



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

T/PH/N/2006/368

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ – NANCY 1

2006

DOSSIER

FACULTE DE PHARMACIE



**L'ACTION DES VENINS OPHIDIENS SUR
L'HEMOSTASE**

THESE

Présentée et soutenue publiquement

Le 29 juin 2006

pour obtenir

le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

par Christelle RENARD
née le 27 février 1981

Membres du Jury

Président : Mme Janine SCHWARTZBROD, Professeur

Juges : Mme Jocelyne COLLOMB, Maître de Conférences
M. René PAULUS, Pharmacien

Membres du personnel enseignant 2005/2006

Doyen

Chantal FINANCE

Vice Doyen

Francine PAULUS

Président du Conseil de la Pédagogie

Pierre LABRUDE

Responsable de la Commission de la Recherche

Jean-Claude BLOCK

Directeur des Etudes

Gérald CATAU

Responsable de la Filière officine

Gérald CATAU

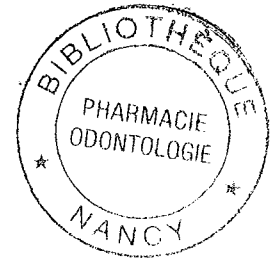
Responsables de la Filière industrie

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Isabelle LARTAUD

Responsable de la Filière hôpital

Jean-Michel SIMON

**DOYEN HONORAIRE**

M. VIGNERON Claude

PROFESSEURS HONORAIRES

Mlle BESSON Suzanne

Mlle GIRARD Thérèse

M. JACQUE Michel

M. LECTARD Pierre

M. LOPPINET Vincent

M. MARTIN Jean-Armand

M. MORTIER François

M. MIRJOLET Marcel

M. PIERFITTE Maurice

PROFESSEURS EMERITES

M. BONALY Roger

M. HOFFMAN Maurice

M. SIEST Gérard

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

Mme FUZELLIER Marie-Claude

Mlle IMBS Marie-Andrée

M. MONAL Jean-Louis

Mme POCHON Marie-France

Mme ROVEL Anne

Mme WELLMAN-ROUSSEAU Marie Monica

PROFESSEURS

M. ASTIER Alain
 M. ATKINSON Jeffrey
 M. AULAGNER Gilles
 M. BAGREL Alain
 M. BLOCK Jean-Claude
 Mme CAPDEVILLE-ATKINSON Christine
 Mme FINANCE Chantal
 Mme FRIANT-MICHEL Pascale
 Mlle GALTEAU Marie-Madeleine
 M. HENRY Max
 M. JOUZEAU Jean-Yves
 M. LABRUDE Pierre
 Mme LARTAUD Isabelle
 Mme LAURAIN-MATTAR Dominique
 M. LALLOZ Lucien
 M. LEROY Pierre
 M. MAINCENT Philippe
 M. MARSURA Alain
 M. MERLIN Jean-Louis
 M. NICOLAS Alain
 M. REGNOUF de VAINS Jean-Bernard
 M. RIHN Bertrand
 Mme SCHWARTZBROD Janine
 M. SIMON Jean-Michel
 M. VIGNERON Claude

Pharmacie clinique
 Pharmacologie cardiovasculaire
 Pharmacie clinique
 Biochimie
 Santé publique
 Pharmacologie cardiovasculaire
 Virologie, immunologie
 Mathématiques, physique, audioprothèse
 Biochimie clinique
 Botanique, mycologie
 Bioanalyse du médicament
 Physiologie, orthopédie, maintien à domicile
 Pharmacologie
 Pharmacognosie
 Chimie organique
 Chimie physique générale
 Pharmacie galénique
 Chimie thérapeutique
 Biologie cellulaire oncologique
 Chimie analytique
 Chimie Thérapeutique
 Biochimie
 Bactériologie, parasitologie
 Droit officinal, législation pharmaceutique
 Hématologie, physiologie

BU PHARMA-ODONTOL



D

104 075275 6

MAITRES DE CONFERENCES

Mme	ALBERT Monique	Bactériologie - virologie
Mme	BANAS Sandrine	Parasitologie
Mme	BENOIT Emmanuelle	Communication et santé
M.	BOISBRUN Michel	Chimie Thérapeutique
Mme	BOITEUX Catherine	Biophysique, Audioprothèse
M.	BONNEAUX François	Chimie thérapeutique
M.	CATAU Gérard	Pharmacologie
M.	CHEVIN Jean-Claude	Chimie générale et minérale
M	CLAROT Igor	Chimie analytique
Mme	COLLOMB Jocelyne	Parasitologie, conseils vétérinaires
M.	COULON Joël	Biochimie
M.	DANGIEN Bernard	Botanique, mycologie
M.	DECOLIN Dominique	Chimie analytique
M.	DUCOURNEAU Joël	Biophysique, audioprothèse, acoustique
M.	DUVAL Raphaël	Microbiologie clinique
Mme	FAIVRE Béatrice	Hématologie
M.	FERRARI Luc	Toxicologie
Mle	FONS Françoise	Biologie végétale, mycologie
M.	GANTZER Christophe	Virologie
M.	GIBAUD Stéphane	Pharmacie clinique
Mle	HINZELIN Françoise	Mycologie, botanique
M.	HUMBERT Thierry	Chimie organique
M.	JORAND Frédéric	Santé, environnement
Mme	KEDZIEREWICZ Francine	Pharmacie galénique
Mle	LAMBERT Alexandrine	Biophysique, biomathématiques
Mme	LEININGER-MULLER Brigitte	Biochimie
Mme	LIVERTOUX Marie-Hélène	Toxicologie
Mle	MARCHAND Stéphanie	Chimie physique
Mme	MARCHAND-ARVIER Monique	Hématologie
M.	MENU Patrick	Physiologie
M.	MERLIN Christophe	Microbiologie environnementale et moléculaire
M.	NOTTER Dominique	Biologie cellulaire
Mme	PAULUS Francine	Informatique
Mme	PERDIAKIS Christine	Chimie organique
Mme	PERRIN-SARRADO Caroline	Pharmacologie
Mme	PICHON Virginie	Biophysique
Mme	SAUDER Marie-Paule	Mycologie, botanique
Mle	THILLY Nathalie	Santé publique
M.	TROCKLE Gabriel	Pharmacologie
M.	ZAIOU Mohamed	Biochimie et biologie moléculaire appliquées aux médicaments
Mme	ZINUTTI Colette	Pharmacie galénique

PROFESSEUR ASSOCIE

Mme	GRISON Geneviève	Pratique officinale
-----	------------------	---------------------

PROFESSEUR AGREGÉ

M.	COCHAUD Christophe	Anglais
----	--------------------	---------

ASSISTANTS

Mme	BEAUD Mariette	Biologie cellulaire
Mme	BERTHE Marie-Catherine	Biochimie
Mme	MOREAU Blandine	Pharmacognosie, phytothérapie
Mme	PAVIS Annie	Bactériologie

« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION,
NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES
THESES, CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES
COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

SERMENT DES APOTHICAIRES



Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit 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 ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

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

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



Remerciements

A Madame Jocelyne Collomb,

Pour m'avoir accompagnée tout au long de ce travail, pour votre disponibilité et votre clarté de raisonnement, veuillez trouver ici mes sincères remerciements.

A Madame Janine Schwartzbrod,

Vous m'avez fait l'honneur d'accepter la présidence du jury. Je vous prie de trouver en ce travail, le témoignage de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur René Paulus,

Votre accueil et votre soutien m'ont profondément touché. Je suis heureuse de vous compter parmi les membres du jury et je vous en remercie.

A ma famille,

Pour votre soutien tout au long de mes études, pour votre patience et votre écoute. Merci aussi à Stéphane, mon frère, pour ses conseils en informatique.

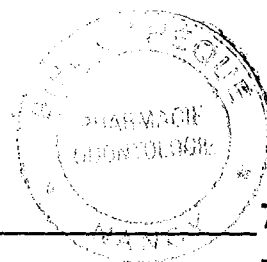
A Clément, mon fiancé,

Pour avoir su patienter et m'encourager tout au long de ces années. Pour son aide à la réalisation du diaporama.

A mes amis,

Ceux de mon enfance, ceux de la faculté et les autres, veuillez trouver ici l'expression de mon amitié sincère.

Table des matières



I. Généralités	7
A. Espèces ayant un venin hémotoxique	7
1. Les Viperidés	7
2. Les Crotalidés	8
B. L'appareil inoculateur	11
C. Epidémiologie	13
D. Symptomatologie	14
1. Le syndrome vipérin	15
1.1 Les symptômes locaux	15
1.2 Les symptômes systémiques	17
1.2.1 La coagulation intravasculaire disséminée (CIVD)	17
1.2.2 Les syndromes hémorragiques	18
2. L'évolution	19
3. Les séquelles	19
4. Cas d'une envenimation par les vipères françaises	19
4.1 Les signes cliniques	20
4.2 La conduite à tenir	20
II. Physiologie de l'hémostase	23
A. Le spasme vasculaire	25
B. L'hémostase primaire	25
1. Description des plaquettes	25
2. L'adhésion plaquettaire à l'endothélium	27
3. L'activation et la sécrétion plaquettaire	28
4. L'agrégation plaquettaire	31
5. Régulation de l'hémostase primaire	32
C. La coagulation	34
1. Deux voies vers l'activation de la prothrombine	39
2. Activation de la prothrombine	42
3. Voie commune vers la thrombine (ou facteur FII)	43
4. Voie commune vers la fibrine	45
5. La régulation de la coagulation	48
D. La fibrinolyse	51
1. Le plasminogène	51
2. Les activateurs du plasminogène	52
3. La régulation de la fibrinolyse	54
III. Action des venins sur l'hémostase primaire	57
A. Les hémorragines	57
1. Structure des hémorragines	57
2. Mode d'action des hémorragines	61
B. Composants interagissant avec les plaquettes	63
1. Les activateurs de l'agrégation plaquettaire	63
1.1 Enzymes à action directe sur les plaquettes	63
1.2 Composés non enzymatiques à action directe sur les plaquettes	66
1.3 Composés interagissant avec le Facteur Willebrand	69

2. Les inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire	74
2.1. Les antagonistes de la GPIb	74
2.2. Les α fibrinogénases	75
2.3. Les phospholipases A ₂	76
2.4. Les 5' nucléotidases	77
2.5. Les antagonistes du récepteur au fibrinogène	78
2.6. Autres inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire	80
C. Action des venins sur la coagulation	87
1. Protéines à activité coagulante	87
1.1. Les activateurs du facteur V	87
1.2. Les activateurs du facteur X	90
1.3. Les activateurs du facteur IX	91
1.4. Les activateurs de la prothrombine (facteur II)	91
1.4.1. Groupe A des activateurs de la prothrombine.	92
1.4.2. Groupe B des activateurs de la prothrombine	93
1.4.3. Groupe C des activateurs de la prothrombine	94
1.4.4. Groupe D des activateurs de la prothrombine	95
1.5. Les enzymes agissant sur le fibrinogène (enzymes thrombine-like)	97
1.5.1. Venombin A	98
1.5.2. Venombin AB	101
1.5.3. Venombin B	103
2. Protéines à activité anticoagulante	103
2.1. Les activateurs de la protéine C	103
2.2. Les inhibiteurs des facteurs IX/X	104
2.3. L'inhibiteur de la thrombine	106
2.4. Les phospholipases A ₂	107
D. Action des venins sur la fibrinolyse	111
1. Les protéinases fibrinolytiques	112
1.1. Métalloprotéinases	113
1.2. Sérine protéases	120
2. Les activateurs du plasminogène	121
3. L'inhibiteur de la plasmine.	124
IV. Utilisation des venins ophidiens : outils de diagnostic, modèles moléculaires, thérapeutiques d'aujourd'hui et de demain	130
A. Les méthodes traditionnellement utilisées pour l'exploration de l'hémostase	130
1. Exploration de l'hémostase primaire	130
2. Exploration de la coagulation	131
2.1. Temps de céphaline activé	132
2.2. Temps de Quick	132
2.3. Exploration de la fibrinoformation	133
3. Exploration de la fibrinolyse	133
B. Les protéines de venins de serpents utilisées pour l'exploration de l'hémostase	134
1. Les protéines de venins de serpent utilisées comme réactifs de laboratoire et leurs applications en analyse.	134
1.1. Etudes sur les enzymes thrombine-like ophidiennes et le fibrinogène	134
1.2. Analyses et recherches sur la fonction de la prothrombine	137
1.3. Analyses et recherches sur la fonction du facteur V	138
1.4. Analyses et recherches sur la fonction du facteur X	139
1.5. Les anticoagulants lupiques	140
1.6. La protéine C et résistance à la protéine C activée	142
1.7. Etudes sur le facteur Von Willebrand	145
1.8. Etudes sur les glycoprotéines plaquettaires	146
2. Protéines ophidiennes utilisées comme modèles moléculaires	146

2.1. Le TSV-PA	146
2.2. La thrombine	147
C. Utilisations thérapeutiques de plusieurs toxines ophidiennes affectant l'hémostase	148
D. Perspectives	153
1. Les désintégrines	153
2. Les estérases d'arginine	154
3. Les fibrinogénases	154
4. Enzymes affectant les inhibiteurs plasmatiques	154
5. Autres protéines	155
Conclusion	156



Table des illustrations

Figure 1 : Squelette de la tête des ophidiens	12
Figure 2 : Œdème du membre supérieur droit suite à une morsure d'Echis	15
Figure 3 : Hémorragie suite à une morsure par Bitis arietans	16
Figure 4 : Nécrose suite à une morsure par Bitis arietans.....	16
Figure 5 : Les différentes étapes de l'hémostase.....	24
Figure 6 : Anatomie fonctionnelle de la plaquette	26
Figure 7 : Etapes de l'adhésion et du début de l'activation plaquettaire	29
Figure 8 : L'agrégation plaquettaire	32
Figure 9 : Antagonismes de la PGI2 et de la TXA2	33
Figure 10 : Cascade de la coagulation	41
Figure 11 : Déroulement de la coagulation, complexe prothrombinase	43
Figure 12 : Les étapes de la fibrinoformation	46
Figure 13 : Les étapes de la fibrinoformation	47
Figure 14 : Le caillot fibrinoplaquettaire.....	47
Figure 15 : Les cibles des principaux inhibiteurs de la coagulation.....	50
Figure 16 : Structure du plasminogène et transformation en plasmine.....	52
Figure 17 : Etapes simplifiées de la fibrinolyse	53
Figure 18 : Structures schématisées de métalloprotéases de venins de serpents	60
Figure 19 : Actions de différentes protéines de venins de serpents sur l'aggrégation plaquettaire	64
Figure 20 : Mécanisme d'action des phospholipases A2	66
Figure 21 : Représentation du tétramère cyclique CVX $\alpha_4\beta_4$	67
Figure 22 : Structure du domaine A1 complexé avec la botrocétine et la bitiscétine.....	71
Figure 23 : La structure moléculaire de la plus petite des désintégrines : l'échistatine.....	79
Figure 24 : Structure globale de l'échicétine.....	83
Figure 25 : Action de différentes protéines de venins de serpent sur la coagulation	89
Figure 26 : Représentation schématique des structures des différents activateurs de la prothrombine.....	96
Figure 27 : Actions de différentes protéines de serpents sur la fibrinolyse	111
Figure 28 : Structure tridimensionnelle de la fibrolase.....	116
Figure 29 : Structure tridimensionnelle du TSV-PA.....	123
Tableau 1 : Incidence et sévérité des morsures de serpent dans le monde	14
Tableau 2 : Gradation des envenimations vipérines selon les signes et symptômes observés.....	20
Tableau 3 : Principaux récepteurs et glycoprotéines de la membrane plaquettaire	27
Tableau 4 : Facteurs de coagulation.....	35
Tableau 5 : Les activateurs de l'agrégation plaquettaire	73
Tableau 6 : Les inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire	84
Tableau 7 : Classification des activateurs de la prothrombine de venins de serpent.....	92
Tableau 8 : Caractéristiques des enzymes agissant sur le fibrinogène	102
Tableau 9 : Propriétés d'enzymes fibrinolytiques de venin de serpent	115
Tableau 10 : Propriétés biologiques et physiologiques des fibrin(ogè)nases décrites récemment.....	119
Tableau 11 : Utilisation de composés de venins ophidiens pour le développement de test d'hémostase.....	134

De tous temps, les serpents ont occupé une place particulière dans la psychologie humaine. Selon les époques, les civilisations et les religions, ces animaux sont considérés comme des représentations divines, parfois maléfiques, mais toujours vénérées; plus fréquemment et malheureusement pour eux, comme des objets de répulsion et ils sont alors massacrés sans pitié.

On dénombre actuellement 2 700 espèces de serpents réparties sur tous les continents à l'exception de l'Antarctique. D'une certaine manière, tous les serpents peuvent être venimeux puisque tous produisent diverses enzymes qui entament la digestion de la proie dès qu'elle est ingérée dans la cavité buccale et avant même sa déglutition. Cependant, l'idée admise est que les serpents réellement venimeux sont ceux qui disposent de dents spécialisées en mesure d'injecter du venin dans les tissus de la proie. Ainsi, seules quelques familles ont des représentants que l'on peut qualifier de venimeux : les Colubridés (couleuvres), les Elapidés (cobras, serpents-corail, bungares, mambas, taïpans, serpents de mer) , les Viperidés et les Crotalidés.

Le venin de serpent est un véritable cocktail de substances chimiques dont la composition varie d'une espèce à l'autre mais aussi selon l'âge de l'individu, selon la progression de son cycle... Elle peut même être différente d'un crochet à l'autre pour un même individu ! De façon générale, les protéines constituent 90 à 95 % du poids sec des venins et sont responsables de la quasi totalité des effets biologiques de ces derniers. Parmi les centaines, voir le millier de protéines différentes contenues dans un venin de serpent, on trouve évidemment des toxines, en particulier des neurotoxines, cardiotoxines, hémotoxines mais aussi des protéines non toxiques, ce qui ne veut pas dire qu'elles soient dépourvues de propriétés pharmacologiques (lectines, protéines liant le facteur de Von Willebrand, désintégrines, bradykinine, peptides natriurétique) et diverses enzymes (protéases, phospholipases, phosphodiesterases, cholinestérases, aminotransférases, catalase, hyaluronidase, nucléosidase...la liste n'est pas exhaustive).

C'est la complexité de la composition des venins de serpents et leur grande variabilité qui expliquent l'extrême diversité de leurs effets biologiques. Schématiquement, il est admis que les venins des Elapidés sont responsables de syndromes neurotoxiques pouvant entraîner la mort par paralysie respiratoire tandis que ceux des Vipéridés impliquent des syndromes inflammatoires, hémorragiques ou nécrotiques.

Ce mémoire traite exclusivement des venins ophidiens ayant une action sur l'hémostase. Le but est de comprendre par quels procédés les composants de ces venins agissent sur les différentes étapes de la coagulation afin d'en faire des outils pharmacologiques, diagnostiques et thérapeutiques.



I. Généralités

A. Espèces ayant un venin hémotoxique

1. Les Viperidés

En Afrique, les espèces des genres *Cerastes*, vipère à cornes de la partie sud du bassin méditerranéen ; *Bitis* , la plus grosse des vipères, et *Echis* sont responsables de graves hémorragies. *Echis carinatus* et les espèces qui y sont apparentées (*E. ocellatus*, *E. leucogaster* et *E. pyramidum*) provoquent environ 25000 décès chaque année (Mion et al., 2002).

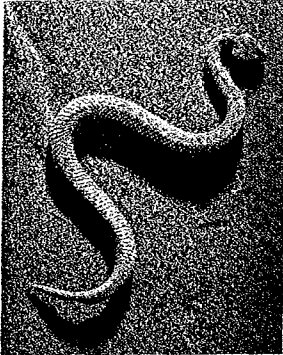
En Asie, on trouve *E. carinatus*, *E. multisquamatus* ; *E. sochureki* aux Indes et au Moyen-Orient, *Pseudocerastes persicus* en Iran et *Eristicophis macmahoni* dans les steppes asiatiques. Les espèces du genre *Vipera* (*V. lebetina* et *V. xanthina* par exemple) y sont beaucoup plus venimeuses que leurs cousines d'Europe occidentale. La vipère de Russell, *Daboia russelii*, est la seule espèce du Sud-Est asiatique (Mion et al., 2002).

En France métropolitaine, il existe quatre espèces de vipères toutes du genre *Vipera* qui vivent dans différentes régions :

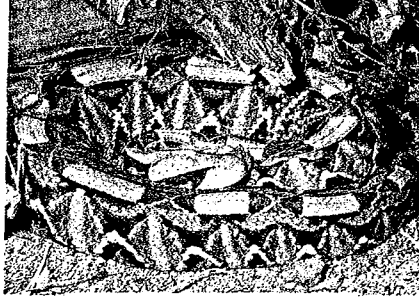
- *Vipera aspis*, la vipère aspic : dans les ¾ sud de la France
- *Vipera berus*, la vipère péliade : nord de la Loire et massif central
- *Vipera seoani*, la vipère basque : extrême sud-ouest de la France
- *Vipera ursinii*, la vipère d'Orsini : entre 1000 et 2400 m d'altitude dans les Alpes de la haute Provence

Parmi ces espèces, seules *V. aspis* et *V. berus* constituent le principal risque pour l'homme (De Haro L., 2003). Les vipères européennes ont une activité essentiellement diurne. Après une longue période d'hibernation, elles sont

Les Vipéridés



Ceraste ceraste, Gaywood
M. et Spellerberg I., 2003.



Bitis gabonica,
Freiberg M. et Walls J,
1984.



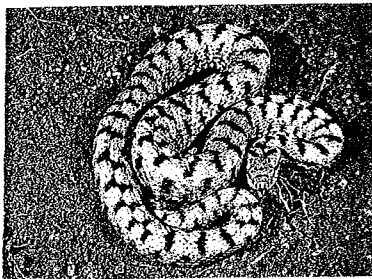
Echis carinatus, Freiberg
M. et Walls J, 1984.



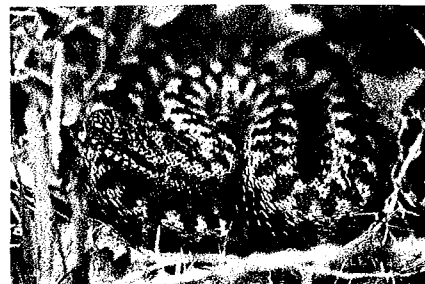
Vipera lebetina, Le Garff
B, 1991.



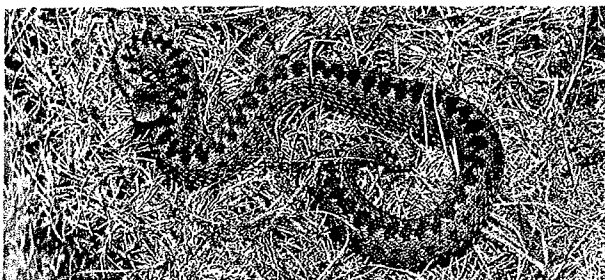
Vipera russelii,
Freiberg M. et Walls J,
1984.



Vipera aspis, Santiani
M, 2002.



Vipera berus, Naulleau
G, 1987.



Vipera ursinii, Santiani
M, 2002.



Vipera seoani,
Naulleau G, 1987.

essentiellement actives entre le mois d'avril et le mois d'octobre. C'est durant la période estivale, où la rencontre entre l'homme et l'animal est la plus fréquente, que l'on observe le plus grand nombre de morsures.

2. Les Crotalidés

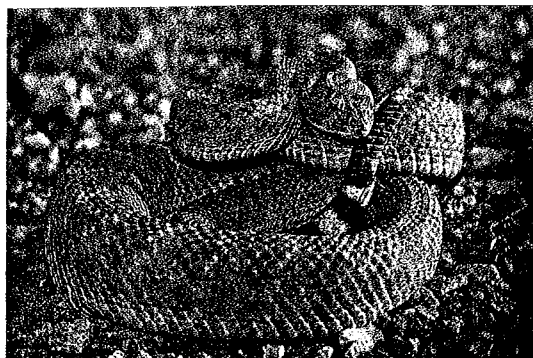
Aux Etats-Unis en 1995, sur 1331 envenimations, on ne comptait qu'un seul décès par morsure de Crotalidé. En Amérique du Nord et au Mexique, les serpents à sonnette comme *Crotalus atrox* ou *Sistrurus catenatus* sont plus nombreux que les *Agkistrodon*. En Amérique du Sud, ce sont les bothrops ou fers de lance qui sont les plus venimeux. Le jararaca est le plus courant en Guyane, *Lachesis muta*, immense, le plus craint (Mion et al., 2002).

A la Martinique, *Bothrops lanceolatus* ou fer de lance antillais, est responsable d'une vingtaine de morsures par an. Avant l'utilisation de l'immunothérapie en 1992, il provoquait le décès dans 13 % des cas.

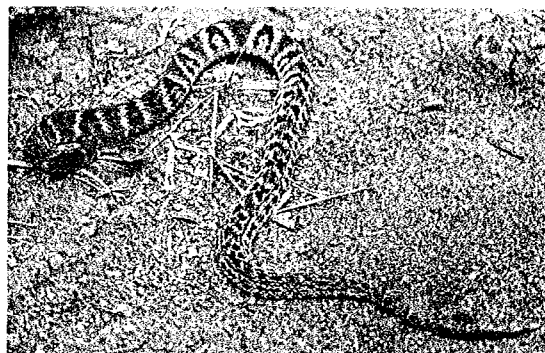
En Asie du Sud-Est, les plantations d'hévéas sont habitées par *Agkistrodon* ou *Calloselasma rhodostoma*. A Bangkok, c'est *Trimeresurus albolabris* qui provoque 450 envenimations annuelles mais sans décès semble-t-il. On trouve aussi des *Trimeresurus* en Indonésie, à Taiwan et en Chine du Sud. En Corée, les crotales présents sont surtout du type *Agkistrodon halys* (Mion et al., 2002).

Même si les espèces responsables de troubles de l'hémostase sont essentiellement des Vipéridés et des Crotalidés, certaines espèces d'Élapidés australiens et quelques Colubridés sont susceptibles d'induire à côté d'un syndrome cobraïque (paralysie de la jonction neuro-musculaire) des troubles sévères de l'hémostase.

Les Crotalidés



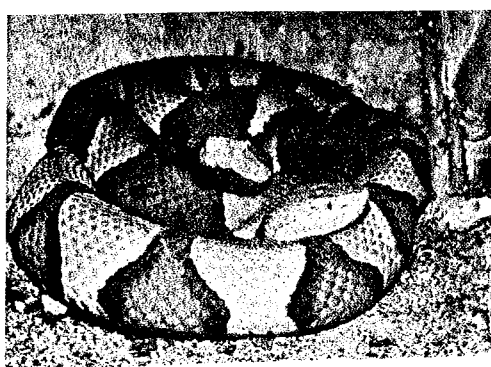
Crotalus atrox, Gaywood M. et
Spellerberg I., 2003.



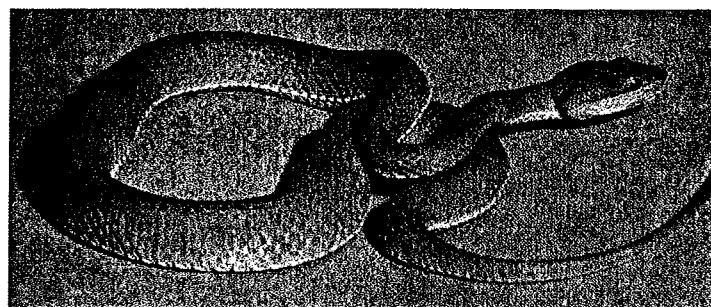
Bothrops jararaca, Freiberg M. et
Walls J., 1984.



Lachesis mutus, Rogé J-P. et
Sauvanet, 1987.



Agkistrodon contortrix, Freiberg
M. et Walls J., 1984.



Trimeresurus stejnegeri,
Freiberg M. et Walls J., 1984.

B. L'appareil inoculateur

Les venins de serpents ne sont que l'un des composants de ce qui se nomme "l'appareil venimeux". Celui-ci est constitué essentiellement de deux glandes venimeuses produisant le venin et d'un système d'injection composé de dents modifiées en crochets permettant au serpent de faire pénétrer son venin dans les tissus de sa proie ou de son agresseur. L'appareil venimeux des serpents est certainement le plus perfectionné que le monde animal terrestre ait élaboré. Sa fonction est d'immobiliser les proies dont l'animal va se nourrir et de jouer un rôle important dans la digestion des proies.

➤ Les glandes venimeuses

Les glandes venimeuses se situent en arrière de la région orbitaire. Il s'agit en fait de glandes salivaires qui se sont spécifiées. Elles sont compartimentées en lobes et lobules. Au centre, il se forme un réservoir qui débouche sur un canal excréteur. En avant des glandes venimeuses, se trouve une glande, accessoire, de nature muqueuse (Goyffon et Heurtault, 1994).

➤ Le système d'injection

Les serpents se divisent en 4 groupes, selon leur dentition (fig. 1)

Les aglyphes ne présentent aucune dent creuse ou sillonnée qui pourrait conduire du venin. Les serpents de ce groupe (Boas, Pythons, couleuvres) ne sont donc pas venimeux, mais la morsure d'un gros spécimen est néanmoins dangereuse.

Les opisthognathes présentent deux séries de crochets sillonnés, spécialisés et placés en arrière des maxillaires. Ils ne sont pas considérés comme dangereux pour l'Homme étant donné la position de leurs crochets. Ils ne peuvent guère blesser quelqu'un, sauf aux doigts lors de manipulations inadaptées, même lorsque leur gueule est grande ouverte. Les Boomslang, Boïgas, certains Serpents liane et

certaines Couleuvres appartiennent à ce groupe. Il est tout de même à noter que des Boomslang (*Dispholidus typus*) et des serpents liane (*Thelotornis*) ont provoqué des envenimations mortelles.

Les protéroglyphes (Cobras, mambas, taïpans...) présentent des crochets venimeux cannelés, fixés en avant de la bouche, maintenus dans la proie après la frappe pour une envenimation optimale avant la déglutition.

Les solénoglyphes (Vipères, Crotales, Mocassins, Fers de lance) possèdent des crochets à venin creusés d'un canal tubulaire. Ils sont mobiles, se dressent à la verticale au moment de l'ouverture de la bouche, ce qui autorise leur longueur accrue. Au repos, ils sont repliés dans leur fourreau et plus ou moins plaqués contre le plafond buccal. Lors de la morsure, ils sont plongés avec violence dans les chairs de la proie et l'injection de venin à lieu aussitôt. Les crochets sont ensuite retirés libérant la proie dont la mort est déjà programmée.

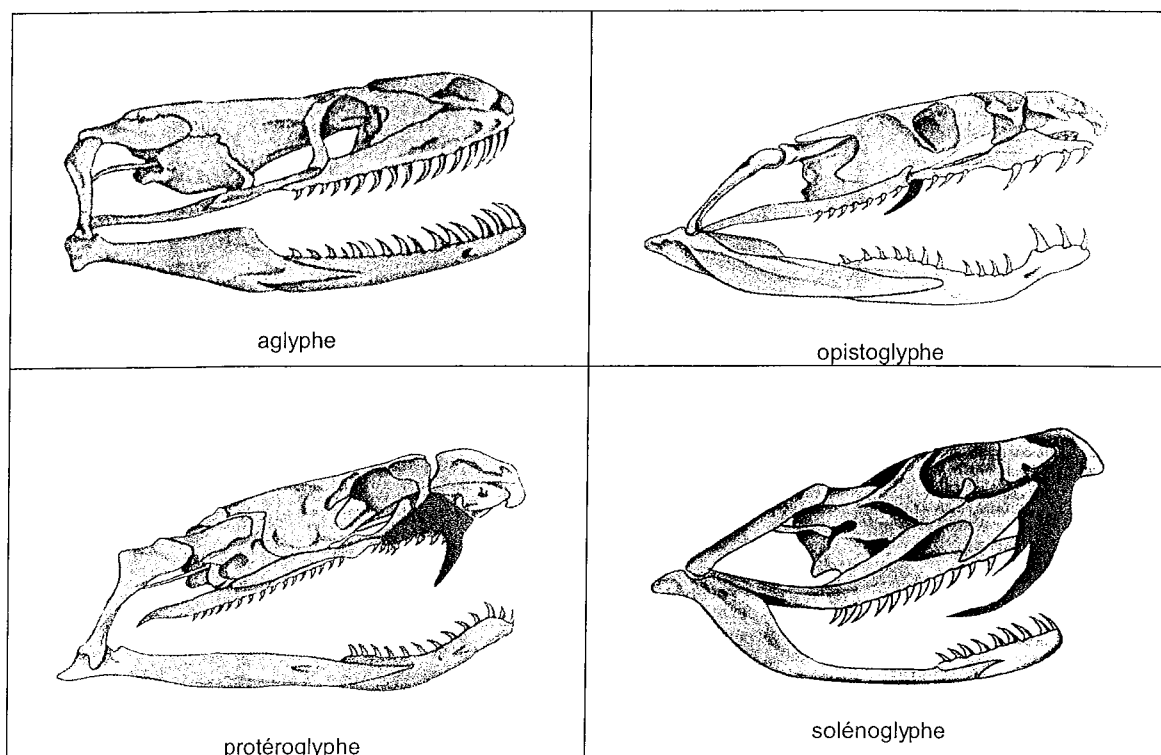


Figure 1 : squelette de la tête des ophidiens (d'après www.reptilesdumonde.ch)

C. Epidémiologie

Les serpents venimeux sont présents dans presque toutes les régions du globe, en dehors de l'Antarctique et de certaines îles, notamment dans le Pacifique. Leur densité est significativement plus élevée entre les tropiques.

Les circonstances qui mettent l'Homme au contact des serpents sont aujourd'hui mieux décrites :

- En milieu rural, les activités agricoles ou récréatives sont à l'origine de la plupart des accidents. La modernisation de l'agriculture réduit considérablement les risques. Cependant, les aménagements hydro-agricoles favorisent la création de biotopes susceptibles d'attirer certaines espèces qui représentent un danger potentiel.
- Dans les pays industrialisés, ce sont les comportements à risque qui entraînent des morsures "hasardeuses" chez les manipulateurs de serpents, dans le cadre de leur profession ou de leurs loisirs.
- Dans les pays en développement, l'insalubrité des maisons, les mauvaises conditions de vie occasionnent certaines morsures accidentelles à domicile, notamment lors du sommeil.

En Afrique, les morsures de serpent constituent une urgence médico-chirurgicale fréquente et un véritable problème de santé publique (Chippaux, 1999).

Le tableau 1 permet d'évaluer la morbidité et la mortalité par envenimation ophidienne dans le monde.

De très nombreux facteurs ont une influence sur la sévérité des envenimations. L'espèce responsable de la morsure est sans doute le plus important mais la taille du serpent, son état physiologique, la quantité de venin inoculé, le siège de la morsure, l'état de santé de la victime (malnutrition, affection intercurrente, maladie métabolique), son âge ou certaines circonstances (grossesse, prise en charge tardive) vont également avoir un rôle non négligeable sur l'évolution de l'envenimation (Chippaux J-P., 1999).

Région	Population(10 ⁶)	Nombre de morsures	Nombre d'envenimations	Nombre de décès
Europe	700	25 000	8 000	30
Moyen-Orient	160	20 000	15 000	100
USA - Canada	270	45 000	6 500	15
afrique latine	400	300 000	150 000	5 000
Afrique	750	1 000 000	500 000	20 000
Asie	3 000	4 000 000	2 000 000	1 00 000
Océanie	20	10 000	3 000	200
Total	5 300	5 400 000	2 682 500	125 345

Tableau 1 : incidence et sévérité des morsures de serpent dans le monde (Chippaux, 2002).

D. Symptomatologie

On peut artificiellement distinguer quatre grands syndromes dans la symptomatologie des envenimations ophidiennes :

- le syndrome cobraïque qui aboutit à une paralysie respiratoire par atteinte de la jonction neuromusculaire ;
- le syndrome vipérin qui réunit un syndrome hémorragique et des signes locaux marqués ;
- l'atteinte de la fonction circulatoire, moins spécifique, mais toujours grave ;
- l'atteinte des autres fonctions (signes généraux, digestifs, musculaires, etc.).

Dans le cadre de ce travail nous ne traiterons que du syndrome vipérin.

1. Le syndrome vipérin

Le syndrome vipérin associe douleur, œdème, troubles cutanés et nécrose. Les troubles hématologiques sont souvent présents mais ils constituent une entité bien distincte au point de vue étiologique et évolutif.

1.1 Les symptômes locaux

Chez les Viperidés, l'injection du venin, profonde en raison de la configuration des crochets, est très douloureuse, immédiate. Le plus souvent, la douleur augmente et irradie vers la racine du membre. Elle peut même être rebelle à toute thérapeutique analgésique et nécessiter une anesthésie locorégionale (Chippaux J-P., 1999).

L'œdème apparaît dans les minutes qui suivent la morsure, gagnant progressivement les zones voisines (fig. 2) et pouvant prendre des proportions inquiétantes chez un tiers des patients. C'est le premier signe objectif d'envenimation. Il se résorbe en 10 à 20 jours dans les morsures d'*Echis* mais peut persister plusieurs semaines, voire des mois, dans le cas de *Bitis* (Mion et al., 2002).



Figure 2 : Œdème du membre supérieur droit suite à une morsure d'*Echis* ; aggravation rapide de l'œdème dans les minutes et les heures qui suivent la morsure (Mion et al., 2000).

Certaines toxines, les hémorragines, provoquent des lésions des parois vasculaires qui se traduisent par des saignements (fig. 3) plus ou moins localisés au point d'inoculation en fonction de la quantité de venin et de sa vitesse de diffusion (Chippaux J-P., 1999).

Rappelons que la fonction première des venins est d'assurer une prédigestion de la proie. Ils contiennent de nombreuses enzymes protéolytiques parmi lesquelles on peut citer les phospholipases A_2 qui agissent sur les membranes, les hyaluronidases qui hydrolysent les mucopolysaccharides des tissus conjonctifs ; ce qui favorise la diffusion des autres composants du venin. Les protéases s'attaquent aux structures musculaire, osseuse ou endothéliale, mais aussi aux protéines fonctionnelles comme certains facteurs de coagulation et du complément ainsi qu'à divers médiateurs chimiques. Toutes ces enzymes détruisent les tissus au contact desquels elles se trouvent et provoquent une nécrose (fig. 4). Annoncée dès les premières heures par un hématome qui encercle la trace des crochets, puis par une tache noire ou cyanique, la nécrose humide et suintante s'étend rapidement en surface et en profondeur (Mion G. et al., 2000).

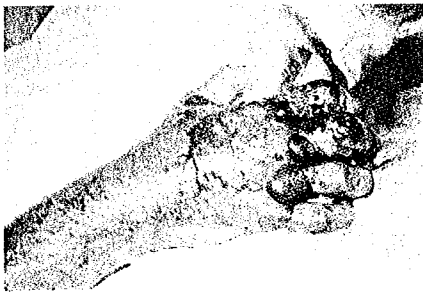


Figure 3 : hémorragie suite à une morsure par *Bitis arietans*, la photo a été prise 36 heures après la morsure (Visser, 1982).



Figure 4 : nécrose suite à une morsure par *Bitis arietans*, la photo a été prise 14 jours après la morsure (Visser, 1982).

Le dernier facteur qui intervient dans les symptômes locaux du syndrome hémorragique est la surinfection. Les agents saprophytes de la cavité buccale du serpent (*Clostridium*, *Pseudomonas*...), inoculés dans des tissus ischémiques, sont sources de surinfection bactérienne. Celle-ci peut évoluer rapidement vers la gangrène gazeuse qui justifie parfois une amputation de sauvetage (Mion et al., 2000).

1.2 Les symptômes systémiques

Les processus mis en jeu au cours des syndromes hémorragiques sont complexes en raison des interactions fréquentes et contradictoires. Plusieurs phénomènes sont à distinguer.

1.2.1 La coagulation intravasculaire disséminée (CIVD)

Les coagulations intravasculaires disséminées et syndromes de défibrination ne s'observent que chez certains Viperidés : *Bitis arietans* (vipère heurtante) en savane africaine, *Bothrops lanceolatus* (fer de lance) en Martinique ou *Bothrops Brazili* (crotale du Brésil) en Amazonie.

Lors de ces envenimations, des enzymes thrombine-like produisent une quantité anormale et continue de monomères solubles de fibrine dans le torrent circulatoire. Des microthrombi obstruent alors la lumière des artérioles, des capillaires et des veinules avant d'être lysés par la plasmine. L'effondrement caractéristique du fibrinogène en est la première manifestation. Des plaquettes sont piégées dans les microthrombi, ce qui explique la thrombopénie. Les hématies lysées dans des capillaires rétrécis par la fibrine (formation de schizocytes et anémie hémolytique) libèrent des agonistes plaquettaires et des phospholipides procoagulants ; les PDF issus de la fibrinolyse perpétuent également les troubles de l'hémostase.

Au cours des morsures de serpents, la CIVD typique est rare, comme en témoignent des taux souvent normaux d'antithrombine III, de facteur XIII ou de D-dimères. La fibrine générée sous l'action des glycoprotéines thrombine-like est instable et rapidement lysée. La morbidité et la mortalité sont donc principalement liées aux syndromes hémorragiques secondaires à la défibrination, associés ou non aux troubles induits par les hémorragines et les protéines à tropisme plaquettaire.

Les trois espèces citées ci-dessus font figure d'exception. Elles sont responsables de thromboses vasculaires, notamment myocardiques et encéphaliques, se traduisant par un infarctus brutal, parfois létal (Mion et al., 2002).

1.2.2 Les syndromes hémorragiques

Si les syndromes hémorragiques décrits ont pu être, grossièrement, rassemblés sous le terme de coagulopathie de consommation, ils devraient être redéfinis avec une plus grande rigueur compte tenu de la diversité des tableaux cliniques rencontrés (Chippaux J-P., 1999). Citons deux exemples :

- Au cours des envenimations par *Bitis*, un syndrome hémorragique massif suit rapidement, habituellement en moins de 5 heures, le syndrome thrombotique. Cela pourrait être en rapport avec la consommation rapide du fibrinogène, associée à une fibrinolyse primitive.
- Avec le venin d'*Echis*, la période hémorragique due à l'afibrinogénémie apparaît longtemps, parfois 24 à 48 heures, après la morsure. En général, au moins au début, aucun autre facteur de coagulation que le fibrinogène n'est franchement effondré. Pas même les plaquettes ce qui élimine formellement le diagnostic de coagulation de consommation aiguë. Ce syndrome hémorragique se traduit dans un premier temps par des saignements persistants au siège de la morsure, difficiles à distinguer avec l'action des hémorragines. Des épistaxis, une hématurie, un purpura massif, parfois une hémoptysie ou une hémorragie digestive surviennent secondairement. Après une morsure par *Echis*, un choc hypovolémique ou une hémorragie méningée peuvent survenir, ce sont les causes de décès les plus fréquentes (Mion et al., 2000).

2. L'évolution

Selon l'espèce responsable de la morsure, l'évolution sera différente. L'envenimation par *Ceraste* conduit à une hypotension marquée et une nécrose humide extensive. Celle par *Bitis* comporte un œdème extensif géant se développant rapidement et se surinfectant systématiquement. On observe des lésions nécrotiques étendues et des phlyctènes à distance du point de morsure puis des hémorragies diffuses. Enfin, les vipères du genre *Echis* entraînent un syndrome hémorragique majeur mais la nécrose est rare (Chippaux, 1999). Les morsures de *Bothrops lanceolatus*, provoquent un syndrome thrombotique souvent mortel en l'absence d'immunothérapie.

3. Les séquelles

Les séquelles représentent 1 à 3 % des envenimations vipérines. Elles sont liées à la nécrose qui peut à terme, nécessiter une amputation, ou au syndrome thrombotique. Les lésions rénales sont les plus nombreuses. Elles surviennent au cours des semaines qui suivent la morsure, alors même que l'évolution paraît favorable. (Chippaux J-P., 1999).

4. Cas d'une envenimation par les vipères françaises

Si les morsures de serpent en France ne représentent pas un problème de santé publique majeur, comme on peut l'observer dans les pays tropicaux et intertropicaux, on évalue cependant à 1000 ou 2000 leur nombre dont seulement une centaine nécessite une prise en charge médicale.

La production du venin demande une énergie considérable au serpent. Il est donc injecté avec parcimonie, juste aux quantités nécessaires pour immobiliser les proies. Cela explique pourquoi dans environ 20 à 30% des cas, la morsure n'est pas suivie d'envenimation ; on parle alors de morsure sèche ou blanche.

4.1 Les signes cliniques

En France, l'unité des venins de l'Institut Pasteur a établi une gradation clinique qui permet en quelques heures d'apprécier la gravité de l'envenimation (tableau 2). Elle doit être répétée dans le temps et permet de déterminer l'attitude thérapeutique à adopter. Grâce à l'élaboration d'un dosage (de type ELISA) des antigènes de venin présents dans le sang, une corrélation a été établie entre la gradation clinique et la concentration sanguine de venin.

Grade	Appellation	Signes et symptômes
0	Morsure blanche, pas d'envenimation	Marque de crochets Absence d'œdème Absence de réaction locale
1	Envenimation mineure	Œdème local autour de la morsure Phlyctènes au niveau de la zone mordue Absence de symptômes généraux
2	Envenimation modérée	Œdème (majeure partie du membre) et/ou symptômes généraux modérés : hypotension passagère, vomissements, diarrhée
3	Envenimation sévère	Œdème étendu (au-delà du membre atteint) et/ou symptômes généraux sévères : hypotension prolongée, choc, saignements, atteintes viscérales

Tableau 2 : gradation des envenimations vipérines selon les signes et symptômes observés (De Haro et al., 2003).

4.2 La conduite à tenir (De Haro et al., 2003)

Sur le lieu de la morsure :

- mettre la victime au repos, immobiliser le membre blessé afin d'éviter la diffusion du venin.
- avertir les secours.
- enlever tous les garrots potentiels (bague, bracelet...).
- désinfecter et glacer la plaie.
- ne pas poser de garrot, donner du café à la victime, inciser, cautériser.
- ne pas donner de corticoïdes ou de salycilés.
- les système d'aspiration type Aspivenin® sont inutiles pour retirer un venin injecté sous pression.

A l'hôpital :

L'examen clinique et l'interrogatoire permettent d'attribuer un grade à l'arrivée. Ils seront complétés par un bilan biologique. La vaccination antitétanique doit être vérifiée.

