions produisent du peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), une espèce réactive de l'oxygène hautement toxique, qui explique les effets de ces enzymes. Ces protéases ont pour cofacteurs le FAD (Flavin Adenine Dinucleotide) ou la FMN (Flavin Mononucleotide) qui sont tous deux composés d'un pigment, la riboflavine, donnant une couleur jaune aux venins riches en ces protéines (37).

Ce groupe d'enzymes a plusieurs rôles. Elles sont responsables d'hémorragies via la dégradation des protéines de la matrice extracellulaire de l'endothélium vasculaire. On retrouve aussi des effets anticoagulants avec la M-LAO (LAAO du venin d'*Agkistrodon halys blomhoffii*) capable d'inhiber l'activité du facteur IX (38), et des effets anti et pro-agrégants plaquettaires qui sont controversés. La production de peroxyde d'hydrogène par les LAAO de certains serpents pourrait être responsable d'interférences entre les récepteurs plaquettaires (GPIIb/IIIa) et le fibrinogène, impactant le mécanisme d'agrégation plaquettaire (39) tandis que les LAAO d'autres serpents sont capables d'induire une agrégation plaquettaire (40,41). De plus, les LAAO sont capables d'induire l'apoptose de diverses lignées cellulaires grâce à la production de peroxyde d'hydrogène, ce qui explique leurs activités apoptotiques, antimicrobiennes et anti-cancéreuses qui font de ces LAAO de sérieux candidats pour de nouvelles biothérapies dans ces domaines.

### 3.2.5 *Autres enzymes*

D'autres protéines enzymatiques sont également retrouvées dans les venins de serpents, n'ayant pas d'activité sur l'hémostase.

#### 3.2.5.1 *Hyaluronidase*

Les Hyaluronidases sont des protéines enzymatiques retrouvées dans les venins de serpent dont l'activité principale n'est pas en rapport direct avec l'hémostase. Ces protéines sont produites par les serpents appartenant aux familles des Elapidae, Viperidae, et Crotalidae. Ces enzymes sont responsables des effets locaux des morsures avec une nécrose tissulaire. Les hyaluronidases sont essentielles car c'est grâce à elles que les autres toxines vont pouvoir maximiser leur effet. Ces enzymes ont la capacité de lyser les tissus et détruire les cellules facilitant alors la diffusion des autres protéines sur leur lieu d'action.

#### 3.2.5.2 *Acétylcholine estérase*

Cette enzyme est présente dans les venins des serpents appartenant à la famille des Elapidae.

On la retrouve de manière physiologique au niveau de la jonction neuromusculaire des vertébrés. Son rôle consiste en la dégradation du neurotransmetteur acétylcholine libéré par l'axone neuronal. L'acétylcholine est hydrolysée en choline et acide acétique ce qui limite l'action du neurotransmetteur sur ses récepteurs post-synaptiques et la transmission cholinergique.

## 3.3 **Protéines non enzymatiques**

Les venins de serpent sont également composés de protéines non enzymatiques. Ces protéines ciblent majoritairement des canaux ioniques ou des récepteurs membranaires dont les principaux effets sont une neurotoxicité et une cardiotoxicité mais certaines sont capables d'activer ou d'inhiber les plaquettes.

### 3.3.1 *Lectines de type C*

Les lectines de type C sont des protéines non enzymatiques,  $Ca^{2+}$  dépendantes capables de fixer des résidus glucidiques. Il s'agit d'un groupe de protéines assez complexe, avec une grande polyvalence dans leurs fonctions [Tableau 11]. En effet, ces protéines ont plusieurs cibles telles que des récepteurs membranaires ou d'autres protéines essentielles à l'hémostase (42). On retrouve notamment de nombreux récepteurs plaquettaires identifiés comme ligand. Par conséquent, elles ont un effet sur l'hémostase et leurs activités ont permis de mieux appréhender les mécanismes impliqués dans la coagulation sanguine et l'activation des plaquettes en analysant les voies de signalisation.

Une majorité des protéines de cette famille sont capables de se lier à la glycoprotéine plaquettaire GPIb (plus ou moins via une interaction avec le facteur Willebrand) et peuvent soit inhiber les fonctions plaquettares, soit au contraire les activer via ce même récepteur. D'autres lectines de type C peuvent également activer les plaquettes via la glycoprotéine GPVI, ou l'intégrine  $\alpha 2\beta 1$  (43).

Enfin, on retrouve des lectines de type C capables de dégrader les facteurs de la coagulation soit en se fixant au facteur IX seul soit en se fixant à la fois aux facteurs IX et X de la coagulation : elles sont appelées protéines de liaison au facteur IX (IX-BP) et aux facteurs IX/X (IX/X-BP). Pour ces dernières, des études ont montré leur capacité à bloquer l'interaction entre le facteur X activé et son cofacteur dans le complexe de la prothrombinase (44).

FONCTION	LECTINES DE TYPE C	LIGAND OU SUBSTRAT
<b>Anticoagulant</b>	IX/X-bp, IX-bp	Facteur IX
	IX/X-bp, X-bp	Facteur X
	Bothrojaracine	$\alpha$ -Thrombine
<b>Agoniste plaquettaire</b>	Botrocétine, bitiscétine	vWF
	Aloboaggégine-B	GPIba
	Agglucétine	GPIba
	Echicétine	GPIba
	Aggégine	GPIa/IIa
	Convulxine	GPVI
<b>Antagoniste plaquettaire</b>	Flavocétine-A (FL-A)	GPIba
	EMS 16	GPIa/IIa
	Rhodocétine	GPIa/IIa

Tableau 11 : Lectines de type C et fonctions (d'après Morita et al (45) et d'après Arlinghaus et al (42))

### 3.3.2 Désintégrines

Les désintégrines sont un groupe de protéines non enzymatiques des venins de serpent. Elles sont riches en cystéines et de taille plutôt petite (4-15kDa). Elles présentent des motifs désintégrines le plus souvent RGD mais aussi MLD, MVD, RTS, KTS ou KDG. La majorité de ces protéines constituent le domaine C-terminal des métalloprotéases de la classe PII et sont libérées dans le venin par clivage protéolytique (46). Ces protéines sont des inhibiteurs des récepteurs de type intégrine, qui jouent un

rôle fondamental à la fois dans des processus physiologiques tel que l'hémostase et pathologiques tel que le cancer.

Les désintégrines isolées de différentes espèces de serpents ont la capacité d'inhiber des processus biologiques comme par exemple l'activation des plaquettes, l'adhésion, la migration cellulaire et la survie cellulaire (47). Ces protéines peuvent en effet être des inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire via l'inhibition de la liaison du fibrinogène à l'intégrine GPIIb/IIIa. Elles s'opposent ainsi à la formation du clou plaquettaire en inhibant l'agrégation plaquettaire.

Elles sont classées selon leur séquence consensus d'adhésion se fixant aux intégrines et présent dans une position bien conservée [Tableau 12].

<b>Motif RGD</b> <b>(Arg Gly Asp)</b>	Trigramine ( <i>Trimeresurus gramineus</i> )
	Echistatine ( <i>Echis carinatus</i> )
	Kistrine
	Albolabrine
	Favoridine
	Salmosine
	Rhodostomine
<b>Motif MLD</b> <b>(Met Leu Asp)</b>	Obtustatine
	EMS11
<b>Motif MVD</b> <b>(Met Val Asp)</b>	Atrollysine
<b>motif RTS ou KTS</b> <b>(Arg Thr Ser ou Lys Thr Ser)</b>	Obtustatine
	Vipéristatine
	Lebestatine
<b>motif KGD</b> <b>(Lys Gly Asp)</b>	Barbourine ( <i>Sistrurus miliarius barbourin</i> )
	Ussuristatine
	Salmosine

Tableau 12 : Classification des désintégrines selon leur motif

### 3.3.3 *Three finger toxine (TFT)*

Les toxines à 3 doigts sont des protéines non enzymatiques majoritairement retrouvées dans les venins d'Elapidae. L'appellation de cette protéine dérive de sa structure moléculaire qui prend l'apparence de 3 doigts de la main : on retrouve 3 feuilletts  $\beta$  en forme de boucle dépassant du noyau central et stabilisés par quatre liaisons disulfure. Le premier TFT a été découvert il y a plus de 50 ans, il s'agit de l' $\alpha$ -bungarotoxine. L'activité biologique de ces protéines est très diverse et varie fortement de l'interaction hautement spécifique avec certains récepteurs ( $\alpha$ -neurotoxines) à la lyse cellulaire non spécifique (cytotoxines) (48). Ces molécules possèdent en effet une action au niveau des récepteurs muscarinique et nicotinique à l'acétylcholine des cellules musculaires lisses dont elles sont antagonistes.

Ces protéines vont également bloquer les canaux calciques  $Ca^{2+}$  de type L entraînant un défaut de vasoconstriction.

Elles peuvent aussi altérer les fonctions de l'hémostase bien qu'elles soient moins nombreuses à avoir de telles propriétés. La toxine *KT-6.9* a montré in vitro une activité inhibitrice de l'agrégation plaquettaire induite par l'adénosine diphosphate (ADP), la thrombine et l'acide arachidonique mais pas par le collagène et la ristocétine (49). On peut citer également la ringhalexine (50) et l'exactine (51) qui sont capables de bloquer le complexe ténase en inhibant le facteur X (48).

### 3.3.4 *Inhibiteurs de protéase*

Les inhibiteurs de protéases (IP) sont des protéines capables d'inhiber l'activité catalytique d'autres enzymes protéolytiques. On les retrouve chez différentes espèces venimeuses et notamment dans les venins de serpents [Tableau 13]. Les IP peuvent être classés en fonction des protéases qu'ils inhibent, on regroupe ainsi des inhibiteurs de protéases à sérine, à cystéine, à acide aspartique et à d'autres métalloprotéases (52).

Les inhibiteurs de protéases à sérine constituent la superfamille d'IP la plus largement distribuée au sein de laquelle les inhibiteurs de protéase de type Kunitz sont les mieux caractérisés (53). Ces protéines inhibent spécifiquement l'activité protéolytique de la trypsine ou de la chymotrypsine. Ces inhibiteurs de protéases de type Kunitz sont en particulier retrouvés dans les venins de serpents Elapidae et Viperidae. L'inhibiteur bovin de la trypsine pancréatique (BPTI) est considéré comme la protéine de référence de la famille des inhibiteurs des sérines protéases. Ces inhibiteurs de type Kunitz ont différentes actions : ils peuvent agir comme des neurotoxines ou des inhibiteurs de certains facteurs de la coagulation et de la fibrinolyse (plasmine). Certains de ces inhibiteurs possèdent en effet une forte activité anti-fibrinolytique. C'est le cas par exemple de la Textilinine-1, isolée du venin du serpent *Pseudonaja textilis*, qui peut inhiber la plasmine humaine.

En plus de l'activité inhibitrice des protéases, ces protéines ont parfois une activité antagoniste des canaux ioniques (potassiques principalement et parfois calciques). Pour cela, elles possèdent un site effecteur différent de celui qui interagit avec les protéases. Parmi les inhibiteurs des canaux ioniques, on retrouve les dendrotoxines, des inhibiteurs de protéases neurotoxiques.

<b>ESPECE</b>	<b>TOXINE</b>	<b>PROTÉASE INHIBÉE</b>
<i>Dendroaspis polylepis polylepis</i>	<b>Dendrotoxin E</b>	Trypsine *, Chymotrypsine
<i>Daboia siamensis</i>	<b>BBPTI-1</b>	Chymotrypsine
	<b>CBPTI-1</b>	Trypsine
	<b>CBPTI-2</b>	Trypsine
	<b>CBPTI-3</b>	Chymotrypsine
<i>Hemachatus haemachatus</i>	<b>HHV inhibitor II</b>	Trypsine, chymotrypsine, kallikréine, plasmine
<i>Naja nivea</i>	<b>NNV inhibitor II</b>	Trypsine
<i>Vipera ammodytes</i>	<b>Trypsin inhibitor I</b>	Trypsine *, chymotrypsine, kallikréine, plasmine
	<b>Trypsin inhibitor II</b>	Trypsine *, chymotrypsine, kallikréine, plasmine
	<b>Chymotrypsine inhibitor</b>	Chymotrypsine *, trypsin, plasma kallikréine
<i>Bungarus fasciatus</i>	<b>BF9</b>	Chymotrypsine
	<b>Bungaruskunin</b>	Chymotrypsine *, trypsin, elastase
<i>Naja naja</i>	<b>Trypsin inhibitor</b>	Trypsine
<i>Naja atra</i>	<b>NACI</b>	Chymotrypsine
<i>Ophiophagus hannah</i>	<b>Oh11-1</b>	Chymotrypsine
	<b>OH-TCI</b>	Chymotrypsine *, Trypsine
<i>Bungarus multicinctus</i>	<b>PILP-1</b>	Trypsine
<i>Oxyuranus scutellatus scutellatus</i>	<b>TSPI</b>	Kallikréine *, trypsin, plasmine, elastase, factor Xa, $\alpha$ -factor XIIIa
<i>Pseudonaja textilis textilis</i>	<b>Textilinin-1</b>	Plasmine *, Trypsine
	<b>Textilinin-2</b>	Plasmine
<i>Macrovipera lebetina transmediterranea</i>	<b>PIVL</b>	Trypsine
<i>Pseudechis australis</i>	<b>Pr-mulgin 1</b>	Metalloprotease 2

	<b>Pr-mulgin 2</b>	Trypsine *, Chymotrypsine, Plasmine
	<b>Pr-mulgin 3</b>	Trypsine, Plasmine

\* Protéase contre laquelle l'inhibiteur a montré une activité plus puissante.

Tableau 13 : Inhibiteurs de protéases de venins de serpents (d'après Mourão et al (53))

### 3.3.5 Autres protéines sans effet sur l'hémostase

#### 3.3.5.1 Cysteine-rich secretory proteins (CRISPs)

Ces protéines non enzymatiques appartiennent à la superfamille des CAP protéines. On les retrouve dans les venins de serpents colubridés, élapidés et vipéridés. Ces protéines sont appelées cystein-rich secretory proteins de par leur structure : elles sont constituées de plus de 200 acides aminés, et présentent à leur extrémité C-terminale un motif caractéristique constitué de 10 résidus cystéine (54). Ces protéines agissent sur les canaux ioniques, elles sont notamment capables de bloquer les canaux calciques de type L des cellules musculaires lisses. Une réduction des contractions du muscle lisse artériel consécutive à la dépolarisation induite par le K<sup>+</sup> est alors observée (55,56). Parmi ces protéines, on retrouve la pseudechetoquine ainsi que l'ablomine, la catrine, la latisemine, l'ophanine, la piscivorine et la trifline.

#### 3.3.5.2 Peptide natriurétique

De nombreux peptides natriurétiques jouant sur le système cardiovasculaire ont également pu être identifiés dans les venins de serpent. Ces peptides ont une structure proche de celle de l'ANP (Atrial Natriuretic Peptide) ou BNP (Brain Natriuretic Peptide). Ils stimulent les canaux potassiques membranaires augmentant l'expulsion de K<sup>+</sup> par la cellule, ce qui entraîne la libération de NO dont l'une des actions consiste en la vasorelaxation des cellules musculaires lisses.

#### 3.3.5.3 Bradykinine Potentiating Peptides (BPPs)

On trouve aussi dans certains venins des Bradykinine Potentiating Peptides (BPPs) ou Bradykinine potentiating Factors (BPFs). Ce sont des inhibiteurs du domaine C de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE). Via cette inhibition enzymatique, ils empêchent la formation d'angiotensine II à partir de l'angiotensine I. Ainsi, en inhibant la formation d'angiotensine II qui est un puissant agent vasoconstricteur, les BPPs limitent la vasoconstriction artérielle. De plus, ces peptides bloquent la dégradation de la bradykinine endogène.

### 3.3.5.4 Défensines

Les défensines sont des peptides de défense de l'hôte et ont des activités à la fois antimicrobienne et immunitaire. Ces protéines sont principalement retrouvées dans le venin des Viperidae et ont une activité inhibitrice des canaux sodiques et potassiques présents sur les membranes plasmiques. Elles agissent notamment sur les cellules musculaires (le sarcolemme). Elles ont des effets analgésiques, neurotoxiques, myotoxiques et cytotoxiques. Une de leur spécificité est leur accumulation dans les lysosomes, provoquant une cytotoxicité. Toutefois, les défensines sont assez rarement retrouvés dans les venins, en moyenne elles représentent 1% des protéines du venin même si on les retrouve en proportion plus élevée dans certains venins (57).

En résumé, les protéines contenues dans les venins de serpents ont des activités multiples [Tableau 14] notamment sur les mécanismes de l'hémostase [Figure 16, Figure 17 et Figure 18]. Nous verrons que ces propriétés peuvent être mises à profit dans différents secteurs que ce soit médical, pharmaceutique ou biologique.

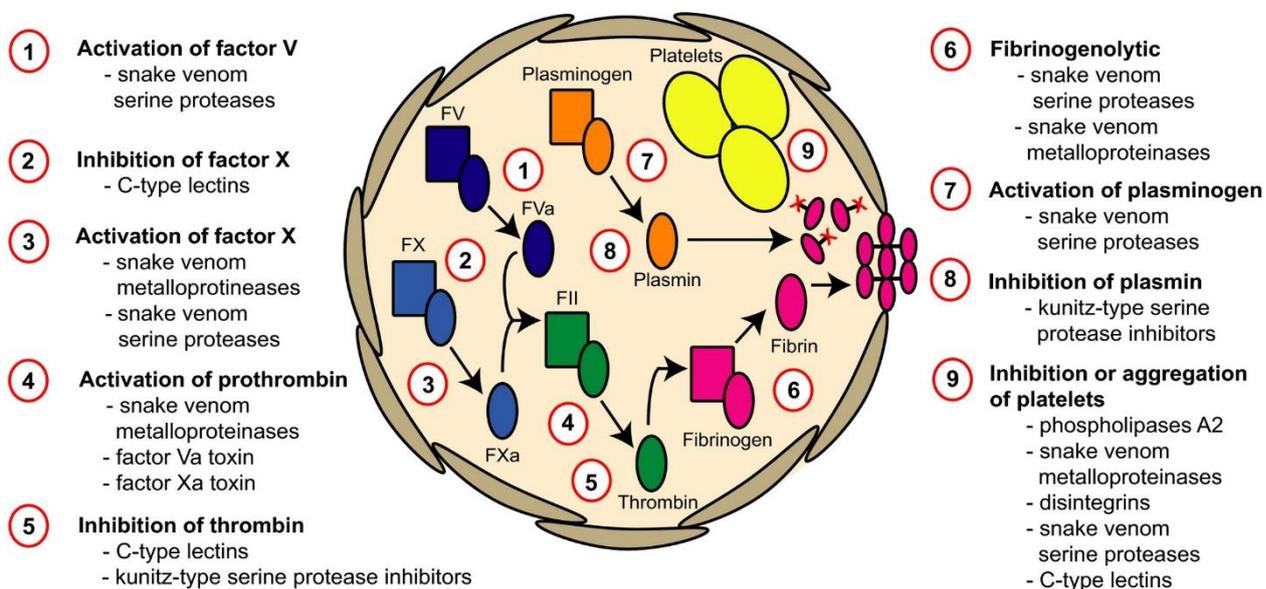


Figure 16 : Mode d'action des différentes protéines ophidiennes sur l'hémostase (d'après Slagboom et al (58))

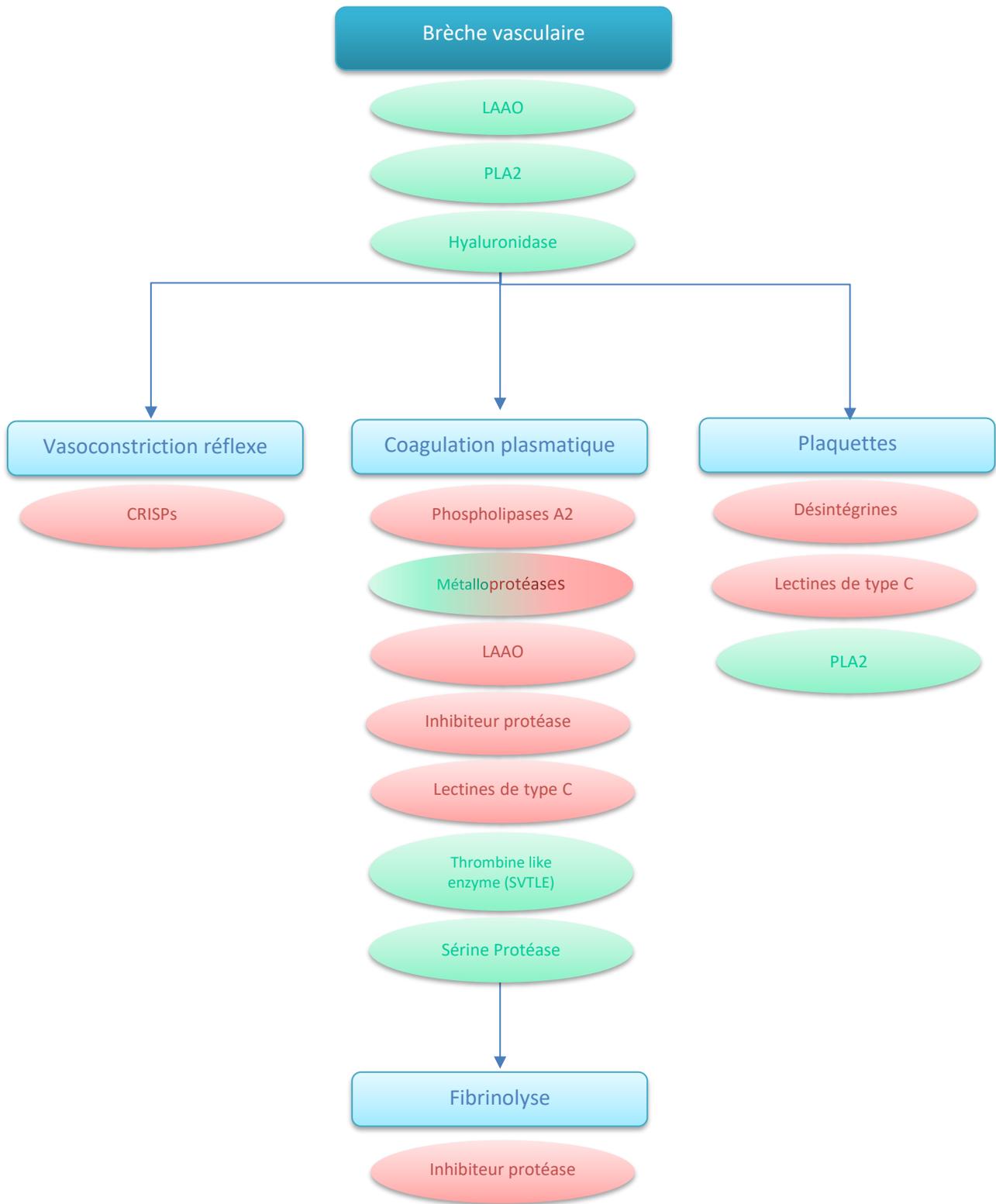


Figure 17 : Effets des différentes protéines de venins de serpents sur l'hémostase

Légende



	Famille de toxines	Famille de serpents	Principales cibles biologiques	Principales activités physiopathologiques
<b>Protéines enzymatiques</b>	<b>SVMP</b>	<i>Elapidae</i> (SVMPs P-III)  <i>Viperidae</i> (SVMPs P-I, P-II et P-III)	Grande variété de cibles (collagène IV et facteurs de coagulation)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Activité hémorragique</b> prédominante (activation de facteurs de la coagulation)</li> <li>- <b>Dégradation protéolytique du fibrinogène et de la fibrine</b></li> <li>- Apoptose cellulaire</li> <li>- <b>Inhibition de l'agrégation plaquettaire</b></li> </ul>
	<b>SVSP</b>	<i>Elapidae</i>  <i>Viperidae</i>	Facteurs de la coagulation (principalement)	<p>Déséquilibre le système hémostatique.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>SVTLEs</b></li> <li>- Activité <b>pro-coagulante</b> in vitro en clivant le fibrinogène en fibrine</li> <li>- Activité <b>anticoagulante</b> in vivo en épuisant le fibrinogène plasmatique et en formant des caillots solubles rapidement éliminés par la fibrinolyse</li> <li>• <b>Kallikrein-like enzyme</b></li> <li>- Protéolyse du KHPM et libération de bradykinine (↑ perméabilité vasculaire)</li> <li>- Inhibition de l'angiotensine I (vasodilatation)</li> </ul>
	<b>PLA2</b>	<i>Elapidae</i>  <i>Viperidae</i>	Membrane plasmique des myocytes et de la membrane axonale.  (Hydrolyse des glycérophospholipides de membrane relarguant un mélange d'acide arachidonique et de lysophospholipides)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Activité proagrégante</b> : libération d'acide arachidonique, précurseur du thromboxane A2 (activateur plaquettaire)</li> <li>- <b>Activité anticoagulante</b> : Hydrolyse des phospholipides du complexe prothrombinase et liaison au facteur X</li> <li>- <b>Activité pro-inflammatoire</b> : œdème, afflux de leucocytes dans les tissus,</li> <li>- <b>Toxicité musculaire</b> (nécrose aiguë des muscles squelettiques),</li> <li>- <b>Neurotoxicité</b> (paralysie flasque)</li> <li>- <b>Hypotension</b></li> </ul>
	<b>LAO</b>	<i>Elapidae</i>  <i>Viperidae</i>	Acides aminés L : désamination oxydative stéréospécifique des acides L-aminés	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Effets hémorragiques</b> (dégradation des protéines de la matrice extracellulaire et de l'endothélium)</li> <li>- <b>Effets anticoagulants</b> (M-LAO inhibiteur du facteur IX)</li> <li>- <b>Effets anti ou pro-agrégant plaquettaires</b>,</li> <li>- Apoptose, oedème</li> </ul>

<b>Protéines non enzymatiques</b>	<b>Lectine de type C</b>	<i>Viperidae</i>	Récepteurs plaquettaires (Gplb, Gpla/Ila, GPVI) et cellulaires (agoniste ou antagonistes)  Facteurs de coagulation, FIX et FX et FIIa) (inhibition)	- Hémagglutination, - <b>Inhibition ou activation de l'agrégation plaquettaire</b> - Oedème, ↑ perméabilité vasculaire, hypotension, - Cytotoxicité - Modulation de la libération de Ca <sup>2+</sup> par le réticulum sarcoplasmique des muscles squelettiques.
	<b>Désintégrines</b>	<i>Viperidae</i>	Récepteurs de type intégrine (inhibition)	- <b>Inhibition de l'agrégation plaquettaire</b> (anti-GPIIb/IIIa) - <b>Inhibition de l'adhésion cellule-cellule et l'adhésion cellule-matrice,</b> - <b>Inhibition de l'angiogenèse</b>
	<b>3FTx</b>	<i>Elapidae</i>	Récepteurs nicotiniques et muscariniques de l'acétylcholine (antagonisme d'action), acétylcholinestérase et cardiomyocytes (blocage des canaux calciques Ca <sup>2+</sup> de type L)	- <b>Neurotoxicité</b> (paralysie, fasciculations musculaires) - <b>Cardiotoxicité</b> : arrêt cardiaque par lyse des cardiomyocytes - <b>Toxine KT-6.9 : inhibiteur de l'agrégation plaquettaire</b> - <b>Ringhalexine et exactine : blocage du complexe ténase</b>
	<b>CRiSP</b>	<i>Elapidae</i> <i>Viperidae</i>	Canaux Ca <sup>2+</sup> de type L, canaux K <sup>+</sup> et cascades de signalisation impliquées dans l'adhésion cellulaire	- <b>Inhibition de l'angiogenèse,</b> - <b>Réduction des contractions du muscle lisse artériel</b> - ↑ perméabilité vasculaire - Inflammation (infiltration de leucocytes et de neutrophiles)
	<b>Peptides natriurétiques</b>	<i>Elapidae</i> <i>Viperidae</i>	Récepteurs des peptides natriurétiques A, B and C	- <b>Effets hypotenseurs</b> puissants (relaxation vasculaire et diminution de la contractilité du myocarde via la libération de NO)

Tableau 14 : Résumé des principales activités des protéines ophidiennes

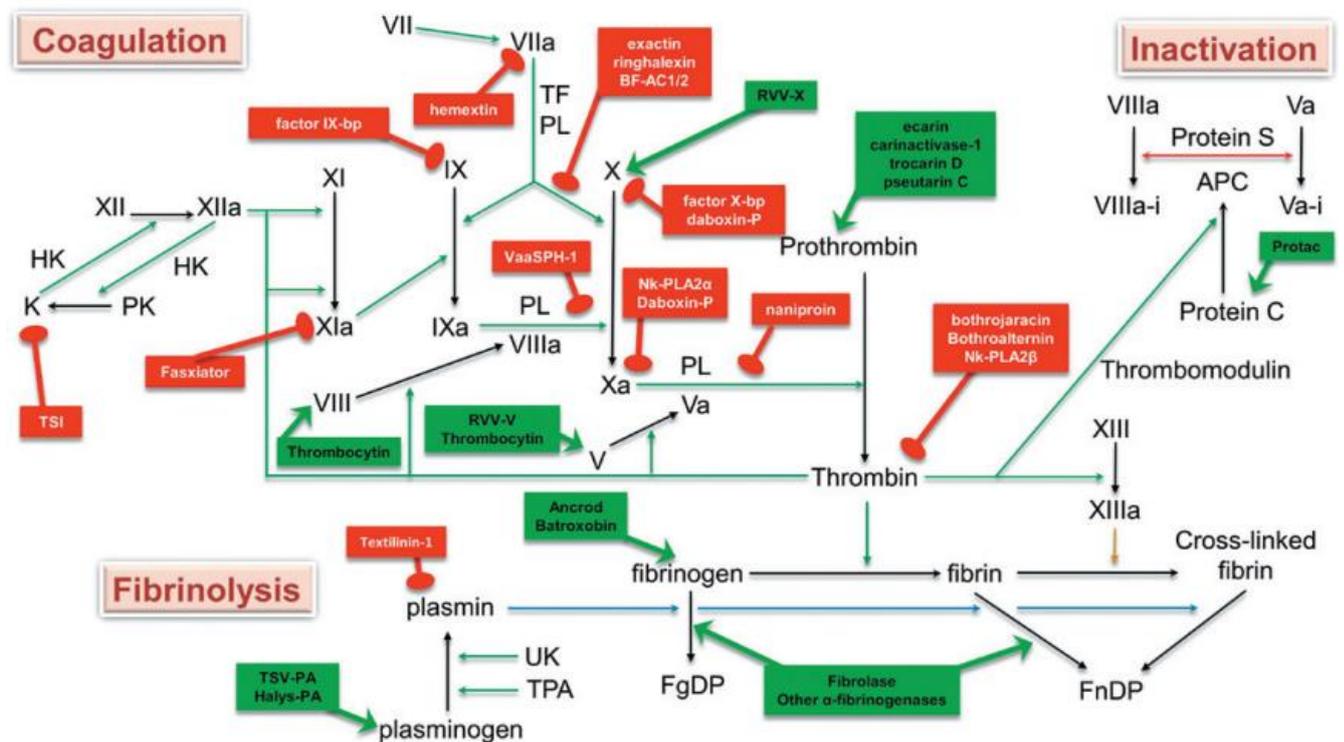
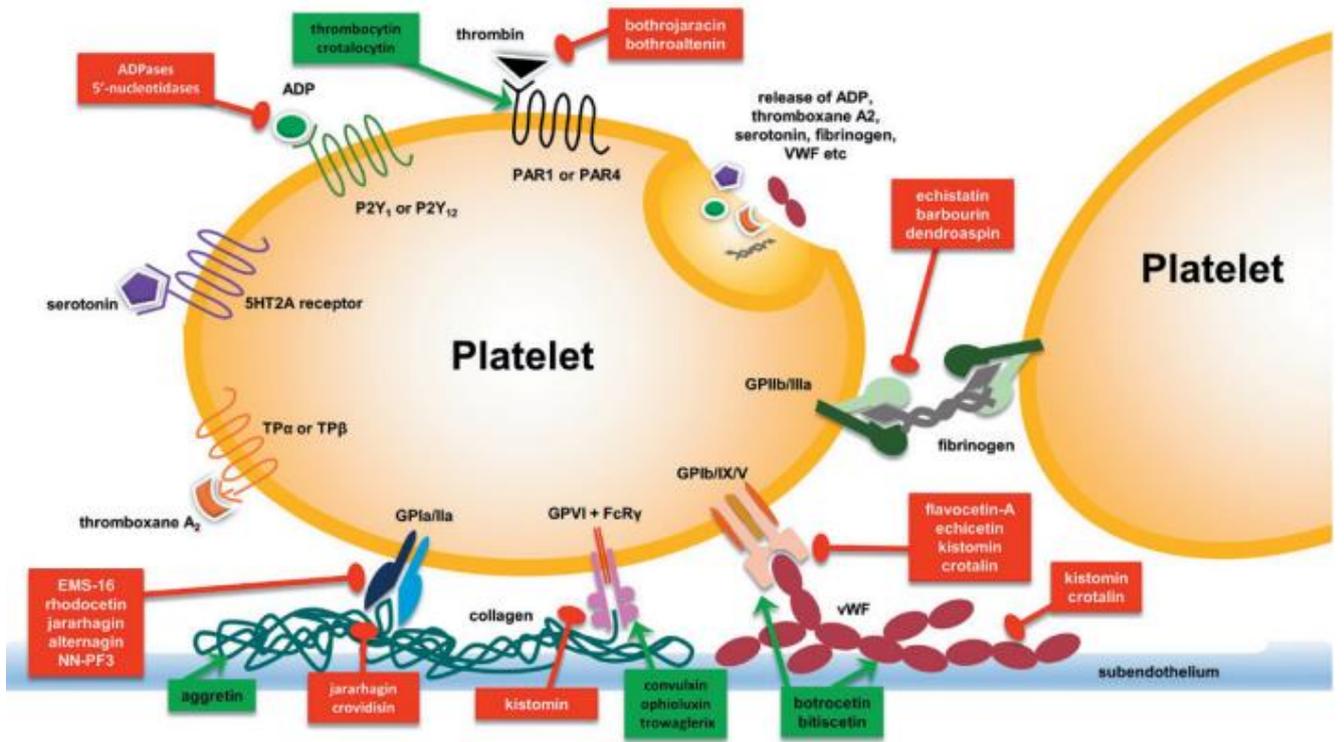


Figure 18 : Actions des toxines de venins de serpents sur l'agrégation plaquettaire et la coagulation (d'après Koh et al (59,60))

### 3.4 Répartition des protéines dans les venins de serpents

Les serpents venimeux appartiennent majoritairement aux familles des Elapidae et des Viperidae. Si on considère ces 2 familles, on se rend bien compte de la grande variabilité des protéines et toxines qui composent leur venin ce qui peut expliquer la différence des symptômes associés à leur envenimation [Figure 19 et Figure 20].

