

## LES VENINS DES *ATRACTASPIS*

Ducancel F<sup>1</sup>, Goyffon M<sup>2</sup>

1. CEA/DSV/iBiTec-Saclay/SPI/LIAS, Bt 152, CE de Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette Cedex, France.

2. USM 0505, Ecosystèmes et Interactions Toxiques, Muséum national d'histoire naturelle, 18 rue Buffon, 75231 Paris Cedex 05, France.

*Med Trop* 2008 ; **68** : 340-347

**RÉSUMÉ** • Les serpents du genre *Atractaspis* appartiennent à la famille des Atractaspididae au sein de la superfamille des Cénophidiens. Ces serpents fouisseurs font des Atractaspididés, avec les Colubridés, les Elapidés et les Vipéridés, la quatrième famille de serpents venimeux. On les retrouve dans tous les pays d'Afrique sub-saharienne, ainsi qu'en Israël et dans la partie sud-ouest de la péninsule arabique (Jordanie, Sultanat d'Oman, Arabie Saoudite). Dix-huit espèces ont été décrites à ce jour, dont les venins sont principalement cardiotoxiques, avec également des manifestations cliniques de type hémorragique et nécrotique. Leur toxicité est très variable d'une espèce à l'autre. Les cas les plus documentés de décès par piqûre d'*Atractaspis* révèlent une mort rapide (en moins d'une heure) par arrêt cardiaque consécutive à des spasmes coronariens et à un blocage auriculo-ventriculaire sévère. Les venins des *Atractaspis* renferment entre 50 et 100 espèces moléculaires différentes, parmi lesquelles les sarafotoxines, analogues structuraux et fonctionnels des endothélines de mammifères, sont majoritaires. On trouve également de nombreuses protéases ainsi que des phospholipases. Il existe une très grande diversité moléculaire des sarafotoxines au sein d'un même venin et d'une espèce à l'autre. Récemment, un premier sérum polyclonal équin, capable de neutraliser l'activité toxique du venin d'*Atractaspis microlepidota*, a été obtenu.

**MOTS-CLÉS** • Venins - *Atractaspis* - Sarafotoxines - Endothélines - Vasoconstriction.

### ATRACTASPIS VENOMS

**ABSTRACT** • Snakes of the *Atractaspis* genus belong to the Atractaspididae family that is part of the Caenophidia superfamily. Along with Colubrids, Elapids, and Viperids, Atractaspid burrowing snakes form the four families of venomous snakes. Atractaspid snakes are found in sub-Saharan Africa as well as in Israel and parts of the southwestern Arabic peninsula (Jordan, Oman, and Saudi Arabia). Study of the 18 *Atractaspis* species described up to now has shown that venoms have mainly cardiotoxic characteristics with hemorrhagic and necrotic action. Venom toxicity varies from one species to another. The best-documented cases of fatal Atractaspis snakebite describe death as rapid (less than one hour) due to cardiac arrest following severe coronary spasm and atrioventricular block. *Atractaspis* venom contains between 50 and 100 different molecular species. The predominant species is sarafotoxin that is a structural and functional analog of mammal endothelins. It also contains numerous proteases as well as phospholipases. Saratoxins exhibit great molecular diversity within the same venom as well as from one species to another. Recently a polyclonal equine serum capable of neutralizing the toxic action of *Atractaspis microlepidota* venom has been developed.

**KEY WORDS** • Venoms - *Atractaspis* - Sarafotoxins - Endothelins - Vasoconstriction.

### LES SERPENTS DU GENRE *ATRACTASPIS* : DESCRIPTION, VENINS, TOXICITÉ ET ENVENIMATIONS

#### Les serpents du genre *Atractaspis*

Les serpents du genre *Atractaspis* appartiennent à la famille des Atractaspididés au sein de la superfamille des Cénophidiens, ce qui en fait, avec les Colubridés, les Elapidés et les Vipéridés, la quatrième famille de serpents venimeux. Les premières descriptions de serpents du genre *Atractaspis* datent du milieu du XIX<sup>e</sup> siècle (1-3). Il s'agit de serpents de petite taille (moins d'un mètre en général), de couleur grise, noire ou brune (Fig. 1a), avec parfois le ventre blanc, qui vivent sous terre dans les sols meubles et/ou dans des galeries pré-existantes dans des zones plutôt désertiques.

Ces serpents dit « fouisseurs » sont ovipares, se nourrissent de lézards, de serpents, d'amphibiens et de petits rongeurs. Ils ressemblent aux Colubridés, tout en présentant des caractéristiques propres : une petite tête, un maxillaire très réduit, avec une articulation complexe avec l'os préfrontal comme chez les Vipéridés. On parle plus de piqûres que de morsures, puisque de manière unique chez les reptiles, les *Atractaspis* sont capables d'injecter leur venin la gueule fermée grâce à deux crochets canaliculés et horizontaux, capables de pivoter latéralement (serpents solénoglyphes), dont un seul dépasse à la fois lors d'un mouvement latéral de la tête (Fig. 1b). Dix-huit espèces ont été décrites à ce jour, que l'on retrouve dans tous les pays d'Afrique sub-saharienne, ainsi qu'en Israël et dans la partie sud-ouest de la péninsule Arabique (Jordanie, Sultanat d'Oman, Arabie Saoudite). Deux types de glandes à venin ont été observées chez les serpents du genre *Atractaspis* : i) en forme de tube de plusieurs centimètres de long avec une asymétrie des deux glandes (*A. engaddensis*, et *microlepidota*), et, ii) en forme de sac (*A. irregularis*, *bibronii*, *fallax*).

• Correspondance : frederic.ducancel@cea.fr.

