

# Les venins de serpent

## Risques liés aux « nouveaux animaux de compagnie »

« Les “nouveaux animaux domestiques” sont devenus en France une mode directement importée des États- Unis, où l’on peut parler d’un véritable phénomène de société [...] La fascination qu’ils exercent sur la population explique le développement de ce marché très particulier. [...] Les animaux les plus dangereux que peuvent posséder des particuliers sont sans conteste les serpents. Le risque zéro n’existant pas, tout propriétaire de serpent venimeux s’expose un jour ou l’autre à une morsure avec envenimation pouvant mettre en jeu le pronostic vital. »

Dr L. de HARO - Centre Antipoison – Marseille.

Les Annales de Biologie Clinique rapportent le cas d’un jeune homme mordu par un crotale brésilien « Fer de Lance » *Bothrops moojeni* appartenant à son élevage clandestin<sup>1</sup>.



www.objetoseducacionais2.mec.gov.br  
*bothrops moojeni* crotale brésilien fer de lance



www.reptilesdumonde.ch

Les crotales sont pourvus de deux crochets mobiles, dents possédant un « canal à venin » interne. La quantité de venin injectée conditionne les grades d’envenimation.

### Document 1 : scores de gravité des envenimations

| Grade | Signes locaux                                                | Symptômes systémiques                                          | Coagulopathie |
|-------|--------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|---------------|
| I     | Piqûre ou abrasion, sans œdème                               | Non                                                            | Non           |
| II    | Érythème, œdème local, douleur forte                         | Paresthésies péri-orales                                       | Non           |
| III   | Œdème extensif au premier segment de membre, douleur majeure | Sueurs, lipothymies, vomissement, paresthésies à distance      | Oui           |
| IV    | Œdème du membre entier                                       | Choc, saignement, convulsions, coma, insuffisance respiratoire | Oui           |

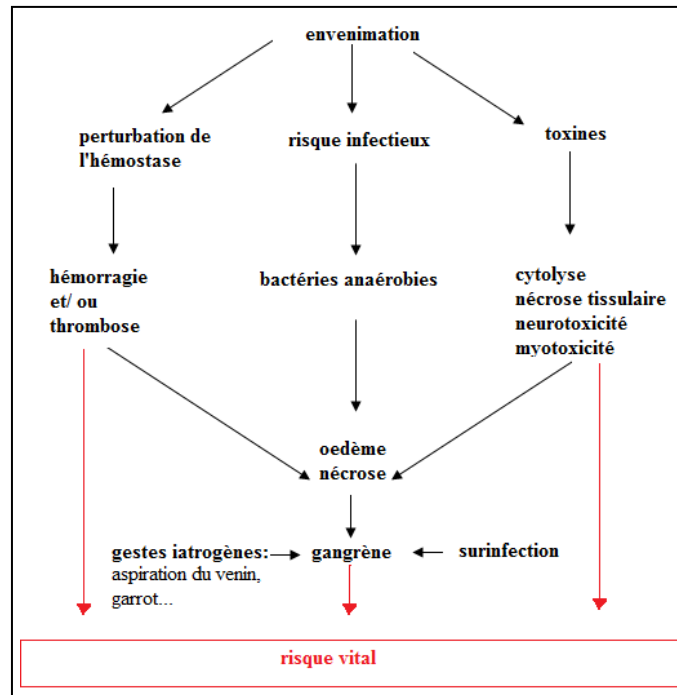
Lors de la prise en charge aux urgences, le patient présente une plaie à l’avant-bras droit, avec un œdème touchant l’ensemble de l’avant-bras et quelques pétéchies (micro ruptures de capillaires se traduisant par des plaques rouges sur la peau). Il se plaint de douleurs intenses de l’ensemble du membre, douleurs cotées à 5/10 par le patient. Il présente un épisode de vomissement et une sensation de faiblesse. Il est apyrétique (absence de fièvre), sans céphalées (maux de tête), sans douleur abdominale ou thoracique. Les fonctions cardio-circulatoire et respiratoire sont normales.

Il s’agit d’une envenimation sévère de grade III qui nécessite une prise en charge spécifique avec sérothérapie antivenimeuse.

<sup>1</sup> Hypofibrinogénémie sévère après morsure de crotale en France » Mérens et al. *Ann Biol Clin* 2005 ; 63 (2) : 220-4

La stratégie thérapeutique est orientée en fonction des risques encourus par le patient. Le document 2 ci-dessous représente la « symptomatologie d'une envenimation », qui dépend de la composition du venin et donc de l'espèce du serpent.

Document 2: symptomatologie d'une envenimation



## 1. Exploration biologique

La prise en charge du patient débute par une série d'analyses biologiques. Le risque vital est d'abord lié aux perturbations de l'hémostase.

### 1.1. Étude du risque hémorragique

Dans de nombreuses envenimations le sang est dit « incoagulable ». On effectue donc un bilan d'hémostase.

1.1.1. Définir l'hémostase.

1.1.2. Reporter sur la copie les numéros de l'**Annexe 1**, puis compléter les légendes correspondantes à l'aide de l'**Annexe 2**.

1.1.3. Présenter le rôle des plaquettes dans l'hémostase primaire.

1.1.4. Dosage des D-Dimères par agglutination passive (**Annexe 2**).

Les D-dimères sont des produits de dégradation de la fibrine dans lesquels on retrouve l'association de deux domaines « D » associés par une liaison covalente et pouvant être reconnue spécifiquement.

1.1.4.1. Définir l'agglutination passive.

1.1.4.2. Proposer, sous forme d'un schéma, un test permettant de doser les D-dimères par une méthode d'agglutination passive.

1.1.5. On compare deux bilans d'hémostase (**Annexe 3**):

➤ dans le cas de l'envenimation du patient par le crotale *Bothrops moojeni*

➤ dans le cas d'une morsure par la vipère heurtante *Bitis arietans*.

1.1.5.1. Compléter le tableau de l'**Annexe 3** (document à rendre avec la copie).

1.1.5.2. Dans chaque cas, le patient mordu présente une hypofibrinogénémie. En comparant les résultats obtenus pour les produits de dégradation du fibrinogène et de la fibrine (PDF) et pour les D-Dimères, et en s'appuyant sur l'**Annexe 2**, proposer une explication dans chacun des cas pour l'hypofibrinogénémie observée.

1.1.5.3. Montrer que les autres paramètres, pour chacun des patients, permettent de vérifier cette hypothèse.

1.1.5.4. Dans chacun des cas, le sang est devenu incoagulable. Proposer une explication.

- 1.1.6. Commenter le frottis sanguin coloré au MGG du patient mordu par la vipère *Bitis arietans* présenté dans l'**Annexe 4**.
- 1.1.7. Le frottis sanguin coloré au MGG du patient mordu par le crotale *Bothrops moojeni* montre un aspect normal. La perturbation de l'hémostase pour le sujet mordu par la vipère *Bitis arietans* est une coagulation intra-vasculaire disséminée (CIVD). Proposer une interprétation permettant de faire le lien entre la CIVD et l'aspect du frottis sanguin coloré au MGG de l'**Annexe 4**.

## 1.2. Exploration biochimique

### 1.2.1. Atteintes musculaires

« Les créatine kinases sont dosées à 355 UI/L ( $N < 250$  UI/L) avec une myoglobine normale à 54  $\mu\text{g/L}$  ( $N < 80$   $\mu\text{g/L}$ ), témoins de l'action très discrète des myotoxines présentes dans les venins ophidiens ».<sup>2</sup>

- Expliquer en quoi les dosages des créatine kinases et de la myoglobine dans le sérum, permettent le diagnostic d'une éventuelle atteinte musculaire.

### 1.2.2. Atteintes rénales

L'urée et la créatinine sont dosées afin d'explorer la fonction rénale. Le dosage de l'urée a été effectué par une méthode enzymatique dont la fiche technique figure à l'**Annexe 5**.

- 1.2.2.1. Indiquer l'intérêt d'utiliser des enzymes pour doser un substrat.
- 1.2.2.2. Donner la réaction principale et la réaction indicatrice de ce dosage ; justifier la réponse.
- 1.2.2.3. La méthode utilisée est une méthode cinétique.
  - Écrire l'équation de Michaelis-Menten.
  - En déduire que, pour de très faibles concentrations en substrat ( $[S] < 0,1 K_M$ ), la vitesse initiale est proportionnelle à la concentration en substrat.
- 1.2.2.4. Indiquer le rôle de chacun des constituants des réactifs R1 et R2.
- 1.2.2.5. Donner les conditions opératoires à respecter lors de ce dosage (concentrations, durée, température et pH).
- 1.2.2.6. Justifier les conditions de durée, de température et de pH, qui sont les conditions habituelles pour un dosage de vitesse initiale.

## 2. Traitements mis en œuvre

Sans attendre les résultats des analyses biologiques, un traitement prophylactique est décidé.

### 2.1 Antibiothérapie préventive

Le traitement choisi associe deux antibiotiques l'amoxicilline et l'acide clavulanique.

- 2.1.1. A partir de la symptomatologie donnée en introduction, justifier la nécessité de réaliser une antibiothérapie préventive.
- 2.1.2. L'amoxicilline est un antibiotique à large spectre.
  - 2.1.2.1. Définir le terme « antibiotique ».
  - 2.1.2.2. Préciser la signification de l'expression « large spectre ».
- 2.1.3. Ces antibiotiques appartiennent à la famille des  $\beta$ -lactamines et sont actifs sur la paroi bactérienne. L'**Annexe 6** présente la structure de la paroi bactérienne de différentes bactéries.
  - Reporter sur la copie les numéros des légendes de l'**Annexe 6** et les compléter.
  - Donner un titre aux documents A et B de l'**Annexe 6**.
- 2.1.4. Pour mettre en évidence le rôle des  $\beta$ -lactamines, des expériences sont réalisées sur une souche d'*Escherichia coli*. Une croissance d'*Escherichia coli* est réalisée en milieu liquide. La courbe obtenue est présentée en **Annexe 7**. Dans les mêmes conditions, on ajoute de l'amoxicilline en cours de croissance :
  - Pendant la phase 2, on obtient la courbe 2 de l'**Annexe 7**.
  - Pendant la phase 3, on obtient la courbe 3 de l'**Annexe 7**.
- 2.1.4.1. Donner et justifier le nom des différentes phases de la courbe 1.