Les venins d'élapidés sont principalement composés par des protéines appartenant aux familles des phospholipases A2 (PLA2s), et des three-fingers toxines (3FTx). Ces 2 familles de protéines semblent complémentaires et représentent en moyenne >80% du protéome total du venin chez la plupart des espèces d'Elapidae. Ensuite, les familles protéiques les plus représentées sont les métalloprotéinases (SVMP), les sérine protéases (SVSP), les L-aminoacides oxydases (LAAO) et les peptides de type Kunitz. Ces peptides de type Kunitz sont d'ailleurs particulièrement répandus chez les mambas comme le mamba vert de l'Est *Dendroaspis angusticeps* ou le mamba noir qui tous deux ne synthétisent pas de PLA2 dans leur venin ce qui en fait une exception chez les Elapidae.

En revanche, dans les venins de vipéridés, on retrouve majoritairement des protéines de la famille des PLA2, des SVMP et des SVSP. Ces 3 familles représentent en moyenne près des 2/3 du protéome total du venin. D'autres toxines composent également le venin des Viperidae mais sont retrouvées en plus faibles proportions telles que les LAAOs, les lectines de type C, les protéines lectine-like de type C, et les peptides natriurétiques.

On remarque ainsi que les PLA2 sont des enzymes majoritaires dans les deux familles de serpents venimeux. Toutefois, leurs actions sont différentes avec une activité myotoxique des PLA2 des Viperidae et une activité neurotoxique des PLA2 des Elapidae.

La différence dans la composition chimique du venin des Elapidae et des Viperidae entraîne des manifestations cliniques distinctes. L'envenimation par les serpents Elapidae induit principalement des manifestations neurotoxiques, cytotoxiques et cardiotoxiques, alors que l'envenimation par les vipères induit typiquement une myotoxicité et une hémotoxicité (29).

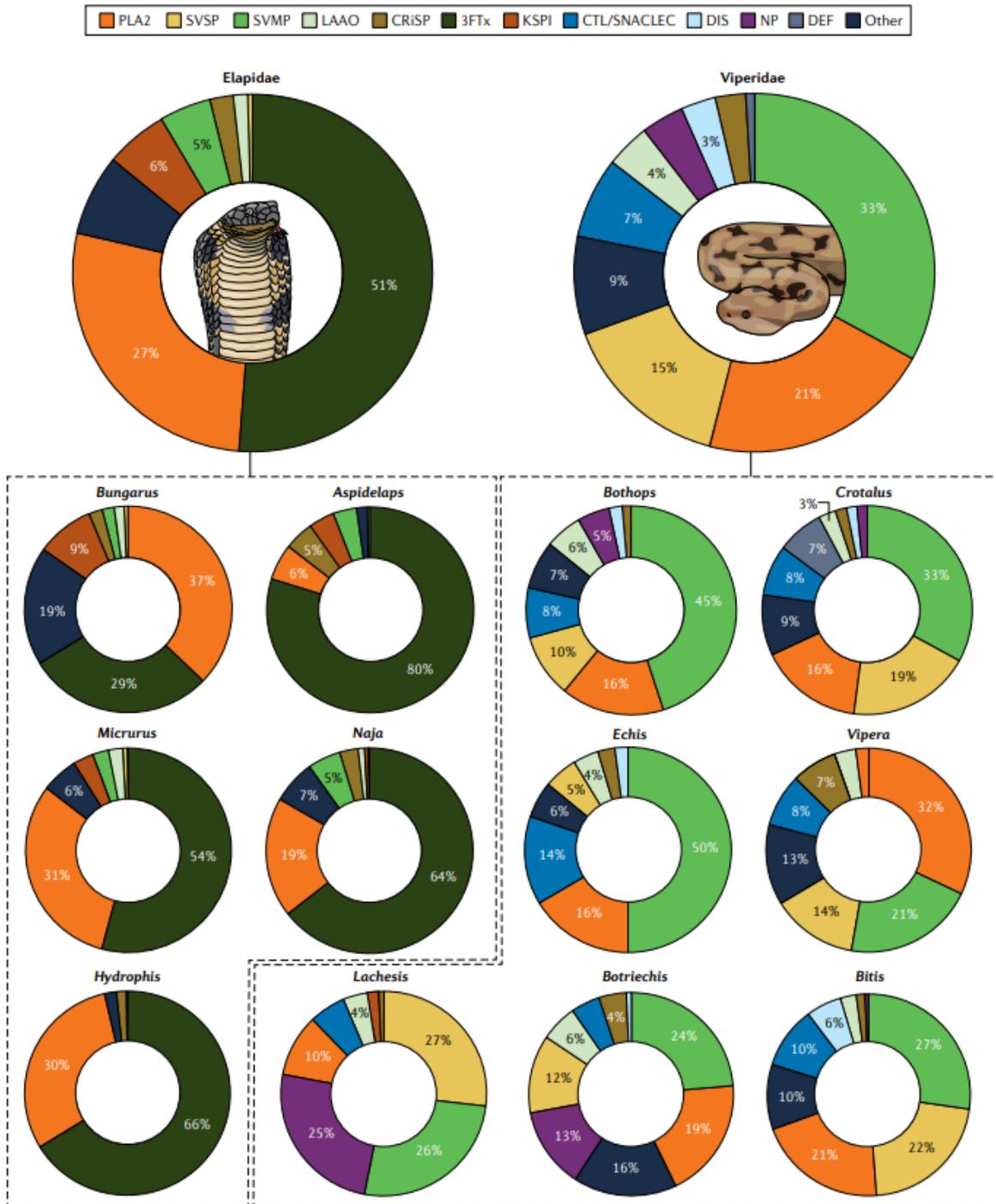


Figure 19 : Répartition des classes de protéines entre les différents venins de serpents Elapidae et Viperidae (d'après Oliveira et al (57))

3FTx, toxine à trois doigts ; CRISP, protéine sécrétoire riche en cystéine ; CTL/SNACLEC, lectine de type C et protéine semblable à la lectine de type C ; DEF, défensine ; DIS, désintégrine ; KSPI, inhibiteur de la sérine protéase de type Kunitz ; LAAO, L-aminoacide oxydase ; NP, peptide natriurétique ; PLA2, phospholipase A2 ; SVMP, métalloprotéinase du venin de serpent ; SVSP, sérine protéase du venin de serpent.

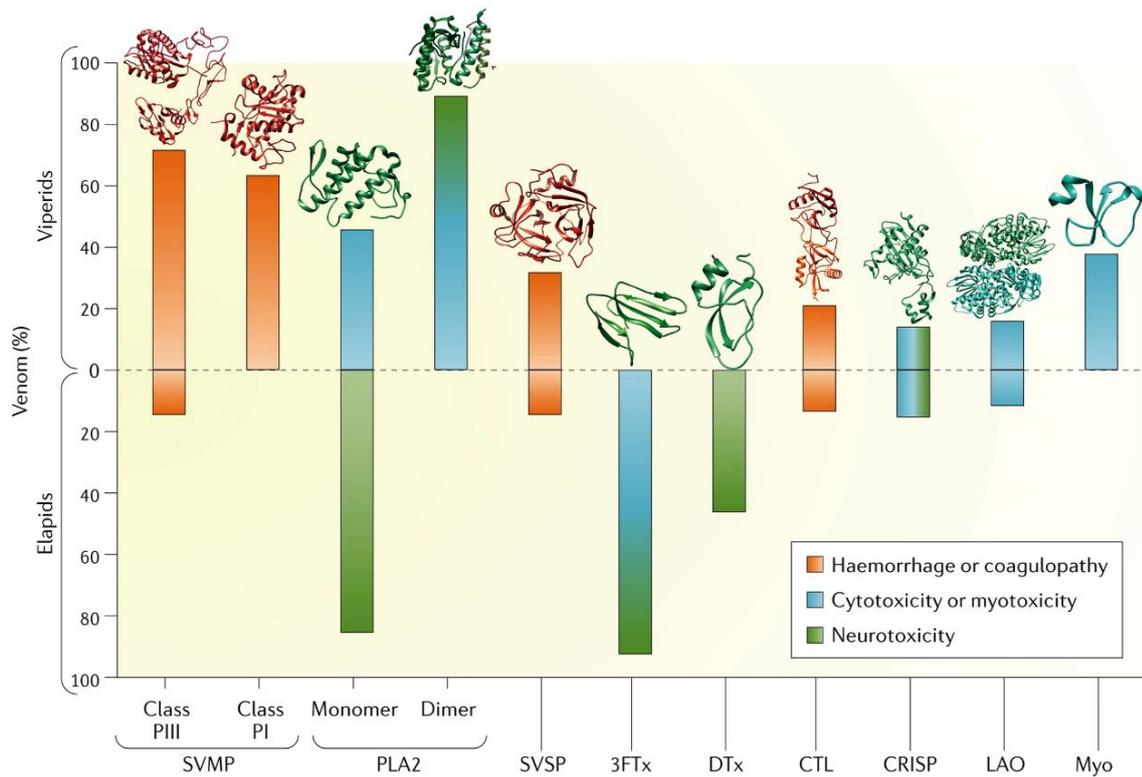


Figure 20 : Distribution des familles de toxines les plus abondantes dans différents venins d'espèces de serpents des familles Viperidae (sous-familles Viperinae et Crotalinae) et Elapidae (sous-familles Elapinae et Hydrophiinae) (d'après Gutiérrez et al (29))

3FTx, toxine à trois doigts ; CRISP, protéine sécrétoire riche en cystéine ; CTL/SNACLEC, lectine de type C et protéine semblable à la lectine de type C ; DEF, défensine ; DIS, désintégrine ; KSPI, inhibiteur de la sérine protéase de type Kunitz ; LAAO, L-aminoacide oxydase ; NP, peptide natriurétique ; PLA2, phospholipase A2 ; SVMP, métalloprotéinase du venin de serpent ; SVSP, sérine protéase du venin de serpent.

## 4. Intérêt thérapeutique : développement de nouveaux médicaments dérivés des venins de serpent

De l'observation des différents effets des protéines des venins de serpents sur les humains est née l'idée de les détourner pour les utiliser comme remèdes dans diverses pathologies. Les composants toxiques des venins de serpents ont des activités biologiques multiples dont l'étude permet de comprendre les envenimations mais aussi de développer de nouveaux candidats médicamenteux pour traiter plusieurs maladies.

### **4.1 Médicaments de l'hémostase**

La description des effets du venin de vipère sur la coagulation par Fontana à la fin du XVIII<sup>e</sup> siècle a entraîné l'extension de l'utilisation des venins à but thérapeutique notamment pour traiter les hémorragies spontanées ou accidentelles. Le recours aux venins d'*Agkistrodon*, de *Notechis*, de *Cerastes*, de *Naja* et de *Bothrops* sous forme plus ou moins diluée s'est répandu (24).

A ce jour, les développements biologiques et technologiques ont permis d'identifier et de purifier les molécules d'intérêt des venins de serpent ayant un effet sur l'hémostase afin de produire des médicaments avec une meilleure efficacité et sécurité. Les propriétés des venins ophidiens ont permis de développer des médicaments agissant sur l'hémostase et la coagulation [Tableau 15]. Parmi ces médicaments, certains sont toujours commercialisés, d'autres ont été retirés du marché et d'autres encore sont en cours de développement.

#### *4.1.1 Antiagrégants plaquettaires*

Plusieurs antiagrégants plaquettaires ont été modélisés et développés à partir de protéines de venins [Figure 26].

##### **4.1.1.1 Tirofiban (Agrastat®)**

Le tirofiban est un médicament dérivant de la structure de la protéine de venin de serpent appelée *Echistatine*. Cette protéine est une désintégrine à motif RGD (61) purifiée à partir du venin d'*Echis carinatus*. L'échistatine est la désintégrine la plus largement caractérisée, elle se compose de 49 acides aminés et possède un motif RGD conservé et une longue extrémité C-terminale.

Des études portées sur l'échistatine ont permis de localiser le motif RGD au niveau d'une boucle spécifique (62). L'extrémité C-terminale agirait en synergie avec cette boucle de liaison aux intégrines pour conférer à l'échistatine une meilleure affinité pour les récepteurs des intégrines (63).

Le développement du tirofiban à partir de l'échistatine s'est basé sur le motif RGD des chaînes latérales de l'échistatine et l'optimisation structurelle des extrémités N et C-terminale. Un pharmacophore

possédant une conformation spatiale comparable et des groupements de même classe chimique a été recherché (54)[Figure 21]. L'idée a été d'identifier des composés dans lesquels les groupes fonctionnels interagissent de manière similaires avec la désintégrine et ont le même espacement que la protéine de venin. Afin de reproduire la même activité biologique de type désintégrine, on cherche à ce que les groupements amino et carboxylate soient séparés par la même distance que la guanidine basique et le carboxylate acide de la boucle RGD (64). Dans la structure du tirofiban, le site basique (mimant Arg=R) est une pipéridine, le lieu aliphatique réplique la glycine et le site acide (mimant Asp=D) est le groupement carboxyle de la tyrosine [Figure 22]. Finalement, le groupe (S)-NHSO<sub>2</sub>n-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub> augmente l'affinité du tirofiban pour sa cible  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. Grâce à ces optimisations structurales, le niveau de sélectivité du tirofiban est supérieur à celui de l'échistatine (65).

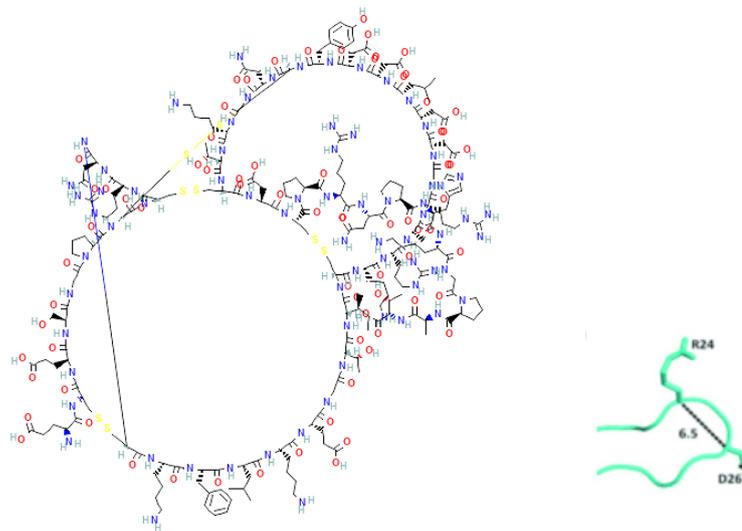


Figure 21 : Formule chimique de l'échistatine (à gauche) (66) et sa boucle RGD (à droite) (67)

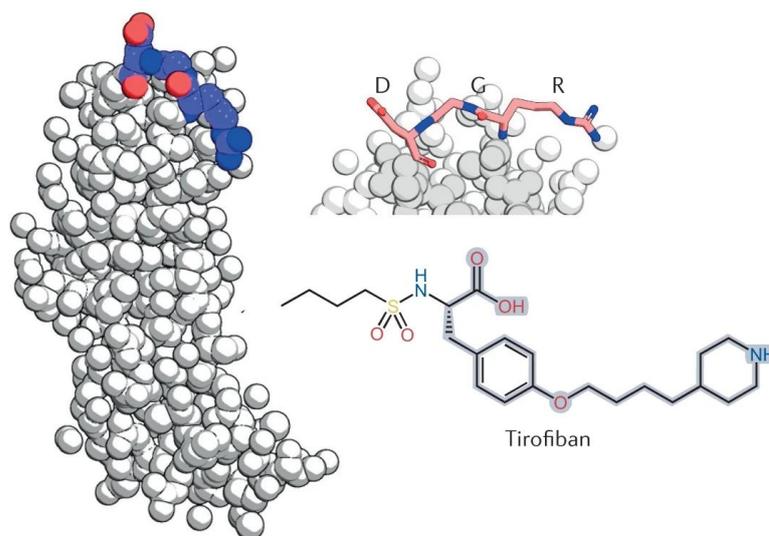


Figure 22 : Molécule de tirofiban avec sa séquence mimant RGD issue de la protéase échistatine (d'après Oliveira et al (57))

L'échistatine (à gauche) se lie à l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 par son motif Arg-Gly-Asp (RGD) (sphères colorées en haut à droite). Motif retrouvé dans la molécule de Tirofiban en bas à droite.

Le tirofiban correspond à un peptidomimétique de synthèse qui mime la charge et la conformation spatiale de la séquence RGD (Arg-Gly-Asp) retrouvées 4 fois dans le fibrinogène (14) [Figure 23]. Il est responsable de l'inhibition de l'agrégation plaquettaire via l'antagonisme de la glycoprotéine GpIIb/IIIa, récepteur du fibrinogène situé à la surface des plaquettes. Ce médicament inhibe par conséquent l'interaction plaquettes-plaquettes via le fibrinogène et la formation du clou plaquettaire en empêchant la formation de ponts de fibrinogène inter-plaquettaires.

Ce médicament est utilisé par voie intraveineuse dans les syndromes coronariens aigus et la prévention de complications thrombotiques (68). En effet, les indications de l'Agrastat® sont la prévention des infarctus du myocarde précoce chez l'adulte souffrant d'un syndrome coronaire aigu sans sus-décalage persistant du segment ST (SCA NST) avec dernier épisode de douleur thoracique depuis moins de 12 heures et modifications électrocardiographiques et/ou élévation des enzymes cardiaques. Ce traitement est également indiqué afin de réduire le risque de survenue d'événements cardiovasculaires majeurs chez les patients en phase aiguë d'infarctus du myocarde (IDM ST+) devant bénéficier d'une intervention coronaire percutanée (69).

Associé à l'aspirine et au clopidogrel, le tirofiban permet de réduire de 50% les complications thrombotiques aiguës liées au geste d'angioplastie, ainsi que la mortalité à long terme (à trois ans) (14).

La fonction plaquettaire revient à son niveau initial dans les huit heures après l'arrêt du traitement.

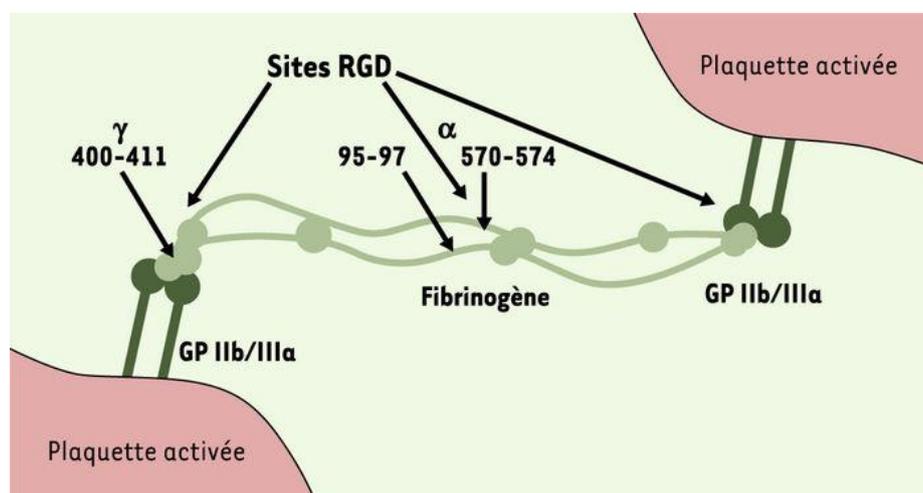


Figure 23 : Interaction de la molécule de fibrinogène avec son récepteur membranaire plaquettaire activé, la glycoprotéine GP IIb/IIIa (14)

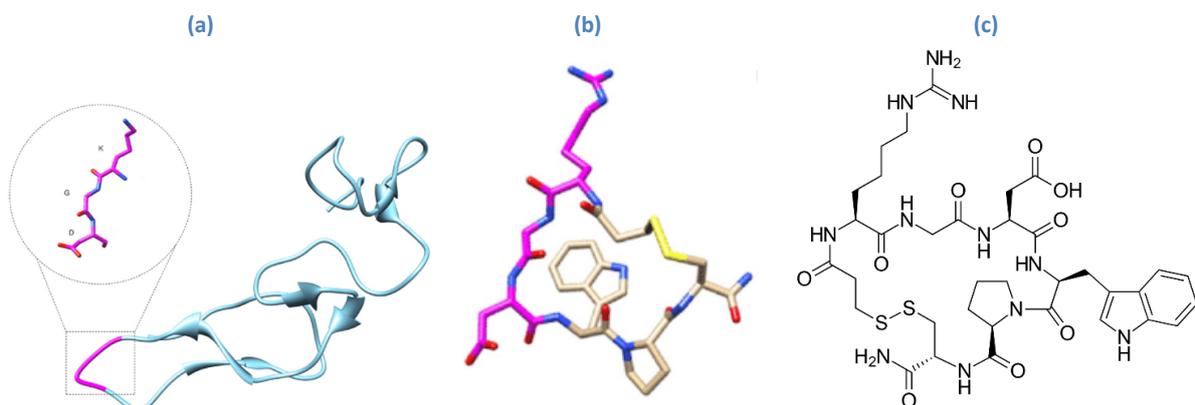
#### 4.1.1.2 Eptifibatide (Integrilin®)

L'éptifibatide est un médicament anti-agrégant plaquettaire dont la structure dérive de la barbourine, une désintégrine à motif KGD issue du venin du crotale pygmée du Sud-Est, *Sistrurus miliarius*. Tout comme le tirofiban, il s'agit d'un antagoniste de la Gp IIb/IIIa plaquettaire.

Le développement de l'éptifibatide a été pensé suite aux effets indésirables rapportés d'un inhibiteur de la Gp IIb/IIIa déjà commercialisé, l'abciximab, en mettant en place une approche alternative de blocage de la Gp IIb/IIIa (70). L'objectif a été de développer un médicament possédant une haute affinité pour la Gp IIb/IIIa, une action antiplaquettaire rapide mais réversible à l'arrêt du traitement, une bonne sécurité d'utilisation et ne déclenchant pas de réponse immunitaire.

Des tests ont été menés à partir de venins de serpent pour trouver des désintégrines spécifiques de la Gp IIb/IIIa (71). Sur 62 venins, seul celui du crotale pygmée du Sud-Est, *Sistrurus miliarius* a montré une spécificité d'action vis-à-vis de l'intégrine plaquettaire GpIIb/IIIa. La barbourine a été isolée du venin puis séquencée. Sa séquence de 73 acides aminés ne contenait pas de motif RGD comme d'autres désintégrines de venins de serpent mais un motif homologue KGD (Lys-Gly-Asp) qui serait responsable d'une plus grande affinité pour Gp IIb/IIIa. La barbourine est un peptide de grande taille à l'origine d'une antigénicité potentielle et d'une élimination rapide ne pouvant donc être utilisé tel quel en tant que médicament. L'objectif a donc été de concevoir des peptides synthétiques de plus petite taille, non immunogènes et résistants à la protéolyse mais gardant cette spécificité d'action envers la Gp IIb/IIIa grâce au motif KGD (71).

L'éptifibatide a été développé à partir de la barbourine sous la forme d'un petit peptide cyclique composé par 6 acides aminés, contraints par des ponts disulfures et contenant le motif KGD de la barbourine (72) [Figure 24 et Figure 25]. La cyclisation du peptide permet de préserver la structure tertiaire de haute affinité à la Gp IIb/IIIa et d'assurer une résistance à la dégradation protéolytique in vivo. La présence de lysine (K) à la place d'une arginine (R) dans le motif désintégrine de l'éptifibatide en comparaison au tirofiban confère une plus grande spécificité pour la glycoprotéine Gp IIb/IIIa limitant l'interaction avec  $\alpha 5\beta 1$  (récepteur de la fibronectine) et  $\alpha v\beta 3$  (récepteur de la vitronectine).



**Figure 24 : Structure chimique de la barbourine et de l'éptifibatide avec leur séquence KGD (d'après Bocian et Hus (73))**  
**(a) Barbourine : structure tertiaire avec séquence KGD en magenta**  
**(b) Eptifibatide : heptapeptide cyclique composé de la séquence KGD en magenta**  
**(c) Eptifibatide : structure primaire**

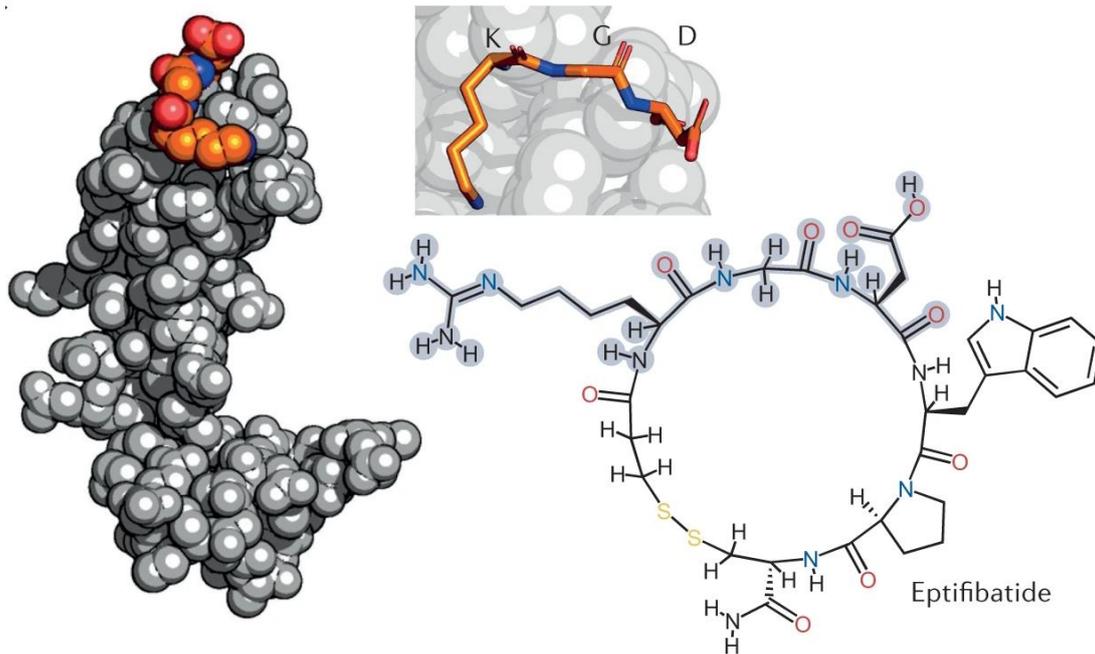


Figure 25 : Molécule d'eptifibatide avec sa séquence mimant KGD issue de la protéase barbourine (d'après Oliveira et al (57))

La barbourine (à gauche) se lie à l'intégrine  $\alpha$ Ib $\beta$ 3 par son motif Lys-Gly-Asp (KGD) (sphères colorées). Motif retrouvé dans la molécule d'eptifibatide en bas à droite.

Ce traitement associé à l'aspirine et à l'héparine non fractionné est indiqué dans la prévention des infarctus du myocarde précoces chez les adultes souffrant d'angor instable ou d'infarctus du myocarde sans onde Q survenu dans les 24 heures, s'accompagnant de modifications de l'électrocardiogramme (ECG) et/ou d'une élévation des enzymes cardiaques (74).

Ce médicament s'administre comme le tirofiban par voie intraveineuse. Des études ont montré l'absence d'immunogénicité du médicament et une inhibition rapide de l'agrégation plaquettaire dans les 15 minutes suivant le traitement par eptifibatide, maintenue pendant toute la durée de la perfusion. L'inhibition plaquettaire est rapidement réversible, avec un retour à la normale de la fonction plaquettaire (> 50 % d'agrégation plaquettaire) 2 à 4 heures après l'arrêt de la perfusion.

#### 4.1.1.3 Vipégitide

Le vipégitide est une molécule peptidomimétique composée de 13 acides aminés dont l'activité pharmacologique est l'inhibition de l'agrégation plaquettaire par antagonisme de l'intégrine  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 (également appelé récepteur de la glycoprotéine Ia/IIa, VLA-2, ou CD49b/CD29). Ce récepteur de l'intégrine  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 se trouve sur la membrane des plaquettes et déclenche, en condition physiologique, l'agrégation plaquettaire induite par le collagène. Cette cible est très intéressante car à la différence de la GP IIb/IIIa, l'intégrine  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 n'est pas associée à un risque de saignement grave lorsqu'elle est déficitaire ou inhibée. On rappelle qu'un déficit en GP IIb/IIIa est quant à lui responsable de troubles

hémorragiques profonds dans la pathologie nommée thrombasthénie de Glanzmann. La surexpression de l'intégrine  $\alpha 2\beta 1$  est associée à la formation de caillots pathologiques d'où l'intérêt de l'inhiber chez les sujets à risque thrombotique (75).

Pour la synthèse du vipégitide, les scientifiques ont utilisé comme modèle la vixapatine (VP12) et sa séquence K(R)TS qui est une protéine lectine de type C trouvée dans le venin de *Vipera xantina palestinae* (75). Une forme pégylée plus stable du vipégitide a également été synthétisée : il s'agit du peptidomimétique Vipegitide-PEG2 pour lequel deux molécules de polyéthylène glycol (PEG) remplacent les résidus glycine et tryptophane aux positions 1 et 2. Des données montrent que cette forme est stable dans le sérum humain pendant plus de 3 heures (76).