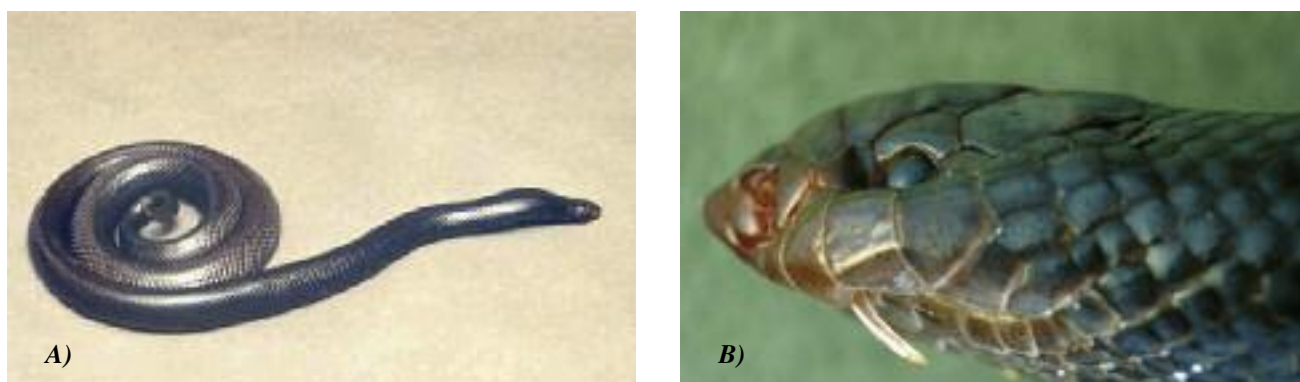


Figure 1. Images d'un serpent *Atractaspis engaddensis*. A) Spécimen en position mixte défensive/offensive : cou arc-bouté, corps lové avec l'extrémité de la queue qui remonte. B) Illustration de la capacité des *Atractaspidés* à faire émerger un seul crochet la gueule fermée.

### Composition et toxicité des venins d'*Atractaspis*

Les venins des *Atractaspis* sont principalement cardiotoxiques, avec également des manifestations cliniques de type hémorragique et nécrotique, et leur toxicité est très variable d'une espèce à une autre. Ainsi, les doses létales 50 (LD<sub>50</sub>) en injection intraveineuse chez la souris sont respectivement de : 75, 80, 500, 2000 et > 3000 ng/g de poids corporel, pour *A. engaddensis*, *microlepidota*, *bibronii*, *dahomeyensis*, et *micropholis*. La plupart de ces serpents sont inoffensifs ou trop petits pour provoquer une envenimation grave, toutefois une dizaine de cas de décès d'enfants et d'adultes consécutifs à des piqûres par *Atractaspis microlepidota*, *irregularis* et *engaddensis*, a été décrite à ce jour (3-9). La mort survient alors rapidement, en moins d'une heure, par arrêt du cœur consécutivement à un syndrome coronarien aigu, et à un blocage auriculo-ventriculaire sévère (10). Aucune neurotoxicité post- ou pré-synaptique n'a été observée en laboratoire sur des préparations nerf/muscle en présence de venin complet d'*Atractaspis engaddensis* (11). D'un point de vue moléculaire, les venins des *Atractaspis* renferment de nombreux composés, comme ont pu le révéler différentes études protéomiques réalisées par spectrométrie de masse et gels bi-dimensionnels (12-14). Ainsi, une centaine de composés dont la masse varie de 600 à 65 000 Daltons a été identifiée après analyse des venins bruts d'*Atractaspis microlepidota* et *irregularis*. Dans le cas du venin d'*A. microlepidota* (14, 15), on observe de nombreuses petites molécules comprises entre 600-4000 daltons, et un ensemble de protéines dont la masse moléculaire va de 35 à 66 kDa. Plusieurs spots protéiques sont également visibles pour des masses d'environ 12-13 kDa. Le séquençage de l'extrémité N-terminale de certains de ces composés a révélé de très fortes similitudes avec des phospholipases de types A2 pour les composés de 12-13 kDa, et avec une protéase pour le composé de 36 kDa. Les petites molécules sont très majoritairement représentées par les sarafotoxines, des analogues structuraux et fonctionnels des endothélines de mammifères (voir ci-après).

### Envenimation non mortelle par un *Atractaspis* sp.

En 1999, un cas bien documenté d'envenimation non mortelle chez l'homme par un *Atractaspis engaddensis* a été publié (16). L'accident concernait un zoologiste de 69 ans lors d'une séance de prélèvement de venin d'un groupe d'*Atractaspis engaddensis*. La piqûre a eu lieu au niveau de l'index droit. Dans les 5 minutes qui ont suivi la piqûre, des signes locaux d'envenimation sont apparus : fort œdème, érythème et engourdissement. Au bout de 15 minutes, les premiers effets toxiques ont été notés : faiblesse générale, transpiration abondante et pâleur, suivis de fluctuations de la conscience. Au cours des 15 minutes suivantes, la conscience du patient est redevenue normale, laissant place à des vomissements et au développement d'une diarrhée aqueuse sans saignement. La tension du patient était alors de 170/70 au lieu de 140/80 normalement. Le patient a été admis à l'hôpital 2 heures après la piqûre où il a été mis sous perfusion de sérum physiologique. Après examen, il est apparu anxieux, avec un œdème s'étendant au-delà de l'avant-bras, associé à un hématome localisé au niveau du doigt piqué, et une perte de sensibilité locale. D'un point de vue cardiaque, 2 heures après la piqûre, a été notée une augmentation significative de la pression sanguine diastolique avec des valeurs autour de 180/110, alors que le rythme cardiaque restait inchangé. Trois heures plus tard, la pression sanguine était revenue à sa valeur normale. Au cours des heures qui ont suivi, des vésicules séreuses sont également apparues au niveau de l'index, et l'œdème s'est étendu jusqu'à l'épaule. Au second jour, l'œdème a commencé à se résorber, la sensibilité dans le bras est progressivement revenue à la normale, et la pression sanguine s'est maintenue à sa valeur de référence. Dans les semaines qui ont suivi, les vésicules se sont progressivement résorbées, et au bout d'un mois, le patient avait récupéré l'ensemble de la fonctionnalité de son bras, de sa main et de son doigt, avec toutefois la persistance pendant plusieurs mois d'une décoloration et d'une perte de sensibilité locales.

L'électrocardiogramme effectué lors de l'admission de ce patient à l'hôpital a montré un rythme cardiaque sinusal, une absence de bloc auriculo-ventriculaire, avec toute-

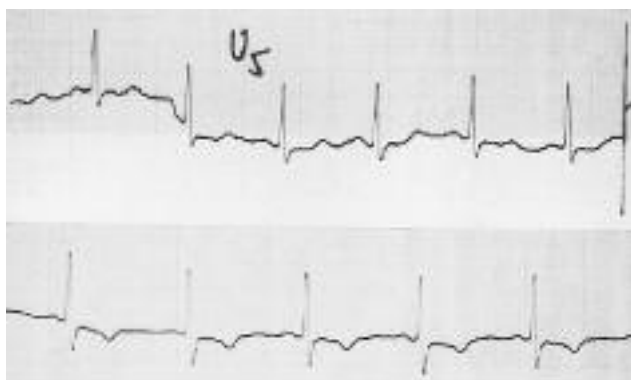


Figure 2. En haut, ECG lors de l'admission à l'hôpital. En bas ECG 24 heures après la piqûre : notez l'inversion des ondes T.

fois une réduction de l'amplitude des ondes T dans les dérivations DI et aVL. Après 24 heures, l'ECG montra une nouvelle inversion des ondes T (Fig. 2) dans les dérivations V5 et V6, qui a progressivement régressé au cours des jours suivants.