<sup>2</sup> Hypofibrinogénémie sévère après morsure de crotale en France Mérens et al. *Ann Biol Clin* 2005 ; 63 (2) : 220-4

- 2.1.4.2. Analyser les courbes 2 et 3 de l'**Annexe 7** (l'allure de la courbe 1 est rappelée en pointillés).
  - 2.1.4.3. Une suspension d'*Escherichia coli*, en phase 2 de culture, est réalisée en solution isotonique de saccharose à 100 g.L<sup>-1</sup> additionnée d'amoxicilline. Après une vingtaine de minutes, une observation au microscope électronique montre la présence dans la suspension de l'élément figuré X représenté dans l'**Annexe 8**.
    - Nommer l'élément X
    - Reporter sur la copie les numéros de l'**Annexe 8**, puis compléter les légendes
  - 2.1.4.4. Préciser la cible de l'amoxicilline.
  - 2.1.4.5. La synthèse du peptidoglycane se fait en différentes étapes. La dernière étape consiste en la formation de ponts interpeptidiques entre les différentes chaînes glucidiques grâce à l'intervention de transpeptidases dont le site actif reconnaît spécifiquement le dimère D Ala-D Ala (**Annexe 9**).
    - Montrer que la liaison peptidique du dipeptide terminal D Ala-D Ala présente une analogie de structure avec la pénicilline et l'amoxicilline (**Annexe 10**).
    - En déduire le mode d'action des  $\beta$ -lactamines au niveau des transpeptidases.
- 2.1.5. Le traitement par les  $\beta$ -lactamines est parfois mis en échec en raison de la résistance acquise par les bactéries, résistance liée à la synthèse de  $\beta$ -lactamases. L'acide clavulanique, associé à l'amoxicilline, permet de limiter l'expression de cette résistance lors de l'antibiothérapie.
- 2.1.5.1. Définir l'expression « résistance acquise ».
  - 2.1.5.2. Citer les différents modes d'acquisition d'une telle résistance par une bactérie.
  - 2.1.5.3. Préciser le rôle d'une  $\beta$ -lactamase.

## 2.2. Sérothérapie curative

Dans le cas de ce patient, l'envenimation est sévère (grade III) et impose une sérothérapie antivenimeuse, seul traitement curatif existant à ce jour. Cependant peu d'anti venins sont disponibles sur le marché. La sérothérapie est effectuée à partir d'un médicament appelé Bothrofav® (Aventis Pasteur, Lyon, France). Il s'agit d'anticorps polyclonaux obtenus par immunisations répétées d'un cheval avec de faibles doses de venin du crotale *Bothrops lanceolatus*.

### 2.2.1. Utilisation d'immun sérum

Le sérum d'un cheval immunisé à deux reprises est prélevé régulièrement. Les anticorps dirigés contre l'un des constituants du venin sont dosés. On obtient la courbe de l'**Annexe 11**.

- 2.2.1.1. Définir le terme « sérothérapie ».
- 2.2.1.2. Définir un isotype et citer les différents isotypes.
- 2.2.1.3. Analyser et interpréter les courbes représentées sur le graphe de l'**Annexe 11**.
- 2.2.1.4. Reporter sur la copie les numéros de l'**Annexe 12** et compléter les légendes correspondantes.
- 2.2.1.5. Définir les expressions « anticorps monoclonaux » et « anticorps polyclonaux ».
- 2.2.1.6. Présenter les principales étapes de la production des anticorps monoclonaux par la technique des hybridomes.
- 2.2.1.7. Comparer les caractéristiques des anticorps monoclonaux à celles des anticorps polyclonaux.

Le médicament purifié injecté par perfusion intraveineuse ne contient que des fragments d'anticorps ; il est composé d'un mélange de fragments Fab'2 et de Fab :

- Les fragments Fab'2 diffusent peu au niveau du site de la morsure mais ont une demi-vie plus longue et une faible toxicité rénale ;
- Les fragments Fab ont une bonne diffusion tissulaire mais une demi-vie courte et une toxicité rénale non négligeable.

- 2.2.1.8. Le fragment Fab'2 est obtenu après traitement des IgG par la pepsine qui hydrolyse la protéine au niveau des sites localisés sur le schéma de l'**Annexe 12**.
  - Localiser le fragment Fab sur le document de l'**Annexe 12** (à rendre avec la copie).
- 2.2.1.9. Comparer les structures des fragments Fab et Fab'2.
- 2.2.1.10. Expliquer pourquoi on privilégie l'utilisation des fragments Fab'2 ou Fab plutôt que celle d'une IgG de cheval.

- 2.2.1.11. Le seul sérum disponible en métropole est dirigé contre les constituants du venin de *Bothrops lanceolatus*, espèce proche mais différente de *Bothrops moojeni*.
- Expliquer pourquoi la protection apportée par ce sérum est probablement moins efficace que celle qui aurait été apportée par un sérum fabriqué à partir des constituants du venin de *Bothrops moojeni*.

## 2.2.2. Utilisation des anticorps recombinants<sup>3</sup>

Pour éviter l'utilisation d'anticorps produits *in vivo*, une nouvelle technologie est à l'étude : la production de paratopes des anticorps par « phage display » (**Annexe 13**).

- 2.2.2.1. Donner la signification de terme « bactériophage ».
- 2.2.2.2. On distingue différents types de phage, dont les phages virulents et lysogènes.
- Définir le terme « phage virulent ».
  - Définir le terme « phage lysogène ».
- 2.2.2.3. Donner la signification du terme « paratope ».
- 2.2.2.4. A partir du schéma présenté dans le **document B** de l'**Annexe 13**, donner la propriété des molécules utilisées dans la phase fixe de la chromatographie d'affinité.
- 2.2.2.5. Justifier l'intérêt de produire de cette manière des fragments Fv par rapport à une immunisation classique.
- 2.2.2.6. Le patient, traité par une sérothérapie classique, ne pourra pas bénéficier ultérieurement d'une seconde injection de l'anti sérum. En effet, les fragments Fab et Fab'2 présentent une xénogénicité résiduelle due à la présence d'un domaine constant.
- Définir le terme « xénogénicité ».
  - Justifier l'intérêt de disposer de tels fragments Fv pour pouvoir traiter ultérieurement le patient, s'il venait à être à nouveau mordu par un des serpents de son élevage.
- 2.2.2.7. La technique du phage display utilise un bactériophage fd.
- Reporter sur la copie les numéros de l'**Annexe 14** et compléter les légendes.
- 2.2.2.8. Proposer une explication à l'utilisation du phage filamenteux fd plutôt qu'à celle d'un phage lytique de type T4.
- 2.2.2.9. Schématiser une bactérie *Escherichia coli* F<sup>+</sup> en mettant en évidence les éléments de structures à l'origine de cette qualification.
- 2.2.2.10. Les éléments de structure d'un *Escherichia coli* F<sup>+</sup> interviennent également au cours du phénomène de conjugaison bactérienne.
- Définir la conjugaison bactérienne.
  - Présenter les principales étapes de ce phénomène grâce à des schémas légendés.

## 3. Étude de quelques toxines d'un venin de crotale *Bothrops moojeni*

Un venin de serpent est un mélange complexe de plus de mille protéines, dont la composition varie en fonction de la famille mais aussi de l'espèce, expliquant l'hétérogénéité des tableaux cliniques. Elles remplissent deux objectifs : immobiliser rapidement la proie et commencer la digestion.

Ces protéines sont responsables de phénomènes inflammatoires et nécrotiques (cytotoxines, protéases, hyaluronidases), de phénomènes toxiques (myotoxines, toxines hémolytiques, neurotoxines) et de perturbations de l'hémostase. Par ailleurs, certains éleveurs produisent des serpents hybrides pour lesquels il est difficile de prédire les propriétés du venin.

### 3.1. La crotamine : une myotoxine de nature peptidique

#### 3.1.1. La crotamine : un peptide de 42 acides aminés

- 3.1.1.1. Les formules des acides aminés sont données dans l'**Annexe 15**.
- Écrire la formule générale d'un acide aminé.
  - Positionner le carbone asymétrique ; justifier la réponse.
- 3.1.1.2. Les acides aminés peuvent être classés en fonction de la polarité de leur chaîne latérale.
- Nommer les différentes catégories de cette classification et donner un exemple pour chacune.

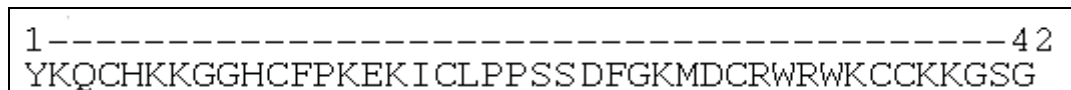
<sup>3</sup> Biofutur n°292, Octobre 2008 pages 31-48

3.1.1.3. La charge des acides aminés des protéines dépend du pH.

- Définir le pHi d'un acide aminé.
- A l'aide de l'**Annexe 15**, calculer le pHi pour chacun des acides aminés suivants : lysine, arginine, acide aspartique et acide glutamique.

### 3.1.2. Structure primaire de la crotamine

La structure primaire est représentée ci-dessous :



La convention d'écriture des acides aminés choisie est celle à une lettre, donnée dans l'**Annexe 15**.

- 3.1.2.1. Définir la structure primaire d'une protéine et nommer le type des liaisons mises en jeu dans ce niveau de structure.
- 3.1.2.2. Écrire la formule semi-développée de la séquence correspondant aux quatre premiers acides aminés de la crotamine. Localiser les liaisons citées en 3.1.2.1.

### 3.1.3. Structure spatiale de la crotamine

La structure tridimensionnelle de la crotamine, donnée dans le **document A** de l'**Annexe 16** présente une hélice alpha, deux brins d'un feuillet bêta et plusieurs ponts disulfure.

- 3.1.3.1. A l'aide des **documents B** et **C** de l'**Annexe 16**, citer les caractéristiques des hélices alpha et des feuillets bêta.
- 3.1.3.2. Ces structures sont riches en liaisons notées « X » sur les **documents B** et **C** de l'**Annexe 16**.
  - Les nommer et les représenter (formules chimiques exigées).
  - Indiquer leur rôle.
- 3.1.3.3. La confrontation de la structure primaire et de la structure tridimensionnelle a montré qu'un résidu glycine est souvent retrouvé entre l'hélice alpha et un feuillet bêta (**document A** de l'**Annexe 16**).
  - Donner les caractéristiques de la glycine la différenciant des autres acides aminés.
  - Expliquer pourquoi aucun autre acide aminé que la glycine ne pourrait se trouver à cet endroit.
- 3.1.3.4. Les ponts disulfure sont des liaisons covalentes.
  - Définir l'expression « liaison covalente ».
  - Citer l'acide aminé nécessaire à l'établissement des ponts disulfure.
  - Indiquer le rôle de ces liaisons dans la structure protéique.
- 3.1.3.5. Le **document D** de l'**Annexe 16** représente la répartition de charges positives et négatives à la surface de la crotamine.
  - Justifier ces charges au pH physiologique (7,4) à l'aide de la réponse à la question 3.1.1.3.

### 3.1.4. Mode d'action de la crotamine

La crotamine est une myotoxine se fixant sur les canaux sodiques de la membrane plasmique, ce qui empêche leur fermeture et inhibe la contraction musculaire d'où une paralysie flasque.

- 3.1.4.1. Reporter sur la copie les numéros du **document A** de l'**Annexe 17** et compléter les légendes.
- 3.1.4.2. Indiquer les différentes catégories de transport membranaire en reportant sur la copie les numéros du **document B** de l'**Annexe 17** et en complétant les légendes.
- 3.1.4.3. Justifier la nécessité d'un apport d'énergie dans le transport n°4 (**document B** de l'**Annexe 17**).

## 3.2. La crotamine : une phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>)

### 3.2.1. Réaction catalysée par la PLA<sub>2</sub>

L'hydrolyse d'un phospholipide, catalysée par une PLA<sub>2</sub>, libère un acide gras et un lysophospholipide.