Vipegitide et Vipegitide-PEG2 ont montré ex vivo qu'ils étaient efficaces pour l'inhibition de l'agrégation plaquettaire induite par l'adénosine diphosphate et le collagène I (dans le plasma riche en plaquettes et le sang humain total). De même, des tests sur animaux ont montré une bonne tolérance aiguë chez les souris après une injection intraveineuse en bolus de 50 mg/kg (76). Ces résultats sont prometteurs pour l'utilisation de telles molécules dans le développement de thérapies antithrombotiques anti-agrégantes anti- $\alpha 2\beta 1$ .

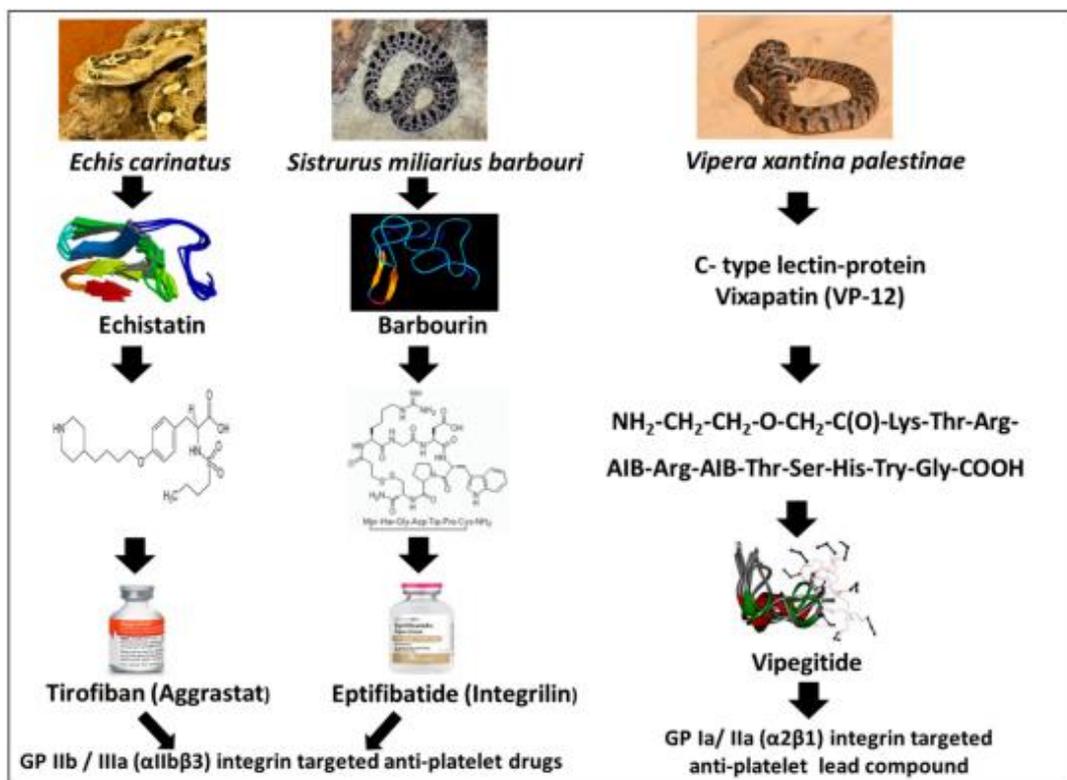


Figure 26 : Médicaments antiagrégants plaquettaires développés à partir des protéines ophidiennes de type désintégrines et lectines de type C (d'après Lazarovici et al (75))

#### **4.1.1.4 Anfibatide**

L'anfibatide est une protéine de type lectine C isolée à partir du venin de la vipère à nez pointu *Deinagkistrodon acutus*. L'activité antiagrégante de l'anfibatide est consécutive au blocage de la liaison de la GpIb $\alpha$  avec le facteur Willebrand et la thrombine (77,78) plus spécifiquement dans les zones exposées à de fortes contraintes de cisaillement. Cette liaison intervient notamment dans l'activation et l'adhésion plaquettaire.

Des essais sur volontaires sains (phase 1) ont été réalisés dans un essai clinique prospectif, randomisé et ouvert de phase I afin d'évaluer l'effet et la sécurité de l'anfibatide. L'anfibatide a été administré par voie intraveineuse soit sous forme d'un bolus, soit sous forme d'un bolus suivi d'une perfusion de 24 heures à 94 volontaires sains. L'effet du médicament a été immédiat avec une inhibition maximale immédiate suivant l'administration et la durée d'action a été estimée à 8 heures. La tolérance était correcte : aucune thrombopénie, aucun saignement ni anticorps anti-anfibatide n'ont été mis en évidence. Aucun événement indésirable grave ni réaction allergique n'ont été observés au cours des études (77).

Cette étude suggère un effet antithrombotique rapide, puissant et réversible de l'anfibatide chez les sujets sains. Pour la suite, des essais de phase Ib-IIa et de phase II chez des patients souffrant d'infarctus du myocarde sans sus-décalage du segment ST et avec sus-décalage du segment ST bénéficiant d'une intervention coronarienne percutanée sont prévus prochainement pour évaluer l'efficacité de la molécule.

### 4.1.2 Traitements défibrinants

On retrouve au sein des venins de serpents des enzymes défibrinantes. Elles sont appelées veinombines et sont classées en trois groupes (A, B ou AB) en fonction de leur capacité à cliver le fibrinopeptide A, le fibrinopeptide B, ou les deux du fibrinogène [Figure 27]. Le viprinex et la batroxobine font parties du groupe des veinombines de type A. Elles permettent de diminuer in vivo les concentrations de fibrinogène.

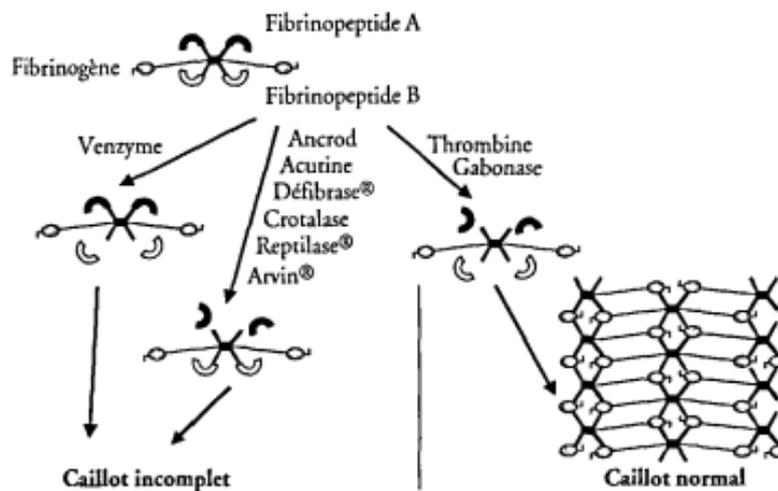


Figure 27 : Différents types de veinombines (d'après Chippaux et al (24))

#### 4.1.2.1 Viprinex (Ancrod®)

Le viprinex est une sérine protéase (Thrombin Like Enzyme, SVTLE) purifiée à partir du venin de la vipère de Malaisie *Agkistrodon rhodostoma*.

Ce médicament a plusieurs propriétés : il réduit les taux de fibrinogène et permet de diminuer la viscosité du sang. Cette molécule est un agent défibrinant. La défibrinogénéation produit une anticoagulation en épuisant le substrat nécessaire à la formation du thrombus (79). L'agrégation plaquettaire est également inhibée de manière indirecte puisque le fibrinogène n'est plus disponible au cours de cette étape pour fixer les intégrines plaquettaires Gp IIb/IIIa. L'un des produits de clivage du fibrinogène, appelé "desAA-Fibrine", agit aussi comme cofacteur du t-PA pour l'activation du plasminogène en plasmine. Il en résulte une fibrinolyse accrue localement (80).

A la suite d'un traitement par viprinex, des études ont montré une diminution de la viscosité du sang de 30 à 40 % en comparaison au niveau avant traitement. Les effets sont une amélioration du flux sanguin et de la perfusion de la microcirculation (81,83).

Bien que les résultats initiaux aient été très prometteurs (79,82), le viprinex a échoué lors des essais de phase III où il n'a pas montré de bénéfices thérapeutiques dans les essais sur les infarctus et les

AVC. Son utilisation chez les victimes d'accidents ischémiques cérébraux a été arrêtée en décembre 2008 en raison du manque d'efficacité. Dans l'étude ESTAT (étude multicentrique, randomisée, en double aveugle, contrôlée par placebo) visant à évaluer l'efficacité et la sécurité d'Ancrod® administré par voie intraveineuse dans les 6 heures suivant l'apparition d'un accident vasculaire cérébral ischémique aigu et poursuivi pendant 5 jours, des résultats plus tardifs portant sur 1 600 patients ont montré une efficacité plus élevée du placebo que du médicament. L'étude a dû être arrêtée parce que la mortalité dans le groupe Ancrod® était plus élevée. Une autre étude "Stroke Treatment with Ancrod Trial (STAT)" a confirmé ce résultat dans le traitement de l'accident vasculaire cérébral ischémique (83).

#### **4.1.2.2 Batroxobine (Defibrase®)**

La batroxobine est une sérine protéase issue des venins de 2 espèces de Bothrops : *Bothrops moojeni* et *Bothrops atrox*. Elle possède une action thrombine-like (84) et est capable de lyser la partie N-terminale de la chaîne alpha du fibrinogène libérant les fibrinopeptides A et transformant le fibrinogène en fibrine instable (desAA-Fibrine).

De ce mécanisme d'action en découle des propriétés défibrinante et anticoagulante in vivo en épuisant le fibrinogène plasmatique et en formant des caillots solubles rapidement éliminés par la fibrinolyse.

La batroxobine possède diverses activités pharmacologiques :

- diminution du taux de fibrinogène induisant un effet anticoagulant et une diminution de la thrombogénèse.
- réduction de la viscosité du sang total et du plasma avec amélioration de la rhéologie et de la perfusion sanguine.

Elle peut être utilisée dans différentes indications comme l'infarctus cérébral aigu (autorisation seulement en Chine (84,85)), l'ischémie causée par des maladies vasculaires occlusives (telles que la thromboangéite oblitérante, la thrombose veineuse profonde et l'embolie pulmonaire) ou le dysfonctionnement de la circulation périphérique et de la microcirculation (telles que la surdité soudaine et la maladie des vibrations) (86).

Ce médicament est seulement autorisé en Chine ou au Japon dans certaines de ces indications. Son utilisation n'a pas été approuvée par la FDA aux Etats-Unis ni par l'EMA en Europe.

#### **4.1.3 Sutures biologiques**

Différents hémostatiques chirurgicaux existent et sont indiqués en chirurgie pour améliorer l'hémostase lorsque les techniques conventionnelles comme la compression, les sutures mécaniques ou l'électrocoagulation sont insuffisantes. Parmi eux, on retrouve notamment l'utilisation de produits à base de thrombine et fibrinogène permettant la réalisation de sutures dites biologiques. Ces produits

sont soit des médicaments dérivés du sang (MDS) qualifiés de « colles de fibrines homologues », contenant principalement des protéines plasmatiques coagulables d'origine humaine (fibrinogène, facteur XIII, fibronectine et thrombine) qu'on oppose aux « colles de fibrine autologues » dont l'essor est récent. La raison du développement de nouvelles colles biologiques est notamment la progression technologique dans le secteur mais également la crainte de la transmission potentielle de virus ou de prions par ces MDS. Certaines « colles de fibrines autologues » recourent à l'utilisation de protéases de venin de serpent comme la batroxobine et sont disponibles sous forme de dispositifs médicaux commercialisés pour la routine clinique (87).

#### **4.1.3.1 Batroxobine : Plateltext-Act®**

La batroxobine issue du venin du serpent brésilien *Bothrops atrox* peut être utilisée pour préparer des gels de plaquettes autologues nécessaires dans les thérapies cellulaires et tissulaires.

On la retrouve dans le dispositif médical Plateltext-Act® accompagné de gluconate de calcium. En formant de la fibrine à partir du fibrinogène en présence de calcium, la batroxobine provoque la gélification d'un plasma riche en plaquettes. Ce gel peut alors être manipulé et appliqué sur la plaie chirurgicale soutenant les processus de réparation et de régénération des tissus endommagés (88).

Le gel plaquettaire produit avec Plateltext-Act® est utilisé pour la thérapie des plaies, des ulcères, des blessures aiguës et chroniques des tissus durs et mous et au cours de certaines chirurgies.

A la différence des autres produits sur le marché composé de thrombine, ce dispositif médical à base de batroxobine a comme avantage de ne pas activer les plaquettes. Celles-ci sont passivement piégées dans le réseau de fibrine et la libération de leurs granules est lente. Dans ces conditions, la rétraction du caillot est plus longue à se produire (89) ce qui peut être utile dans certaines conditions cliniques nécessitant une efficacité à plus long terme.

#### **4.1.3.2 Batroxobine : Vivostat®**

Le dispositif médical Vivostat® permet la préparation peropératoire automatisée en 30 minutes de « colle de fibrine autologue » à partir du sang du patient. Une unité « processeur » permet la préparation automatisée de la colle de fibrine à partir d'un échantillon de sang préalablement prélevé au malade et une unité « d'application » permet la distribution du produit sur la plaie avec un contrôle de la diffusion de la fibrine (87,90). Le principe repose également sur la conversion du fibrinogène en fibrine médié par la batroxobine (91).

#### **4.1.3.3 Hemocoagulase® (Hémogoaculase agkistrodon HCA)**

Depuis les études sur la batroxobine, d'autres protéines de type thrombin-like enzymes (TLE) ont été étudiées. C'est le cas par exemple de l'hémocoagulase agkistrodon (HCA), issue du venin du mocassin

chinois *Agkistrodon acutus*. Il s'agit d'une TLE à double chaîne. L'HCA est un médicament prescriptible en Chine pour réaliser des sutures biologiques et est connu pour son efficacité hémostatique (92).

Dans le princeps Hemocoagulase®, les monomères de des-A-fibrine produits grâce à l'activité enzymatique de type thrombine ont la capacité de former un complexe avec le fibrinogène natif. Ces complexes sont de haut poids moléculaire et amplifient l'agrégation des plaquettes limitant l'extravasation au niveau de la brèche vasculaire (93).

Un des avantages de l'HCA par rapport à la thrombine dans les colles biologiques est son absence d'activation du FXIII. Par conséquent, la consolidation par réticulation de la fibrine soluble en fibrine insoluble par le FXIIIa a lieu au site de la brèche vasculaire par le FXIIIa généré physiologiquement par la thrombine mais est limitée dans les vaisseaux sanguins indemnes (94) .

Les indications de l'Hémocoagulase® sont la réduction des saignements dans les chirurgies plastiques, les chirurgies abdominales et les vitrectomies humaines. Des études ont montré l'intérêt de l'Hémocoagulase® à limiter les saignements et hémorragies au cours d'interventions dentaires, abdominales, urologiques, thyroïdiennes, orthopédiques, obstétriques et gynécologiques (92,95,96). L'hémocoagulase réduit les saignements postopératoires et les besoins en transfusion sanguine chez les patients en chirurgie cardiaque en préservant les fonctions de coagulation (92).

#### **4.1.3.4 Haempatch (Q8009)**

Haempatch (Q8009) est issu du venin de *Pseudonaja texilis*. Ce médicament correspond à une sérine protéase analogue du facteur Xa activant la prothrombine, dont l'utilisation est envisagée en topique.

De manière comparable au facteur Xa, Q8009 est une protéase à deux chaînes : la chaîne lourde contient le site enzymatique et la chaîne légère possède des résidus d'acide gamma-carboxy glutamique facilitant la fixation aux membranes. Q8009 possède une homologie de séquence avec le facteur Xa de 47%. Son activité enzymatique permet le clivage de la prothrombine aux mêmes sites que le facteur Xa humain (94). A la différence du facteur Xa, cette activité est indépendante de la présence de cofacteurs tels que le calcium, les phospholipides ou le FVa.

Des études in vivo ont été réalisées entre 2007 et 2009 sur cinq modèles différents chez le rat (excision dermique, de l'extrémité de la queue, du foie, de la rate et des reins). Ces études réalisées en comparatif à la thrombine rapportaient des résultats prometteurs pour Q8009 avec une réduction du volume total de sang perdu (97,98). De plus, des recherches ont permis de mettre en place un processus de fabrication recombinant pour Q8009 même si son rendement reste limité (99).

Cet agent hémostatique topique serait indiqué pour réduire la perte de sang consécutive à une chirurgie ou à un traumatisme et permettrait de limiter les besoins transfusionnels ainsi que la durée d'intervention chirurgicale. Toutefois, ce médicament n'est pas disponible sur le marché.

#### 4.1.4 Traitements pro-coagulants

##### 4.1.4.1 CoVase (V0801)

CoVase (V0801) est une protéine analogue du facteur Va provenant du venin de *Pseudonaja texilis*.

L'utilisation de cette molécule comme agent procoagulant repose sur l'hypothèse que le FVa serait le facteur limitant dans la formation du complexe prothrombinase. Par conséquent, CoVase permettrait d'accélérer la coagulation. Jouant le rôle de co-facteur, CoVase aurait a priori une activité seulement sur les sites où la coagulation a déjà été physiologiquement activée c'est-à-dire où le facteur Xa est présent. L'activité coagulante du facteur Xa étant régulée par l'antithrombine, le risque de coagulation disséminée resterait limitée (100).

CoVase ne nécessite aucune coupure protéolytique pour être activé à la différence du facteur V endogène. Il n'est pas sensible à l'inhibition par la protéine C.

Ce cofacteur procoagulant pourrait être indiqué comme agent antihémorragique systémique dans le traitement des hémorragies internes et des hémorragies non compressibles caractérisées par des blessures et saignements multiples localisés sur de petits vaisseaux des viscères et qui ne sont pas facilement accessibles par un traitement conventionnel.

Il était prévu que cette molécule soit testée lors d'études précliniques notamment dans un essai d'hémorragie non compressible chez le lapin (blessure splénique). Aucun résultat n'est paru à ce sujet depuis 2012.

#### 4.1.5 Traitements anticoagulants

##### 4.1.5.1 Ximelagatran (Exanta®)

Le ximelagatran a été le premier inhibiteur direct oral de la thrombine à avoir atteint les essais cliniques de phase III. C'est un promédicament dont le métabolite actif est le mélagatran. Le ximelagatran possède une structure moléculaire basée sur celle d'un peptide identifié dans le venin de cobra *Naja*. La séquence d'acides aminés du médicament mime une séquence du fibrinopeptide A précédant le site qui est clivé par la thrombine pendant la conversion du fibrinogène en fibrine (101) permettant d'inhiber l'action de la thrombine.

Des études cliniques ont montré que le ximelagatran avait une efficacité comparable à la warfarine et aux héparines de faible poids moléculaire (HBPM) pour la prophylaxie de la thromboembolie veineuse, comparable à la warfarine pour la prévention de l'accident vasculaire cérébral dans le cadre de la fibrillation auriculaire. Cependant, la FDA a refusé en 2004 l'autorisation de commercialisation aux États-Unis du ximelagatran pour toutes les indications proposées (102) et le médicament a été retiré du marché en 2006 du marché européen ultérieurement à l'apparition d'effets indésirables à type de

cytolysé hépatique. Cette décision a été prise à la suite d'un cas d'hépatite grave identifié 3 semaines après la dernière prise du médicament (103). Compte tenu de l'apparition des lésions hépatiques graves chez un patient après la fin de l'exposition au médicament et l'insuffisance d'une surveillance régulière de la fonction hépatique comme moyen préventif (104), AstraZeneca® a préféré retirer du marché melagatran/ximelagatran.

#### 4.1.6 Traitements thrombolytiques

##### 4.1.6.1 Alfimeprase

L'alfimeprase est une protéine recombinante de la métalloprotéinase P-I issue de la toxine fibrolase. Cette toxine avait été initialement purifiée à partir du venin du serpent cuivré du Sud *Agkistrodon contortrix contortrix* (mocassin à tête cuivrée). Elle possède une activité fibrinolytique, capable de cliver la chaîne A $\alpha$  du fibrinogène et de la fibrine mais aussi la chaîne B $\beta$ , mais à un rythme plus lent. L'enzyme agit également directement sur la fibrine lui conférant une activité thrombolytique.

L'un des avantages de la fibrolase est qu'elle est insensible à l'action des serpins sanguines. Toutefois, elle est rapidement inactivée de façon irréversible par l'alpha-2 macroglobuline (101). La fibrolase a été légèrement modifiée afin de stabiliser l'enzyme (initialement dans l'objectif de stocker la protéine pendant les essais cliniques). Cette forme modifiée, du côté de l'extrémité N-terminale, est appelée alfimeprase. L'alfimeprase a montré sur des études in vitro qu'elle lysait les caillots environ six fois plus rapidement que l'activateur du plasminogène (t-PA).

Ce médicament avait été évalué dans des essais de phase III dans les indications de traitement des occlusions artérielles périphériques et des occlusions du dispositif d'accès veineux central (DAVC). Suite aux échecs des essais de phase III, Nuvelo a décidé de mettre fin à cette étude en mars 2008, et le programme de développement de l'Alfimeprase a été arrêté.

#### 4.1.7 Traitements antifibrinolytiques

##### 4.1.7.1 Textilinine-1 (Q8008)

La textilinine-1 est un inhibiteur de la sérine-protéinase de type Kunitz isolé du venin du serpent brun australien *Pseudonaja textilis*. Cette toxine a pour propriété d'inhiber la plasmine humaine de manière spécifique.

Deux types de textilinine ont été initialement purifiés : Textilinine-1 et Textilinine-2. Les textilinines 1 et 2 présentent respectivement 45 et 43% d'homologie avec l'aprotinine (Trasylol®), un médicament antifibrinolytique. Textilinines et aprotinine ont en commun 6 résidus Cys, une spécificité des inhibiteurs de type Kunitz (100). L'aprotinine est un inhibiteur de protéase de type Kunitz issu du poumon de bovin capable d'inhiber l'activité de la plasmine, de la kallikréine ou encore de la trypsine.

Actuellement, l'un des axes thérapeutiques dans la prise en charge d'hémorragies est l'utilisation d'agents antifibrinolytiques ( $\pm$  en association à d'autres molécules). Dans cette catégorie de médicaments, on retrouve l'acide tranexamique et anciennement l'aprotinine. La textilinine a le potentiel de remplacer l'aprotinine grâce à une plus grande spécificité et l'avantage par rapport à l'acide tranexamique d'inhiber directement la plasmine alors que l'acide tranexamique inhibe préalablement l'activation du plasminogène en plasmine (105).

L'utilisation de Textilinine-1 (Q8008) comme agent anti-fibrinolytique systémique en chirurgie a été envisagée. Dans un modèle murin, elle réduisait les pertes sanguines, et son utilisation semblait plus sûre que l'aprotinine (101,106). Des études ont montré que l'aprotinine est un inhibiteur de protéase à large spectre tandis que Q8008 est un inhibiteur sélectif de la plasmine et de la trypsine. Ce spectre d'action plus restreint permettrait de limiter les effets indésirables liés à une activité sur des protéines non ciblées. En effet, plusieurs effets indésirables ont été rapportés avec l'aprotinine notamment un risque accru d'accident vasculaire cérébral, d'insuffisance cardiaque, d'infarctus du myocarde, d'encéphalopathie et d'événements vasculaires, cardiovasculaires et cérébrovasculaires (100,107) qui lui ont valu d'être retirée du marché français en 2018.

Récemment, une étude menée par Dr Kijas et son équipe a testé un hydrogel à base d'un polymère PIC synthétique (polyisocyanopeptide substitué par du triéthylène glycol) conjugué à des protéines recombinantes ophidiennes de 2 types : écarine (mécanisme d'action décrit dans le chapitre 5.1.4.1 en page 98) et textilinine. L'association de ces 2 enzymes permet une initiation rapide la coagulation grâce à l'écarine conjointe à une inhibition de la dégradation du caillot à partir de la textilinine [Figure 28]. Des essais dans un modèle murin en condition hémorragique (amputation de la queue d'une souris) ont été conduits et ont montré que l'application de l'hydrogel contrôlait rapidement l'hémorragie tant dans des conditions physiologiques que qu'hypocoagulantes (administration de warfarine). A noter que cet hydrogel est thermosensible, c'est à dire qu'à des températures inférieures à 22°C il est sous forme liquide, et qu'au contact du corps et de la plaie il prend la consistance d'un gel ferme facilitant son application. Des études in vivo utilisant des modèles précliniques de grands animaux devraient prochainement être mises en place afin de continuer l'évaluation de ce nouveau dispositif dans les hémorragies (105).

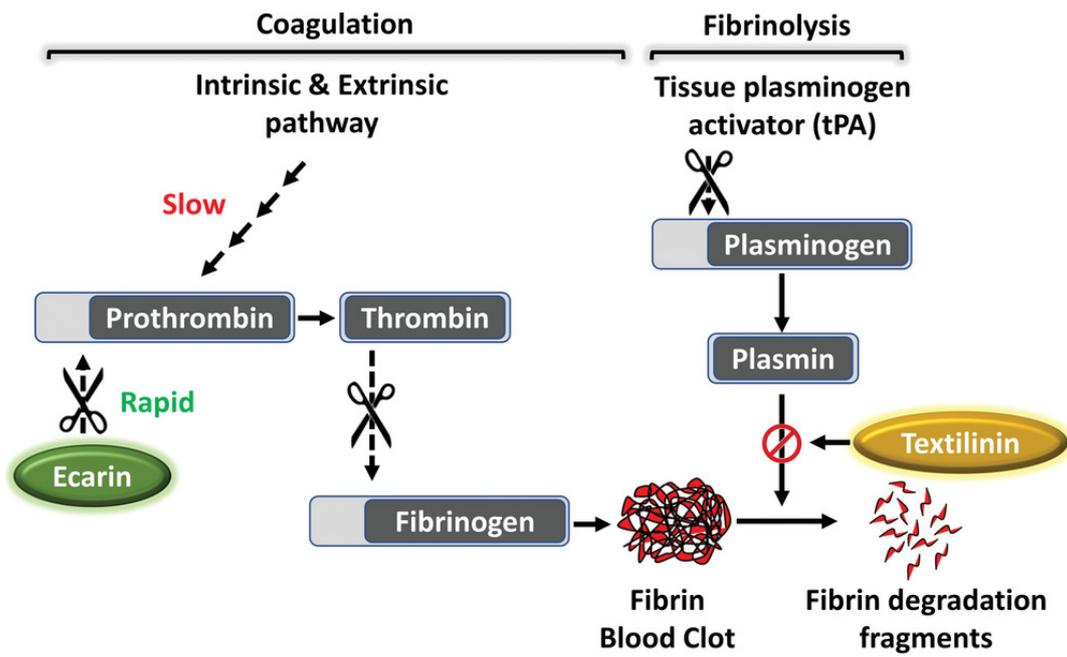


Figure 28 : Mécanisme d'action de l'hydrogel associant écarine et textilinine (d'après Yegappan et al (105))

MEDICAMENTS	CLASSE	MECANISME D'ACTION	VENINS	INDICATIONS
<b>Tirofiban (Aggrastat®)</b>	<i>Antiagrégant plaquettaire</i>	Antagoniste réversible de la Gp αIIbβ3 plaquettaire	<i>Echis carinatus</i>	Prévention des infarctus du myocarde précoce chez l'adulte (angioplastie coronaire)
<b>Eptifibatide (Integrilin®)</b>	<i>Antiagrégant plaquettaire</i>	Antagoniste réversible de la Gp αIIbβ3 plaquettaire	<i>Sistrurus miliarius barbouri</i>	Prévention des infarctus du myocarde précoces chez les adultes souffrant d'angor instable ou d'infarctus du myocarde sans onde Q (angioplastie coronaire)
<b>Vipegitide</b>	<i>Antiagrégant plaquettaire</i>	Antagoniste sélectif de l'intégrine α2β1	<i>Vipera xantina palestinae</i>	Thérapie antithrombotique (tests sur animaux)
<b>Anfibatide</b>	<i>Antiagrégant plaquettaire</i>	Inhibiteur de la GPIIb/IIIa	<i>Deinagkistrodon acutus</i>	Développement en cours Infarctus du myocarde
<b>Viprinex (Ancrod®)</b>	<i>Agent défibrinant</i>	Clivage du fibrinopeptide A du fibrinogène	<i>Agkistrodon rhodostoma</i>	AVC (échec essais de phase III en 2008)
<b>Batroxobine (Defibrase®/ Reptilase®)</b>	<i>Agent défibrinant</i>	Clivage du fibrinopeptide A du fibrinogène	<i>Bothrops moojeni</i> et <i>Bothrops atrox</i>	Traitement des AVC ou des embolies pulmonaires en Chine et au Japon
<b>Haempatch (Q8009)</b>	<i>Agent procoagulant</i>	Analogue du FXa, activateur de la prothrombine	<i>Pseudonaja textilis</i>	Agent hémostatique topique (chirurgie, traumatisme)
<b>CoVase (V0801)</b>	<i>Agent procoagulant</i> <i>Agent antihémorragique</i>	Analogue du facteur Va, cofacteur du complexe prothrombinase	<i>Pseudonaja textilis</i>	En cours d'étude avec des essais prévus sur animaux Traitement des hémorragies internes et des hémorragies non compressibles
<b>Ximelagatran (Exanta®)</b>	<i>Inhibiteur direct de la thrombine</i>	Inhibiteur direct de la thrombine	<i>Naja spp.</i>	Arrêt essais phase III en 2008
<b>Alfimeprase</b>	<i>Activité fibrinolytique</i>	Lyse les fibrinopeptides A et B du fibrinogène	<i>Agkistrodon contortrix contortrix</i>	Arrêt essais de phase III (traitement des occlusions artérielles périphériques (OAP) et des occlusions du dispositif d'accès veineux central (DAVC))
<b>Textilinine-1 (Q8008)</b>	<i>Agent anti-fibrinolytique</i>	Inhibiteur de plasmine humaine	<i>Pseudonaja textilis</i>	Essais précliniques en cours

Tableau 15 : Médicaments issus de protéines de venins de serpent ayant un effet sur l'hémostase

## 4.2 Autres traitements sans effet sur l'hémostase

### 4.2.1 Antihypertenseurs Inhibiteurs de l'Enzyme de Conversion (IEC)

Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine sont des traitements antihypertenseurs. Deux d'entre eux ont été conçus à partir de protéines de venins de serpent : le captopril et l'enalapril [Figure 29]. Bien qu'ils n'aient pas d'action sur l'hémostase plasmatique mais seulement sur les vaisseaux, il s'agit des premiers traitements modélisés à partir de molécules ophidiennes, leur découverte et leur développement seront tout de même rapidement exposés.

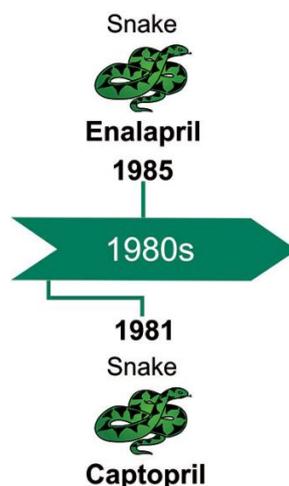


Figure 29 : Chronologie de découverte des inhibiteurs de l'ECA modélisés à partir de protéines de venin de serpent (d'après Bordon et al (88))

#### 4.2.1.1 Captopril

Captopril est le tout premier médicament développé à partir de la structure d'une protéine de venin de serpent qui a été commercialisé (approuvé par la FDA en 1981). Captopril dérive du peptide *Teprotide* retrouvé dans le venin de *Bothrops jararaca* (61).

La découverte de peptides hypotenseurs dans le venin du crotale *Bothrops jararaca* remonte à 1965 par le pharmacologue brésilien Ferreira. Ses études avaient montré que des peptides présents dans le venin inhibaient l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) et potentialisaient le système vasodilatateur kallikrine-kinine. L'un des peptides, le teprotide (BPP9) s'avérait prometteur. Ce nonapeptide BPP9 (Bradykinin Potentiating Peptide) (Glu-Trp-Pro-Arg-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro) était le tout premier inhibiteur de l'ECA thérapeutiquement actif. Toutefois, ce peptide natif purifié issu du venin de serpent était complexe et relativement cher à synthétiser, et son administration orale était impossible de par sa structure peptidique rapidement hydrolysée.