Pendant son hospitalisation, aucune arythmie n'a été observée, aucune douleur au niveau de la poitrine n'est apparue, et l'ensemble des enzymes cardiaques est resté à un niveau normal. Un test d'effort ainsi qu'une angiographie multiplane effectués 5 mois après la piqûre, n'ont pas révélé de signe d'ischémie cardiaque et ont montré un fonctionnement ventriculaire gauche normal.

## LES SARAFOTOXINES : LES COMPOSÉS MAJEURS DES VENINS DES SERPENTS DU GENRE *ATRACTASPIS*

### Les sarafotoxines

Les sarafotoxines (SRTX) forment avec les endothélines (ET) une famille homogène de puissants vasoconstricteurs (17, 18). Présentes uniquement et en grandes quantités dans les venins des serpents du genre *Atractaspis*, elles doivent leur appellation au nom hébreu de l'espèce *Atractaspis engaddensis*, *Saraf Ein Gedi*, dans laquelle elles furent isolées et caractérisées pour la première fois (19, 20). Les endothélines jouent un rôle important dans la régulation des fonctions vasculaires, ainsi que dans diverses manifestations cardiopatho-physiologiques, telles que : l'hypertension, les défaillances rénales aiguës, ou l'angine de poitrine (21). Les SRTXs et les ETs ont environ 60% d'homologie de séquences. Elles présentent toutes un motif structural commun composé de 21 acides aminés et de deux ponts disulfure invariants entre les cystéines +1/+15 et +3/+11. Les SRTXs et les ETs adoptent la même conformation de type CSH (Cystein stabilized  $\alpha$  helical motif) caractérisée par i) une structure étendue des 4 acides aminés N-terminaux, ii) un coude  $\beta$  entre les positions +5 et +8, iii) une conformation en hélice  $\alpha$  du segment Lys<sub>9</sub>-Cys<sub>15</sub>, et, iv) l'absence de conformation du domaine C-terminal (Fig. 3).

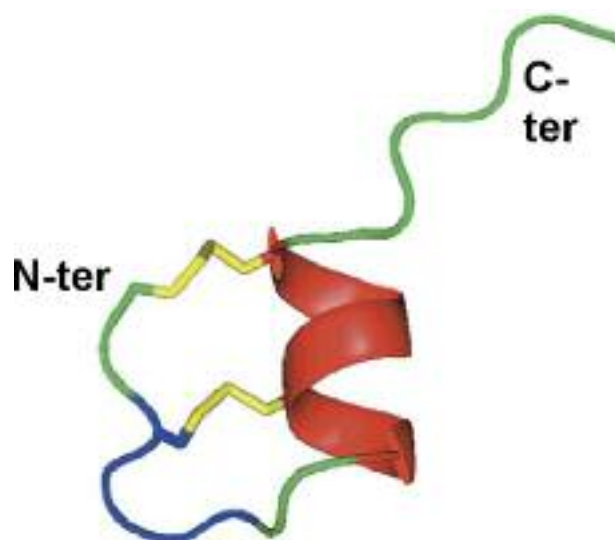


Figure 3. Structure tridimensionnelle de SRTX-b (PDB : 1srb). On note une organisation de type CSH (Cystein stabilized  $\alpha$ Helical motif) : le coude  $\beta$  est en bleu, les extrémités N- et C-terminales non structurées sont en vert, l'hélice  $\alpha$  est en rouge, et les deux ponts disulfure sont représentés en jaune.

On distingue à ce jour deux familles de SRTXs. La première est constituée de 7 isoformes de 21 acides aminés présentes dans les venins d'*Atractaspis engaddensis* et *Atractaspis bibroni*. Elles ont été isolées par extraction/purification à partir du venin (20, 22) ou par clonage de leurs précurseurs (23). Les trois premières notées SRTX-a, b et c l'ont été à partir du venin d'*Atractaspis engaddensis* dont environ 30% des composés correspondent à des SRTXs. La comparaison de leurs structures primaires souligne les fortes homologies qui existent entre elles avec au minimum 85 % d'identité stricte dont une même extrémité C-terminale. Les isoformes a et b qui présentent une même toxicité avec une DL<sub>50</sub> chez la souris d'environ 0,01  $\mu$ g/g, ne diffèrent que par une unique substitution à la position +13 : asparagine en tyrosine. La SRTX-c qui est la plus abondante dans le venin est aussi 30 fois moins toxique (DL<sub>50</sub> = 0,3  $\mu$ g/g). Les trois autres isoformes notées SRTX-a1, b1 et e, ont été caractérisées après clonage de leur précurseur. Une seule sarafotoxine a, à ce jour, été caractérisée dans le venin d'*Atractaspis bibroni* : la bibrotoxine (BTX), qui diffère de la SRTX-b uniquement par la présence d'une alanine en position +4 au lieu d'une lysine (Fig. 4b). La comparaison avec les endothélines de mammifères (Fig. 4a et c), révèle environ 60% d'homologie avec les SRTXs, les différences les plus significatives se situant principalement à l'extrémité coude  $\beta$ .

La seconde famille renferme les SRTXs dites « longues » car présentant une extension de leurs extrémités C-terminales. Ces dernières n'ont été identifiées à ce jour que dans les venins d'*Atractaspis microlepidota* (12, 14), et d'*Atractaspis irregularis* (13), par clonage de leurs précurseurs et analyse de la composition de leurs venins par spectrométrie de masse. Les molécules majoritaires identifiées dans ces deux venins sont respectivement composées de 24 et 25 acides aminés. L'extension C-terminale des SRTXs