- 3.2.1.1. Écrire la réaction d'hydrolyse (formules semi-développées exigées).
- 3.2.1.2. Nommer la liaison impliquée dans cette hydrolyse et encadrer cette liaison sur la formule chimique du phospholipide de l'équation précédente.
- 3.2.1.3. Indiquer la classe d'enzyme à laquelle appartiennent les PLA<sub>2</sub>.

### 3.2.2. Effets physiologiques des Phospholipases A<sub>2</sub>

- 3.2.2.1. Certaines phospholipases A<sub>2</sub> agissent sur la jonction neuromusculaire et conduisent à une paralysie des muscles, et en particulier du diaphragme, ce qui conduit à une mort par arrêt respiratoire. Le **document B** de l'**Annexe 18** est une électroneurographie d'une jonction neuromusculaire.
  - Indiquer, en le justifiant, le type de synapse auquel appartient la jonction neuro musculaire.
- 3.2.2.2. Reporter sur la copie les numéros du **document B** de l'**Annexe 18** et compléter les légendes.
- 3.2.2.3. Sur une jonction neuromusculaire, on dispose des électrodes excitatrices sur le neurone et une électrode réceptrice sur la fibre musculaire, comme indiqué sur le **document C** de l'**Annexe 18**. Les phénomènes électriques se déroulant dans la zone post synaptique de la jonction neuromusculaire sont mesurés. Quatre expériences sont réalisées, en absence ou présence de PLA<sub>2</sub>. Les résultats sont présentés dans le **document D** de l'**Annexe 18**.
  - Définir un potentiel de membrane.
  - Comparer potentiel de repos et potentiel d'action.
  - Analyser et interpréter les expériences 1 et 2 du **document D** de l'**Annexe 18**.
  - Analyser et interpréter les expériences 3 et 4 du **document D** de l'**Annexe 18**.

### 3.2.3. Purification de l'inhibiteur de la crotoxine

Une protéine antivenimeuse, qui neutralise les effets neurotoxiques de la crotoxine, a été purifiée à partir du sérum de crotale. Cet inhibiteur est un système de protection du crotale contre son propre venin.

La masse moléculaire de cet inhibiteur a été déterminée par gel filtration.

- 3.2.3.1. Exposer le principe de la « chromatographie d'exclusion moléculaire », également appelée « gel filtration ».
- 3.2.3.2. A partir des résultats et des données présentés dans le **document A** de l'**Annexe 19** :
  - Déterminer graphiquement le volume d'élution V<sub>e</sub> de l'inhibiteur de la crotoxine.
  - Calculer le coefficient de partage K<sub>av</sub> de l'inhibiteur de la crotoxine.
  - Donner une valeur encadrée de la masse moléculaire de l'inhibiteur de la crotoxine.
- 3.2.3.3. La fraction possédant une activité inhibitrice de la crotoxine obtenue par gel filtration, a été soumise à deux électrophorèses sur gel de polyacrylamide (**document B** de l'**Annexe 19**). Ce support possède une porosité donnée et sert de « tamis » moléculaire.
  - Analyser le résultat de l'électrophorèse A.
- 3.2.3.4. L'électrophorèse B a été réalisée en présence d'agents dénaturants, Sodium Dodécyl Sulfate (SDS) et 2-mercapto-éthanol :
  - Le 2-mercaptoéthanol réduit les ponts disulfure.
  - Le SDS (CH<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>-CH<sub>2</sub>-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Na<sup>+</sup>) est un tensio-actif dont la longue chaîne carbonée hydrophobe s'adsorbe sur la protéine et la transforme en polyanion.
- Définir la dénaturation d'une protéine.
- Estimer la masse moléculaire de la fraction analysée.
- A partir des résultats de la chromatographie et des électrophorèses de l'**Annexe 19**, émettre une hypothèse sur la structure de l'inhibiteur de la crotoxine.

## 3.3. La Batroxobine recombinante : une perspective thérapeutique

La batroxobine, présente dans le venin de serpents tels que *Bothrops moojeni*, est une autre toxine ayant une action fibrinolytique.

Elle peut être utilisée à des fins thérapeutiques notamment dans le cas d'infarctus du myocarde pour traiter les thromboses. Cette enzyme est produite par recombinaison génétique grâce à l'utilisation d'un plasmide recombinant introduit dans une bactérie telle qu'*Escherichia coli*. L'**Annexe 20** illustre les principales étapes pour la construction et le clonage de plasmides recombinants.

- 3.3.1. Donner la définition d'un plasmide.
- 3.3.2. A partir de l'**Annexe 20**, expliquer le rôle de l'enzyme de restriction EcoR1 et l'intérêt d'utiliser une telle enzyme.
- 3.3.3. Donner la signification de l'expression « plasmide recombinant ».
- 3.3.4. Commenter l'étape de transformation d'*Escherichia coli* présentée dans l'**Annexe 20**.
- 3.3.5. Préciser l'intérêt d'utiliser un plasmide porteur d'un gène de résistance à la tétracycline.

## Conclusion

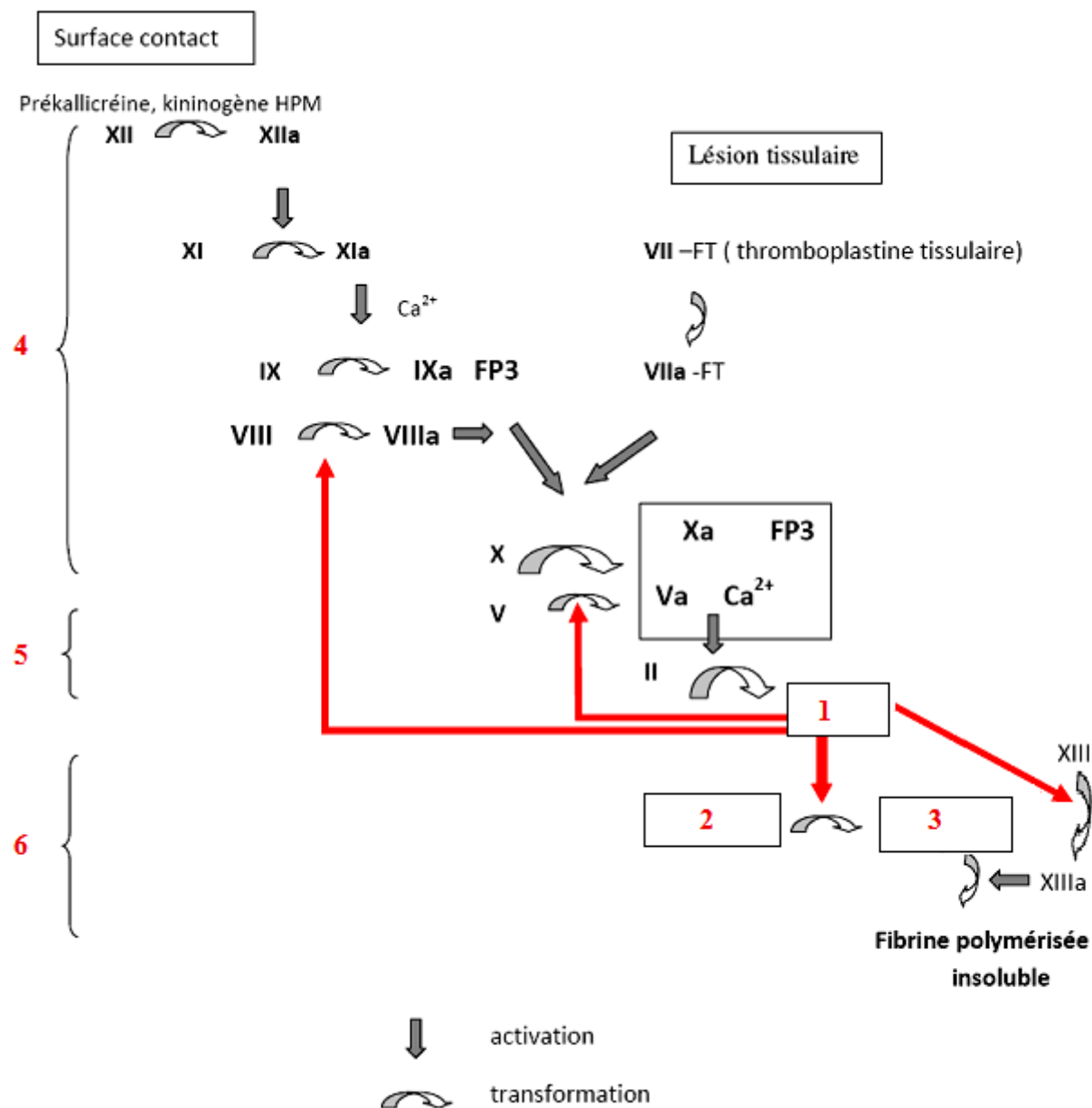
Les envenimations ophidiennes (par les serpents) sont un important problème de santé mondial, notamment dans les pays en voie de développement où il est recensé chaque année 5 millions d'envenimations et 40.000 décès.

Le traitement anti venimeux par injection de sérum (1500 euros l'ampoule) a certainement permis au patient de passer un cap aigu et de survivre. Si la question de la prise en charge par la collectivité ne se pose pas en France, ce point reste l'un des freins au développement des traitements anti venimeux dans les pays en voie de développement dans la mesure où ils représentent plusieurs mois ou plusieurs années du revenu moyen d'une famille.