Dans les années 1970, des études de conception rationnelle des médicaments ont permis de développer un médicament efficace par voie orale. Dans un premier temps, un modèle théorique du site actif de l'ECA a été construit. Pour cela, les scientifiques se sont basés sur la structure de la carboxypeptidase A, une autre enzyme qui clive la deuxième liaison peptidique de l'angiotensine, pour en déduire celle de l'ECA qui clive la première liaison du substrat. Ce n'est que plus tard dans les années 1980 que la structure l'ECA a été officiellement découverte. Dans un second temps, et en regard de ce modèle théorique de l'ECA, des études de structure-activité ont pu être conduites permettant d'identifier le pharmacophore responsable de l'inhibition de l'ECA. Par analogie avec un inhibiteur de la carboxypeptidase A (CPA) récemment découvert, plusieurs peptides N-acétylés ont été testés. Les chercheurs ont découvert les caractéristiques chimiques nécessaires pour que la molécule en cours de développement soit efficace sur l'ECA. C'est ainsi qu'a été sélectionné le captopril (3-mercapto-2-méthylpropanoyl-L-proline). On considère la synthèse du captopril comme l'une des premières conception rationnelle d'un médicament. C'est grâce à ces différents travaux de chimie qu'a été développé le captopril dérivant de la protéine native teprotide [Figure 30].

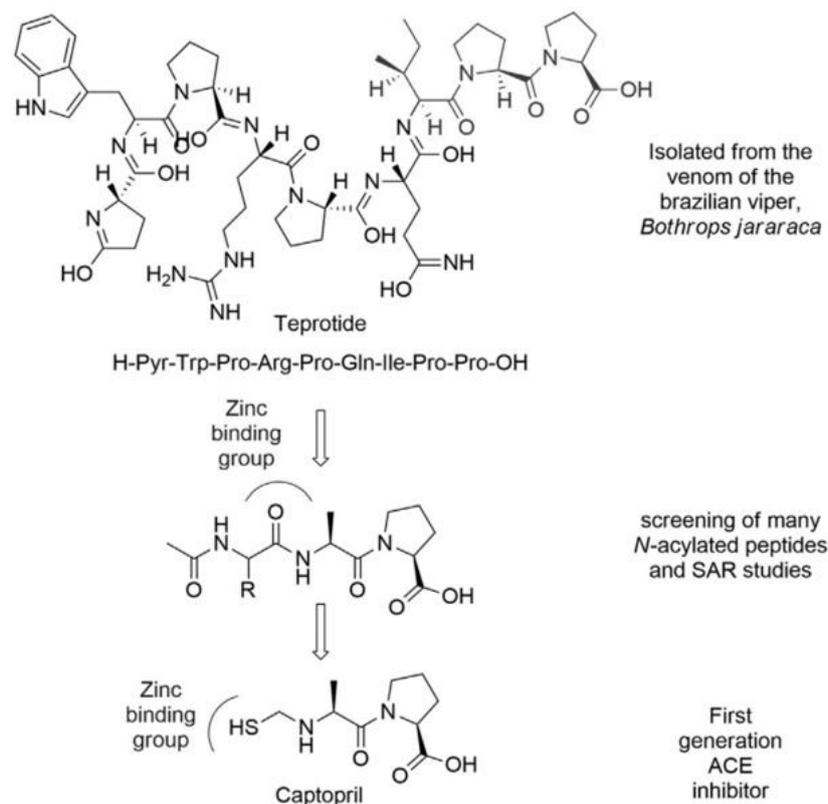


Figure 30 : Structure chimique du teprotide et du captopril (d'après Lenci et al (108))

Le captopril est un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine qui agit sur le système renine-angiotensine. En limitant la production d'angiotensine II et en potentialisant l'action de la bradykinine, ce médicament fonctionne comme hypotenseur.

#### 4.2.1.2 Enalapril

L'enalapril a été quelques années plus tard lui aussi approuvé par la FDA (en 1985). Il dérive lui-même du captopril : c'est une prodrogue qui est métabolisée en enalaprilate. Il a été synthétisé en substituant le groupe mercapto du captopril par un groupement alkyl (109). Ce groupe mercapto était considéré comme responsable de certains effets indésirables du captopril notamment dermatologiques (rashes cutanés) ou d'une perte de goût (88). Ce médicament est indiqué dans le traitement de l'hypertension artérielle, de l'insuffisance cardiaque symptomatique et en prévention de l'insuffisance cardiaque symptomatique chez des patients ayant une dysfonction ventriculaire gauche asymptomatique (fraction d'éjection  $\leq 35\%$ ) (110).

#### 4.2.2 Autres traitements

D'autres traitements sans influence sur l'hémostase sont également inspirées de protéines de serpents. Nous ne développerons pas de manière précise ces molécules qui sont sans lien avec l'hémostase et sortent donc du cadre de cette thèse.

On peut citer :

- La cobratid, une  $\alpha$ -neurotoxine qui agit comme antagoniste des récepteurs nicotiques à l'acétylcholine et qui dérive d'une protéine de *Naja naja atra*. C'est un médicament analgésique commercialisé sous forme associée au tramadol et à l'ibuprofène, utilisé dans les douleurs modérées à sévères associées aux cancers (88,111).
- Les mambalgines, qui sont des protéines de la famille 3FTx isolées à partir du venin du mamba noir. Ces protéines sont capables d'inhiber les transporteurs de  $\text{Na}^+$  activés (ASIC) au niveau des neurones nociceptifs leur conférant des propriétés analgésiques puissantes et non toxiques (112,113).
- Le cenderitide, peptide natriurétique dont la conception est basée sur une protéine de venin du mamba vert de l'Est *Dendroaspis angusticeps*. Les études montrent une efficacité et une tolérance chez les patients souffrant d'insuffisance cardiaque chronique stable (114).
- La crotamine, une défensine purifiée à partir du venin de crotale néotropical d'Amérique du Sud *Crotalus durissus* (57). Des essais chez la souris ont montré une activité anti-mélanome (115) ainsi que des activités anti-inflammatoire et analgésique (116).

## 5. Intérêt diagnostique : tests biologiques en hémostase

### 5.1 Tests de coagulation

Certaines molécules issues de venins de serpents ont permis de développer des tests de laboratoire de biologie médicale dans le domaine de l'hémostase. On retrouve notamment le Protac®, le RVV-X ou la convulxine qui sont utilisés en routine et d'autres toxines moins connues. Ces tests ainsi que les protéines qu'ils utilisent vont être détaillés dans cette partie [Tableau 16].

#### 5.1.1 Temps de Reptilase

##### 5.1.1.1 Principe du temps de Reptilase

Le temps de Reptilase consiste à mesurer le temps de coagulation à 37°C d'un plasma pauvre en plaquettes citraté après ajout de reptilase ou enzyme « équivalente ». Ce test est similaire au temps de thrombine à la différence qu'une enzyme thrombine like ophidienne est utilisée à la place de la thrombine. Deux protéases issues des venins de serpent peuvent être utilisées afin de remplacer la thrombine dans le test. Il s'agit de la batroxobine (Reptilase®), enzyme purifiée provenant du serpent *Bothrops atrox*, et le viprinex (Ancrod®), enzyme similaire provenant du serpent *Agkistrodon rhodostoma*.

##### 5.1.1.2 La Batroxobine

La batroxobine est une sérine protéase thrombine-like (SVTLE) issue du venin de *Bothrops atrox moojeni*. Elle possède la propriété de cliver les fibrinopeptides A du fibrinogène.

Physiologiquement, la thrombine est la protéase responsable du clivage et du relargage de fibrinopeptides A et B du fibrinogène entraînant la formation de monomère de fibrine (117) tandis que la batroxobine libère seulement des fibrinopeptides A [Figure 31]. Cette protéase ophidienne scinde la liaison Arg16-Gly17 au niveau de la partie N-terminale de la chaîne A $\alpha$  du fibrinogène ce qui conduit à la formation de monomères de fibrine (118). Une fois la batroxobine liée au fibrinogène grâce à sa haute affinité, son activité enzymatique peut être 18 fois plus importante que celle de la thrombine (119). Il est à noter que les sites de fixation de la batroxobine au fibrinogène ne sont que partiellement identiques à ceux de la thrombine car des études ont montré que la thrombine est incapable de complètement déplacer la batroxobine fixée au fibrinogène (119). Le fibrinogène et la fibrine sont les seuls substrats connus de la batroxobine. De plus la batroxobine, à la différence de la thrombine n'est pas inhibé par l'antithrombine (119).

Au sein des laboratoire diagnostiques et de recherche, la batroxobine a pour principales indications :

- la réalisation d'un temps de reptilase pour explorer les anomalies du fibrinogène (dysfibrinogénémie et hypofibrinogénémie).
- la préparation de plasmas défibrinés nécessaires à la réalisation de certains tests au laboratoire

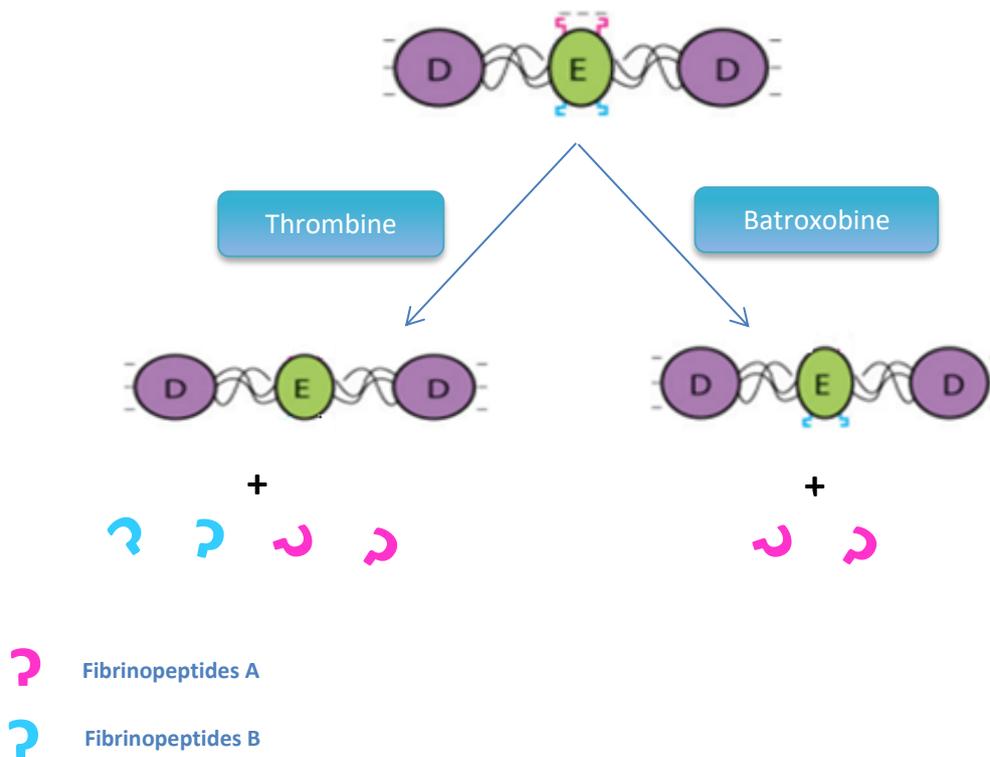


Figure 31 : Mécanisme d'action de la Batroxobine sur le fibrinogène en comparaison à la thrombine

### 5.1.1.3 Indications du temps de Reptilase

Le temps de reptilase est, comme le temps de thrombine (TT), sensible aux déficits qualitatifs ou quantitatifs en fibrinogène mais insensible à la présence d'héparine (HNF et HBPM) et d'inhibiteurs directs de la thrombine, à la différence du TT (118).

L'exploration d'un allongement isolé du TCA peut être réalisée par la prescription d'un temps de thrombine (TT). Le TT sera allongé en présence d'anticoagulant avec une activité anti-IIa ou d'une anomalie du fibrinogène. Le temps de Reptilase sera quant à lui allongé seulement en cas d'anomalie du fibrinogène au vu de ses propriétés. On peut ainsi réaliser un temps de thrombine et un temps de reptilase conjointement car les résultats de ces deux tests sont complémentaires. L'allongement de ces 2 temps doit faire évoquer une dysfibrinogénémie (acquise ou héréditaire) ou une hypofibrinogénémie (CIVD, ...).

## 5.1.2 *Dosage de la protéine C*

### 5.1.2.1 *Indications des dosages de protéine C*

Le dosage de la protéine C (PC) est essentiellement réalisé dans le contexte de bilan de thrombophilie. L'objectif est de rechercher un déficit en PC chez des patients ayant des antécédents thrombotiques veineux inexplicables personnels ou un antécédent familial de déficit en PC.

Les dosages antigéniques de la protéine C reposent sur des tests immunologiques tandis que les tests de détermination de l'activité de la protéine C sont des tests fonctionnels. Le dosage de l'activité est réalisé en première intention. Le dosage antigénique de la protéine C n'est réalisé qu'en seconde intention en cas de diminution du dosage fonctionnel afin de préciser le diagnostic. Cette approche permet de diagnostiquer à la fois les déficits quantitatifs dits de type I (protéine C réduite) et qualitatifs dits de type II (protéine C dysfonctionnelle).

Les tests fonctionnels peuvent être des tests coagulométriques ou bien des tests de type chromogénique reposant tous deux sur l'utilisation d'une protéase du serpent *Agkistrodon contortrix* (Protac®) capable d'activer la PC.

### 5.1.2.2 *Le Protac®*

Le Protac® est un produit commercial (American Diagnostica, Greenwich C.T., USA) contenant une protéine de type serine protéase issue du venin du serpent cuivré du sud *Agkistrodon contortrix contortrix*. Il correspond à une glycoprotéine à chaîne unique. Il s'agit d'un activateur de la protéine C d'action rapide et indépendant de la thrombomoduline découvert en 1985.

La protéine C est convertie en serine protéinase (PCa) qui possède des activités enzymatique et anticoagulante. La PCa peut ensuite, à l'aide de son cofacteur la protéine S, inactiver les facteurs VIIIa et Va par une dégradation protéolytique ce qui inhibe la génération de thrombine.

Les tests dépendant du Protac® sont utilisés dans les laboratoires diagnostiques pour la détermination des taux de protéine C et de protéine S dans le plasma afin de détecter des déficits en ces protéines pouvant augmenter le risque thrombo-embolique veineux.

### 5.1.2.3 *Dosage coagulométrique de la protéine C*

Le test de coagulation de la PC correspond à l'évaluation de l'action anticoagulante de la protéine C activée via la mesure d'un TCA en présence de phospholipides, d'activateur de phase contact et de calcium. Le plasma du patient est dans un premier temps dilué avec du plasma déficient en PC. L'utilisation d'un plasma déficient en protéine C permet de s'affranchir des déficits d'autres protéines plasmatiques (comme la protéine S). Dans un second temps, la PC est activée à l'aide du réactif activateur : le Protac®. Finalement, la coagulation est déclenchée par l'ajout de calcium.

L'augmentation du temps de coagulation est proportionnelle à l'activité de la protéine C dans le plasma du patient. La protéine C étant le facteur limitant, il en résulte une relation linéaire directe [Figure 32].

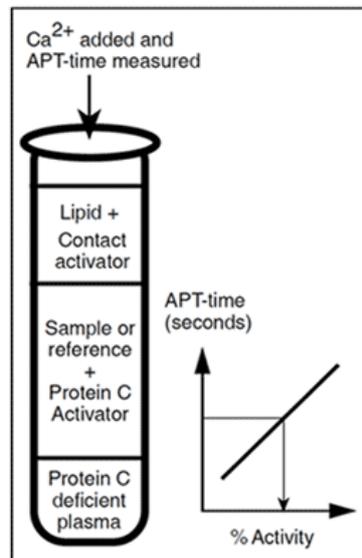


Figure 32 : Principe du dosage coagulométrique de la protéine C (d'après Diapharma (120))

Ce test est interprétable chez les patients traités par héparine. Le taux de PC (protéine vitamine K dépendante) est diminué sous AVK. L'activité mesurée de la PC pourrait être faussement diminuée chez les patients traités par l'aprotinine, capable d'inhiber la PCa (121). De même, le dosage coagulométrique de la PC est sous-estimé chez les patients traités par AOD.

Les dosages coagulométriques de la protéine C sont moins précis et plus variables d'un réactif à l'autre en comparaison aux tests chromogéniques. Cela peut s'expliquer par la sensibilité du test au FVIII (un taux élevé de facteur VIII est susceptible de raccourcir le temps de coagulation et d'induire une sous-estimation du taux de PC (120)) ou par une composition variable des réactifs en phospholipidiques.

#### 5.1.2.4 Dosage chromogénique de la protéine C

Le test chromogénique repose sur l'utilisation du Protac<sup>®</sup> et d'un substrat chromogénique de la protéine C activée. Ce test est spécifique, de bonne précision et simple. La PC dans le plasma est activée grâce au Protac<sup>®</sup> puis la PCa clive un substrat chromogène. La mesure de l'activité enzymatique de la PCa repose sur la mesure de l'absorbance liée au substrat chromogène spécifique libéré. Par exemple, le chromogène 4-nitroaniline (pNA) peut être utilisé comme substrat, et sa libération sera mesurée à une longueur d'onde de 405nm (122) [Figure 33]. Cette mesure peut s'effectuer soit pendant la réaction dans une cuvette de photomètre (méthode cinétique), soit de façon discontinue en arrêtant la réaction avec de l'acide acétique ou citrique (méthode du point final). Le signal photométrique est proportionnel à l'activité enzymatique.

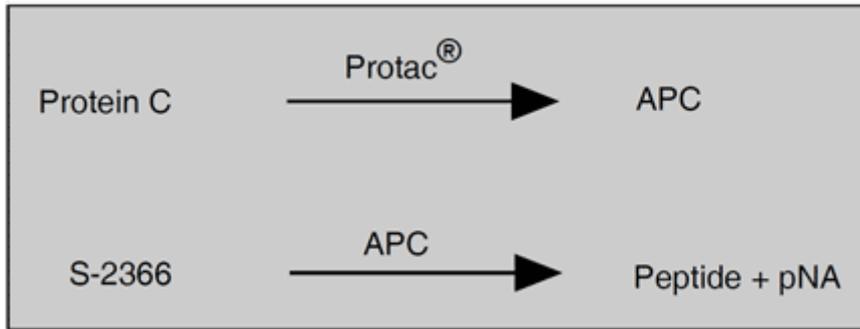


Figure 33 : Principe du dosage chromogénique de l'activité de la protéine C (d'après Diapharma (120))

L'intérêt du Protac<sup>®</sup> réside aussi dans son incapacité à hydrolyser significativement des substrats chromogènes de la protéine C activée. De plus, étant un activateur d'action rapide, le Protac<sup>®</sup> minimise l'action des inhibiteurs de la protéine C.

### 5.1.3 Test de résistance de la protéine C activée (RPCa)

La RPCa peut être héréditaire ou acquise. Elle se caractérise par l'incapacité de la PCa à inhiber les cofacteurs FVa et/ou FVIIIa. La principale cause de résistance à la PCa est la mutation du facteur V Leiden, qui est une anomalie thrombophile fréquente à l'état hétérozygote (5 à 7% de prévalence). A l'état hétérozygote, cette mutation augmente le risque de premier épisode de MTEV d'environ 5 fois et bien plus à l'état homozygote. En effet, le Facteur V Leiden présente la mutation p.Arg506Gln au niveau d'un site de clivage naturel de la PCa le rendant résistant à la protéolyse exercée par la PCa. De même, le facteur V Leiden ne peut pas être converti par la PCa en un cofacteur PCa fonctionnel, ce qui conduit à une inactivation inefficace du FVIIIa [Figure 34].

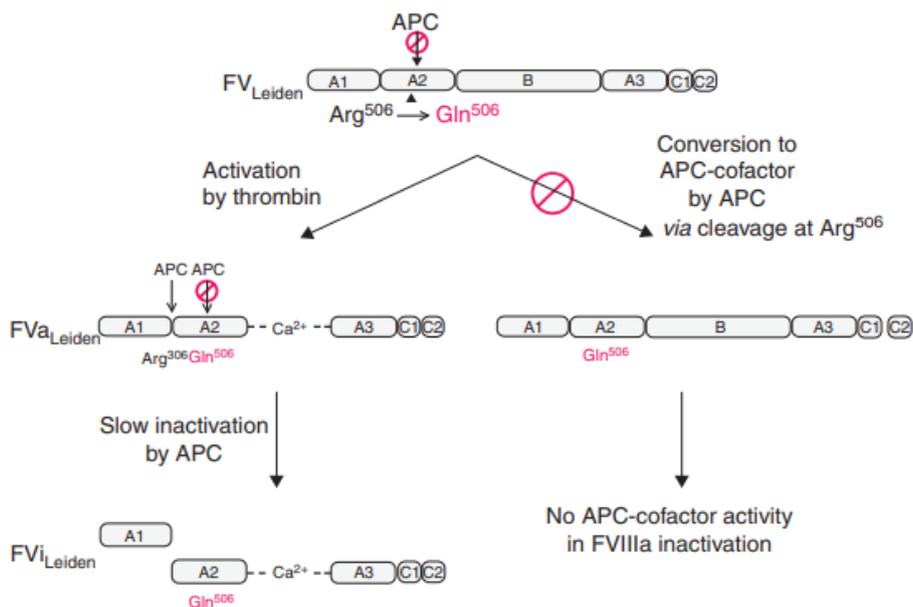


Figure 34 : Mécanismes moléculaires de RPCa du FV Leiden (d'après Castoldi et al (123))

Des tests de mesure de la RPCa ont été mis au point pour dépister cette anomalie. Bien que les tests de mesure de la RPCa aient été pendant longtemps utilisés, il est désormais préconisé de rechercher directement la mutation Facteur V Leiden par biologie moléculaire.

Toutefois, nous allons détailler les tests de RPCa existants qui utilisent des protéases ophidiennes [Figure 37].

### **5.1.3.1 Mesure d'un temps Noscarine en présence de RVV-V**

#### *5.1.3.1.1 RVV-V*

RVV-V est une serine protéase (SVSP) isolée du venin de la vipère Russel (*Daboia russelii*). C'est un activateur du facteur V.

Physiologiquement, les facteurs Xa et IIa (thrombine) activent le facteur V dans la cascade de la coagulation. Pour cela, ils clivent 3 liaisons spécifiques : Arg709-Ser710, Arg1018-Thr1019 et Arg1545-Ser1546. Ces coupures enzymatiques permettent d'éliminer le domaine B hautement glycosylé du facteur V, ce qui entraîne l'exposition du site de liaison pour le FXa [Figure 35.A]. À la différence du facteur Xa et de la thrombine, RVV-V ne clive qu'une seule de ces liaisons : Arg1545-Ser1546 [Figure 36.B]. Ainsi, le domaine B glycosylé n'est pas éliminé mais le facteur V clivé a tout de même la capacité de se fixer au facteur Xa (124). A part le facteur V, il n'est connu aucun autre substrat du RVV-V.

L'activité du RVV-V est mesurée in vitro par sa capacité à activer le facteur V. Ensuite, le facteur Va généré est testé par sa capacité à corriger le temps de coagulation du plasma humain déficient en facteur V. La correction du temps de coagulation est proportionnelle à la concentration de facteur Va présente et donc à l'efficacité de RVV-V à convertir le facteur V en Va (125).

L'activité du FVa disparaît au bout de 20 heures (126). N'étant pas stable dans le temps, RVV-V peut être utilisé pour déstabiliser et inactiver de manière sélective le facteur V contenu dans le plasma. On peut ainsi préparer des réactifs plasmas déficients en facteurs V utiles aux tests de détermination du taux plasmatique de facteur V (126).

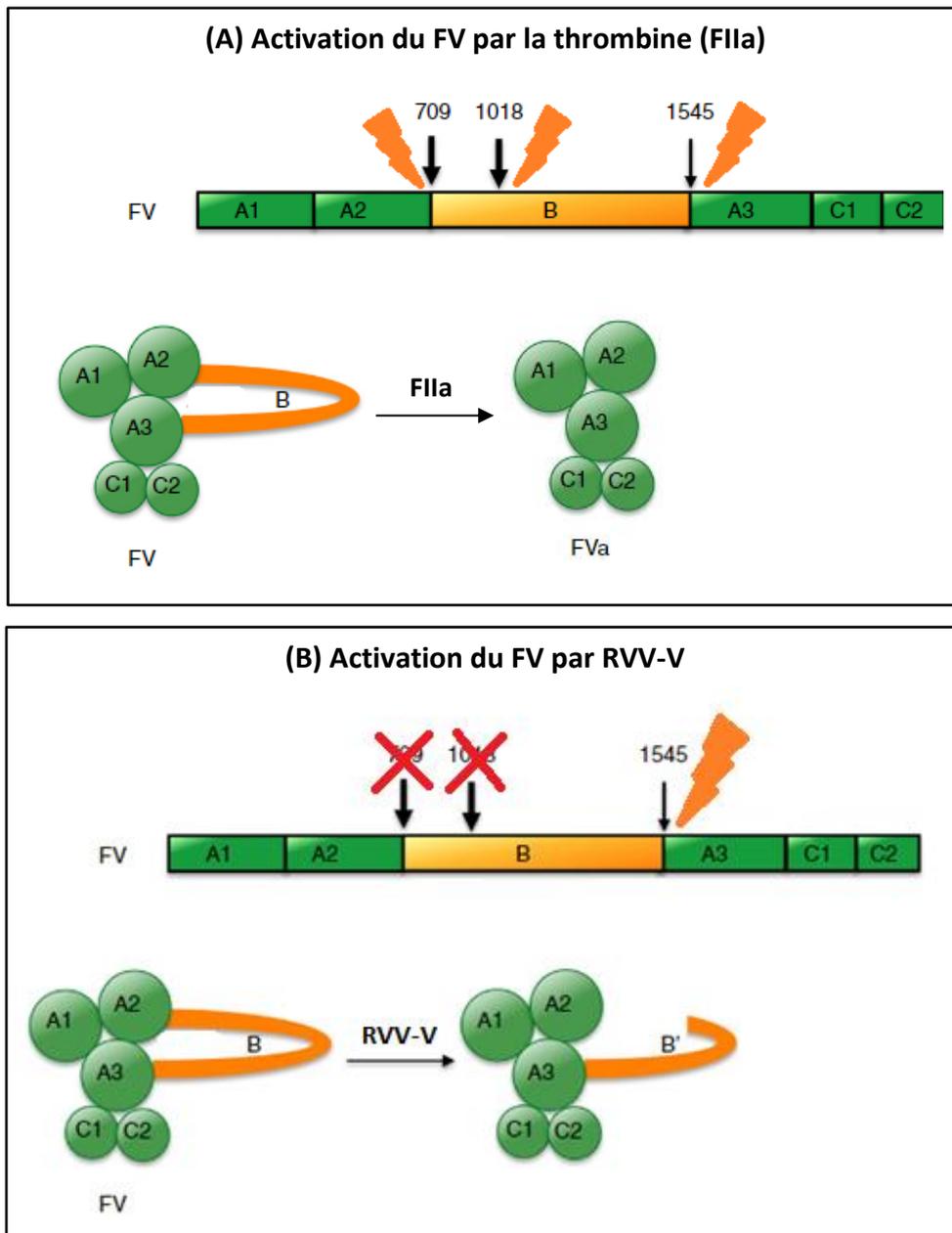


Figure 35 : Schéma d'activation du facteur V par la thrombine (A) et par RVV-V (B) (d'après D. Dahlbäck et al (127))

Arg1545 : site de clivage du RVV-V

#### 5.1.3.1.2 Principe du test

Le 1<sup>er</sup> test s'appelle le test Pefakit APCR facteur V Leiden (Pentapharm®). Dans ce test, le plasma du patient est dilué dans du plasma déficient en FV. Ensuite, un réactif contenant le RVV-V et la PCa est ajouté au plasma patient pour déclencher la coagulation [Figure 36 et Figure 37C]. A noter que le calcium n'est pas nécessaire à cette activation. Le RVV-V active le FV en FVa qui va lui-même être inactivé par la PCa. Dans une seconde étape, un réactif à base de Noscantine, protéase issue du venin de *Notechis scutatus* et activateur de prothrombine FVa dépendant est ajouté. Les temps de coagulation sont alors mesurés :

- chez les patients indemnes de mutation du facteur V Leiden et dans le plasma témoin, l'inhibition du FVa par la PCa entraîne un allongement du temps de coagulation.

- chez les patients porteurs de la mutation FV Leiden, le clivage protéolytique du FVa par la PCa en position 506 est défectueux. Par conséquent, l'activité du cofacteur FVa reste suffisante pour soutenir l'activation de la prothrombine par la Noscarine, et le temps de coagulation mesuré est raccourci.

Le même test est réalisé en parallèle en l'absence de PCa et permet de calculer un rapport du temps de coagulation avec/sans ajout de PCa. Ce rapport permet de classer les individus normaux (« wild type »), hétérozygotes et homozygotes. Une mutation homozygote donne classiquement un rapport inférieur à 1,0, une mutation hétérozygote, un rapport entre 1,0 et 2,0, et le type sauvage, un rapport supérieur à 2,0 (128).

Ce test s'affranchit des effets de l'héparine ou d'un lupus anticoagulant grâce à un inhibiteur de l'héparine. Toutefois, les inhibiteurs directs de la thrombine et les taux abaissés en facteur V (<50%) interfèrent avec le test (118).

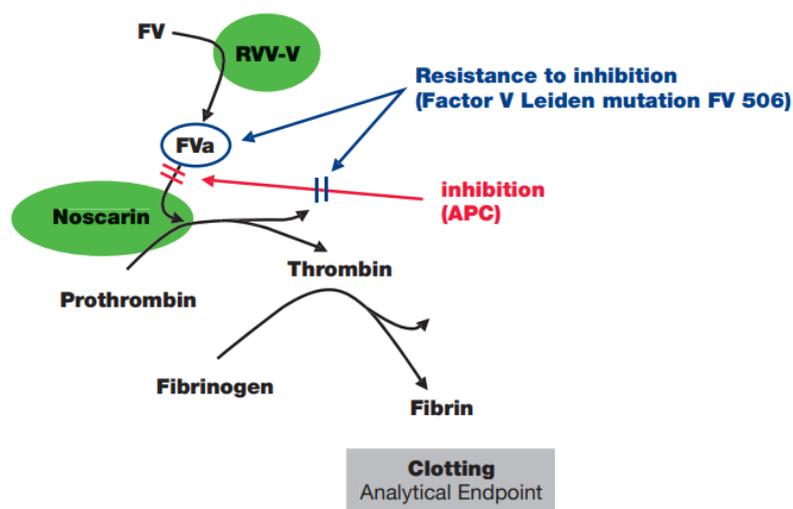


Figure 36 : Principe du test de résistance de la protéine C activée par la mesure d'un temps de noscarine (d'après Pentapharm® (129))

### 5.1.3.2 Mesure d'un dRVVT en présence de Protac®

Un deuxième test de RPCa est basé sur la mesure d'un dRVVT (Temps dilué de venin de vipère Russel) en présence de Protac® [Figure 37A].

En présence de calcium, le facteur X présent dans l'échantillon de plasma testé est directement activé en FXa par le RVV-X (mécanisme d'action décrit dans le chapitre 5.1.5.1.1 page 101). En présence de Facteur V, de calcium et de phospholipides, le FXa active la prothrombine en thrombine, et entraîne la

formation d'un caillot. Par conséquent, les anomalies des facteurs de la phase contact, les carences en FVII, FVIII et FIX n'impactent pas ce test.

Le Protac® est utilisé afin d'activer la protéine C contenu dans le plasma du patient. Le dRVVT mesuré va s'allonger en présence de PCa et sera plus court en présence de la mutation FV Leiden qui confère au FV une résistance à la protéolyse par la PCa.

Ainsi, chez les patients indemnes de mutation du facteur V Leiden, l'activation de la protéine C allonge le temps de coagulation de deux à trois fois alors que chez les individus porteurs de la mutation FV Leiden, l'activation de la PC par le venin n'induit qu'une prolongation minime, généralement inférieure à 1,5 fois (118).

### 5.1.3.3 Mesure d'un dRVVT en présence de PCa

Il existe un test assez similaire au précédent basé sur la mesure d'un temps de coagulation en présence d'un activateur de FX (*Crotalus viridis helleri* FX activator) proche d'un dRVVT. La principale différence réside dans l'ajout direct de PCa plutôt que de Protac® [Figure 37B].