	1	5	10	15	21	24	25	31														
a)	C	T	C	F	T	Y	K	D	K	K	C	V	Y	Y	C	E	L	D	E	I	W	ET-3
	C	T	C	F	T	Y	F	D	K	K	C	V	Y	Y	C	E	L	D	E	I	W	ET-3 <sub>11</sub>
	C	S	C	S	S	L	H	D	K	K	C	V	Y	F	C	E	L	D	E	I	W	ET-1
	C	S	C	S	S	L	H	D	K	K	C	V	Y	F	C	E	L	D	E	I	W	ET-1 <sub>11</sub>
b)	C	S	C	K	D	H	T	D	K	K	C	L	N	F	C	E	Q	D	V	I	W	SRTX-a
	C	S	C	K	D	H	T	D	K	K	C	L	N	F	C	E	Q	D	V	I	W	SRTX-a1
	C	S	C	K	D	H	T	D	K	K	C	L	N	F	C	E	Q	D	V	I	W	SRTX-b
	C	S	C	K	D	H	T	D	K	K	C	L	N	F	C	E	Q	D	V	I	W	SRTX-b1
c)	C	T	C	N	D	H	T	D	K	K	C	L	N	F	C	E	Q	D	V	I	W	SRTX-c
	C	T	C	N	D	H	T	D	K	K	C	L	N	F	C	E	Q	D	V	I	W	SRTX-c
	C	S	C	A	D	H	T	D	K	K	C	L	N	F	C	E	Q	D	V	I	W	ETx
	C	S	C	A	D	H	T	D	K	K	C	L	N	F	C	E	Q	D	V	I	W	ETx
d)	C	S	C	N	D	I	N	D	K	K	C	M	Y	F	C	E	Q	D	V	I	W	SRTX-m
	C	S	C	N	D	I	N	D	K	K	C	M	Y	F	C	E	Q	D	V	I	W	SRTX-m1
	C	S	C	N	D	I	N	D	K	K	C	M	Y	F	C	E	Q	D	V	I	W	SRTX-m2
	C	S	C	N	D	I	N	D	K	K	C	M	Y	F	C	E	Q	D	V	I	W	SRTX-m3
	C	S	C	N	D	I	N	D	K	K	C	M	Y	F	C	E	Q	D	V	I	W	SRTX-m4
e)	C	S	C	N	D	H	T	D	K	K	C	V	Y	F	C	E	Q	D	V	I	W	SRTX-m5
	C	S	C	N	D	H	T	D	K	K	C	V	Y	F	C	E	Q	D	V	I	W	SRTX-m5
	C	S	C	N	D	H	T	D	K	K	C	V	Y	F	C	E	Q	D	V	I	W	SRTX-m5
f)	C	S	C	A	D	H	T	D	K	K	C	L	N	F	C	E	Q	D	V	I	W	SRTX-11
	C	S	C	A	D	H	T	D	K	K	C	L	N	F	C	E	Q	D	V	I	W	SRTX-12
	C	S	C	A	D	H	T	D	K	K	C	L	N	F	C	E	Q	D	V	I	W	SRTX-13

Figure 4. Alignement des séquences en acides aminés des endothélines humaines et des sarafotoxines. A) endothélines humaines courtes et longues. B) Sarafotoxines de 21 acides aminés d'A. engaddensis. C) Bibrotoxine d'A. bibroni. D) Sarafotoxines de 24 acides aminés d'A. microlepidota. E) Sarafotoxines de 25 acides aminés d'A. irregularis. F) Variabilité en acides aminés. Les acides aminés invariants sont en caractère gras. La fréquence des différents acides aminés aux positions non conservées est indiquée en indice.

d'Atractaspis microlepidota étant « -D<sup>22</sup>-E<sup>23</sup>-P<sup>24</sup> », ou « -E<sup>22</sup>-N<sup>23</sup>-V<sup>24</sup> » (14), alors que chez Atractaspis irregularis elle est de type « -I<sup>22</sup>-N<sup>23</sup>-R<sup>24</sup>-N<sup>25</sup> », ou « -V<sup>22</sup>-N<sup>23</sup>-R<sup>24</sup>-N<sup>25</sup> » (13). Les SRTXs longues présentent la structure tridimensionnelle de type CSH « commune » aux sarafotoxines et endothélines de 21 acides aminés, l'extension C-terminale n'adoptant pas de conformation particulière. Trois isoformes d'endothélines longues constituées de 31 acides aminés, et biologiquement actives au niveau pulmonaire, ont également été décrites (24-26). Ces trois isoformes résultent du clivage par une chymase du précurseur des endothélines (la big-endothéline) et ont des extensions C-terminale différentes « -V<sup>22</sup>-N<sup>23</sup>-T<sup>24</sup>-P<sup>25</sup>-E/G<sup>26</sup>-H/R<sup>27</sup>-I/V<sup>28</sup>-V<sup>29</sup>-P<sup>30</sup>-Y<sup>31</sup> », de celles des SRTXs-longues.

**Cibles cellulaires et mode d'action des SRTXs**

Les SRTXs et les ETs se lient aux muscles lisses de plusieurs organes : intestin, utérus, aorte, vaisseaux sanguins, mais aussi au muscle cardiaque et à différents tissus cérébraux, via des récepteurs identiques (27-30). Ainsi, il a été démontré que la SRTX-b se lie spécifiquement avec une forte affinité, de manière saturable et réversible à des préparations de membranes auriculaires (20). Cette liaison est efficacement inhibée par les SRTX-a, SRTX-b et SRTX-c, avec des concentrations inhibitrices moyennes (IC<sub>50</sub>) respectives de 30, 25 et 100 nM. D'autres expériences de liaison ont également montré que la <sup>125</sup>I-SRTX-b reconnaît des sites dans le cerveau de rat, et plus particulièrement au niveau de cervelet (K<sub>D</sub>=3,5nM), ou du cortex cérébral (K<sub>D</sub>=0,3nM) (29). Par ailleurs, il a été démontré que : i) l'activité biologique des sarafotoxines

est associée à une mobilisation d'ions Ca<sup>2+</sup> intracellulaires, ii) que la liaison de la SRTX-b iodée n'est pas affectée par l'action de bloqueurs spécifiques des canaux Ca<sup>2+</sup> tels le verapamil ou la nimodipine, et iii) que la liaison de la SRTX-b induit l'hydrolyse des phosphoinositides. L'ensemble de ces résultats suggère que les sarafotoxines ainsi que les endothélines utilisent la voie de transduction du signal par les phosphoinositides via des récepteurs spécifiques couplés à une protéine G qui activerait des phospholipases de type C et D. Plusieurs sous-types de récepteurs reconnus par les SRTXs et les ETs, ont été identifiés (31-34). Il s'agit de protéines glycosylées (35, 36) dont la taille varie entre 30 et 70 kDa, contenant sept domaines transmembranaires (Fig. 5). L'interaction des endothélines induit une série de réponses fonctionnelles via l'activation de la phospholipase C (PLC) et d'une protéine de liaison à la guanosine triphosphate 5GTP. L'activation de la PLC induit l'hydrolyse du phosphatidylinositol-4-5-biphosphate (PIP<sub>2</sub>), et la formation de 1, 4, 5-inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>) et l'accumulation du 2-diacylglycérol (DAG). La présence d'IP<sub>3</sub> stimule la libération de calcium par les organelles intracellulaires, incluant celles du réticulum endoplasmique. Le calcium s'associe au DAG, pour activer la MLCK (Myosine Light Chain Kinase), qui va induire la vasoconstriction.