- le patient est en grade 0 : une surveillance de 4 à 6 heures peut être proposée mais elle est discutée.
- le patient est en grade 1 : une hospitalisation de 24 heures s'impose. Du venin a été injecté mais il est impossible de prévoir l'évolution à ce stade. Des traitements symptomatiques sont mis en place : antalgiques, vessie de glace, membre surélevé, antibiotiques si suspicion d'infection.
- le patient est en grade 2 ou 3 : perfusion intraveineuse d'antivenin. En France, l'antivenin employé est Viperfav®. Il contient des fragments F(ab')₂ d'anticorps de chevaux immunisés avec le venin de *V. berus*, *V. aspis* et *V ammodytes* des Balkans. Il est réservé à l'usage hospitalier. Le traitement comporte la perfusion sur une heure d'une dose de 4 ml, soit une ampoule, diluée dans 100 ml de sérum physiologique. Quatre heures après la fin de la perfusion, on réalise un nouveau bilan clinique et biologique. S'il s'aggrave une nouvelle perfusion de 4 ml est prescrite. Les quantités d'antivenin nécessaires ne dépendent pas de la victime mais de la quantité de venin injectée, elle est donc la même pour un adulte et pour un enfant. La tolérance de Viperfav® s'est avérée excellente grâce à son processus de fabrication et de purification, à l'étape de pasteurisation finale qui lui confèrent une grande pureté. L'hôpital doit cependant disposer d'adrénaline afin de traiter immédiatement toute manifestation allergique.

Comme nous l'avons vu, les envenimations ophidiennes sont devenues un véritable problème de santé publique en Afrique avec pas moins d'un million d'accidents chaque année entraînant 60 000 envenimations et plus de 20 000 décès. Cela est dû à une densité et une diversité élevée des espèces qui sont souvent en relation avec les hommes de par leur activité à prédominance rurale. Un autre élément contribue à la gravité des morsures : l'insuffisance des infrastructures sanitaires et leur dénuement.

Le syndrome vipérin s'il est pris en charge rapidement peut être facilement maîtrisé comme c'est le cas en France avec l'utilisation de l'antivenin Viperfav®. A l'inverse les conséquences peuvent être graves en l'absence de diagnostic et/ou de traitement avec des thromboses suivies d'hémorragies diffuses, nécroses et gangrènes. L'évolution est parfois fatale.

Afin de traiter ces victimes et de mettre au point de nouveaux antidotes, les composants des venins ophidiens ont été largement étudiés. Aujourd'hui, grâce aux techniques poussées (chromatographies, PCR..) il est possible d'isoler les molécules le composant, de découvrir leurs structures dans l'espace et même pour certains de connaître leur séquence ADN. Le but est alors de trouver les relations structure-activités de ces composés pour les utiliser comme outils pharmacologiques et donc mieux comprendre ou stopper certains mécanismes physiologiques, comme agent de diagnostic dans des tests d'hémostase et comme agents thérapeutiques.

Pour comprendre l'action des venins ophidiens sur l'hémostase primaire nous étudierons dans un premier temps la physiologie de l'hémostase puis, dans un second temps nous analyserons les cibles et les modes d'action des venins sur l'agrégation plaquettaire, la coagulation et la fibrinolyse.

II. Physiologie de l'hémostase

Normalement le sang circule librement contre l'endothélium intact des vaisseaux sanguins. En cas de rupture d'un de ces vaisseaux il s'établit toute une série de réactions pour arrêter le saignement : cette série de réactions est l'hémostase. Sans cette réaction défensive, rappelant l'endiguement d'un cours d'eau, nous perdriions rapidement tout notre sang même après une minuscule coupure (MARIEB E., 1999).

L'hémostase est une réponse rapide, localisée, précise. Elle fait intervenir de nombreux facteurs présents dans le plasma ainsi que des substances libérées par les plaquettes et les tissus endommagés. Elle comprend plusieurs étapes intriquées et interdépendantes (fig. 5) qu'il convient d'isoler par souci descriptif en :

- une vasoconstriction réflexe du vaisseau endommagé
- l'hémostase primaire, première étape d'urgence du contrôle hémorragique, conduisant au thrombus plaquettaire en une durée de 3 à 5 minutes
- l'hémostase secondaire, ou coagulation plasmatique, dont le rôle est de consolider le thrombus plaquettaire par la constitution d'un réseau de fibrine en une durée de 5 à 10 minutes
- la fibrinolyse assurant secondairement la dégradation enzymatique du caillot fibrinoplaquettaire en une durée de 24 à 48 heures.

L'ensemble de ces processus est étroitement régulé par la mise en œuvre d'un système très complexe d'activateurs et d'inhibiteurs permettant à l'hémostase de se développer au foyer même de la brèche vasculaire sans extension à distance.

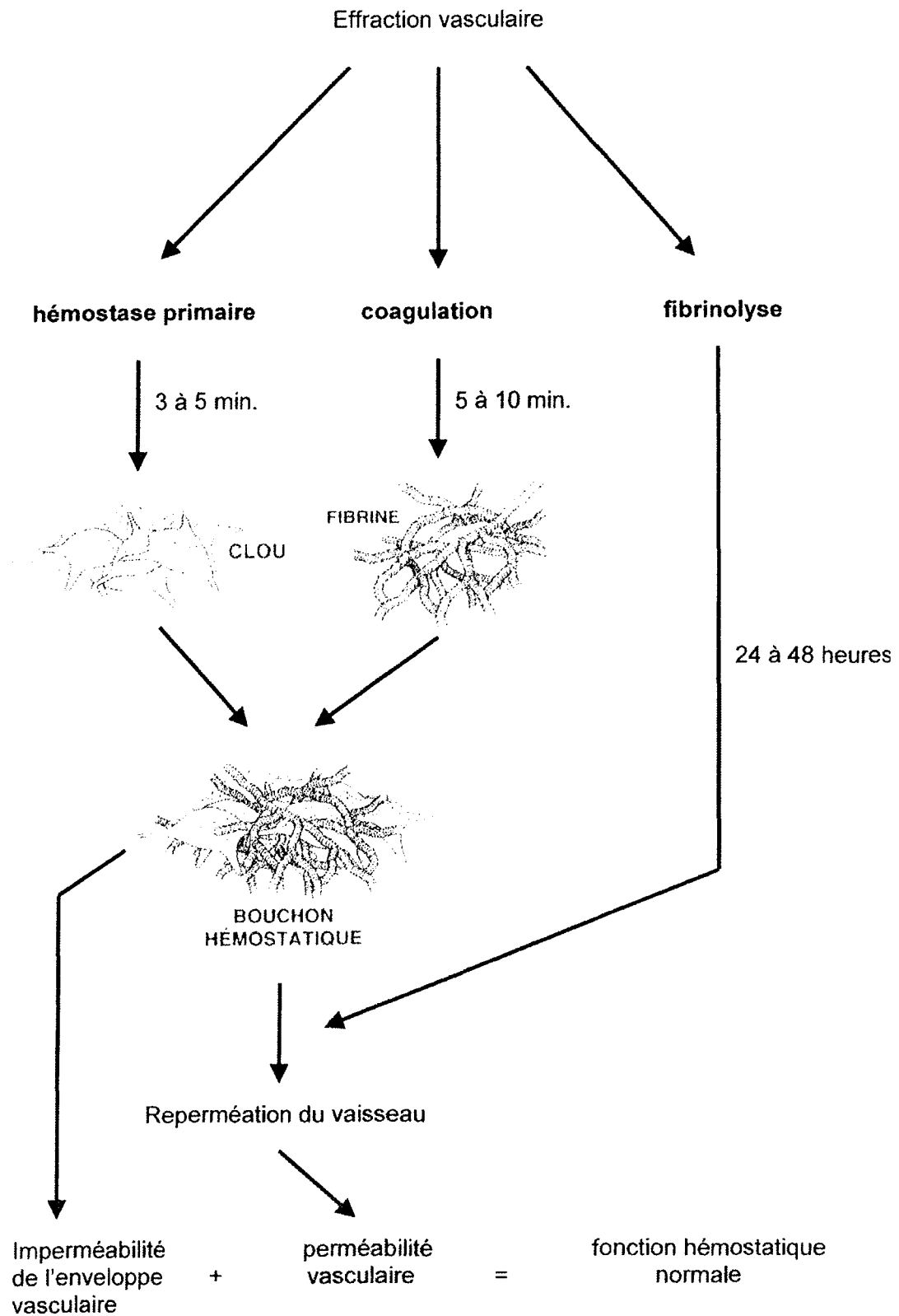


Figure 5 : Les différentes étapes de l'hémostase.

Une fonction hémostatique normale est caractérisée par une imperméabilité de l'enveloppe vasculaire et une perméabilité vasculaire. Elle nécessite un équilibre parfait entre les plaquettes (en nombre correct et fonctionnelles) et un endothélium en bon état.

A. Le spasme vasculaire

La première réaction que provoque la lésion d'un vaisseau est sa constriction. Plusieurs facteurs favorisent ce spasme vasculaire : l'atteinte du muscle lisse du vaisseau, les substances chimiques libérées par les cellules endothéliales et les plaquettes (sérotonine, prostaglandine...), les réflexes amorcés par l'activation de nocicepteurs de la région atteinte. Il en résulte une réduction du calibre vasculaire qui ralentit le débit sanguin, permettant par là une réduction des pertes et une certaine stase circulatoire favorisant la mise en œuvre des différentes étapes de l'hémostase.

Le mécanisme du spasme vasculaire augmente en efficacité proportionnellement à la gravité de la lésion. Cette réaction comporte un avantage évident : l'intense contraction d'un vaisseau peut endiguer une hémorragie le temps nécessaire à la formation du clou plaquettaire et du caillot (JOBIN F., 1995).

B. L'hémostase primaire

1. Description des plaquettes

Les plaquettes, ou thrombocytes, ne sont pas des cellules à proprement parler. Ce sont des fragments cytoplasmiques cylindriques, de 2 à 3 micromètres de diamètre, qui se sont détachés, par bourgeonnement, de très grandes cellules de la moelle osseuse appelées mégacaryocytes. Du fait de leur mode de formation elles sont dépourvues de noyau. Elles contiennent beaucoup d'actine et de myosine, des granules de deux sortes (fig. 6). Les granules denses sont riches en sérotonine, ions calcium, histamine, adénosine di et triphosphate. Les granules alpha possèdent

quant à eux le facteur de croissance cellulaire dérivé des plaquettes, le facteur IV plaquettaire, le facteur Willebrand (FW ou VWF), du fibrinogène, des protéines adhésives (GAUSSEN P. et al., 1994).

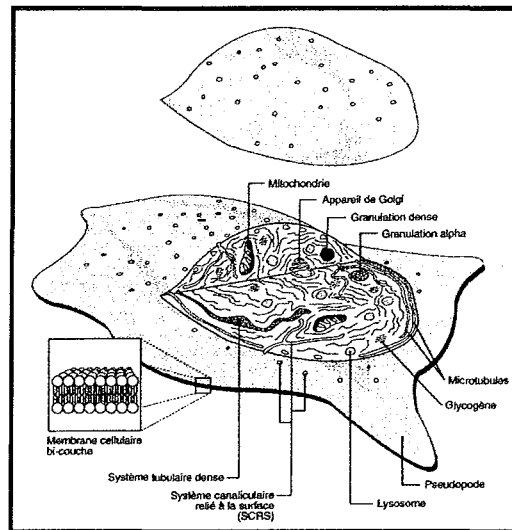


Figure 6 : Anatomie fonctionnelle de la plaquette (JOBIN F., 1995).

Les propriétés des plaquettes sont médiées par de nombreux récepteurs de surface (tableau 3). La glycoprotéine Ib (GPIb), impliquée dans l'adhésion plaquettaire, est le principal récepteur du facteur Willebrand. Il s'agit d'une glycoprotéine riche en leucine qui ne nécessite pas d'activation. La glycoprotéine IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) doit, elle, être activée par la thrombine, l'adénosine diphosphate (ADP) ou le collagène. Elle représente le point clé de l'agrégation plaquettaire : récepteur du facteur Willebrand elle l'est aussi pour le fibrinogène, la fibronectine sous endothéliale et la vitronectine. Ces deux intégrines ont une structure hétérodimérique c'est à dire composées de deux monomères différents α et β (ex : $\alpha 1\beta 2$, $\alpha 5\beta 1$...) et le site de reconnaissance de leur ligand comporte un motif tripeptidique RGD (Arg-Gly-Asp) avec une dépendance vis à vis de cations divalents.

Le rôle des plaquettes dans l'hémostase primaire est capital. Il consiste à former un bouchon qui obstrue temporairement l'ouverture du vaisseau sanguin. Comme les plaquettes sont anucléées elles vieillissent rapidement et dégénèrent en 8 à 10 jours environ si elles ne servent pas.

Le taux de plaquettes sanguines varie de 150 à 400 $10^9/l$, le tiers du pool plaquettaire périphérique étant séquestré dans la rate.

RECEPTEUR	FONCTION	LIGAND
GPIb-V-IX	Adhésion	Facteur Willebrand (et thrombine)
GP Ialla ($\alpha 2\beta 1$)	Adhésion	Collagène
GP IV	Adhésion	Thrombospondine
GP IIbIIIa ($\alpha IIb\beta 3$)	Agrégation	Fibrinogène (et facteur Willebrand)
PAR-1	Activation	Thrombine
Récepteur à la TX A_2	Activation	TX A_2
Récepteur à l'ADP	Activation	ADP
Récepteur à la prostacycline	Inhibition de l'agrégation	Prostacycline (PGI ₂)

PAR-1 : protease activated receptor de type 1, Tx A_2 : thromboxane A_2

Tableau 3 : Principaux récepteurs et glycoprotéines de la membrane plaquettaire (GAUSSEN P. et al., 1994).

2. L'adhésion plaquettaire à l'endothélium

En règle générale les plaquettes n'adhèrent ni les unes aux autres ni à l'endothélium lisse des vaisseaux sanguins. Mais dès que cet endothélium est endommagé et que les fibres collagènes sous jacentes sont mises à nue les plaquettes subissent des changements étonnants (MARIEB E., 1999).

L'adhésion plaquettaire est un phénomène passif induit par la rencontre des plaquettes circulantes avec les structures sous-endothéliales hautement thrombogènes, comme le collagène, mises à nu par la rupture de la couche endothéliale. L'adhésion plaquettaire est permise par la fixation du facteur Willebrand ancré dans le sous endothélium au collagène qui s'arrime à la membrane plaquettaire par son récepteur (le facteur Willebrand circulant ne lie pas les plaquettes).

Le facteur Willebrand est le principal cofacteur de l'adhésion plaquettaire. Il s'agit d'une glycoprotéine multimérique de poids moléculaire à la fois élevé et variable (de 1 à 20 10^3 kDa). Il est sécrété à trois endroits différents :

- Dans le plasma, où sa concentration est de 10 mg/l, par la cellule endothéliale
- Sur l'intima, par la cellule endothéliale immédiatement sous-jacente à celle-ci
- A l'interface entre la plaquette et les fibres conjonctives, par la plaquette après l'adhésion primaire.

D'autres récepteurs plaquettaires interviennent aussi pour fixer les plaquettes au collagène et aux autres substances conjonctives de la paroi. Ce sont les glycoprotéines Ia et IV (tableau 3).

Ce premier contact des plaquettes non activées au sous endothélium est appelé l'adhésion primaire, elle est réversible (fig. 7(2)). Cette fixation des plaquettes est un préalable indispensable à leur activation. En effet, l'interaction des récepteurs glycoprotéiques plaquettaires avec leurs ligands respectifs conduit à la transduction d'un signal intracytoplasmique déclenchant les différentes réactions métaboliques d'activation cellulaire (De Revel et al., 2004).

3. L'activation et la sécrétion plaquettaire

L'activation des plaquettes est caractérisée par deux phénomènes principaux : leur changement de forme et leur activation métabolique. Il s'agit de processus actifs nécessitant de l'énergie (sous forme d'ATP) et la disponibilité intracytoplasmique des ions calcium (Ca^{++}) indispensables à l'activation du système contractile actine-myosine. Détaillons ces deux mécanismes :

➤ Le changement de forme.

Il est dû à un influx de calcium permettant la phosphorylation de la myosine et sa liaison à l'actine, phénomène responsable du changement de forme plaquettaire. Discoïdes à l'état de repos les plaquettes activées deviennent sphériques, émettent des pseudopodes.

Seules les plaquettes en contact avec le substrat s'étalent et couvrent une surface importante de fibrilles conjonctives. Le facteur Willebrand et la fibronectine multiplient alors les liens entre la plaquette et la paroi. C'est l'adhésion secondaire qui est irréversible (fig. 7(3)).

Les plaquettes recrutées par la suite émettent, quant à elles, des pseudopodes (fig. 7(4)). C'est l'enchevêtrement de leurs pseudopodes qui permet une meilleure agrégation et la formation du clou plaquettaire (fig. 8).

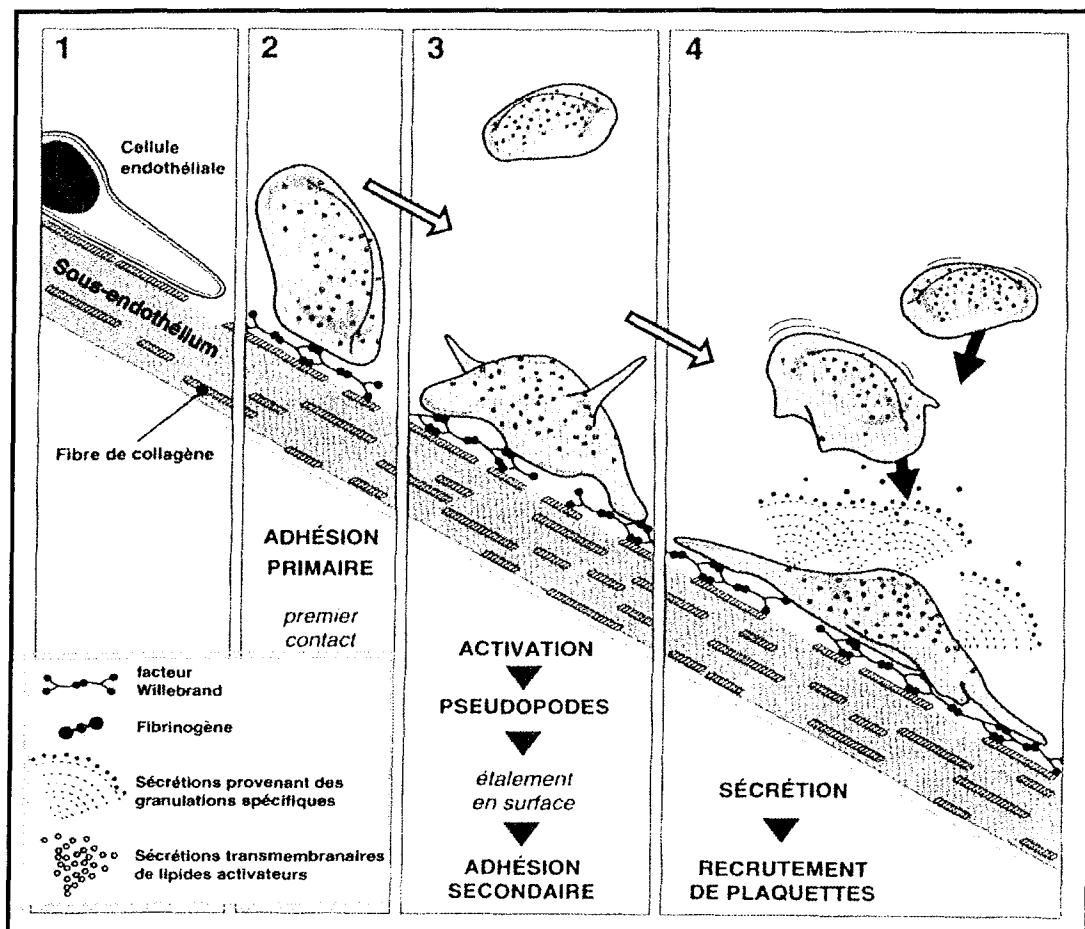


Figure 7 : Etapes de l'adhésion et du début de l'activation plaquettaire (JOBIN F., 1995).

Suite au changement de forme survient la phase de sécrétion (release) qui est un processus d'exocytose. En effet, la réorganisation des microtubules et des microfilaments intra plaquettaires induit la migration des granules qui se rassemblent dans la partie centrale du cytoplasme. Les granules fusionnent avec le système canaliculaire ouvert et libèrent leur contenu qui se déverse ainsi dans le plasma environnant.

Ce phénomène permet la libération de nombreuses substances proagrégantes (ADP, fibrinogène, sérotonine), procoagulantes (facteur V, VWF, fibrinogène) ou vasomotrices (sérotonine, NO, TXA₂) contribuant à l'amplification du processus d'hémostase primaire et créant les conditions favorables à la coagulation plasmatique.

➤ L'activation métabolique

La plaquette activée est capable de générer de nombreuses substances pharmacologiquement actives à partir de ses phospholipides membranaires. C'est ce que l'on appelle la voie d'activation des prostaglandines. Ainsi l'acide arachidonique est métabolisé par la phospholipase A₂ pour aboutir à la TXA₂, ou à d'autres prostaglandines modulant les activités plaquettaires et vasculaires. La TXA₂ est un puissant agent vasoconstricteur et proagrégant qui va contribuer au recrutement de nouvelles plaquettes

En plus de cette voie d'activation des prostaglandines il existe la voie d'activation des phospholipases C. Dans cette voie l'activation des récepteurs membranaires, cette excitation, est médiée à l'intérieur de la plaquette par des phénomènes de transduction membranaire activant de nombreuses enzymes telles les phospholipases C et des kinases. Il en résulte la production de nouveaux produits appelés seconds messagers : l'inositol triphosphate (IP3), le diacylglycérol (DAG), la TXA₂, le facteur d'activation plaquettaire (PAF) ainsi qu'une forte augmentation de la concentration calcique intracellulaire (les ions calcium proviennent du système tubulaire dense ou du milieu extracellulaire).

La sécrétion transmembranaire des produits ainsi obtenus permet une vasoconstriction renforçant le spasme initial ainsi que le recrutement d'autres plaquettes circulantes.

Sous l'influence des endoperoxydes et de la TXA₂ les plaquettes nouvellement arrivées sécrètent à leur tour le contenu de leurs granules (fig. 7(4)). La libération de substances spécifiques telles l'ADP, la sérotonine, le FW ou le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) va amplifier l'adhésion, l'activation et favoriser l'agrégation en attirant un surcroît de plaquette. Le système est ainsi autoentretenu.

Le phénomène de “flip-flop” membranaire est un autre mécanisme se déroulant au cours de la phase d'activation plaquettaire. Il permet aux structures internes de la membrane de se repositionner vers l'extérieur, en contact avec le plasma. Cette modification permet aux phospholipides chargés négativement, et notamment la phosphatidylsérine, de s'extérioriser et de devenir disponibles pour la fixation des facteurs de la coagulation vitamine K dépendants, amplifiant par là considérablement les processus enzymatiques de la cascade de la coagulation (De Revel et al., 2004).

4. L'agrégation plaquettaire

L'ADP et les traces de thrombine initialement produites par les premières étapes de la coagulation sont les principaux agonistes de l'agrégation plaquettaire. Elle est ensuite amplifiée par d'autres substances telles que la TXA₂, l'adrénaline ou la sérotonine.

Dans un premier temps les plaquettes s'accrochent les unes aux autres. Il a été établi qu'à faible dose d'ADP cette agrégation est réversible. La phase irréversible pourrait être liée à la libération d'ADP endogène, de thrombospondine ou de fibronectine qui amplifient le mécanisme d'agrégation et consolident les liens entre plaquettes.

Dans un second temps les plaquettes vont agréger entre elles par l'intermédiaire de ponts entre une région spécifique du fibrinogène (fig. 4) contenant une séquence d'acides aminés RGD et la glycoprotéine GPIIb/IIIa en présence de calcium. Cette glycoprotéine est présente sur la membrane plaquettaire mais également dans celle des granules α . Au moment de la sécrétion, la membrane des granules α fusionnant avec celle des plaquettes cela permet d'augmenter de façon significative le nombre de récepteurs exposés en surface.

Grâce à l'agrégation d'un nombre croissant de plaquettes, et en moins d'une minute, un clou plaquettaire se forme à partir du pourtour de l'orifice. La vasoconstriction cède après une minute environ et le clou grossit davantage, jusqu'à

occuper finalement toute la surface de la brèche. Le clou est initialement instable et éphémère car les plaquettes se désagrègent après quelques heures seulement par autolyse ou disparaissent par phagocytose. De là toute l'importance de la coagulation que d'ailleurs l'hémostase primaire a déjà démarrée grâce au réarrangement des phospholipides membranaires.

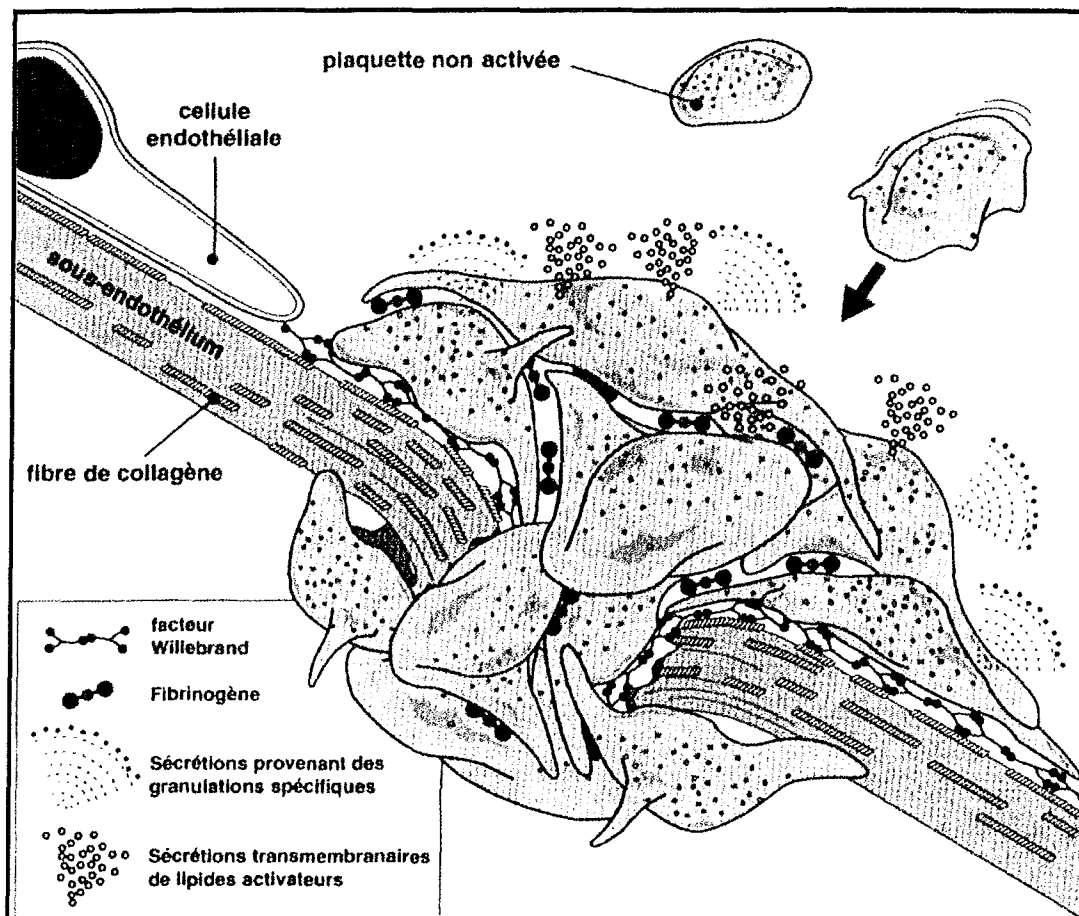


Figure 8 : L'agrégation plaquettaire (JOBIN F., 1995).

5. Régulation de l'hémostase primaire

Pour être bénéfique l'hémostase doit demeurer limitée dans le temps et dans l'espace. C'est là tout le rôle de la balance agonistes/antagonistes.

C. La coagulation

La coagulation, ou formation du caillot, est la transformation de sang liquide en une masse gélatineuse, de protéines solubles en protéines insolubles, de fibrinogène en fibrine. Elle est centrée sur l'intervention d'une dizaine de protéines plasmatiques et à l'exception des plaquettes qui ont un rôle important dans la conversion finale du fibrinogène en fibrine les autres cellules sanguines n'interviennent pas. A tel point que la formation du caillot peut avoir lieu en leur absence (SAMPOL J. et al., 1995).

La coagulation s'effectue en trois étapes capitales :

- La formation, suite à une cascade de réactions enzymatiques, d'une association de facteurs appelée activateur de la prothrombine ou complexe prothrombinase. Deux voies sont possibles pour y parvenir.
- La conversion d'une protéine plasmatique inactive : la prothrombine en sa forme active : la thrombine, enzyme pivot de la coagulation.
- La catalyse par la thrombine de la transformation des molécules de fibrinogène en filaments de fibrine qui emprisonnent les cellules sanguines. Le caillot ainsi formé solidifie et assure la durabilité du bouchon hémostatique.

Elle fait appel à différents facteurs :

- Les protéines de coagulation

Il s'agit de protéines plasmatiques, de concentrations variables, synthétisées par le foie, les cellules endothéliales, les macrophages ou les mégacaryocytes. Elles sont numérotées en chiffres romains de I à XIII suivant l'ordre dans lequel elles ont été découvertes et non pas celui dans lequel elles interviennent (tableau 4). Dans le plasma ces protéines se trouvent sous la forme de pro enzymes ou zymogène, donc sous forme inactive, jusqu'à ce qu'elles soient utilisées dans le processus de coagulation (on note alors un a minuscule après le chiffre romain).

N° du facteur	Nom du facteur	Nature/origine	Fonction ou voie
I	Fibrinogène	Protéine plasmatique; synthétisée par le foie	Voie commune; converti en fibrine insoluble dont les filaments forment le caillot
II	Prothrombine	Protéine plasmatique; synthétisée par le foie; la vitamine K est nécessaire à sa formation	Voie commune; convertie en thrombine, qui transforme le fibrinogène en fibrine par des mécanismes enzymatiques
III	Facteur tissulaire (FT), ou thromboplastine tissulaire	Complexe lipoprotéique libéré par les tissus endommagés	Active la voie extrinsèque
IV	Ions calcium (Ca^{2+})	Ion inorganique présent dans le plasma; ingéré dans les aliments ou libéré par les os	Nécessaire à presque toutes les étapes de la coagulation
V	Proaccélélerine, ou facteur A labile	Protéine plasmatique; synthétisée par le foie; libérée aussi par les plaquettes	Voies extrinsèque et intrinsèque
VI	Ce numéro n'est plus usité; cette substance serait identique au facteur V		
VII	Proconvertine	Protéine plasmatique; synthétisée par le foie au cours d'un processus nécessitant de la vitamine K	Voies extrinsèque et intrinsèque
VIII	Facteur antihémophilique A, ou thromboplastinogène	Globuline synthétisée par le foie; un déficit cause l'hémophilie A	Voie intrinsèque
IX	Facteur antihémophilique B, ou facteur Christmas	Protéine plasmatique; synthétisée par le foie; un déficit cause l'hémophilie B; la vitamine K est nécessaire à sa synthèse	Voie intrinsèque
X	Facteur Stuart, ou facteur Stuart-Prower, ou thrombokinasase	Protéine plasmatique; synthétisée par le foie; la vitamine K est nécessaire à sa synthèse	Voies extrinsèque et intrinsèque
XI	Facteur prothromboplastique plasmatique C	Protéine plasmatique; synthétisée par le foie; un déficit cause l'hémophilie C (ou maladie de Rosenthal)	Voie intrinsèque
XII	Facteur Hageman	Protéine plasmatique; enzyme protéolytique; synthétisée dans le foie	Voie intrinsèque; active la plasmine; activé par le contact avec le verre et déclenche peut-être la coagulation <i>in vitro</i>
XIII	Facteur de stabilisation de la fibrine (FSF)	Protéine plasmatique; synthétisée par le foie et présente dans les plaquettes	Stabilise les monomères de fibrine dans les filaments

Tableau 4 : Facteurs de coagulation (MARIEB E., 1999).

Ces protéines plasmatiques ont été initialement reconnues au cours de pathologies hémorragiques héréditaires liées à un déficit de synthèse. Elles ont été ensuite isolées, purifiées et leurs gènes séquencés, ce qui a permis l'étude de leur régulation et pour certaines leur synthèse par voie recombinante.

On distingue trois groupes différents : les protéines à activité enzymatique, les protéines dénuées d'activité enzymatique mais servant de cofacteurs et les protéines ayant un rôle de substrat.

- **Précurseurs enzymatiques**

Les facteurs vitamine K dépendants II, VII, IX, X d'une part, et les facteurs contacts XI, XII, la prékallicréine d'autre part, circulent dans le plasma sous la forme de précurseurs enzymatiques inactifs. Ils possèdent un site actif protéolytique au niveau de la région carboxyterminale, qui est masqué tant que la molécule n'est pas activée. Ce domaine catalytique est caractérisé par une séquence précise d'acides aminés comportant notamment un résidu sérine dans une conformation spatiale particulière, d'où leur nom de sérine protéase. L'activation consiste en une hydrolyse partielle de la molécule démasquant le site sérine protéase. Le facteur activé a ainsi la capacité d'activer par hydrolyse un autre facteur et il se forme une véritable cascade enzymatique.

Bien que la vitamine K n'intervienne pas directement dans le processus de coagulation cette substance liposoluble est nécessaire à l'acquisition des propriétés fonctionnelles des facteurs II, VII, IX et X dénommés ainsi facteurs vitamine K dépendants. Le rôle de la vitamine K consiste en une carboxylation des résidus d'acide glutamique de la partie N terminale de la chaîne polypeptidique. La carboxylation est nécessaire à la fixation du calcium, véritable pont entre la chaîne polypeptidique et la surface phospholipidique plaquettaire ou tissulaire. En l'absence de vitamine K, le foie libère des facteurs décarboxylés très faiblement actifs.

La fixation des sérines protéases procoagulantes à la surface des phospholipides confère trois types d'avantages au processus de coagulation : un accroissement des interactions entre les différents facteurs, une restriction locale de l'activation de la

coagulation, une protection des enzymes procoagulantes vis-à-vis des inhibiteurs circulants de la coagulation (De Revel et al., 2004).

Les facteurs contacts (facteurs XI, XII, prékallicréine), dont la synthèse ne dépend pas de la vitamine K, sont essentiellement définis par leur rôle dans le développement de la coagulation du plasma *in vitro*. En effet, leur activation est déclenchée par le contact avec une surface non mouillable (verre du tube à essai par exemple) ou chargée négativement (sous endothélium). Il semble que leur rôle dans l'hémostase soit mineur et bien que leur déficit congénital perturbe grandement les tests de coagulation, les sujets atteints ne présentent pas de manifestations hémorragiques. Les facteurs contacts participent également aux processus de la fibrinolyse et de l'inflammation, tous deux étroitement reliés au système de la coagulation.

- **Fibrinogène**

Le fibrinogène représente le troisième type de facteur de la coagulation, jouant un rôle de substrat sans activité enzymatique ou catalytique propre. Il s'agit du substrat final de la coagulation, hydrolysé par la thrombine qui le transforme en chaînes insolubles de fibrine. Le fibrinogène est synthétisé par l'hépatocyte et son taux plasmatique est de l'ordre de 2 à 4 g/l. Ce taux est accru lors des états infectieux ou inflammatoires, diminué par une consommation excessive dans certains états pathologiques (coagulation intra vasculaire disséminée [CIVD] ou fibrinogénolyse primitive).

- **Cofacteurs : facteurs V et VIII**

Les facteurs V et VIII sont dépourvus d'activité enzymatique mais accélèrent les réactions entre une enzyme et son substrat, d'où leur nom de cofacteurs. Ils sont activés par la thrombine (Va et VIIIa) qui réalise une hydrolyse partielle des molécules, démasquant ainsi les sites de liaison du cofacteur à l'enzyme et à son substrat. Les facteurs Va et VIIIa ont donc un rôle de potentialisateur des interactions enzymatiques et interviennent respectivement au sein de deux complexes enzymatiques de la cascade de la coagulation, le complexe prothrombinase et le complexe tenase. Ces facteurs ne sont pas vitamine K dépendants et sont

synthétisés dans l'hépatocyte. Le facteur VIII, ou facteur antihémophilique A, circule dans le plasma associé au FW qui joue ainsi le rôle de protéine transporteuse. Le gène codant pour le facteur VIII est situé sur le chromosome X.

➤ Les phospholipides activateurs de la coagulation

Ils constituent une surface catalytique permettant le déclenchement de la coagulation par l'activation des facteurs procoagulants. Il faut en effet comprendre que la coagulation est un processus de surface dont le déclenchement, la rapidité d'exécution et la restriction locale sont assurés par ces phospholipides membranaires exposés lors de conditions pathologiques ou réactionnelles. La fixation aux phospholipides membranaires de l'enzyme protéolytique, de son substrat et du cofacteur catalytique accélère grandement leurs interactions.

Les phospholipides impliqués dans le déclenchement et le déroulement de la coagulation comprennent la phosphatidylsérine plaquettaire, aussi dénommée facteur 3 plaquettaire (PF3), et le facteur tissulaire ou thromboplastine tissulaire. La phosphatidylsérine plaquettaire est exprimée à la surface de la membrane plaquettaire lors de son activation. Le facteur tissulaire, protéine transmembranaire, est, quant à lui, exprimé de façon inductible par la cellule endothéliale activée, et de façon constitutive par les cellules sous endothéliales, fibroblastes et cellules musculaires lisses. Le facteur tissulaire est ainsi exposé aux protéines procoagulantes lors d'une brèche vasculaire avec mise à nu des structures sous endothéliales. Il permet d'activer la voie extrinsèque. Le gène codant pour ce facteur est situé sur le chromosome 1.

➤ Le calcium

C'est un cofacteur nécessaire à presque toutes les étapes de la coagulation.

1. Deux voies vers l'activation de la prothrombine

La coagulation du sang est l'aboutissement d'une cascade de réactions protéolytiques qui ont lieu sur des surfaces membranaires.

In vitro, la coagulation peut être initiée de deux façons différentes (fig. 10). La première, connue sous le nom de voie exogène ou voie extrinsèque de la coagulation, est l'exposition du sang au contact du facteur tissulaire. La seconde, connue sous le nom de voie endogène ou voie intrinsèque de la coagulation, est l'exposition du sang au contact d'une surface chargée négativement.

In vivo, il semble très vraisemblable que le facteur tissulaire démasqué par la rupture de la continuité endothéliale soit l'élément primordial responsable de l'initiation de la coagulation, la voie endogène venant secondairement renforcer la croissance du caillot de fibrine. En réalité la distinction entre les deux voies *in vivo* n'a guère de signification dans la mesure où les intrications sont multiples.

Ces deux voies d'activation ont des points communs : elles mettent en jeu le calcium et une autre molécule clé appelée facteur plaquettaire 3 (PF3).

➤ La voie intrinsèque ou voie endogène (fig. 10)

Dans la voie intrinsèque, la plus lente, tous les facteurs nécessaires à la coagulation sont présents dans le sang (d'où le terme employé).

In vitro l'initiation de la coagulation peut également se faire par la fixation sur une surface électronégative (type tube à essai en verre) du facteur XII et du kininogène de haut poids moléculaire et par l'intermédiaire de ce dernier du facteur XI et de la prékallikréine.

In vivo cette voie comportant sept étapes est mise en route lorsque le facteur XII est activé. Cette activation se fait au contact du collagène dénudé lors d'une lésion vasculaire. Si l'on se rappelle que le collagène dénudé est à l'origine de l'agrégation plaquettaire on réalise que la formation du clou plaquettaire et la mise en œuvre de la cascade de la coagulation ont lieu simultanément.

Description des différentes étapes :

- Par un mécanisme non encore élucidé la protéolyse du facteur XII suit sa fixation sur la surface plaquettaire.
- Le facteur XIIa transforme ensuite, par protéolyse, le facteur XI en XIa et la prékallikréine en kallikréine. Ici encore il y a auto amplification du processus : la kallikréine active le facteur XII, ce qui augmente considérablement la production de facteur XIIa. Par ailleurs d'autres systèmes sont activés du fait de la production de kallikréine comme les systèmes du complément, des kinines, la fibrinolyse et l'inflammation.
- Le facteur XIa est une sérine protéase inhabituelle car elle contient deux sites catalytiques. Elle active le facteur IX en présence d'ions calcium, il en résulte la libération d'un peptide de 35 acides aminés.
- Le facteur IXa forme ensuite un complexe équimoléculaire avec le facteur VIIIa en présence de phospholipides chargés négativement et d'ions calcium. Ce complexe, appelé complexe ténase, active le facteur X par coupure de liaisons peptidiques. La surface phospholipidique utilisée *in vivo* est celle des plaquettes activées car elles seules ont exposée de la phosphatidylsérine à leur surface. L'arrangement du complexe est le suivant : l'enzyme (IXa) et le substrat (X) sont fixés sur les phospholipides anioniques par l'intermédiaire d'ions calcium. Le facteur VIIIa est fixé d'une part sur les phospholipides par une liaison hydrophobe et d'autre part à la fois au facteur IXa et au facteur X. C'est ainsi qu'il joue son rôle de cofacteur en condensant l'enzyme et le substrat à la surface d'une membrane et en les rapprochant l'un de l'autre dans une conformation favorable à une interaction rapide. Pour jouer ce rôle le facteur VIII doit être activé par une protéolyse mineure qui détache une région centrale de 170 kDa et produit le facteur actif : deux sous unités unies de façon non covalente par des ions calcium. Cette réaction est catalysée par le facteur Xa ou la thrombine, ce qui implique que l'activation du facteur X par le complexe ténase ne sera efficace que secondairement.

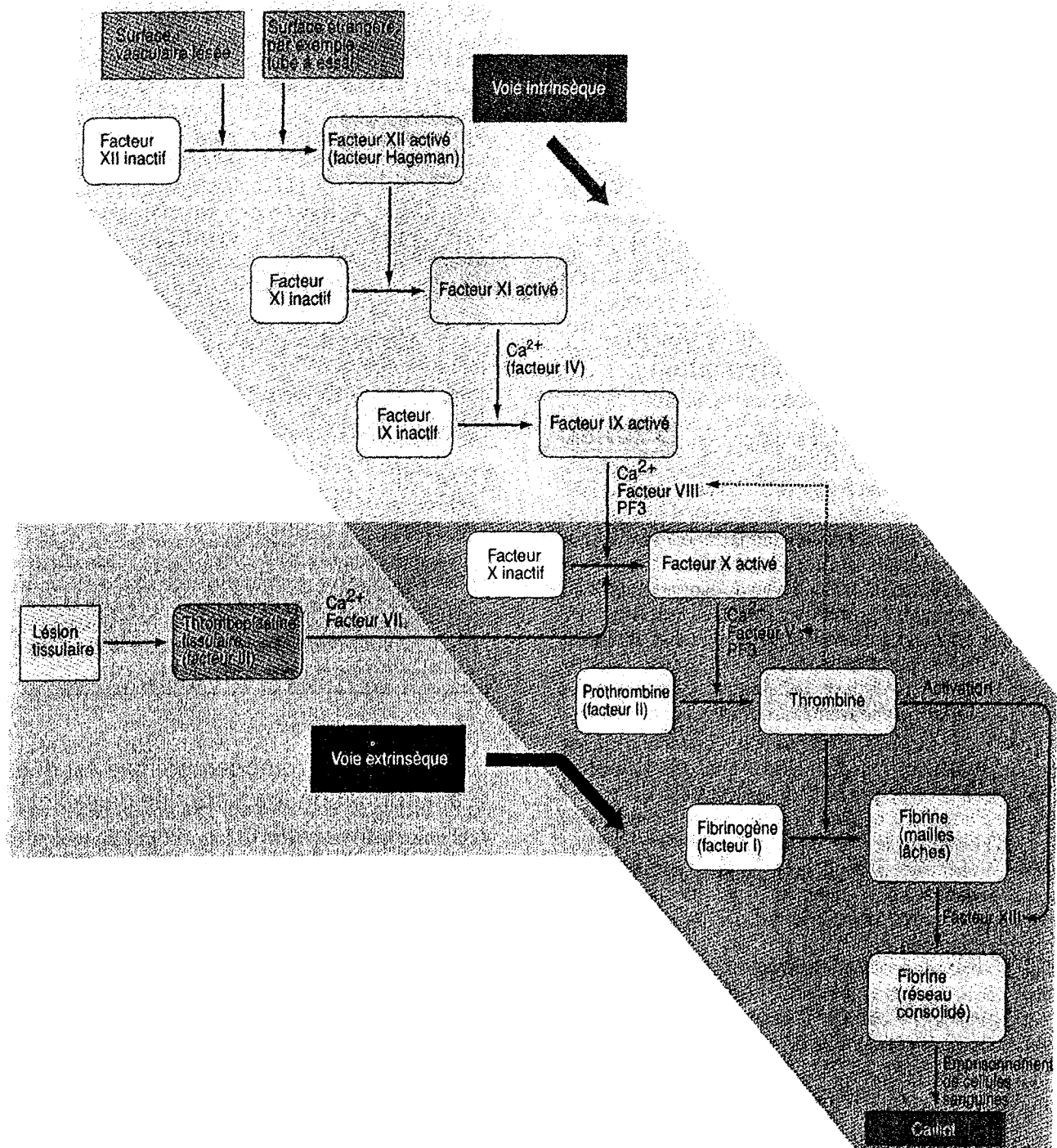


Figure 10 : Cascade de la coagulation (SHERWOOD L., 2000).

➤ **La voie extrinsèque ou voie exogène (fig. 10)**

La voie extrinsèque est plus rapide car elle ne comporte que quatre étapes. Elle est amorcée par des facteurs tissulaires donc n'appartenant pas au sang.