## Table des annexes

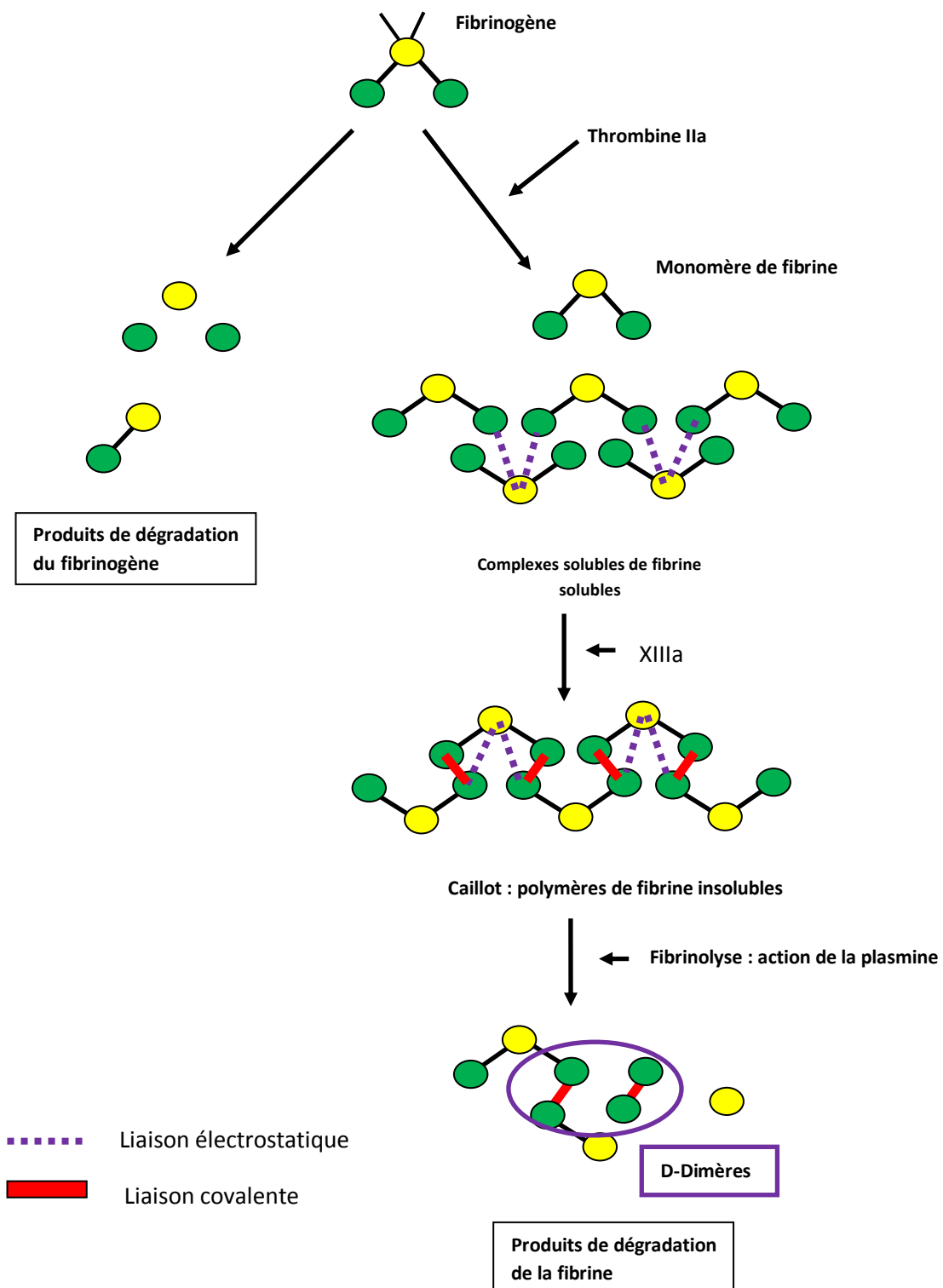
|            |                                                                                                           |    |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Annexe 1.  | La coagulation <i>in vitro</i> .....                                                                      | 10 |
| Annexe 2.  | Schéma simplifié des voies de transformation du fibrinogène.....                                          | 11 |
| Annexe 3.  | Bilan d'hémostase .....                                                                                   | 12 |
| Annexe 4.  | Frottis sanguin du patient mordu par <i>Bitis arietans</i> MGG x1000 .....                                | 13 |
| Annexe 5.  | Dosage de l'urée par une méthode enzymatique .....                                                        | 14 |
| Annexe 6.  | Structure de la paroi bactérienne et de la membrane plasmique .....                                       | 15 |
| Annexe 7.  | Courbes de croissance d' <i>Escherichia coli</i> .....                                                    | 16 |
| Annexe 8.  | Schémas d'observation au microscope électronique de l'élément figuré X obtenu .....                       | 16 |
| Annexe 9.  | Dernière étape de la synthèse du peptidoglycane chez <i>E. coli</i> .....                                 | 17 |
| Annexe 10. | Structure de quelques $\beta$ -lactamines .....                                                           | 18 |
| Annexe 11. | Dosage de la quantité d'anticorps (IgG et IgM) produits par un cheval à la suite d'une immunisation ..... | 19 |
| Annexe 12. | Structure d'une IgG .....                                                                                 | 19 |
| Annexe 13. | Technique du « phage display ».....                                                                       | 20 |
| Annexe 14. | Structure du phage filamenteux Fd.....                                                                    | 21 |
| Annexe 15. | Tableau des vingt acides aminés différents.....                                                           | 22 |
| Annexe 16. | Étude de la structure tridimensionnelle de la crotamine .....                                             | 23 |
| Annexe 17. | La membrane plasmique et les transports membranaires.....                                                 | 24 |
| Annexe 18. | La plaque motrice ou jonction neuro-musculaire .....                                                      | 25 |
| Annexe 19. | Etude de la structure de l'inhibiteur de la crotoxine.....                                                | 27 |
| Annexe 20. | Construction et clonage de plasmides recombinants .....                                                   | 28 |

## Annexe 1

La coagulation *in vitro*

## Annexe 2

## Schéma simplifié des voies de transformation du fibrinogène



## DOCUMENT A RENDRE AVEC LA COPIE

## Annexe 3

## Bilan d'hémostase

Document A : Facteurs explorés par les tests chronométriques

| Test                           | Facteurs explorés                        |
|--------------------------------|------------------------------------------|
| Temps de Quick TQ.             | VII, X, V, II, Fibrinogène               |
| Temps de céphaline activée TCA | XII, XI, IX, X, V, VIII, II, Fibrinogène |
| Temps de thrombine TT          | Fibrinogène mais pas le XIII             |

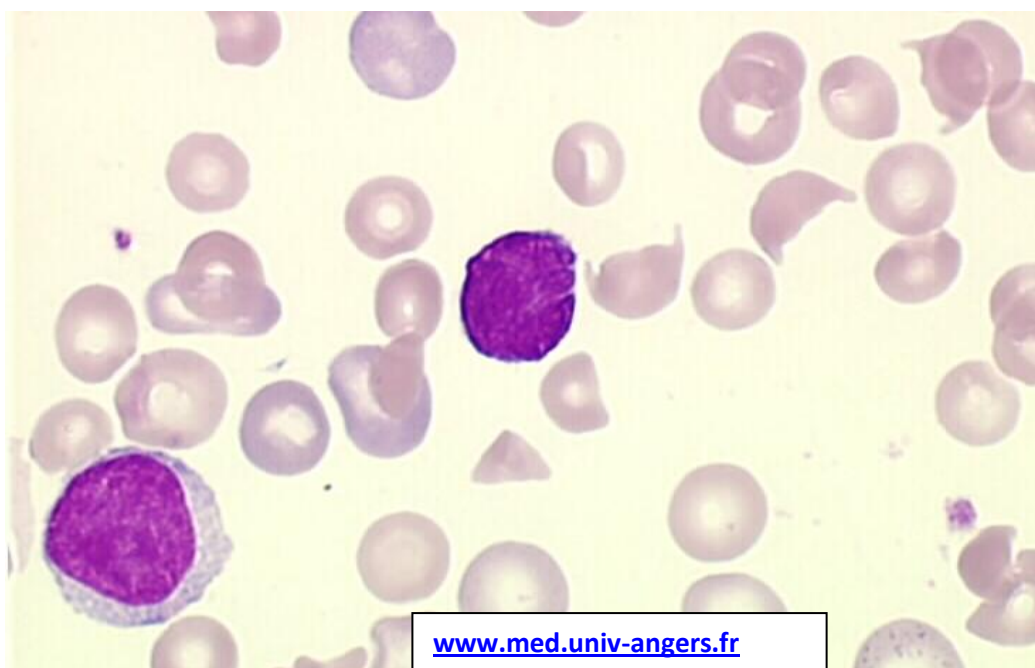
Document B : Bilans d'hémostase dans le cas de deux envenimations différentes

| Tests              | Valeurs de référence         | Patient mordu par <i>Bitis arietans</i> | Interprétation | Patient mordu par <i>Bothrops moojeni</i> | Interprétation |
|--------------------|------------------------------|-----------------------------------------|----------------|-------------------------------------------|----------------|
| TCA                | 33 ± 4 s                     | 55 s                                    |                | 94 s                                      |                |
| TQ                 | 12, 5 ± 1,5 s                | 34 s                                    |                | 26 s                                      |                |
| TT                 | 19 ± 3 s                     | 65 s                                    |                | 112 s                                     |                |
| Plaquettes         | (150-400).10 <sup>9</sup> /L | 15.10 <sup>9</sup> /L                   |                | 210.10 <sup>9</sup> /L                    |                |
| PDF*               | < 5 µg/mL                    | 160 µg/mL                               |                | 200 µg/mL                                 |                |
| D-Dimères          | < 500 ng/mL                  | 2780 ng/mL                              |                | 480 ng/mL                                 |                |
| complexes solubles | -                            | ++                                      |                | -                                         |                |
| Facteur VIII       | >30%                         | 5 %                                     |                | 84 %                                      |                |
| Facteur IX         | >30%                         | 5 %                                     |                | 93 %                                      |                |
| Facteur XII        | > 0%                         | 7 %                                     |                | 58 %                                      |                |
| Facteur V          | > 30%                        | 5 %                                     |                | 55 %                                      |                |
| Antithrombine      | > 86 %                       | 20 %                                    |                | 86 %                                      |                |
| Fibrinogène        | 2-4 g/L                      | 0,5 g/L                                 |                | 0,1g/L                                    |                |

PDF\* : produits de dégradation du fibrinogène et de la fibrine

**Annexe 4**

**Frottis sanguin du patient mordu par *Bitis arietans* MGG x1000**

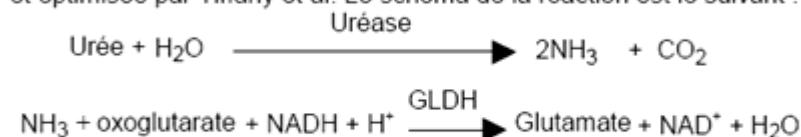


## Annexe 5

Dosage de l'urée par une méthode enzymatique<sup>4</sup>

## PRINCIPE

Méthode enzymatique basée sur la réaction décrite par Talke et Schubert et optimisée par Tiffany et al. Le schéma de la réaction est le suivant :



La diminution de l'absorbance due à la conversion du NADH en NAD<sup>+</sup>, mesurée pendant un temps donné à 340 nm, est proportionnelle à la concentration en urée dans le spécimen.

## REACTIFS

## flacon R1 TAMPON TRIS

Tris pH 7,9 ± 0,1 à 30°C      80 mmol/L  
Oxoglutarate                      5 mmol/L  
Conservateur

## flacon R2 ENZYMES COENZYME

NADH                                ≥ 0,2 mmol/L  
Uréase                                20000 UI/L  
GLDH                                ≥ 1200 UI/L

## flacon R3 ETALON

## PREPARATION DES REACTIFS

Verser sans délai, le contenu du flacon R2 (Enzymes-Coenzyme) dans le flacon R1 (Tampon).

Agiter doucement jusqu'à complète dissolution avant d'utiliser le réactif (environ 2 minutes).

Flacon R2 : Utiliser un objet non coupant pour enlever la capsule.

## MODE OPERATOIRE (TECHNIQUE MANUELLE)

Ramener les réactifs et spécimens à température ambiante.