Les isoformes ET-1 et ET-2 ont des affinités similaires pour ET<sub>A</sub>-R, alors que ET-3 reconnaît 1000 fois moins bien le sous-type ET<sub>A</sub>-R. La seconde famille de récepteurs : ET<sub>B</sub>-R apparaît moins sélective puisque les trois isoformes d'endothélines ainsi que les sarafotoxines interagissent avec la même affinité. Pour pouvoir rendre compte de la distribution

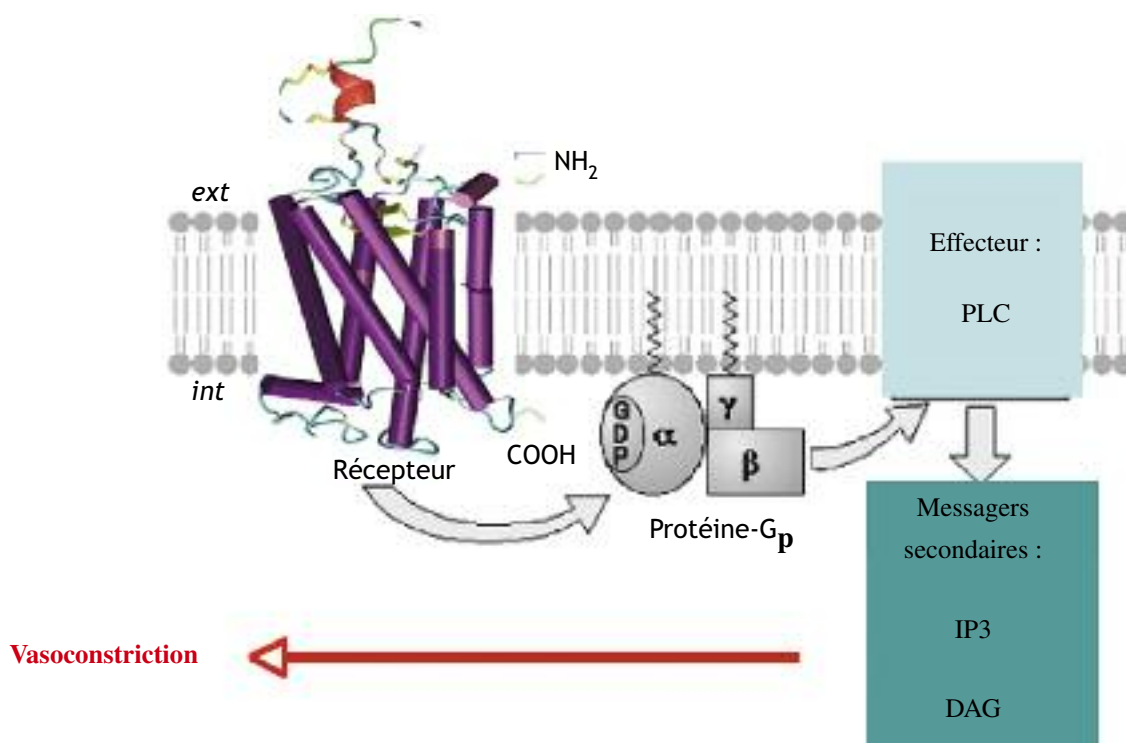


Figure 5. Représentation schématique de l'activation d'un récepteur ETR couplé à une protéine-G, par une sarafotoxine.

tissulaire des sites de fixation des endothélines, ainsi que des différents effets biologiques mis en évidence, l'existence d'autres sous-types de récepteurs doit être postulée. Ainsi, il a récemment été suggéré que la capacité de résistance de la mangouste d'Égypte à de très fortes concentrations de SRTX-b ou d'ET-1, serait due à une nouvelle famille de sites de liaison spécifiques des SRTXs et des ETs localisés au niveau du cerveau et des tissus cardiovasculaires (37).

D'autre part, un nouveau sous-type de récepteurs aux endothélines, nommé  $ET_{B1}$ -R a été mis en évidence dans différentes régions du cerveau et de l'atrium. Il est caractérisé par des sites de haute affinité de l'ordre du picomolaire pour les trois ETs ainsi que pour les SRTX-b et c (38). L'existence d'un sous-type de récepteur spécifique de l'ET-3 ( $ET_C$ -R) a été rapportée chez la grenouille *Xenopus laevis* (39). Enfin, un sous-type noté  $ET_{B2}$ -R qui lie les trois endothélines humaines avec une affinité nanomolaire équivalente, alors que les SRTX-b et -c sont respectivement reconnus avec des affinités 100 et 1000 fois inférieures, a lui été mis en évidence chez la caille (40).

### Relations structure/fonction des sarafotoxines et des endothélines

De nombreuses études structure/fonction ont été menées afin d'identifier le site fonctionnel par lequel les endothélines reconnaissent leurs récepteurs. Ainsi, la présence d'une sérine ou d'une thréonine en position +2 est importante pour obtenir une forte activité vasoconstrictrice. Une autre étude (41) a révélé l'importance de l'extrémité C-

terminale d'ET-1, en particulier du tryptophane 21, ainsi que des 2 ponts disulfure dans son activité biologique. De plus, des expériences de modification chimique ont établi l'importance fonctionnelle (activité constrictrice sur des artères pulmonaires de rat) des groupes amino et carboxy terminaux, ainsi que celle des groupements carboxyliques des acides aspartique 8 et glutamique 10 (42). Ces résultats sont confirmés par le fait que 7 acides aminés sont invariants pour l'ensemble des isopeptides SRTXs et ETs : Cys1/3 et 11/15, Asp8, Glu10, Trp21, la plus grande variabilité en séquence au sein de cette famille de molécules étant observée au niveau du coude  $\beta$  entre les acides aminés +5 et +8. Enfin, l'étude des propriétés de liaison d'une SRTX longue (14), a révélé l'incapacité de ces SRTXs longues à entrer en compétition avec la SRTX-b (constituée de 21 acides aminés) vis-à-vis de la liaison aux récepteurs aux endothélines. Ce résultat, suggère que l'extrémité C-terminale des SRTX longues pourrait être responsable d'une modulation de l'affinité et/ou de la spécificité de liaison de ces toxines pour ces mêmes récepteurs.