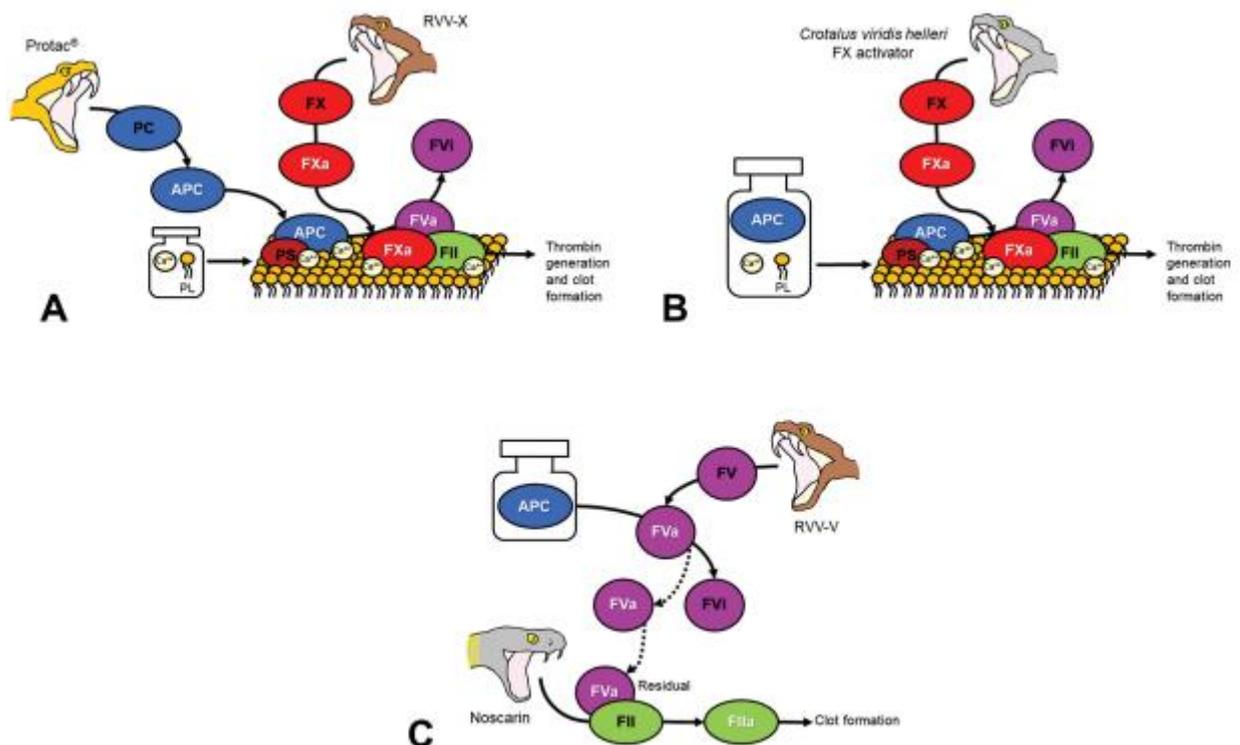


Figure 37 : Principes des tests de RPCa (d'après Moore et al(1))

A : Mesure d'un dRVVT en présence de Protac

B : Mesure d'un dRVVT en présence de PCa

C : Mesure d'un temps Noscarine en présence de RVV-V

### 5.1.4 Temps d'écarine et test chromogénique basé sur l'écarine

Avec l'essor des inhibiteurs directs de la thrombine au cours des dix dernières années, des tests permettant le dosage de ces médicaments ont dû être mis en place. Certains d'entre eux sont basés sur l'utilisation d'écarine. Il existe à la fois des tests de coagulation et des tests chromogéniques [Figure 39].

#### 5.1.4.1 L'écarine

L'écarine est une métalloprotéinase produite par le venin de vipère à écailles *Echis carinatus*. Ses propriétés sont l'activation spécifique de la prothrombine (FII) conduisant à la formation de meizothrombine.

Le processus d'activation de la prothrombine via écarine diffère significativement du processus physiologique assuré par le facteur Xa. Contrairement au FXa, l'écarine ne nécessite pas de cofacteurs ou d'ions calcium pour l'activation de la prothrombine (130). L'écarine ne peut cliver la prothrombine qu'au niveau du site Arg323-Ile324 alors que le FXa peut, en plus de ce clivage, réaliser un clivage en position Arg274. Ces 2 clivages par le FXa permettent in fine de générer de l'alpha-thrombine tandis que l'action de l'écarine sur la prothrombine génère seulement de la meizothrombine [Figure 38].

La meizothrombine correspond à la structure de la prothrombine après clivage du site de l'Arg323-Ile324 c'est-à-dire à la structure de l'alpha-thrombine succédant au fragment 1+2 (131).

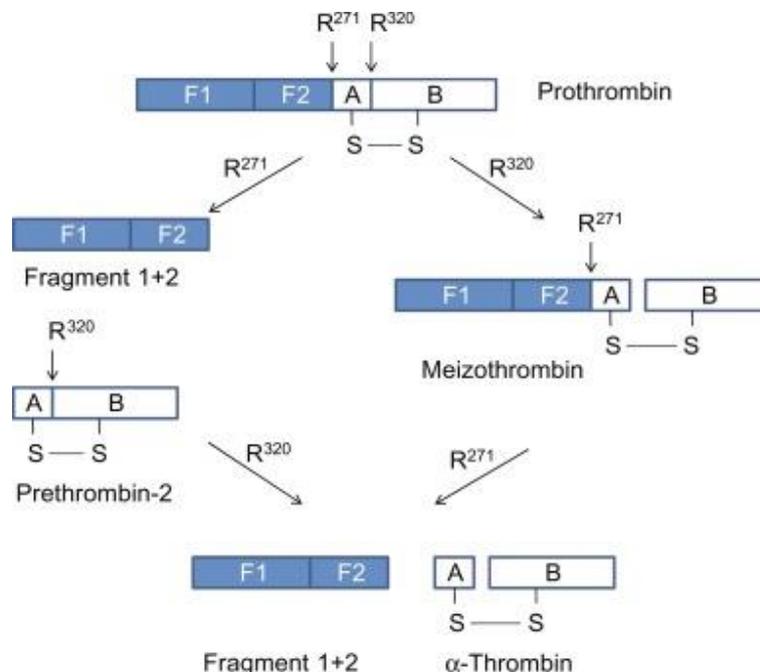


Figure 38 : Activation de la prothrombine (d'après Mijovski et al (132))

R271 (Arg274-Thr275) : site de clivage du FXa

R320 (Arg323-Ile324) : site de clivage de l'écarine et du FXa

La meizothrombine a le même poids moléculaire que la prothrombine mais le centre actif de la molécule est plus difficilement atteignable par les substrats naturels tel que le fibrinogène (132) en comparaison à l'alpha-thrombine. Par conséquent, les inhibiteurs directs de la thrombine (comme l'argatroban ou le dabigatran) peuvent inhiber la meizothrombine en raison de leur petite taille ce qui n'est pas le cas de l'héparine en raison de l'encombrement stérique trop important du complexe héparine-antithrombine (133).

L'écarine est utilisée dans les tests de la coagulation pour la mesure de l'Ecarin Clotting Time (ECT) et Ecarine Chromogenic Assay (ECA) pour doser des anticoagulants inhibiteurs directs de la thrombine (argatroban, dabigatran et hirudine).

#### **5.1.4.2 Ecarin clotting time (ECT)**

Le principe du temps d'écarine (Ecarin clotting time) repose sur l'ajout d'une faible quantité d'écarine au plasma qui convertit la prothrombine en meizothrombine. En présence d'inhibiteurs directs de la thrombine, la meizothrombine est inhibée et le temps de coagulation est allongé. Ce test permet d'évaluer l'effet et de doser les anticoagulants anti-IIa directs (Hirudine, Dabigatran, Argatroban).

Jusqu'à récemment, l'ECT a été largement utilisé comme outil de recherche et sa disponibilité était assez limitée. De nouveaux kits commerciaux sont maintenant commercialisés. Toutefois, ces kits n'ont pas été standardisés ou validés avec le dabigatran.

Il convient également de noter qu'étant donné la sensibilité de l'ECT à la prothrombine et au fibrinogène présent dans l'échantillon, des perturbations de ces paramètres sont susceptibles d'impacter les mesures de temps d'écarine. En effet, un taux faible de prothrombine (FII) ou une hypofibrinogénémie entraînera des temps de coagulation faussement élevés, sans rapport avec les concentrations d'inhibiteurs directs de la thrombine. Pour ces raisons, l'ECT n'est pas recommandé pour la surveillance d'urgence des effets des anticoagulants (131).

#### **5.1.4.3 Ecarin chromogen assay (ECA)**

Le test chromogénique à base d'écarine (ECA) permet les mesures des concentrations d'inhibiteurs direct de thrombine tel que le dabigatran ou encore l'argatroban.

Pour ce test, sont ajoutés au plasma citraté :

- un substrat chromogénique spécifique de la meizothrombine
- de la prothrombine humaine en excès
- un réactif à base d'écarine

Au cours de ce test, le substrat chromogénique est clivé par la meizothrombine formée libérant un chromophore. La mesure de l'absorbance par spectrophotométrie est réalisée suite à son relargage. La concentration en inhibiteur de thrombine est inversement proportionnelle à l'absorbance. Une

calibration permet de convertir la variation de densité optique en concentration en inhibiteur de thrombine (en ng/mL).

L'ECA n'est pas sensible à l'héparine car l'héparine ne possède pas d'action inhibitrice sur la meizothrombine au contraire de plus petites molécules telles que le dabigatran ou l'argatroban. Ce test s'affranchit également de perturbations qualitatives ou quantitatives en prothrombine, en fibrinogène (contrairement à l'ECT) et n'est pas influencé par la présence d'AVK.

Pour les patients traités au dabigatran, les tests basés sur l'écarine ont montré une réponse plus linéaire à la concentration du médicament qu'avec le TCA. Il y a également moins de variations interindividuelles.

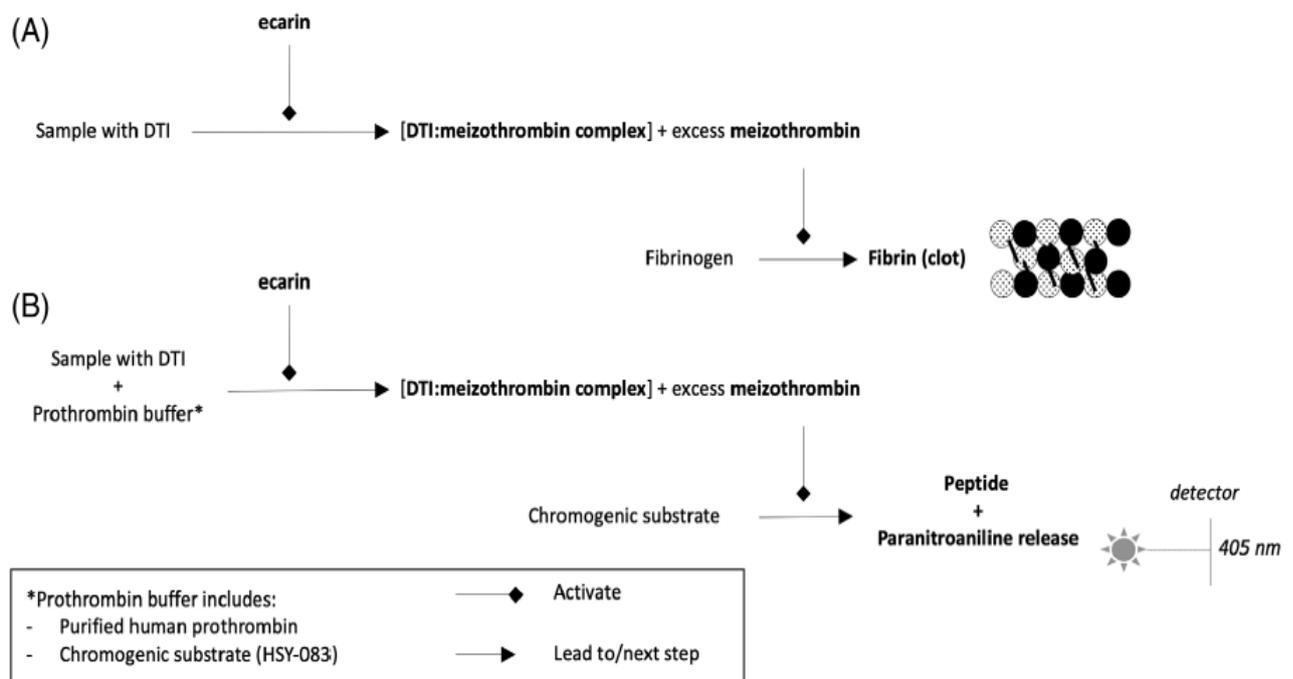


Figure 39 : Principes des tests de coagulation et chromogénique faisant intervenir l'écarine (d'après Gosselin et al (131))

(A) Test coagulométrique : Ecarin clotting time (ECT)

(B) Test chromogénique : Ecarin chromogen assay (ECA)

### 5.1.5 Tests impliqués dans la recherche de lupus anticoagulant

La recherche de lupus anticoagulant est réalisée notamment dans le cadre de bilan de thrombophilie pour dépister un syndrome des antiphospholipides (SAPL) en association à la recherche d'anticorps anti-phospholipides. Cette recherche peut également être prescrite dans le cadre d'une exploration d'un TCA allongé. L'ISTH recommande la réalisation de deux tests sensibles de dépistage du lupus anticoagulant évaluant des composants différents de la voie de la coagulation afin de détecter de manière large ces ACC (Temps de venin de vipère Russel dilué (également appelé temps de Stypven) et TCA sensibilisé). Si les tests de dépistages reviennent positifs, ils seront confirmés par des tests de mélange et de confirmation.

### 5.1.5.1 Temps de venin de vipère Russel dilué dRVVT

Il s'agit d'un test de coagulation réalisé pour la recherche d'anticoagulant circulant (ACC) de type lupique (lupus anticoagulant). Le temps de venin de vipère Russell dilué (dRVVT = diluted Russel Viper Venom Time) est un test fiable, spécifique et robuste qui fait partie des 2 tests de dépistage à réaliser pour mettre en évidence un lupus anticoagulant. Pour réaliser le dRVVT, un réactif à base de RVV-X est utilisé.

#### 5.1.5.1.1 RVV-X

RVV-X est une métalloprotéinase (SVMP) issue du venin de la vipère Russel (*Daboia russelii*). Cette protéase est un activateur spécifique du facteur X qui clive la liaison peptidique entre Arg194 et Ile195 de la chaîne lourde du facteur X comme le font les facteurs IXa et VIIa dans la cascade de la coagulation physiologique [Figure 40]. Cette coupure enzymatique libère le peptide d'activation du facteur X et permet d'exposer pleinement le site actif du facteur X. Au final, RVV-X conduit à l'activation de la voie commune de la coagulation.

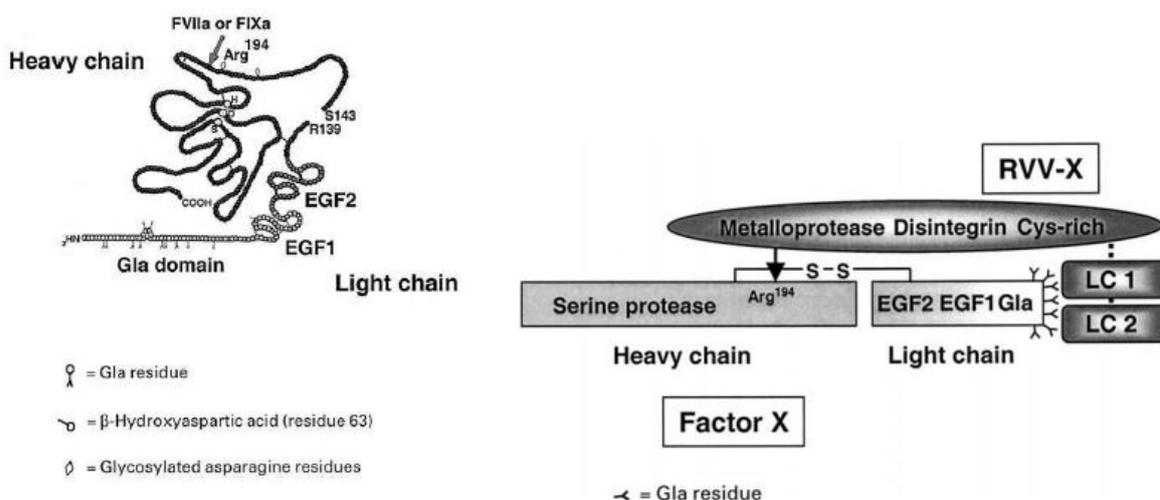


Figure 40 : Schéma du facteur X avec site d'activation par RVV-X (d'après G. Tans et al (134))

RVV-X est composé de deux domaines à liaison intersulfure, d'une chaîne lourde et de deux chaînes légères. La chaîne lourde de RVV-X contient les domaines de type métalloprotéinase, désintégrine (sans séquence RGD) et des domaines riches en cystéine [Figure 41]. Cette chaîne lourde possède le site catalytique de l'enzyme. Tandis que les chaînes légères contiennent des domaines lectine de type C (135) qui seraient responsables d'une régulation de l'activation du facteur X  $Ca^{2+}$  dépendante (134). Pour son activité protéolytique, cette enzyme nécessite la présence de  $Ca^{2+}$  et l'accès au domaine Gla (N-terminal) du facteur X (136). RVV-X est également capable d'activer le facteur IX et la protéine C du fait de la présence de leur domaine Gla comparable à celui du facteur X (134).

Grâce à cette propriété d'activation du facteur X, le RVV-X a été largement utilisé comme outil afin d'étudier la cascade de coagulation. RVV-X est également utilisé comme réactif de diagnostic pour le dosage plasmatique du facteur X et comme agent hémostatique topique. À visée diagnostique, RVV-X est cependant essentiellement utilisé dans un test dénommé Temps de Stypven (ou Temps de Venin de Vipère dilué) pour la recherche de lupus anticoagulants (ACC lupiques).

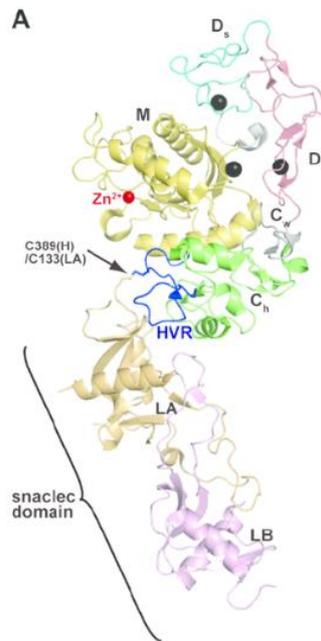


Figure 41 : Structure de RVV-X (d'après S. Takeda et al (137))

LA, LB : chaînes légères du RVV-X entrant en interaction avec le domaine Gla du FX.  
M : domaine métalloprotéinase  
D : domaine désintégrine  
C : domaine riche en cystéine

#### 5.1.5.1.2 Principe du test dRVVT

Le réactif RVV-X est utilisé pour activer le facteur X. La réaction a lieu dans un système contenant des quantités limitées de phospholipides dilués de cerveau de lapin. La présence de lupus anticoagulant prolonge le dRVVT en interférant avec la formation du complexe prothrombinase (138). En effet, ces anticorps de type lupique sont capables de se lier à la  $\beta$ 2-glycoprotéine I ou à la prothrombine, interférant sur le complexe prothrombinase (prothrombine, facteurs Xa et Va, calcium et phospholipides) et empêchant la conversion de la prothrombine en thrombine (139).

Si le dRVVT (dépistage) est allongé (ratio patient/témoin habituellement > 1.2), le même test est alors réalisé après ajout de phospholipides en excès permettant de neutraliser cet ACC. Ce test correspond au dRVVT de confirmation [Figure 42].

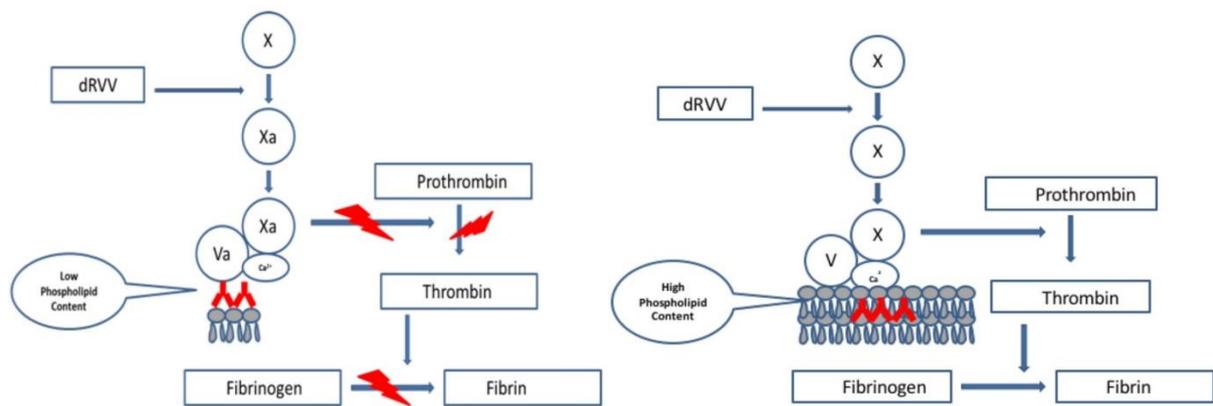


Figure 42 : Principe des tests de dRVVT de screening et de confirmation (d'après L.J. Smith et al (140))

Pour la réalisation de ce test sont nécessaires (141) :

- du plasma pauvre en plaquettes : source de facteurs de coagulation.
- du venin de vipère de Russell dilué (RVV-X): la sensibilité aux anticorps antiphospholipides est maximisée lorsqu'il est dilué et donne un temps de coagulation dans le plasma normal compris entre 30 et 35 secondes
- des phospholipides : servant de surface pour la réaction de coagulation. Leur quantité doit être restreinte pour qu'ils soient l'étape limitante de la coagulation et que l'inhibition par un lupus anticoagulant prolonge la coagulation.
- du calcium.

Le dRVVT évalue sélectivement la conversion de la prothrombine en thrombine par les facteurs Xa en présence de son cofacteur Va; cela explique une plus haute spécificité du test aux lupus anticoagulant en comparaison des tests globaux où les étapes de la coagulation en amont de l'activation du facteur X sont significatives (142). En effet, l'utilisation de RVV-X rend ce test peu sensible aux éventuelles anomalies de la coagulation associées (déficits en facteurs de la voie endogène et déficit en facteur VII).

Toutefois, un traitement anticoagulant concomitant par héparine, warfarine ou inhibiteurs directs de la thrombine peut donner des résultats faussement positifs. L'héparine interfère via l'augmentation de l'activité de l'antithrombine qui conduit à une inhibition des facteurs IIa, IXa, Xa, XIa, XIIa et de la kallikréine. Les temps de coagulation sont alors prolongés indépendamment de la présence d'un lupus anticoagulant. De même, la lépirudine, le danaparoiide et l'argatroban via leur action inhibitrice du FIIa peuvent également prolonger les temps de coagulation (143). Il est donc recommandé de vérifier l'absence de traitement par de tels médicaments avant la réalisation de ces tests pour s'assurer que les résultats rendus ne soient pas de faux positifs. Il est également possible d'éliminer certains anticoagulants (AOD) du plasma via un traitement de l'échantillon de plasma par du charbon activé.

D'autres protéases ophidiennes ont été proposées pour être utilisées dans les tests de dépistage des ACC tels que les temps de textarine et de venin de Taipan.

#### **5.1.5.2 Temps de textarine**

La textarine est une protéase du venin du serpent brun oriental australien *Pseudonaja textilis* dont les propriétés sont l'activation de la prothrombine en meizothrombine en présence de phospholipides, de facteur V et d'ions calcium contrairement à l'écarine capable d'activer la prothrombine en l'absence de tout cofacteur (phospholipides, calcium).

Le temps de textarine et le temps d'écarine ne sont pas impactés de la même manière par la présence de lupus anticoagulant du fait d'une différence de dépendance de ces 2 tests à la présence de phospholipides. Le temps de textarine est prolongé tandis que le temps d'écarine n'est pas affecté par la présence de lupus anticoagulants. Un ratio des temps textarine/écarine est établi à partir des résultats : au-dessus d'un seuil de 1.3, le ratio temps de textarine/temps d'écarine est un marqueur de positivité du lupus anticoagulant (144). Ce ratio est insensible aux AVK et aux inhibiteurs directs du facteur Xa. Toutefois, un déficit en facteur V ou la présence d'inhibiteurs de la thrombine peuvent dans certains cas interférer sur les tests et donner des résultats faussement positifs.

#### **5.1.5.3 Temps de venin de Taipan**

De la même manière que pour le ratio textarine/écarine, il est possible dans le cadre du dépistage de lupus anticoagulant, de réaliser un ratio taipan/écarine.

Le venin de vipère Taipan *Oxyuranus scutellatus* est capable d'activer la prothrombine en présence de phospholipides et de calcium. Son action est indépendante du facteur V à la différence de la textarine. Il n'est pas sensible aux déficits en facteurs autres que la prothrombine (145). Plus le rapport temps taipan/écarine réalisé est élevé, plus la probabilité de la présence d'un lupus anticoagulant est élevée (146).

Il faut rappeler que les lupus anticoagulants sont très hétérogènes et ne sont pas détectés par tous les tests. Ainsi un test négatif ne permet pas d'exclure totalement la présence d'un lupus anticoagulant. Il est recommandé de réaliser un second test mettant en jeu une autre voie afin de s'assurer de la négativité du test de dépistage.

### 5.1.6 *Dosage du facteur X*

Le facteur X peut être dosé grâce à un test basé sur le temps de Quick en une étape. Cette méthode est la plus répandue et repose sur la mesure d'un temps de coagulation à 37°C d'un plasma pauvre en plaquette dilué dans un plasma déficient en facteur V et recalifié en présence de thromboplastine. Cependant, il existe également des tests de détermination du taux de facteur X utilisant des protéases de serpents soit par méthode coagulométrique soit par méthode chromogénique.

Pour le test coagulométrique, le plasma est dilué avec un plasma déficient en facteur X puis est incubé en présence de RVV-X, activateur du facteur X (voir chapitre 5.1.5.1.1 page 101). La coagulation est initiée par l'ajout de calcium. Le temps de coagulation est alors mesuré et la concentration de FX dans le plasma à tester peut être établie grâce à une courbe de calibration.

Le test chromogénique utilise un substrat spécifique, qui est clivé par le FXa généré par le RVV-X, produisant une couleur détectée par spectrophotométrie.

Ces tests permettent de mettre en évidence un déficit en facteur X dans le cadre d'une exploration d'un TP diminué (carence en vitamine K, traitement par AVK, déficit congénital en facteur X, amylose, inhibiteurs acquis du facteur X).

### 5.1.7 *Test de génération de thrombine pour caractériser de nouvelles protéases ophidiennes d'intérêt*

Les tests d'hémostase classiques utilisés dans les laboratoires ne sont pas capables d'évaluer globalement toutes les étapes de l'hémostase. Ils ne fournissent pas d'informations sur les phases d'amplification et d'inhibition naturelle de la coagulation. De même, une des principales limites des tests de routine comme le TP ou le TCA est qu'ils sont peu sensibles aux états hypercoagulables, étant pertinents seulement pour la détection de certains états hypocoagulables. Il est pourtant légitime de vouloir appréhender la coagulation dans sa globalité et notamment l'effet hémostatique d'un venin de serpent car il est composé d'une multitude de protéines ayant des effets pro et/ou anti-coagulants (147).

Le test de génération de thrombine (TGT) est un test global de la coagulation à la fois sensible aux états d'hyper et d'hypocoagulabilité selon les conditions expérimentales. Il quantifie la thrombine générée au cours du temps et intègre à la fois les mécanismes pro- et anticoagulants. Il est essentiellement utilisé dans le domaine de la recherche. Certains paramètres ont montré une corrélation avec le risque hémorragique ou thrombotique dans certaines populations.

Le TGT repose sur une mesure de l'activité protéolytique de la thrombine grâce à l'utilisation d'un substrat chromogénique ou fluorogénique après avoir déclenché la coagulation le plus souvent par un mélange de facteur tissulaire (de l'ordre de 1 à quelques pM), de phospholipides et de calcium. Le

signal généré par la libération du chromophore ou fluorophore est mesuré en continu pendant environ 1 heure et est proportionnel à la quantité de thrombine dans le plasma.

La méthode du thrombogramme automatisé calibré (CAT) est le système le plus répandu basé sur un substrat fluorogénique de la thrombine. C'est un système ouvert, dans lequel différentes substances peuvent être introduites pour répondre à des questions spécifiques concernant la coagulation. Il peut s'utiliser sur des plasmas pauvres en plaquettes (PPP) ou riches en plaquettes (PRP).

Très schématiquement, en calculant la dérivée première de la courbe de fluorescence ou d'absorbance, on obtient la courbe de génération de thrombine. On décrit ainsi un temps de latence (correspondant au temps d'initiation de la coagulation), une phase ascendante correspondant à l'amplification et la propagation de la coagulation qui atteint un pic suivie d'une phase de résolution qui témoigne de l'action de différents inhibiteurs ou anticoagulants présents dans le plasma (PCa, AT et alpha-2-macroglobuline) (78). L'aire sous la courbe correspondant au potentiel endogène de thrombine (ETP) est également un paramètre d'intérêt [Figure 43].

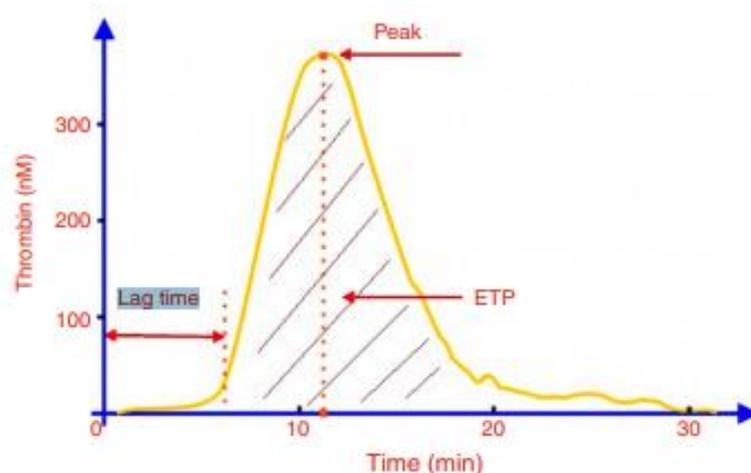


Figure 43 : Paramètres mesurés à partir du thrombogramme (d'après Duarte et al. (78))

Une hypocoagulabilité ou diminution de la génération de la thrombine sera caractérisée par une diminution de l'ETP et du pic. Au contraire une hypercoagulabilité, qui correspond à une augmentation de la production de thrombine, sera caractérisée par une diminution du temps de latence et une augmentation du pic et de l'ETP.

Bien que cette méthode souffre d'un manque de standardisation et d'un coût assez élevé, elle peut être utilisée pour évaluer l'effet pro-coagulant ou anticoagulant de diverses molécules ou traitements. Le TGT pourrait avoir un rôle dans l'étude en laboratoire des venins de serpent pour screener l'effet de certains venins avec notamment les modifications hémostatiques qu'ils impliquent entraînant des états d'hypocoagulabilité ou d'hypercoagulabilité.

Des études ont été conduites comme celle de Duarte (147) sur des serpents brésiliens (*Bothrox jararacussus*, *B. alternatus*, *B. moojeni* et *Crotalus durissus*) en utilisant pour la première fois des tests de génération de thrombine afin d'étudier l'effet de différents venins et de mieux appréhender les altérations hémostatiques causées par le venin de serpents. Duarte et al ont ainsi montré l'effet procoagulant des différents venins avec un raccourcissement du temps de latence et une augmentation de l'ETP et un plus grand effet procoagulant des venins de *B. jararacussu* et *B. moojeni* comparativement à *B. alternatus* et *C. durissus terrificus*. Ils ont aussi prouvé l'absence d'effet des venins aux mêmes concentrations sur les tests de coagulation de routine TP et TCA et concluent à une plus grande sensibilité du TGT pour évaluer in vitro l'effet hémostatique des venins. Grâce à de telles études, on peut envisager de découvrir et/ou caractériser de nouvelles protéases ophidiennes d'intérêt.