Faire le zéro du spectrophotomètre sur de l'eau déminéralisée à 340 nm.

| Mesurer dans une cuve thermostatée (30°C ou 37°C)                                                                                 | Etalon | Dosage |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|--------|
| Réactif                                                                                                                           | 1 mL   | 1 mL   |
| Etalon                                                                                                                            | 5 µL   |        |
| Spécimen *                                                                                                                        |        | 5 µL   |
| Mélanger. Lire les absorbances à 340 nm.<br>1 <sup>ère</sup> lecture A1 à 30 secondes, 2 <sup>ème</sup> lecture A2 à 90 secondes. |        |        |

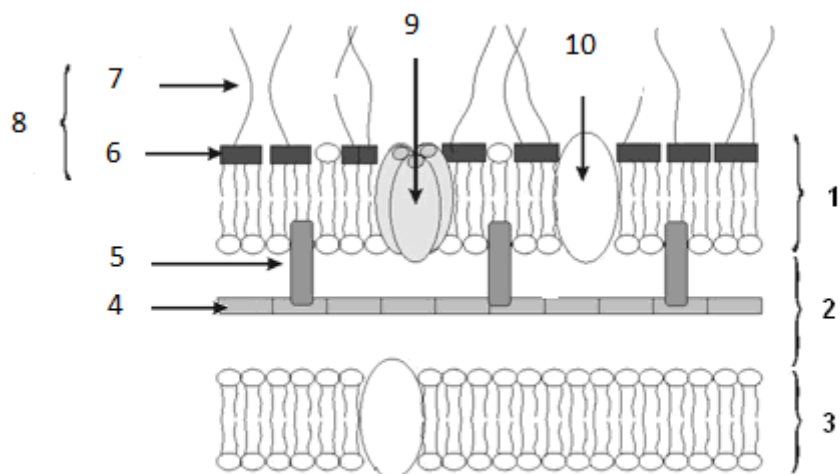
\* Sérum, plasma ou urines diluées (1+19) dans l'eau déminéralisée.

<sup>4</sup> Extrait de la fiche technique Biolabo REF 92032

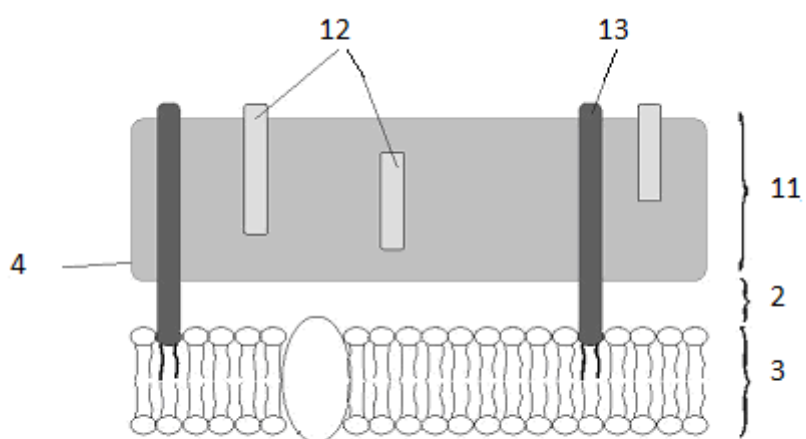
## Annexe 6

## Structure de la paroi bactérienne et de la membrane plasmique

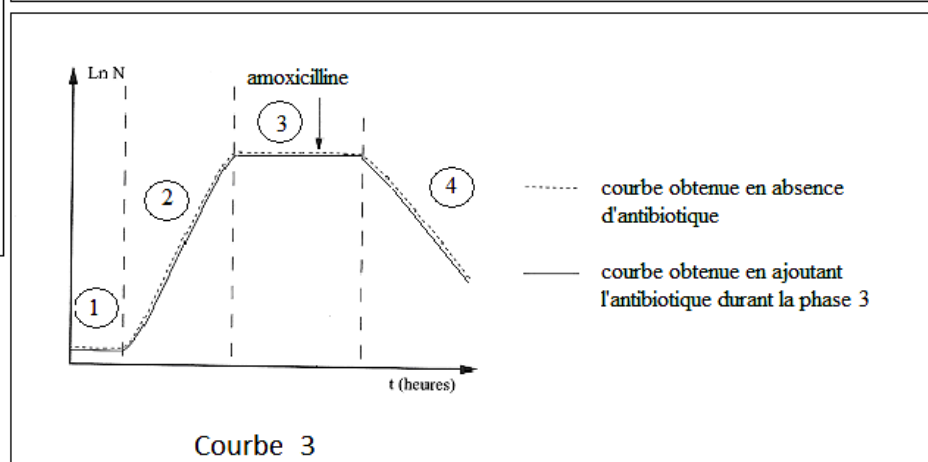
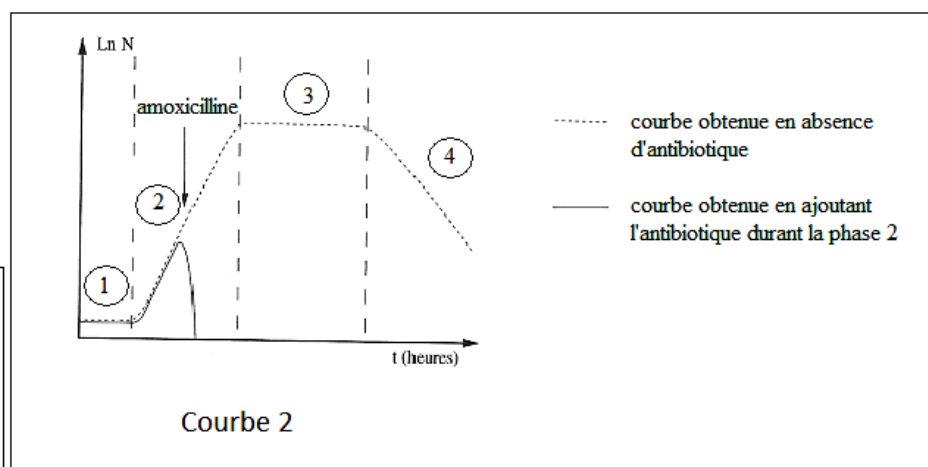
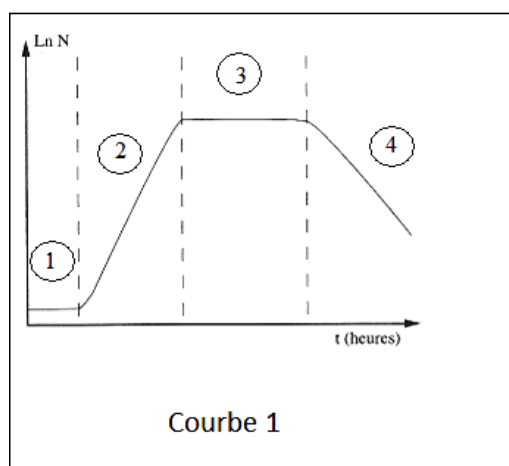
Document A



Document B

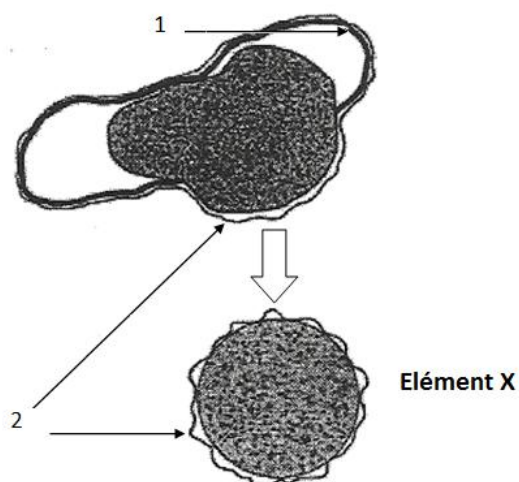


## Annexe 7

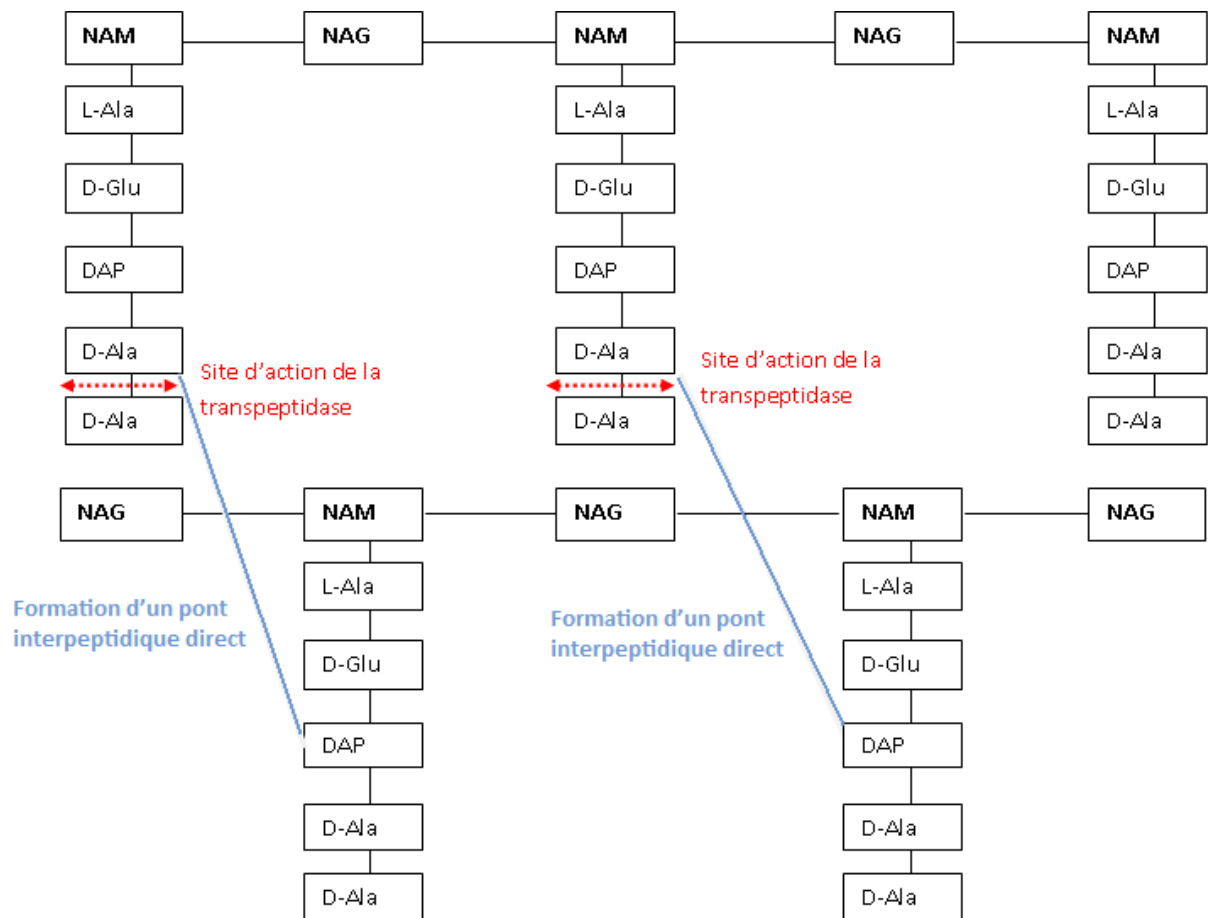
Courbes de croissance d'*Escherichia coli*