### Précurseurs et gènes des sarafotoxines

Nous avons précédemment mentionné que les SRTXs sont surproduites dans les venins, alors que les ETs sont détectées à de faibles concentrations chez les mammifères. Dans le but d'étudier le métabolisme par les glandes à venin des SRTXs, nous avons entrepris l'étude de la structure des précurseurs codant les sarafotoxines, puis comparé cette dernière à celle des précurseurs des ETs. Les endothélines sont

produites sous la forme de «big-ET» : pro-forme inactive constituée de 39 acides aminés, issues de la maturation de longs précurseurs de 178 à 224 acides aminés (43). Finalement, une molécule d'endothéline biologiquement active est générée par molécule de précurseur, après action de l'endothelin-converting-enzyme (ECE) spécifique du lien peptidique -Trp<sub>21</sub>-Val<sub>22</sub>- (44).

À ce jour, deux types de précurseurs des sarafotoxines différents entre eux et par rapport à ceux des endothélines ont été caractérisés. Dans le cas d'*Atractaspis engaddensis* (23), et d'*Atractaspis microlepidota* (14), nous avons mis en évidence des précurseurs dit « poly-cistroniques » en ce sens qu'une molécule de précurseur code pour plusieurs molécules (jusqu'à 12) de sarafotoxines. Cette organisation dite en « chapelet » est unique par sa régularité au sein des précurseurs codant des toxines de serpent à ponts disulfure. Les différentes copies de sarafotoxines sont séparées les unes des autres par un peptide « espaceur » de 19, 20 ou 24 acides aminés, conservé au sein d'un même précurseur, et ne présentant aucun point commun avec les 18 acides aminés qui forment les big-endothélines. Au total, chez *A. engaddensis* ce sont cinq isoformes différentes de sarafotoxines notées : SRTX-a, a1, b, e, et c, qui sont codées. L'isoforme SRTX-c qui est la plus abondante dans le venin, est également la plus représentée au sein du précurseur, ce qui suggère une maturation complète de ce dernier. Le second précurseur poly-cistronique est celui qui code les sarafotoxines longues (de 24 acides aminés) d'*A. microlepidota* (14). Bien qu'incomplet le fragment cloné, révèle la présence de 5 isoformes différentes notées SRTX-m à -m4 (Fig. 4d). La découverte de ces précurseurs « poly-cistroniques » semble constituer une stratégie simple, économique et efficace d'amplification de la production des SRTXs dans les venins en question. Toutefois, cette structure pose le problème du processus de maturation qui aboutit à la libération dans la lumière de la glande à venin des isoformes de SRTXs. Les enzymes responsables de cette maturation ne sont pas connues à ce jour.

Dans le cas du clonage des précurseurs des sarafotoxines d'*A. irregularis* (13), nous avons été surpris d'identifier des précurseurs mono-cistroniques codant les 3 isoformes de sarafotoxines longues de 25 acides aminés présentes dans le venin : SRTX-i1, i2 et i3 (Fig. 4e). Bien qu'ils soient mono-cistroniques, les précurseurs des SRTXs d'*A. irregularis* ne présentent aucune homologie d'organisation ni de séquence avec ceux des précurseurs des endothélines,

Bien que SRTXs et ETs forment une même famille d'isopetides vasoactifs, nous avons vu qu'ils ne sont pas issus de précurseurs similaires. La présence de répétitions au sein des pro-polypeptides codant les SRTXs suggère fortement la duplication d'un exon ancestral codant un même motif peptidique constitué d'un lien « espaceur » puis d'une séquence de sarafotoxine. La diversité de structure primaire des répétitions résulte probablement d'évènements mutationnels plus récents à l'origine des différentes isoformes de SRTXs. Le clonage et l'analyse d'un fragment d'ADN génomique codant la SRTX-c a confirmé cette hypothèse (45). En effet, l'exon

code pour une séquence « espaceur » et une sarafotoxine. Une structure génomique similaire existe probablement au niveau du gène des SRTXs d'*A. microlepidota* comme le laissent présager les caractéristiques structurales communes à ces deux familles de précurseurs poly-cistroniques (46,47) Le clonage et la caractérisation des gènes des endothélines démontrent un découpage en cinq exons différents, qui ne présentent aucune similitude d'organisation, de structure ni de séquence avec l'exon de la SRTX-c (48-52). Ainsi, et en dépit des fortes homologues de structure et d'activité biologique existant entre les SRTXs et les ETs, leurs gènes présentent des organisations différentes, suggérant des chemins évolutifs distincts.

### Un premier sérum antivenimeux efficace contre *Atractaspis microlepidota*

Jusqu'à l'année dernière, aucun sérum antivenimeux n'était disponible en cas d'envenimation par des serpents du genre *Atractaspis*. Très récemment, un antiserum bivalent car dirigé à la fois contre les envenimations provoquées par deux serpents d'Arabie Saoudite : *Walterinnesia aegyptia* (cobra noir du désert) et *Atractaspis microlepidota* (vipère taupe), a été obtenu (10). La démarche expérimentale suivie est très originale, puisqu'elle a consisté à utiliser comme antigène, le produit du couplage chimique entre la fraction « sarafotoxines » du venin d'*A. microlepidota*, qui contient toute la toxicité du venin complet, et la principale fraction toxique TIII du venin de *W. aegyptia*. La fraction de conjugués ainsi obtenue, est caractérisée par une toxicité (DL<sub>50</sub>) de 408,0 µg/kg, au lieu de 10,0 et 53,5, respectivement pour les fractions « sarafotoxines » et T<sub>III</sub>. L'immunisation de chevaux avec la fraction d'immunoconjugués a duré 8 mois et s'est poursuivie pendant 2 mois supplémentaires par l'injection des deux fractions toxiques. L'immunsérum ainsi généré a été extrait, puis traité enzymatiquement afin de préparer des fragments F(ab')<sub>2</sub>. Cet anti-sérum protège les souris et les rats contre les effets toxiques des deux venins respectivement à hauteur de 20 et 50 DL<sub>50</sub> pour *A. microlepidota* et *W. aegyptia*. Qui plus est, il est capable de protéger tous les rats, si on administre l'anti-sérum par voie intraveineuse au plus tard 5 minutes après injection d'une dose minimale mortelle (DMM), soit 33,4 µg/kg, de venin d'*A. microlepidota*. De même, cet anti-sérum neutralise complètement les manifestations hémorragiques et nécrotiques du venin d'*A. microlepidota*, et ce aussi bien *in vitro*, qu'*in vivo*. Enfin, le prétraitement de lapins avec l'anti-sérum empêche toutes les manifestations cardiaques induites par le venin d'*A. microlepidota*.