## 5.2 Tests sur les plaquettes

Les protéases de venins de serpents peuvent également être utilisées pour la réalisation de tests plaquettaires afin notamment d'approfondir la recherche sur l'agrégation plaquettaire.

### 5.2.1 Mesure de l'activité Willebrand avec la Botrocétine

La botrocétine est une lectine de type C issue du venin de serpents *Bothrops* sp qui possède des propriétés d'activation et d'agglutination des plaquettes en association avec le facteur Willebrand. Le facteur Willebrand est une glycoprotéine essentielle à l'adhésion des plaquettes au collagène sous-endothélial. La botrocétine provoque une activation des plaquettes via la glycoprotéine Ib (GPIb) par l'intermédiaire du domaine A1 du VWF, ce qui entraîne l'agglutination des plaquettes (148). Elle a été utilisée au même titre que la ristocétine pour induire une agrégation plaquettaire facteur Willebrand dépendante et objectiver une diminution d'affinité du VWF pour la GPIb qu'on retrouve dans certains types de maladie de Willebrand.

La botrocétine fait agréger les plaquettes en présence de multimères de haut poids moléculaire du Facteur Willebrand. Ainsi, en présence de botrocétine, la liaison du VWF aux plaquettes est normale dans le type 2M, alors qu'elle est anormale dans le type 2A (149,150). En comparaison, avec la ristocétine la liaison est anormale aussi bien dans les types 2M que 2A. La botrocétine et la ristocétine peuvent donc être employés conjointement pour distinguer différents types de maladies de Willebrand.

### 5.2.2 Test d'agrégation plaquettaire avec la convulxine

La convulxine est une protéine de la famille des lectines C isolée à partir du venin de serpent à sonnette *Crotalus durissus terrificus*. Elle agit comme un puissant activateur plaquettaire et participe à l'agrégation de celles-ci principalement par l'intermédiaire d'un des récepteurs du collagène, la GPVI (151).

Les tests d'agrégation plaquettaire sont réalisés pour évaluer in vitro les fonctions plaquettaires de patients chez qui on suspecte une thrombopathie devant des antécédents hémorragiques personnels ou familiaux. Pour ce test, un panel d'inducteurs plaquettaires est habituellement réalisé en 1<sup>ère</sup> intention (acide arachidonique, ADP, collagène, adrénaline, ristocétine). En l'absence d'agrégation plaquettaire isolée au collagène, on peut suspecter un déficit plaquettaire rare constitutionnel ou acquis en GPVI. La convulxine est alors utilisée le plus souvent comme agoniste de seconde intention. Un défaut d'agrégation plaquettaire à la convulxine confirmera le déficit de la GPVI. En effet, la convulxine est particulièrement efficace pour activer la signalisation GPVI du fait de son affinité pour cette glycoprotéine (152) ce qui conduit à l'activation plaquettaire avec libération d'ADP et de thromboxane A2 et mobilisation du calcium intraplaquettaire (153). En cas de déficit en GPVI sur les plaquettes du patient, on observera sur les test d'agrégation plaquettaire un défaut d'agrégation de celles-ci en présence de l'agoniste convulxine [Figure 44].

Ces tests permettent d'explorer des déficits en GPVI ou dans la signalisation de ce récepteur plaquettaire entraînant un défaut d'agrégation des plaquettes via le collagène. Les études conduites chez la souris suggèreraient que chez l'homme, la perte de l'intégrine  $\alpha 2\beta 1$  ou du GPVI est associée à un risque hémorragique léger (154).

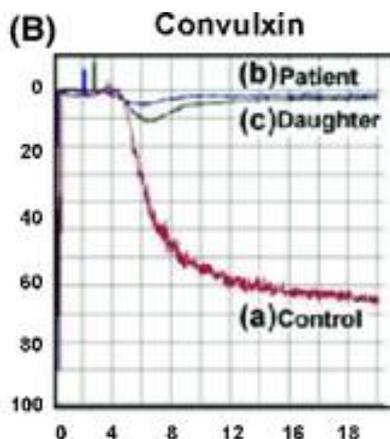


Figure 44 : Test d'agrégation plaquettaire avec la convulxine (d'après E. Gardiner et al (155))

Cible		Enzymes ( <i>serpent</i> )	Type de protéine	Fonction	Mesures/Tests	Applications
Fibrinogène		<b>Batroxobine (Reptilase)</b> ( <i>Bothrops atrox</i> )	Thrombine-like serine protéase	Clivage du fibrinogène avec relargage de fibrinopeptide A uniquement	<b>Temps de Reptilase</b>	Dysfibrinogénémie Défibrination de plasma
		<b>Ancrod (Viprinex)</b> ( <i>Agkistrodon rhodostoma</i> )			<b>Temps de Reptilase</b>	Dysfibrinogénémie Défibrination de plasma
Prothrombine	<b>Groupe A</b> (aucun cofacteur)	<b>Ecarine</b> ( <i>Echis carinatus</i> )	Métalloprotéinase	Activation spécifique de la prothrombine avec formation de meizothrombine	<b>Ecarin Chromogenic assay (ECA)</b> <b>Ecarin Clotting Time (ECT)</b>	Dosage des inhibiteurs direct de la thrombine
	<b>Groupe B</b> (Ca <sup>2+</sup> )	<b>Carinactivase 1</b> ( <i>Echis carinatus</i> )				Dosage FII (AVK)
	<b>Groupe C</b> (Ca <sup>2+</sup> , Phospholipides)	<b>Oscutarine C</b> ( <i>Oxyuranus scutellatus</i> )			<b>Temps de venin de Taipan</b>	LA screening test
	<b>Groupe D</b> (Ca <sup>2+</sup> , Phospholipides et Va)	<b>Textarine</b> ( <i>Pseudonaja textilis</i> )			<b>Temps de Textarine</b>	LA screening test
		<b>Noscarine</b> ( <i>Notechis scutatus</i> )			<b>Temps de Noscarine</b>	LA screening test

<b>FV</b>	<b>RVV-V</b> ( <i>Daboia russelii</i> )	Serine protéase (SVSP)	Activateur du facteur V	<b>Dosage FV</b> <b>RPCA</b>	Préparation de plasma déficient en facteur V
<b>FX</b>	<b>RVV-X</b> ( <i>Daboia russelii</i> )	Métalloprotéinase (SVMP)	Activateur du facteur X	<b>Temps de Venin de Vipère Russel dilué (dRVVT)</b>	LA screening test Dosage de FX (test chronométrique ou chromogénique)
<b>PC</b>	<b>Protac</b> ( <i>Agkistrodon contortrix contortrix</i> )	Serine protéase (SVSP)	Activateur de la protéine C d'action rapide	<b>Dosage PC</b> <b>RPCA</b>	Déficit en PC
<b>GpIb</b>	<b>Botrocétine</b> ( <i>Bothrops</i> sp)	Lectine de type C	Activateur plaquettaire via la GPIb par l'intermédiaire du domaine A1 du VWF	<b>Test d'agrégation plaquettaire</b>	Maladie de Willebrand
<b>GpVI</b>	<b>Convulxine</b> ( <i>Crotalus durissus terrificus</i> )	Lectine de type C	Activateur plaquettaire via un récepteur du collagène, la GPVI	<b>Test d'agrégation plaquettaire</b>	Déficit en GPVI

Tableau 16 : Résumé des principales protéines de venins de serpents utilisées pour des tests de laboratoire

## **Partie 2 (expérimentale) : évaluation et quantification de l'activité de 5 protéines de venins de serpents**

### **1. Introduction**

La société LATOXAN® a contacté le laboratoire d'hémostase du CHU Grenoble Alpes dans l'objectif d'évaluer et de quantifier l'activité de 5 protéases de venins de serpents à l'aide de tests coagulométriques. La batroxobine, le RVV-V, le RVV-X, le Protac® et l'écarine sont les protéases sur lesquelles nous avons réalisé des tests. Le but était de mesurer l'activité de différentes fractions de purification de ces protéines à partir de venins de serpents, issues de procédés de séparation et de purification variés (filtration, chromatographie, techniques électrophorétiques, adsorption ...) et de la comparer à celle d'une protéine de référence (commercialisée par Pentapharm®).

Latoxan® est une microentreprise française productrice de venins de serpents, mais également de scorpions et de batraciens en activité depuis 40 ans qui possède une bibliothèque de plus de 300 venins différents disponibles dans le monde entier. Son effectif est compris entre 3 et 5 salariés. Le siège social de la société est situé à Portes-Lès-Valence (Drôme, 26). L'entreprise possède à ce jour 200 spécimens en captivité représentant une vingtaine d'espèces de serpents en pension à Marne la Vallée depuis quelques années. La traçabilité est soignée avec la tenue de registres individuels de toutes les données relatives à l'origine, l'état de santé, les traitements, l'état d'alimentation et de traite de l'animal. Le venin de ces serpents est prélevé en moyenne une fois par mois par du personnel formé conformément aux bonnes pratiques en matière de bien-être animal. Ce venin est par la suite transformé en poudre sèche lyophilisée qui est commercialisée. Cette société fournit l'industrie pharmaceutique, les centres de recherche universitaires et pharmaceutiques ainsi que les distributeurs mondiaux de réactifs pour les sciences de la vie (156).

L'objectif de cette partie expérimentale a été de mettre en place des tests capables d'évaluer l'activité de ces 5 protéases ophidiennes pour tester les fractions de séparation/purification transmises par la société LATOXAN® et de la comparer à la protéine de référence déjà commercialisée.

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1 Généralités

Au cours de l'année 2022, la société Latoxan® a mis à notre disposition plusieurs lots de flacons numérotés correspondant à des fractions de purification/séparation de venins de serpent. Il y avait environ 4 à 12 flacons à tester pour chaque protéine dont l'un était le produit de référence commercialisé par Pentapharm®. Les autres correspondaient à des techniques de purification de la protéine d'intérêt dont seul Latoxan était avisé.

En se basant sur les données de la littérature et des protocoles de dosages déjà existants, nous avons pu définir les modes opératoires nécessaires à l'évaluation de l'activité de chacune de ces protéases. Des tests chronométriques ont été priorisés car moins chers par rapport aux tests colorimétriques lorsque les deux étaient possibles. Chaque temps mesuré l'était en double afin de s'affranchir de toute erreur de manipulation.

Les tests ont été conduits dans le laboratoire d'hémostase à l'Institut de Biologie et Pathologie du CHUGA.

### 2.2 Matériel

L'analyseur utilisé a été le semi automate START-4 (Diagnostica Stago®) [Figure 45]. Il s'agit d'un système de paillasse semi-automatique avec une détection électromécanique des caillots : lorsque le caillot est formé, le plasma rendu visqueux bloque l'oscillation d'une bille métallique en agitation grâce à un champ magnétique dans une cuvette. Il possède 16 puits d'incubation à  $37\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$  et 4 stations d'incubation chronométrées indépendamment. Cet appareil dispose également d'une pipette multiple reliée électroniquement ce qui permet un déclenchement immédiat du chronomètre lors de l'ajout du réactif déclencheur. Cet analyseur est adapté pour la réalisation de nos tests de faible à moyen volume. Il propose des tests programmables et préprogrammés. Les résultats des temps de coagulation s'affichent sur l'écran et sont également imprimés grâce à une imprimante interne. Cet analyseur nous a permis de réaliser plusieurs tests chronométriques, avec une consommation plus faible de réactifs que les automates de routine (car il n'y a pas de volume mort), et une possibilité de paramétrage nécessaire à l'élaboration des protocoles ainsi qu'à la réalisation des tests.

Pour la réalisation des tests, des pools de plasmas normaux issus de volontaires sains étaient nécessaires. Les numéros de lot ont été tracés et un même lot était utilisé au cours de chaque manipulation.



Figure 45 : Semi-automate START-4 (Diagnostica Stago®) (157)

## 2.3 Organisation

Une fois les protocoles définis, quelques tests ont d'abord été réalisés en priorité avec la molécule de référence (servant de témoin positif) afin de s'assurer de la faisabilité et de l'efficacité des protocoles. Puis, par la suite, les tests ont été conduits sur les autres flacons comprenant les molécules à tester. Les dilutions nécessaires étaient ajustées au fur à mesure en fonction des résultats trouvés.

## 2.4 Analyses des données

Concernant l'analyse des données, celles-ci étaient répertoriées dans des tableaux EXCEL puis analysées à l'aide de graphiques et d'équations (lorsque cela était possible ou indiqué).

## 3. Tests réalisés avec les 5 protéases

### 3.1 Batroxobine

#### 3.1.1 Objectifs

L'objectif de la mise en place d'un test coagulométrique pour la batroxobine a été de mesurer à l'aide d'un temps de reptilase l'activité de plusieurs lots d'échantillons fournis par Latoxan® qui contenaient de la batroxobine. Chaque lot correspond à une fraction de purification de venin obtenue à partir de différents procédés de purification et de séparation.

Nous avons également comparé l'activité de ces échantillons à l'activité d'une référence commerciale (Pentapharm®).

Le nombre d'unités (PCU ou Plasma Clotting Unit) contenue dans chacun des échantillons testés a également été déterminé en se référant à la définition suivante : 2 PCU (Plasma Clot Unit) sont définies comme la quantité d'enzyme dans 0,1 mL qui fait coaguler 0,3 mL de plasma citraté en  $19 \pm 0,2$  s. Un temps de coagulation de 19 secondes correspond d'après la définition à 2 PCU contenues dans 0.1 mL soit une concentration de batroxobine de 20 PCU/mL.

### 3.1.2 Protocole

Onze échantillons ont été testés en plus de la référence commerciale.

Chaque échantillon primaire (flacon étiqueté à 5U) qui contient une fraction de purification de venin est reconstitué par du tampon (150 mM NaCl 20 mM HEPES pH 7.38) pour obtenir une solution mère à 20 U/mL puis des dilutions en cascade sont effectuées.

Le temps de reptilase est réalisé pour chacune de ces dilutions en suivant le protocole ci-dessous sur l'automate START-4. Les réactifs étaient pré-incubés 4 min à 37°C. Puis, à 150  $\mu$ L de plasma normal étaient ajoutés 50  $\mu$ L de batroxobine et le temps de coagulation était mesuré.

Les résultats obtenus nous ont permis de réaliser des graphiques représentant le temps de reptilase en fonction de la concentration théorique en batroxobine dans le volume réactionnel et de déterminer une équation à partir de la courbe expérimentale [Figure 46]. Cette équation permet ensuite de déterminer la concentration en batroxobine correspondant au temps de coagulation de 19 secondes et de déduire le nombre de PCU de chacun des échantillons.

### 3.1.3 Résultats

Au total, 11 échantillons ont été testés (Bx-1 à Bx-6 puis Bx-A à Bx-F) en plus de la référence commerciale contenue dans les échantillons Bx-4 et Bx-G.

Pour la molécule de référence (Bx-G), un temps de 19 secondes correspond d'après l'équation de la courbe expérimentale [Figure 46] à une concentration de 4.09 U/mL dans le volume final (50  $\mu$ L Bx-G + 150  $\mu$ L plasma). La concentration en batroxobine est 4 fois plus importante dans les 50  $\mu$ L de Bx-G initiaux ce qui correspond à 16.4 U/mL. On précise de nouveau que cette concentration théorique est basée sur l'étiquetage du flacon. D'après l'étiquetage du flacon, 16,4 UI/mL correspondent donc à 20 PCU/mL. Ainsi 1 UI de la référence Bx-G équivaut à 1,22 PCU.

Aucune activité n'a été détectée avec les flacons Bx-1, Bx-2, Bx-3, Bx-5, Bx-6.

De nouveaux échantillons nous ont été adressés dans un second temps (Bx-A, Bx-B et Bx-C puis Bx-D, Bx-E, Bx-F) pour lesquels les résultats étaient négatifs escompté le flacon de batroxobine D (Bx-D) pour lequel on détectait une activité à 39,3 PCU. Un temps de 19 secondes correspond d'après l'équation de la courbe expérimentale de Bx-D à une concentration de 0.127 U/mL dans le volume final [Figure

46] soit 0,509 U/mL dans les 50 µL de Bx-D. Ainsi, 0,509 UI/mL correspondent à 20 PCU/mL. Au final, 1 UI de Bx-D équivaut à 39,29 PCU.

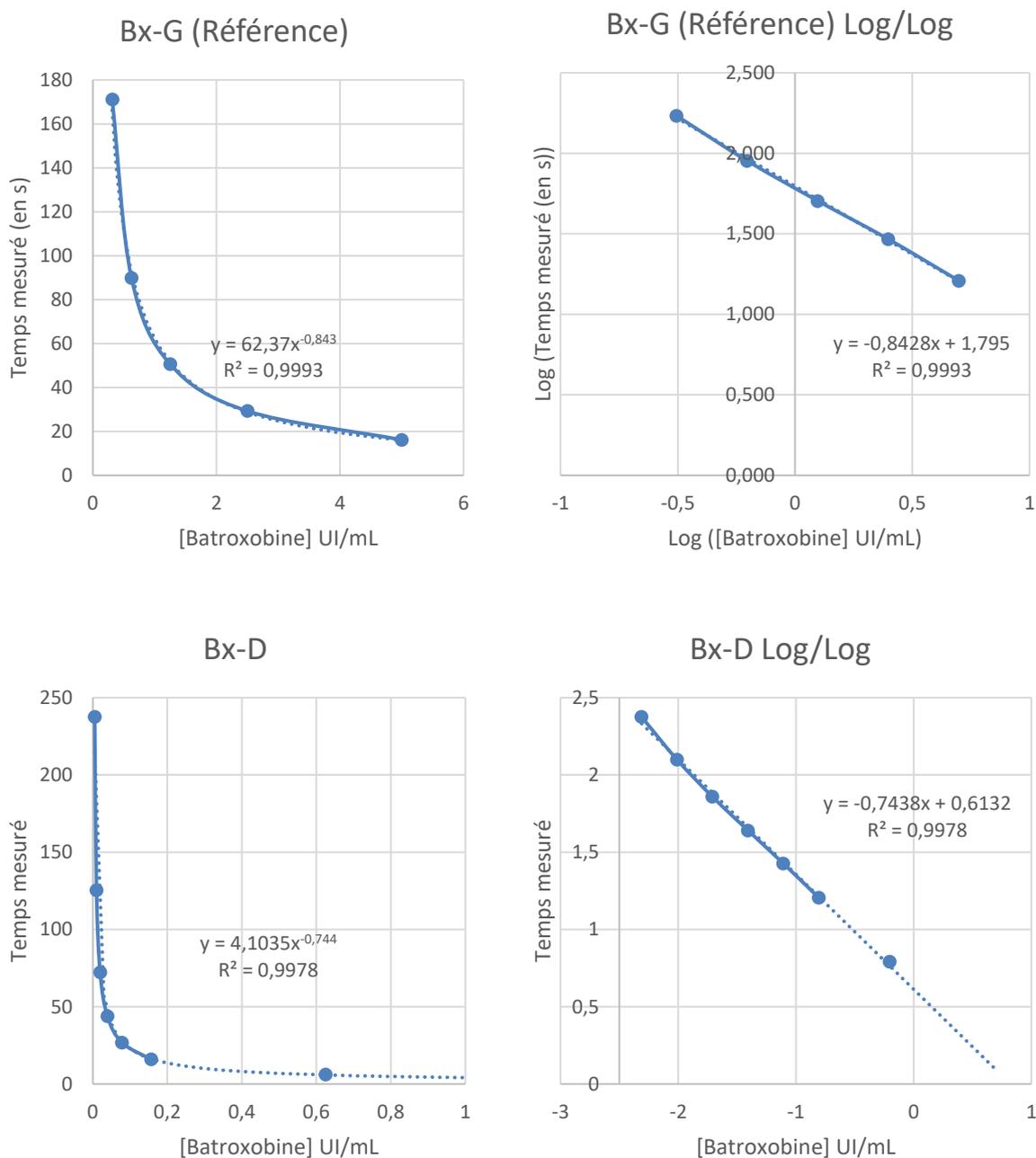


Figure 46 : Résultats des temps de reptilase réalisés avec la batroxobine de référence Bx-G (en haut) et de Latoxan Bx-D (en bas).

Les résultats numériques détaillés sont présentés dans un tableau en Annexe 1. La concentration de batroxobine en abscisse est la concentration dans le volume réactionnel final basé sur l'étiquetage des flacons reçus.

Le flacon de Batroxobine D était le seul pour lequel on détectait une activité mis à part les flacons contenant la protéine de référence de chez Pentapharm®. Il s'agit en fait de venin non purifié (8mg/mL), montrant que le venin extrait du serpent possède bien l'activité recherchée. Une hypothèse

pour expliquer l'absence d'activité dans les fractions purifiées est la possible dégradation de la batroxobine par l'un des traitements chimiques au cours des étapes de purification. De nouveaux essais de purification sont prévus et vont donner lieu à des tests à venir.

## **3.2 RVV-V**

### *3.2.1 Objectifs*

L'objectif a été de mesurer l'activité RVV-V dans 5 échantillons fournis par Latoxan® contenant des fractions purifiées de venin grâce à un test coagulométrique se basant sur la capacité du RVV-V à activer le FV.

Nous avons comparé l'activité de ces échantillons à l'activité de la molécule de référence (Pentapharm®).

Un autre objectif a été également de déterminer le nombre d'unités de RVV-V contenu dans l'échantillon en s'appuyant sur la définition suivante : une unité de RVV-V est la quantité de RVV-V nécessaire pour activer tout le FV contenu dans 1mL de plasma (126).

### *3.2.2 Protocole*

Cinq échantillons ont été testés en plus de la référence commerciale.

Chaque échantillon primaire (flacon étiqueté à 5U) qui contient une fraction de purification de venin est reconstitué par du tampon (150 mM NaCl 20 mM HEPES pH 7.38) pour obtenir une solution à 20 U/mL puis des dilutions en cascade sont effectuées.

Le protocole consistait d'abord en l'activation du FV par RVV-V. Pour cela, 20 µL des dilutions de RVV-V étaient ajoutés à 1 mL de plasma normal et le mélange était incubé 3 minutes à 37°C. Finalement, le mélange était dilué au 1:100 dans du tampon HEPES NaCl.

Enfin, le temps de coagulation était mesuré sur l'analyseur START-4. Pour cela, 50 µL de plasma déficient en FV initialement préchauffé à 37°C étaient mélangés à 50 µL du RVV-V dilué dans le tampon et à 100 µL de thromboplastine calcique.

### **Protocole :**

- 1) ETAPE 1 : Préparer le RVV-V
  - 2) ETAPE 2 : Activation du Facteur V par RVV-V
    - **10 µL** de dilution de **RVV-V**
    - Ajouter **500 µL** de **plasma normal**
    - Incubation du mélange **3 minutes à 37°C**
    - Puis Dilution au **1:100** du mélange dans du **tampon HEPES NaCl (10µL + 990µL Tampon)**
  - 3) ETAPE 3 : Mesure d'un temps de coagulation (sur START-4)
    - **50 µL** plasma **déficient en FV** (STAGO®) (pré-chauffé à 37°C)
    - Ajouter **50 µL** du **mélange plasma + RVV-V** (dilué dans tampon à l'étape 2) (préchauffé à 37°C)
    - Incuber 120 sec à 37°C
    - Ajouter **100 µL** de **Thromboplastine calcique** (STA-Neoptimal STAGO) (préchauffé à 37°C)
- Mesure du temps de coagulation à 37°C

L'activation du FV est complète quand l'augmentation de la concentration en RVV-V ne conduit plus à un raccourcissement du temps de coagulation.

Ainsi, à partir des graphiques représentant le temps de coagulation en fonction de la concentration théorique en RVV-V, on peut déterminer la plus faible concentration en RVV-V pour laquelle on atteint un plateau. Ce plateau correspondant au temps de coagulation le plus court est obtenu lorsque le RVV-V a activé tout le FV. Cette concentration permet ensuite de déterminer l'unité de RVV-V de chaque échantillon testé.

### *3.2.3 Résultats*

Initialement, 3 échantillons nous ont été adressés et ont été testés (RVV-V 1,3 et 4) en plus de RVV-V 2 correspondant à la référence commerciale. RVV-V 1 et RVV-V 4 n'ont montré aucune activité sur la coagulation. RVV-V 3 possède une très faible activité coagulométrique.

Les nouveaux flacons reçus dans un second temps (RVV-V A, RVV-V B et RVV-V C) ont montré de meilleurs résultats en termes d'activités.

La référence commerciale correspondait au flacon RVV-V C. Avec cette référence, on atteint bien un plateau vers 1 UI/mL (ce qui était attendu d'après la définition) puisque l'activité a été estimée à 0,98 U. Pour RVV-V B, l'activité correspondait à 0,38 U soit environ 40% de l'activité de la protéine de référence. RVV-V A, quant à lui, était beaucoup moins active (environ 1/20<sup>e</sup> de l'activité de la protéine de référence).

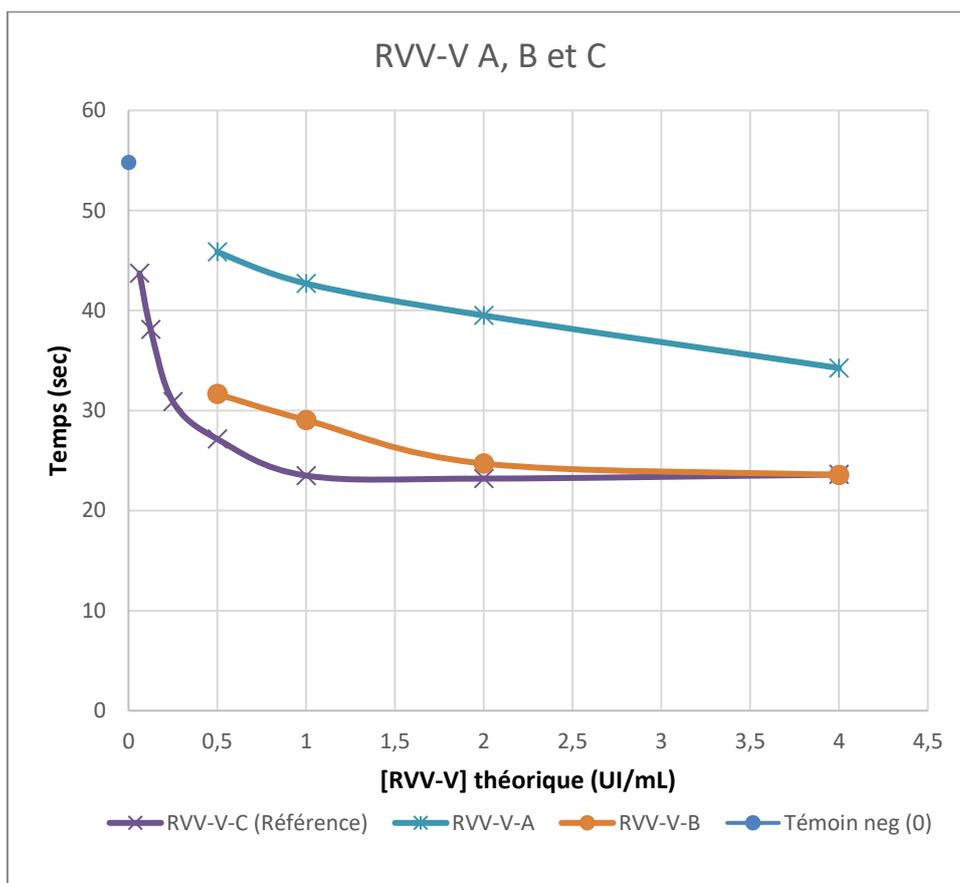


Figure 47 : Résultats du test réalisé sur échantillon RVV-V A, B et C.

Les résultats numériques détaillés sont présentés dans un tableau en Annexe 2. La concentration de RVV-V en abscisse est la concentration dans le volume réactionnel final basé sur l'étiquetage des flacons reçus.

Pour RVV-A, il n'est pas réellement possible de déterminer un titre en traçant la courbe [Figure 48], le plateau correspondant à l'activation complète du FV n'est pas atteint. On peut toutefois réaliser une estimation en reportant les temps obtenus sur la courbe de référence de RVV-C pour comparer les activités des 2 échantillons. Ainsi, 1 UI/mL de RVV-V A (d'après l'étiquetage des flacons) donne un temps de 42.7 sec qui est proche du temps de 43.7 sec obtenu avec 0.062 UI/mL de la référence RVV-C. RVV-A est donc environ 20 fois moins actif que la référence RVV-C.

Pour RVV-V B, on atteint bien un plateau au niveau du temps de coagulation vers 2 UI/mL [Figure 47]. En reportant sur la courbe de référence (RVV-V C) le temps de 29.1 secondes obtenu avec 1 UI/mL de RVV-V B, on obtient environ 0.375 UI/mL de la référence RVV-V C (27.2 sec à 0.5 UI/mL et 30.9 sec à 0.25 UI/mL). RVV-V B est donc environ 60% moins actif que la référence.

### 3.3 RVV-X

#### 3.3.1 Objectifs

Les objectifs du test étaient la mesure de l'activité de RVV-X contenu dans 4 échantillons fournis par Latoxan® grâce à un test chromométrique basé sur un TCA puis de comparer cette activité à celle de la référence commerciale (Pentapharm®).

Pour le RVV-X, on trouve dans la littérature une définition de l'unité d'activité : d'après Stocker (158), une unité correspond à la quantité de FX qui génère une unité d'enzyme FXa depuis FX mesurée grâce au substrat chromogène CH<sub>3</sub>OCO-D-Nle-Gly-I-Arg-pNA. Il s'agit d'un test chromogénique dont le substrat n'est plus disponible. Nous avons décidé de ne pas réaliser ce test chromogénique et de réaliser un test chromométrique plus simple à mettre en place et moins cher, basé sur la réalisation d'un TCA modifié. La réalisation d'un tel test s'est inspiré d'un protocole de mesure chromométrique du taux de facteur X utilisant le RVV-X (159).

#### 3.3.2 Protocole

Quatre échantillons ont été testés en plus de la référence de chez Pentapharm® (RVV-X 1 à 5).

Chaque échantillon primaire (flacon étiqueté à 5U) qui contient une fraction de purification de venin est reconstitué par du tampon (150 mM NaCl 20 mM HEPES pH 7.38) pour obtenir une solution à 20 U/mL puis des dilutions en cascade sont effectuées.

Pour réaliser le test chromométrique, un mélange composé de 100 µL RVV-X, 20 µL CaCl<sub>2</sub> 25 mM pH 7.38 et 25 µL Céphaline PTTA était réalisé et incubé 2 minutes à 37°C. Puis 25 µL de plasma normal étaient ajoutés et le temps de coagulation était mesuré sur l'automate START-4.