Description des différentes étapes :

- Lorsqu'un tissu est traumatisé il expose un complexe protéique : la thromboplastine tissulaire ou facteur tissulaire.
- Le facteur tissulaire inséré dans les phospholipides a une forte affinité pour le facteur VII. Lors d'une lésion vasculaire les deux protéines forment un complexe équimoléculaire en présence d'ions calcium. Cette association facilite la conversion du facteur VII en une sérine protéase (VIIa) par simple protéolyse d'une liaison peptidique du zymogène. Dans cette réaction le facteur tissulaire intervient comme cofacteur et l'enzyme plasmatique ou cellulaire responsable de la protéolyse n'est à ce jour pas identifiée.
Le complexe facteur VIIa/ facteur tissulaire est lui même capable d'activer le facteur VII, par une réaction d'auto activation, ce qui augmente de façon importante la production de facteur VIIa.
- Le complexe facteur VIIa/facteur tissulaire a pour substrat le facteur X. Il l'active directement par scission d'une seule liaison peptidique. Le facteur tissulaire joue là encore un rôle de cofacteur, il accélère la réaction.

2. Activation de la prothrombine

Les étapes intermédiaires de chaque voie se déroulent en cascade vers un facteur commun, le facteur X, qu'elles activent (fig. 11). L'activation directe par le complexe FT-FVII est très rapide. Elle constitue le starter de la cascade enzymatique, pour aboutir précocement aux premières molécules de thrombine, alors que la voie indirecte passant par l'activation du facteur IX est beaucoup plus lente à se mettre en place mais est quantitativement prépondérante.

Le facteur Xa forme lui aussi un complexe équimoléculaire avec le facteur Va en présence d'ion calcium et de phospholipides anioniques exposés à la surface des plaquettes activées (fig. 11). Ce complexe est appelé prothrombinase. Il active la prothrombine par scission de deux liaisons peptidiques. Il en résulte le détachement d'un peptide amino terminal de 35 kDa et la naissance de la thrombine, molécule de 36,5 kDa composée de deux chaînes polypeptidiques.

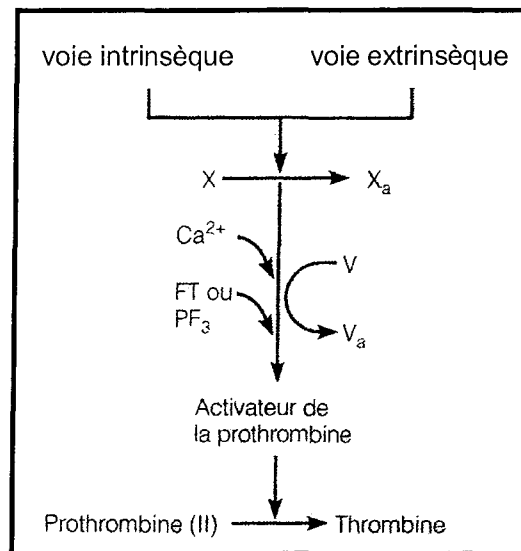


Figure 11 : Déroulement de la coagulation, complexe prothrombinase (MARIEB E., 1999)

3. Voie commune vers la thrombine (ou facteur FII)

➤ La formation de la thrombine

La thrombinoformation est :

- Rapide
- Massive : la concentration plasmatique de la thrombine est 50 à 400 fois plus grande que celle des facteurs XII, XI ou X.
- Migratrice : la thrombine fraîchement formée ne reste pas localisée sur la membrane car son fragment qui sert à l'arrimer aux phospholipides via des ponts calciques a été détaché par la prothrombinase.

➤ Les actions de la thrombine

La thrombine est l'enzyme pivot de l'hémostase car elle accomplit plusieurs actions sur plusieurs substrats, à différents niveaux. Elle termine la chaîne des réactions de la coagulation en produisant et stabilisant le caillot de fibrine.

Par rétro action auto catalytique elle active les facteurs VIII et V, ce qui augmente de façon importante l'efficacité des deux complexes enzymatiques dont font parti ces cofacteurs et accélère la thrombinoformation (fig. 10). On considère en effet que la présence du cofacteur activé au sein du complexe enzymatique accroît son rendement par un facteur 10^6 . Ce phénomène est nommé la double boucle de rétroactivation de la génération de thrombine, c'est sur elle que repose toute l'efficacité et la puissance du système.

Il existe une autre voie d'activation passant par le facteur XI qui est activé lentement par la thrombine nouvellement formée. Le facteur XIa active en retour le facteur IX pour renforcer la génération du complexe tenase. Le facteur XI peut également être activé par les facteurs contacts après exposition des composants du sous endothélium, mais l'importance de cette voie d'activation est mineure et les déficits en facteurs contacts n'entraînent pas de troubles hémorragiques (BROZE, 1991).

La thrombine est probablement l'agoniste plaquettaire le plus puissant. Les plaquettes possèdent plus de 1500 récepteurs de haute ou moyenne affinité pour celle-ci et leur stimulation active les phospholipases A_2 et C (sources de prostaglandines). Ainsi des traces de thrombine incapables de produire de la fibrine peuvent tout de même activer les plaquettes accélérant la coagulation donc la thrombinoformation d'une autre façon (JOBIN F., 1995).

La thrombine est un vasoconstricteur efficace pour une artère blessée et un vasodilatateur puissant pour une artère saine.

La thrombine agit sur l'endothélium soit par rétroaction positive avec la sécrétion de facteur Willebrand soit par rétroaction négative avec la sécrétion de prostacycline et l'activation du système de la protéine C.

4. Voie commune vers la fibrine

La thrombine catalyse deux réactions qui aboutiront à la formation de la fibrine stabilisée : la transformation du fibrinogène en monomère de fibrine et l'activation du facteur stabilisant de la fibrine (XIII)

➤ La transformation du fibrinogène en monomère de fibrine

Le fibrinogène est une protéine très abondante dans le plasma. Sa structure est allongée, fibreuse et trinodulaire. Cette protéine de quelques 330 kDa est constituée par trois paires de chaînes polypeptidiques qui s'enroulent en trois endroits pour former trois nodules. Un nodule D est situé près de chacune des extrémités de la molécule tandis qu'un nodule E se situe en son centre (fig. 12).

La thrombine détache quatre petits fibrinopeptides du nodule E et transforme ainsi la molécule de fibrinogène en monomère de fibrine. Le monomère de fibrine possède deux nouveaux sites qui sont capables de se combiner (par des liaisons hydrogène non covalentes) avec d'autres sites présents sur les nodules D des monomères voisins. La polymérisation des monomères solubles forme des fibrilles de fibrine qui s'allongent, s'épaississent et finalement deviennent insolubles dans l'eau. Les fibrilles s'entrecroisent et s'unissent en tout sens créant un filet aux mailles serrées (fig. 12).

Au niveau du bouchon hémostatique le réseau de fibrine se constitue autour d'agrégats plaquettaires auxquels les monomères sont intimement attachés. Au pourtour du bouchon hémostatique la fibrine s'attache fermement à la paroi de la brèche vasculaire par l'entremise du facteur XIII et de la fibronectine.

La polymérisation bout à bout des monomères de fibrine crée beaucoup de nouveaux récepteurs ayant une grande affinité pour la thrombine. La molécule de thrombine s'y adsorbe avec avidité, ce qui l'immobilise et met un terme à ses multiples actions sur le plasma, les plaquettes et l'endothélium. En dépit des apparences la fibrine et la thrombine qu'elle garde captive deviennent des partenaires. La thrombine occupe ainsi, en surface de la fibrine, une position

stratégique pour poursuivre la fibrinoformation, promouvoir des interactions entre les plaquettes, le facteur V, le facteur VIII et la fibrine et enfin pour activer le facteur XIII en présence d'ions calcium.

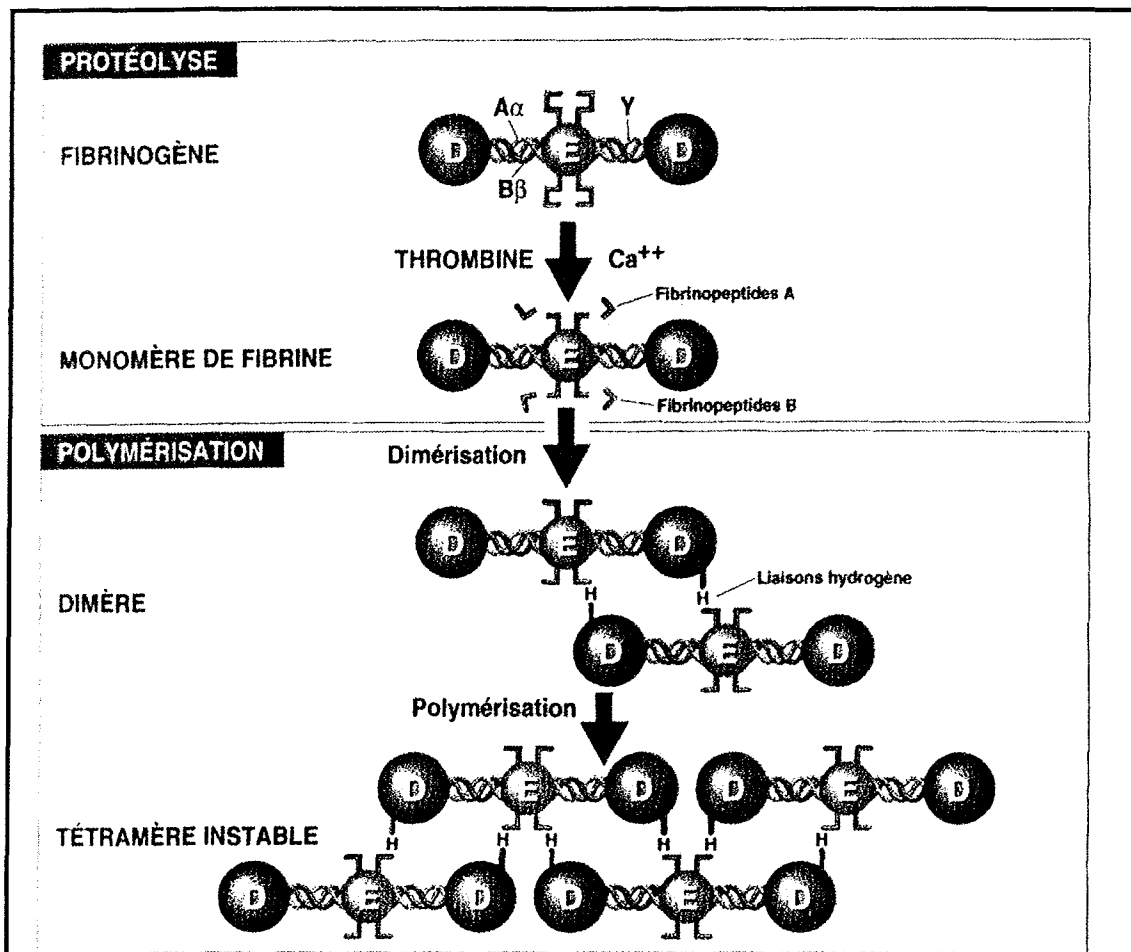


Figure 12 : Les étapes de la fibrinoformation (JOBIN F., 1995).

➤ L'activation du facteur stabilisant de la fibrine

Le facteur XIIIa est une transglutaminase qui établit des liens peptidiques entre les monomères de fibrine bout à bout et côte à côte. Cela afin d'obtenir des fibrilles plus épaisses et plus résistantes au stress mécanique (fig. 13).

Il crée aussi des liens entre la fibrine et la fibronectine ; entre la fibronectine et le collagène ; entre la fibrine et l' α_2 antitrypsine. Ces multiples actions contribuent de façon importante à la solidité et à la durabilité du bouchon hémostatique.

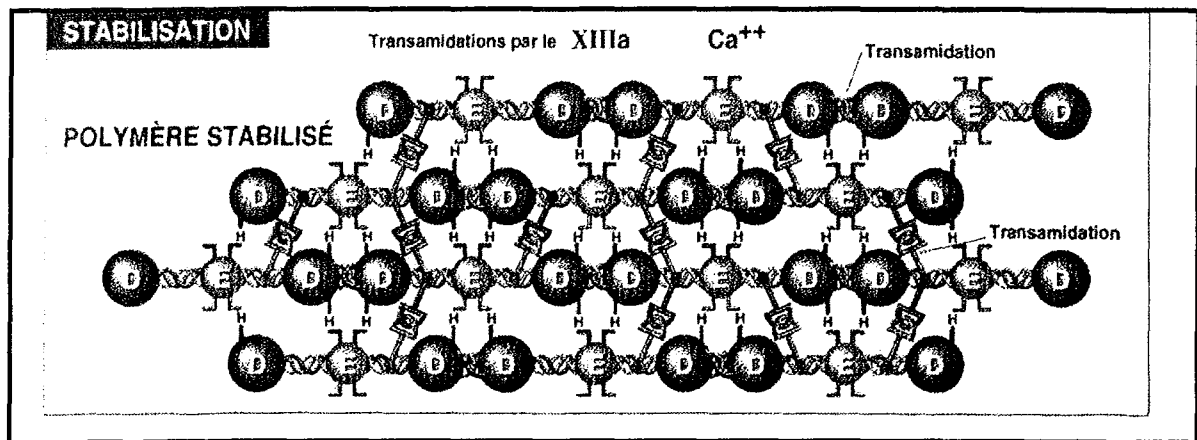


Figure 13 : Les étapes de la fibrinoformation (JOBIN F., 1995).

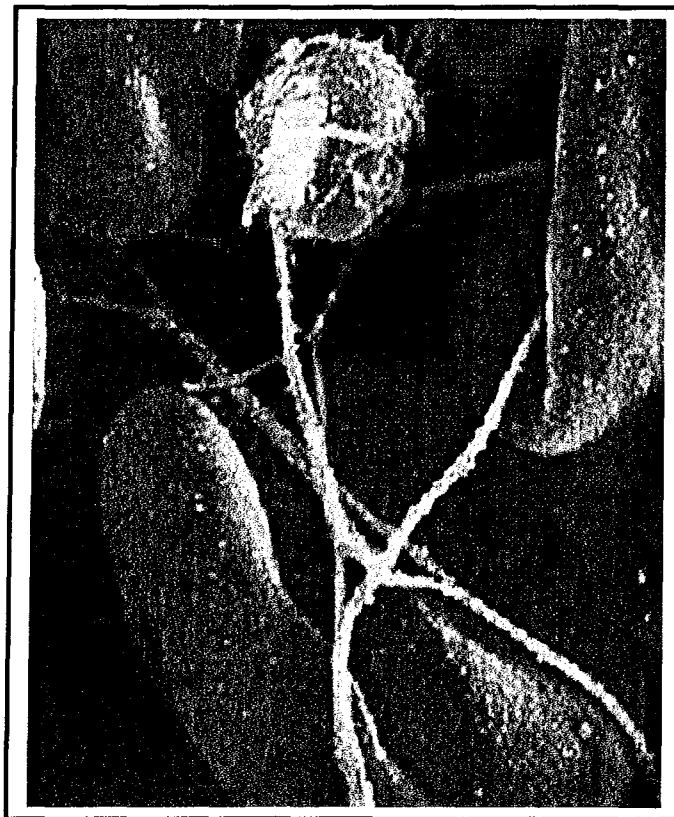


Figure 14 : Le caillot fibrinoplaquettaire (MARIEB E., 1999).

La formation du caillot fibrinoplaquettaire s'achève normalement en trois à six minutes après la rupture du vaisseau sanguin. En trente à soixante minutes la rétractation du caillot, un processus provoqué par les plaquettes, complète la stabilisation du caillot. Les plaquettes contiennent en effet des protéines contractiles

(actine et myosine) qui leur permettent d'exercer une traction sur les filaments de fibrine et d'expulser le sérum de la masse. Ainsi le caillot se ressert et les extrémités de la lésion se rapprochent. La cicatrisation a déjà débutée. Le facteur de croissance dérivé des plaquettes PDGF (Platelet Derived Growth Factor) libéré pendant la dégranulation stimule la division des cellules musculaires lisses, les fibroblastes et favorise ainsi la reconstruction de la paroi vasculaire.

5. La régulation de la coagulation

Pour être bénéfique la coagulation doit elle aussi être circonscrite et prendre fin au moment opportun. Pour cela divers processus sont mis en place :

- La cascade de la coagulation est compartimentée en étapes telles que le passage de l'une à l'autre n'est possible que lorsqu'une concentration seuil en enzyme activée est atteinte.
- Le précurseur inactif n'est activé qu'en présence d'un cofacteur.
- La thrombine formée en excès se lie au réseau de fibrine qui constitue ainsi son principal inhibiteur physiologique. Toutefois elle retrouve son activité si elle est libérée dans la circulation d'où la nécessité de neutralisation par des anticoagulants naturels.
- La mise en jeu d'inhibiteurs physiologiques

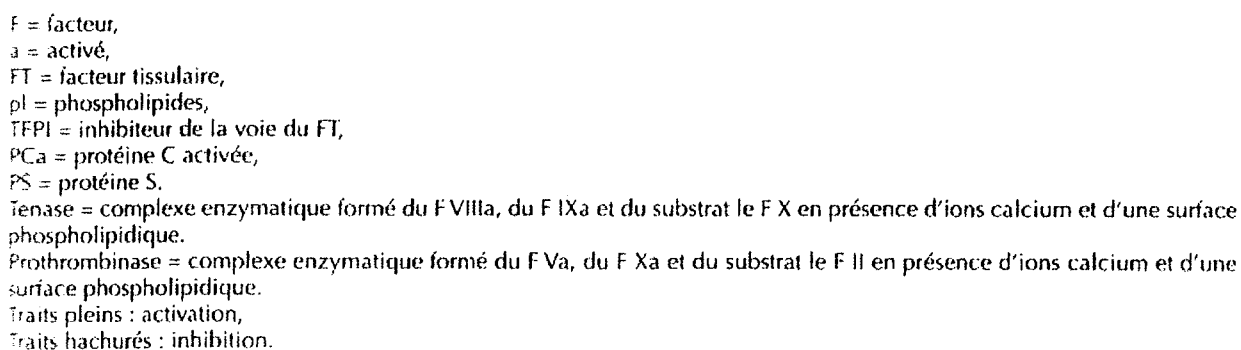
L'antithrombine est un inhibiteur de sérine protéases appartenant à la famille des serpins. Elle a été la première molécule décrite et c'est l'un des principaux inhibiteurs physiologiques de la coagulation. Il s'agit d'une glycoprotéine synthétisée par le foie mais non dépendante de la vitamine K. Elle neutralise préférentiellement l'activité de la thrombine (IIa) mais aussi celle des autres facteurs de la coagulation à activité enzymatique (VIIa, IXa, Xa), à distance du caillot de fibrine (fig. 15).

L'antithrombine expose son site actif sur une boucle en surface, il se comporte comme un substrat idéal pour la protéase cible. Une fois son site actif occupé l'antithrombine piège la protéase par formation d'un complexe équimoléculaire stable. Ce complexe inactif est rapidement éliminé de la circulation. La liaison avec l'héparine ou d'autres glycosaminoglycanes sur un exosite de l'antithrombine modifie sa conformation et accélère considérablement son pouvoir inhibiteur vis à vis de ses protéases cibles de l'ordre d'un facteur 1000.

D'autres serpins se comportent comme des inhibiteurs mineurs, c'est le cas de l' α_1 antitrypsine qui prend en charge le facteur XIIa, la kallikréine et le facteur XIa.

Le TFPI "Tissue Factor Pathway Inhibitor" que l'on traduit par l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire s'occupe plus particulièrement de la voie exogène. Il inhibe l'activité du complexe facteur tissulaire/facteur VIIa mais aussi celle du facteur Xa en formant un complexe quaternaire Xa/TFPI/facteur tissulaire/VIIa (fig. 15).

La protéine C est une protéine vitamine K dépendante qui circule sous forme inactive dans le plasma. Elle est activée par la thrombine lorsque cette dernière est liée à une protéine de la surface endothéliale : la thrombomoduline. L'activation de la protéine C se traduit par une dégradation protéolytique des facteurs Va et VIIa à l'aide d'un cofacteur appelé protéine S. La protéine S circule dans le plasma sous une forme libre active et sous une forme inactive liée à une protéine du complément (la C4 binding protein). Il a été démontré qu'une mutation unique sur le gène du facteur V le rend insensible à l'inactivation et serait responsable d'environ 20% des cas de thrombose. Il s'agit de la "résistance à la protéine C activée", pourvoyeur de thromboses familiales d'identification récente.



50

D. La fibrinolyse

La fibrinolyse peut être définie comme le processus physiologique de dissociation du caillot de fibrine et de reperméation du vaisseau. Il faut savoir que le caillot fibrineux formé n'est pas immuable. Dès sa formation il a incorporé les germes de sa propre dissolution ; sa désintégration par la fibrinolyse et par les macrophages est déjà planifiée. Comme il se forme continuellement de petits caillots dans les vaisseaux sanguins ce processus revêt une importance cruciale. Sans lui l'obstruction complète guetterait tous les vaisseaux (SAMPOL J. et *al.*, 1995).

La fibrinolyse est bâtie selon la même conception que le système de la coagulation comprenant des molécules à activité protéolytique, qui agissent sur un substrat, contrôlées par un système d'activateurs et d'inhibiteurs permettant une régulation physiologique très précise.

1. Le plasminogène

Le plasminogène est une protéine monocaténaire, de 92 kDa, synthétisée par l'hépatocyte. Il circule dans le plasma sous la forme de proenzyme à l'état inactif. La molécule, dans sa structure tertiaire est formée de cinq boucles (fig. 16). Les boucles 1 et 4 sont indispensables à la liaison du plasminogène à des protéines comportant des résidus lysine comme la fibrine et à la glycoprotéine riche en histidine. Ces sites sont appelés LBS (Lisine Binding Sites). Par l'intermédiaire de ces LBS environ la moitié du plasminogène circule sous la forme d'un complexe réversible avec la glycoprotéine riche en histidine. D'autre part le plasminogène peut également se lier à un récepteur spécifique cellulaire. Lors de la coagulation, une fraction du plasminogène circulant se lie à la fibrine il est ainsi incorporé au caillot.

L'activation du plasminogène se traduit par la libération de plasmine. Elle se fait par rupture peptidique et formation d'une protéine bicaténaire (fig. 16). La plasmine a pour rôle principal la dégradation de la fibrine en produits spécifiques mais elle intervient aussi dans la dégradation du fibrinogène, des facteurs V, VIII, XIIIa, FW ainsi que la matrice extracellulaire en activant le système des métalloprotéases.

plasminogène plasmatique qui se lie à ces nouveaux sites subirait une modification conformationnelle qui le rendrait apte à lier la scu-PA. Celle-ci est ensuite activée en u-PA par la plasmine, créant ainsi une boucle d'amplification.

Le système kallikréine, facteur XIa, facteur XIIa est une troisième voie d'activation de la fibrinolyse dont l'importance physiologique n'est pas parfaitement élucidée. Il semblerait qu'au niveau de la surface plaquettaire le facteur XIIa active la prékallikréine en kallikréine, ce qui permet la transformation de la scu-PA en u-PA.

La fibrinolyse est une étape nécessaire dans l'hémostase car si le caillot, qui n'est plus nécessaire à l'arrêt du saignement, n'était pas lentement dissout par la plasmine les vaisseaux et surtout les plus petits qui sont les plus souvent lésés resteraient bouchés. La disparition progressive du sang répandu dans un tissu est facile à suivre sous la peau. L'ecchymose due au sang désoxygéné coagulé disparaît peu à peu ; ce qui révèle l'action de la plasmine et des phagocytes.

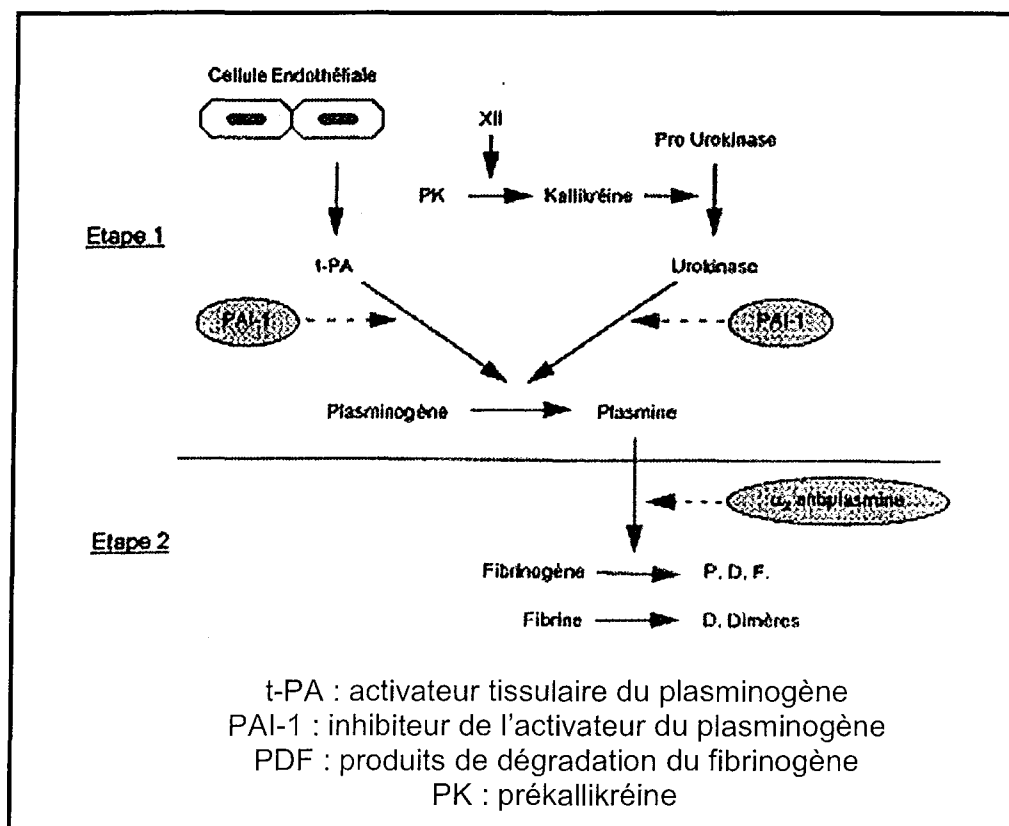


Figure 17 : Etapes simplifiées de la fibrinolyse (SAMPOL J. et al., 1995).

3. La régulation de la fibrinolyse

Les interactions entre les éléments du sang, le thrombus et l'endothélium vasculaire doivent conduire à une réaction fibrinolytique localisée. Durant sa formation le caillot de fibrine incorpore diverses protéines du sang circulant comme le plasminogène mais aussi des éléments cellulaires qui facilitent la fibrinolyse. Par exemple les polynucléaires neutrophiles qui, ayant migré à l'intérieur du thrombus, libèrent diverses enzymes et phagocytent la fibrine digérée. Les monocytes quant à eux possèdent des récepteurs au plasminogène et à la scu-PA.

Un équilibre parfait entre systèmes activateurs et systèmes inhibiteurs est nécessaire car une exagération du processus fibrinolytique peut conduire à une hémorragie gravissime (la plasmine formée en grand excès perd sa spécificité pour la fibrine et protéolyse le fibrinogène donc plus d'agrégation plaquettaire et les facteurs de la coagulation). En revanche un déficit du système fibrinolytique peut être, dans certains cas, à l'origine de phénomènes thromboemboliques.

Un premier système de régulation se situe au niveau même du complexe ternaire fibrine/t-PA/plasminogène dont le but est le développement d'une fibrinolyse localisée. Un second mode de régulation doit permettre d'éviter le développement d'une activité fibrinolytique circulante cette fois ci par inhibition de la plasmine d'une part et par inhibition des activateurs du plasminogène d'autre part.

➤ L'inhibition de la plasmine libre

L' α_2 antiplasmine, de synthèse hépatique, appartient à la famille des serpins. Il s'agit d'une glycoprotéine de 70 kDa qui complexe de façon covalente la plasmine libre (fig. 17). Le complexe ainsi formé, inactif, est éliminé par le foie. La plasmine liée au caillot est donc protégée contre cette action.

Il est à savoir qu'une fraction d' α_2 antiplasmine est incorporée au thrombus lors de sa formation pour éviter par la suite une lyse trop précoce de ce dernier.

L'importance physiologique de ce puissant inhibiteur est attestée par le syndrome hémorragique grave retrouvé chez les sujets ayant un déficit sévère en α_2 antiplasmine (SAMPOL J. et al., 1995).

➤ Les inhibiteurs des activateurs du plasminogène

Il s'agit essentiellement du PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor de type 1). C'est une serpine synthétisée par les cellules endothéliales, les hépatocytes, les mégacaryocytes, les cellules tumorales... Il est capable d'inhiber le t-PA et l'u-PA (fig. 17) par la formation de complexes inactifs. Comme il circule en grand excès dans le plasma, le t-PA libéré par les cellules endothéliales est immédiatement neutralisé s'il n'est pas lié à la fibrine. Ainsi aucune activité fibrinolytique circulante n'est retrouvée physiologiquement.

D'autres inhibiteurs ont un rôle moindre : le PAI-2 qui semble plus spécifique de l'urokinase et interviendrait plutôt dans la régulation de la fibrinolyse extravasculaire, le PAI-3 décrit comme l'inhibiteur de la protéine C activée est également capable de neutraliser l'urokinase ; l'inhibiteur de la C1 estérase intervient en tant qu'inhibiteur de la prékallikréine et du facteur XIIa (POMMEREUIL M., 1995).

➤ L'inhibition de la liaison du plasminogène à la fibrine

La lipoprotéine a Lp(a) possède dans sa structure de multiples copies d'une boucle du plasminogène. En quantité anormalement élevée dans le plasma elle peut se lier à la surface de la fibrine à la place de ce dernier. Ceci constitue une interférence au processus de fibrinolyse (JOBIN F., 1995).

Ce système très fin de régulation de l'activité de la plasmine et de sa restriction à la surface de la fibrine explique le fait que la fibrinolyse physiologique soit un processus qui reste localisé au niveau du thrombus. Son rôle réside en effet dans la lyse progressive du caillot après la cicatrisation de la brèche vasculaire, mais aussi dans la prévention de son extension évitant par là l'occlusion de la lumière vasculaire.

Une hyperfibrinolyse primitive pathologique avec syndrome hémorragique peut s'observer au décours d'interventions chirurgicales intéressant des organes très riches en activateurs du plasminogène (t-PA et u-PA). Il existe par ailleurs des tableaux de fibrinolyse secondaire à des processus pathologiques de CIVD se développant au cours de certaines hémopathies ou états septiques sévères.

Après avoir décrit les différentes étapes de l'hémostase et la place des facteurs qui y ont un rôle nous allons à présent étudier les mécanismes par lesquels les composants de venins de serpent affectent ce processus physiologique. Pour plus de compréhension nous décrirons leur action sur :

- l'hémostase primaire
- la coagulation
- la fibrinolyse.

III. Action des venins sur l'hémostase

primaire

Les venins de serpents sont une mixture d'enzymes nécrosantes, procoagulantes, anticoagulantes et fibrinolytiques qui ont sur la coagulation une action complexe, multifactorielle et variable d'une espèce à l'autre. Les protéines responsables de troubles de l'hémostase peuvent être classées en plusieurs catégories. On différencie les hémorragines qui induisent des troubles de la perméabilité capillaire, les désintégrines et protéines apparentées qui perturbent l'hémostase primaire, les protéases qui interfèrent avec la coagulation et les enzymes fibrinolytiques.

A. Les hémorragines

L'endothélium vasculaire, dont nous avons vu le rôle fondamental dans l'homéostasie de la coagulation, est la cible de zinc-métalloprotéases regroupées sous le terme d'hémorragines. Présentes dans le venin des vipères, des crotales et du cobra royal elles détruisent les protéines de la membrane basale des capillaires. Ceci se traduit par la perte de l'intégrité des vaisseaux avec l'apparition d'œdème, de nécrose et d'hémorragie. Dans un premier temps nous étudierons leurs structures puis dans un second leurs modes d'action.

1. Structure des hémorragines

Les toxines hémorragiques sont communes dans le venin de beaucoup de serpents des familles de Crotalidés et Vipéridés. On peut trouver plusieurs formes de protéinases hémorragiques dans les venins de serpents de la même famille et même au sein d'un seul venin. Par exemple, dans le venin de *Crotalus atrox* pas moins de sept composants hémorragiques ont été isolés, différents en taille et en composition (Bjarnason et Fox, 1994).

Les toxines hémorragiques qui ont été détaillées sont des protéinases métalliques avec un site de liaison à un atome de zinc. Cette liaison est nécessaire à leur fonctionnement car le déplacement du zinc par des agents de chélation, tel l'EDTA, les prive de toute activité hémorragique.

D'un point de vue classification, ces métalloprotéases hémorragiques sont divisées en quatre groupes, en fonction de leur taille (fig. 18) :

- les protéinases de la classe P-I sont des petites toxines avec une activité hémorragique relativement faible. Elles possèdent des masses moléculaires de l'ordre de 20-30 kDa. Elles contiennent toutes un site de liaison au zinc dans leur domaine protéinase. Ce site de liaison au zinc correspond à une séquence d'acides aminés présente chez tous les membres de cette famille et des trois autres groupes. Il s'agit de la séquence HEBXHXBGBXHZ, où H, est l'histidine, E, l'acide glutamique, G, la glycine, B, un résidu hydrophobe encombrant, X, n'importe quel acide aminé, et Z est différent dans chacune des sous familles mais il est toujours conservé.

Parmi les métalloprotéinases de la classe P-I on peut trouver les atrollysines C et E(Ht-c et Ht-e) issues du venin de *Crotalus atrox*, la trimerylsine II de *Trimeresurus flavoviridis*, la ruberlysine (HT-2) de *Crotalus ruber*, l'adamalysine II de *Crotalus adamanteus*...la liste n'est pas exhaustive (Matsui et al., 2000).

- les protéinases de la classe P-II sont des toxines de taille moyenne avec une masse moléculaire comprise entre 30 et 60 kDa. Il s'agit de précurseurs de désintégrines car elles contiennent un domaine protéinase, structurellement semblable à celui de la classe P-I, associé à un domaine désintégrine (séquence RGD). L'activation en désintégrine pourrait se faire de manière autonome ou par l'action d'une autre protéase non encore identifiée (Matsui et al., 2000).

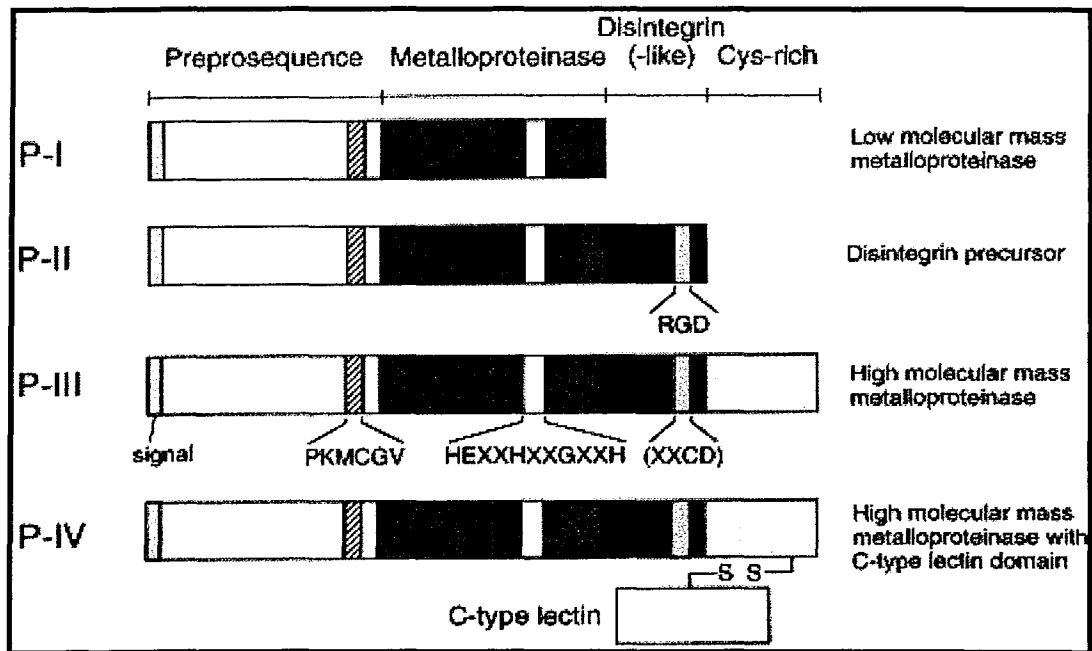
- les protéinases de la classe P-III sont de grandes toxines avec une masse moléculaire allant de 60 à 100 kDa. Elles comportent un domaine métalloprotéase, un domaine désintégrine-like avec une séquence SECD à la place de la séquence RGD et un domaine riche en cystéine de fonction inconnue. Ces métalloprotéases sont généralement plus hémorragiques que les deux autres classes ce qui suggère que les domaines désintégrine-like ont un rôle clé.

On peut y trouver la trimere lysine I de *Trimeresurus flavoridis*, l'atrolysine A (Ht-a) de *Crotalus atrox* et la jararhagine de *Bothrops jararaca* (Matsui et al., 2000).

- les protéinases de la classe P-IV ont une masse moléculaire supérieure à 100 kDa. Elles possèdent un domaine apparenté aux lectines de type C, relié par un pont dissulfure, en plus des domaines déjà présents chez les protéases de la classe III.

Les membres de cette classe sont la russellysine, la carinactivase I, l'activateur de la prothrombine issu d'*Echis carinatus* ou la mucrotoxine A. Pour le moment, aucun n'a été séquencé.

Les lectines de type-C de mammifères sont en grande majorité des protéines multimériques qui comportent dans leur structure un ou plusieurs domaines CRD (*Carbohydrate Recognition Domain*). Elles ont ainsi la propriété de lier les sucres en présence d'ions calcium. Dans les venins de Crotalidés et de Viperidés un groupe de protéines a été rattaché à la superfamille des lectines de type C car leur structure primaire présente une homologie avec le domaine CRD. Elles se subdivisent en deux groupes : les lectines de type C vraies qui lient le galactose et les protéines apparentées aux lectines de type C qui ont perdu la capacité de lier les sucres et le calcium. Le premier groupe rassemble les protéines formant des homodimères de CRD telles certaines métalloprotéinases, l'activateur du facteur X du venin de la vipère de Russell. Le second groupe est constitué d'hétérodimères de CRD comme la bothrojaracine.



La préproséquence contient un peptide signal de 18 résidus ainsi que la proséquence (env 170 résidus) avec le motif PKMCGV.

Le domaine métalloprotéase (env 200 résidus) possède le motif de liaison au zinc HEXXHXXGXXH.

Le domaine désintégrine-like contient le motif XXCD à la place de RGD.

Figure 18 : Structures schématiques de métalloprotéases de venins de serpents

Adapté de Matsui et al., 2000.

Toutes les métalloprotéinases sont synthétisées et stockées dans les glandes à venin sous forme de zymogènes car un groupement thiol, conservé, bloque le site de liaison au zinc. Après leur sécrétion, un mécanisme protéolytique convertit le zymogène en enzyme active en retirant ce groupe thiol. Ce mécanisme d'activation serait de type commutation d'une cystéine, par analogie avec celui des métalloprotéinases de mammifères dégradant la matrice (Markland F., 1998).

En 1994, 65 toxines hémorragiques de 24 espèces différentes de serpent étaient rapportées, quasiment la moitié d'entre elles (31 sur 64) étant des membres de la classe P-I et pratiquement toutes étant des métalloprotéinases. En 2000, on en compte pas moins d'une centaine dont une vingtaine ont été séquencées. Les structures 3D de quatre métalloprotéinases de venin (l'adamalysine II l'atrolysine C, la trimérélysine II et l'acutolysine A) ont même été élucidées par analyse cristallographique aux rayons X (Matsui et al., 2000).

2. Mode d'action des hémorragines

Les hémorragines de venins de serpents ont pour rôle de dégrader des protéines de la membrane basale des capillaires telles la fibronectine, la laminine, le collagène de type IV... Cette action a été rapidement mise en évidence car l'injection intradermique d'une fraction de venin de serpent sur le dos d'un animal de laboratoire se traduit par une nécrose hémorragique facilement observable.

Lors d'études sur des substrats de faibles poids moléculaires, il s'est avéré que les hémorragines préfèrent agir sur l'extrémité carboxyterminale des protéines, au niveau d'un acide aminé hydrophobe. Certaines dégradent également le fibrinogène et la gélatine. Par exemple, la fibrolase issue du venin d' *Agkistrodon contortrix*, l'atroxase de *Crotalus atrox* et la lébétase de *Vipera lebetina* dégradent le fibrinogène. Nous les étudierons plus en détail dans la partie des enzymes fibrinolytiques.

Comme nous l'avons vu, la plupart des métalloprotéinases sont issues des venins de Vipéridés et Crotalidés. Récemment, quelques homologues intéressants ont été isolés dans le venin d'Elapidés. Nous en citerons deux.

La mocarhagine, une métalloprotéinase isolée du venin de *Naja mocambique* cumule plusieurs actions en plus de son activité métalloprotéase. Elle agit sur la GPIIb qui a un rôle clé dans l'agrégation plaquettaire et elle peut rompre la chaîne α du fibrinogène humain. Elle possède aussi une activité lectine-like (Markland F., 1998). Une autre métalloprotéase, la kaouthiagine, a été extraite du venin de cobra à monocle (*Naja kaouthia*). Elle se lie et rompt spécifiquement le facteur Willebrand humain rendant celui-ci inefficace. Elle n'agit ni sur le fibrinogène ni sur les substrats peptidiques synthétiques utilisés pour décrire les actions des trimérelýsines (Matsui et al., 2000).

Des études réalisées en 1997, suggèrent que le domaine désintégrine-like des métalloprotéases de la classe P-III pourrait contribuer au pouvoir biologique global de ces enzymes. Au cours de ces études, le domaine désintégrine-like et le domaine riche en cystéines de l'atrolysine A (la plus efficace des hémorragines du venin de

Crotalus atrox) ont été exprimés dans des cellules d'insecte. Le matériel obtenu a permis de démontrer que la boucle contenant la séquence Arg-Ser-Glu-Cys-Asp (RSECD) est responsable d'une activité antiagrégant plaquettaire et que le résidu cystéine de cette séquence est impliqué dans une liaison dissulfure nécessaire à son activité (Jia et al., 1997).

La jararhagine-C, une autre protéine de classe III extraite du venin de *Bothrops jararaca* après protéolyse de la jararhagine, a été isolée et séquencée. Elle contient un domaine désintégrine-like et un domaine riche en cystéine. Cette protéine est capable d'empêcher l'agrégation plaquettaire induite par le collagène et l'ADP car elle dégrade la GPIa/IIa. Elle agit aussi sur le facteur Willebrand et le fibrinogène. Du point de vue inhibition, elle est insensible aux facteurs plasmatiques comme l' α 2 macroglobuline. L'ensemble de ces propriétés explique sa capacité à dégrader des composants hémostatiques et à conduire à un saignement systémique. Cela renforce les idées précédemment avancées (Matsui et al., 2000).

Pour conclure, les résultats de différentes études suggèrent que les grandes toxines hémorragiques de la classe P-III et P-IV exercent leur activité hémorragique par un mécanisme double, impliquant d'une part la protéolyse directe des protéines de la membrane basale des capillaires et d'autre part inhibant l'agrégation plaquettaire via des domaines désintégrine-like ou réalisant la protéolyse des intégrines et des protéines adhésives plasmatiques. De plus on a signalé que la jararhagine stimule la fibrinolyse *in vitro* en augmentant l'activité du t-PA et qu'elle diminue l'activité de l' α 2 antiplasmine (le principal inhibiteur de la voie fibrinolytique). Toutes ces actions peuvent donc contribuer à l'hémorragie systémique observée chez les victimes d'envenimation de *Bothrops jararaca* (Laing G. and Moura-da-Silva A., 2005).

B. Composants interagissant avec les plaquettes

Les venins de serpent contiennent de nombreux composés actifs sur les plaquettes avec d'une part des agents responsables de l'agrégation et d'autres part des inhibiteurs de l'agrégation. Nous traiterons ici seulement des composés qui ont été purifiés et bien caractérisés. Leurs actions sont précisées dans la figure 19, les tableaux 5 et 6.

1. Les activateurs de l'agrégation plaquettaire

1.1 Enzymes à action directe sur les plaquettes

Les enzymes à action directe sur les plaquettes peuvent être divisées en deux groupes avec d'une part les enzymes thrombine-like, qui sont des sérines protéinases de structure et d'actions proches de celles de la thrombine, et d'autre part les phospholipases A₂. Ces deux groupes interviennent principalement sur les récepteurs plaquettaires.

Parmi les sérines protéinases thrombine-like, on peut citer la cérastocytine issue du venin de *Ceraste ceraste* et la cerastobine issue du venin de *Ceraste vipera*, donc de deux espèces proches.

La **cérastocytine** agit en bloquant les récepteurs plaquettaires de la thrombine (GPIIb) ou du fibrinogène (GPIIb/IIIa). Son action a été démontrée en utilisant des anticorps monoclonaux dirigés contre ces récepteurs : lors d'un prétraitement des plaquettes avec ces agents l'agrégation induite par la cérastocytine est rendue inefficace (Marrakchi et al., 1997). Les concentrations de cérastocytine induisant l'agrégation des plaquettes sont de l'ordre de la nanomole.

Des tests utilisant des concentrations plus élevées de cérastocytine ont révélé qu'elle a, dans ces conditions, une action sur la prothrombine et le facteur X. Après une longue incubation, elle est aussi capable d'activer le facteur XIII. Même si cette molécule est polyvalente elle est de façon globale moins active que la thrombine sur la coagulation plasmatique (Marrakchi et al., 1995).

Le mécanisme d'action de la **cérastobine** est différent de celui de la cérastocytine puisque son action proagrégante exige la présence du fibrinogène et du complexe FW/VIII. Son activité est également inhibée par un anticorps monoclonal dirigé contre la GPIb, mais pas par un anticorps monoclonal dirigé contre la GPIIbIIIa.

Même si la cérastocytine et la cérastobine sont deux enzymes thrombine-like d'espèces proches, il s'agit bien de molécules différentes :

- elles diffèrent par leur point isoélectrique (7,7 pour cérastobine et 9 pour la cérastocytine)
- leurs séquences d'acides aminés aux extrémités aminotermiales sont différentes
- la cérastocytine est aussi efficace que la thrombine pour induire l'agrégation plaquettaire, alors que la cérastobine est cent fois moins efficace.
- au contraire, la cérastobine présente une activité pro-coagulante et formes des caillots stables, hydrolysant le fibrinogène en plusieurs endroits alors que la cérastocytine est une enzyme à faible activité procoagulante, dégradant le fibrinogène beaucoup plus lentement (Marrakchi et al., 1995).