## Annexe 8

## Schémas d'observation au microscope électronique de l'élément figuré X obtenu

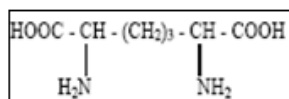


## Annexe 9

Dernière étape de la synthèse du peptidoglycane chez *E. coli*

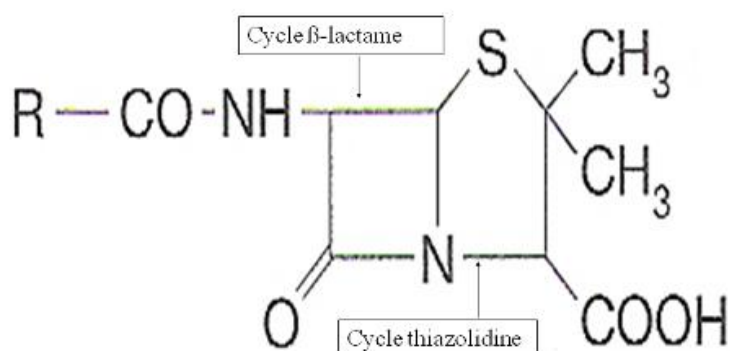
NAM : acide N-acétylmuramique  
 NAG : N-acétylglucosamine  
 L-Ala : L-Alanine  
 D-Ala : D-Alanine  
 D-Glu : Acide D-glutamique  
 DAP : acide diaminopimélique

Structure du DAP :

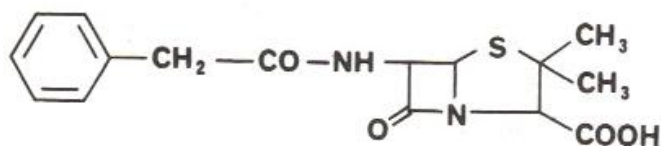


Dans le cas d'*Escherichia coli* les transpeptidases clivent (  $\leftarrow \cdots \rightarrow$  ) la liaison entre le D-Ala en position 4 et le D-Ala en position 5 du pentapeptide lié à l'acide N-acétylmuramique (NAM) d'une chaîne glucidique et lient directement la D-Ala en position 4 au DAP du pentapeptide de la chaîne suivante.

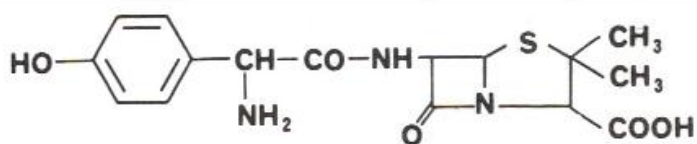
## Annexe 10

Structure de quelques  $\beta$ -lactamines

Structure de la Pénicilline G



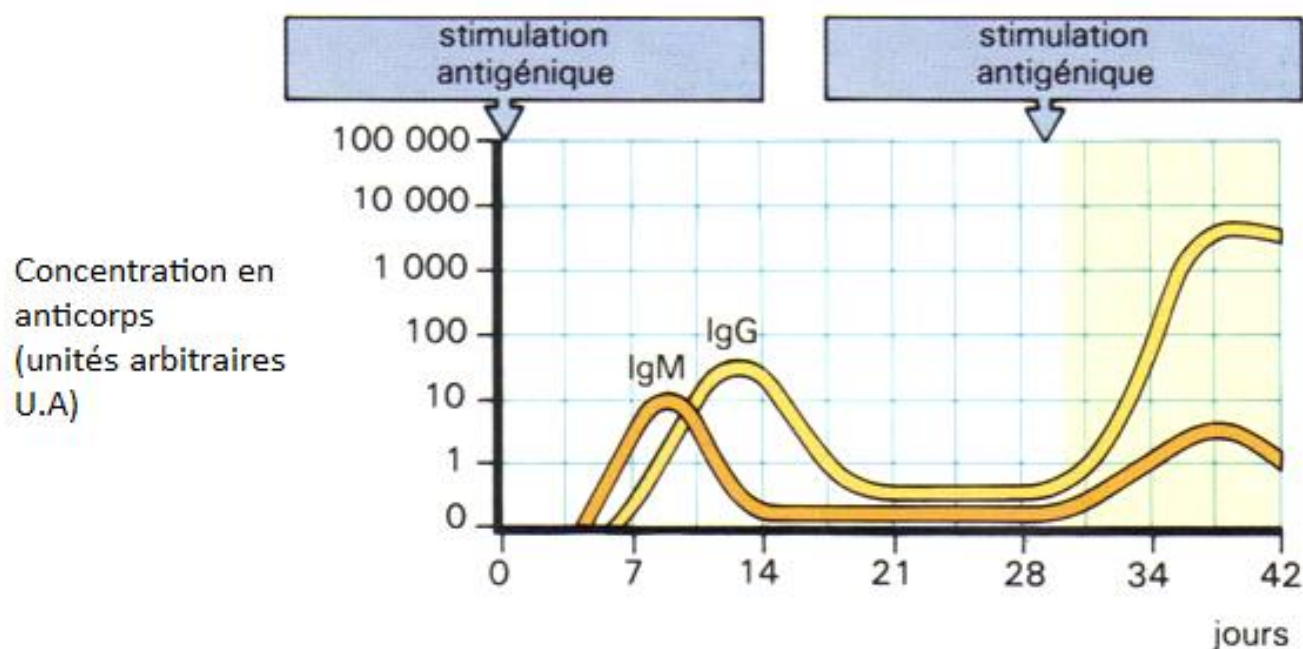
Structure de l'amoxicilline



## DOCUMENT A RENDRE AVEC LA COPIE

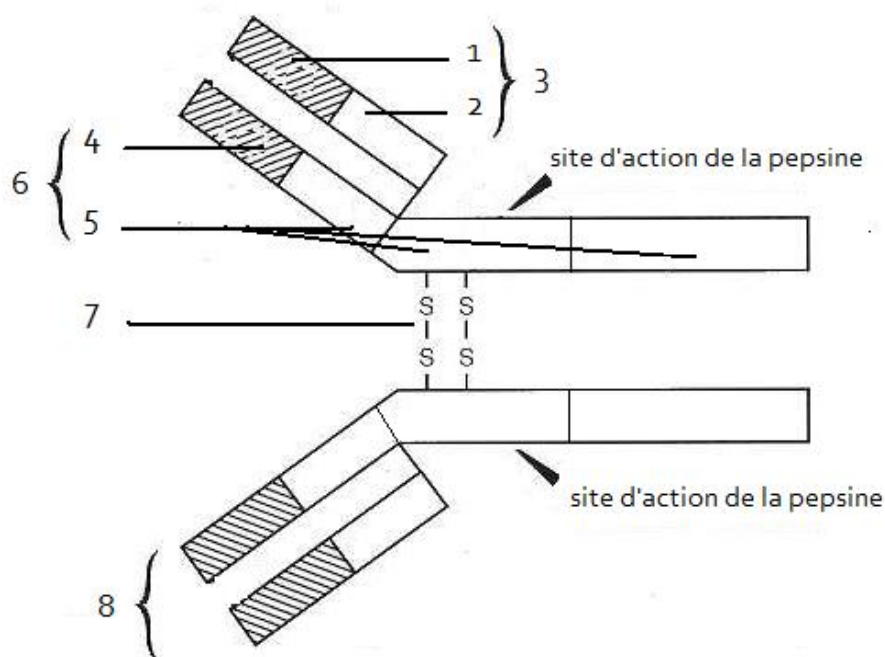
## Annexe 11

Dosage de la quantité d'anticorps (IgG et IgM) produits par un cheval à la suite d'une immunisation<sup>5</sup>



## Annexe 12

## Structure d'une IgG



<sup>5</sup> Immunologie fondamentale et appliquée, Roitt, Brostoff et Male, Ed MEDSI/ Mac Graw-Hill

## Annexe 13

## Technique du « phage display »

Des bactériophages filamenteux sont modifiés de façon à posséder, dans leur génome, une séquence des gènes humains codant les domaines variables des anticorps.

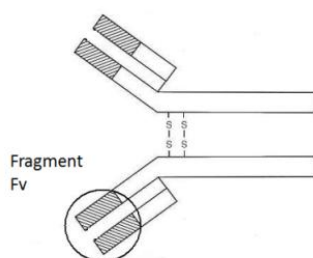
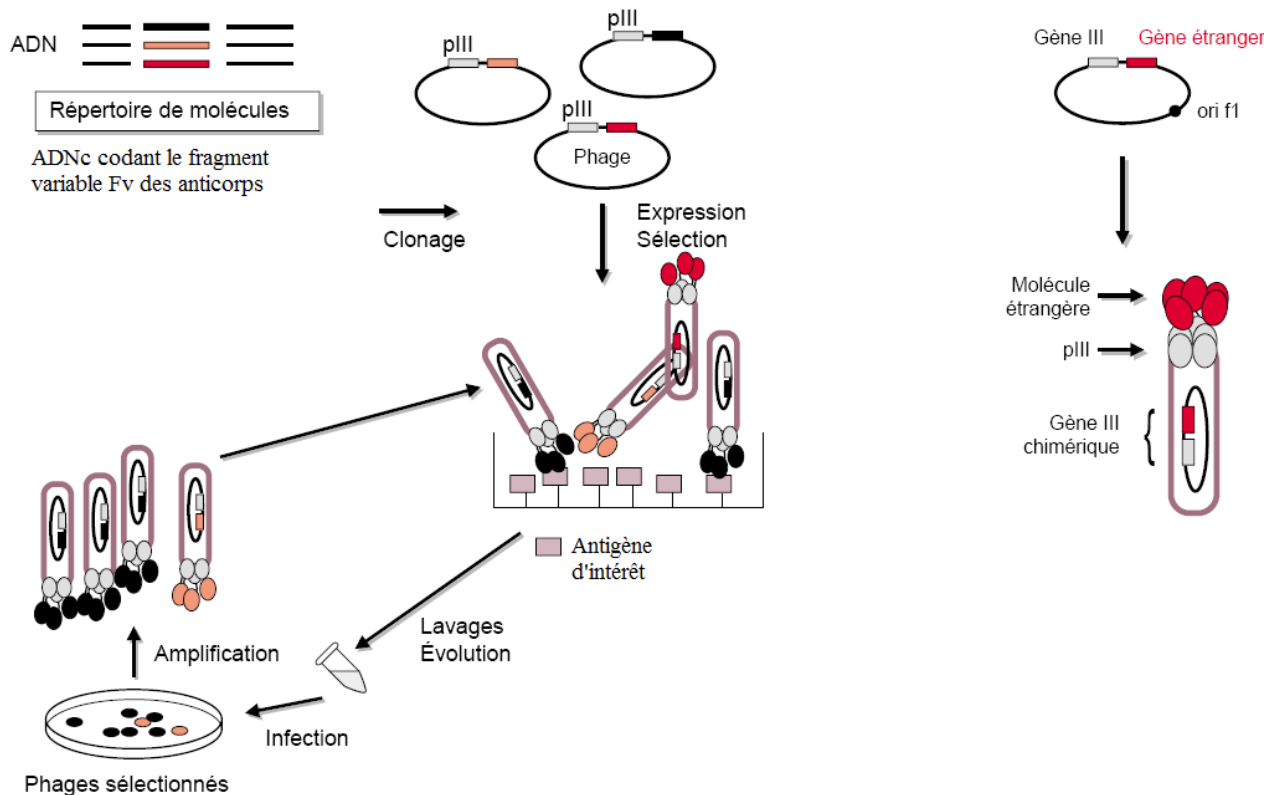
Dans ces conditions, il est possible d'obtenir des phages présentant à leur surface toutes les combinaisons possibles de paratopes ( $10^{10}$  paratopes différents)<sup>6</sup>.