Cette stratégie originale d'immunisation a donc i) permis de contourner la très faible immunogénicité des sarafotoxines, due à leur faible masse moléculaire (2900 daltons environ), comme l'indique l'impossibilité des auteurs de ce travail à obtenir un antiserum protecteur par immunisation avec le venin complet d'*A. microlepidota*, et ii) d'obtenir le premier anti-sérum efficace en cas d'envenimation par un serpent du genre *Atractaspis*.

---

## CONCLUSION

---

L'ensemble des résultats relatés dans cet article, indique que certains venins des serpents du genre *Atractaspis* sont susceptibles d'être mortels pour l'homme, à la suite de dérèglements du système cardio-vasculaire. Toutefois, un premier sérum antivenimeux efficace contre les envenimations par le serpent *Atractaspis microlepidota*, l'un des Atractaspididés décrit comme mortel, vient d'être obtenu, laissant envisager la possibilité d'en obtenir prochainement contre les autres espèces d'*Atractaspis* responsables d'envenimations chez l'homme. Les principales molécules responsables de cette toxicité sont les sarafotoxines, des analogues structuraux et fonctionnels des endothélines. Bien que formant une même famille de peptides vaso-actifs, sarafotoxines et endothélines diffèrent fondamentalement à la fois par leur diversité structurale, l'organisation de leurs précurseurs, ainsi que par l'organisation de leurs gènes, suggérant des origines et des chemins évolutifs distincts. Depuis leur découverte en 1982, et tout particulièrement les apports récents de la biologie moléculaire et des approches protéomiques, il ressort que les venins des serpents du genre *Atractaspis* renferment, comme c'est le cas pour d'autres animaux venimeux, une grande diversité d'isoformes d'un même composé. Cette diversité dont on peut penser qu'elle reflète un besoin d'adaptation au cours de l'évolution des prédateurs vis-à-vis de la diversité écologique des proies est probablement le reflet d'une non moins grande diversité de récepteurs. Ainsi, ces nouvelles sarafotoxines constituent des outils de choix pour rechercher et identifier de nouveaux récepteurs aux endothélines, dont on perçoit de plus en plus l'importance physiologique chez les mammifères, et en particulier en cancérologie (53).

---

## RÉFÉRENCES

---

- Reinhardt IT. Beskrivelse af nogle nye slangearter. K danske Vidensk. Selsk. Skr 1843; 10 : 233-79.
- Smith A. Illustrations of the zoology of South Africa, Reptilia. Smith, Elder & Co ed, London, pp 1847-1849.
- Kochva E. *Atractaspis* (serpentes, atractaspididae) the burrowing asp; a multidisciplinary minireview. *Bull Nat Hist Mus Lond (Zool)* 2002; 68 : 91-9.
- Warrell DA, Ormerod LD, Davidson NM. Bites by the night adder (*Causu maculatus*) and burrowing vipers (genus *Atractaspis*) in Nigeria. *Am J Trop Med Hyg* 1976; 25 : 517-29.
- Mann G, Gunders AE. Epidemiology of snake-bites in Israel. Rofe Hamishpaha (the Family Physician). 1977; 7 : 82-7.
- Gunders AE. Rofe Hamishpaha (the Family Physician). 1997; 7 : 119-22. (non trouvé)
- Corkill NL, Ionides CJ, Pitman CR. Biting and poisoning by the mole vipers of the genus *Atractaspis*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1959; 53 : 95-101.
- Chajek T, Rubinger D, Alkan M, Melmed RM, Gunders AE. Anaphylactoid reaction and tissue damage following bite by *Atractaspis engaddensis*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1974; 68 : 333-7.
- Trape JF, Mané Y. Guide des serpents d'Afrique Occidentale. Savane et désert. ED. IRD ed, Paris 2006; p. 226.
- Ismail M, al-Ahaidib MS, Abdoon N, Abd-Elsalam MA. Preparation of a novel antivenom against *Atractaspis* and *Walterinnesia* venoms. *Toxicon*. 2007; 49 : 8-18.
- Weiser E, Wollberg Z, Kochva E, Lee SY. Cardiotoxic effects of the venom of the burrowing asp, *Atractaspis engaddensis* (Atractaspididae, Ophidia) *Toxicon*. 1984; 22 : 767-74.
- Menin L *et al*. Proceedings of the 15th European Symposium on Animal, Plant and Microbial Toxins (Slovenia). 2004; p. 68.
- Quinton L, Le Caer JP, Phan G, Ligny-Lemaire C, Bourdais-Jomaron J, Ducancel F, Chamot-Rooke J. Characterization of toxins within crude venoms by combined use of Fourier transform mass spectrometry and cloning. *Anal Chem* 2005; 77; 6630-9.
- Hayashi MA, Ligny-Lemaire C, Wollberg Z, Wery M, Galat A, Ogawa T *et al*. Long-sarafotoxins: characterization of a new family of endothelin-like peptides. *Peptides*. 2004; 25 : 1243-51.
- Wery M. DEA "Interactions toxiques dans les écosystèmes et biotechnologies liées aux toxines" 1998. Museum National d'Histoire Naturelle (Paris, France).
- Kurnik D, Haviv Y, Kochva E. A snake bite by the Burrowing Asp, *Atractaspis engaddensis*. *Toxicon* 1999; 37 : 223-7.
- Bdolah A, Wollberg Z, Kochva E. In « Snake Toxins-Sarafotoxins: A New group of Cardiotoxic Peptides from the Venom of *Atractaspis*. Harvey AL ». Pergamon Press ed, New-York, 1991, pp 415.
- Ducancel F. Endothelin-like peptides. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62 : 2828-39.
- Kochva E, Viljoen CC, Botes DP. A new type of toxin in the venom of snakes of the genus *Atractaspis* (Atractaspidinae). *Toxicon*. 1982; 20 : 581-92.
- Kloog Y, Ambar I, Sokolovsky M, Kochva E, Wollberg Z, Bdolah A. Sarafotoxin a novel vasoconstrictor peptide: phosphoinositide hydrolysis in rat heart and brain. *Science*. 1988; 242 : 268-70.
- Remuzzi G, Perico N, Benigni A. New therapeutics that antagonize endothelin: promises and frustrations. *Nat Rev Drug Discov*. 2002; 1 : 986-1001.
- Becker A, Dowdle EB, Hechler U, Krauser K, Donner P, Schleuning WD. Bibrotoxin, a novel member of the endothelin/sarafotoxin peptide family, from the venom of the burrowing asp *Atractaspis bibroni*. *FEBS Lett*. 1993; 315 : 100-3.
- Ducancel F, Matre V, Dupont C, Lajeunesse E, Wollberg Z, Bdolah A. *et al*. Cloning and sequence analysis of cDNAs encoding precursors of sarafotoxins. Evidence for an unusual "rosary-type" organization. *J Biol Chem* 1993; 268 : 3052-5.
- Nakano A, Kishi F, Minami K, Wakabayashi H, Nakaya Y, Kido H. Selective conversion of big endothelins to tracheal smooth muscle-constricting 31-amino acid-length endothelins by chymase from human mast cells. *J Immunol* 1997; 159 : 1987-92.
- Kishi F, Minami K, Okishima N, Murakami M, Mori S, Yano M *et al*. Novel 31-amino-acid-length endothelins cause constriction of vascular smooth muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 248 : 387-90.
- Kitamura H, Cui P, Sharmin S, Yano M, Kido H. Binding of a new bioactive 31-amino-acid endothelin-1 to an endothelin ET(B) or ET (B)-like receptor in porcine lungs. *Eur J Pharmacol* 2003; 465 : 31-8.
- Sakurai T, Yanagisawa M, Masaki T. Molecular characterization of endothelin receptors. *Trends Pharmacol Sci* 1992; 13 : 103-8.
- Sokolovsky M. Endothelins and sarafotoxins: receptor heterogeneity. *Int J Biochem* 1994; 26 : 335-40.
- Kloog Y, Sokolovsky M. Similarities in mode and sites of action of sarafotoxins and endothelins. *Trends Pharmacol Sci* 1989; 10 : 212-4.
- Sokolovsky M. Endothelins and sarafotoxins: physiological, regulation, receptor subtypes and transmembrane signaling. *Trends Biochem Sci* 1991; 16 : 261-4.
- Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* 1990; 348 : 730-2.