Leurs similitudes et leurs différences, le fait qu'elles permettent une activation plaquettaire sélective par l'un ou l'autre des mécanismes de la thrombine font de ces deux enzymes ophidiennes des outils intéressants pour comprendre le mécanisme d'action global de la thrombine.

Parmi les autres sérines protéinases thrombine-like on peut citer la **crotalocytine** qui est capable d'induire simultanément l'agrégation plaquettaire et la sécrétion d'ADP, de sérotonine plaquettaire ainsi que la **thrombocytine** qui agrège

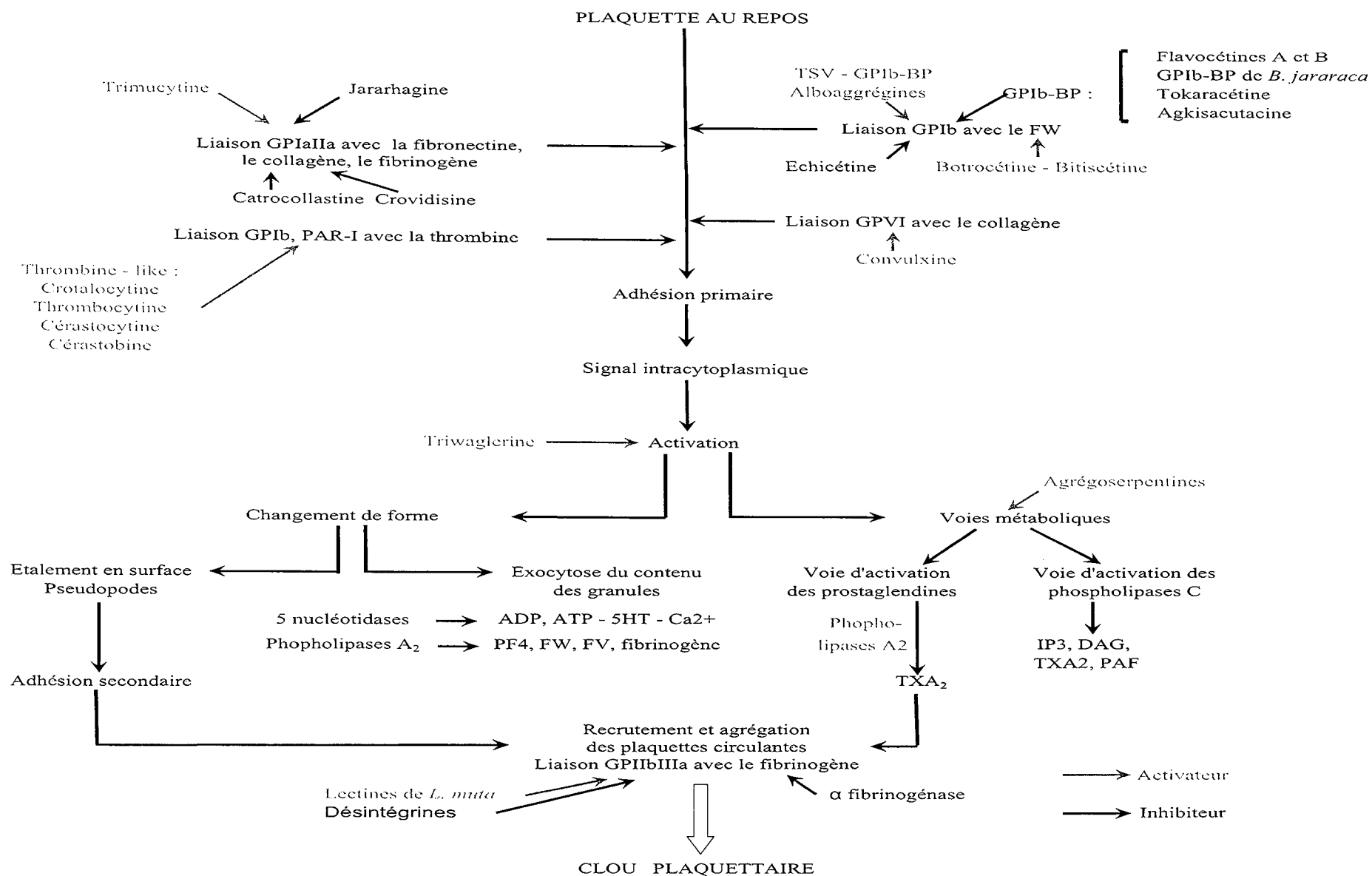


Figure 19 : Action de différentes protéines de venins de serpent sur l'agrégation plaquettaire.

directement les plaquettes et libère l'ADP plaquettaire. Ces deux enzymes sont structurellement parlant typiquement des sérines protéinases de type thrombine-like. Cependant aucune d'elles n'agit sur le fibrinogène et leurs mécanismes d'action diffèrent légèrement. Il semblerait que l'activité agrégante de ces enzymes soit en grande partie due à l'ADP (un agoniste plaquettaire largué par celles-ci) plutôt qu'à la thrombine (Schmaier et al., 1980).

Les **phospholipases A₂** constituent l'autre groupe induisant directement l'agrégation plaquettaire. Les phospholipases agissent en clivant les phospholipides des membranes plaquettaires et en produisant des métabolites actifs :

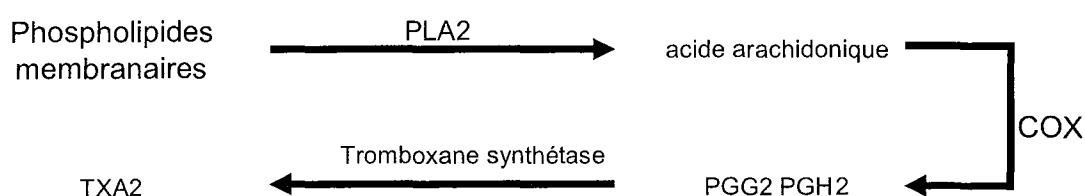


Figure 20 : Mécanisme d'action des phospholipases A₂

L'administration d'aspirine, un inhibiteur de la cyclooxygénase, bloque l'effet agrégant des phospholipases A₂ prouvant ainsi que la synthèse des métabolites de l'acide arachidonique tels que la thromboxane A₂ ont un rôle primordial dans ce mécanisme (Mounier et al., 1994)

Il est à remarquer que certaines phospholipases issues de venins de serpents ont un double effet : elles initient l'agrégation à faible concentration et inhibent celle-ci à forte concentration ou suite à de plus longues incubations. C'est par exemple le cas des phospholipases A₂ des venins de Cobra et de la vipère de Russel.

1.2 Composés non enzymatiques à action directe sur les plaquettes

La **convulxine** (CVX) issue du venin de *Crotalus durissus terrificus* et d'autres espèces apparentées représente un type d'agent agrégant non enzymatique et non coagulant. C'est une glycoprotéine complexe, cyclique, comportant quatre copies de deux sous unités CVXα et CVXβ reliées par des liaisons dissulfures. Sa structure

cristallographique (fig. 21) a été déterminée en 2003 grâce à des techniques de haute résolution impliquant les rayons X (Murakami et al., 2003). C'est la première structure cristallographique connue d'une protéine issue de *Crotalus durissus terrificus*.

La convulxine semble appartenir à la famille des lectines de type C mais à la différence des autres lectines de type C présentes dans les venins, la convulxine ne se lie pas au récepteur plaquettaire GPIIb. Elle se lie à un des récepteurs du collagène (la GPVI) et induit la transduction du signal de l'agrégation de façon similaire à celui-ci. Son mécanisme d'action est calcium dépendant (Murakami et al., 2003).

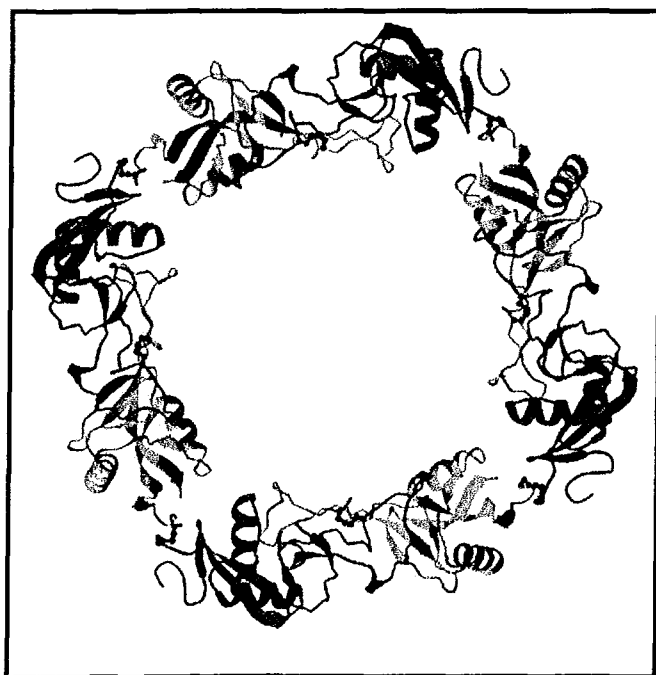


Figure 21 : Représentation du tétramère cyclique CVX $\alpha_4\beta_4$. Les chaînes α et β sont représentées en bleu et en vert, respectivement. Les liaisons dissulfures inter et intra chaînes ($C\alpha$, $C\beta$, and $S\gamma$) sont en rose (Murakami et al., 2003)

En utilisant de la convulxine marquée à l'iode 125 on a vu qu'elle se lie aux plaquettes avec une haute affinité et à un petit nombre de récepteurs (environ 1000 sites de liaison par plaquette). Sa haute affinité semble être spécifique aux plaquettes car elle n'est pas observée avec d'autres cellules telles les érythrocytes et les polynucléaires neutrophiles.

On a aussi testé plusieurs agonistes compétitifs et on a conclu que sa liaison n'est pas inhibée par la présence de thrombine, fibrinogène, collagène, ADP, PAF acéter ou sérotonine (Francischetti et al., 1997). L'aspirine n'interfère pas non plus sur son activité indiquant ainsi que la synthèse de la thromboxane A₂ stimulée par convulxine est indépendante de la cyclooxygénase. Enfin on a remarqué que de petites doses de convulxine ne causent pas de lyse de la membrane plaquettaire tandis que de plus fortes doses administrées en intraveineuse peuvent être cytolytiques (Murakami et al., 2003).

En s'appuyant sur ses avantages et en essayant de limiter ses inconvénients il se pourrait bien que la convulxine trouve sa place dans l'arsenal thérapeutique futur.

Teng et ses collaborateurs étudièrent longuement les venins de *Trimeresurus* à la recherche de composés non enzymatiques à action directe sur les plaquettes. En 1989, ils se penchèrent sur deux molécules : l'agrégoserpentine et la triwaglerine.

L'**agrégoserpentine** semble activer les plaquettes en diminuant le niveau d'AMPc ou en activant une phospholipase A₂ endogène qui conduit à la formation de facteurs activateurs des plaquettes mais pas à celle des prostaglandines. Ce mécanisme d'activation plaquettaire n'a toujours pas été clairement défini, une seule certitude : le calcium est exigé pour l'activité de cette protéine.

La **triwaglerine** est l'inducteur de l'agrégation plaquettaire le plus efficace, isolé parmi sept venins examinés. Elle ne possède aucune activité enzymatique discernable et semble activer les plaquettes par un mécanisme unique, indépendant de la formation de la thromboxane A₂ et du facteur d'activation plaquettaire ou de la sécrétion d'ADP. Aucune autre recherche n'a été faite à son sujet.

En 1993, ces mêmes chercheurs isolèrent la **trimucytine**. Il s'agit d'une glycoprotéine présentant une répétition de Gly-Pro-X, comme le collagène, dans sa partie amino-terminale. Elle est capable d'induire la sécrétion d'ATP et la formation de thromboxane A₂ au niveau des plaquettes du lapin. Un anticorps monoclonal dirigé contre la sous-unité α_2 de l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ (GPIIb/IIIa) supprime la capacité de la trimucytine à déclencher l'agrégation plaquettaire indiquant ainsi que cette intégrine

joue un rôle central dans la réactivité de la plaquette à la trimucytine. De nombreuses études ont localisé le domaine I de la sous unité $\alpha 2$ comme site réactif à la trimucytine. Cependant, en utilisant un domaine I recombinant, produit par des *Escherichia coli*, on a vu que l'agrégation plaquettaire reste inchangée en présence de trimucytine. Sur la base de ces résultats, on a conclu que la réactivité des plaquettes à la trimucytine est dépendante de la GPIIb/IIIa mais que le domaine I de la sous-unité $\alpha 2$ n'est pas impliqué (Teng et al., 1993).

Parmi les composés non enzymatiques à action plaquettaire directe on trouve également des **lectines isolées du venin de *Lachetis muta***. Ces toxines se lient aux plaquettes et induisent un changement conformationnel du récepteur au fibrinogène (GPIIb/IIIa), par un mécanisme encore inconnu, permettant ainsi l'agrégation plaquettaire (Markland F, 1998).

1.3 Composés interagissant avec le Facteur Willebrand

Rappelons que l'agglutination (adhésion primaire) est un processus passif qui implique seulement une interaction entre une protéine et son récepteur plaquettaire alors que l'agrégation est un processus transmembranaire actif qui requiert une activation métabolique.

In vitro, il a été montré que de nombreuses protéines de venins de serpents agissent sur la liaison entre le FW et ses récepteurs membranaires plaquettaires. Deux familles de protéines, les protéines apparentées aux lectines de type C et les zinc métalloprotéinases, se sont distinguées dans cette action. Comme les zinc métalloprotéinases ont déjà été traitées dans la partie sur les hémorragines nous étudierons plus particulièrement ici les protéines ayant un motif apparenté aux lectines de type C.

La **botrocétine** est une protéine issue du venin des *Bothrops*. Elle n'a aucune activité enzymatique et, *in vitro*, elle agglutine clairement les plaquettes en présence du FW indépendamment de l'espèce mammifère. Elle ne montre pas d'activités de liaison des sucres et n'est pas dépendante du calcium donc ce n'est pas une vraie lectine de type C.

La botrocétine agit en se fixant sur le FW, au niveau du domaine A1, le modulant afin d'obtenir une liaison à la GPIb plus rapide et plus importante. La concentration efficace de botrocétine induisant l'agglutination plaquettaire est approximativement de 2-5 µg/ml. Plusieurs auteurs ont travaillé sur sa purification (par exemple Andrews en 1989, Fujimura en 1991) et sa séquence en acides aminés a été déterminée en 1993 par Usami et ses collaborateurs. Les deux sous unités la constituant montrent un degré de similitude élevé avec d'autres protéines ophidiennes.

La **bitiscétine**, une autre protéine apparentée aux lectines de type C, isolée en 1996, est structurellement proche de la botrocétine (hétérodimère à deux sous unités) mais elle diffère de celle-ci par son point isoélectrique (9,1 contre 4,6) et par son mode d'action.

L'agglutination plaquettaire induite par la bitiscétine est dépendante du FW et de la GPIb mais pas du calcium ni de la GPIIb/IIIa. Les différentes études menées suggèrent que la bitiscétine interagisse directement au niveau du domaine A1 du FW, sur un site différent de celui de la botrocétine, et qu'elle exige une conformation donnée pour son interaction. Sa façon d'interagir avec le FW semble toutefois être différente de celle du botrocétine. En effet, la botrocétine présente une région chargée négativement qui complète potentiellement la région sulfatée de la GPIb et réalise des interactions électrostatiques avec une région positive sur le domaine A1 du FW. La bitiscétine ne possède pas de région négative comparable et se place plus probablement sur une région positive pour interagir électrostatiquement avec un site anionique complémentaire de la GPIb (Matsui et Hamako, 2005).

Les structures cristallographiques de la botrocétine et de la bitiscétine (fig. 22) ainsi que le complexe de ces protéines avec le FW ont permis de mieux comprendre leurs mécanismes d'action et indiquent ce qui suit :

- un domaine concave central formé par les deux sous unités de la botrocétine ou de la bitiscétine fournit le site accepteur pour le FW
- ces protéines se lient directement au domaine A1 du FW à proximité étroite du site de liaison pour la GPIIb
- ces protéines n'induisent aucun changement conformationnel crucial sur le site de liaison à la GPIIb mais pourraient fournir un ajustage de précision supplémentaire pour la liaison à la GPIIb.

Ces résultats suggèrent que les mécanismes d'action des venins ophidiens sont différents de ceux imaginés et testés *in vitro* avec d'autres molécules, notamment des antibiotiques comme la ristocétine. (Matsui et Hamako, 2005).

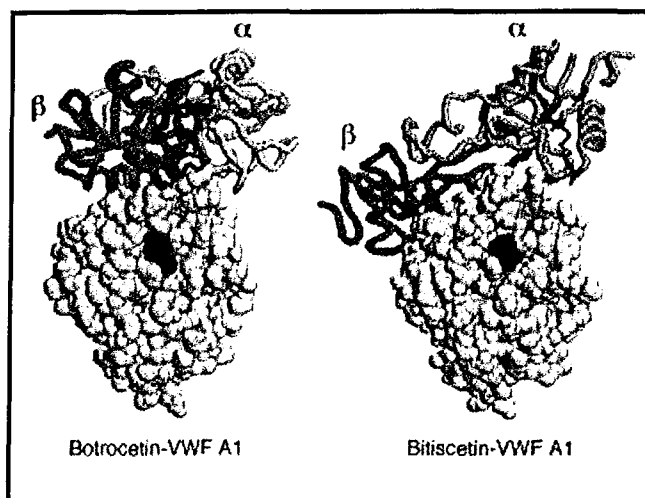


Figure 22 : Structure du domaine A1 complexé avec la botrocétine et la bitiscétine. La botrocétine et la bitiscétine se lient au domaine A1 du FW dans un site étroit et perpendiculairement (Matsui et Hamako, 2005).

Après avoir décrit les composés agissant directement sur le FW voyons à présent ceux qui ont pour cible le récepteur du FW (la GPIIb). On compte parmi eux de nombreuses protéines structurellement liées aux lectines de type C dont les alboaggrégines ainsi que les agonistes de la GPIIb.

Les alboaggrégines issues du venin de *Trimeresurus albolabris* ont un mécanisme d'action propre. Bien que le mécanisme précis n'ait pas été encore totalement élucidé, l'**alboaggrégine-B** est unique dans son induction de l'agrégation. Cette protéine se lie spécifiquement à la GPIb plaquettaire, avec une forte affinité et empêche ainsi toute liaison du FW bovin ou humain, même celle induite par la ristocétine ou la botrocétine. C'est un processus qui dépend uniquement du récepteur GPIb, sans qu'il n'y ait l'activation des plaquettes. Sa liaison à la GPIb ne renforce pas l'agrégation des plaquettes même en présence de fibrinogène exogène, suggérant donc que cette liaison à la GPIb n'active pas le complexe GPIIb/IIIa (Usami et al., 1996).

En étudiant sa structure il a été prouvé que les séquences aminoterminales des deux sous unités la composant sont fortement homologues à celles de la botrocétine. Lors de recherches sur l'alboaggrégine-B, une autre forme d'alboaggrégine a été découverte. La liaison de cette nouvelle protéine à la GPIb induit l'activation plaquettaire et stimule la protéine kinase C, les tyrosines kinases mais elle aussi n'a aucune action sur l'activation de la GPIIb/IIIa. (Andrews et al., 2005).

Les protéines se liant directement à la GPIb plaquettaire sont appelées GPIb-BP (BP pour Binding Protéine). Il s'agit de protéines modulatrices de la GPIb par comparaison avec la botrocétine qui est modulatrice du FW. Une de ces protéines, nommée **TSV-GPIb-BP**, a été isolée dans le venin de *Trimeresurus stejnegeri*. A de faibles doses (< 5 µg/ml) TSV-GPIb-BP inhibe l'agrégation plaquettaire humaine induite par la ristocétine. A des doses plus élevées (> 5 µg/ml) elle agrège directement les plaquettes humaines en l'absence de calcium additionnel ou de tout autre cofacteur. Cette activité d'agrégation est donc dose dépendante. Elle est inhibée par les anticorps spécifiques de GPIb, mais pas par les anticorps dirigés contre les GPIa, GPIIa, GPIIb et GPIIIa plaquettaires (Lee et Zhang, 2003).

Les protéines structurellement liées aux lectines de type C et les agonistes de la GPIb ont un point commun : elles peuvent être des outils très utiles pour étudier le mécanisme d'activation plaquettaire suite à la stimulation de la GPIb ainsi que les relations structure-activité de cette glycoprotéine.

Molécule	Serpent	Structure	Cible
Enzymes à action directe sur les plaquettes			
Cérastocytine	<i>Ceraste ceraste</i>	sérine protéinase thrombine-like	GPIb GPIIb/IIIa
Cerastobine	<i>Ceraste vipera</i>	sérine protéinase thrombine-like	GPIb
Crotalocytine	<i>Timber rattlesnake</i>	sérine protéinase thrombine-like	PAR-I
Thrombocytine	<i>Bothrops atrox</i>	sérine protéinase thrombine-like	PAR-I
Composés non enzymatiques à action directe sur les plaquettes			
Convulxine	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	glycoprotéine cyclique	GPVI
Agrégoserpentine	<i>Trimeresurus gramineus</i>	glycoprotéine	non défini
Triwaglerine	<i>Trimeresurus wagleri</i>	glycoprotéine	activation
Trimucytine	<i>Trimeresurus mucrosquamatus</i>	glycoprotéine	GPIIa
Composés interagissant avec le Facteur Willebrand			
Botrocétine	<i>Bothrops genus</i>	protéine apparentée aux lectines de type C.	FW
Bitiscetine	<i>Bitis arietans</i>	protéine apparentée aux lectines de type C.	FW
Alboaggrégine-B	<i>Trimeresurus albolabris</i>	protéine apparentée aux lectines de type C.	GPIb
TSV-GPIb-BP	<i>Trimeresurus stejnegeri</i>	protéine apparentée aux lectines de type C.	GPIb

Tableau 5 : Les activateurs de l'agrégation plaquettaire.

2. Les inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire

2.1. Les antagonistes de la GPIb

Il s'agit là de protéines qui se fixent sur le récepteur plaquettaire et empêchent toute liaison du FW. L'antagoniste est dit compétitif lorsqu'il est capable de déclencher les même action que le FW, non compétitif dans le cas inverse. Parmi les antagonistes de la GPIb on peut citer les flavocétines, la GPIb de *Bothrops jararaca*, celle de *Trimeresurus tokarensis*.

Dans le venin de *Bothrops jararaca* on a isolé une protéine appelée **GPIb-BP**. La séquence de cette protéine élucidée, on a trouvé que le site de liaison à la GPIb se situe sur une sous unité β au niveau du 123^{ème} acide aminé (Kawasaki et al., 1995). Cette GPIb-BP est un membre de la famille des lectines de type C et témoigne d'un degré d'homologie important avec la botrocétine et les alboaggrégines. Elle se lie spécifiquement à la GPIb et elle n'induit ni l'agrégation des plaquettes ni l'exocytose du contenu des granules (vérifiée par le dégagement de sérotonine). Elle empêche complètement l'attache du FW induite par la ristocétine ou la botrocétine, sans affecter l'agrégation induite par l'ADP ou la thrombine (Kawasaki et al., 1995). Etrangement, les séquences aminotermiales de ses deux sous unités révèlent une similitude importante avec les lectines de type C et spécialement avec deux protéines fonctionnant différemment qui sont la botrocétine (une modulatrice du FW) et l'alboaggrégine B (une modulatrice de la GPIb).

Deux protéines de haute masse moléculaire, la **flavocétine A** et la **flavocétine B**, ont été extraites du venin de *Trimeresurus flavoviridis*. Ce sont des protéines spécifiques aux plaquettes. On sait aujourd'hui que la flavocétine A se lie avec une affinité élevée ($K_d = 0,35 - 0,13$ nM) à $21\,500 \pm 1760$ récepteurs par plaquette. À la dose de 1 $\mu\text{g/ml}$, les flavocétines A et B inhibent l'agrégation plaquettaire humaine dépendante du FW. Cependant, à 10 $\mu\text{g/ml}$ elles n'ont plus aucun effet sur l'agrégation induite par le collagène ou l'ADP. De plus, la flavocétine A empêche complètement l'agrégation et la sécrétion d'ATP par les plaquettes stimulées par une faible concentration de thrombine (Taniuchi et al., 1995).

Toujours dans le venin de *Trimeresurus* (*Trimeresurus tokarensis* cette fois) on a isolé un autre antagoniste plaquettaire, la **tokaracétine**, via plusieurs techniques chromatographiques. La tokaracétine appartient à la superfamille des lectines de type C, elle empêche l'attache du FW bovin et humain (marqué à l'iode 125) en présence de botrocétine. Elle se lie spécifiquement aux plaquettes humaines avec une affinité élevée ($3,9 \pm 1,4$ nM) à 47440 ± 2780 récepteurs par plaquette. Cette liaison est réversible, inhibée par l'anticorps monoclonal Gur83-35 qui est dirigé contre l'extrémité aminoterminal de la GPIb humaine (Kawasaki et al., 1995).

Enfin, une protéine récente, l'**agkisacutacine**, apparentée aux lectines de type C a été isolée du venin d'*Agkistrodon acutus*. Tout d'abord elle a été identifiée en tant qu'antagoniste de l'agrégation plaquettaire en bloquant l'effet de la ristocétine et possédant aussi une activité fibrinogénolytique. Après plusieurs purifications par chromatographie, ses fonctions biologiques ont été davantage caractérisées. Lorsqu'elle est hautement purifiée, elle maintient son action, dépendante du facteur Willebrand, sur les plaquettes alors qu'elle perd son activité fibrinogénolytique. Cependant elle n'inhibe pas l'agrégation induite par l'ADP ou le collagène, et a peu d'effet sur l'agrégation induite par la thrombine. On a même démontré que l'agkisacutacine stimule l'activité anticoagulante en se liant au complexe IX/X. Ainsi, l'agkisacutacine est la première protéine apparentée aux lectines de type C rapportée qui se lie aux récepteurs membranaires plaquettaires et aux facteurs de coagulation (Li et al., 2005).

2.2. Les α fibrinogénases

L' **α fibrinogénase** issue du venin de *Calloselasma rhodostoma* est une enzyme dégradant préférentiellement la chaîne A α du fibrinogène, ce qui empêche l'agrégation plaquettaire (Ouyang et al., 1986). Cette action est réversible par l'addition d'EDTA qui inhibe l'activité fibrinogénolytique mais aussi par l'addition de fibrinogène.

L' α fibrinogénase issue du venin de *Naja nivicollis* inhibe, quant à elle, l'agrégation plaquettaire en absence de fibrinogène (Kini et Evans, 1991). Cela prouve qu'il n'y a pas un mécanisme commun à toutes les α fibrinogénases.

Plus récemment, deux fibrinogénases glycosylées ont été isolées du venin de *Vipera lebetina*. Elles possèdent des séquences et des déterminants antigéniques homologues mais peuvent être clairement différenciées par leur spécificité de substrat, leurs niveaux de glycosylation, leur masse moléculaire.

Les α fibrinogénases n'ont aucune homologie avec les sérine protéinases humaines connues. Elles en ont une avec des arginine estérases d'autres venins de serpents mais elles sont incapables d'hydrolyser les esters de l'arginine, de la lysine et de la tyrosine. Ces enzymes ont une activité protéolytique forte et dégradent la chaîne α du fibrinogène le rendant inapte à l'aggrégation plaquettaire et à la coagulation par la thrombine. Les β fibrinogénases sont des arginine estérases typiques qui hydrolysent des esters et des amides d'arginine, elles attaquent la chaîne β du fibrinogène (Samel et al., 2002).

2.3. Les phospholipases A2

Comme nous l'avons vu précédemment, les phospholipases peuvent être pro ou antiagrégantes plaquettaires. Quelques phospholipases ont une double action impliquant un effet agrégant après de courtes incubations ou de faibles concentrations et un effet antiagrégant après de longues incubations ou lors de fortes concentrations.

Une théorie est basée sur le fait que lorsque l'activité phospholipase est inhibée par du bromure de bromphenacyl, l'activité antiagrégante n'est que partiellement diminuée donc que l'effet antiplaquettaire doit être en partie non enzymatique. Il s'agirait en fait d'un changement de morphologie comprenant une rupture du cytosquelette et par conséquent une perte de la sécrétion (Huang et al., 1997).

Parmi les dernières phospholipases issues de venin de serpent on peut citer celles de *Austrelaps superba*, de la vipère de Russell, du cobra royal *Ophiophagus hannah*.

2.4. Les 5' nucléotidases

Dès 1938, Gulland et Jackson prouvèrent que les venins ophidiens possèdent une activité nucléotidase très spécifique et très active envers la 5'-AMP et la 5'-IMP. En 1951, Heppel et Hilmoe trouvèrent l'activité 5'-nucléotidase dans les venins des *Crotalus viridis*, *adamanteus*, *atrox*, *horridus*, et d'*Agkistrodon piscivorus*, *contortrix mokasen*. La 5'-nucleotidase étant omniprésente dans des venins de serpents, cela suggère qu'elle ait un rôle central dans les envenimations.

A ses débuts, cette enzyme était définie comme étant plus active contre l'AMP, mais elle avait d'autres substrats. Elle est maintenant connue pour hydrolyser une grande variété d'autres riboses et désoxyriboses, y compris les 5'-AMP, 5'-IMP, 5'-UMP, 5'-CMP, 5'-GMP, 5'-dAMP, 5'-dTMP, 5'-dCMP, 5'-dGMP, mononucléotide de nicotinamide, et également plusieurs substrats hydroxylés, méthylés ou halogénés (Mizuno et al., 2000). Elle n'agit pas sur les riboses 5'-phosphate, ni sur l'AMP cyclique. Son activité est inhibée par l'EDTA mais stimulée par les cations divalents tels le zinc ou le cobalt.

En 1983, Ouyang et Huang ont rapporté que dans le plasma de lapin enrichi en plaquettes, l'agrégation induite par l'ADP est complètement inhibée par la 5'-nucleotidase et que cette enzyme empêche également l'agrégation induite par le collagène. Puis, en 1986, ces mêmes auteurs ont conclu que seule l'ADPase de venin empêche totalement l'agrégation induite par le collagène ou l'ADP et que la 5'-nucleotidase empêche l'agrégation induite par l'ADP seulement à hauteur de 31%.

La préférence de la 5'-nucleotidase de serpent pour la 5'-AMP suggère l'importance centrale de l'adénosine dans l'envenimation. La fonction première de cette enzyme serait de libérer l'adénosine et d'autres purines, et l'inhibition de l'agrégation plaquettaire serait une conséquence de cette libération d'adénosine. Les faibles concentrations d'adénosine trouvées dans les venins sont suffisantes pour empêcher l'agrégation dans le plasma humain enrichi en plaquettes. Cependant, des concentrations beaucoup plus élevées d'adénosine sont exigées pour produire le même effet sur du sang entier, vraisemblablement en raison de sa prise cellulaire rapide (Aird, 2002).

Il faut aussi noter que dans l'envenimation, la 5'-nucleotidase du venin n'est pas strictement responsable de la libération d'adénosine ou d'autres nucléosides. En effet, les ectoenzymes sont des enzymes incorporées à la membrane des cellules avec leurs sites actifs situés sur la surface externe de la cellule. Elles peuvent être libérées de la membrane par une phospholipase C spécifique et produire de l'adénosine. Tout comme les 5'-nucleotidases de venin elles empêchent l'agrégation plaquettaire (Kawashima et al., 2000).

2.5. Les antagonistes du récepteur au fibrinogène

Ces molécules, également appelées **désintégrines**, ont reçu une grande attention du fait de leur potentiel thérapeutique. Il s'agit d'une famille de polypeptides riches en ponts disulfures qui se lient aux récepteurs de la surface plaquettaire avec une affinité élevée. Ce sont des inhibiteurs spécifiques des intégrines β_1 et β_3 incluant le récepteur du fibrinogène GPIIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$), le récepteur de la vitonectine ($\alpha_v\beta_3$) et de la fibronectine ($\alpha_5\beta_1$). Bien qu'au départ les désintégrines ont été rapportées comme inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire elles sont à présent étudiées pour d'autres rôles car se lient aussi à la surface de nombreux types cellulaires ainsi que sur les cellules malignes.

Près de 50 désintégrines et leurs isoformes ont été purifiées à partir de différentes espèces de vipères. Leurs noms exotiques (kistrine, bitistatine, barbourine, echistatine, albolabrine, applagine, batroxostatine, flavoridine, trigramine, élégantine...) dérivent de celui du serpent chez lequel elles ont été isolées. De plus, certaines ont été clonées et synthétisées chimiquement (Markland F, 2005). La première désintégrine séquencée (1989-1990) fut la tigramine et depuis la liste ne cesse d'augmenter car de nouvelles protéines sont découvertes tous les ans.

Il y a trois sous groupes de désintégrines basés sur leurs tailles. Les petites désintégrines comportent 4 ponts disulfures et une simple chaîne polypeptidique de 49 à 51 acides aminés. Les moyennes ont 6 ponts disulfures et une chaîne de 68 à 73 acides aminés alors que les longues possèdent 7 ponts disulfures et une chaîne de 83 acides aminés (fig. 23).

Toutes les désintégrines contiennent une séquence Arg-Gly-Asp (RGD) à leur extrémité carboxyterminale (fig. 23), qui est essentielle à leur capacité de bloquer la liaison entre les intégrines et leurs ligands. La barbourine issue du venin de *Sistrurus m. barbouri* contient, elle, une séquence Lys-Gly-Asp (KGD) qui lui confère une haute affinité pour la GPIIb/IIIa. Le positionnement des ponts disulfures et du motif RGD est constant dans toutes les désintégrines répertoriées jusqu'à présent. De plus pour toutes les petites désintégrines, et pas les autres, un résidu de cystéine est placé uniquement du côté de l'extrémité carboxyterminale du motif RGD.

Les régions hors de la boucle RGD sont très conservées et peuvent présenter des fonctions additionnelles et/ou contribuer à la bonne présentation de la boucle. En effet, une réduction ou une alkylation de cette zone réduit fortement l'affinité des désintégrines pour les intégrines (Mion et al., 2002).

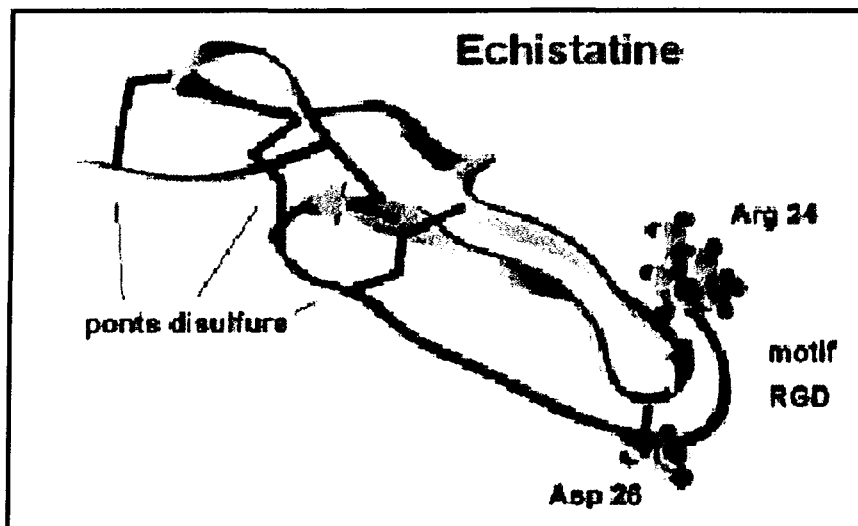


Figure 23 : la structure moléculaire de la plus petite des désintégrines : l'échistatine (Mion et al., 2002).

Les désintégrines dérivent de protéines multifonctionnelles beaucoup plus grandes. Le premier exemple de ce type de molécule fut HR1B (416 acides aminés) qui en plus d'un domaine désintégrine contenait un domaine aminoterminal présentant des homologies avec une famille de métalloprotéases solubles de venin ophidiens et une région carboxyterminale riche en cystéine.

Les gènes précurseurs de la kistrine, de la trigramine et de l'atrolysine sont aujourd'hui clonés. Les précurseurs de ces protéines présentent un peptide signal suivi d'une courte région de fonction inconnue, d'un domaine métalloprotéase et d'un domaine désintégrine. Dans les trois cas un codon stop termine la séquence décrite juste après le domaine désintégrine. En effet, le domaine carboxyterminal riche en cystéine de HR1B ne se retrouve pas dans la pro-kistrine, la pro-trigramine ou la pro-atrolysine. Il a donc été proposé que les métalloprotéases de venin et les désintégrines sont issues d'un clivage protéolytique d'une plus grosse protéine. On ignore encore si ces trois désintégrines sont synthétisées sous forme soluble ou libérées par protéolyse depuis un précurseur transmembranaire.

Un cas particulier se produit avec la piscivostatine du venin d'*Agkistrodon piscivorus*. C'est une désintégrine hétérodimérique qui contient les motifs RDG et KDG. Ses chaînes, de 65 et 67 acides aminés, ont des homologies entre elles et avec les autres désintégrines ophidiennes. La piscivostatine induit deux activités contradictoires en bloquant la liaison du fibrinogène à la GPIIb/IIIa et, quand cette liaison existe déjà, en la rendant irréversible (Okuda et al., 2000).

2.6. Autres inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire

Même si les désintégrines constituent la grande majorité des inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire d'autres molécules ont été mises en évidence. Parmi celles-ci nous pouvons citer la jararhagine, la catrocollastatine, la crovidisine et l'échicétine.

La **jararhagine** est une métalloprotéinase hémorragique de la classe P-III isolée du venin du *Bothrops jararaca* brésilien. C'est un membre de la famille des reprotéases (des zinc-métalloprotéases contenant un domaine catalytique suivi d'un domaine désintégrine-like et d'un domaine riche en cystéines).

L'impact de la jararhagine sur l'hémostase a été très étudié en utilisant des modèles *in vitro* et *in vivo* aussi bien que des études cliniques. L'hémorragie induite par la jararhagine résulte de sa capacité à agir à différents niveaux :

- elle dégrade des protéines de matrice endothéliales menant à la rupture de l'endothélium du vaisseau sanguin (domaine zinc-métalloprotéinase)
- elle inhibe l'agrégation plaquettaire induite par le collagène en se liant au domaine I de la sous unité $\alpha 2$ de l'intégrine de surface $\alpha 2\beta 1$ (récepteur du collagène) via son domaine désintégrine-like puis coupe la sous-unité $\beta 1$ de cette même intégrine, via son domaine protéinase
- elle agit directement sur le facteur Willebrand
- elle dégrade le fibrinogène

Son activité est renforcée par son incapacité d'être affecté par des inhibiteurs plasmatiques tels que l' α_2 -macroglobuline.

Bien que l'hémorragie et l'œdème soient une réponse directe à l'effet de la jararhagine, l'inflammation et la nécrose induites par celle-ci dépendent des macrophages et des cytokines pro-inflammatoires ou de leurs récepteurs.

Toutes les capacités de la jararhagine font d'elle un outil important pour la recherche sur les mécanismes d'action des toxines semblables, pour la compréhension des interactions cellulaires et pour des recherches cliniques sur le traitement des envenimations à partir du venin de *Bothrops jararaca*.

La **catrocollastatine** est aussi un antagoniste du collagène, elle est extraite du venin de *Crotalus atrox*. C'est une protéine multidomaines comprenant un domaine aminoterminal, un domaine métalloprotéinase, un domaine apparenté aux désintégrines et un domaine riche en cystéines à l'extrémité carboxyterminale. Les protéines de venins de serpents structurellement semblables à la catrocollastatine incluent la jararhagine, les Ht-a et Ht-e. Elles appartiennent à la famille des hémorragines de poids moléculaire élevé et toutes ont conservé un domaine désintégrine-like.

La catrocollastatine supprime totalement l'agrégation induite par le collagène mais n'a aucun effet sur l'agrégation induite par l'ADP ou un analogue de la thromboxane. Cela s'explique par le fait qu'elle se fixe directement sur le collagène, bloquant ainsi l'adhésion plaquettaire et par conséquent les réactions de sécrétions,

la formation du thromboxane. Elle n'affecte pas l'interaction entre le fibrinogène et la GP IIb/IIIa (Shimokawa et al., 1997).

Grâce à plusieurs techniques chromatographiques (gel liquide, haute pression avec phase inversée), un autre inhibiteur sélectif de l'agrégation plaquettaire induite par le collagène, appelé **crovidisine**, a été détecté à partir du venin de *Crotalus viridis*. La crovidisine a une activité inhibitrice sélective sur l'agrégation plaquettaire humaine induite par le collagène sans affecter celle obtenue par la thrombine, l'acide arachidonique ou l'ADP.

Des hydrolyses par la trypsine indiquent que sa séquence semble être identique à celle de la catrocollastatine. Son action est dose dépendante, déclenchée dès une concentration de 5 µg/ml. La réaction de sécrétion, la formation de thromboxane et l'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire en réponse au collagène sont totalement supprimées par la crovidisine alors que l'interaction entre les plaquettes et le fibrinogène est inchangée. Pour mieux comprendre son mécanisme d'action, un marquage de fibres de collagène à base de fluorescéine a été réalisé. L'émission de fluorescence indique que la crovidisine se lie directement aux fibres de collagène empêchant ainsi toute interaction avec les plaquettes (Liu et Huang, 1997).

Une nouvelle protéine a spécifiquement empêché l'agrégation des plaquettes induites par plusieurs agonistes de la GPIIb tels le facteur Willebrand bovin, les alboaggrégines et le facteur Willebrand humain en présence de bothrocétine. Elle est appelée **échicétine** car issue du venin d'*Echis carinatus*. A la différence des alboaggrégines, l'échicétine se lie au GPIIb mais n'induit pas l'agglutination des plaquettes libres ou fixées et contrairement aux désintégrines, elle ne joue pas sur l'agrégation induite par l'ADP en présence de fibrinogène. Son attache est sélectivement inhibée par un anticorps monoclonal dirigé contre un domaine de la GPIIb mais pas par les anticorps monoclonaux dirigés contre d'autres régions de GPIIb. La demi vie de l'échicétine dans le sang est approximativement 170 minutes. *In vivo*, chez la souris, elle prolonge significativement le temps de saignement suggérant qu'elle doit agir sur la GPIIb aussi bien qu'*in vitro* (Peng et al., 1994).

L'échicétine possède deux sous unités réunies par un pont disulfure (fig. 24). Sa séquence est totalement connue : elle comporte une séquence similaire à la botrocétine et à la protéine liant le complexe IXa/Xa pour sa sous unité β et aux lectines de type C pour sa sous unité α . De plus, il y a environ 50% d'homologie entre les deux sous unités.

Sa structure cristallographique a été élucidée. Les parties centrales des chaînes se rapprochent l'une de l'autre pour former une association serrée. Les parties restantes des chaînes des deux sous unités se plient de façon semblable aux lectines de type C. Un point particulier est le fait que dans l'échicétine, les sites de liaison du calcium ne sont pas présents, bien qu'en étant topologiquement équivalents à d'autres protéines liant le calcium. Les résidus Ser41, Glu43 et Glu47 que l'on trouve dans les protéines liant le calcium sont conservés mais les résidus Glu126/120 sont remplacés par la lysine (Jasti et al., 2004).

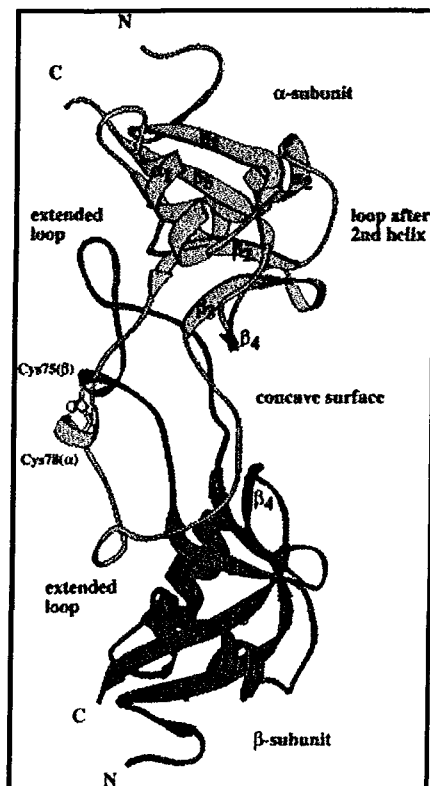


Figure 24 : structure globale de l'échicétine. La sous unité α est représentée en vert et la sous unité β en rouge. Les deux chaînes sont interconnectées par une liaison dissulfure entre Cys78-Cys75 en jaune (Jasti et al., 2004).

Molécule	Serpent	Structure	Cible
Les antagonistes de la GPIb			
GPIb-BP	<i>Bothrops jararaca</i>	lectine de type C	GPIb
Flavocétine A	<i>Trimeresurus flavoviridis</i>	ND	GPIb
Flavocétine B	<i>Trimeresurus flavoviridis</i>	ND	GPIb
Tokaracétine	<i>Trimeresurus tokarensis</i>	lectine de type C	GPIb
Agkisacutacine	<i>Agkistrodon acutus</i>	lectine de type C	GPIb FIX/X
Autres inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire			
Jararhagine	<i>Bothrops jararaca</i>	métalloprotéinase P-III	protéines endothéliales GPIIb/IIIa FW fibrinogène
Catrocollastine	<i>Crotalus atrox</i>	métalloprotéinase P-III	collagène
Crovidisine	<i>Crotalus viridis</i>	métalloprotéinase P-III	collagène
Echicétine	<i>Echis carinatus</i>	protéine apparentée aux lectines de type C.	GPIb

Tableau 6 : Les inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire.

Conclusion :

Comme nous venons de le voir, l'action des venins ophidiens sur les plaquettes est multiple tant par ses cibles que par ses mécanismes d'action. De plus, les protéines ophidiennes ont souvent plusieurs récepteurs et dans un même venin il peut y avoir présence d'agent pro et anti-agrégant.

Les activateurs de l'agrégation plaquettaire peuvent se diviser en trois grands groupes avec les enzymes à action directe sur les plaquettes, les composés non enzymatiques à action directe ainsi que les composés interagissant avec le FW.