#### **Protocole (mesure chromométrique du facteur X en utilisant le RVV-X sur START-4) :**

- 100 µL RVV-X
- 25 µL CaCl<sub>2</sub> 25 mM
- 25 µl Céphaline PTTA
- ➔ Incubation 2 minutes à 37°C
- 25 µL plasma normal
- ➔ Mesure du temps de coagulation à 37°C

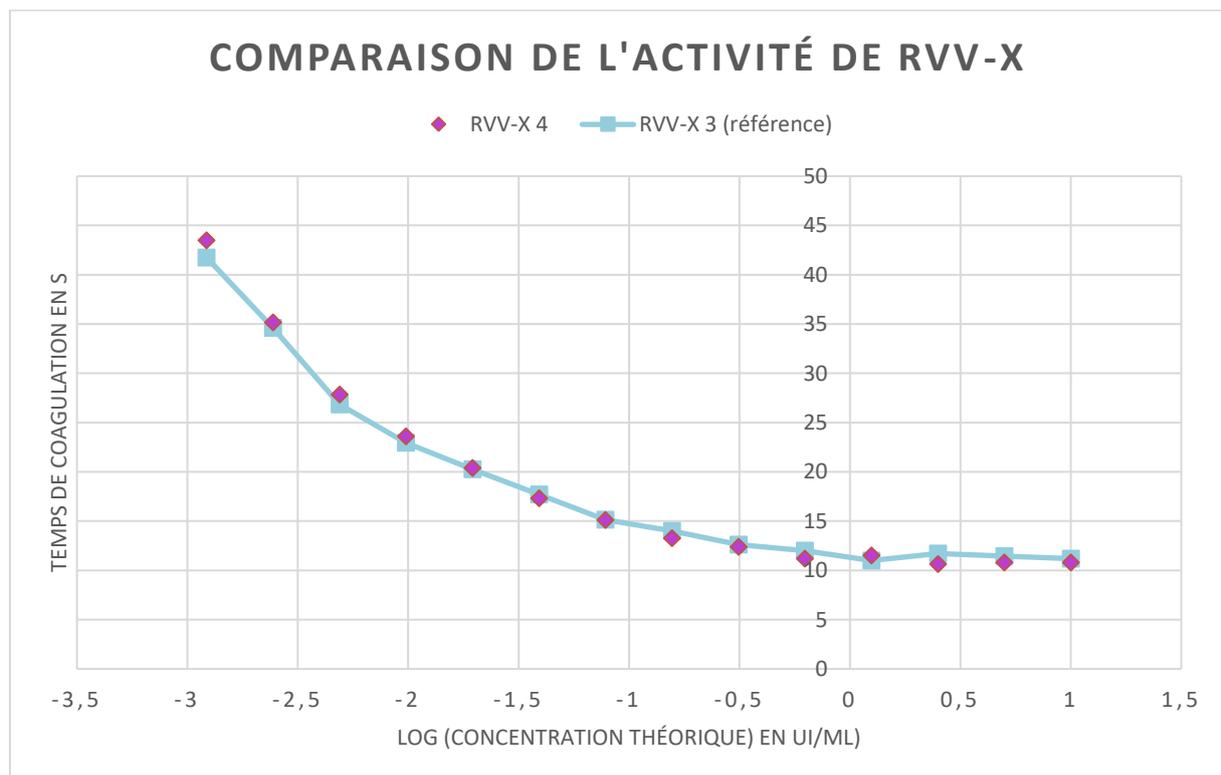
#### 3.3.3 Résultats

L'activation du FX est complète quand l'augmentation de la concentration en RVV-X ne conduit plus à un raccourcissement du temps de coagulation.

Ainsi, à partir des graphiques représentant le temps de coagulation en fonction de la concentration théorique en RVV-X, on peut déterminer la plus faible concentration en RVV-X pour laquelle on atteint un plateau. Ce plateau correspondant au temps de coagulation le plus court est obtenu lorsque le RVV-X a activé tout le FX. Pour un meilleur aperçu du plateau, les résultats ont été présentés selon un graphique logarithmique.

Parmi les 4 échantillons provenant de Latoxan®, seul l'un d'entre eux (RVV-X 4) avait une activité comparable à la référence d'après nos tests [Figure 48 et Annexe 3]. Les autres échantillons (RVV-X 1, 2 et 5) n'ont montré qu'une faible voire très faible activité : RVV-X 5 avait une activité environ 10 fois inférieure à la référence, RVV-X 2 était 300 fois moins actif que la référence et pour RVV-X 1 l'activité est 4000 moins efficace que la référence.

Finalement, le RVV-X 4 a une très bonne activité similaire à la référence RVV-X 3.



**Figure 48 : Résultats des tests chronométriques réalisés avec RVV-X 4 et RVV-X 3 (référence).**  
 Les résultats numériques détaillés sont présentés dans un tableau en Annexe 3. La concentration en abscisse est la concentration dans le volume réactionnel final basé sur l'étiquetage des flacons reçus.

## 3.4 Protac

### 3.4.1 Objectifs

L'objectif a été la mesure de l'activité de 6 échantillons de différentes fractions de purification fournies par Latoxan® à l'aide d'un test chromométrique de type TCA. Ensuite, l'activité de chaque échantillon a pu être comparée à l'activité de la protéine de référence.

### 3.4.2 Protocole

Six échantillons ont été testés en plus de la molécule Protac® commerciale.

Pour ce test, le contrôle positif correspondant à du Protac® (référence commerciale) est reconstitué avec 0.5mL de tampon HEPES afin d'obtenir une concentration à 6 UI/mL.

Les différents échantillons Pr-1 à 6 contenant 5U « théoriques » de Protac sont reconstitués avec 250 µL de tampon pour obtenir une concentration à 20 UI/mL puis des dilutions en cascade à partir de l'échantillon primaire sont réalisées et testées.

L'activité anticoagulante du Protac® a été testée grâce à un test type TCA réalisé sur l'automate START-4 selon le protocole suivant. Un mélange de 50 µL de plasma humain citraté, 50 µL Protac et 50 µL de céphaline activée ACTIN FS est réalisé et incubé 4 min à 37°C. Puis 50 µL CaCl<sub>2</sub> 25 mM sont ajoutés au mélange pour déclencher la coagulation et mesurer un temps de coagulation.

#### **Protocole :**

- 1) Reconstitution du Protac « commercial » :
  - 250 µL de tampon (concentration à 12 UI/mL)
- 2) Reconstitution des différents échantillons (PR-1 à 6)
  - 250 µL de tampon (concentration théorique à 20 UI/mL)
- 3) Détermination du temps de coagulation
  - 50 µl de plasma humain citraté
  - 50 µL PROTAC
  - 50 µL d'ACTIN FS
  - ➔ Incubation du mélange 4 min à 37°C
  - 50 µl CaCl<sub>2</sub> 25 mM
  - ➔ Mesure d'un temps de coagulation à 37°C

### 3.4.3 Résultats

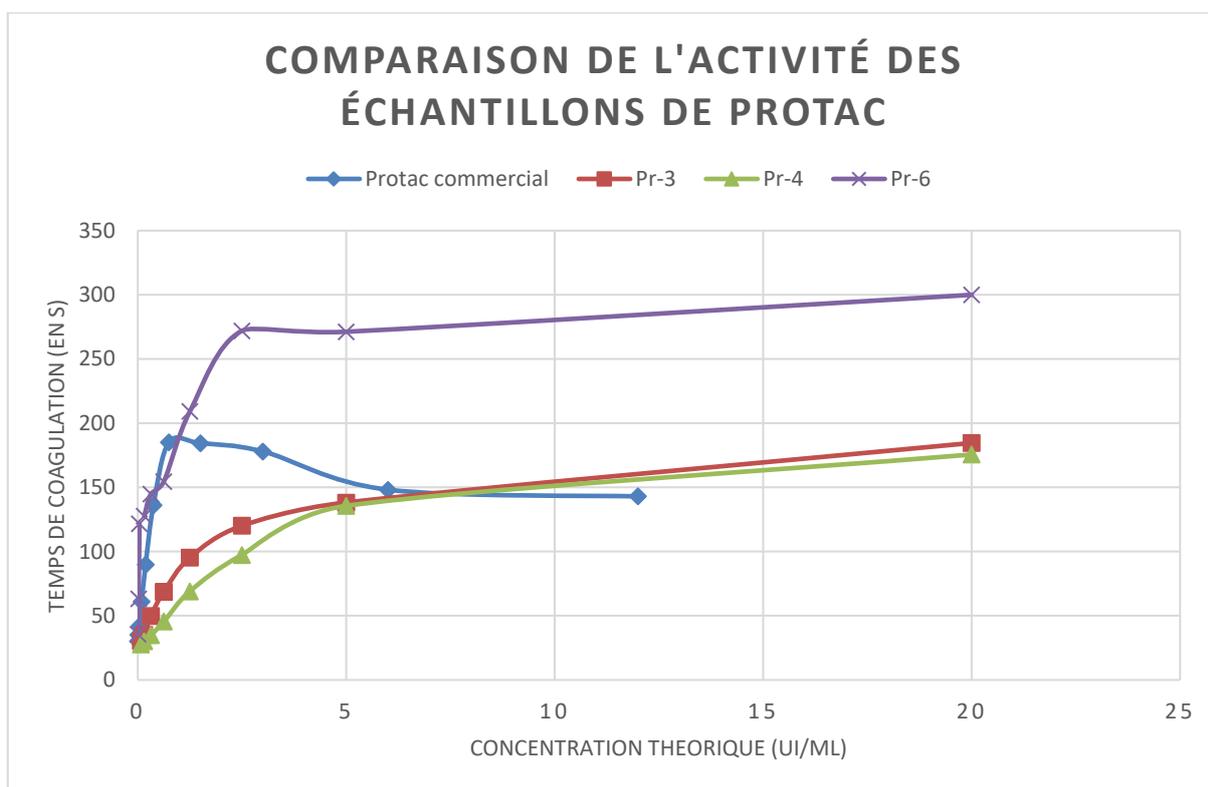


Figure 49 : Résultats des tests chronométriques avec les échantillons de Protac (Pr-3 et Pr-4 et Pr-6) et la référence commerciale

Les résultats numériques détaillés sont présentés dans un tableau en Annexe 4. La concentration en abscisse est la concentration dans le volume réactionnel final basé sur l'étiquetage des flacons reçus.

Pour les échantillons Pr-1, Pr-2 et Pr-5, nous avons constaté une coagulation du plasma durant la période d'incubation (avant la recalcification) ce qui fait suspecter la présence d'un probable contaminant. Aucune activité anti-coagulante n'a été détectée. Concernant les échantillons Pr-3 et Pr-4, on retrouvait une activité anticoagulante mais celle-ci était nettement inférieure à la référence.

L'échantillon Pr-6 retrouve une activité anticoagulante au moins équivalente à celle de la référence avec des temps de coagulation plus longs [Figure 49], il s'agit en fait du venin pur (lyophilisé et reconstitué) utilisé en tant que contrôle ce qui explique probablement l'aspect différent de la courbe par rapport à la référence car le venin primaire contient d'autres protéases.

Les tests vont être reconduits avec une durée de 1 min d'incubation au lieu de 4 min ce qui permettra de définir une unité selon la définition : une unité de Protac® est la quantité de Protac® nécessaire pour activer toute la PC contenue dans 1mL de plasma humain citraté en 1 minute à 37°C.

## 3.5 Ecarine

### 3.5.1 Objectifs

Les objectifs des tests réalisés avec l'écarine ont été d'évaluer l'activité des 5 échantillons fournis par Latoxan® en réalisant un temps d'écarine. Ces résultats ont ensuite été comparés à l'activité de la référence commerciale.

### 3.5.2 Protocole

Cinq échantillons ont été testés en plus de la molécule de référence (Ec-1 à Ec-6).

Chaque échantillon primaire (flacon étiqueté à 5U) qui contient une fraction de purification de venin est reconstitué par du tampon (150 mM NaCl 20 mM HEPES pH 7.38) pour obtenir une solution à 20 U/mL puis des dilutions en cascade sont effectuées.

Nous avons réalisé un temps d'écarine sur le semi-automate START-4 selon le protocole suivant permettant de comparer les activités des échantillons à la référence.

**Protocole** (selon Pötzch et al. Thrombosis Research 1997. Vol 86 No5, 373-383.) :

- 100 µL de plasma humain citraté (préchauffé à 37 °C)
- Incubation 120 sec à 37°C
- 50 µL Ecarine (préchauffé à 37 °C)
- ➔ Détermination temps de coagulation

### 3.5.3 Résultats

Les lots Ec-1 (référence), Ec-2, Ec-3, Ec-5 et Ec-6 ont une activité. Parmi eux, Ec-6 et Ec-3 ont une activité similaire à la référence [Figure 50]. Pour comparer plus précisément les activités, on peut se placer à 5 U/mL d'écarine (dans le volume total réactionnel). L'activité d'Ec-6 (19.9 sec à 5 U/mL) est alors supérieure à celle d'Ec-1 qui correspond à la référence (24.4 sec à 5 U/mL) et d'Ec-3 (25.5 sec à 5 U/mL). L'activité d'Ec-5 (147.4 sec à 5 U/mL) et d'Ec-2 (145.6 sec à 10 UI/mL) restent largement inférieures à la référence.

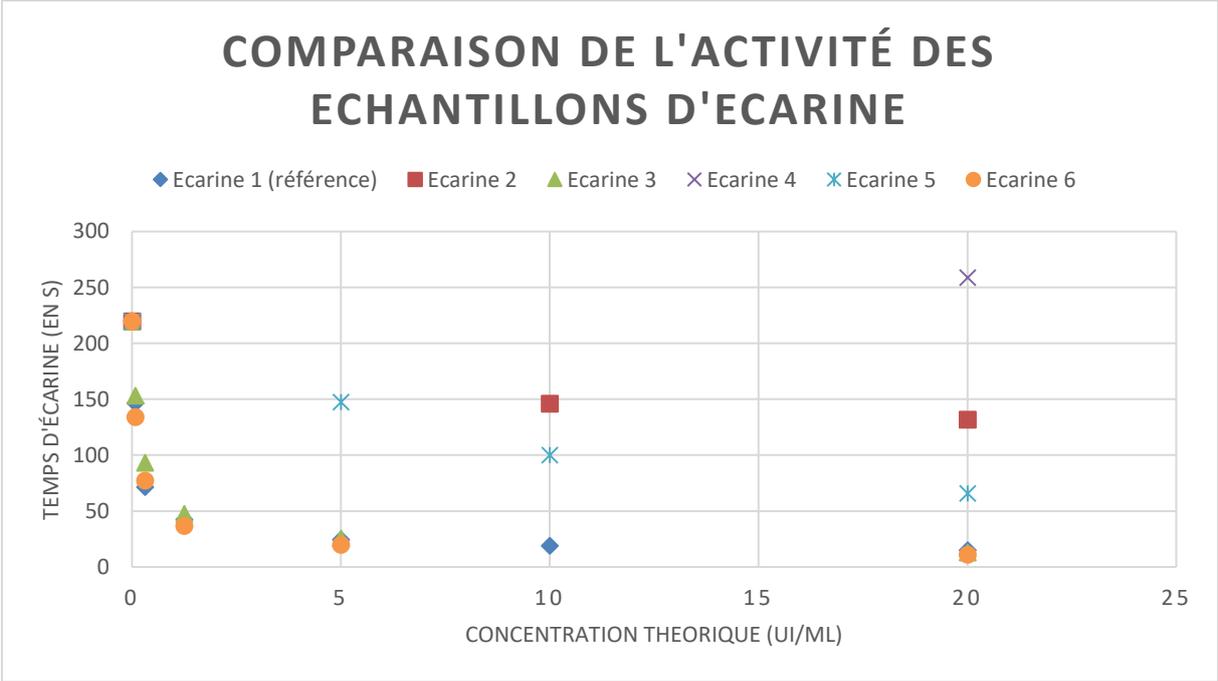


Figure 50 : Résultats des tests chronométriques réalisés avec les échantillons d'Ecarine (Ecarine-2 à -6) et la référence commerciale (Ecarine-1)

#### 4. Discussion de la partie expérimentale

Nous avons mis en place des tests coagulométriques permettant d'évaluer l'activité de 5 protéases (batroxobine, RVV-V, RVV-X, Protac<sup>®</sup>, et écarine). Nos protocoles ont été validés grâce à l'utilisation de protéines commerciales de référence.

En conclusion de cette partie expérimentale, nos résultats montrent une activité de certaines fractions de purification testées comparable à la référence commerciale pour certaines protéases (RVV-V, RVV-X et écarine) tandis que d'autres sont sans activité.

Pour RVV-V, RVV-X et écarine, nous avons retrouvé des activités proches voire équivalentes à la molécule de référence pour certains produits de fractionnement confirmant l'efficacité des techniques de séparation et de purification développées par Latoxan<sup>®</sup>. Il s'agit du lot RVV-V B, pour lequel l'activité correspondait à environ 40% de l'activité de la protéine de référence, du lot RVV-X 4 possédant une activité comparable à la référence d'après nos tests et du lot d'Ec-6 dont l'activité est supérieure à celle de la référence. Nos résultats valident les stratégies de fractionnement et de purification adoptées par Latoxan<sup>®</sup> pour les 3 protéases RVV-V, RVV-X et Ecarine. De plus, pour RVV-V et RVV-X, de nouveaux tests sur 3 lots différents de serpents sont prévus afin de comparer l'activité de ces molécules chez des espèces provenant de localisations géographiques distinctes. Cela permettra par la suite à la société Latoxan<sup>®</sup> de déterminer si une espèce spécifique de serpent doit être retenue pour le procédé de purification de ces 2 protéases.

Pour les 2 autres toxines ophidiennes testées (batroxobine et Protac<sup>®</sup>), les échantillons testés n'ont pas permis de mettre en évidence d'activité satisfaisante dans les différents produits de fractionnement et de purification en comparaison à la référence. Cependant, pour la batroxobine, le venin de serpent pur a montré un effet très significatif sur nos tests coagulométriques, le disculpant. Un problème de contamination par un sel lors d'une étape d'HPLC est suspecté comme responsable d'une interférence sur l'activité procoagulante de la protéase. Le protocole de séparation et de purification devrait donc être revu et de nouveaux échantillons à tester devraient nous être fournis par la suite. Pour le Protac<sup>®</sup>, de la même manière que pour la batroxobine, le venin de serpent pur non purifié a été testé et a retrouvé également une bonne activité. Une autre méthode de fractionnement devra être envisagée.

Les tests coagulométriques que nous avons mis en place ont permis de mesurer l'activité de différentes protéases ophidiennes et de valider ou non les stratégies de fractionnement et de purification adoptées par la société Latoxan<sup>®</sup>. D'autres lots correspondants à des produits issus d'autres stratégies de purifications nous seront prochainement adressés afin de poursuivre les tests.

THÈSE SOUTENUE PAR : Gabrielle LE GUYADEC

TITRE :

VENINS DE SERPENT ET HEMOSTASE : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE ET MESURE DE L'ACTIVITE DE PROTEASES OPHIDIENNES

CONCLUSION :

Bien que les serpents soient des espèces appréhendées aujourd'hui, les anciennes civilisations respectaient à juste titre leur pouvoir guérisseur. On ne peut ôter aux serpents leur capacité à produire au sein de leur venin, des enzymes et protéines au large panel d'action disposant d'un intérêt médical, pharmaceutique et/ou biologique. L'étude approfondie de ces toxines a permis de mieux appréhender la physiopathologie des envenimations ophidiennes mais également de comprendre certaines voies de signalisation biologiques. Ces protéines enzymatiques et non enzymatiques ont des propriétés leur conférant une activité pharmacologique potentielle. La découverte des effets des toxines ophidiennes sur la coagulation dès le XVIIIe siècle a motivé la recherche dans ce domaine. L'utilisation des propriétés des venins a bien évolué depuis cette époque en lien avec les avancées technologiques et scientifiques du dernier siècle. Le toxinomimétisme a été une référence dans le développement des médicaments issus de la structure de protéines de venins ophidiens. À ce jour, on en compte une dizaine modélisés et conçus à partir de toxines ophidiennes. D'autres molécules prometteuses anti-cancéreuses et antalgiques sont en cours de développement. Certaines toxines ophidiennes, de par leurs effets sur la coagulation, ont également permis de développer des tests de biologie médicale en hémostase. Certains de ces tests sont largement utilisés en routine comme le temps de Stypven avec RVV-X pour le dépistage du lupus anticoagulant ou le dosage de protéine C à base de Protac® dans les explorations de thrombophilie. Au cours de ce travail, nous nous sommes attachés à rapporter les données récentes relatives à la physiopathologie des envenimations, aux innovations médicales et aux tests diagnostiques en hémostase en rapport avec des protéines ophidiennes. Nous avons également mis en place des tests de la coagulation qui ont permis de caractériser l'activité de cinq toxines purifiées de venins de serpents fournies par la société Latoxan® (batroxobine, écarine, Protac®, RVV-V et RVV-X). L'objectif a été de comparer l'activité des produits de fractionnement et de purification aux références commerciales afin de valider les stratégies de purification.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le : 20 10 2018

LE DOYEN DE LA  
FACULTÉ DE PHARMACIE

Pr Michel SÈVE

Pour la Présidente  
et par délégation  
Le Doyen de Pharmacie  
Pr. Michel SEVE

LE DIRECTEUR / LA DIRECTRICE DE THÈSE



Dr Raphaël MARLU

LE TUTEUR / LA TUTRICE UNIVERSITAIRE

## Bibliographie

1. Moore GW. Snake Venoms in Diagnostic Hemostasis and Thrombosis. *Semin Thromb Hemost.* mars 2022;48(2):145-60.
2. OMS - Morsures de serpents venimeux [Internet]. 2021 [cité 17 avr 2022]. Disponible sur: <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/snakebite-envenoming>
3. Médecins et symboles [Internet]. Ordomedic. [cité 17 avr 2022]. Disponible sur: <https://ordomedic.be/fr/l-ordre/serment-belgique/medecins-et-symboles>
4. Que signifie l'emblème de la pharmacie ? [Internet]. POD. [cité 17 avr 2022]. Disponible sur: <https://www.pod.fr/acheter-vendre-officine-pharmacie/que-signifie-l-embleme-de-la-pharmacie/>
5. Mohamed Abd El-Aziz T, Soares AG, Stockand JD. Snake Venoms in Drug Discovery: Valuable Therapeutic Tools for Life Saving. *Toxins.* 25 sept 2019;11(10):564.
6. Greener M. The next generation of venom-based drugs. *Prescriber.* 2020;31(4):28-32.
7. Gomes A, Bhattacharya S, Chakraborty M, Bhattacharjee P, Mishra R, Gomes A. Anti-arthritic activity of Indian monocellate cobra (*Naja kaouthia*) venom on adjuvant induced arthritis. *Toxicol Off J Int Soc Toxinology.* mars 2010;55(2-3):670-3.
8. Vonk FJ, Jackson K, Doley R, Madaras F, Mirtschin PJ, Vidal N. Snake venom: From fieldwork to the clinic: Recent insights into snake biology, together with new technology allowing high-throughput screening of venom, bring new hope for drug discovery. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol.* avr 2011;33(4):269-79.
9. Chippaux JP. Zoologie des serpents. In: *Venins de serpent et envenimations.* Marseille: IRD Éditions; 2017. p. 19-57. (Didactiques).
10. THE REPTILE DATABASE [Internet]. [cité 25 mai 2022]. Disponible sur: <http://www.reptile-database.org/>
11. Bauchot R, Bon C, David P. *Serpents.* Editions Artemis; 2005. 228 p.
12. Venom Expulsion in Rattlesnakes [Internet]. 2021 [cité 7 juill 2022]. Disponible sur: <https://al3xandria.com/2021/03/24/venom-expulsion-in-rattlesnakes/>
13. Chippaux JP. Appareil venimeux. In: *Venins de serpent et envenimations.* Marseille: IRD Éditions; 2017. p. 61-86. (Didactiques).
14. Collet JP, Choussat R, Montalescot G. L'agrégation plaquettaire et ses inhibiteurs dans les syndromes coronariens aigus. *MS Médecine Sci.* 2004;20(3):291-7.
15. Marlu R. Physiologie de l'hémostase. *Oxymag.* 1 janv 2016;29:10-5.
16. Wood JP, Ellery PER, Maroney SA, Mast AE. Biology of tissue factor pathway inhibitor. *Blood.* 8 mai 2014;123(19):2934-43.

17. Mast AE. Tissue Factor Pathway Inhibitor: Multiple Anticoagulant Activities for a Single Protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* janv 2016;36(1):9-14.
18. Maroney SA, Mast AE. New insights into the biology of tissue factor pathway inhibitor. *J Thromb Haemost JTH.* juin 2015;13 Suppl 1:S200-207.
19. Coagulation et cirrhose : un nouveau regard [Internet]. *Revue Medicale Suisse.* [cité 11 août 2022]. Disponible sur: <https://www.revmed.ch/revue-medicale-suisse/2012/revue-medicale-suisse-352/coagulation-et-cirrhose-un-nouveau-regard>
20. Pereira DAT and GN. The Big Four Snakes Inside the Coffee Forests of India [Internet]. *EcoFriendly Coffee.* 2016 [cité 18 juill 2022]. Disponible sur: <https://ecofriendlycoffee.org/coffee-forests-the-big-four/>
21. Larréché S, Boucau C, Erauso T, Mion G. Envenimations ophidiennes graves. *Prat En Anesth Réanimation.* sept 2010;14(4):254-63.
22. Chippaux JP. L'envenimation ophidienne en Afrique: épidémiologie, clinique et traitement. *Ann Inst Pasteur Actual.* 1 avr 1999;10(2):161-71.
23. Larréché S, Mion G, Clapson P, Debien B, Wybrecht D, Goyffon M. Neurotoxines ophidiennes. *Ann Fr Anesth Réanimation.* avr 2008;27(4):310-6.
24. Chippaux JP. *Venins de serpent et envenimations.* IRD Editions; 2002. 296 p.
25. Larréché S, Chani M, Ramsang S, Mion G. Critères de gravité des morsures de serpents : implications thérapeutiques. In 2013. p. 313-28.
26. Larréché S, Chippaux JP, Chevillard L, Mathé S, Résière D, Siguret V, et al. Bleeding and Thrombosis: Insights into Pathophysiology of Bothrops Venom-Related Hemostasis Disorders. *Int J Mol Sci.* 2021;26.
27. Développement et Santé | Envenimation par les serpents [Internet]. [cité 9 juin 2022]. Disponible sur: <https://devsante.org/articles/envenimation-par-les-serpents>
28. Chippaux JP. Clinique et traitement des envenimations. In: *Venins de serpent et envenimations.* Marseille: IRD Éditions; 2017. p. 216-48. (Didactiques).
29. Gutiérrez JM, Calvete JJ, Habib AG, Harrison RA, Williams DJ, Warrell DA. Snakebite envenoming. *Nat Rev Dis Primer.* 14 sept 2017;3(1):1-21.
30. Bjarnason JB, Fox JW. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmacol Ther.* 1 janv 1994;62(3):325-72.
31. Olaoba OT. Snake Venom Metalloproteinases (SVMPs): A structure-function update. 2020;15.
32. Schaffner F, Ray AM, Dontenwill M. Integrin  $\alpha 5\beta 1$ , the Fibronectin Receptor, as a Pertinent Therapeutic Target in Solid Tumors. *Cancers.* 15 janv 2013;5(1):27-47.
33. Koh CY, Kini RM. Biochemists' bliss: harnessing the power of snake toxins to treat cardiovascular diseases. *The Biochemist.* 2 déc 2019;41(6):10-4.

34. Kerns RT, Kini RM, Stefansson S, Evans HJ. Targeting of venom phospholipases: the strongly anticoagulant phospholipase A(2) from *Naja nigricollis* venom binds to coagulation factor Xa to inhibit the prothrombinase complex. *Arch Biochem Biophys.* 1 sept 1999;369(1):107-13.
35. Stefansson S, Kini RM, Evans HJ. The basic phospholipase A2 from *Naja nigricollis* venom inhibits the prothrombinase complex by a novel nonenzymic mechanism. *Biochemistry.* août 1990;29(33):7742-6.
36. Kini RM. Structure-function relationships and mechanism of anticoagulant phospholipase A2 enzymes from snake venoms. *Toxicon Off J Int Soc Toxinology.* 15 juin 2005;45(8):1147-61.
37. Izidoro LFM, Sobrinho JC, Mendes MM, Costa TR, Grabner AN, Rodrigues VM, et al. Snake Venom L-Amino Acid Oxidases: Trends in Pharmacology and Biochemistry. *BioMed Res Int.* 12 mars 2014;2014:e196754.
38. Li ZY, Yu TF, Lian EY. Purification and characterization of l-amino acid oxidase from king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom and its effects on human platelet aggregation. *Toxicon.* 1 nov 1994;32(11):1349-58.
39. Du XY, Clemetson KJ. Snake venom l-amino acid oxidases. *Toxicon.* 1 juin 2002;40(6):659-65.
40. Rodrigues RS, da Silva JF, Boldrini França J, Fonseca FPP, Otaviano AR, Henrique Silva F, et al. Structural and functional properties of Bp-LAAO, a new l-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. *Biochimie.* 1 avr 2009;91(4):490-501.
41. Alves RM, Antonucci GA, Paiva HH, Cintra ACO, Franco JJ, Mendonça-Franqueiro EP, et al. Evidence of caspase-mediated apoptosis induced by l-amino acid oxidase isolated from *Bothrops atrox* snake venom. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 1 déc 2008;151(4):542-50.
42. Arlinghaus FT, Eble JA. C-type lectin-like proteins from snake venoms. *Toxicon.* sept 2012;60(4):512-9.
43. Lu Q, Navdaev A, Clemetson JM, Clemetson KJ. Snake venom C-type lectins interacting with platelet receptors. Structure-function relationships and effects on haemostasis. *Toxicon Off J Int Soc Toxinology.* 15 juin 2005;45(8):1089-98.
44. Atoda H, Yoshida N, Ishikawa M, Morita T. Binding properties of the coagulation factor IX/factor X-binding protein isolated from the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. *Eur J Biochem.* 1 sept 1994;224(2):703-8.
45. Morita T. Structures and functions of snake venom CLPs (C-type lectin-like proteins) with anticoagulant-, procoagulant-, and platelet-modulating activities. *Toxicon.* juin 2005;45(8):1099-114.
46. Kallech-Ziri O, Luis J, MOHAMED E, Marrakchi N. [Snake venom disintegrins: classification and therapeutic potential]. *Arch Inst Pasteur Tunis.* 1 févr 2007;84:29-37.
47. Rivas-Mercado EA, Garza-Ocañas L. Disintegrins obtained from snake venom and their pharmacological potential. *Med Univ.* 1 janv 2017;19(74):32-7.
48. Utkin YN. Last decade update for three-finger toxins: Newly emerging structures and biological activities. *World J Biol Chem.* 7 janv 2019;10(1):17-27.

49. Chanda C, Sarkar A, Sistla S, Chakrabarty D. Anti-platelet activity of a three-finger toxin (3FTx) from Indian monocled cobra (*Naja kaouthia*) venom. *Biochem Biophys Res Commun.* 22 nov 2013;441(3):550-4.
50. Barnwal B, Jobichen C, Girish VM, Foo CS, Sivaraman J, Kini RM. Ringhalexin from *Hemachatus haemachatus*: A novel inhibitor of extrinsic tenase complex. *Sci Rep.* 13 mai 2016;6:25935.
51. Girish VM, Kini RM. Exactin: A specific inhibitor of Factor X activation by extrinsic tenase complex from the venom of *Hemachatus haemachatus*. *Sci Rep.* 25 août 2016;6:32036.
52. Abbenante G, Fairlie DP. Protease inhibitors in the clinic. *Med Chem Shariqah United Arab Emir.* janv 2005;1(1):71-104.
53. Mourão CBF, Schwartz EF. Protease Inhibitors from Marine Venomous Animals and Their Counterparts in Terrestrial Venomous Animals. *Mar Drugs.* 14 juin 2013;11(6):2069-112.
54. Trim CM, Byrne LJ, Trim SA. Utilisation of compounds from venoms in drug discovery. In: *Progress in Medicinal Chemistry.* Elsevier; 2021. p. 1-66.
55. Harvey AL. Snake Venom Peptides. In: *Handbook of Biologically Active Peptides.* Elsevier; 2006. p. 355-62.
56. Yamazaki Y, Hyodo F, Morita T. Wide distribution of cysteine-rich secretory proteins in snake venoms: isolation and cloning of novel snake venom cysteine-rich secretory proteins. *Arch Biochem Biophys.* 1 avr 2003;412(1):133-41.
57. Oliveira AL, Viegas MF, da Silva SL, Soares AM, Ramos MJ, Fernandes PA. The chemistry of snake venom and its medicinal potential. *Nat Rev Chem.* 10 juin 2022;1-19.
58. Slagboom J, Kool J, Harrison RA, Casewell NR. Haemotoxic snake venoms: their functional activity, impact on snakebite victims and pharmaceutical promise. *Br J Haematol.* 2017;177(6):947-59.
59. Koh CY, Kini RM. Biochemists' bliss: harnessing the power of snake toxins to treat cardiovascular diseases. *The Biochemist.* 2 déc 2019;41(6):10-4.
60. Andrews RK, Gardiner EE, Berndt MC. Snake venom toxins affecting platelet function. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2004;273:335-48.
61. Frangieh J, Rima M, Fajloun Z, Henrion D, Sabatier JM, Legros C, et al. Snake Venom Components: Tools and Cures to Target Cardiovascular Diseases. *Molecules.* 12 avr 2021;26(8):2223.
62. Chen Y, Pitzenberger SM, Garsky VM, Lumma PK, Sanyal G, Baum J. Proton NMR assignments and secondary structure of the snake venom protein echistatin. *Biochemistry.* 17 déc 1991;30(50):11625-36.
63. Bernard JF, Galand C, Boivin P. March hemoglobinuria. One case with erythrocyte glutathione peroxidase deficiency. *Nouv Presse Med.* 1 avr 1975;4(15):1117-20.
64. Thiagarajan P, Wu KK. Mechanisms of Antithrombotic Drugs. In: August JT, Anders MW, Murad F, Coyle JT, éditeurs. *Advances in Pharmacology.* Academic Press; 1999. p. 297-324.