32. Sakurai T, Yanagisawa M, Takuwa Y, Miyazaki H, Goto K *et al.* Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* 1990; 348 : 732-5.
33. Lin HY, Kaji EH, Winkel GK, Ives HE, Lodish HF. Cloning and functional expression of a vascular smooth muscle endothelin 1 receptor. *Proc Nat Acad Sci USA* 1991; 88 : 3185-9.
34. Ambar I, Kloog Y, Kochva E, Wollberg Z, Bdolah A, Oron U *et al.* Characterization and localization of a novel neuroreceptor for the peptide sarafotoxin. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 157 : 1104-10.
35. Davenport AP, Maguire JJ. Frontiers in endocrinology, endothelins in endocrinology: new advances-endothelin receptor sub-types and their function. In: Baldi E, Maggi M, Cameron IT, Dunn MJ (Eds). *Ares Serono Symposia*. 1995; 15 : 35-45.
36. Bousso-Mittler D, Galron R, Sokolovsky M. Endothelin/sarafotoxin receptor heterogeneity: evidence for different glycosylation in receptors from different tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 178 : 921-6.
37. Bdolah A, Kochva E, Ovadia M, Kinamon S, Wollberg Z. Resistance of the Egyptian mongoose to sarafotoxins. *Toxicon* 1997; 35: 1251-61.
38. Sokolovsky M, Ambar I, Galron R. A novel subtype of endothelin receptors. *J Bio Chem* 1992; 267 : 20551-4.
39. Karne S, Jayawickreme CK, Lerner MR. Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ETC receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores. *J Bio Chem* 1993; 268 : 19126-33.
40. Lecoin L, Dupin E, Lecoin L, Glavieux C, Champeval D, Ziller C *et al.* Endothelin 3 selectively promotes survival and proliferation of neural crest-derived glial and melanocytic precursors *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95 : 14214-9.
41. Kimura S, Kasuya Y, Sawamura T, Shinmi O, Sugita Y, Yanagisawa M. *et al.* Structure-activity relationships of endothelin : importance of the C-terminal moiety. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 156 : 1182-6.
42. Nakajima K, Kubo S, Kumagaye S, Nishio H, Tsunemi M, Inui T *et al.* Structure-activity relationship of endothelin: importance of charged groups. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 163 : 424-9.
43. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y *et al.* A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 332 : 411-5.
44. Xu D, Emoto N, Giaid A, Slaughter C, Kaw S, deWit D *et al.* ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell* 1994; 78 : 473-85.
45. Takasaki C, Itoh Y, Onda H, Fujino M. Cloning and sequence analysis of a snake, *Atractaspis engaddensis* gene encoding sarafotoxin S6c. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 189 : 1527-33.
46. Ducancel F, Wery M, Hayashi MA, Muller BH, Stöcklin R, Ménez A. Les sarafotoxines de venins de serpent. *Ann Inst Pasteur* 1999; 10 : 183-94.
47. Ducancel F. The sarafotoxins. *Toxicon* 2002; 40 : 1541-5.
48. Bloch KD, Friedrich SP, Lee ME, Eddy RL, Shows TB, Quertermous T. Structural organization and chromosomal assignment of the gene encoding endothelin. *J Biol Chem* 1989; 264 : 10851-7.
49. Bloch KD, Eddy RL, Shows TB, Quertermous T. cDNA cloning and chromosomal assignment of the gene encoding endothelin 3. *J Bio Chem* 1989; 264 : 18156-61.
50. Bloch KD, Hong CC, Eddy RL, Shows TB, Quertermous T. cDNA cloning and chromosomal assignment of the endothelin 2 gene: vasoactive intestinal contractor peptide is rat endothelin 2. *Genomics* 1991; 10 : 236-42.
51. Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K *et al.* The human endothelin family : three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86 : 2863-7.
52. Onda H, Ohkubo S, Ogi K, Kosaka T, Kimura C, Matsumoto H *et al.* One of the endothelin gene family endothelin 3 gene is expressed in the placenta. *FEBS Lett* 1990; 261 : 327-30.
53. Cazaubon S, Deshayes F, Couraud PO, Nahmias C. Endothelin-1, angiotensin II et cancer. *Med Sci* 2006; 22 : 416-22.