Parmi le premier groupe on distingue des enzymes thrombine-like, il s'agit de sérine protéinases de structure et d'actions proches de celles de la thrombine, et des phospholipases A_2 . La cérastocytine et la cérastobine sont deux enzymes thrombine-like qui ont été beaucoup étudiées. Elles servent à présent d'outils pharmacologiques car elles permettent de décomposer et donc de mieux comprendre le mécanisme d'action de la thrombine. Les phospholipases A_2 sont quant à elles des sources de TXA_2 , puissant agent pro-agrégant.

Les composés non enzymatiques se dirigent quant à eux plus particulièrement vers une glycoprotéine membranaire. La convulxine se lie au récepteur plaquettaire du collagène et induit la transduction du signal de l'agrégation de façon similaire à celui-ci. En la purifiant davantage il se pourrait qu'elle devienne un agent thérapeutique.

Les composés interagissant avec le FW et la GPIIb ont trouvé leur place dans la description du mécanisme d'activation plaquettaire ainsi que dans les relations structure-activité de cette glycoprotéine. On distingue, dans un premier temps, les composés agissant directement sur le FW. La botrocétine et la bitiscétine en sont les meilleurs exemples, elles se lient au domaine A1 du FW. La botrocétine est d'ailleurs utilisée aujourd'hui pour le diagnostic de la maladie de Von Willebrand et le syndrome de Bernard Soulier. Dans un second temps, les protéines ayant pour cible le récepteur du FW : la GPIIb comme les alboaggrégines ou le TSV-GPIIb-BP.

Parmi les inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire, les désintégrines (antagonistes de la GPIIb/IIIa) occupent la place principale à côté des antagonistes de la GPIb, des métalloprotéinases P-III, α fibrinogénases, PLA₂, 5' nucléotidases.

Près de 50 désintégrines et leurs isoformes ont été purifiées à partir de différentes espèces de vipères, certaines ont été clonées et synthétisées chimiquement. Toutes les désintégrines contiennent une séquence Arg-Gly-Asp (RGD) à leur extrémité carboxyterminale (fig. X), qui est essentielle à leur capacité de bloquer la liaison entre les intégrines et leurs ligands. Il semble qu'elles dérivent de protéines multifonctionnelles beaucoup plus grandes. En bloquant certains récepteurs de l'adhésion cellulaire les désintégrines permettent d'inhiber des mécanismes biologiques tels que l'agrégation plaquettaire mais aussi l'adhésion cellulaire, la migration cellulaire. Diverses études ont mis en évidence une activité potentielle de ces désintégrines dans le traitement des maladies cardiovasculaires, des maladies liées à la résorption osseuse (ostéoporose) et dans le contrôle du phénomène métastatique (cancer). Nous y reviendrons plus en détails dans la dernière partie.

Parmi les antagonistes de la GPIb, on peut citer la GPIb-BP qui bloque ce récepteur et donc les effets du FW mais qui n'empêche pas l'agrégation induite par l'ADP ou la thrombine ; les flavocétines A et B dont les actions divergent en fonction de leurs concentrations ; l'agkisacutine qui est la première protéine apparentée aux lectines de type C ayant une action à la fois sur les récepteurs membranaires plaquettaires et les facteurs de la coagulation et l'echicétine qui se lie à un domaine spécifique de GPIb et dont la structure est singulière.

Des protéines ophidiennes sont aussi capables d'inhiber l'adhésion et donc l'agrégation des plaquettes en se liant au collagène et en empêchant toute action de sa part. C'est le cas pour la catrocollastatine et la croidisine.

Enfin l'agrégation plaquettaire peut être inhibée par des protéines multifonctionnelles. Prenons comme exemple la jararhagine qui bloque puis dégrade le récepteur au collagène plaquettaire mais également détruit la matrice endothéliale, agit sur le facteur FW et dégrade le fibrinogène. Tous ces effets témoignent de la gravité lors d'une morsure de *Bothrops jararaca*.

C. Action des venins sur la coagulation

Les venins de serpents, en particulier des familles Vipéridés et Elapidés, contiennent un grand nombre de composants qui interagissent avec les protéines de la cascade de coagulation et de la voie fibrinolytique. Chaque espèce de serpent ne comporte pas toutes les activités suivantes dans son venin, mais les activités énumérées ci-dessous ont été décrites dans le venin d'au moins une espèce de serpent. Leurs activités sont précisées dans la figure 25.

1. Protéines à activité coagulante

1.1. Les activateurs du facteur V

Le venin de la vipère de Russel (*Daboia russell* ou auparavant *Vipera russellii*) contient une sérine protéinase activatrice du facteur V qui peut être séparée de la protéine activatrice du facteur X également présente dans ce venin. Cette enzyme, la **RVV-V**, augmente l'activité du facteur V humain de 20 à 26 fois alors qu'une augmentation de 2 à 4 fois a seulement été obtenue dans des conditions semblables avec un activateur du facteur V bovin.

RVV-V agit sur le facteur V au niveau d'un seul acide aminé (Arg1545) par comparaison à l'activation de la thrombine qui a pour cible trois liaisons peptidiques possibles (Arg709, Arg1018 et Arg1545). Dans les deux cas, pour que l'activité soit totale la présence du cofacteur Va est exigée (Rosing et al., 1997). Cela s'explique par sa structure car il y a environ 68 % d'homologie entre RVV-V et la batroxobine, une enzyme thrombine-like issue du venin de *Bothrops atrox*, et 33% avec la chaîne β de la thrombine humaine.

L'activité de la RVV-V n'est pas modulée par l'antithrombine III, ni par la présence ou l'absence d'héparine (Tokunaga et al., 1988) ; elle reste stable même lors d'un traitement thermique à 90-95°C pendant 15 minutes, sur une gamme de pH de 1 à 7 ce qui lui procure un intérêt et un potentiel considérable.

En vertu de son activation sélective du facteur V, RVV-V peut être employée comme réactif pour l'analyse courante du facteur V dans le plasma. Cette utilisation de RVV-V reste cependant limitée. Elle peut aussi être employée pour définir l'importance fonctionnelle des sites de clivage sur le facteur V naturel et sur le facteur V issu d'une recombinaison (Keller et al., 1995). Plus récemment, la découverte d'un variant génétique du facteur V a conduit à une renaissance d'intérêt pour ce facteur, sa participation dans la thrombophilie et sa résistance face à la protéine C activée (Rosing et al., 2001).

Un autre activateur du facteur V appelé **VLFA** pour *Vipera lebetina* factor V activator hydrolyse plusieurs substrats synthétiques d'ester d'arginine, tels que l'ester éthylique de benzoylarginine (BAEE), l'ester méthylique de tosylarginine (DOCILE) et des substrats amidés tels que Pro-Phe-Arg-MCA. Hormis le facteur V, aucun autre substrat protéique n'a encore été identifié. VLFA est une protéine thermostable, une exposition pendant 20 minutes à 70°C ne change pas l'activité d'estérase d'arginine de l'enzyme (Siigur et al., 1998).

Une autre sérine protéase ayant pour cible le facteur V inactivé a été extraite du venin de *Bothrops atrox*. Cette enzyme, appelée la **thrombocytine**, est principalement un inducteur de l'agrégation plaquettaire. Dans une moindre mesure, elle active également le facteur V, les facteurs VIII et XIII et possède une très faible action sur le fibrinogène (Niewiarowski et al., 2000).

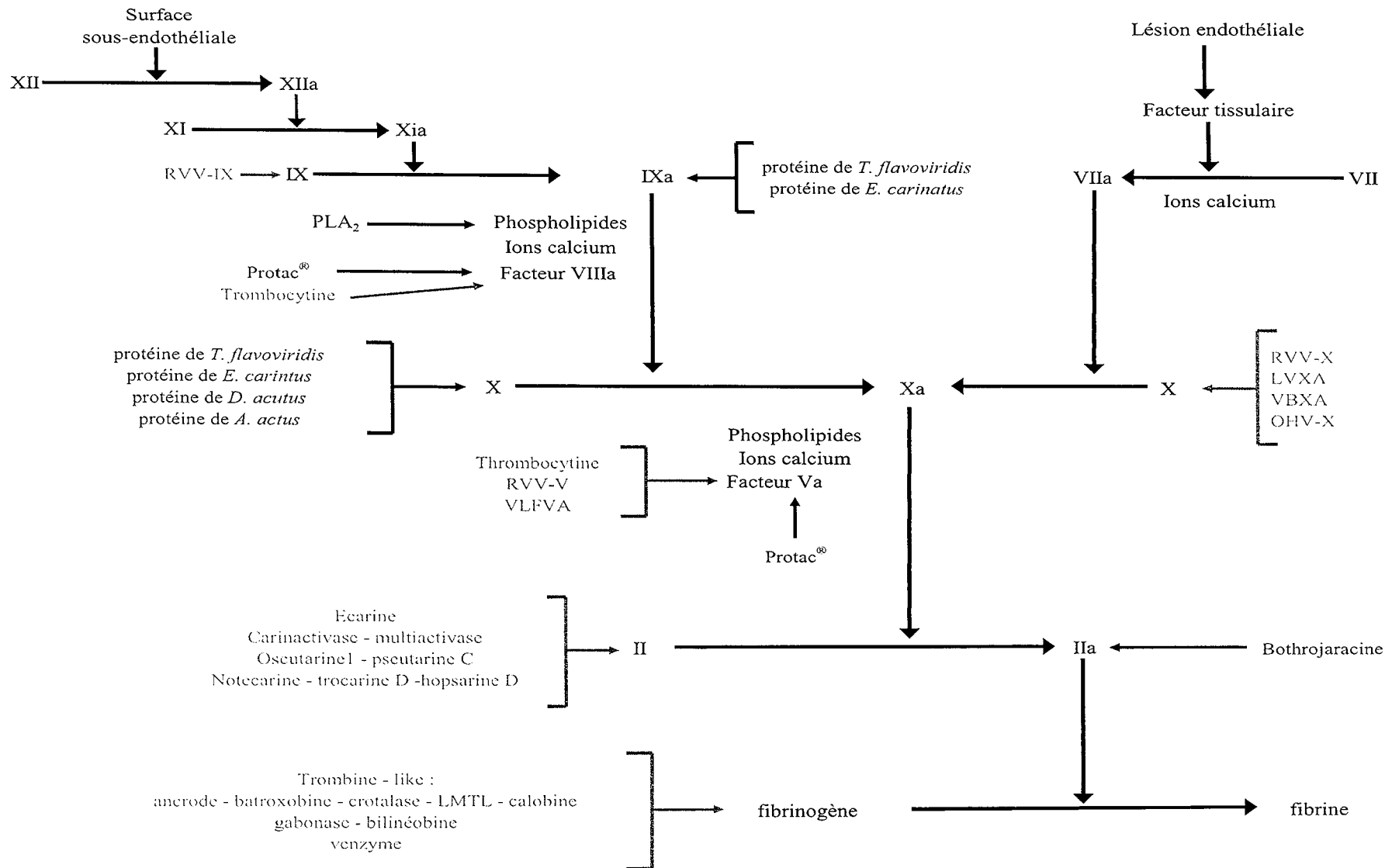


Figure 25 : Action de différentes protéines de venins de serpent sur la coagulation.

1.2. Les activateurs du facteur X

Le venin de la vipère de Russel contient également un activateur du facteur X humain, **RVV-X**, qui est bien caractérisé. RVV-X est une glycoprotéine comprenant trois chaînes reliées par des ponts disulfures (Takeya et al., 1992). La chaîne lourde de RVV-X se compose de domaines métalloprotéinase, apparentés aux désintégrines et de domaines riches en cystéines tandis que les chaînes légères ressemblent aux lectines de type C.

RVV-X identifie la conformation du site de liaison du calcium du domaine Gla du facteur X (acides aminés de 1 à 44) par l'intermédiaire d'une de ses sous unités puis la conversion du facteur X en facteur Xa est catalysée par la sous unité lourde. Il peut également activer le facteur IX et la protéine C par des mécanismes catalytiques semblables, mais sa capacité à activer le facteur IX et la protéine C est très faible (Morita T., 2005).

L'activation du facteur X par le RVV-X exige la présence de calcium à des concentrations millimolaires. Des études de fluorescence intrinsèque ont révélé que ce cofacteur participe à un changement conformationnel de l'enzyme (Morita T., 2005).

Vipera russellii n'est pas la seule vipère à posséder des activateurs du facteur X. On en a également trouvé dans les venins de *Vipera lebetina* (**VLXA**) et de *Vipera berus* (**VBXA**). VLXA et VBXA sont inactifs sur des substrats protéiques synthétiques, la caséine, la prothrombine et le fibrinogène. Ils semblent agir spécifiquement sur le facteur X. VLXA existe sous de multiples formes moléculaires distinctes par leurs points isoélectriques. Aucune différence fonctionnelle n'a été mise en évidence entre ces formes. La différence dans leurs points isoélectriques peut être provoquée par des dissimilitudes dans leurs teneurs respectives en hydrates de carbone. VLXA est semblable à l'activateur du facteur X du venin de *Vipera russellii* en ce qui concerne sa taille, la structure de ses sous-unités et sa spécificité de substrat. VBXA en diffère au niveau de la taille et a une activité spécifique inférieure (Siigur et al., 2001).

Des activateurs du facteur X ont également été isolés des venins d'Elapidés, du cobra royal (*Ophiophagus hannah*) et de *Bungarus fasciatus*. Mais dans ces cas l'activateur du facteur X est une sérine protéinase, alors que RVV-X, comme nous venons de le voir, est une métalloprotéase. Prenons l'exemple de OHV-X. **OHV-X** est un activateur du facteur X issu du venin de cobra royal. Il n'a aucune capacité à activer les substrats naturels tels le fibrinogène, la prothrombine, la protéine C et le plasminogène humains. Par analyses électrophorétiques, on a vu que tel les activateurs physiologiques du facteur X, OHV-X rompt la liaison peptidique entre les acides aminés 51 et 52 sur la chaîne lourde du facteur X et produit ainsi le facteur Xa. Aucun autre site de clivage n'a été observé (Lee et al., 1995).

1.3. Les activateurs du facteur IX

Toujours dans le venin de la vipère de Russel, une protéine est capable d'activer le facteur IX sans qu'il y ait changement de son poids moléculaire. Ceci diffère de l'activation du facteur IX par le facteur XIa dans la cascade de la coagulation qui implique le départ d'un peptide et une réduction du poids moléculaire du facteur IXa (Markland F., 1998).

1.4. Les activateurs de la prothrombine (facteur II)

Lorsque la prothrombine est activée par le facteur Xa, en présence du facteur Va, de phospholipides et de calcium, deux liaisons peptidiques sont rompues. Cette protéolyse se déroule en deux temps avec tout d'abord une action sur la liaison Arg273-Thr274 puis sur celle Arg322-Ile323.

Les activateurs ophidiens de la prothrombine montrent certaines similitudes et différences avec les activateurs trouvés *in vivo*. En se basant sur leurs caractéristiques fonctionnelles ainsi que sur leurs propriétés et les cofacteurs requis lors de l'activation de la prothrombine ils ont été classés en quatre groupes. (Rosing et Tans, 1992, Kini et al., 2001).

Classe	Cofacteurs requis	Type de protéinase	Produit	Exemples
Groupe A	aucun	Métalloprotéinase	Meizothrombine	Ecarine
Groupe B	Ca ²⁺	Métalloprotéinase	Meizothrombine	Carinactivase, multactivase
Groupe C	Ca ²⁺ -phospholipides	Sérine protéinase	Thrombine	Oscutarine, pseutarine C
Groupe D	Ca ²⁺ -phospholipides - FVa	Sérine protéinase	Thrombine	Notécarin, trocarine D, hopsarine D, noténarine D

Tableau 7 : Classification des activateurs de la prothrombine de venins de serpent (Kini, 2005).

1.4.1. Groupe A des activateurs de la prothrombine.

Il s'agit de métalloprotéinases qui activent efficacement la prothrombine sans la nécessité d'un quelconque cofacteur (tableau 7). Elles convertissent directement la prothrombine en meizothrombine (par la rupture de la liaison peptidique Arg322-Ile323), laquelle est ensuite convertie en thrombine par autocatalyse. La meizothrombine est un intermédiaire qui a le même poids moléculaire que la prothrombine mais qui possède une activité enzymatique vis à vis des substrats de faibles poids moléculaire. Ces activateurs sont trouvés dans plusieurs venins de vipère et jouent vraisemblablement un rôle de toxines puisqu'ils sont résistants aux inhibiteurs naturels de la coagulation, les serpinines, telle que l'antithrombine (Yamada et al., 1996).

L'activateur le plus connu du groupe A est l'**écarine**. Son ADN a été récemment cloné et la séquence complète de ses acides aminés a été déduite. La protéine mature est une métalloprotéinase qui montre une homologie de 64% avec la chaîne lourde de RVV-X. L'écarine se compose de trois domaines : un domaine métalloprotéinase, un domaine désintégrine-like et un domaine riche en cystéine (fig. 26). En plus de la prothrombine, l'écarine peut activer la décarboxyprothrombine qui s'accumule dans le plasma durant une thérapie par la warfarine (Kini, 2005).

Du point de vue de sa formation, la "pro-écarine" semble contenir une séquence dite pour la conversion de cystéine. C'est un mécanisme commun avec d'autres métalloprotéinases ophidiennes et mammifères qui semble nécessaire à la synthèse de l'enzyme active.

D'autres activateurs de la prothrombine de cette classe, par exemple ceux isolés de l'espèce *Bothrops*, ont des propriétés semblables. Leurs détails structuraux ne sont toujours pas disponibles.

1.4.2. Groupe B des activateurs de la prothrombine

Les activateurs de la prothrombine du groupe B agissent sur les deux liaisons de la prothrombine. Yamada et ses collaborateurs, en 1996, isolèrent et caractérisèrent la **carinactivase-1**, un autre activateur de la prothrombine du venin d'*Echis carinatus*. Contrairement à l'écarine et aux autres membres du groupe A, cette protéinase est dépendante du calcium pour son activité (tableau 7).

La carinactivase-1 possède en plus de l'écarine une sous unité apparentée aux lectines de type C reliée au domaine métalloprotéinase par une liaison non covalente (fig. 26). Cette sous-unité apparentée aux lectines de type C est homologue à celle de la protéine liant le complexe IX/X du venin de *Trimeresurus flavoviridis* (Morita, 2005). La carinactivase-1 identifie la conformation du site de liaison du calcium sur le domaine Gla de la prothrombine par l'intermédiaire de sa sous-unité apparentée aux lectines de type C, puis la conversion de la prothrombine en thrombine est catalysée par son domaine métalloprotéinase. A la différence de l'écarine, elle n'active pas les dérivés de la prothrombine.

Peu de temps après la carinactivase-1, Yamada et Morita, en 1997, ont rapporté la présence d'un autre activateur de la prothrombine, la **multactivase**, dans le venin d'*Echis multisquamatus* qui possède des propriétés très semblables.

1.4.3. Groupe C des activateurs de la prothrombine

Il s'agit là de sérine protéinases exclusivement trouvées dans les venins de quelques Elapidés australiens. Elles exigent des ions calcium et des phospholipides chargés négativement, mais pas le FVa, pour que leur activité soit maximale (tableau 7). Elles ont été purifiées et caractérisées à partir des venins de *Oxyuranus scutellatus* (Speijer et al., 1986) et de *Pseudonaja textilis* (Rao et Kini, 2002). Ce sont des activateurs de la prothrombine de poids moléculaire élevé (>250 kDa) avec de multiples sous unités.

En 2002, Rao et Kini isolèrent la **pseutarine C** du venin de *Pseudonaja textilis*. Cette enzyme possède une activité procoagulante puissante sur le plasma humain et bovin. Elle convertit la prothrombine en thrombine mature en l'hydrolysant au niveau des liaisons Arg273-Thr274 et Arg322-Ile323, ce qui correspond à la même spécificité d'action que le FXa.

La pseutarine C est un complexe protéique multimérique (fig. 26). Des analyses chromatographiques avaient jusqu'à présent permis de séparer des sous unités enzymatiques et non enzymatiques. Seule la sous unité catalytique, la plus petite, étant active dans ces conditions. En 2003, Kini et ses collaborateurs ont découvert sa séquence ADN ce qui ouvre de nouvelles perspectives.

La séquence aminoterminal de la sous unité catalytique indique une similitude avec le FXa de mammifères et celle de la sous unité non catalytique montre, quant à elle, une similitude de 50% avec le FV de mammifères. La sous unité non enzymatique se trouve sous sa forme active lors de sa complexation avec le FXa-like du venin (Rao et Kini, 2002).

Dans la coagulation humaine, en plus de son action sur la prothrombine, le FXa agit également sur le FV, grâce à son Arg situé à la position 348. Cet emplacement est conservé sur la pseutarine C ce qui lui confère la même propriété. Toujours dans la coagulation humaine, le FVa est inactivé après avoir effectué son rôle procoagulant par protéolyse via la protéine C activée. Cette enzyme agit au niveau des Arg306, Arg506 et Arg679. Sur la pseutarine C deux des trois sites, Arg 679 et l'Arg306, ne sont pas conservés (Rao et al., 2003) elle est donc peu sensible à cet inhibiteur. Comme la sous-unité non enzymatique de la pseutarine C forme un complexe avec le FXa-like du venin pour être active, elle est moins accessible et protégée d'une autre façon contre l'inactivation. La résistance de la pseutarine C face à la protéine C lui donne alors un avantage supplémentaire dans son rôle toxique.

Le genre *Oxyuranus* inclut trois des plus grands et des plus craints des Elapidés australiens : *Oxyuranus scutellatus scutellatus*, *Oxyuranus microlepidotus* et *Oxyuranus scutellatus canni*. Le venin d' *Oxyuranus scutellatus* contient un activateur de la prothrombine du groupe C, l'**oscutarine**, ainsi qu'un activateur du facteur VII (Nakagaki et al., 1992).

L'oscutarine est un activateur multimérique composé de quatre sous unités dont une sous unité montrant une activité semblable au facteur V, une sous-unité semblable au facteur X et soit l'une soit les deux contiennent le site actif. Les études prouvent que l'oscutarine coagule le plasma citraté, les plasmas déficients en facteurs V et X et le plasma contenant de la warfarine, et qu'elle converti la prothrombine humaine purifiée en thrombine (Welton et Burnell, 2005).

1.4.4. Groupe D des activateurs de la prothrombine

Ce sont également des sérine protéinases trouvées, jusqu'ici, exclusivement dans les venins d'Elapidés australiens par exemple dans les venins de *Notechis scutatus*, *Tropidechis carinatus*, *Hoplocephalus stephensi*, *Notechis ater Niger*, *Pseudechis porphyriacus*. Leurs activités sont fortement stimulées par l'addition d'ions calcium, de FVa et des phospholipides chargés négativement. Plusieurs activateurs de la prothrombine de ce groupe ont été purifiés et caractérisés.

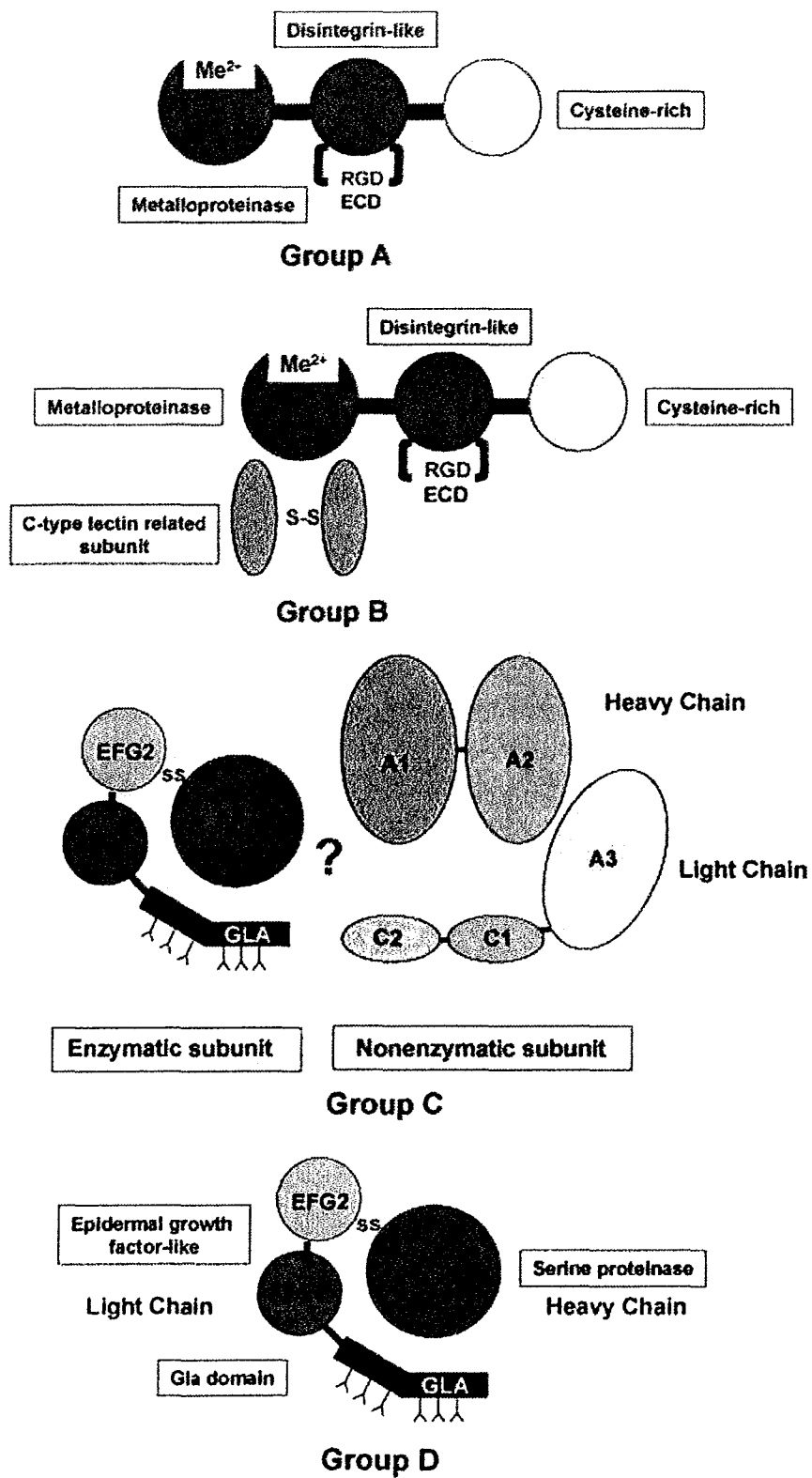


Figure 26 : Représentation schématique des structures des différents activateurs de la prothrombine des venins ophidiens (Kini, 2005).

La **trocarine D** est l'activateur le mieux étudié de ce groupe. Elle représente 5% de la part protéique totale du venin. Sa capacité à activer la prothrombine est augmentée d'environ quatre fois par l'addition des trois cofacteurs. Elle hydrolyse les mêmes liaisons peptidiques (Arg274-Thr275 et Arg323-Ile324) sur la prothrombine que le FXa. Elle est ainsi fonctionnellement semblable au FXa de mammifères.

Sa séquence complète et sa structure sont totalement connues. Elle possède deux chaînes (fig. 26) ; une chaîne légère qui contient un domaine Gla suivi de deux domaines EGF-like et une chaîne lourde qui contient un domaine sérine protéinase. Ces deux chaînes sont reliées par un simple pont disulfure. A la différence du FXa de mammifère, il s'agit là d'une glycoprotéine car la chaîne légère est O-glycosylée sur la Ser52, tandis que la chaîne lourde est N-glycosylée sur l'Asn45 (Rao et al., 2003). Parmi les protéines étroitement liées, seul le FVII est O-glycosylé sur la Ser52.

La trocarine agit en tant que toxine semblable, si non identique, au FX et joue un rôle critique dans l'hémostase. Chez la souris, à la concentration de 1 mg/kg de poids corporel, elle induit la cyanose et la mort.

Parmi les autres activateurs de la prothrombine du groupe D, ayant les mêmes propriétés on peut citer l'hopsarine D, la notécarine, la noténarine D. Par le biais de leurs domaines EGF-like, ces protéines ont peut-être aussi un rôle inflammatoire et mitogène (Joseph et al., 2003).

1.5. Les enzymes agissant sur le fibrinogène (**enzymes thrombine-like**)

Bien que la thrombine ait beaucoup d'activités, la capacité d'un groupe d'enzymes de venins de serpents à agir sur le fibrinogène a eu pour conséquence leur appellation d'enzymes thrombine-like. Ces enzymes sont largement distribuées, principalement dans le venin des serpents de *Bitis gabonica*, *Cerastes vipera*, *Agkistrodon contortrix*, *Crotalus adamanteus*, *Bothrops atrox*... Plusieurs groupes existent, ils sont classés en fonction des taux de libération des fibrinopeptides A et B.

Un groupe libère préférentiellement le fibrinopeptide A, il s'agit du groupe venombin A. Un autre groupe libère à la fois les fibrinopeptides A et le B; c'est le groupe venombin AB. Enfin le troisième groupe libère préférentiellement le fibrinopeptide B, il s'agit du groupe venombin B. Les enzymes thrombine-like, en particulier celles du groupe venombin A, ont été purifiées à partir de près de 40 espèces différentes de serpents. Etudions plus en détails ces trois groupes.

1.5.1. Venombin A

Le groupe des enzymes libérant le fibrinopeptide A est représenté par trois protéines bien caractérisées : l'**ancrode** issue du venin de *Calloselasma rhodostoma* (aussi appelé *Agkistrodon rhodostoma*), la **batroxobine** issue du venin de *Bothrops atrox* et la **crotalase** issue du venin de *Crotalus adamentus* (tableau 8).

Un point commun à ces trois enzymes est le fait qu'elles agissent sur la chaîne A α du fibrinogène au niveau de la liaison peptidique Arg16-Gly17 libérant ainsi le fibrinopeptide A et permettant la conversion du fibrinogène en caillot de fibrine. Elles diffèrent toutes de la thrombine de plusieurs manières, notamment par le fait qu'elles n'agissent que sur la libération du fibrinopeptide A, qu'elles n'activent pas les facteurs de coagulation et qu'elles n'agrègent pas les plaquettes (Soutar et Ginsberg, 1993).

Toutes les trois sont des sérine protéinases. La teneur en hydrates de carbone change considérablement entre les enzymes, ce qui explique les différences dans leurs masses moléculaires. Elles possèdent aussi une activité estérase envers de petits substrats tels que l'ester éthylique de benzoyle-L-arginine. Leurs activités d'agent coagulant et d'estérase ont été bloquées par des inhibiteurs des sérine protéinases tels que le diisopropylfluorophosphate. L'ancrode et la batroxobine sont également inactivées par l' α 2-macroglobuline. En raison des similitudes de structure, on suppose que la crotalase l'est aussi.

Comme indiqué précédemment, les enzymes du groupe venombin A sont toutes des sérine protéinases qui permettent *in vivo* la formation d'un caillot de fibrine. Il s'avérerait que le mécanisme par lequel les enzymes produisent un stade

bénin de défibrinogénéation implique la formation d'un caillot anormal, qui est soluble dans l'urée à 5 moles/litre ou dans l'acide monochloroacétique à 1%. Cela contraste avec les caillots de thrombine qui sont solidifiés par le facteur XIII et sont insolubles dans ces solvants.

Dans les minutes qui suivent l'administration de ces enzymes ophidiennes, il y a une diminution de la concentration du fibrinogène plasmatique et dans l'heure suivante le niveau du fibrinogène devient très bas et demeure ainsi. Le fibrinogène peut être maintenu à de basses concentrations par des administrations répétées sur la journée ou deux fois par jour. Chez quelques patients, le fibrinogène a même pu être maintenu à de faibles concentrations pendant sept semaines. Après l'arrêt de l'administration de ces enzymes il y a un lent rétablissement des concentrations de fibrinogène (Bell, 1990).

Si les enzymes de défibrinogénéation de venin sont employées sur une période prolongée ou s'il y a nécessité d'une utilisation répétée, on constate une perte d'activité enzymatique due au développement d'une résistance immunologique par le patient. De façon surprenante, comme le montre des études avec des anticorps spécifiques, il n'y a aucune réaction immunologique croisée entre l'ancrode et la batroxobine (Markland F., 1998).

L'ancrode et la batroxobine devraient pouvoir remplacer des thérapies anticoagulantes utilisées jusqu'à présent. Elles ont ainsi été testées en tant qu'agents de défibrinogénéation dans la thrombose veineuse profonde, l'infarctus du myocarde, l'embolie pulmonaire, l'occlusion veineuse rétinienne centrale, l'ischémique aiguë, l'angine de poitrine, la glomérulonéphrite, le priapisme, le rejet de greffon rénal... Elles ont également été employées en combinaison avec les agents thrombolytiques sur des modèles de thrombose artérielle canins. De ces études on en a conclu que la batroxobine empêche la réocclusion des artères coronaires tandis que l'ancrode augmente l'effet des agents thrombolytiques au niveau carotidien (probablement en épuisant les ressources de fibrinogènes et en empêchant la propagation des thrombi existants).

L'ancrode est aussi capable de diminuer la viscosité de sang suite au déficit en fibrinogène et d'améliorer les caractéristiques de la circulation sanguine. Cette propriété peut malheureusement être le danger de la thérapie. Cependant, les risques de saignement et les complications peuvent être contrôlés par la connaissance des contre-indications, des dosages de contrôle soigneux et la surveillance quotidiennement de la concentration de fibrinogène. Nous y reviendrons plus en détail dans la dernière partie de ce document.

Une autre enzyme thrombine-like, appelée **élégaxobine**, a été extraite du venin de *Trimeresurus elegans*. Elle coagule seulement le fibrinogène de lapin, elle n'a aucune action sur les fibrinogènes humain et bovin (Oyama et Takahashi, 2000).

L'enzyme thrombine-like de *Lachesis muta* (**LM-TL**) est une sérine protéase qui rompt préférentiellement des liaisons Arg-Gly des chaînes α du fibrinogène. Cette enzyme de coagulation libère le fibrinopeptide A pour effectuer la conversion du fibrinogène en fibrine, se comportant ainsi comme un analogue de la thrombine, mais elle hydrolyse également des substrats synthétiques avec une spécificité semblable à la trypsine. Comme prévu, la séquence d'acides aminés de cette protéase est identique à 38% à la thrombine et à 52% à la trypsine. La LM-TL montre également un degré élevé d'homologie (60-66%) avec d'autres protéases de veninsophidiens telles que la batroxobine et l'ancrode.

Comme les études utilisant la séquence primaire de cette enzyme ne peuvent détecter tous les résidus essentiels à son activité, une structure tridimensionnelle pourrait servir de guide à l'identification de ces résidus. Etant donné l'absence courante de structure cristalliques des enzymes thrombine-like ophidiennes, une approche combinée de modèles moléculaires et d'analyses sur la coagulation a été mise en place pour étudier les conformations possibles de la LM-TL (Castro et al., 2001). Le but étant là encore de faire des progrès pharmacologiques et thérapeutiques.

En 1996, Hahn et ses collaborateurs isolèrent et copièrent le gène d'une autre enzyme thrombine-like, la **calobine**. Au cours de sa purification, un deuxième type de protéase a été trouvé, appelé calobine II. Elle agit sur le fibrinogène pour former

de la fibrine avec une activité spécifique. Sa séquence aminoterminal primaire est connue, elle est conforme à celle de la calobine et montre une homologie élevée avec l'ancrode, la batroxobine et la gyroxine (Cho et al., 2001).

1.5.2. Venombin AB

Le groupe venombin AB comprend des enzymes libérant les fibrinopeptides A et B. Parmi celles-ci on trouve la **gabonase** (tableau 8) issue du venin de la vipère du Gabon ou *Bitis gabonica*. Son action procoagulante est principalement déclenchée par la rupture de la liaison peptidique entre Arg16-Gly17 proche de l'extrémité aminoterminal de la chaîne A α du fibrinogène, libérant le fibrinopeptide A. Le fibrinopeptide B est libéré plus lentement par la rupture de la liaison Arg15-Gly16 proche de l'extrémité aminoterminal de la chaîne B β . Aucun autre site n'a pu être détecté. La gabonase, comme la thrombine, active le facteur XIII en présence des composants de la coagulation. L'activité de l'enzyme est stabilisée par les ions calcium, inactivée par le chlorométhane tosyl-L-lysique mais pas par l'hirudine ou l'héparine (Markland F., 1998).

Une autre enzyme thrombine-like, la **bilinéobine**, catalyse l'hydrolyse des esters d'arginine et des substrats de la thrombine. Les fibrinopeptides libérés lors de l'hydrolyse par cette protéinase ont été identifiés par spectrographie de masse, il s'agit du fibrinopeptide A et du fibrinopeptide B. L'étude cinétique de la libération des fibrinopeptides indique que l'enzyme a une préférence pour la chaîne B. De plus, elle est résistante aux inhibiteurs de la thrombine tels que l'hirudine. Cela suggère que le mécanisme d'action de la bilinéobine est semblable mais non identique à celui de la thrombine. Du point de vue structure, sa région aminoterminal présente des similitudes significatives avec celles des autres enzymes thrombine-like de venins ophidiens. Cependant, seulement trois résidus sont communs avec la thrombine jusqu'au résidu 24 (Komori et al., 1993, Castro et al., 2001).

Propriété	Enzyme				
	Ancrode	Batroxobine	Crotalase	Gabonase	Venzyme
Source de venin	<i>C. rhodostoma</i>	<i>B. atrox</i>	<i>C. adamanteus</i>	<i>B. gabonica</i>	<i>A. contortrix</i>
Poids moléculaire	35 400	36 000	32 700	30 600	64 000
Point isoélectrique	4,2 - 6,2	6,6	4,6 après désialysation	5,3	ND
Carbohydrate	36,0%	5,8%	8,3%	20,6%	ND
Fibrinopeptides libérés	A	A	A	A, B	B > A
Dégradation du fibrinogène	Chaîne A α	Non	Chaîne B β	Non	ND
Inhibiteur	α 2 macroglobuline	α 2 macroglobuline	ND	ND	inhibiteur de trypsine de soja
Activité estérase	esters d'acides aminés basiques	esters d'acides aminés basiques	esters d'acides aminés basiques	esters d'arginine	esters d'arginine
Site actif	sérine	sérine	sérine	sérine	sérine
Activation du FXIII	Non	Non	Non	Oui	Non
Stabilité	stable	stable	stable	stable avec calcium	instable à la chaleur (60°C)

Tableau 8 : Caractéristiques des enzymes agissant sur le fibrinogène (Markland F. , 1998).

1.5.3. Venombin B

La troisième classe des enzymes thrombine-like, le groupe Venombin B, est représentée par une enzyme issue du venin d'*Agkistrodon contortrix*. Cette enzyme, appelée la **venzyme** (tableau 8), libère le fibrinopeptide B beaucoup plus rapidement que le fibrinopeptide A et coagule le fibrinogène seulement après une incubation prolongée. L'enzyme hautement purifiée n'agrège pas les plaquettes ni n'active le facteur XIII. Elle hydrolyse de petits esters d'arginine (Markland F., 1998).

2. Protéines à activité anticoagulante

Dans les venins de différents serpents, une activité anticoagulante a été rapportée et les protéines responsables ont été purifiées dans un certain nombre de cas. L'action anticoagulante des protéines ophidiennes est attribuée à plusieurs mécanismes, ils sont représentés dans la figure 25.

2.1 Les activateurs de la protéine C

Rappelons que, physiologiquement, la protéine C est un zymogène qui est activé par la thrombine liée à une molécule épithéliale (la thrombomoduline). La protéine C activée, la forme protéolytique de l'enzyme, inactive les facteurs Va et VIIIa ayant ainsi une action anticoagulante. Ce processus est étroitement régulé. *In vitro*, la voie de la protéine C peut être rapidement déclenchée par quelques protéases ophidiennes appelées les activateurs de la protéine C (**PCAs**).

L'activité des activateurs de la protéine C a été rapportée la première fois dans le venin d'*Agkistrodon contortrix contortrix* en 1985. Il s'agit d'un glycopeptide capable d'activer la protéine C dans le plasma de l'Homme et de divers vertébrés. La conversion de la protéine C en protéinase active a été démontrée en mesurant la prolongation du temps de thromboplastine et par la mesure directe de l'activité enzymatique au moyen d'un substrat chromogène synthétique. Les venins des différentes sous-espèce d'*Agkistrodon* (*contortrix*, *piscivorus*, *bilineatus*) contiennent des activateurs de la protéine C semblables (Nakagaki et al., 1990).

L'analyse fonctionnelle de la protéine C est problématique car son activation par la thrombine peut être incomplète et cette dernière peut interférer dans les analyses chromogènes. Ces problèmes ont été résolus grâce à l'activateur de la protéine C du venin d'*Agkistrodon contortrix contortrix*, efficace et d'action rapide, commercialisé sous le nom de Protac® (Pentapharm). Protac® est souvent utilisé pour l'analyse de l'activation de la protéine C par des méthodes chromogènes directes et indirectes, la recherche de déficience congénitale en protéine C... Une nouvelle version (ProC Global®, Dade-Behring, Marburg, Allemagne) a identifié avec succès tous les porteurs du facteur V Leiden ainsi que les patients présentant une pré-éclampsie (Toulon et al., 2000).

La voie de la protéine C est étudiée dans un but diagnostique et thérapeutique et dans un besoin d'améliorer les analyses cliniques. Pour ce faire, l'activateur de la protéine C doit être fiable et facile à produire. Plusieurs études se sont alors concentrées sur la production de recombinants d'activateurs par *Pichia pastoris*. Aujourd'hui ce processus est bien établi, il produit des sérines protéases recombinantes avec succès (Kunes et al., 2002).

2.2. Les inhibiteurs des facteurs IX/X

Une protéine se liant au facteur IX ou au facteur X en présence de calcium et empêchant leur participation dans la cascade de coagulation a été isolée dans le venin de *Trimeresurus flavoviridis*. Cette protéine a pour cible les résidus d'acide glutamique à l'extrémité aminoterminal de ces facteurs. La liaison du calcium à cette protéine semble être possible à deux emplacements avec des affinités différentes, elle induit un changement conformationnel (Sekiya et al., 1995). Sa séquence aminée est très proche de celle de la botrocétine, une protéine du venin de *Bothrops jararaca*, qui est un activateur de l'agrégation plaquettaire. Ainsi, en dépit d'un degré élevé de similitudes structurales, ces deux protéines ophidiennes ont des activités biologiques distinctes.

Des protéines semblables ont également été isolées dans d'autres venins. Par exemple, une protéine de liaison aux facteurs IX et X a été isolée dans le venin d'*Echis carinatus* (Chen et Tsai, 1996).

Le venin de *Deinagkistrodon acutus* contient une série de protéines anticoagulantes inhibant la prothrombinase avec notamment un inhibiteur du facteur X. Il n'a aucune activité enzymatique discernable et se lie au facteur Xa en présence de calcium, l'empêche de participer au complexe d'activation de la prothrombine. Une analyse portant seulement sur l'activité de la prothrombinase a révélé que l'inhibition de ce complexe par ce venin a lieu aussi bien sur le plasma de bovins, de lapins, de rat que d'humains. Cette action est dose dépendante. Comme cet inhibiteur n'inhibe pas seulement le facteur Xa, mais qu'il bloque les autres combinaisons de la conversion de la prothrombine, on en a conclut que cette protéine empêche la liaison du complexe FX/FVa aux phospholipides de surfaces plaquettaires et la conversion de la thrombine. Cet inhibiteur bloque également l'activation du facteur X par le facteur VIIa et la thromboplastine. Il n'a aucun effet sur la coagulation induite par la thrombine ou la fibrinolyse induite par l'activateur du plasminogène ou la streptokinase. Cela lui confère plusieurs propriétés exigées pour être un bon agent thérapeutique (Cox A., 1993).

Une protéine anticoagulante appelée **AaACP** a été isolée dans le venin d'*Agkistrodon acutus*. AaACP empêche la coagulation plasmatique induite par le facteur Xa, d'une façon dépendante de sa concentration. Elle semble se lier au facteur Xa dans le complexe de la prothrombinase. Cette protéine est composée de deux chaînes A et B liées par un ou plusieurs ponts disulfures. La comparaison des nucléotides de l'ADN codant pour chaque chaîne d'AaACP et de la protéine liant les facteurs IX/X de *Trimeresurus flavoviridis* (Viperidé) a prouvé que la région codant pour la protéine mature est beaucoup plus variable que le domaine du peptide signal (contrairement à se qui est trouvé d'ordinaire). Tenant compte des diversités fonctionnelles des protéines ophidiennes on peut supposer qu'elles ont été acquises par une évolution accélérée (Tani et al., 2002).

2.3. L'inhibiteur de la thrombine

Un unique inhibiteur de la thrombine a été extrait du venin de *Bothrops jararaca*. C'est la seule protéine de ce type découverte jusqu'ici à partir d'un venin de serpent. Cet inhibiteur, appelé la **bothrojaracine**, forme un complexe équimolaire non covalent avec la thrombine l'empêchant d'agir sur plusieurs de ces substrats macromoléculaires.

La bothrojaracine appartient à la famille des lectines de type C, elle se compose de deux chaînes polypeptidiques reliées par un pont disulfure. Les séquences des acides aminés de ces deux chaînes montrent une similitude considérable avec les deux chaînes de la botrocétine, un agent d'agrégation plaquettaire du venin de *Bothrops jararaca*.

Dans un même venin la bothrojaracine peut se trouver sous différents isoformes et en dépit des différences quantitatives, il n'y a aucune différence qualitative dans la production des isoformes. On peut aussi trouver de la bothrojaracine dans les venins d'autres serpents (Monteiro et al., 1998).

La bothrojaracine est un inhibiteur spécifique de l'agrégation et de la sécrétion plaquettaire induites par la thrombine. Elle prolonge également le temps de coagulation en empêchant compétitivement la liaison de la thrombine au fibrinogène. Elle empêche la liaison de la thrombine à la thrombomoduline et diminue ainsi le taux d'activation de la protéine C par la thrombine. Toutes ces actions indiquent qu'elle se lie à la fois à l'exosite 1 et à l'exosite 2 de la thrombine. Ceci a permis d'expliquer que le taux d'inhibition de la thrombine par le complexe antithrombineIII/héparine est significativement diminué en présence de bothrojaracine (concurrence entre la bothrojaracine et l'héparine pour l'exosite 2) et que la liaison de la thrombine au fibrinogène est bloquée (participation de l'exosite 1).