Les phages recombinants, dont la spécificité est aléatoire, sont ensuite sélectionnés pour leur capacité de liaison à l'antigène contre lequel on veut produire un anticorps par chromatographie d'affinité.

Ils sont ensuite amplifiés par infection d'*Escherichia coli*.

Les fragments variables (Fv) portant les paratopes obtenus peuvent être greffés sur des anticorps humains.

Document A

Document B<sup>7</sup>

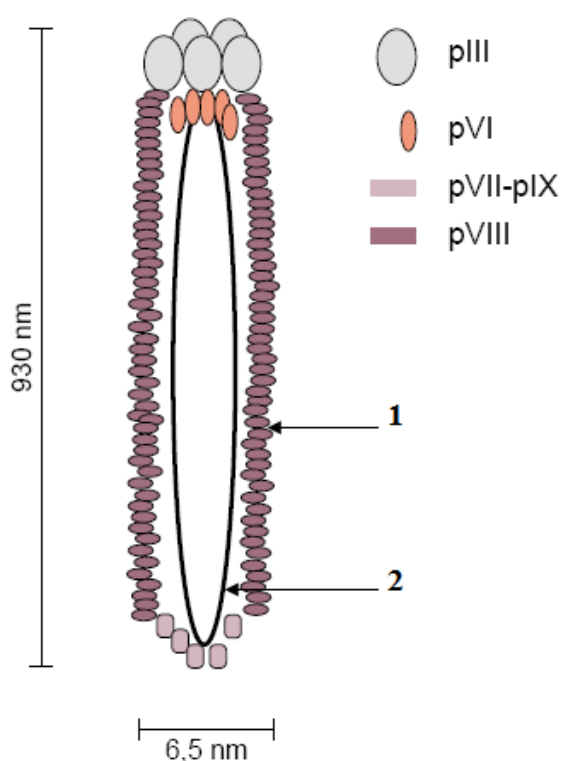
<sup>6</sup> Making antibodies by phage display technology. Winter G, Griffiths AD, Hawkins RE, Hoogenboom HR. *Annu Rev Immunol* 1994 ; 12 : 433-55.

<sup>7</sup> Présentation à la surface des phages filamenteux: les multiples applications du phage display. C. Souriau, T. Duc Hua, M-P. Lefranc, M. Weill . *Médecine/Science* 1998, n°3 vol 14 (p300-8)

## Annexe 14

Structure du phage filamenteux Fd<sup>8</sup>

Le bactériophage fd est un bactériophage filamenteux de la famille des *Inoviridae*. Il est en forme de longue fibre de 6,5 nm de diamètre et de 900 à 1900 nm de longueur. Il est formé d'un ADN simple brin circulaire qui se trouve au centre du filament. L'ADN est entouré d'un tube fait de petites protéines organisées en hélice. Le virus infecte les bactéries *Escherichia coli* F<sup>+</sup> en s'attachant au bout d'un pilus sexuel ; l'ADN entre dans la bactérie à travers le pilus, grâce à une protéine particulière d'adsorption. Une forme répliquative est d'abord synthétisée puis transcrite. Une des protéines virales synthétisées participe à la réplication de l'ADN du phage. Les phages filamenteux fd ne tuent pas la cellule hôte : les nouveaux virions formés à l'intérieur de la bactérie sont relâchés progressivement par un processus sécrétoire. La bactérie continue de croître et de se diviser à un rythme quelque peu ralenti.



Le bactériophage fd est logé à l'intérieur d'un cylindre flexible composé d'environ 2700 monomères de protéines pVIII.

Une extrémité de la particule virale présente 5 copies des protéines pVII et pIX tandis que l'autre extrémité présente 5 copies des protéines pIII et pVI.

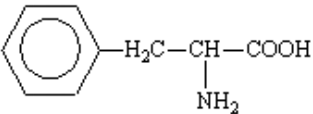
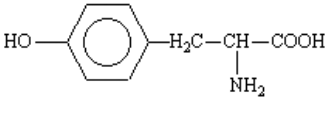
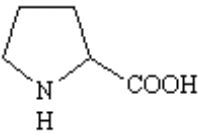
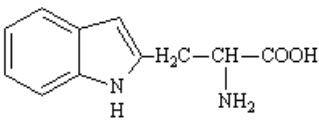
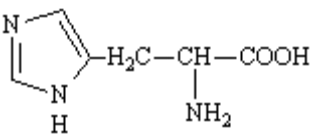
Les protéines pIII sont impliquées dans l'attachement du bactériophage fd aux pili sexuels de la bactérie hôte, telle que *Escherichia coli*, qui précède l'infection.

<sup>8</sup> Présentation à la surface des phages filamenteux: les multiples applications du phage display. C. Souriau, T. Duc Hua, M-P. Lefranc, M. Weill . *Médecine/Science* 1998, n°3 vol 14 (p300-8)

## Annexe 15

## Les acides aminés

## Document A : Structure des acides aminés

|                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Lysine-<br>Lys<br><b>K</b><br><br>$\text{H}_2\text{N}-(\text{H}_2\text{C})_4-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$                                                                 | Asparagine-<br>Asn<br><b>N</b><br><br>$\text{H}_2\text{N}-\underset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{C}}}-\text{H}_2\text{C}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$ | Isoleucine<br>Ile<br><b>I</b><br><br>$\text{H}_3\text{C}-\text{H}_2\text{C}-\underset{\text{CH}_3}{\text{HC}}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$ | Glycine<br>Gly<br><b>G</b><br><br>$\text{H}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$                                                                                         |
| Phénylalanine-<br>Phe<br><b>F</b><br><br>                                                                  | Tyrosine<br>Tyr<br><b>Y</b><br><br>                                                            | Leucine<br>Leu<br><b>L</b><br><br>$\text{H}_3\text{C}-\underset{\text{CH}_3}{\text{HC}}-\text{H}_2\text{C}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$    | Alanine<br>Ala<br><b>A</b><br><br>$\text{H}_3\text{C}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$                                                                               |
| Arginine<br>Arg<br><b>R</b><br><br>$\text{H}_2\text{N}-\underset{\text{NH}}{\underset{\parallel}{\text{C}}}-\text{HN}-(\text{H}_2\text{C})_3-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$ | Acide aspartique<br>Asp<br><b>D</b><br><br>$\text{HOOC}-\text{H}_2\text{C}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$                                                       | Thréonine<br>Thr<br><b>T</b><br><br>$\text{H}_3\text{C}-\underset{\text{OH}}{\text{HC}}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$                       | Proline<br>Pro<br><b>P</b><br><br>                                                             |
| Cystéine<br>Cys<br><b>C</b><br><br>$\text{HS}-\text{H}_2\text{C}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$                                                                             | Sérine<br>Ser<br><b>S</b><br><br>$\text{HOH}_2\text{C}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$                                                                           | Valine<br>Val<br><b>V</b><br><br>$\text{H}_3\text{C}-\underset{\text{CH}_3}{\text{HC}}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$                        | Glutamine<br>Gln<br><b>Q</b><br><br>$\text{H}_2\text{N}-\underset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{C}}}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$ |
| Acide glutamique<br>Glu<br><b>E</b><br><br>$\text{HOOC}-\text{H}_2\text{C}-\text{H}_2\text{C}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$                                                | Tryptophane<br>Trp<br><b>W</b><br><br>                                                       | Méthionine<br>Met<br><b>M</b><br><br>$\text{H}_3\text{C}-\text{S}-\text{H}_2\text{C}-\text{H}_2\text{C}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$       | Histidine<br>His<br><b>H</b><br><br>                                                          |

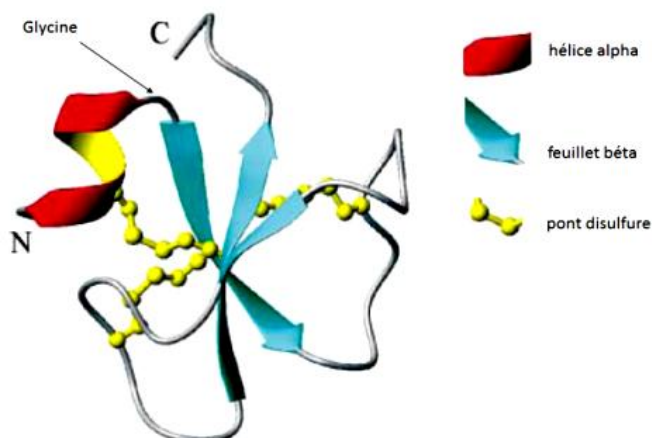
## Document B : pKa des groupements ionisables de quelques acides aminés

|                  | pKa ( $\alpha$ -COOH) | pKa ( $\alpha$ -NH <sub>2</sub> ) | pKa (R) |
|------------------|-----------------------|-----------------------------------|---------|
| Lysine           | 2,18                  | 8,95                              | 10,53   |
| Arginine         | 2,17                  | 9,04                              | 12,48   |
| Acide aspartique | 2,09                  | 9,82                              | 3,86    |
| Acide glutamique | 2,19                  | 9,67                              | 4,25    |

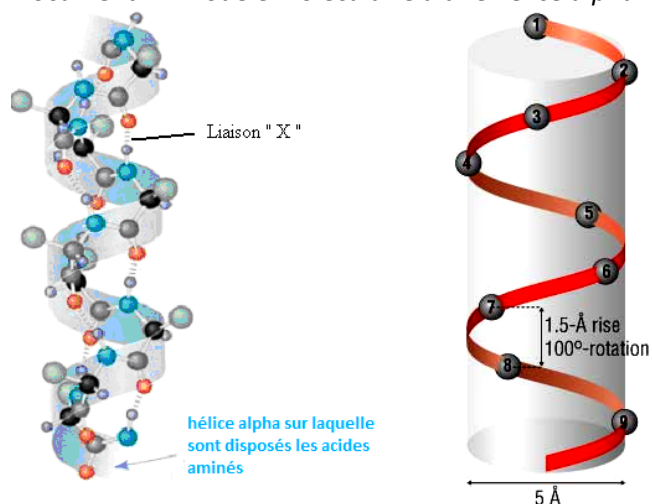
## Annexe 16

## Étude de la structure tridimensionnelle de la crotamine<sup>9</sup>

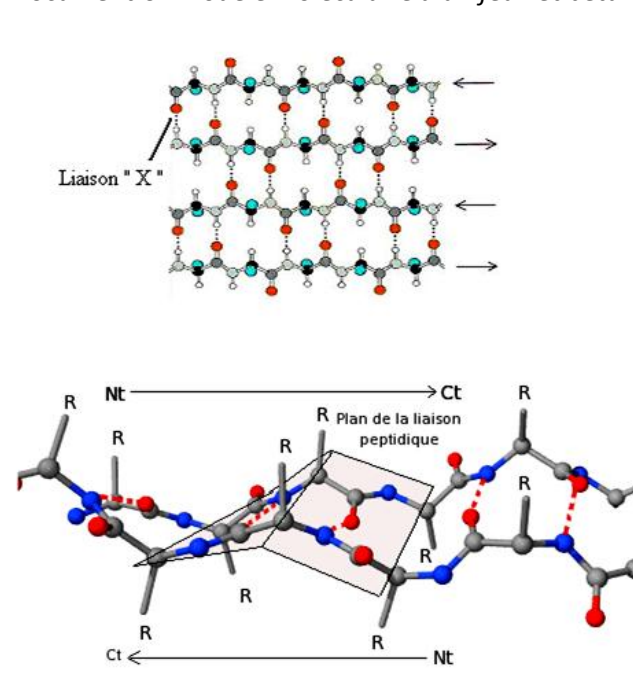
Document A : Schéma représentatif de la structure en trois dimensions de la crotamine