65. Hartman GD, Egbertson MS, Halczenko W, Laswell WL, Duggan ME, Smith RL, et al. Non-peptide fibrinogen receptor antagonists. 1. Discovery and design of exosite inhibitors. *J Med Chem.* nov 1992;35(24):4640-2.
66. PubChem. Echistatin, |A1 isoform [Internet]. [cité 5 sept 2022]. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/90488810>
67. Chen YC, Chang YT, Chen CY, Shiu JH, Cheng CH, Huang CH, et al. Structural Insight into Integrin Recognition and Anticancer Activity of Echistatin. *Toxins.* 9 nov 2020;12(11):709.
68. Valgimigli M, Campo G, Percoco G, Pellegrino L, Guardigli G, Ferrari R. Tirofiban: a critical reappraisal of the clinical use, recent developments and future perspectives. *Future Cardiol.* janv 2006;2(1):17-27.
69. TIROFIBAN ALTAN 50 µg/ml sol p perf - VIDAL Hoptimal [Internet]. [cité 19 mai 2022]. Disponible sur: [https://hoptimal.vidal.fr/medicament/tirofiban\\_altan\\_50\\_g\\_ml\\_sol\\_p\\_perf-196759.html](https://hoptimal.vidal.fr/medicament/tirofiban_altan_50_g_ml_sol_p_perf-196759.html)
70. Substances Abciximab - VIDAL Hoptimal [Internet]. [cité 22 août 2022]. Disponible sur: <https://hoptimal.vidal.fr/substance/details/11965/abciximab.html>
71. Scarborough RM. Development of eptifibatide. *Am Heart J.* déc 1999;138(6 Pt 1):1093-104.
72. Trim CM, Byrne LJ, Trim SA. Chapter One - Utilisation of compounds from venoms in drug discovery. In: Witty DR, Cox B, éditeurs. *Progress in Medicinal Chemistry.* Elsevier; 2021. p. 1-66.
73. Bocian A, Hus K. Antibacterial properties of snake venom components. *Chem Pap.* 21 sept 2019;74:3.
74. INTEGRILIN 0,75 mg/ml sol p perf - VIDAL Hoptimal [Internet]. [cité 19 mai 2022]. Disponible sur: [https://hoptimal.vidal.fr/medicament/integrilin\\_0\\_75\\_mg\\_ml\\_sol\\_p\\_perf-8883.html](https://hoptimal.vidal.fr/medicament/integrilin_0_75_mg_ml_sol_p_perf-8883.html)
75. Lazarovici P, Marcinkiewicz C, Lelkes PI. From Snake Venom's Disintegrins and C-Type Lectins to Anti-Platelet Drugs. 2019;15.
76. Momic T, Katzhendler J, Shai E, Noy E, Senderowitz H, Eble JA, et al. Vipegitide: a folded peptidomimetic partial antagonist of  $\alpha 2\beta 1$  integrin with antiplatelet aggregation activity. *Drug Des Devel Ther.* 2015;9:291-304.
77. Li BX, Dai X, Xu XR, Adili R, Neves MAD, Lei X, et al. In vitro assessment and phase I randomized clinical trial of anfibatide a snake venom derived anti-thrombotic agent targeting human platelet GPIIb/IIIa. *Sci Rep.* 3 juin 2021;11(1):11663.
78. Gao Y, Ge H, Chen H, Li H, Liu Y, Chen L, et al. Crystal structure of agkisacucetin, a GpIb-binding snake C-type lectin that inhibits platelet adhesion and aggregation. *Proteins Struct Funct Bioinforma.* 2012;80(6):1707-11.
79. Sherman DG AR. Intravenous ancrod for treatment of acute ischemic stroke: the STAT study: a randomized controlled trial. *Stroke Treatment with Ancrod Trial. JAMA.* 2000;283(18):2395-403.
80. Geyer A FT. Structure and characterization of the glycan moiety of L-amino-acid oxidase from the Malayan pit viper *Calloselasma rhodostoma*. *Eur J Biochem.* 2001;268(14):4044-53.

81. Ancrod [Internet]. [cité 25 mai 2022]. Disponible sur: <https://www.bionity.com/en/encyclopedia/Ancrod.html>
82. Ancrod for the treatment of acute ischemic brain infarction. The Ancrod Stroke Study Investigators. *Stroke*. sept 1994;25(9):1755-9.
83. Hennerici MG, KR. Intravenous ancrod for acute ischaemic stroke in the European Stroke Treatment with Ancrod Trial: a randomised controlled trial. *Lancet*. 2006;368(9550):1871-8.
84. Holleman WH, Weiss LJ. The thrombin-like enzyme from Bothrops atrox snake venom. Properties of the enzyme purified by affinity chromatography on p-aminobenzamidine-substituted agarose. *J Biol Chem*. 25 mars 1976;251(6):1663-9.
85. Guo Y, Zuo Y, Fang W, Wang Q, Zhang T, Tang B, Shan L, Kang F, Sun Y. Meta-analysis of defibrase in treatment of acute cerebral infarction. *Chin Med J (Engl)*. 20 avr 2006;119(8):662-8.
86. Defibrase® – Batroxobin – Pentapharm [Internet]. [cité 17 mai 2022]. Disponible sur: <https://www.pentapharm.com/markets-and-products/products/pharma/defibrase-batroxobin/>
87. Rapport d'évaluation technologique de la HAS : Hemostatiques chirurgicaux [Internet]. [cité 5 août 2022]. Disponible sur: [https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2011-07/rapport\\_hemostatiques\\_27052011\\_vd.pdf](https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2011-07/rapport_hemostatiques_27052011_vd.pdf)
88. Bordon K, de CF, Cologna CT, Fornari-Baldo EC, Pinheiro-Júnior EL, Cerni FA, Amorim FG, et al. From Animal Poisons and Venoms to Medicines: Achievements, Challenges and Perspectives in Drug Discovery. *Front Pharmacol*. 24 juill 2020;11:1132.
89. Mazzucco L, Balbo V, Cattana E, Borzini P. Platelet-rich plasma and platelet gel preparation using Plateltex. *Vox Sang*. avr 2008;94(3):202-8.
90. Vivostat system autologous fibrin sealant: preliminary study in elective coronary bypass grafting. [Internet]. Epistemonikos. [cité 5 août 2022]. Disponible sur: <https://www.epistemonikos.org/fr/documents/7ec93519cbdd48349a79f2021673caa0e8b43574>
91. Buchta C, Hedrich HC, Macher M, Höcker P, Redl H. Biochemical characterization of autologous fibrin sealants produced by CryoSeal® and Vivostat® in comparison to the homologous fibrin sealant product Tissucol/Tisseel®. *Biomaterials*. 1 nov 2005;26(31):6233-41.
92. Yao YT, Yuan X, Fang NX. Hemocoagulase reduces postoperative bleeding and blood transfusion in cardiac surgical patients: A PRISMA-compliant systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. déc 2019;98(52):e18534.
93. Joshi SA, Gadre KS, Halli R, Shandilya R. Topical use of Hemocoagulase (Reptilase): A simple and effective way of managing post-extraction bleeding. *Ann Maxillofac Surg*. 2014;4(1):119.
94. Li H, Huang Y, Wu X, Wu T, Cao Y, Wang Q, et al. Effects of hemocoagulase agkistrodon on the coagulation factors and its procoagulant activities. *Drug Des Devel Ther*. 23 mai 2018;12:1385-98.
95. Zhu M, Cao J, Jia Z, Duan Z, Liu G, Wei J, et al. Hemocoagulase in abdominal operation and its effect on hemoagglutination. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*. août 2002;40(8):581-4.

96. Zeng Z, Xiao P, Chen J, Wei Y. Are batroxobin agents effective for perioperative hemorrhage in thoracic surgery? A systematic review of randomized controlled trials. *Blood Coagul Fibrinolysis Int J Haemost Thromb.* mars 2009;20(2):101-7.
97. Warner RL, McClintock SD, Barron AG, de la Iglesia F. Hemostatic properties of a venom protein in rodent dermal injuries. *Exp Mol Pathol.* 1 oct 2007;83(2):241-8.
98. Warner RL, McClintock SD, Barron AG, de la Iglesia FA. Hemostatic properties of a venom protein in rat organ trauma. *Exp Mol Pathol.* 1 déc 2009;87(3):204-11.
99. Filippovich I, Sorokina N, Pierre LS, Flight S, Jersey J de, Perry N, et al. Cloning and functional expression of venom prothrombin activator protease from *Pseudonaja textilis* with whole blood procoagulant activity. *Br J Haematol.* 2005;131(2):237-46.
100. Earl STH, Masci PP, de Jersey J, Lavin MF, Dixon J. Drug development from Australian elapid snake venoms and the Venomics pipeline of candidates for haemostasis: Textilinin-1 (Q8008), Haempatch™ (Q8009) and CoVase™ (V0801). *Toxicol Off J Int Soc Toxinology.* 15 mars 2012;59(4):456-63.
101. Markland FS, Swenson SD. Applications of Snake Toxins in Biomedicine. In: Gopalakrishnakone P, Calvete JJ, éditeurs. *Venom Genomics and Proteomics.* Dordrecht: Springer Netherlands; 2016. p. 393-424. (Toxinology).
102. Gulseth MP. Ximelagatran: An orally active direct thrombin inhibitor. *Am J Health Syst Pharm.* 15 juill 2005;62(14):1451-67.
103. Retrait du marché de l'anticoagulant melagatran/ximelagatran - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé [Internet]. [cité 24 mai 2022]. Disponible sur: <https://archiveansm.integra.fr/S-informer/Communiqués-Communiqués-Points-presse/Retrait-du-marché-de-l-anticoagulant-melagatran-ximelagatran>
104. Keisu M, Andersson TB. Drug-Induced Liver Injury in Humans: The Case of Ximelagatran. In: Utrecht J, éditeur. *Adverse Drug Reactions.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2010. p. 407-18. (Handbook of Experimental Pharmacology; vol. 196).
105. Yegappan R, Lauko J, Wang Z, Lavin MF, Kijas AW, Rowan AE. Snake Venom Hydrogels as a Rapid Hemostatic Agent for Uncontrolled Bleeding. *Adv Healthc Mater.* août 2022;11(15):e2200574.
106. Flight SM, Johnson LA, Du QS, Warner RL, Trabi M, Gaffney PJ, et al. Textilinin-1, an alternative anti-bleeding agent to aprotinin: Importance of plasmin inhibition in controlling blood loss. *Br J Haematol.* avr 2009;145(2):207-11.
107. Millers EKI, Johnson LA, Birrell GW, Masci PP, Lavin MF, de Jersey J, et al. The structure of Human Microplasmin in Complex with Textilinin-1, an Aprotinin-like Inhibitor from the Australian Brown Snake. *PLoS ONE.* 15 janv 2013;8(1):e54104.
108. Lenci E, Trabocchi A. Synthetic approaches toward small molecule libraries. In: *Small Molecule Drug Discovery.* Elsevier; 2020. p. 1-34.
109. Patchett AA. The chemistry of enalapril. *Br J Clin Pharmacol.* 1984;18(Suppl 2):201S-207S.

110. Résumé des Caractéristiques du Produit : ENALAPRIL MYLAN 20 mg, comprimé sécable [Internet]. [cité 25 mai 2022]. Disponible sur: <http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/rcp/R0373277.htm>
111. Therapeutic Potential of Peptides Derived from Animal Venoms: Current Views and Emerging Drugs for Diabetes - Aimee Coulter-Parkhill, Stephen McClean, Victor A Gault, Nigel Irwin, 2021.
112. Diochot S, Baron A, Salinas M, Douguet D, Scarzello S, Dabert-Gay AS, et al. Black mamba venom peptides target acid-sensing ion channels to abolish pain. *Nature*. oct 2012;490(7421):552-5.
113. Schroeder CI, Rash LD, Vila-Farrés X, Rosengren KJ, Mobli M, King GF, et al. Chemical Synthesis, 3D Structure, and ASIC Binding Site of the Toxin Mambalgins-2. *Angew Chem Int Ed*. 2014;53(4):1017-20.
114. Kawakami R, Lee CYW, Scott C, Bailey KR, Schirger JA, Chen HH, et al. A Human Study to Evaluate Safety, Tolerability, and Cyclic GMP Activating Properties of Cenderitide in Subjects With Stable Chronic Heart Failure. *Clin Pharmacol Ther*. 2018;104(3):546-52.
115. Pereira A, Kerkis A, Hayashi MA, Pereira AS, Silva FS, Oliveira EB, et al. Crotonamine toxicity and efficacy in mouse models of melanoma. *Expert Opin Investig Drugs*. 1 sept 2011;20(9):1189-200.
116. Moreira LA, Oliveira LP, Magalhães MR, Oliveira SAM, Oliveira-Neto JR, Carvalho PMG, et al. Acute toxicity, antinociceptive, and anti-inflammatory activities of the orally administered crotonamine in mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 1 août 2021;394(8):1703-11.
117. Karapetian H. Reptilase time (RT). *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2013;992:273-7.
118. Francischetti IMB, Reyes Gil M. Chapter 164 - Diagnostic Use of Venoms. In: Shaz BH, Hillyer CD, Reyes Gil M, éditeurs. *Transfusion Medicine and Hemostasis (Third Edition)*. Elsevier; 2019. p. 969-75.
119. Vu TT, Stafford AR, Leslie BA, Kim PY, Fredenburgh JC, Weitz JI. Batroxobin binds fibrin with higher affinity and promotes clot expansion to a greater extent than thrombin. *J Biol Chem*. 7 juin 2013;288(23):16862-71.
120. Protein C [Internet]. Diapharma. [cité 16 mai 2022]. Disponible sur: <https://diapharma.com/protein-c/>
121. HEMOCLOT™ Protein C | HYPHEN BIOMED [Internet]. [cité 20 juill 2022]. Disponible sur: <https://www.hyphen-biomed.com/products/thrombophilia/protein-c-activity-and-antigen/hemoclot-protein-c>
122. Protein C (PC) | technoclone.com [Internet]. [cité 20 sept 2022]. Disponible sur: <https://www.technoclone.com/en/product/protein-c-pc>
123. Castoldi E, Rosing J. APC resistance: biological basis and acquired influences. *J Thromb Haemost JTH*. mars 2010;8(3):445-53.
124. Nakayama D, Ben Ammar Y, Miyata T, Takeda S. Structural basis of coagulation factor V recognition for cleavage by RVV-V. *FEBS Lett*. 3 oct 2011;585(19):3020-5.

125. Barrett AJ, Rawlings ND, Woessner JF. Handbook of Proteolytic Enzymes. Academic Press; 2012. 3987 p.
126. Pentapharm\_RVV-Factor\_V\_Activator.pdf [Internet]. [cité 16 mai 2022]. Disponible sur: [https://www.avant-medical.com/wp-content/uploads/Pentapharm\\_RVV-Factor\\_V\\_Activator.pdf](https://www.avant-medical.com/wp-content/uploads/Pentapharm_RVV-Factor_V_Activator.pdf)
127. Dahlbäck B. Novel insights into the regulation of coagulation by factor V isoforms, tissue factor pathway inhibitor $\alpha$ , and protein S. *J Thromb Haemost.* 2017;15(7):1241-50.
128. Gempeler-Messina PM, Volz K, Bühler B, Müller C. Protein C activators from snake venoms and their diagnostic use. *Haemostasis.* déc 2001;31(3-6):266-72.
129. Pefakit® - APC-R Factor V Leiden - Pentapharm [Internet]. <https://www.pentapharm.com/>. [cité 20 sept 2022]. Disponible sur: <https://www.pentapharm.com/pefakit-factor-v-leiden/>
130. Ecarin - an overview | ScienceDirect Topics [Internet]. [cité 9 mai 2022]. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/ecarin>
131. Gosselin RC, Douxfils J. Ecarin based coagulation testing. :7.
132. Božič Mijovski M. Chapter Five - Advances in monitoring anticoagulant therapy. In: Makowski GS, éditeur. *Advances in Clinical Chemistry.* Elsevier; 2019. p. 197-213.
133. Ecarin Clotting Time [ECT] [Internet]. [cité 27 juill 2022]. Disponible sur: [https://practical-haemostasis.com/Miscellaneous/ecarin\\_ct.html](https://practical-haemostasis.com/Miscellaneous/ecarin_ct.html)
134. Tans G, Rosing J. Snake venom activators of factor X: an overview. *Haemostasis.* déc 2001;31(3-6):225-33.
135. Suntravat M. Recombinant Russell's viper venom-factor X activator (RVV-X)-specific antibody: Neutralization and crossreactivity with Cryptelytrops albolabris and Calloselasma rhodostoma venoms. *Asian Biomed.* 1 juin 2011;5:371-9.
136. Takeya H, Nishida S, Miyata T, Kawada S, Saisaka Y, Morita T, et al. Coagulation factor X activating enzyme from Russell's viper venom (RVV-X). A novel metalloproteinase with disintegrin (platelet aggregation inhibitor)-like and C-type lectin-like domains. *J Biol Chem.* 15 juill 1992;267(20):14109-17.
137. Takeda S. Structures of RVV-X and multactivase, two representatives of P-IIIId SVMPS. [Internet]. ResearchGate. 2016 [cité 23 juin 2022]. Disponible sur: [https://www.researchgate.net/figure/Structures-of-RVV-X-and-multactivase-two-representatives-of-P-IIIId-SVMPs-A-Ribbon\\_fig9\\_303318577](https://www.researchgate.net/figure/Structures-of-RVV-X-and-multactivase-two-representatives-of-P-IIIId-SVMPs-A-Ribbon_fig9_303318577)
138. Wolgast LR. Chapter 158 - Laboratory Diagnosis of Lupus Anticoagulant and Antiphospholipid Antibodies. In: Shaz BH, Hillyer CD, Reyes Gil M, éditeurs. *Transfusion Medicine and Hemostasis (Third Edition).* Elsevier; 2019. p. 925-31.
139. Petty RE, Laxer RM. CHAPTER 16 - SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS. In: Cassidy JT, Petty RE, Laxer RM, Lindsley CB, éditeurs. *Textbook of Pediatric Rheumatology (Fifth Edition).* Philadelphia: W.B. Saunders; 2005. p. 342-91.
140. Smith LJ. Laboratory Diagnosis of the Lupus Anticoagulant. *Am Soc Clin Lab Sci.* 1 janv 2017;30(1):7-14.

141. DRVVT [Internet]. Practical-Haemostasis.com. [cité 30 mai 2022]. Disponible sur: <https://practical-haemostasis.com/Thrombophilia/APS/drvvt.html>
142. Rand JH, Wolgast LR. 20 - Antiphospholipid Syndrome: Pathogenesis, Clinical Presentation, Diagnosis, and Patient Management. In: Kitchens CS, Kessler CM, Konkle BA, éditeurs. Consultative Hemostasis and Thrombosis (Third Edition). Philadelphia: W.B. Saunders; 2013. p. 324-41.
143. Wahed A, Dasgupta A. Chapter 17 - Sources of Errors in Hematology and Coagulation. In: Wahed A, Dasgupta A, éditeurs. Hematology and Coagulation. San Diego: Elsevier; 2015. p. 277-93.
144. Triplett DA, Stocker KF, Unger GA, Barna LK. The Textarin/Ecarin ratio: a confirmatory test for lupus anticoagulants. *Thromb Haemost.* 20 déc 1993;70(6):925-31.
145. Diagnostic biologique du SAPL [Internet]. [cité 30 mai 2022]. Disponible sur: <http://ao.um5.ac.ma/xmlui/bitstream/handle/123456789/14278/P0352009.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
146. Textarin:Ecarin Ratio [Internet]. [cité 30 mai 2022]. Disponible sur: [https://practical-haemostasis.com/Thrombophilia/APS/textarin\\_ecarin\\_ratio.html](https://practical-haemostasis.com/Thrombophilia/APS/textarin_ecarin_ratio.html)
147. Duarte RCF, Rios DRA, Leite PM, Alves LC, Magalhães HPB, Carvalho M das G. Thrombin generation test for evaluating hemostatic effects of Brazilian snake venoms. *Toxicon Off J Int Soc Toxinology.* mai 2019;163:36-43.
148. Matsui T, Hamako J. Structure and function of snake venom toxins interacting with human von Willebrand factor. *Toxicon Off J Int Soc Toxinology.* 15 juin 2005;45(8):1075-87.
149. Maladie de Willebrand - Encyclopédie médicale - Medix [Internet]. [cité 4 août 2022]. Disponible sur: <http://www.medix.free.fr/sim/willebrand-hematologie.php>
150. Marsh N, Williams V. Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. *Toxicon.* juin 2005;45(8):1171-81.
151. Polgár J, Clemetson JM, Kehrel BE, Wiedemann M, Magnenat EM, Wells TNC, et al. Platelet Activation and Signal Transduction by Convulxin, a C-type Lectin from *Crotalus durissus terrificus* (Tropical Rattlesnake) Venom via the p62/GPVI Collagen Receptor \*. *J Biol Chem.* 23 mai 1997;272(21):13576-83.
152. Herr AB. Charming the Snake: Venom-Derived Peptides Show Surprising Efficacy as Glycoprotein VI-Targeting Antithrombotic Agents. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* juill 2017;37(7):1266-8.
153. Convulxine pour les fonctions plaquettaires par GPVI récepteur. [Internet]. [cité 3 juin 2022]. Disponible sur: [https://www.endotell.ch/shop/5-ENZYME-Convulxin\\_1](https://www.endotell.ch/shop/5-ENZYME-Convulxin_1)
154. Nurden AT, Nurden P. CHAPTER 57 - Inherited Disorders of Platelet Function. In: Michelson AD, éditeur. Platelets (Second Edition). Burlington: Academic Press; 2007. p. 1029-50.
155. Dunkley S, Arthur J, Evans S, Gardiner E, Shen Y, Andrews R. A familial platelet function disorder associated with abnormal signalling through the glycoprotein VI pathway. *Br J Haematol.* 1 juill 2007;137:569-77.
156. Latoxan [Internet]. [cité 23 août 2022]. Disponible sur: <https://www.latoxan.com/>

157. Stago - SStart® [Internet]. [cité 6 sept 2022]. Disponible sur: <https://www.stago-us.com/products-services/hemostasis-systems/startr/>
158. Stocker K, Fischer H, Brogli M. Determination of factor X activator in the venom of the saw-scaled viper (*Echis carinatus*). *Toxicon Off J Int Soc Toxinology*. 1986;24(3):313-5.
159. Pentapharm\_RVV-Factor-X-Activator.pdf [Internet]. [cité 23 août 2022]. Disponible sur: [https://www.avant-medical.com/wp-content/uploads/Pentapharm\\_RVV-Factor-X-Activator.pdf](https://www.avant-medical.com/wp-content/uploads/Pentapharm_RVV-Factor-X-Activator.pdf)

## ANNEXES

Echantillons	Dilution	Concentration solution batroxobine (UI/mL)	Concentration dans mélange réactionnel (UI/mL)	Temps (sec)		
				T1	T2	Moyenne
Bx-D	Pur	20	5	-	-	
Bx-D	1/2	10	2,5	-	-	
Bx-D	1/4	5	1,25	-	-	
Bx-D	1/8	2,5	0,625	6,5	5,9	6,2
Bx-D	1/16	1,25	0,312	-	-	
Bx-D	1/32	0,625	0,156	15,9	16,2	16,05
Bx-D	1/64	0,312	0,0781	27,1	26,4	26,75
Bx-D	1/128	0,156	0,0390	44,1	43,5	43,8
Bx-D	1/256	0,0781	0,0195	73,3	71,2	72,25
Bx-D	1/512	0,0390	0,00976	126,4	124,6	125,5
Bx-D	1/1024	0,0195	0,00488	238	237,2	237,6

Bx-G	Pur	20	5	16	16,3	16,15
Bx-G	1/2	10	2,5	29,6	29	29,3
Bx-G	1/4	5	1,25	51,5	49,8	50,65
Bx-G	1/8	2,5	0,625	91,5	88,2	89,85
Bx-G	1/16	1,25	0,312	173,3	169	171,15

Annexe 1 : Résultats des tests Batroxobine (comparant la batroxobine de référence (Bx-G) à Bx-D)

Volume RVV-V (µL)	[RVV-V] dans le mélange initial (U/mL)	RVV-V-C (Référence)			RVV-V-A			RVV-V-B		
		T1 (sec)	T2 (sec)	Moyenne	T1 (sec)	T2 (sec)	Moyenne	T1 (sec)	T2 (sec)	Moyenne
10 µL à 200 U/mL	4	23,7	23,5	23,6	34,1	34,4	34,3	23,4	23,7	23,6
10 µL à 100 U/mL	2	23,3	23,1	23,2	39,6	39,4	39,5	24,7	24,7	24,7
10 µL à 50 U/mL	1	23,4	23,6	23,5	42,5	42,9	42,7	28,8	29,3	29,1
10 µL à 25 U/mL	0,5	27,2	27,1	27,2	46	45,7	45,9	31,6	31,7	31,7
10 µL à 12.5 U/mL	0,25	30,5	31,3	30,9	-	-		-	-	
10 µL à 6.25 U/mL	0,125	38,2	38	38,1	-	-		-	-	
10 µL à 3.12 U/mL (Tampon)	0,0625	43,7	43,7	43,7	-	-		-	-	
10 µL à 0 U/mL (Tampon)	0	54,7	54,9	54,8	54,7	54,9	54,8	54,7	54,9	54,8

Annexe 2 : Résultats des tests RVV-V (comparant la référence (RVV-V C) à 2 autres échantillons (RVV- A et B))

Echantillons	Dilution	Concentration RVV-X (UI/mL)	Temps mesuré (sec)		
			T1	T2	Moyenne
Tampon	1/1	0	112,8	110,7	111,75
Tampon	1/1	0	110,2	112,2	111,2
4	1/2	10	10,9	10,7	10,8
4	1/4	5	10,9	10,7	10,8
4	1/8	2,5	10,5	10,8	10,65
4	1/16	1,25	12,1	10,9	11,5
4	1/32	0,625	11,2	11,2	11,2
4	1/64	0,312	12,4	12,4	12,4
4	1/128	0,156	13	13,5	13,25
4	1/256	0,0781	15,1	15,1	15,1
4	1/512	0,0390	17,2	17,4	17,3
4	1/1024	0,0195	20,4	20,4	20,4
4	1/2048	0,00976	23,6	23,6	23,6
4	1/4096	0,00488	27,7	28	27,85
4	1/8192	0,00244	35,1	35,2	35,15
4	1/16384	0,00122	43,1	43,9	43,5

Tampon	1/1	0	112,8	110,7	111,75
Tampon	1/1	0	110,2	112,2	111,2
3	1/2	10	11,2	14,6	11,2
3	1/4	5	11,4	11,5	11,45
3	1/8	2,5	11,7	11,7	11,7
3	1/16	1,25	10,5	11,5	11
3	1/32	0,625	12	12	12
3	1/64	0,312	12,6	12,6	12,6
3	1/128	0,156	14	14	14
3	1/256	0,0781	15,2	15,1	15,15
3	1/512	0,0390	17,6	17,8	17,7
3	1/1024	0,0195	20,2	20,3	20,25
3	1/2048	0,00976	23	22,9	22,95
3	1/4096	0,00488	27	26,7	26,85
3	1/8192	0,00244	34,8	34,4	34,6
3	1/16384	0,00122	41,6	41,9	41,75

Annexe 3 : Résultats des tests RVV-X (comparant la référence (RVV-X 3) à RVV-X 4)

Echantillons	Dilution	Concentration PROTAC (UI/mL)	Temps (sec)		
			T1	T2	Moyenne
Tampon	Pur	0	34,1	34,3	34,2
Tampon	Pur	0	31,8	31,6	31,7

Référence	Pur	6	>240	214,1	214,1
Référence	1/2	3	>240	>240	240
Référence	1/4	1,5	>240	>240	240
Référence	1/16	0,375	192	213,9	202,95
Référence	1/64	0,0937	84,4	81	82,7
Référence	1/256	0,0234	44,9	43,8	44,35
Référence	1/1024	0,00585	30,7	30,2	30,45

Pr-3	Pur	20	224,1	233,5	228,8
Pr-3	1/4	5	>240	>240	240
Pr-3	1/16	1,25	143,2	145,4	144,3
Pr-3	1/64	0,312	59,2	61,1	60,15

Pr-4	Pur	20	147,5	150,9	149,2
Pr-4	1/4	5	151,5	159,2	155,35
Pr-4	1/16	1,25	69	66,1	67,55
Pr-4	1/64	0,312	39,3	39,7	39,5

Pr-6	Pur	20	>240	>240	240
Pr-6	1/4	5	206,4	197,4	201,9
Pr-6	1/16	1,25	>240	>240	240
Pr-6	1/64	0,312	147,6	145,1	146,35
Pr-6	1/256	0,0781	178,6	150	164,3
Pr-6	1/1024	0,0195	93,9	93,5	93,7

Annexe 4 : Résultats des tests Protac (comparant le Protac® commercial à Pr-3, Pr-4 et Pr-6)



## **Serment de Galien**



« En présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples, je jure :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque ».

Mme Gabrielle LE GUYADEC

## VENINS DE SERPENT ET HEMOSTASE : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE ET MESURE DE L'ACTIVITÉ DE PROTÉASES OPHIDIENNES

### RÉSUMÉ :

Bien que les serpents soient des espèces appréhendées aujourd'hui, les anciennes civilisations respectaient à juste titre leur pouvoir guérisseur. On ne peut ôter aux serpents leur capacité à produire au sein de leur venin, des enzymes et protéines au large panel d'action disposant d'un intérêt médical, pharmaceutique et/ou biologique. L'étude approfondie de ces toxines a permis de mieux appréhender la physiopathologie des envenimations ophidiennes mais également de comprendre certaines voies de signalisation biologiques. Ces protéines enzymatiques et non enzymatiques ont des propriétés leur conférant une activité pharmacologique potentielle. La découverte des effets des toxines ophidiennes sur la coagulation dès le XVIIIe siècle a motivé la recherche dans ce domaine. L'utilisation des propriétés des venins a bien évolué depuis cette époque en lien avec les avancées technologiques et scientifiques du dernier siècle. Le toxinomimétisme a été une référence dans le développement des médicaments issus de la structure de protéines de venins ophidiens. À ce jour, on en compte une dizaine modélisés et conçus à partir de toxines ophidiennes. D'autres molécules prometteuses anti-cancéreuses et antalgiques sont en cours de développement. Certaines toxines ophidiennes, de par leurs effets sur la coagulation, ont également permis de développer des tests de biologie médicale en hémostase. Certains de ces tests sont largement utilisés en routine comme le temps de Stypven avec RVV-X pour le dépistage du lupus anticoagulant ou le dosage de protéine C à base de Protac® dans les explorations de thrombophilie. Au cours de ce travail, nous nous sommes attachés à rapporter les données récentes relatives à la physiopathologie des envenimations, aux innovations médicales et aux tests diagnostiques en hémostase en rapport avec des protéines ophidiennes. Nous avons également mis en place des tests de la coagulation qui ont permis de caractériser l'activité de cinq toxines purifiées de venins de serpents fournies par la société Latoxan® (batroxobine, écarine, Protac®, RVV-V et RVV-X). L'objectif a été de comparer l'activité des produits de fractionnement et de purification aux références commerciales afin de valider les stratégies de purification.

**MOTS CLÉS :** protéines ophidiennes, hémostase, tests de la coagulation, serpents, venins

**SPÉCIALITÉ :** Biologie médicale