De plus, la bothrojaracine interagit spécifiquement avec la prothrombine dans le plasma humain. C'est un anticoagulant efficace après l'activation de la voie intrinsèque. L'analyse de la conversion de la prothrombine dans le plasma prouve

que la bothrojaracine réduit fortement la formation de thrombine. Pour déterminer si cet effet est dû exclusivement à l'inhibition des réactions de rétroaction impliquant l'activation des facteurs V et VIII par la thrombine, l'effet de la bothrojaracine sur l'activation de la prothrombine purifiée du venin d'*Oxyuranus scutellatus* a été analysée (Monteiro et Zingali, 2000). Il a été conclut que la bothrojaracine exerce son effet d'anticoagulant par deux mécanismes distincts:

- elle se lie à la thrombine produite et empêche les activités dépendantes de l'exosite 1 telles que la coagulation du fibrinogène et l'activation du FV.
- elle interagit avec la prothrombine et son activation protéolytique.

Comme la bothrojaracine peut être utile pour la recherche des inhibiteurs de la thrombine des recherches ont été lancées. Les venins de six espèces de *Bothrops* (*atrox*, *cotiara*, *jararacussu*, *moojeni*, *neuwiedi* et *jararaca*), de *Lachesis muta* et de *Crotalus durissus terrificus* ont été analysés afin de mettre en évidence la présence de protéines bothrojaracine-like. Ce sont des protéines immunologiquement liées à la bothrojaracine qui empêchent l'agrégation plaquettaire induite par la thrombine. L'examen immunologique (utilisation d'un sérum anti-bothrojaracine) de ces venins indique l'existence d'au moins une protéine bothrojaracine-like dans tous ces venins. Elles ont été purifiées de tous les venins bruts, excepté celui de *Crotalus durissus terrificus*. Elles sont retrouvées dans une proportion différente pour chaque espèce (Castro et al., 1999).

L'utilisation anticorps anti-bothrojaracine a mis en évidences des protéines d'un poids moléculaire plus élevé. Ce pourrait être des précurseurs de la bothrojaracine : des métalloprotéinases avec un domaine lectine de type C ou des tétramères, des hexamères de lectine de type C.

2.4. Les phospholipases A₂

Les venins de serpents sont riches en phospholipases A₂ (PLA₂) et ils contiennent souvent plusieurs isozymes. Par exemple, les venins de *Naja naja*, *Daboia russelli*, *Trimeresurus flavoviridis*, *Austrelaps superbis* et *Pseudechis australis* contiennent plus de 10 isozymes de PLA₂. Jusqu'à présent, plusieurs centaines de PLA₂ de venins de serpents ont été purifiées et caractérisées.

En dépit de similitudes dans leurs structures primaires, secondaires et tertiaires et de propriétés catalytiques communes, elles induisent des effets variés (neurotoxiques, hémolytiques, anticoagulants, antiplaquettaires, cardiotoxiques, myotoxiques, convulsifs, œdémateux) et causent des effets tissulaires préjudiciables. Ce qui rend les relations structure-activité et le mécanisme d'action de ce groupe de petites protéines à la fois complexes et intrigants.

Les complexes prothrombinase et tenase comportant des phospholipides, une première hypothèse stipulait que les phospholipases de venins pourraient empêcher la formation de ces complexes en dégradant leurs phospholipides (Ouyang et al., 1992). On suggérait que l'action anticoagulante résultait de la formation d'un complexe hydrolytique entre une phospholipase et la phosphatidylsérine à la surface des plaquettes. Mais on a ensuite prouvé que l'activité enzymatique peut être séparée de l'activité anticoagulante donc que la liaison aux phospholipides plutôt que leur hydrolyse intrinsèquement puisse expliquer l'effet anticoagulant.

Les phospholipases ont été classées selon leur action en tant que fortement, faiblement ou non anticoagulantes (Subburaju et Kini, 1997). Les PLA₂ fortement anticoagulantes agissent sur la coagulation à faible concentration (2 µg/ml). Elles incluent les venins de *Naja nigricollis*, *Naja mossambica*, *Vipera berus orientalis*, *Daboia russelli*, *Agkistrodon halys blomhoffi*, *Crotalus durissus terrificus*. Les enzymes faiblement anticoagulantes ont montré des effets entre 3 et 10 µg/ml. Les phospholipases de *Naja mossambica*, *Naja nigricollis*, *Agkistrodon halys blomhoffi*, *Enhydrina schistosa* (myotoxine) et *Oxyuranus scutellatus* appartiennent à ce groupe. Plusieurs PLA₂ ont peu d'effet sur le temps de coagulation même à des concentrations supérieures à 15 µg/ml. Elles incluent le venin de *Naja mossambica*, *Naja naja*, *Naja melanoleuca*, *Agkistrodon halys blomhoffi*, *Hemachatus haemachatus*, *Bitis gabonica*, *Crotalus admanteus*, *Crotalus durissus terrificus*, *Vipera aspis*, *Notechis liscutatus*, *Bungarus multicinctus*...

Les anticoagulants puissants inhibent à la fois les complexes tenase et prothrombinase, tandis que les PLA₂ au pouvoir anticoagulant plus faible inhibent seulement le complexe tenase. Les anticoagulants puissants se lient au facteur Xa et interfèrent dans son interaction avec le FV et par conséquent sur la formation du

complexe prothrombinase. De plus, ils agissent sur le complexe tenase par une combinaison de mécanismes enzymatiques et non-enzymatiques. Les PLA₂ au pouvoir anticoagulant plus faible agissent uniquement par un mécanisme enzymatique. Ces différences fonctionnelles expliquent la disparité dans le pouvoir anticoagulant des phospholipases d'un même venin.

Les PLA₂ humaines se lient elles aussi au facteur Xa et empêchent la formation du complexe prothrombinase. En établissant une comparaison des séquences aminées humaines et ophidiennes ainsi qu'en utilisant des méthodes de mutagenèse la région anticoagulante de l'enzyme a pu être déterminée. En utilisant des substrats synthétiques, il a été confirmé que les PLA₂ ophidiennes fortement anticoagulantes se lient au facteur Xa (la protéine cible) via cette région. En revanche, les enzymes faiblement anticoagulantes, qui sont dépourvues de la région anticoagulante ne peuvent se lier spécifiquement au facteur Xa. C'est donc bien l'interaction protéine-protéine plutôt que l'interaction protéine-phospholipide qui détermine la spécificité pharmacologique des enzymes PLA₂ (Kini R., 2005).

Conclusion

Les venins de Vipéridés et d'Elapidés sont sources de protéines capables d'interagir sur la cascade de la coagulation à la fois de manière pro et anticoagulantes.

Parmi les protéines à activité coagulante, les activateurs du facteur V et du facteur X sont aujourd'hui bien caractérisés tant au niveau de leur structure qu'au niveau de leur action. RVV-V est même utilisé à des fins d'analyse du facteur V et de diagnostic de la thrombophilie.

Les activateurs de la prothrombine sont nombreux. Ils ont été classés en quatre groupes selon leurs caractéristiques fonctionnelles et les cofacteurs requis. Par exemple, l'écarine produit de la thrombine en agissant sur une seule liaison peptidique et ne nécessite pas de cofacteur (groupe A) ; la pseutarine C agit sur deux liaisons peptidiques et nécessite des ions calcium ainsi que des phospholipides chargés négativement pour que son activité soit maximale (groupe C).

Les enzymes agissant sur le fibrinogène ou enzymes thrombine-like sont elles aussi largement distribuées. Elles ont été séparées en trois classes en fonction des taux de libération des fibrinopeptides A et B. Le groupe des venombin A contient l'ancrode, la batroxobine et la crotalase qui sont actuellement étudiées à des fins thérapeutiques.

Les protéines à activité anticoagulante sont représentées par les activateurs de la protéine C (un inhibiteur physiologique de la coagulation qui inactive les facteurs Va et VIIIa), les inhibiteurs des facteurs IX/X, l'inhibiteur de la thrombine et les phospholipases A₂.

L'activateur de la protéine C du venin d'*Agkistrodon contortrix contortrix*, est à présent commercialisé sous le nom de Protac® (Pentapharm). Protac® est utilisé pour l'analyse de l'activation de la protéine C par des méthodes chromogènes directes et indirectes, la recherche de déficience congénitale en protéine C...

Pour l'instant, la botrojaracine, est le seul inhibiteur de la thrombine. Elle est extraite du venin de *Bothrops jararaca*. Elle forme un complexe équimoléculaire avec la thrombine, bloque les deux exosites de cette dernière, l'empêchant d'agir sur ses substrats habituels. Elle inhibe également sur la conversion de la prothrombine en thrombine. Vu son potentiel pharmacologique, des recherches ont été lancées à la recherche de protéine bothrojaracine-like.

Les venins ophidiens sont riches en phospholipases A₂ (PLA₂) et ils en contiennent souvent plusieurs isozymes. Elles ont pour cibles les phospholipides des complexes tenase et prothrombinase, le facteur Xa. Il existe une disparité dans le pouvoir anticoagulant des phospholipases d'un même venin qui serait d'origine fonctionnelle. Ainsi les PLA₂ fortement anticoagulante agissent sur le complexe tenase par une combinaison de mécanismes enzymatiques et non-enzymatiques. Les PLA₂ au pouvoir anticoagulant plus faible agissent uniquement par un mécanisme enzymatique.

D. Action des venins sur la fibrinolyse

Des enzymes fibrinolytiques, à action directe, ont été isolées dans le venin de plusieurs serpents du nord et du sud de l'Amérique ; notamment des serpents à sonnettes. Ces enzymes ont également été purifiées à partir des venins d'Elapidés (certains cobras), et des vipères européennes (Markland F., 1998). Elles sont, une fois encore, très nombreuses et nous aborderons seulement quelques enzymes caractéristiques. Leurs actions sont récapitulées dans la figure 27.

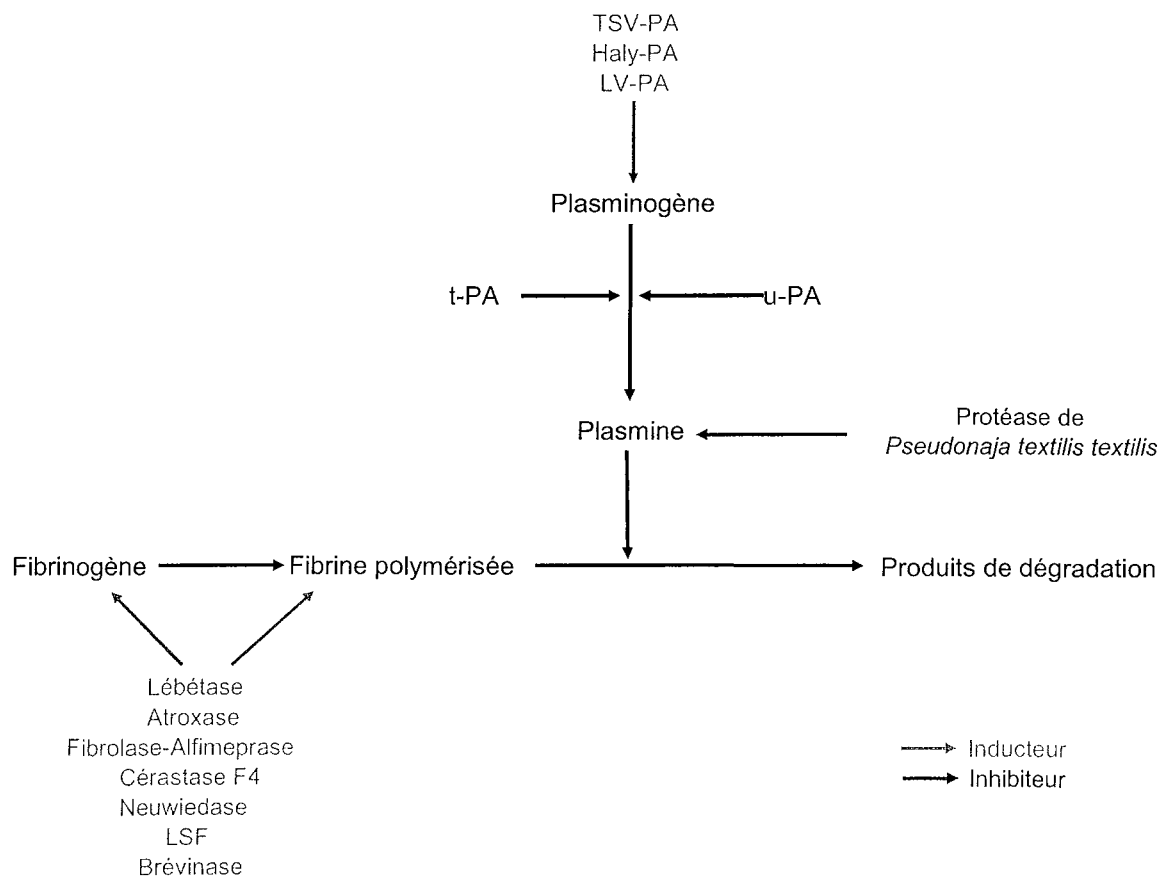


Figure 27 : Action de différentes protéines de venins de serpent sur la fibrinolyse.

1. Les protéinases fibrinolytiques

Lors de l'envenimation, le serpent a besoin d'un mécanisme facilitant la diffusion des composants toxiques dans toute la circulation. Ce rôle est assuré par les enzymes fibrin(ogène)olytiques qui décomposent les caillots riches en fibrine et empêchent la formation de nouveaux caillots par leur action sur le fibrinogène. Dans un inventaire datant de 1998, Markland a décrit 67 enzymes à action fibrin(ogène)olytique, purifiées à partir de différents venins ophidiens. Toutes ces enzymes ont une action directe et ne requièrent pas de composants enzymatiques sanguins pour leur activité. La majorité de ces enzymes sont extraites du venin de serpents asiatiques (22/67), nord-américains (23/67), et d'une famille de Crotalidés d'Amérique centrale et du sud (10/67).

Deux classes distinctes d'enzymes fibrin(ogène)olytiques ophidiennes ont alors été identifiées : les métalloprotéinases (46/67) et les sérine protéinases. Ces deux classes de protéinases diffèrent de par leur mécanisme d'action et le fait qu'elles visent différents acides aminés sur le fibrin(ogène), mais chacune exécute le même rôle. Ces enzymes diffèrent sensiblement de la plasmine qui est aisément inactivée par les inhibiteurs des sérine (ou serpins). De plus, la plasmine agit sur les liaisons peptidiques de l'extrémité carboxyterminale, au niveau des résidus de lysine sur les chaînes α , β ou γ du fibrin(ogène), emplacements distincts de ceux choisis par les enzymes fibrin(ogène)olytiques de venin.

Les enzymes fibrin(ogène)olytiques extraites de venins ophidiens peuvent aussi être classées en tant que fibrin(ogène)ases de la chaîne α ou β car jusqu'ici il n'y a eu pratiquement aucun rapport d'une enzyme spécifique de la chaîne γ du fibrinogène. La spécificité pour la chaîne α ou β n'est pas absolue puisqu'il y a une dégradation substantielle de la chaîne alternative avec l'augmentation du temps de contact, nous ne retiendrons donc pas cette classification.

1.1. Métalloprotéinases

Plusieurs des enzymes fibrinolytiques de venin ophidien récemment caractérisées sont des zinc-métalloprotéinases. Ce sont des membres de la famille des metzincines décrite par Stocker en 1995. Les membres de cette famille incluent des métalloprotéinases dégradants la matrice chez les mammifères (les matrixines), des métalloprotéinases bactériennes (les serralysines), et les astacines y compris une enzyme collagénolytique du système digestif, aussi bien que les métalloprotéinases de venin (adamalysines). Le site de liaison au zinc révèle une séquence commune d'acides aminés chez les différents membres de cette famille de métalloprotéinases : HEBXHBGBXHZ, où H est histidine, E est acide glutamique, G est glycine, B est un résidu hydrophobe encombrant, X est n'importe quel acide aminé, et Z est différent dans chacune des quatre sous familles mais il est toujours conservé. L'intérêt pour la classe des enzymes de venin a nettement augmenté lorsqu'on a déterminé la structure tridimensionnelle du premier membre de cette famille, l'adamalysine.

L'**adamalysine** est une métalloprotéinase de 24 kDa issue du venin *Crotalus adamanteus*. Elle contient un atome de zinc et un atome de calcium par molécule. Cette enzyme dégrade des inhibiteurs de protéinases humains tels l'antithrombine III et l' α 1-antitrypsine. Bien qu'elle ne possède pas l'activité fibrinolytique, elle sert de prototype structural tridimensionnel aux enzymes fibrin(ogène)olytiques et hémorragiques avec lesquelles elle partage une identité étendue de séquence. Par exemple la fibrolase, l'enzyme fibrinolytique du venin d'*Agkistrodon contortrix*, montre une homologie d'environ 59% avec l'adamalysine.

Les métalloprotéinases fibrin(ogène)olytiques sont apparemment stockées dans la glande à venin en tant que zymogènes inactifs et activées par un mécanisme de commutation de cystéine semblable à celui décrit pour les hémorragines de *Crotalus atrox*, de la toxine hémorragique e (Ht-e) et de l'adamalysine. Dans ce mécanisme un résidu thiol conservé, sur une cystéine de la proséquence du zymogène, se lie à l'emplacement de la liaison de l'atome de zinc bloquant de ce fait

la fonction enzymatique. Après un traitement protéolytique, par un mécanisme non encore élucidé mais pouvant être autolytique, le thiol est déplacé et l'enzyme active est produite.

Les séquences aminées de plusieurs enzymes fibrinolytiques ont été récemment déterminées. Pour ce faire, elles ont été alignées suivant le positionnement, invariable, de la Cys 118 et des résidus actifs (141 et 151), qui incluent deux des trois résidus d'histidine obligatoires pour la liaison à l'atome de zinc. La troisième histidine impliquée dans l'attache du zinc est le résidu 153.

En 1991, Siigur et Siigur isolèrent, du venin de *Vipera lebetina*, la **lébétase**, une métalloprotéinase fibrinolytique. Cette enzyme a une action directe, elle dégrade la chaîne A α du fibrinogène légèrement plus rapidement que la chaîne B β (tableau 9). Elle n'a aucune action sur le plasminogène. Son rôle d'anticoagulant est renforcé par le fait qu'elle empêche l'agrégation plaquettaire. La lébétase possède une faible activité hémorragique.

L'analyse de sa séquence indique que la pro-protéine contient un motif de commutation de cystéine suggérant un mécanisme d'activation semblable à celui utilisé par les métalloprotéinases de matrice et les métalloprotéinases hémorragiques de venin. Deux isoformes de lébétase ont été isolés : la lébétase I (22,719 Da, PI 5,0) et la lébétase II (22,912 Da, PI 5,3). Ils possèdent une action semblable sur la rupture du fibrinogène et de la fibrine.

Les deux isoformes sont inhibés par l' α_2 macroglobuline humaine. Il s'agit d'un inhibiteur de protéinases plasmatiques capable d'empêcher l'activité de la plupart des membres des quatre classes des protéinases (aspartique, métallique, sérine et cystéine protéinases). Son action sur les protéinases est exercée par un mécanisme unique de piégeage moléculaire suivi de la sortie rapide du complexe hors de la circulation.

Une autre enzyme fibrin(ogène)olytique du venin de *Vipera lebetina* dégrade légèrement le plasminogène ou la prothrombine. Contrairement à la lébétase, cette métalloprotéinase dégrade la chaîne β du fibrinogène légèrement plus rapidement

que la chaîne α . Cette enzyme dégrade aussi les chaînes de la fibrine rapidement, et semble dégrader la chaîne γ après une incubation prolongée (24 h). Elle inhibe l'agrégation plaquettaire dans un plasma humain enrichi en plaquettes et a été employée comme agent thrombolytique dans un modèle veineux de thrombose de rat (Gasmi et al., 1997). Elle n'est pas hémorragique.

L'**atroxase**, isolée dans le venin de *Crotalus atrox*, est une métalloprotéinase exempte de toute activité hémorragique. Elle possède une activité fibrinolytique *in vitro* et *in vivo*. La solubilisation de la fibrine se produit principalement par l'hydrolyse d'un polymère α et de monomères solubles α et β (tableau 9). L'enzyme rompt également la chaîne $A\alpha$ du fibrinogène, suivie de la chaîne $B\beta$ et ne montre aucun effet sur la chaîne γ . Bien que le venin brut induise l'agrégation plaquettaire, l'atroxase est incapable d'induire ou d'empêcher l'agrégation. L'administration intraveineuse d'atroxase à une concentration de 6,0 mg/kg provoque une thrombolyse dans un délai d'une heure (Tu et al., 1996).

Propriété et activité	<i>Vipera lebetina</i>	<i>Crotalus atrox</i>	<i>Agkistrodon contortrix</i>
Nom commun	lébétase	atroxase	fibrolase
Poids moléculaire	23 700	23 500	23 000
Point isoélectrique	4,6-5,4	9,6	6,8
Pourcentage carbohydrate	2,40%	/	/
Activité hémorragique	+ à forte concentration	/	/
Activité fibrinogénolytique	$A\alpha > B\beta$	$A\alpha > B\beta$	$A\alpha > B\beta$
Activité fibrinolytique	α et β	α et β	$\alpha > \beta$
Inhibiteurs	EDTA	EDTA	EDTA
Activité plaquettaire	non déterminée	aucune capacité à induire ou inhiber l'agrégation	aucune activité activatrice ou inhibitrice <i>in vitro</i>

Tableau 9 : propriétés d'enzymes fibrinolytiques de venin de serpent (Markland F., 1998)

La **fibrolase** est une métalloprotéinase contenant une mole de zinc par mole de protéine. Elle a une action directe et agit préférentiellement sur la chaîne $A\alpha$ du fibrinogène à la position Lys413-Leu414. Elle agit également la chaîne de $B\beta$ à un taux plus bas (tableau 9), elle n'active ni ne dégrade le plasminogène. De plus, elle n'active pas la protéine C et ne possède pas l'activité coagulante thrombine-like. Elle ne possède pas non plus d'activité hémorragique que ce soit *in vitro* (Guan et al., 1991) ou *in vivo* (Markland et al., 1996). Elle existe sous au moins deux isoformes

distincts comme démontré par CLHP. La différence entre ces isoformes se situe dans la région aminoterminale car un des isoformes possède deux résidus Gln tandis que l'autre n'en a qu'un. Ce changement mineur de la structure primaire de la protéine n'a aucun effet apparent sur l'activité enzymatique car les deux isoformes possèdent une activité identique sur plusieurs substrats et ils sont tous deux inhibés par des agents de chélation.

Un modèle de structure tridimensionnel de la fibrolase a été créé en se basant sur les structures connues d'autres métalloprotéases : l'adamalysine et l'atrolysine C. Il y a trois liaisons dissulfures dans la fibrolase comparé à deux liaisons pour les autres (fig. 28). Le site actif comprend les acides aminés entre les résidus 140-166 et inclut trois histidines impliquées dans la liaison du zinc.

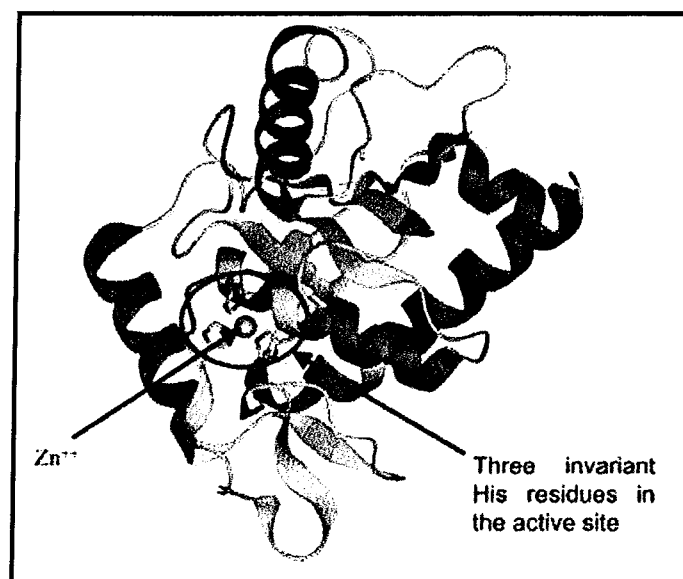


Figure 28 : structure tridimensionnelle de la fibrolase (Swenson et al., 2005).
Le site actif s'étend des acides aminés 139 à 159 et contient l'atome de zinc (flèche) qui est complexé à 3 résidus d'Histidine (cercle)

Bien que structurellement très semblables certaines enzymes possèdent l'activité fibrinolytique seule ou l'activité fibrinolytique et hémorragique. Il n'y a, à présent, aucune différence de séquence aminée qui explique la capacité d'induire l'hémorragie. Seuls davantage de modèles et les analyses tridimensionnelles pourront indiquer les différences structurales subtiles qui distinguent ces deux groupes d'enzymes étroitement liés (Swenson et al., 2005).

Plusieurs études ont indiqué que la fibrolase hautement purifiée aboutit à une thrombolyse rapide et consistante. L'action directe de cette enzyme se produit indépendamment du système fibrinolytique endogène et offre un mécanisme sûr, effectif, rapide, et spécifique pour la dissolution de caillots. Elle peut s'avérer utile comme alternative ou pour l'usage dans une combinaison synergique aux agents thrombolytiques actuellement utilisés. L'absence d'altérations physiologiques attribuables à son origine démontre les promesses d'utilisation de cette enzyme ophidienne pour l'usage clinique.

Récemment, l'**alfiméprase**, une forme tronquée de la fibrolase produite par recombinaison a été produite par *P pastoris* et testée, au stade II, dans des épreuves cliniques (Toombs C., 2001). Les activités *in vivo* et *in vitro* de cette molécule se sont avérées identiques à celles de la fibrolase. En plus, l'alfiméprase est, comme la fibrolase, efficacement liée et neutralisée par l' α_2 macroglobuline. Les études *in vivo* avec l'alfiméprase prouvent que la lyse du caillot est jusqu'à 6 fois plus rapide que celle observée avec les activateurs du plasminogène. Le fait que cette enzyme soit inhibée par l' α_2 macroglobuline lui apporte un avantage par rapport aux activateurs du plasminogène limitant de ce fait les complications potentielles de saignements systémiques dus à la thrombolyse et à la protéolyse non réprimées.

Une autre enzyme anticoagulante, la **cérastase F-4**, du venin de *Ceraste ceraste* a été purifiée et caractérisée. Elle hydrolyse aisément la chaîne A α du fibrinogène puis elle hydrolyse la chaîne B β . La chaîne γ est relativement résistante à l'hydrolyse. Elle dégrade également les chaînes de la fibrine à différents taux. Les produits de dégradation des deux substrats trouvés sur le gel SDS-polyacrylamide sont tout à fait différents de ceux produits par la plasmine, indiquant des sites d'hydrolyse différents. En utilisant des substrats chromogènes spécifiques il a été montré que la cérastase F-4 ne semble pas avoir d'action thrombine-like, plasmine-like, kallikréine-like, antithrombine ou antiplasmine. On a alors conclu que la propriété anticoagulante de l'enzyme purifiée est due à sa destruction du fibrinogène. Elle possède également une faible activité hémorragique.

Parmi les autres métalloprotéinases découvertes on peut citer l'enzyme du venin d'*Agkistrodon contortrix* qui dégrade seulement les chaînes A α du fibrinogène et vraisemblablement de la fibrine ; deux enzymes fibrin(ogène)olytiques du venin de *Crotalus basiliscus* qui dégradent les chaînes du fibrinogène approximativement au même taux, bien qu'avec la fibrine la vitesse de la dégradation de chaîne A soit plus rapide que celle de la chaîne B (Retzios et Markland, 1994). La fibrin(ogène)nase de *Naja nigricolis* qui semble dégrader seulement la chaîne α ou un polymère α du fibrinogène et de la fibrine. Le clivage semble avoir lieu dans la région carboxyterminale (Kini et Evans, 1991) et le fibrinogène ainsi digéré est encore coagulable par la thrombine.

Depuis ces six dernières années quatre nouvelles enzymes (tableau 10) ont été trouvées : trois métalloprotéases et une sérine protéase.

En 2000, Rodrigues et ses collaborateurs ont identifié la **neuwiedase**, une métalloprotéase non hémorragique, issue du venin de *Bothrops neuwiedi*. Cette enzyme a une activité préférentielle vers la chaîne de A α du fibrinogène mais une activité contre la chaîne de B β a également été détectée. La neuwiedase montre une activité protéolytique limitée envers les composants de la matrice extracellulaire, et son potentiel hémorragique est faible (Rodrigues et al., 2000). Cette enzyme partage approximativement un même niveau d'homologie (70%) avec des métalloprotéinases hémorragiques et non-hémorragiques, mais elle est unique parce qu'aucune autre enzyme fibrinolytique non hémorragique n'a été précédemment identifiée dans le genre *Bothrops*.

D'autres investigateurs ont permis d'isoler et de caractériser une métalloprotéinase non hémorragique du venin d'*Agkistrodon halys brevicaudus* (Terada et al., 1999) appelée la **brévilysine L6**. Comme avec la majorité des autres métalloprotéinases fibrinolytiques de venin cette enzyme contient le motif obligatoire HEXXHXXGXXH des metzincines. En ce qui concerne la spécificité de substrat de cette protéine, elle coupe efficacement la chaîne B β du fibrinogène mais elle a peu ou pas d'activité sur la chaîne A α .

Propriétés	fibrinogénase chaîne α	fibrinogénase chaîne α	fibrinogénase chaîne α	fibrinogénase chaîne β
Source (genre espèce)	<i>Bothrops neuwiedi</i>	<i>Agkistrodon halys brevicaudus</i>	<i>Lachesis stenophrys</i>	<i>Agkistrodon blomhoffi brevicaudus</i>
Nom commun	Neuwiedase	Brévilysine L6	LSF	Brévinase
Résidus d'acides aminés par molécule	198	203	200	233 en tout (hétérodimère)
Poids moléculaire	22,524 Da	22,713 Da	24,000 Da	25,725 Da (total des 2 chaînes)
Point isoélectrique	5.9	4.8	N.D.	5.5
Carbohydate content	<1%	aucune	Glycosylée	N.D.
Inhibiteurs enzymatiques	EDTA, 1,10-phenanthroline	EDTA, o-phenanthroline	EDTA, DTT	PMSF, DFP, Pefabloc, et DTT
Inhibition par des inhibiteurs plasmatiques des protéinases humaines	+	N.D.	N.D.	N.D.
pH optimal	7.4–8.0	8.5–9.5	N.D.	5.5–8.5
Température optimale	37 °C labile à la chaleur	Stable à la chaleur	N.D.	Stable à la chaleur
Activité hémorragique	–	–	–	N.D.
Activité fibrinogénolytique	A α >B β	B β »A α	A α >B β	B β >A α
Activité fibrinolytique	+	–	+	+

N.D. : Non Défini

Tableau 10 : Propriétés biologiques et physiologiques des fibrin(ogè)nases décrites récemment. (Swenson et al., 2005)

Les genres *Lachesis* avaient été étudiés à la recherche d'enzymes fibrinolytiques, mais celles qui avaient été identifiées étaient également hémorragiques. Récemment, une enzyme identifiée en tant que ***Lachesis stenophrys* fibrinogénases (LSF)**, a été isolée. Elle est fibrinolytique mais non hémorragique. L'enzyme est assignée à la classe P1 des protéinases et partage un degré d'homologie élevé avec l'enzyme hémorragique du venin de *Lachesis muta* et avec la fibrolase du venin d'*Agkistrodon contortrix*. Les différences structurales primaires entre les deux enzymes dérivées de *Lachesis* résident dans la partie aminoterminal de l'enzyme et dans les glycosylations post-translations. Léonardi et ses collègues, qui ont isolé l'enzyme, proposent que les légers changements entre ces protéines modifient l'affinité de LSF envers les protéines de matrice plutôt que de changer la spécificité de substrat. La théorie d'un changement d'affinité se base sur le fait que c'est la région carboxyterminale qui détermine l'attache au substrat et dans notre cas elles sont identiques. C'est une enzyme intéressante, car encore une fois identifiée dans les genres pour lesquels seules des fibrinogénases hémorragiques avaient été précédemment isolées.

1.2. Sérine protéases

Les sérine protéinases de venin qui possèdent l'activité fibrin(ogène)olytique agissent préférentiellement sur la chaîne B β , bien qu'il y ait un certain nombre d'exceptions à cette généralisation. Plusieurs sérine protéinases sont à la fois fibrinogénolytiques et fibrinolytiques, certaines ne sont pas fibrinolytiques.

Les sérine protéinases fibrin(ogène)olytiques de venin posent problème en ce qui concerne leur classification enzymatique, comme les métalloprotéinases hémorragiques et fibrinolytiques. Ces protéinases, aussi bien que l'activateur du plasminogène de venin, partagent une homologie étendue au niveau de leurs séquences aminées avec l'ancrode, la batroxobine; la crotalase (des enzymes thrombine-like) et avec d'autres sérine protéinases telles que la kallikréine-like, l'activateur de protéine C. Il y a cependant de subtiles différences entre ces enzymes qui déterminent et orientent leurs actions.

Une des enzymes fibrinolytiques de venin les plus intéressantes a été récemment rapportée. Elle est extraite du venin d'*Agkistrodon blomhoffi brevicadus*. En raison de sa spécificité d'action et parcequ'elle est complètement inactivée par des inhibiteurs de sérine protéinase, la **brévinase** appartient à la famille des β fibrinogénases (Lee et al., 1999). Cette enzyme est un hétérodimère qui exige des liaisons dissulfures pour se stabiliser. Les études sur les dimères témoignent d'une activité fibrinolytique directe sans coaguler le fibrinogène prouvant ainsi que l'enzyme n'est pas une thrombine-like. La brévinase ne montre aucune activité sur des substrats pour la trypsine, la thrombine, la plasmine ou la kallikréine. L'analyse de ses deux chaînes indique des différences significatives entre les chaînes. La séquence aminoterminal de la chaîne de 16,5 kDa montre un degré d'homologie élevé avec celle des enzymes thrombine-like telles que l'ancrode et la batroxobine. Celle de la chaîne de 17 kDa montre également une similitude avec ce groupe d'enzymes, mais au niveau de la séquence centrale plutôt qu'à celle terminale. Cette enzyme représente une nouvelle classe d'enzymes fibrinolytiques de venin de serpent. Davantage de recherches sur cette enzyme aussi bien que l'analyse d'autres venins pour ce type de structure enzymatique seront assurément effectués. Une question reste cependant sans réponse : cette enzyme est-elle à l'origine composée d'une simple chaîne polypeptidique qui serait protéolysée durant l'isolement ?

La capacité de dégrader des caillots de fibrine et l'insensibilité aux serpins a généré un intérêt croissant pour une potentielle utilisation thérapeutique des enzymes fibrinolytiques de venin dans le traitement des maladies thrombotiques artérielles ou veineuses occlusives. Nous en saurons plus d'ici quelques années.

2. Les activateurs du plasminogène

Dès 1988, on rapporta que des venins de serpent stimulent la sécrétion des activateurs du plasminogène des cellules endothéliales. Ce sont les venins de *Crotalus atrox* et *Crotalus adamanteus* qui ont l'activité la plus prononcée (Kirschbaum et al., 1988).

Puis, en 1995, Zhang et ses collaborateurs mirent en évidence ce qui semble être un véritable activateur du plasminogène dans le venin de *Trimeresurus stejnegeri*. Il s'agit d'une glycoprotéine à simple chaîne avec un poids moléculaire de 33 kDa, appelée **TSV-PA**. Elle représente environ 0,5% des protéines de ce venin. Cette sérine protéinase active le plasminogène par une action enzymatique, conduisant à la génération de plasmine. Cependant, à la différence de l'activation du plasminogène par l'activateur tissulaire (t-PA), l'activation par cette enzyme n'est pas stimulée par des fragments de fibrine et elle est moins importante. En utilisant le Glu-plasminogène humain, on a vu que le clivage par l'enzyme ophidienne se produit au niveau d'une simple liaison peptidique Arg 561-Val 562; la même liaison que celle rompu par l'urokinase et le t-PA. Le TSV-PA n'active pas ni ne dégrade la prothrombine, le facteur X ou la protéine C et il ne coagule pas le fibrinogène, ne montre pas d'activité fibrin(ogène)olytique en l'absence de plasminogène.

Le TSV-PA a ensuite été cloné et on a pu déduire sa séquence aminée complète. Il est composé de 234 acides aminés avec un site de N-glycosylation. Il montre une similitude étendue avec d'autres sérine protéinases ophidiennes: 66% d'homologie avec l'activateur de la protéine C du venin de *A. contortrix*, 63% avec la batroxobine de *B. atrox* et 60% avec l'activateur du facteur V du venin de la vipère de Russell. En revanche, le TSV-PA montre une similitude de seulement 21 à 23% avec les domaines catalytiques d'u-PA et de t-PA. Certaines régions variables (VR) du domaine catalytique du t-PA sont absentes. C'est le cas en particulier de la VR1, responsable de l'interaction du t-PA avec le PAI-1. De plus, il ne possède pas les domaines *kringle* et EGF du t-PA qui sont responsables de son élimination hépatique. Ces deux caractéristiques permettent au TSV-PA d'avoir une durée de vie *in vivo* supérieure à celle du t-PA (plusieurs heures *versus* quelques minutes).

En 2000, on détermina sa structure cristallographique (fig. 29). La structure cristallographique du TSV-PA est l'unique structure cristallographique d'une sérine protéinase de venin de serpent ayant été déterminée. Bien que cette structure soit en accord avec son modèle moléculaire elle a été établie par comparaison avec la structure en cristal de la trypsine.

Une analyse détaillée de la structure tridimensionnelle du TSV-PA indique que l'accès au site actif est limité par un segment de boucle. Cette boucle compte un acide aminé de plus dans le TSV-PA que dans la trypsine, à la position 218, et une proline est présente à la position 219. Beaucoup de sérine protéinases de venin possèdent cette Pro en 219, cela serait dû à l'évolution des kallikréines glandulaires. Les délétions observées par l'alignement des structures primaires des sérines protéinases de venin avec le domaine catalytique des enzymes humaines correspondent à des boucles de surface impliquées dans leurs interactions avec leurs inhibiteurs physiologiques et leurs substrats. L'absence de ces boucles de surface sur les protéinases de venins rend bien compte de leur insensibilité aux inhibiteurs physiologiques et soulève des questions intéressantes quant à leur spécificité de substrat (Braud et al., 2000).

Le niveau élevé de similitude entre le TSV-PA et les autres sérine protéinases de venin est utile car il permet de déterminer la structure tridimensionnelle de ces protéines, par modelage moléculaire, en utilisant la structure cristallographique du TSV-PA comme calibre.

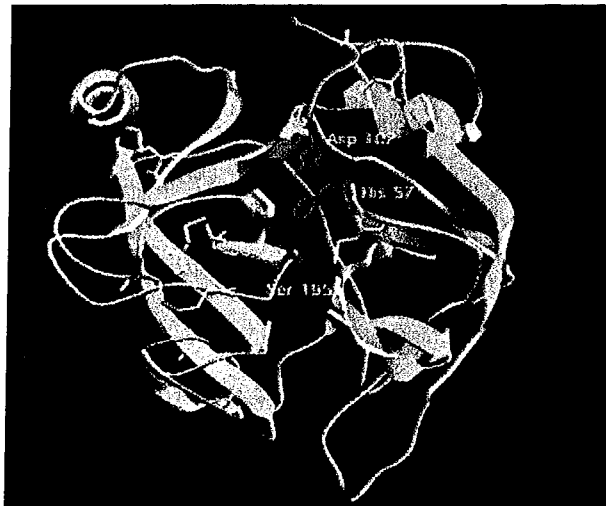


Figure 29 : structure tridimensionnelle du TSV-PA. Les ponts dissulfures sont en jaune et la triade catalytique His 57, Asp 102, Ser 195 est en bleu (Braud et al., 2000).

Aujourd'hui le TSV-PA n'est plus l'unique activateur du plasminogène ophidien car deux autres enzymes ont démontré avoir la même propriété.

En partant d'une analyse des séquences d'ADN contenues dans la glande à venin d'*Agkistrodon halys*, deux protéines ont été produites : **haly-PA** et **haly 2**. Lors d'une recherche sur la base de données de protéines ophidiennes, haly-PA a montré une similitude de 82% avec le TSV-PA et haly 2 a montré une similitude de 78% avec les β fibrinogénases. Haly-PA a été exprimé avec succès en utilisant le baculovirus et sécrété dans les milieux de culture comme une glycoprotéine de 32 kDa. Lors de l'analyse du venin de serpent, l'anticorps anti-haly-PA détecta une même bande indiquant ainsi que l'enzyme est bien un composant du venin. Lors d'une analyse fibrinolytique, l'haly-PA recombinant a montré qu'elle possédait une activité fibrinolytique indirecte en présence de plasminogène, convertissant ce dernier en plasmine (Park et al., 1998).

Une enzyme issue du venin de *Lachesis muta*, le **LV-PA**, a été purifiée en utilisant une filtration sur gel suivie d'une chromatographie d'échange anionique. Il s'agit d'une glycoprotéine acide qui converti le plasminogène en plasmine en formant un complexe moléculaire. Le LV-PA catalyse l'hydrolyse de plusieurs substrats peptidiques contenant des résidus Lys mais n'a aucune action sur les substrats contenant des résidus Arg. Il se distingue de la thrombine car il ne coagule pas fibrinogène. Après incubation du LV-PA avec le plasma enrichi en plaquettes, il ne montre aucun effet sur l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP ou le collagène.

La comparaison de la séquence aminoterminal du LV-PA avec d'autres activateurs du plasminogène de venin de serpent indique qu'il y a un degré élevé d'identité avec le TSV-PA (90%) et avec le Haly-PA (85%). Il possède également une homologie avec d'autres sérine protéinases de serpent (Sanchez et al., 2000).

3. L'inhibiteur de la plasmine.

Jusqu'à présent une seule protéine de 7kDa, isolée dans le venin de *Pseudonaja textilis textilis*, s'est avérée être une sérine protéinase inhibitrice de la plasmine. Son mode d'action, son efficacité et sa spécificité ont été déterminées,

comparées à celles de l'aprotinine (un inhibiteur de Kunitz). En utilisant l'aprotinine comme inhibiteur de protéase et la plasmine comme enzyme, l'inhibition observée se déroule en deux temps. La formation du complexe initial (EI) est rapide, mais lâche ($K_i=3.78$ nM), puis la transition d'EI à EI' est lente, avec une liaison serrée cette fois, ($K_i'=53.2$ pM). Avec l'inhibiteur de serpent, et contrairement au mécanisme standard ci-dessus, l'inhibition observée se fait par un mécanisme réversible, concurrentiel et en une seule étape. La plasmine et la trypsine sont liées à l'inhibiteur ophidien avec des valeurs de K_i de $0,15$ μ M et de $0,30$ μ M, respectivement.

Des concentrations en protéine ophidienne allant jusqu'à 10 μ M sont incapables d'inhiber plusieurs sérine protéinases telles que l'activateur du plasminogène tissulaire recombinant, l'urokinase, la thrombine, la chymotrypsine. Ces résultats démontrent que ce petit inhibiteur de protéase ophidien n'agit pas par l'intermédiaire du mécanisme commun à d'autres petits inhibiteurs de protéase de sérine de protéine (Willmott et al, 1995).

Conclusion :

Les enzymes activatrices de la fibrinolyse se divisent en deux grandes classes : les métalloprotéinases et les sérine protéases. Elles diffèrent de la plasmine par le fait qu'elles sont insensibles à ses inhibiteurs physiologiques et qu'elles agissent sur d'autres liaisons peptidiques. Les enzymes ophidiennes agissent sur les chaînes α ou β car jusqu'ici il n'y a eu pratiquement aucun rapport d'une enzyme spécifique de la chaîne γ du fibrinogène.

Les métalloprotéinases sont apparemment stockées dans la glande à venin sous forme de zymogène. Aujourd'hui on connaît leur structure primaire et pour certaine on connaît même leur structure tridimensionnelle. Trois molécules ont été bien caractérisées : la lébétase, l'atroxase et la fibrolase. On a parfaitement déterminé leurs activités fibrinogénolytiques, fibrinolytiques, hémorragiques et plaquettaires.

Des études *in vivo* ont démontré que la fibrolase lyse des thrombi expérimentaux dans des artères et des veines (Markland, 1996). Ces études ont validé le concept que l'introduction temporaire d'une protéinase fibrinolytique de venin de serpent pourrait être une thérapie clinique appropriée pour lutter contre les thrombi occlusifs. Un avantage à cette approche est le manque d'activation du plasminogène car l'activation du plasminogène systémique peut mener à la dissolution des bouchons hémostatiques avec des effets secondaires négatifs tels que l'hémorragie intra-crânienne. Une forme tronquée de la fibrolase, l'alfiméprase est testée, au stade II, pour son effet thrombolytique.

Depuis ces six dernières années quatre nouvelles enzymes (tableau x) ont été trouvées : trois métalloprotéases et une sérine protéase. Les nouvelles métalloprotéinases (la neuwiedase, la brévilysine, LSF) sont non hémorragiques. On cherche désormais à avoir une spécificité de chaîne, comme c'est le cas pour la brévilysine L6.

Du côté des sérine protéinases, la brévinase retient toutes les attention du fait de sa spécificité d'action et parcequ'elle est complètement inactivée par des inhibiteurs de sérine protéinase.

Plusieurs activateurs du plasminogène ophidiens ont été rapportés. Le TSV-PA est le plus étudié notamment en France par l'Institut Pasteur. La mise en œuvre de sa structure cristallographique permet une nouvelle approche, on comprend le rôle décisif de certains acides aminés présents dans la structure primaire ainsi que le rôle des boucles de surface (elles confèrent une résistance aux inhibiteurs physiologiques) qui pourrait être transposés à de nouveaux modèles.

En ce qui concerne les Inhibiteurs ophidiens de la plasmine humaine, une seule protéine a été mise en évidence, à partir du venin de *Pseudonaja textilis*. Son mécanisme d'action est tout à fait particulier car il nécessite une seule étape.

Conclusion générale

Comme nous venons de le voir, les venins des Vipéridés, Crotalidés, certaines espèces d'Élapidés australiens et quelques Colubridés sont un véritable cocktail d'enzymes. Leurs actions sur l'hémostase sont multiples tant par le nombre important de composés actifs contenus à l'intérieur d'un même venin, les différentes cibles possibles et le mode d'action de ces protéines. Certains venins ont une action dominante sur l'une des trois étapes de la coagulation, d'autres ont une action plus globale, certains encore contiennent à la fois des agents pro et anti coagulants.

Il est maintenant plus aisé de comprendre que les coagulations intravasculaires disséminées et syndromes de défibrination s'observent plus particulièrement chez certains Viperidés possédant des enzymes thrombine-like et qu'il est possible d'avoir un syndrome hémorragique massif qui suit rapidement un syndrome thrombotique.

La connaissance des mécanismes sous-jacents aux troubles de l'hémostase induits par les venins de serpents explique pourquoi il n'existe aucune thérapeutique efficace en dehors de l'immunothérapie :

- les traitements substitutifs (fibrinogène, plasma, voire plaquettes) sont très décevants car rapidement inactivés par les enzymes ophidiennes circulantes.

- le PPSB (Kaskadil ®), qui apporte des facteurs concentrés et, contrairement au plasma, ne contient pas d'inhibiteurs naturels, comporte des risques d'exacerbation de la CIVD.

- l'héparinothérapie, proposée dans certaines CIVD médicales et susceptible théoriquement de prévenir la coagulopathie, doit résolument être proscrite (Chippaux et al., 2002). Sur la base d'un travail *in vitro* et de l'observation d'un unique patient, Weiss et ses collaborateurs avaient prôné en 1973 l'utilisation de l'héparine dans les morsures d'*Echis carinatus*. En fait, l'amélioration constatée tardivement n'impliquait que l'histoire naturelle de l'envenimation (correction spontanée des troubles en une semaine en moyenne). La meizothrombine produite sous l'action du venin et a fortiori les enzymes thrombine-like ont une structure moléculaire différente de celle de la

thrombine "physiologique". Ce point fondamental explique pourquoi ni l'héparine ni l'hirudine ne peuvent les neutraliser. Dès 1976, une étude randomisée a montré l'absence d'intérêt du traitement héparinique dans les morsures d'Echis. De plus il a été montré que l'héparine et l'hirudine, même à faibles doses, aggravent le syndrome hémorragique (Mion et al., 2000).

- d'autres traitements : inhibiteurs du système fibrinolytique, thrombolytiques, chélateurs de métaux ont ponctuellement montré un certain intérêt, ils restent néanmoins l'apanage de spécialistes.

La multiplicité des cibles des constituants d'un même venin (endothélium, plaquettes, prothrombine, fibrinogène...) explique qu'il reste illusoire d'espérer contrecarrer un syndrome hémorragique en agissant sur une seule étape de l'hémostase. C'est en ce sens que l'antivenin, dont les composants sont dirigés contre l'ensemble des protéines ophidiennes du venin concerné, reste la seule thérapeutique logique et surtout efficace des envenimations ophidiennes.

Avec l'utilisation de fragments d'immunoglobulines purifiés, les effets indésirables de la sérothérapie sont devenus négligeables face aux complications de l'envenimation. L'administration d'antivenin doit être proposée devant toute envenimation patente : elle réduit très significativement la durée d'hospitalisation, l'intensité des soins ainsi que les risques de complications. L'administration doit être faite par voie veineuse exclusivement, en perfusion ou en injection directe, lente si l'état clinique le nécessite. La posologie est fonction de la quantité de venin inoculée, donc de la gravité et de la rapidité d'apparition des symptômes, et non de la taille de la victime ou du retard de la prise en charge, bien que ce dernier critère puisse également être pris en considération.

Même en l'absence de laboratoire, un test de coagulation, simple et efficace, peut être effectué au lit du malade. Il permet un diagnostic précoce du syndrome hémorragique, dès l'arrivée du patient, et la surveillance du traitement. Pour cela, 5 ml de sang sont prélevés sur un tube sec et si possible neuf pour éviter les traces de détergent. Le tube est laissé en place 30 minutes sur une paillasse ou une table stable. Un caillot normal doit se former en moins de 15 minutes et rester stable (lors

de l'agitation douce du tube) pendant plus de 48 heures. Au contraire, si le temps de coagulation dépasse 30 minutes, si il y a absence totale de caillot ou formation d'un caillot partiel ou friable cela traduit un syndrome hémorragique latent ou avéré que l'on confirmera par l'examen clinique (saignements spontanés des plaies ou des cicatrices récentes, hématuries microscopiques ou macroscopiques, gingivorragies, épistaxis, phlyctènes, purpura). Dans ce cas, la mise en place ou la poursuite d'un traitement est licite (Chippaux et al., 1999).

IV. Utilisation des venins ophidiens : outils de diagnostic, modèles moléculaires, thérapeutiques d'aujourd'hui et de demain

En raison de leurs potentialités variées et de leurs actions extrêmement spécifiques, les composés des venins ophidiens sont largement utilisés dans la recherche fondamentale que ce soit en physiologie, biochimie ou immunologie. Ces molécules ont fortement contribué à nos connaissances sur les mécanismes de l'hémostase et beaucoup d'entre elles sont utilisées dans des tests d'hémostase. En retardant ou accélérant les processus biochimiques ou cellulaires, les composants des venins permettent aux chercheurs d'analyser les différentes étapes de processus complexes et de développer de nouveaux médicaments. Les venins ophidiens sont actuellement étudiés pour des utilisations potentielles en tant qu'agents antithrombotiques, antiviraux, antibactériens (tétanos, hépatites, trachome, paludisme, botulisme...) ou anticancéreux (Mion et al., 2002).

Afin de mieux comprendre les utilisations de protéines ophidiennes pour l'exploration de l'hémostase nous verons un bref rappel des méthodes traditionnellement utilisées.

A. Les méthodes traditionnellement utilisées pour l'exploration de l'hémostase

1. Exploration de l'hémostase primaire

L'exploration de l'hémostase primaire comprend la numération plaquettaire, le temps de saignement ainsi que des tests fonctionnels. Le temps de saignement est la pierre angulaire de l'exploration de l'hémostase primaire, et il est défini comme le temps

nécessaire à l'arrêt spontané d'un saignement provoqué par une petite coupure superficielle. Il explore les différents éléments concourant à l'hémostase primaire, soit les plaquettes, la paroi vasculaire et le facteur de Willebrand.

La standardisation des techniques par des procédés à usage unique a amélioré la fiabilité de ce test qui s'effectue classiquement, selon la méthode décrite initialement par Ivy, par une incision cutanée superficielle au niveau de l'avant-bras sous une pression constante de 40 mmHg. Dans ces conditions, le temps de saignement (TS) se situe entre 4 et 8 minutes. Avant toute pratique d'un TS, l'interrogatoire doit rechercher la prise de salicylés ou d'anti-inflammatoires non stéroïdiens, qui allongent le TS par l'inhibition pharmacologique des fonctions plaquettaires. Par ailleurs il est parfaitement inutile de demander un TS devant une thrombopénie, et notamment pour un taux inférieur à $50 \times 10^9/l$. En l'absence de thrombopénie, le temps de saignement est allongé dans les cas de thrombopathies acquises ou héréditaires, perturbant les fonctions plaquettaires, ou dans la maladie de Willebrand. La maladie de Willebrand est la plus fréquente des maladies hémorragiques héréditaires. Elle est caractérisée par un déficit, quantitatif ou qualitatif, en FW. Le diagnostic de cette maladie doit être évoqué devant tout allongement du TS associé à un accroissement modéré du temps de céphaline activée (TCA). Le diagnostic est affirmé par la diminution de l'activité fonctionnelle du FW (agglutination des plaquettes en présence de ristocétine) et de son activité antigénique (dosage immunologique).

2. Exploration de la coagulation

Le temps de céphaline activé (TCA) et le temps de Quick (TQ) sont les deux tests de dépistage universellement utilisés pour explorer les différentes phases de la coagulation. Le dosage spécifique des facteurs de la coagulation, à la recherche d'un déficit isolé, est effectué en fonction des résultats des tests précédents. Le TCA explore la voie dite endogène mettant en jeu les facteurs contacts et les facteurs IX et VIII jusqu'au complexe prothrombinase et le TQ explore la voie exogène relative au facteur

tissulaire et impliquant le facteur VII. Ces deux tests impliquent par ailleurs le tronc commun terminal. La voie commune comprend la thrombinoformation et implique les facteurs V, X et II et la fibrinoformation. Il est dorénavant admis que ce schéma n'est pas directement applicable *in vivo* mais qu'il reste utile dans l'exploration *in vitro*.

2.1. Temps de céphaline activé

Le TCA correspond au temps de coagulation d'un plasma, décalcifié et déplaquetté, en présence de céphaline, d'un activateur des facteurs de la phase contact et de calcium. La céphaline est un substitut des phospholipides plaquettaires dont il existe plusieurs formes commercialisées, et l'activateur de la phase contact le plus communément utilisé est le kaolin.

Le TCA explore les facteurs contacts (facteurs XII, XI,) et les facteurs IX, VIII, X, V, II et le fibrinogène. Le temps normal dépend des activateurs et de la céphaline utilisée par chaque laboratoire, et varie de 30 à 40 secondes. Le TCA d'un patient donné doit être comparé au TCA témoin du laboratoire, et on considère qu'un temps est pathologique pour une valeur supérieure de 6 à 10 secondes au-dessus du témoin. Un TCA allongé de façon isolée, sans allongement du TQ, chez un patient qui saigne, doit faire évoquer un déficit en facteur IX (hémophilie B) ou en facteur VIII (hémophilie A), les déficits pour les autres facteurs de la voie endogène étant peu hémorragiques.

2.2. Temps de Quick

Le temps de Quick correspond au temps de coagulation d'un plasma, décalcifié et déplaquetté, en présence de thromboplastine, source de facteur tissulaire, et de calcium. Le TQ explore le facteur VII, facteur de la voie extrinsèque, et les facteurs de la voie commune : X, V, II et le fibrinogène. Il est compris entre 10 et 13 secondes en fonction de la thromboplastine utilisée, et est exprimé en pourcentage par rapport à un

pool de plasma calculé selon une courbe de référence. On le nomme alors taux de prothrombine (TP), ce qui peut amener une certaine confusion terminologique. La normalité se situe entre 70 et 100 %. Le TQ pratiqué dans le cadre de la surveillance d'un traitement anticoagulant par antivitamine K doit s'exprimer en INR (*international normalized ratio*) calculé selon un index international permettant de s'affranchir des variations de sensibilité des différents réactifs utilisés.

2.3. Exploration de la fibrinoformation

Elle repose sur deux tests simples, le dosage du fibrinogène et le temps de thrombine. Le dosage du fibrinogène est effectué par diverses méthodes et son taux est normalement compris entre 2 et 4 g/l. Le temps de thrombine est le temps de coagulation d'un plasma après apport d'une quantité fixe et diluée de thrombine. Il est déterminé pour être normalement compris entre 16 et 20 secondes. Le temps de thrombine explore spécifiquement la fibrinoformation et est allongé en cas d'anomalie quantitative ou qualitative du fibrinogène, ou en présence d'inhibiteurs de la thrombine, telle l'héparine.

3. Exploration de la fibrinolyse

En routine, elle comprend le dosage du fibrinogène et de ses produits de dégradations (fibrinopeptides A et B) ainsi que le dosage des produits de dégradation de la fibrine (les D dimères). Le temps de lyse des euglobulines, ou test de Von Kaulla, est parfois encore utilisé. Il s'agit du temps de lyse d'un caillot formé à partir d'une fraction protéique plasmatique contenant tous les activateurs de la fibrinolyse mais dépourvue de ses inhibiteurs.

Les protéines de la fibrinolyse peuvent être dosées antigéniquement ou par la mesure de leur activité. Cependant ces méthodes ne sont pas utilisées en routine et restent du domaine de l'hémostase spécialisée au même titre que l'analyse des polymorphismes du gène PAI-1 par exemple.

B. Les protéines de venins de serpents utilisées pour l'exploration de l'hémostase

1. Les protéines de venins de serpent utilisées comme réactifs de laboratoire et leurs applications en analyse.

La grande diversité des protéines de venins de serpents affectant l'hémostase contraste avec la haute spécificité de chaque composant. Cette spécificité est employée pour des applications pratiques et le développement de plusieurs essais en laboratoire. Quelques unes sont illustrées dans le tableau 11.

Test	Diagnostic	Protéine	Fonction
Reptilase TM	Titration de la réaction fibrinogène-fibrine	Batroxobine	Sécrétion du fibrinopeptide A à partir du fibrinogène
Ecarine	Détection d'une forme anormale de prothrombine	Ecarine	Activation de la prothrombine
Stypven®	Mesure du niveau du F X	RVV-X	Activation du F X
Protac®	Titration de la protéine C et de la protéine S	ACC-C	Activation de la protéine C
Botrocétine	Diagnostic de la maladie de Von Willebrand et du syndrome Bernard Soulier	botrocétine	Agglutination des plaquettes en présence du facteur Von Willebrand

Tableau 11 : Utilisation de composés de venins ophidiens pour le développement de test d'hémostase d'après Braud et al., 2000.

1.1. Etudes sur les enzymes thrombine-like ophidiennes et le fibrinogène

Les enzymes thrombine-like sont des enzymes largement répandues dans les venins ophidiens. Les plus étudiées sont celles du venin de *Bothrops atrox* avec la batroxobine et la thrombocytine.

La batroxobine est une enzyme thrombine-like issue du venin de *Bothrops atrox*. Elle a une action spécifique sur le fibrinogène (libération du fibrinopeptide A) et n'a aucun effet sur les plaquettes ou les autres facteurs de la coagulation.

Elle a donné naissance à un test appelé Reptilase-Time. Ce test de coagulation se déroule de la même façon que le temps de thrombine sauf qu'à la place d'introduire une quantité donnée de thrombine on utilise une quantité déterminée de batroxobine. Le temps de reptilase est allongé dans les mêmes situations que le temps de thrombine sauf au cours des traitements par héparine, hirudine, antithrombine, aprotinine. Il permet ainsi de vérifier que l'allongement observé n'est pas dû à un tel traitement en cours (qui n'aurait pas été signalé) et oriente le diagnostic vers une anomalie de la coagulation : afibrinogénémie ou hypofibrinogénémie, problème de polymérisation de la fibrine (myélome, anticorps anti-fibrinogène), hyperfibrinolyse, maladie hépatique, CIVD... Ce test est donc réalisé le plus souvent en deuxième intention chez des personnes présentant des saignements plus ou moins important.

En présence d'une hypofibrinogénémie, l'addition du fibrinogène à l'échantillon corrige le temps de reptilase allongé. Si cela ne se produit pas et que des PDF peuvent être éliminés par un test basé sur des anticorps, un défaut de polymérisation de fibrine est alors confirmé par exemple dans la maladie de Kawaguchi (Matsuda et al., 1985).

L'exploration de la fibrinoformation est l'utilisation la plus courante du temps de reptilase mais son insensibilité vis-à-vis des inhibiteurs et activateurs physiologiques lui ouvre d'autres portes :

- En 1982, Ranby et ses collaborateurs utilisent la batroxobine comme stimulant de la fibrine dans l'analyse fonctionnelle de l'activateur du plasminogène tissulaire.
- En 1990, Stocker et ses collaborateurs l'utilisent pour étudier les conditions et la cinétique de formation de monomère de fibrine et pour suivre le monomère aux différentes étapes de la formation de la fibrine aussi bien que sa stabilisation par le facteur XIII.

- En 1994, Kumar et ses collaborateurs se servent des enzymes thrombine-like ophidiennes comme outils utiles pour comprendre la fonction de la fibrine, le mécanisme de la rétroactivation induite par la thrombine.
- En 2002, Cunningham et ses collaborateurs se penchent sur la recherche en laboratoire d'une dysfibrinogénémie comprenant l'utilisation de reptilase et dans l'analyse de l'antithrombine III où le plasma peut être préparé exempt de fibrinogène sans addition de thrombine qui réagirait avec ATIII et interférerait l'analyse.

La thrombocytine est une autre enzyme thrombine-like issue du venin de *Bothrops atrox*. C'est une sérine protéinase qui exerce un très faible effet coagulant sur le fibrinogène. Cependant, elle active les FV, FVII et FXIII, déclenche l'agrégation plaquettaire et des réactions de sécrétion. Elle interagit également avec l'endothélium vasculaire.

Elle a été utilisée comme outil pour comprendre les fonctions plaquettaires (Kubisz et al., 1984), pour comprendre les aspects moléculaires de l'activation des facteurs XIII et V (Kisiel et Canfield, 1981), pour élucider le mécanisme de relâchement des coronaires dépendant de l'endothélium (Glusa et al., 1991) et pour étudier la stimulation protéolytique du tPA à partir de l'endothélium vasculaire (Klöcking and Hoffmann, 1991)

Du fait de sa faible activité coagulante, la thrombocytine pourrait être utilisée comme un substitut de thrombine dans un plasma dans lequel il ne faut pas qu'il se forme de thrombus. Puisqu'elle n'est pas inhibée par l'hirudine, cette enzyme peut aussi présenter un intérêt tout spécial comme réactif pour l'évaluation de la fonction plaquettaire dans le plasma de patients traités par cet anticoagulant (Stocker et Hon, 1998).

1.2. Analyses et recherches sur la fonction de la prothrombine

Les activateurs de la prothrombine ophidiens ont été intensivement passés en revue de 1992 à 2001. Ils sont aujourd'hui classifiés en quatre groupes selon la nécessité de cofacteurs (tableau 7).

Plusieurs de ces enzymes sont disponibles dans le commerce, par exemple : l'activateur du serpent brun australien (Venom Supplies, Tanunda, Australie), l'écarine d'*Echis carinatus* (Pentapharm), la noscarine de *Notechis scutatus* (Pentapharm) et le venin de taipan (Diagnostic Reagents Ltd, Thame, UK). Dans le cas du venin de taipan, le venin brut contient une proportion si élevée d'enzyme activatrice de la prothrombine, qu'il peut être utilisé sans purification dans une analyse en une seule étape. Cependant, la facilité avec laquelle le venin de taipan peut faire augmenter le facteur tissulaire a fait qu'il n'a pas été adopté pour l'utilisation courante.

Les activateurs de la prothrombine ophidiens sont principalement utilisés pour la détection de formes anormales de la prothrombine car ils ont pour cible la prothrombine qu'elle soit normale ou fonctionnellement anormale. Ainsi les formes décarboxylées PIVKA (Protéines Induites par Vitamine K Absence/Antagonistes) présentes dans certaines affections hépatiques peuvent être détectées tout comme les dysprothrombinémies.

Parmi ces activateurs, le plus connu et le plus utilisé est l'écarine. En effet, le temps d'écarine (Ecarin Clotting Time) est un test de génération de meizothrombine qui tient compte de la quantification précise des inhibiteurs directs de la thrombine. Il a démontré son utilité depuis plus de dix ans dans des investigations biochimiques et pharmacologiques aussi bien que dans la recherche et dans la clinique. Le temps d'écarine est également préconisé, de préférence au temps de Quick (taux de prothrombine), pour contrôler l'effet anticoagulant de la PEG-hirudine (Moser et al., 2001).

L'écarine a aussi une place dans le processus de la préparation de sérum. En effet, la préparation de sérum à partir d'échantillons de sang par coagulation spontanée et rétraction du caillot, suivi d'une centrifugation, peut être fortement accéléré par l'addition d'écarine, même si il y a de l'héparine dans ces échantillons. Pour cette application, la pureté de l'écarine est d'importance cruciale puisque la présence d'électrolytes, de facteurs hémolytiques direct ou indirect, d'inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire, les fibrinogénases... rendraient l'échantillon de sérum inefficace pour des utilisations à buts analytiques (Stocker et Hon, 1998).

D'autres activateurs de la prothrombine ophidiens sont également employés pour préparer de la meizothrombine, analyser les formes non enzymatiques de la thrombine et de la meizothrombine (Rosing et al., 1992), dans les études du clivage de la prothrombine recombinante (Stevens et al., 1996) et pour détailler le mécanisme de l'activation de la prothrombine (Yamada et al., 1996).

1.3. Analyses et recherches sur la fonction du facteur V

Le venin de la vipère de Russell (*Daboia russelli*) active le facteur V au moyen d'une sérine protéase contenue dans son venin (RVV-V). L'activation de ce facteur de coagulation se produit au niveau de l'Arg1545 (par opposition à celle négociée par la thrombine qui agit sur trois liaisons peptidiques aux positions Arg709, Arg1018 et Arg1545), mais dans les deux cas, l'activation du FV exige la présence de cofacteurs.

En vertu de son action sélective sur le facteur V plasmatique, RVV-V est utilisé pour préparer un réactif dans l'analyse courante de ce facteur. Le plasma du patient est mis en contact avec RVV-V, du FXa, des phospholipides et des ions calcium afin de former le complexe prothrombinase, puis il y a addition de prothrombine (à partir de laquelle la thrombine sera produite). Le taux de formation de thrombine est déterminé à l'aide d'un substrat chromogène, il est proportionnel à la quantité de FVa présent dans le mélange. Cette utilisation est toutefois limitée.

Plus récemment, une autre utilisation de RVV-V a vu le jour. Il s'agit d'une simple analyse de la coagulation conçue pour la surveillance pré et post-opératoire chez les patients traités par anticoagulants agissant sur FXa (HBPM) ou sur la thrombine (HNF ou hirudine). Dans ce test, RVV-V active le FV des patients indépendamment des mécanismes de feed -back de la thrombine. Ce test est donc appelé temps de coagulation induit par la prothrombinase : Pefakit® PiCT® (Prothrombinase-induced Clotting Time).

Du point de vue pharmacologique, RVV-V reste néanmoins un outil utile dans l'étude de l'activation du facteur V. Il est également employé pour définir l'importance fonctionnelle des sites actifs sur le FV sauvage et recombinant (Keller et al., 1995). Plus récemment, la découverte du facteur V Leiden génétiquement variable a conduit à une renaissance d'intérêt pour le facteur V et sa participation dans la thrombophilie et dans la résistance à la protéine C activée.

1.4. Analyses et recherches sur la fonction du facteur X

Le venin de la vipère de Russell contient également un activateur efficace du facteur X (RVV-X) qui a été découvert il y a plus de 70 ans par MacFarlane et Barnett. RVV-X est utilisé dans plusieurs analyses de la coagulation, notamment pour la mesure du facteur X elle-même avec une analyse très simple en une seule étape (temps de stypven®). Il joue également un rôle dans la distinction entre l'insuffisance du facteur VII et celle du facteur X et dans l'analyse d'anticoagulants lupiques (Marsh et Williams, 2005).

Pour réaliser le temps de stypven® il suffit de mettre en contact le plasma d'un patient avec RVV-X, des ions calcium, des phospholipides, du FV. Cet ensemble va activer la prothrombine en thrombine. La quantité de thrombine formée peut être révélée soit directement en utilisant un substrat chromogène soit en mesurant le temps

nécessaire à la formation du caillot. Le temps de coagulation, dans ce cas, est inversement proportionnel à la quantité de facteur X présent dans la plasma.

Un temps de stypven® normal associé à un temps de prothrombine prolongé suggère une insuffisance du facteur VII tandis qu'un temps de stypven® prolongé et un temps de prothrombine normal indique une insuffisance du facteur X. RVV-X a donc une place établie dans l'analyse du facteur X et dans l'étude de son activation, par exemple, dans l'identification des sites de reconnaissance du facteur X (Chattopadhyay et Fair, 1989), des effets de la déglycosylation sur l'activation du facteur X (Inoue et Morita, 1993).

RVV-X est aussi utilisé pour analyser le facteur 3 plaquettaire. Si le temps allongé de stypven® retourne à la normale après ajout de céphaline, on conclut à un déficit de facteur 3 plaquettaire. Ceci présente un avantage par rapport aux essais courants de coagulation en distinguant les patients thrombotiques et les patients sains (Hardisty et Hutton, 1966).

1.5. Les anticoagulants lupiques

Les anticoagulants lupiques sont une population hétérogène d'immunoglobulines, y compris des anticorps anti-phospholipides, interférant dans les essais de coagulation dépendants des phospholipides tels que le temps partiel de thromboplastine, le taux de prothrombine (PTT) et le temps de coagulation de kaolin (KCT). En raison de l'hétérogénéité moléculaire liée aux anticoagulants lupiques, un essai unique ne fournit pas un résultat satisfaisant et le PTT ainsi que le KCT ont été précédemment associés.

Les patients atteints du syndrome des anti-phospholipides peuvent présenter un grand nombre de manifestations cliniques à type de thromboses artérielles ou veineuses, avortements spontanés à répétition et thrombocytopénie. Lorsque les anticorps anti-phospholipides surviennent isolément sans maladie générale associée, on

parle alors de syndrome primitif des anti-phospholipides (SAPL-1). Dans un certain nombre de cas, les anticorps anti-phospholipides peuvent être associés à des maladies rhumatologiques comme le lupus érythémateux ou avec certaines infections ou prises de médicaments.

Les méthodes de recherche d'anticoagulants lupiques ont été largement étudiées et plusieurs activateurs de venins de serpents sont maintenant régulièrement utilisés. Ceux-ci incluent, d'une manière primordiale, l'activateur du facteur X de venin de la vipère de Russell, les activateurs de la prothrombine du venin de taipan (*Oxyuranus scutellatus*), du venin du serpent brun australien (*Pseudonaja textilis*) et d'*Echis carinatus*.

Le temps de venin de la vipère du Russell dilué (dRVVT) occupe une place primordiale dans l'analyse des anticoagulants lupiques car il est rapide, sensible et peu coûteux. Ce test évalue la transformation de la prothrombinase en thrombine par le Xa, le Va et les phospholipides. Il est positif si (temps du malade) - (temps du témoin) > 6 secondes ou M/T > 1,2. Afin que sa sensibilité soit maximale, plusieurs laboratoires ont employé des variations par rapport à la formulation conventionnelle de dRVVT (Moore et al., 2000).

Un autre test a été développé en se basant sur le venin de taipan combiné à un procédé de neutralisation de plaquettes (Rooney et al., 1994). Bien qu'étant insensible aux anticoagulants oraux, l'essai n'avait pas un taux de 100% de détection et n'a donc pas eu de suite.

Un autre essai utilisant la textarine et l'écarine s'est montré être un essai sensible et relativement spécifique. La textarine est un activateur de la prothrombine extrait du venin de *Pseudonaja textilis*. Elle est dépendante des ions calcium et des phospholipides pour son fonctionnement, contrairement à l'écarine qui ne nécessite aucun cofacteur. Il est à présent établi qu'un rapport du temps de textarine/écarine > 1,3 est considéré comme anormal. Vingt cinq plasmas contenant des anticoagulants lupiques ont été détectés par cette méthode. Dans une plus grande étude, le rapport de

textarine/écarine a prouvé être un essai de confirmation utile pour le diagnostic des patients présentant des anticoagulants lupiques et ayant un PTT prolongé non expliqué (Forastiero et al., 1994).

Plus récemment, une autre combinaison des activateurs de prothrombine de venins de serpents (taipan et *Echis*) a été employée avec succès lors de l'identification d'anticoagulant de lupus rendue difficile à cause d'une anticoagulation continue (Moore et al., 2003)

1.6. La protéine C et résistance à la protéine C activée

La protéine C activée (PCa) est une protéinase anticoagulante qui inactive les facteurs Va et VIIIa et joue un rôle principal dans le contrôle de l'hémostase. Son précurseur inactif, la protéine C (PC), est une protéine dépendante de la vitamine K. L'analyse fonctionnelle de la PC est problématique car son activation nécessite de la thrombine et de la thrombomoduline, elle peut être incomplète et la thrombine peut interférer dans les analyses chromogènes. Ces problèmes sont aujourd'hui résolus grâce à l'utilisation de l'activateur de la protéine C extrait du venin d'*Agkistrodon contortrix contortrix* dans un test appelé Protac® (Pentapharm). Protac®, efficace et d'action rapide, est extrêmement utile pour étudier l'activation de la protéine C.

Il existe deux type de méthodes : une analyse de la coagulation fonctionnelle et une analyse utilisant une méthode chromogène directe ou indirecte.

Pour l'analyse de la coagulation fonctionnelle, le principe est simple : Protac convertit la protéine C présente dans le prélèvement en protéine C activée, laquelle lors d'addition de calcium et de phospholipides catalyse la dégradation des facteurs V et VIII de ce même plasma ; ce qui conduit à un allongement du temps de coagulation proportionnel à la concentration de protéine C dans le plasma.

La protéine C présente dans le plasma peut aussi être directement déterminée, sur activation par Protac, en mesurant son activité amidolytique, au moyen d'un substrat chromogène. L'augmentation de l'absorbance due au dégagement du chromophore catalysé par PCa est proportionnelle à la quantité de PC présente dans l'échantillon.

Etant donné que la PCa conduit à une augmentation du temps partiel de thromboplastine activée (APTT), ce système peut aussi être utilisé comme une méthode de détermination de la PC. Dans ce cas il faut un substrat chromogène de la thrombine et un photomètre d'absorbance fixe. En utilisant cette méthode, c'est le temps nécessaire entre le début de la réaction jusqu'au dégagement du chromophore atteignant une absorbance définie qui est mesuré (Stocker et Hon, 1998).

Les résultats de ces analyses rivalisent favorablement avec ceux des méthodes immunologiques. De plus, la méthode utilisant Protac® apporte une amélioration par rapport aux analyses utilisant la thrombine puisque cette dernière peut mener à une mauvaise classification des patients déficients en protéine C de façon normale ou congénitale.

Protac® est également un véhicule commode pour comparer l'activation de la protéine C indigène et recombinante (Lee et al., 1996) et pour activer la protéine C murine, bovine et équine. Etrangement, il n'a aucun effet sur la protéine C canine. De plus, cette enzyme ophidienne a réduit les coûts de ces analyses et a facilité la diminution de l'échantillon.

Un test basé sur le rapport du temps de Quick en l'absence et en présence de Protac® est employé avec succès pour identifier les patients présentant des défauts dans la voie anticoagulante de la protéine C (Robert et al., 1996) et peut permettre l'identification d'une protéine C dysfonctionnelle via des résultats différentiels entre des analyses chromogènes et des analyses de la coagulation (Girolami et al., 1993). Une

nouvelle version ProC Global® (Dade-Behring) a identifié avec succès tous les patients porteurs du facteur V Leiden et ceux avec de basses concentrations de protéine C activée dans une épreuve multicentrique (N=627) sur des patients thrombotiques (Toulon et al., 2000) et parmi des patients présentant une pré-éclampsie (Heilmann et al., 2002).

La résistance à la protéine C activée est une des causes principales de thrombophilie et, dans la majorité de cas, c'est une mutation sur le gène du facteur V, connu sous le nom de facteur V Leiden, qui en est responsable. Cette mutation consiste en la substitution d'une arginine par une glutamine à la position 506 du facteur V rendant la molécule résistante à la dégradation protéolytique par la protéine C activée. Après les rapports initiaux sur le diagnostic moléculaire de la thrombophilie, on a développé quelques analyses fonctionnelles qui peuvent raisonnablement déterminer l'anomalie du génotype. De tels essais utilisent des activateurs de la coagulation de venins de serpents, ils incluent le dRVVT (GradiLeiden V, Gradipore), le RVV-V et la noscarine (Pefakit® APC-R Factor V Leiden, Pentapharm), le temps de textarine ainsi qu'un activateur spécifique de *Crotalus viridis helleri* (Quehenberger et al., 2000). Le dRVVT montre un niveau plus élevé de sensibilité et de spécificité comparé à l'analyse basée sur le taux de prothrombine (Solano et al., 1997). De plus, le temps de textarine se corrèle plus étroitement avec le génotype du FV Leiden en comparaison avec l'essai basé sur le taux de prothrombine. Avec ces deux méthodes et l'activateur du venin de *Crotalus viridis helleri*, l'analyse de l'ADN reste toutefois vivement recommandée (Gemmati et al., 1997).

Il est possible que d'autres mutations puissent être responsables de la résistance à la protéine C activée. En dépit de la sensibilité améliorée des analyses fonctionnelles pour le facteur V Leiden, il reste un besoin de diagnostic moléculaire d'autres mutations relatives à la thrombophilie telles que la prothrombine 20210 (Poort et al., 1996) et la variante de la méthylènetétrahydrofolate réductase qui génère une hyperhomocystéinurie (Frosst et al., 1995).

Comme nous venons de le voir, Protac® a considérablement simplifié l'analyse de la protéine C. Il a aussi un rôle important dans l'analyse de la protéine S (la protéine S est le cofacteur exigé pour l'inactivation des facteurs Va et VIIIa par la PCa), cette dernière étant analysée auparavant par des méthodes amidolytiques (Francis et Seyfert, de 1987) et coagulantes (Suzuki et Nishioka, 1988).

1.7. Etudes sur le facteur Von Willebrand

Plusieurs espèces du genre *Bothrops* contiennent de la botrocétine, une protéine d'agrégation plaquettaire. Le venin de *Bothrops jararaca* en est la source la plus riche. La botrocétine exige une liaison avec le facteur Willebrand pour exercer son effet sur les plaquettes. Elle a un effet légèrement mais sensiblement différent de celui de la ristocétine et ces deux agonistes peuvent donc être employés pour différencier des variantes moléculaires du FW. La botrocétine agrège partiellement les plaquettes de patients souffrant de la maladie de Bernard-Soulier (absence de la glycoprotéine Ib) alors que la ristocétine n'induit pas d'agrégation dans le plasma de ces patients puisqu'elle dépend de GPIb. La même distinction peut être faite pour la maladie de Willebrand de type IIa où les multimères de FW de haut poids moléculaire sont absents (Bloom, 1991). Une analyse, en phase solide, d'inhibition du FW lié à la GPIb plaquettaire a été proposée en utilisant la botrocétine (Miura et al., 1996) et la combinaison ristocétine-botrocétine. Elle a pour but de caractériser le FW plaquettaire humain et de détecter des mutations responsables de la maladie de Willebrand de type B (Williams et al., 1994).

Une deuxième protéine agrégante dépendante du FW, extraite du venin de *Trimeresurus albolabris*, l'alboagrégine-B, a été employée pour quantifier les récepteurs du FW sur la molécule de GPIb (Yoshida et al., 1995).

1.8. Etudes sur les glycoprotéines plaquettaires

De nombreuses toxines ophidiennes affectent la fonction plaquettaire mais les désintégrines sont les plus intéressantes vis-à-vis de l'hémostase. Les désintégrines constituent une famille nombreuse de protéines fortement homologues qui empêchent l'agrégation plaquettaire via l'inhibition de l'activité réceptrice des glycoprotéines de surface. Vu cette propriété, ces composés procurent une occasion unique pour l'étude des interactions plaquette-plaquette et plaquette-endothélium. Cependant, jusqu'ici, on n'a développé aucun essai en laboratoire d'hémostase qui utilise des désintégrines. Elles sont plus utilisées en thérapeutique.

Plus récemment, des lectines de type C ont été identifiées comme modulatrices de la fonction plaquettaire (Andrews et Berndt, 2000- Wisner et al., 2002).

2. Protéines ophidiennes utilisées comme modèles moléculaires

2.1. Le TSV-PA

La thrombose est responsable de plusieurs maladies cardiovasculaires telles que l'infarctus du myocarde aigu, l'embolie pulmonaire. Pour faire face à cela, les agents thrombolytiques généralement utilisés sont des activateurs du plasminogène comme le t-PA. Le t-PA possède plusieurs inconvénients : une demi vie courte (quelques minutes), une inactivation rapide *in vivo* due à l'interaction avec son principal inhibiteur endogène (le PAI-1), la réapparition possible de l'occlusion coronaire aiguë et des saignements. Le TSV-PA, issu du venin de *Trimeresurus stejnegeri*, ne possède pas le domaine du facteur de croissance épidermique présent sur t-PA. Ce domaine étant impliqué dans l'absorption de cette molécule par les cellules hépatiques il explique la plus longue demi vie du TSV-PA, due à une vitesse d'élimination inférieure. De plus, l'action du TSV-PA

n'est pas empêchée par les inhibiteurs physiologiques de la famille des sérine protéinases. Cette absence d'inhibition est due à l'absence de sites impliqués dans les interactions serpine/protéinase ou à certains résidus ayant des fonctions spécifiques. Toutes ces propriétés font que le TSV-PA est un bon modèle moléculaire pour améliorer les propriétés des agents thrombolytiques actuellement utilisés et en créer de nouveaux (Braud et al., 2000).

2.2. La thrombine

La thrombine est une sérine protéinase multifonctionnelle qui joue un rôle important dans l'entretien et la régulation de l'hémostase. La thrombine stimule l'agrégation plaquettaire et la coagulation mais elle a également des propriétés anticoagulantes, activant la protéine C après interaction avec la thrombomoduline. Les résidus aminés fonctionnels impliqués dans les fonctions procoagulantes et anticoagulantes de la thrombine sont situés sur un hémisphère de la molécule. Cet hémisphère inclut à la fois le site actif et l'exosite 1. Quelques sérines protéinases de venin imitent seulement un effet de la thrombine sur les plaquettes (la céraostocytine, le PA-BJ, la thrombocytine), sur le fibrinogène (l'ancrode, la batroxobine...), sur le facteur V (RVV-V) ou sur la protéine C (ACC-C). L'étude structure-fonction de ces différentes protéines est une approche moléculaire valable pour identifier les surfaces de ces enzymes qui interagissent avec les diverses cibles de la thrombine. Ces résultats peuvent être employés pour concevoir une nouvelle génération de facteurs antithrombotiques ainsi que pour contrôler les actions procoagulantes ou anticoagulantes de la thrombine (Braud et al., 2000).

C. Utilisations thérapeutiques de plusieurs toxines ophidiennes affectant l'hémostase

La suggestion que l'effet anticoagulant pourrait être réalisé en éliminant totalement le fibrinogène de la circulation au moyen d'une protéine ophidienne thrombine-like "défibrination thérapeutique" a été faite la première fois en 1968 (Reid et Chan, 1968) puisque l'on sait que ces enzymes agissent en convertissant le fibrinogène en forme peu coagulable de fibrine qui est alors éliminée par divers processus enzymatiques. Un extrait du venin de *Agkistrodon rhodostoma* (Malayan Pit Viper) a alors été isolé, épuré puis rendu disponible pour l'usage thérapeutique ; l'enzyme utilisée est l'ancrode (Viprinex® (anciennement Arvin®), Knoll). Ensuite, un extrait du venin de *Bothrops atrox* fut utilisé, la batroxobine (Défibrase®, Pentapharm).

L'ancrode a fait l'objet d'études cliniques dans les accidents vasculaires cérébraux (AVC), la thrombose veineuse ou artérielle, l'utilisation au cours de la circulation extra-corporelle (CEC) ou encore l'anticoagulation des patients porteurs de thrombopénie induite par l'héparine (Marsh et Williams, 2005). La réduction de la fibrinogénémie est rapide car ce type d'enzyme clive le fibrinopeptide A du fibrinogène, mais pas le B, pour produire une fibrine non stabilisée par le facteur XIII qui est rapidement lysée par le système fibrinolytique et les cellules réticulo-endothéliales. Sa demi-vie est de 3 à 5 heures et 4 jours après son introduction il en reste 10% dans la circulation. Son administration débute par un bolus de 1 UI/kg sur 6 heures suivi d'une perfusion dont la posologie est fonction du dosage du fibrinogène 12 heures après le début de la perfusion IV.

L'ancrode est également administrée en prophylaxie pour réduire l'incidence de la thrombose veineuse profonde postopératoire et la réapparition de la thrombose après chirurgie vasculaire car elle n'a aucun effet fibrinolytique.

Malgré l'absence de réaction croisée avec l'héparine, on réserve l'ancrode comme alternative au danaparoïde pour plusieurs raisons. L'ancrode n'inhibe pas et peut même augmenter la formation de thrombine et de microthrombi chez les patients présentant une TIH. Une administration lente est nécessaire pour éviter la formation d'un microthrombus intravasculaire et son coût est élevé par rapport au danaparoïde (1050 \$ versus 600 \$ pour 5 jours de traitement). De plus, des anticorps peuvent se développer et une résistance peut survenir lors d'une utilisation prolongée. Enfin, contrairement au danaparoïde, la diminution du fibrinogène par l'ancrode est difficilement prévisible d'un patient à l'autre.

Une comparaison avec d'autres traitements indique que l'ancrode est moins bénéfique que le t-PA recombinant ou la pro-urokinase (Madhavan et al., 2002). Cependant, on a récemment suggéré que l'utilisation d'ancrode lors d'atteintes ischémiques apporte une meilleure espérance de vie et des coûts médicaux inférieurs en comparaison avec un placebo (Samsa et al., 2002).

La batroxobine, une enzyme thrombine-like du venin de *Bothrops atrox moojeni*, dénommée commercialement sous le nom de Défibrase® ou Défibrol®, est une enzyme capable de coaguler le fibrinogène. Elle libère seulement le fibrinopeptide A et n'a aucune activité directe envers les autres substrats de la thrombine. *In vivo*, le polymère de fibrine formé est rapidement dégradé par le système fibrinolytique et éliminé par le système réticulo-endothélial. L'injection de batroxobine a donc comme conséquence une diminution de la concentration plasmatique en fibrinogène et une réduction de la viscosité de sang dépendante de la dose employée.

Jusqu'ici, la batroxobine a été employée dans la thérapie de l'athérosclérose oblitérative périphérique (Furukawa K., 1979), de la perturbation circulatoire périphérique du syndrome de vibration (Agishi et al., 1985). Récemment, on a rapporté que la batroxobine est utile dans la stimulation de la thrombolyse artériel chez le chien (Tomaru et al., 1989) et dans l'amélioration des conséquences de l'infarctus cérébral

chez les rats (Namikata et al., 1992). Mais ses principales applications thérapeutiques sont les préparations topiques hémostatiques et la "colle de fibrine". La "colle de fibrine" peut être employée dans presque toutes les disciplines chirurgicales, en application directe sur les tissus, et cela dans trois buts :

- pour contrôler le saignement diffus dans les organes parenchymateux (foie, rein, rate, pancréas) les saignements de grandes surfaces et les saignements locaux chez les patients présentant une diathèse hémorragique (extraction dentaire).
- pour la jonction des surfaces de résection des organes parenchymateux, pour renforcer les sutures incertaines et pour réduire le besoin d'une seconde suture
- pour avoir un effet curatif sur la blessure, dans la gestion de l'ulcération de la peau , de la nécrose et de la transplantation.

Malgré tous ces avantages, la batroxobine est délaissée au profit de colles biologiques composées de concentrés de facteurs humains de l'hémostase, coagulables sous l'action de la thrombine (ex : Tissucol®)

Reptilase®, un médicament commercialisé en France et figurant sur le Vidal, est un complexe de protéases appelé hémocoagulase de Klobusitzky (DCI), du nom de l'auteur qui l'isole pour la première fois en 1936, du venin d'un *Bothrops jararaca*. Cette préparation à visée hémostatique est utilisée depuis le début des années 1950 dans différentes branches de la médecine.

L'hémocoagulase de Klobusitzky se compose de deux fractions :

- Une fraction thromboplastinique qui, en présence des facteurs V, X et du facteur 3 plaquettaire, transforme la prothrombine en thrombine
- Une fraction thrombinomimétique (la batroxobine) libérant le fibrinopeptide A à partir du fibrinogène, qui est insensible à l'antithrombine III et l'héparine.

Reptilase® agit à deux niveaux. Vis-à-vis des plaquettes, l'hémocoagulase de Klobusitzky normalise ou augmente leur adhésivité (première étape de l'hémostase

primaire) ce qui permet ensuite leur agrégation (deuxième étape). Pour certains auteurs, elle augmente directement l'agrégation thrombocytaire. Elle aurait aussi un effet vasoconstricteur sur les capillaires par la libération de sérotonine et d'adrénaline des plaquettes après leur agglutination. Ainsi, en favorisant la formation d'un clou hémostatique plaquettaire, l'effet de la Reptilase® se traduit déjà in vivo par la réduction du temps de saignement (T.S.) (Lacroix et al., 1986).

Au niveau de la fibrinoformation, l'hémocoagulase conduit à la formation du complexe enzymatique prothrombinase. Cela est dû à son activité thromboplastinique qui active les facteurs VII et X, en la présence indispensable du facteur 3 plaquettaire, et augmentant l'activité du facteur V. D'autre part, la fraction thrombomimétique de Reptilase®, la batroxobine, en faible quantité dans le complexe médicamenteux, libère uniquement le fibrinopeptide A à partir du fibrinogène à la différence de la thrombine qui sépare les fibrinopeptides A et B. Ces monomères forment avec le fibrinogène un complexe qui ne coagule pas et il faut attendre la saturation des capacités de complexation du fibrinogène pour qu'un caillot non rétractile s'organise, en présence du facteur stabilisant la fibrine (facteur XIII) produit sous l'action de la thrombine, indispensable, même en faible quantité, à cette polymérisation.

Un point important : Reptilase® n'est pas inhibé par l'antithrombine III, ni par l'héparine.

Les indications thérapeutiques de l'hémocoagulase de Klobusitzky se comprennent aisément au vu de ses activités. Elle est proposée comme traitement symptomatique des hémorragies chirurgicales en per- et (ou) postopératoire, des hémorragies médicales diverses (épistaxis, hémoptysie, hématurie, ménométrorragie) non liées à un déficit en facteurs de coagulation et (ou) à un allongement du temps de saignement.

Elle se présente en ampoule de 1 ml contenant 1 unité de Klobusitzky c'est-à-dire la quantité d'enzyme qui coagule 5 cm³ de sang frais de cheval, décalcifié, in vitro, en l'espace de 10 minutes à 22°C ou 0,3 unité NIH, unité définie par le National Institute of Health, mesurant l'effet thrombinomimétique. La posologie, en IV, IM, SC ou locale, est

de 1 à 3 ampoules par 24 heures pour les adultes et ½ à 1 ampoule par 24 heures pour les enfants de plus de 3 ans.

Etant donné que ce médicament est issu du venin d'un serpent, il est important de spécifier qu'il y a possibilité de production d'anticorps mais en fait à des doses très largement supérieures aux doses thérapeutiques (environ 10 fois), ce qui explique sa remarquable tolérance. De l'avis même du Laboratoire commercialisant ce produit, le nombre d'unités vendues annuellement est restreint; ce qui minimise encore ce risque. En cas exceptionnel de manifestation allergique il faut interrompre le traitement.

Excepté la voie IM en cas de syndrome hémorragique biologique il n'existe pas de contre-indications. Il y a évidemment une non-indication en cas d'hémorragie survenant au cours d'une coagulation intravasculaire disséminée (C.I.V.D.) d'hémophilie, de thrombopénies, d'allongements du TS sans thrombopénie mais avec trouble de la coagulation. Reptilase® n'induit pas de CIVD.

La bothropase, une sérine protéase thrombine-like de venins de *Bothrops*, a été administrée in vivo pour créer un état d'hypercoagulabilité passager. Elle a été employée, avec succès, pour traiter des patients avec des saignements gastro-intestinaux ou urinaires. Cependant, le risque de voir apparaître des coagulations intravasculaires disséminées fait que cette protéine est classée comme potentiellement dangereuse et diminue sa chance de la voir arriver, un jour, dans l'arsenal thérapeutique humain (Markland F, 1998).

Malgré toutes ces études, le succès de ces enzymes reste indifférent et il est difficile de trouver des essais cliniques bien conçus avec ces agents, excepté peut-être pour l'étude STAT (Stroke Treatment with Ancrod Trial, N=500) qui a montré des résultats de trois mois marginalement positifs (Sherman et al., 2000). Le rôle optimal des enzymes

ophidiennes thrombine-like reste donc à établir bien que les données récentes suggèrent que l'ancrode puisse être utilisée sans risque, et thérapeutiquement, chez les patients présentant un syndrome de thrombocytopénie induite par l'héparine ou de thrombose (Illig et Ouriel, 1996) et comme une alternative à l'héparine dans la déviation cardio-pulmonaire (Von Segesser et al., 2001). De même en dépit de la bonne tolérance clinique de l'hémocoagulase de Klobusitzky, ce médicament reste peu prescrit en ambulatoire ; les prescripteurs ayant peut-être peur d'employer un produit tiré du venin d'un serpent.

D. Perspectives

1. Les désintégrines

Des antagonistes de la glycoprotéine IIb/IIIa plaquettaire dérivés des venins de serpent (les désintégrines) ont été utilisés dans plusieurs études expérimentales. Ces agents ont empêché la fermeture brusque et la resténose des artères (Ellis et al., 1991), inhibé l'agrégation plaquettaire induite par des cellules tumorales (Swaim et al., 1996) prévenu l'agrégation plaquettaire *in vivo* et *in vitro* (Sheu et Huang, 1994 - Liu et al., 1995) prévenu l'occlusion artérielle (Markland, 1996). Les résultats encourageants de ces études suggèrent qu'une utilisation thérapeutique de ces désintégrines ou de molécules construites à partir de ces molécules puisse avoir lieu à l'avenir.

Les désintégrines peuvent également trouver un rôle dans l'inhibition de la formation des thrombi et des embolies. La bitistatine du venin de *Bitis arietans* a le plus de promesse à cet égard (Knight et al., 1996).

Des études *in vivo* ont montré le rôle potentiel des désintégrines pour la prévention de l'agrégation plaquettaire après angioplastie ou thrombolyse. D'ailleurs, le tirofiban (Agrastat®), modélisé à partir de l'échistatine, est un nouvel antiagrégant

plaquettaire antagoniste de GPIIb/IIIa. Il est utilisé, en complément de l'administration d'héparine et d'aspirine, pour la prévention des complications cardiaques ischémiques chez les patients qui font l'objet d'une intervention coronarienne percutanée et pour la réduction du risque d'infarctus du myocarde chez les patients souffrant d'angor instable ou d'infarctus du myocarde sans onde Q, chez lesquels une intervention coronarienne percutanée est programmée.

2. Les estérases d'arginine

Les estérases d'arginine, un constituant courant des venins de serpent, ont été employées pour le traitement de l'atteinte ischémique (Kim et al., 2001-Caplan, 2002).

3. Les fibrinogénases

Ces dernières années, la famille des fibrinogénases, un groupe d'enzymes de venin de serpent qui libère spécifiquement une ou plusieurs chaînes de fibrinogène, ont suscité plus d'attention (Markland, 1998). La fibrolase dégrade à la fois les chaînes α et β de fibrine et promet une utilisation certaine en tant qu'agent thrombolytique. Il en est de même pour d'autres enzymes qui dissolvent les caillots *in vivo* et *in vitro* telles l'afaacytine de *Cerastes cerastes* (Larabadjebari et al., 1995), l'atroxase de *Bothrops atrox* (Baker et Tu, 1996), et la fibrinogénase du venin de *Vipera lebetina* (Gasmi et al., 1997).

4. Enzymes affectant les inhibiteurs plasmatiques

Des protéinases capables de dégrader les inhibiteurs des sérine protéinases (serpines) et éventuellement l' α_2 macroglobuline sont présentes dans de nombreux venins ophidiens. De telles enzymes sont exploitées afin de préparer des test de diagnostic ou d'élaborer des méthodes thérapeutiques sans qu'il y ait l'activité inhibitrice des sérines protéinases dans les prélèvements de plasma (Stocker et Hon, 1998).

En 1992, Contant et ses collaborateurs ont mis au point une méthode pour la détermination de PAI-1 dans laquelle il n'y a pas d'interférences avec l' α_2 antiplasmine et l' α_2 macroglobuline en utilisant le venin de *Bitis arietans*. Jansen et son équipe, la même année, ont utilisé le venin de *Causus rhombeatus* pour s'affranchir des effets de l'héparine, en détruisant son cofacteur l'ATIII, dans le plasma d'un patient testé pour anticoagulants lupiques

5. Autres protéines

La bothrojaracine découverte dans le venin de *Bothrops jararaca* est un puissant inhibiteur de la thrombine. Elle interagit de façon originale avec les exosites I et II de la thrombine nécessaires à l'interaction de celle-ci avec ses substrats macro moléculaires (fibrinogène, récepteurs plaquettaires, thrombomoduline...) et ses inhibiteurs physiologiques (héparine, antithrombine III), mais sans effet sur ses capacités catalytiques. Cette molécule transformée par génie génétique pourrait être utilisée comme nouvel agent antithrombotique (Markland F., 1998).

La création du variant F193G de TSV- PA, par remplacement du résidu Phe par Gly altère ses propriétés de façon intéressante : alors que TSV- PA est insensible aux inhibiteurs naturels du t-PA (comme le PAI-1) et à d'autres serpinines (α_2 -antiplasmine et α_1 antitrypsine), le variant est inhibé par ces facteurs. Ceci illustre le rôle majeur du résidu 193 et laisse imaginer que le remplacement du résidu Gly par Phe sur la molécule de t-PA pourrait donner un nouvel agent thrombolytique insensible aux serpinines et donc de demie-vie plus longue (Braud et al., 2000).

Certaines molécules qui interfèrent avec l'adhésion cellulaire pourraient également permettre de développer des agents anticancéreux : la lébécétine du venin de *Macrovipera lebetina*, par exemple, inhibe l'agrégation plaquettaire mais aussi l'adhérence de cellules mélanomateuses au fibrinogène.

Conclusion

Les venins de Vipéridés et de Crotalidés sont des sources très riches en protéines avec une activité sélective contre diverses étapes de la cascade de l'hémostase. Toutes les étapes de ce processus physiologique complexe peuvent être affectées par plusieurs des protéines de venin de serpent. La stabilité *in vitro* et *in vivo* des protéines de venin, leur spécificité élevée pour différents facteurs de coagulation et leur résistance aux inhibiteurs physiologiques les rendent très utiles pour le développement des tests de diagnostic.

Les venins de serpent ont une place évidente dans les laboratoires travaillant sur la coagulation à la fois pour l'analyse courante des facteurs de coagulation et comme réactifs pour étudier des facteurs de coagulation et le mécanisme de l'hémostase en général. Des travaux récents dans lesquels les structures moléculaires de ces protéines ont été déterminées ont prouvé que ces protéines appartiennent à diverses familles de protéines (sérine protéinases, métalloprotéinases, PLA2, lectines de type C, désintégrines) avec des structures semblables mais des cibles spécifiques et différentes. Ces molécules sont donc les modèles structuraux utiles pour l'identification et la définition des sites de l'interaction de ces protéines avec leurs cibles.

Les applications cliniques des enzymes de venins de serpents ont été moins réussies faute d'un manque d'épreuves cliniques. Elles ont tout de même montré leur efficacité dans les affections cardio-vasculaires de type thrombose veineuse et artérielle, réocclusion, accidents vasculaires cérébraux...Plusieurs composés potentiellement utiles ont été identifiés, notamment les désintégrines, qui ont déjà été montrés *in vitro* et

in vivo, sur des animaux de laboratoire, être des antiagrégants plaquettaires puissants. D'autres sont en train de faire leurs preuves (bitistatine, lébécétine...).

Nous pouvons d'ores et déjà prévoir le développement des composants des venins de serpent qui élargiront notre panel de réactifs et seront si tout va bien utiles dans le domaine thérapeutique.

Bibliographie

Agishi Y., Uchiumi T., Shirakawa H., Oku T., Kishi H., Saito K., Yoshimatsu S., Kato M., Fukushima T., Habu K., Nasu Y., Fujimaki M., Furukawa K. and Mishima Y. *Clinical investigation of defibrinogenating therapy on peripheral circulation disturbance of vibration syndrome patients*. Clin. Med., 1, 1985, p1145-1168.

Aird Steven D. *Ophidian envenomation strategies and the role of purines*. Toxicon, 40, 2002, p335-393.

Andrews Robert K., Berndt Michael C. et Wijeyewickrema Lakshmi C. *Snake venom probes of platelet adhesion receptors and their ligands*. Toxicon, 45, 2005, p1051-1061.

Andrews R.K., Berndt M.C. *Snake venom modulators of platelet adhesion receptors and their ligands*. Toxicon, 38, 2000, p775-791.

Baker B.J., Tu A.T. *Atroxase : a fibrinolytic enzyme isolated from the venom of western diamondback rattlesnake : isolation, characterization and cloning*. Adv. Exp. Med. Biol., 391, 1996, p203-211.

Bell W. *Defibrinogenating enzymes*. Hemostasis and Thrombosis, eds R. W. Colman, J. Hirsh, V. J. Marder and E. W. Salzman, 1990, p886-900.

Bjarnason J. et Fox J. *Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms*. Pharmac. Ther., 62, 1994, p325-372.

Bloom A.L. *Progress in the clinical management of haemophilia*. Thromb. Haemost., 66, 1991, p166-177.

Braud S., Bon C et Wisner A. *Snake venom proteins acting on hemostasis*. Biochimie, 82, 2000, p851-859.

Caplan L. *Treatment of patients with stroke*. Arch. Neurol., 59, 2002, p703-707.

Castro H., Silva D., Craik C. and Zingali R. *Structural features of a snake venom thrombin-like enzyme: thrombin and trypsin on a single catalytic platform?* Biochimica

and Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology, 1547, 2001, p183-195.

Castro H., Fernandes M. et Zingali R. *Identification of Bothrojaracin-like proteins in snake venoms from Bothrops species and Lachesis muta*. Toxicon, 37, 1999, p1403-1416.

Chattopadhyay A., Fair D.S. *Molecular recognition in the activation of human blood coagulation factor X*. J. Biol. Chem., 264, 1989, p11035-11043.

Chen Y.-L. et Tsai I.-H. *Functional and sequence characterization of coagulation factor IX/factor X-binding protein from the venom of Echis carinatus leucogaster*. Biochemistry, 35, 1996, p5264-5271.

Chippaux Jean-Philippe. *Morsures et envenimations ophidiennes*. Revue Française des Laboratoires, 2002, 2002, p 55-60.

Chippaux J. P, Amadi-Eddine S et Fagot P. *Diagnostic et surveillance des hémorragies dues aux envenimations vipérines en savane africaine*. Bull Soc Pathol Exot, 92, 1999, p 109-113.

Cho So Yean, Hahn Bum-Soo, Yang Kyoung Youl and Kim Yeong Shik. *Purification and characterization of calobin II, a second type of thrombin-like enzyme from Agkistrodon caliginosus (Korean viper)*. Toxicon, 39, 2001, p499-506.

Contant G., Nicham F., Martinoli J. *Determination of PAI by a new venom-based assay*. Fibrinolysis, 6, 1992, p85-86.

Cox A. *Coagulation factor X inhibitor from hundred-pace snake (Deinagkistrodon acutus) venom*. Toxicon, 31, 1993, p1445-1457.

Cunningham M.T., Brandt J.T., Laposata M., Olson J.D. *Laboratory diagnosis of dysfibrinogenaemia*. Arch. Pathol. Lab. Med., 126, 2002, p499-505.

De Haro Luc. *Les envenimations par les serpents de France et leur traitement*. La presse médicale, 32, 2003, p1131-1137.

De Revel T., Doghmi K. *Physiologie de l'hémostase*. Editions Elsevier, 2003, 11p.

Ellis S.G., Bates E.R., Schaible T., Weisman H.F., Pitt B., Topol E.J. *Prospects for the use of antagonists to the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor to prevent postangioplasty restenosis and thrombosis*. J. Am. Coll. Cardiol., 17, 1991, p89-95.

Forastiero R., Cerrato G., Carreras L. *Evaluation of recently described tests for the detection of the lupus anticoagulant*. Thromb. Haemost., 72, 1994, p728-733.

Francis R.B., Seyfert U. *Rapid amidolytic assay of protein C in whole plasma using an activator from the venom of Agkistrodon contortrix*. Am. J. Clin. Pathol., 87, 1987, p619-625.

Francischetti Ivo, Saliou Bernard, Leduc Mireille, Carlini Celia, Hatmi Mohamed, Randon Jacques, Faili Ahmad and Bon Cassian. *Convulxin, a potent platelet-aggregating protein from Crotalus durissus terrificus venom, specifically binds to platelets*. Toxicon, 35, 1997, p1217-1228.

Freiberg M. et Walls J. *The world of venomous animals*. T.F.H., 1984, p120-179.

Frosst P., Blom H.J., Goyette P., Sheppard C., Matthews R.G., Boers G.J.H., den Heijer M., Kluijtmans L.A.J., van den Heuvel L.P., Rozen R. *A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase*. Nature Genetics, 10, 1995, p111-113.

Furukawa K. *Reconstructive arterial surgery in peripheral obliterative atherosclerosis*. Jpn. J. Surg., 80, 1979, p1135-1138.

Gasmi A., Chabchoub A., Guermazi S., Karoui H., Elayeb M. and Dellagi K. *Further characterization and thrombolytic activity in a rat model of a fibrinogenase from Vipera lebetina venom*. Thrombosis Research, 86, 1997, p233-242

Gaussen P., Aiach M. *Physiologie de l'hémostase primaire et de la coagulation*. Le moniteur-internat Hématologie. Tome 3. 2^{ème} édition. Paris : Groupe liaison S.A., 1994, p53-63.

Gaussen P., Aiach M. *Physiologie de la fibrinolyse*. Le moniteur-internat Hématologie. Tome 3. 2^{ème} édition. Paris : Groupe liaison S.A, 1994, p63-67.

Guan A., Retzios A., Henderson G. et Markland F. *Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme from venom of the southern copperhead snake (Agkistrodon contortrix contortrix)*. Arch. Biochem. Biophys., 289, 1991, p197-207.

Gaywood M. et Spellerberg I. *Serpents*. Portraits nature, 2003, p72.

Gemmati D., Serino M.L., Mari R., Verzola I., Moratelli S., Ballerini, G. *Different anticoagulant response to activated protein C (APC test) and to Agkistrodon contortrix venom (ACV test) in a family with FV-R506Q substitution*. Clin. Appl. Thromb. Hemost., 3, 1997, p168-173.

Girolami A., Simioni P., Girolami B., Marchiori A., Millar D.S., Bignell P., Kakkar V., Cooper D.N. *A novel dysfunctional protein C (Protein C Padua 2) associated with a thrombotic tendency: substitution of Cys for Arg-1 results in a strongly reduced affinity for binding of CaCC*. Br. J. Haematol., 85, 1993, p521-527.

Glusa E., Brauns H., Stocker K. *Endothelium-dependent relaxant effect of thrombocytin, a serine proteinase from B. atrox snake venom, on isolated pig coronary arteries*. Toxicon, 29, 1991, p725-732.

Goyffon M. et Heurtault J. *La fonction venimeuse*. Paris : Masson, 1994

Hardisty R.M., Hutton R.A. *Platelet aggregation and the availability of platelet factor 3*. Br. J. Haematol., 12, 1966, p764-776.

Heilmann L., Von Tempelhoff G., Pollow K. *ProC global assay in the evaluation of women with a history of severe preeclampsia or HELLP syndrome*. Clin. Appl. Thromb. Hemost., 8, 2002, p319-324.

Huang Min Zhou, Gopalakrishnakone P. and Kini Manjunatha. *Role of enzymatic activity in the antiplatelet effects of a phospholipase A₂ from Ophiophagus hannah snake venom* Life Sciences, 61, 1997, p2211-2217.

Illig K.A., Ouriel K. *Ancrod: understanding the agent*. Semin. Vasc. Surg., 9, 1996, p303-314.

Inoue K., Morita T. *Identification of O-linked oligosaccharide chains in the activation peptides of blood coagulation factor X*. Eur. J. Biochem., 218, 1993, p153-163.

Janssen M., Meier J. and Freyvogel T. *Purification and characterization of an ATIII inactivating enzyme from the venom of the African night adder*. Toxicon, 80, 1992, p985-999.

Jasti J., Paramasivam M., Srinivasan A. and Singh T. *Crystal Structure of Echicetin from Echis carinatus (Indian Saw-scaled Viper) at 2.4 Å Resolution*. Journal of Molecular Biology, 335, 2004, p167-176.

Jia L., Wang X., Shannon J., Bjarnason J., Fox J. *Function of disintegrin-like/cysteine-rich domain of atrolysin A : inhibition of platelet aggregation by recombinant protein and peptide antagonists*. J. Biol Chem., 272, 1997, p13094-13102.

Jobin François. *L'hémostase*. Les presses de l'Université Laval. Editions Maloine, 1995, 749p.

Joseph J., Thirumangalathu S., Tsang F., Wong F. and Kini R. *Trocarin, a blood coagulation factor Xa homologue from snake venom, causes inflammation and mitogenesis*. Toxicon, 42, 2003, p769-776.

Kawasaki T., Fujimura Y., Ikeda Y., Miura S., Yoshida E., Shima H., Nishida S., Suzuki M., Titani, K. and Taniuchi Y. *Isolation and characterization of jararaca GPIIb-BP, a snake venom antagonist specific to platelet glycoprotein Ib*. Thromb Haemost., 74, 1995, p743-750.

Kawasaki T., Fujimura Y., Hisamichi Y., Miura S., Yoshida E., Shima H., Nishida S., Suzuki M., Titani, K., Sakai Y., Kaku S., Satoh N., Handa M., Sawai Y., Takenaka T. and Taniuchi Y. *Tokaracetin, a new platelet antagonist that binds to platelet glycoprotein Ib and inhibits von Willebrand factor-dependent shear-induced platelet aggregation*. Biochem J., 308, 1995, p947-953.

Kawashima H., Maruyama K.; Kawasaki T., Sakai Y., Taniuchi Y., Shimizu M., Takenada T. *Isolation and amino acid sequence of Flavostatin, a novel disintegrin from the venom of Trimeresurus flavoviridis*. Peptides, 18, 2000, p73-78.

Keller F., Ortel T., Quinn-Allen M. and Kane W. *Thrombin-catalysed activation of recombinant human factor V*. Biochemistry, 34, 1995, p4118-4124.

Kim J.S., Yoon S.S., Kwon S.U., Suh J.H., Chi H.S. *Treatment of acute cerebral infarction with arginine esterase: a controlled study with heparin*. Cerebrovasc. Dis., 11, 2001, p251-256.

Kini R. *The intriguing world of prothrombin activators from snake venom*. Toxicon, 45, 2005, p1133-1145.

Kini R. *Structure–function relationships and mechanism of anticoagulant phospholipase A₂ enzymes from snake venoms*. Toxicon, 45, 2005, p1147-1161.

Kini R., Morita T., Rosing, J. *Classification and nomenclature of prothrombin activators isolated from snake venoms*. Thromb. Haemost., 86, 2001, p710-711.

Kini R. and Evans H. *Inhibition of platelet aggregation by a fibrinogenase from Naja nigricollis venom is independent of fibrinogen degradation*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 1095, 1991, p117-121.

Kirschbaum N., Soszka T., Stewart G. et Budzynski A. *Effect of fibrinogen-clotting enzymes on secretion of plasminogen activators from cultured human endothelial cells*. Fibrinolysis, 2, 1988, p49-57.

Kisiel W., Canfield W. *Snake venom proteases that activate blood-coagulation factor V*. Methods in enzymology, 1981, p275-285.

Klöcking H. et Hoffmann A. *Effects of snake venoms on tissue-type plasminogen activator release*. Arch. Toxic., 1991, p157-159.

Knight L.C., Maurer A.H., Romano J.E. *Comparison of iodine123-disintegrins for imaging thrombi and emboli in a canine model.* J. Nucl. Med., 37, 1996, p476-482.

Komori Y., Nikai T., Ohara A., Yagihashi S. et Sugihara H. *Effect of bilineobin, a thrombin-like proteinase from the venom of common cantil (Agkistrodon bilineatus).* Toxicon, 31, 1993, p257-270.

Kubisz P., Arabi A., Seghier F., Cronberg S. *Investigations on the effect of thrombocytin on platelets.* Thromb Res., 33, 1984, p225-227.

Kumar R., Beguin S., Hemker H.C. *The influence of fibrinogen and fibrin on thrombin generation. Evidence for feedback activation of the clotting system by clot bound thrombin.* Thromb. Haemost., 72, 1994, p713-721.

Kunes Y., Sanz M-C., Tumanova I., Birr C., Shi P., Bruguera P., Ruiz J. and Sánchez-Martínez D. *Expression and characterization of a synthetic protein C activator in Pichia pastoris.* Protein Expression and Purification, 26, 2002, p406-415.

Laing G. et Moura-da-Silva A. *Jararhagin and its multiple effects on hemostasis.* Toxicon, 45, 2005, p987-996.

Larabadjebari F., Martineauclaire M.F., Mauco G., Marchot P. *Afaacytin, an a-b-fibrinogenase from Cerastes cerastes (horned viper) venom, activates purified factor X and induces serotonin release from human blood platelets.* Eur. J. Biochem., 233, 1995, p756-765.

Lee Wen-Hui and Zhang Yun. *Molecular cloning and characterization of a platelet glycoprotein Ib-binding protein from the venom of Trimeresurus stejnegeri.* Toxicon, 41, 2003, p885-892.

Lee J.W., Seu J.H., Rhee I.K., Jin I., Kawamura Y. et Park W. *Purification and characterization of brevinase, a heterogeneous two-chain fibrinolytic enzyme from the venom of Korean snake, Agkistrodon blomhoffii brevicaudus.* Biochem. Biophys. Res. Commun., 260, 1999, p665-670.

Lee T.K., Bangalore N., Velander W., Drohan W.N., Lubon H. *Activation of recombinant human protein C.* Thromb. Res., 82, 1996, p225-234.

Lee W., Zhang Y., Wang W., Xiong Y.-L. et Gao R. *Isolation and properties of a blood coagulation factor X activator from the venom of king cobra (Ophiophagus hannah)*. *Toxicon*, 33, 1995, p1263-1276.

Le Garff B. *Les amphibiens et les reptiles dans leur milieu*. Ecoguides, 1991, p246.

Leonardi A., Aragon-Ortiz F., Gubensek F. et Krizaj I. *Partial primary structure of a fibrinogenase from the venom of the snake Lachesis stenophrys*. *J. Chromatogr.*, 852, 1999, p237-243.

Li Wei-Fang, Chen Lan, Li Xiang-Ming and Liu Jing. *A C-type lectin-like protein from Agkistrodon acutus venom binds to both platelet glycoprotein Ib and coagulation factor IX/factor X*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 332, 2005, p904-912.

Liu Chao-Zong and Huang Tur-Fu. *Crovidisin, a Collagen-Binding Protein Isolated from Snake Venom of Crotalus viridis, Prevents Platelet–Collagen Interaction*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 337, 1997, p291-299.

Liu C.Z., Peng H.C., Huang T.F. *Crotavirin, a potent platelet aggregation inhibitor purified from the venom of the snake Crotalus viridis*. *Toxicon*, 33, 1995, p1289-1298.

Madhavan R., Jacobs B.S., Levine S.R. *Stroke trials: what have we learned?*. *Neurol. Res.*, 24, 2002, p27-32.

Marieb Elaine N. *Hémostase*. Anatomie et physiologie humaine. 4th ed. Paris : De Boeck Université, 1999, p644-650.

Markland F.S. and Swenson S. *Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes*. *Toxicon*, 45, 2005, p1021-1039.

Markland F.S. *Snake venoms and the hemostatic system*. *Toxicon*, 36, 1998, p1749-1800.

Markland, F. *Fibrolase, an Active Thrombolytic Enzyme in Arterial and Venous Thrombosis Model Systems*. Plenum Press, New York ,1996, p427-438.

Marrakchi Naziha, Zingali Russolina B., Karoui Habib, Bon Cassian and El Ayeb Mohamed. *Cerastocytin, a new thrombin-like platelet activator from the venom of the Tunisian viper Cerastes cerastes*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA), 1244, 1995, p147-156.

Marrakchi Naziha, Barbouche Rym, Guermazi Sami, Bon Cassian and El Ayeb Mohamed. *Procoagulant and platelet-aggregating properties of cerastocytin from Cerastes cerastes venom*. Toxicon, 35, 1997, p261-272.

Matsuda M., Saeki E., Kasamatsu A., Nakamikawa C., Manabe S., Samejima Y. *Fibrinogen Kawaguchi: an abnormal fibrinogen characterised by defective release of fibrinopeptide A*. Thromb. Res., 37, 1985, p379-390.

Matsui Taei and Hamako Jiharu. *Structure and function of snake venom toxins interacting with human von Willebrand factor*. Toxicon, 45, 2005, p1075-1087.

Matsui T , Fujimura Y , Titani K. *Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis*. Biochimica et Biophysica Acta, 1477, 2000, p146-156.

Mion G., Olive F., Hernandez E., Martin Y.-N., Viellefosse A.-S., Goyffon M. *Action des venins sur la coagulation sanguine : diagnostic des syndromes hémorragiques*. Bull. Soc. Pathol. Exot., 95, 2002, p132-138.

Mion G., Ruttimann M., Olive F., Saïssy J-M. *Traitement des envenimations vipérines graves*. Les envenimations graves. Edition Arnette, 2000, p23-34.

Miura S., Nishida S., Makita K., Sakurai Y., Shimoyama T., Sugimoto M., Yoshioka A., Ishii K., Kito M., Kobayash T., Fujimura Y. *Inhibition assay for the binding of biotinylated von Willebrand factor to platelet-bound microtiter wells in the presence of ristocetin or botrocetin*. Anal. Biochem., 236, 1996, p215-220.

Monteiro R. et Zingali R. *Inhibition of Prothrombin Activation by Bothrojaracin, a C-Type Lectin from Bothrops jararaca Venom*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 382, 2000, p123-128.

Monteiro R., Yamanouye N., Carlini C., Guimarães J, Bon C. et Zingali R. *Variability of bothrojaracin isoforms and other venom principles in individual jararaca (bothrops jararaca) snakes maintained under seasonally invariant conditions*. Toxicon, 36, 1998, p153-163.

Moore G.W., Smit M.P., Savidge G.F. *The Ecarin time is an improved confirmatory test for the Taipan snake venom time in warfarinised patients with lupus anticoagulants.* Blood Coagul. Fibrinolysis, 14, 2003, p307-312.

Moore G.W., Savidge G.F., Smith M.P. *Improved detection of lupus anticoagulants by the dilute Russell's viper venom time.* Blood Coagul. Fibrinolysis, 11, 2000, p767-774.

Morita T. *Structures and functions of snake venom CLPs (C-type lectin-like proteins) with anticoagulant-, procoagulant-, and platelet-modulating activities.* Toxicon, 45, 2005, p1099-1114.

Moser M., Ruef J., Peter K., Kohler B., Gulba D.C., Paterna N., Nordt T., Kubler W., Bode C. *Ecarin clotting time but not aPTT correlates with PEG-hirudin plasma activity.* J. Thromb., 12, 2001, p165-169.

Mounier, C., Vargaftig, B., Franken, P., Verheij, H. M., Bon C. and Touqui, L. *Platelet secretory phospholipase A2 fails to induce rabbit platelet activation and to release arachidonic acid in contrast with venom phospholipases A2.* Biochim. Biophys. Acta, 1214, 1994, p88-96.

Murakami M. T., Zela S. P., Gava L. M., Michelin-Duarte S., Cintra A. C and Arni R. K. *Crystal structure of the platelet activator convulxin, a disulfide-linked $\alpha_4\beta_4$ cyclic tetramer from the venom of *Crotalus durissus terrificus*.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 310, 2003, p478-482.

Nakagaki T., Lin P. et Kisiel W. *Activation of human factor VII by the prothrombin activator from the venom of *Oxyuranus scutellatus* (Taipan snake).* Thromb Res., 65, 1992, p105-116.

Nakagaki T., Kazim A. et Kisiel W. *Isolation and characterization of a protein C activator from tropical moccasin venom.* Thrombosis Research, 58, 1990, p593-602.

Namikata S., Sato S., Yoshida M., Nishikawa T., Takenaga K. and Senga Y. *Effects of snake venom batroxobin (Defibrase) on cerebral infarction in a rat model.* Jpn. Pharmacol. Ther., 20, 1992, p2393-2405.

Naulleau G. *Les serpents de France*. Revue française d'aquariologie, 1987, 56p.

Niewiarowski S., Santos B., Serrano S. et Kuliopulos A. *Interaction of viper venom serine peptidases with thrombin receptors on human platelets*. FEBS Letters, 477, 2000, p199-202.

Okuda D. and Morita T. *Piscivostatin, heterodimeric disintegrin from the venom of Agkistrodon piscivorus piscivorus has a novel activity on platelet aggregation*. XIIIth world congress of the International Society of Toxicology, Paris, 2000.

Ouyang Chaohe, Yeh Horng-I and Huang Tur-Fu. *Purification and characterization of a platelet aggregation inducer from Calloselasma rhodostoma (Malayan pit viper) snake venom*. Toxicon, 24, 1986, p633-643.

Ouyang Chaohe and Huang Tur-Fu. *Platelet aggregation inhibitors from Agkistrodon acutus snake venom*. Toxicon, 24, 1986, p1099-1106.

Ouyang Chaohe and Huang Tur-Fu. *Inhibition of platelet aggregation by 5'-nucleotidase purified from Trimeresurus gramineus snake venom*. Toxicon, 21, 1983, p491-501.

Oyama E. and Takahashi H. *Purification and characterization of a thrombin like enzyme, elegaxobin, from the venom of Trimeresurus elegans (Sakishima-habu)*. Toxicon, 38, 2000, p1087-1100.

Park D., Kim H., Chung K., Kim D. et Yun Y. *Expression and characterization of a novel plasminogen activator from Agkistrodon halys venom*. Toxicon, 36, 1998, p1807-1819.

Peng M. L., Holt J. C. and Niewiarowski S. *Isolation, Characterization and Amino Acid Sequence of Echicetin β Subunit, a Specific Inhibitor of von Willebrand Factor and Thrombin Interaction with Glycoprotein Ib*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 205, 1994, p68-72.

Pommereuil M. *Hémostase*. Hématologie. Editions Médicales Internationales, 1995, p227-311.

Poort S.R., Rosendaal F.R., Reitsma P.H., Bertina R.M. *A common genetic variation in the 30-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis.* Blood, 88, 1996, p3698-3703.

Quehenberger P., Handler S., Mannhalter C., Pabinger-Fasching I., Speiser W. *Evaluation of a highly specific functional test for the detection of factor V Leiden.* Int. J. Clin. Lab. Res., 30, 2000, p113-117.

Ranby M., Norrman B., Wallen P. *A sensitive assay for tissue plasminogen activator.* Thromb. Res., 27, 1982, p743-749.

Rao V., Swarup S., Kini R. *The nonenzymatic subunit of pseutarin C, a prothrombin activator from eastern brown snake (Pseudonaja textilis) venom, shows structural similarity to mammalian coagulation factor V.* Blood, 102, 2003, p1347-1354.

Rao V. and Kini R. *Pseutarin C, a prothrombin activator from Pseudonaja textilis venom: its structural and functional similarity to mammalian coagulation factor Xa/Va complex.* Thromb. Haemost., 88, 2002, p611-619.

Reid H., Chan K. *The paradox in therapeutic defibrination.* Lancet i, 1968, p485-486.

Retzios A. et Markland F. *Fibrinolytic enzymes from the venoms of Agkistrodon contortrix contortrix and Crotalus basiliscus basiliscus: Cleavage site specificity towards the α -chain of fibrin.* Thrombosis Research, 74, 1994, p355-367.

Robert A., Eschwege V., Hameg H., Drouet L., Aillaud M.F. *Anticoagulant response to Agkistrodon contortrix venom (ACVtest): a new global test to screen for defects in the anticoagulant protein C pathway.* Thromb. Haemost., 75, 1996, p562-566.

Rogé J-P. et Sauvanet J. *Les serpents.* La documentation guyanaise, 1987, 32p.

Rodrigues M, Soares A., Guerra-Sa R., Rodrigues V., Fontes M. et Giglio J. *Structural and functional characterization of neuwiedase, a nonhemorrhagic fibrin(ogen)olytic metalloprotease from Bothrops neuwiedi snake venom.* Arch. Biochem. Biophys., 381, 2000, p213-224.

Rooney A.M., McNally T., Mackie I.J., Machin S.J. *The taipan snake venom time: a new test for lupus anticoagulant*. J. Clin. Pathol., 47, 1994, p497-501.

Rosing J., Govers-Riemslog J., Yukelson L. and Tans G. *Factor V activation and inactivation by venom proteases*. International Conference on Exogenous Factors affecting Thrombosis and Haemostasis, Haemostasis 31, 2001, p241-246.

Rosing J. and Tans G. *Structural and functional properties of snake venom prothrombin activators*. Toxicon, 30, 1992, p1515-1527.

Samsa G.P., Matchar D.B., Williams G.R., Levy D.E. *Cost-effectiveness of ancrod treatment of acute ischaemic stroke: results from the Stroke Treatment with Ancrod Trial (STAT)*. J. Eval. Clin. Pract., 8, 2002, p 61-70.

Samel Mari, Subbi Juhan, Siigur Jüri and Siigur Ene. *Biochemical characterization of fibrinogenolytic serine proteinases from Vipera lebetina snake venom*. Toxicon, 40, 2002, p51-54.

Sampol J., Arnoux D., Boutière B. *Manuel d'hémostase*. Paris : Editions scientifiques et médicales Elsevier, 1995, 772p.

Sanchez E., Santos C., Magalhaes A., Diniz C., Figueiredo S., Gilroy J. et Richardson M. *Isolation of a Proteinase with Plasminogen-Activating Activity from Lachesis muta muta (Bushmaster) Snake Venom*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 378, 2000, p131-141.

Santiani M. *Amphibiens et reptiles*. Découverte Nature, 2002, 127p.

Schmaier A. and Colman R. *Crotalocytin: Characterization of the timber rattlesnake platelet activating protein*. Blood, 56, 1980, p1020-1028.

Sherman D.G., Atkinson R.P., Chippendale T., Levin K.A., Ng K., Futrell N., Hsu C.Y., Levy D.E. *Intravenous ancrod for treatment of acute ischemic stroke. The STAT Study : a randomized controlled trial*. JAMA 283, 2000, p2395-2403.

Sherwood Laurelee. *Le sang et les défenses de l'organisme*. Physiologie humaine. 2nd ed. Paris : De Boeck Université, 2000, p277-286.

Sheu J.R., Huang T.F. *Ex-vivo and in-vitro antithrombotic effect of triflavin, an RGD-containing peptide*. J. Pharm. Pharmacol., 46, 1994, p58-62.

Shimokawa Ken-ichi, Shannon John D., Jia Li-Guo and Fox Jay W. *Sequence and Biological Activity of Catrocollastatin-C : A Disintegrin-Like/Cysteine-Rich Two-Domain Protein from Crotalus atrox Venom*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 343, 1997, p35-43.

Siigur E., Aaspõllu A. and Siigur J. *Sequence diversity of Vipera lebetina snake venom gland serine proteinase homologs. Result of alternative-splicing or genome alteration*. Gene, 263, 2001, p199-203.

Siigur E., Samel M., Tõnismägi K., Subbi J., Reintamm T. and Siigur J. *Isolation, properties and N-terminal amino acid sequence of a factor V activator from Vipera lebetina (Levantine viper) snake venom*. Biochimica and Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology, 1429, 1998, p239-248.

Solano C., Hogg A.L., Saal R.J., Scott D.C., Cobcroft R.G. *The use of two different APC resistance assay systems provides optimal sensitivity and specificity for diagnosing genetic APC resistance*. Blood Coagul. Fibrinolysis, 8, 1997, p268–273.

Soutar R. L. and Ginsberg J. S. *Anticoagulant therapy with ancrod*. Clinical Rev. Oncology Hematology, 15, 1993, p23-33.

Speijer H., Zwall J., Robert F. et Rosing J. *Prothrombin Activation by an Activator from the Venom of Oxyuranus Scutellatus (Taipan Snake)*. J. Biol. Chem., 261, 1986, p13258-13267.

Stevens W.K., Cote H.C.F., MacGillivray R.T.A., Nesheim M.E. *Calcium ion modulation of meizothrombin autolysis at Arg55–Asp56 and catalytic activity*. J. Biol. Chem., 271, 1996, p8062-8067.

Stocker K., Hon D. *Research, diagnostic and medicinal uses of snake venom enzymes*. Enzymes from snake venom. Pentapharm, 1998, p705-736.

Stocker K. *Applicationb of snake venom proteins in the diagnostis of hemostatic disorders*. Medical use of snake venom proteins. Pentapharm,1990, p213-252.

Subburaju S. et Kini R. *Isolation and purification of superbins I and II from Austrelaps superbis (copperhead) snake venom and their anticoagulant and antiplatelet effects*. Toxicon, 35, 1997, 1239-1250.

Suzuki K., Nishioka J. *Plasma protein S activity measured using Protac, a snake venom derived activator of protein C*. Thromb. Res., 49, 1988, p241-251.

Swaim M.W., Chiang H.S., Huang T.F. *Characterization of platelet aggregation induced by PC-3 human prostate adenocarcinoma cells and inhibited by venom peptides, trigramin and rhodostomin*. Eur. J. Cancer 32A, 1996, p715–721.

Swenson S. et Markland F. *Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes*. Toxicon, 45, 2005, p1021-1039.

Takeya H., Nishida S., Miyata T., Kawada S., Saisaka Y., Morita T. and Iwanaga S. *Factor X-activating enzyme from Russell's viper venom, (RVV-X). A novel metalloproteinase with disintegrin (platelet aggregation inhibitor)-like and C-type lectin-like domains*. J. Biol. Chem., 267, 1992, p14109-14117.

Tani A., Ogawa T., Nose T., Nikandrov N., Deshimaru M., Chijiwa T., Chang C., Fukumaki Y. et Ohno M. *Characterization, primary structure and molecular evolution of anticoagulant protein from Agkistrodon acutus venom*. Toxicon, 40, 2002, p803-813.

Taniuchi Y., Kawasaki T., Fujimura Y., Suzuki M., Titani K., Sakai Y., Kaku S., Hisamichi N., Satoh N., Takenaka T. *Flavocetin-A and -B, two high molecular mass glycoprotein Ib binding proteins with high affinity purified from Trimeresurus flavoviridis venom, inhibit platelet aggregation at high shear stress*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 1244, 1995, p331-338.

Teng Che-Ming, Hung Man-Ling, Huang Tur-Fu and Ouyang Chao-ho. *Triaglerin: a potent platelet aggregation inducer purified from Trimeresurus wagleri snake venom*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 992, 1989, p258-264.

Teng Che-Ming, Hung Man-Ling, Huang Tur-Fu and I. H. Tsai. *Trimucylin : a collagen-like aggregating inducer isolated from Trimeresurus mucrosquamatus snake venom*. Thromb. Haemost., 69, 1993, p286-292.

Tokunaga F., Nagasawa K., Tamura S., Miyata T., Iwanaga S. and Kisiel W. *The factor V-activating enzyme (RVV-V) from Russell's viper venom*. J. Biol. Chem., 263, 1988, p17471-17481.

Tomaru T., Uchida Y., Nakamura F., Sonoki H., Tsukamoto M. and Sugimoto T. *Enhancement of arterial thrombolysis with native tissue-type plasminogen activator by pretreatment with heparin or batroxobin: an angioscopic study*. Am. Heart J., 117, 1989, p275-281.

Toombs C. *New directions in thrombolytic therapy*. Current Opinion in Pharmacology, 2001, p164-168.

Toulon P., Halbmeyer W.M., Hafner G., Schmitt Y., Randgard B., Odpadlik M., Van den Eynden C., Wagner C. *Screening for abnormalities of the protein C anticoagulant pathway using the ProC Global assay. Results of a European multicenter evaluation*. Blood Coagul. Fibrinolysis, 11, 2000, p447-454.

Tu A., Baker B., Wongvibulsin S. et Willis T. *Biochemical characterization of atroxase and nucleotide sequence encoding the fibrinolytic enzyme*. Toxicon, 34, 1996, p1295-1300.

Usami Yoshiko, Suzuki Masami, Yoshida Eri, Sakurai Yoshihiko, Hirano Kazuyuki, Kawasaki Tomihisa, Fujimura Yoshihiro and Titani Koiti. *Primary Structure of Alboaggregin-B Purified from the Venom of Trimeresurus albolabris*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 219, 1996, p727-733.

Usami Y., Yoshida E., Fujimura Y., Miura S., Sugimoto M., Fukui H., Narita N., Suzuki M. and Titani K. *Alboaggregin-B and Botrocetin, Two Snake Venom Proteins with Highly Homologous Amino Acid Sequences but Totally Distinct Functions on von Willebrand Factor Binding to Platelets*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 191, 1993, p1386-1392.

Visser J. *Dangerous snakes and snakebite*. P.O. Box 20, Camps bay 8040, 1982.

Von Segesser L.K., Mueller X., Marty B., Horisberger J., Corno A. *Alternatives to unfractionated heparin for anticoagulation in cardiopulmonary bypass*. Perfusion, 16, 2001, p411-416.

Welton R. and Burnell J. *Full length nucleotide sequence of a Factor V-like subunit of oscutarin from Oxyuranus scutellatus scutellatus (coastal Taipan)*. Toxicon, 46, 2005, p328-336.

Williams S.B., McKeown L.P., Kruttsch H., Hansmann K., Gralnick, H.R. *Purification and characterization of human platelet von Willebrand factor*. Br. J. Haematol., 88, 1994, p582-591.

Willmott N., Gaffney P., Masci P. et Whitaker A. *A novel serine protease inhibitor from the Australian brown snake, Pseudonaja textilis textilis: Inhibition kinetics*. Fibrinolysis, 9, 1995, p1-8.

Wisner A., Leduc M., Bon C. *C-type lectins from snake venoms: new tools for research in thrombosis and haemostasis*. Perspectives in Molecular Toxinology. Wiley, Chichester, 2002, p357-375.

Yamada D., Sekiya F., Morita T. *Isolation and characterization of carinactivase, a novel prothrombin activator in Echis carinatus venom with a unique catalytic mechanism*. J. Biol.Chem., 271, 1996, p5200–5207.

Yamada D., Morita T. *Purification and characterization of a Ca²⁺-dependent prothrombin activator, multactivase, from the venom of Echis multisquamatus*. J. Biochem., 122, 1997, p991-997.

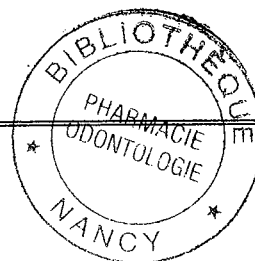
Yoshida E., Fujimura Y., Ikeda Y., Takeda I., Yamamoto Y., Nishikawa K., Miyataka K., Oonuki M., Kawasaki T., Katayama M. *Impaired high-shear-stress-induced platelet aggregation in patients with chronic renal failure undergoing dialysis*. Br. J. Haematol., 89, 1995, p861-867.

Zhang Y., Wisner A., Xiong Y. et Bon C. *A new plasminogen activator isolated from snake venom*. Toxicon, 33, 1995, 1132p.

www.reptilesdumonde.ch

DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 29 juin 2006

**DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR
EN PHARMACIE**présenté par : **Christelle RENARD**Sujet :**L'action des venins ophidiens sur l'hémostase.**Jury :

Président : Mme Janine SCHWARTZBROD, Professeur

Juges : Mme Jocelyne COLLOMB, Maître de Conférences
M. René PAULUS, Pharmacien

Vu,
Nancy, le 18 Mai 2006

Le Président du Jury Le Directeur de Thèse

Mme Janine SCHWARTZBROD,
Professeur**Mme Jocelyne COLLOMB**
Maître de Conférences

Vu et approuvé,
Nancy, le 19 mai 2006

Doyen de la Faculté de Pharmacie
De l'Université Henri Poincaré – Nancy 1,

Chantal FINANCE

Vu,
Nancy, le 18 mai 2006

Le Président de l'Université Henri Poincaré – Nancy 1,

Jean-Pierre FINANCE

N° d'enregistrement : 102535

N° d'identification : PH Nancy 06 n° 86

TITRE :

L'action des venins ophidiens sur l'hémostase.

Thèse soutenue le 29 juin 2006

Par Christelle Renard

RESUME :

Les venins des Vipéridés, Crotalidés, certaines espèces d'Elapidés australiens et quelques Colubridés sont riches en enzymes qui ont une action multifactorielle sur l'hémostase. Elles sont capables d'agir aussi bien sur l'agrégation plaquettaire que sur la cascade de la coagulation ou sur la fibrinolyse, avec un effet activateur ou inhibiteur. De plus, une même molécule peut posséder des activités différentes.

Les recherches effectuées sur de nombreuses protéines ophidiennes ont permis de découvrir leurs structures ainsi que leurs modes d'action. Elles sont aujourd'hui utilisées dans des tests d'hémostase, en recherche fondamentale et comme outils thérapeutiques. Elles ont également des utilisations potentielles en tant qu'agents antithrombotiques, anti-infectieux ou anti-cancéreux.

MOTS CLES :

Serpents Vipères Venins Hémostase Thrombine Batroxobine

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Mme Jocelyne COLLOMB, Maître de Conférences	Parasitologie	Expérimentale <input type="checkbox"/>
		Bibliographique <input checked="" type="checkbox"/>
		Thème <input type="checkbox"/>

Thèmes : 1 - Sciences fondamentales
 3 - Médicament
 5 - Biologie

2 - Hygiène / Environnement
4 - Alimentation – Nutrition
6 – Pratique professionnelle