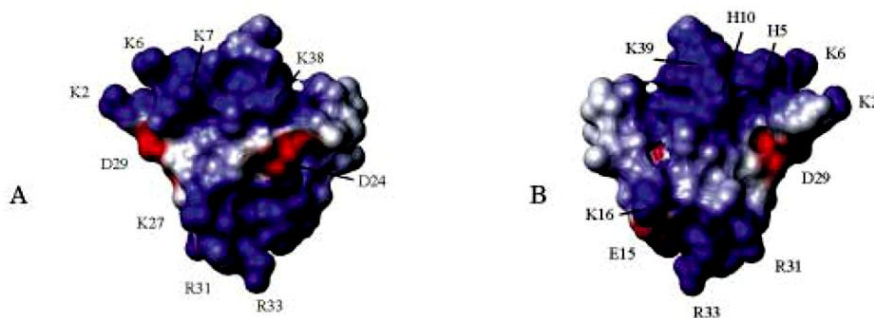
*Document B : Modèle moléculaire d'une hélice alpha*



*Document C : Modèle moléculaire d'un feuillet bêta*



*Document D : Structure dans l'espace de la crotamine*



Les régions chargées positivement et négativement sont colorées respectivement en bleu et en rouge

Figure A : représentation d'une face de la crotamine

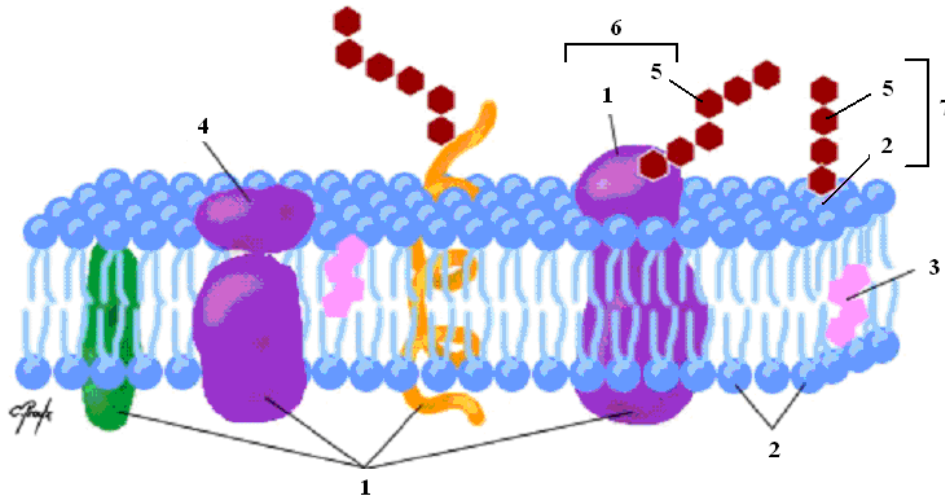
Figure B : même représentation que la figure A tournée à 180°

<sup>9</sup> Solution structure of crostamine, a Na<sup>+</sup> channel affecting toxin from *Crotalus durissus terrificus* venom, Nicastro et al. *Eur. J. Biochem.* 270, 1969–1979 (2003)

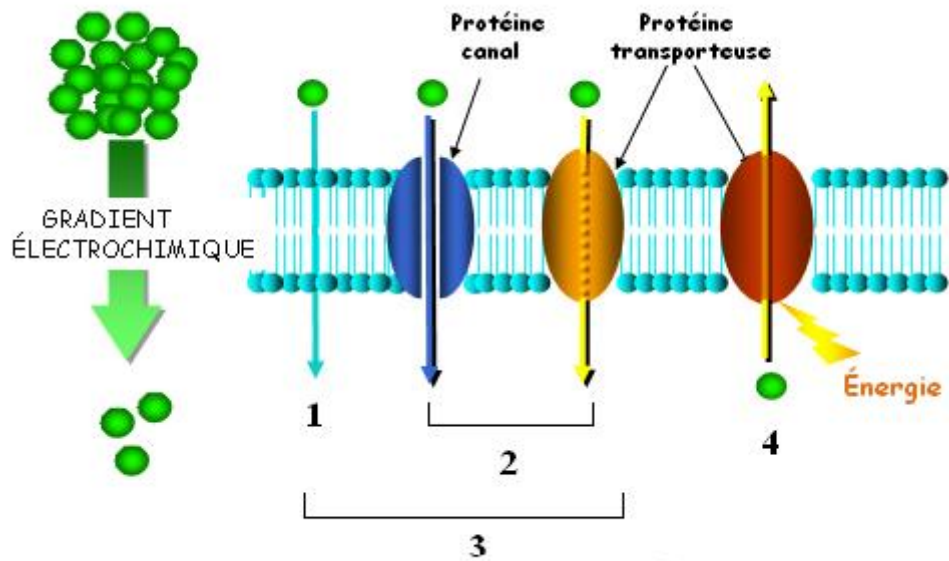
## Annexe 17

## La membrane plasmique et les transports membranaires

Document A : structure de la membrane plasmique



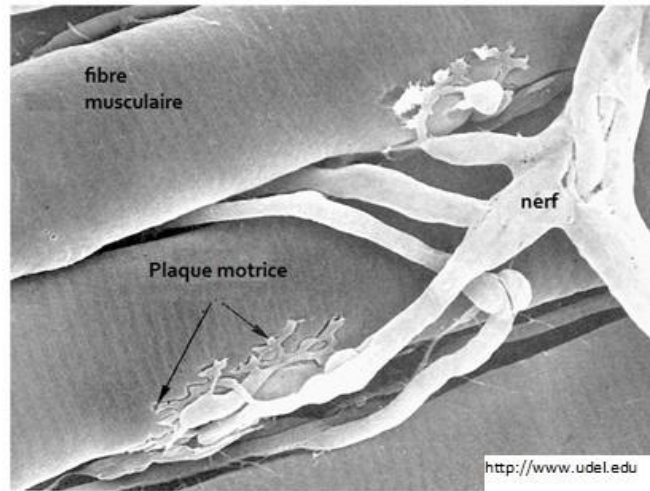
Document B : Les quatre types de transports membranaires



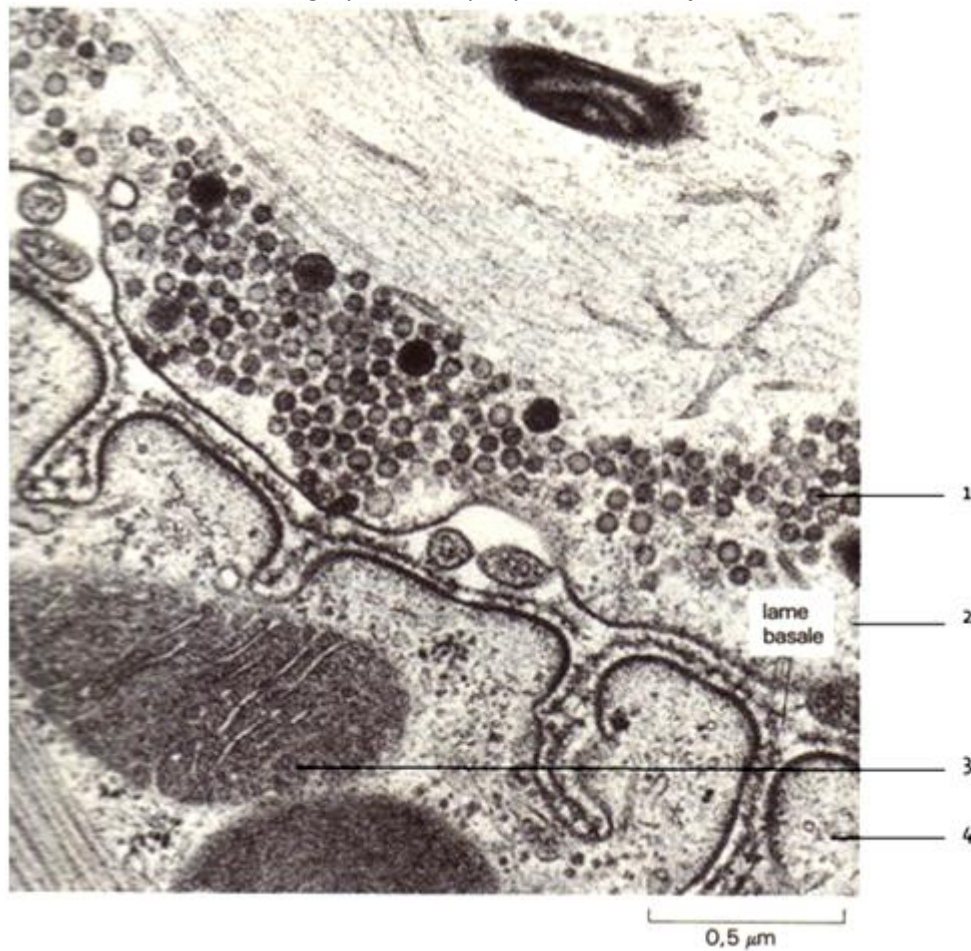
## Annexe 18

### La plaque motrice ou jonction neuro-musculaire

Document A : électronographie d'un nerf innervant une fibre musculaire



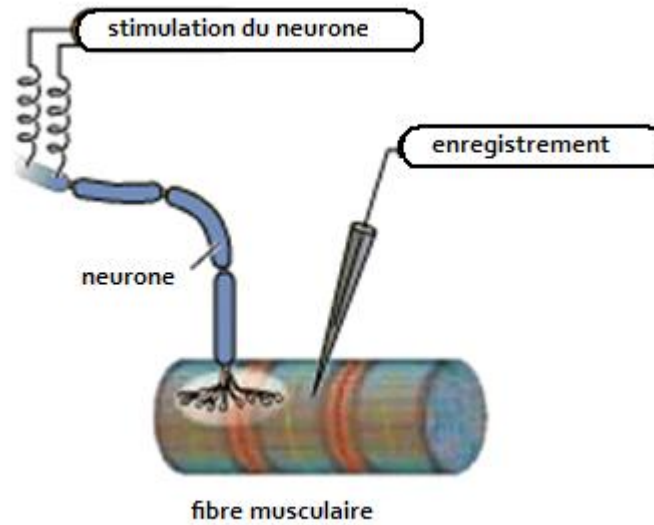
Document B : électronographie de la plaque motrice ou jonction neuro musculaire<sup>10</sup>



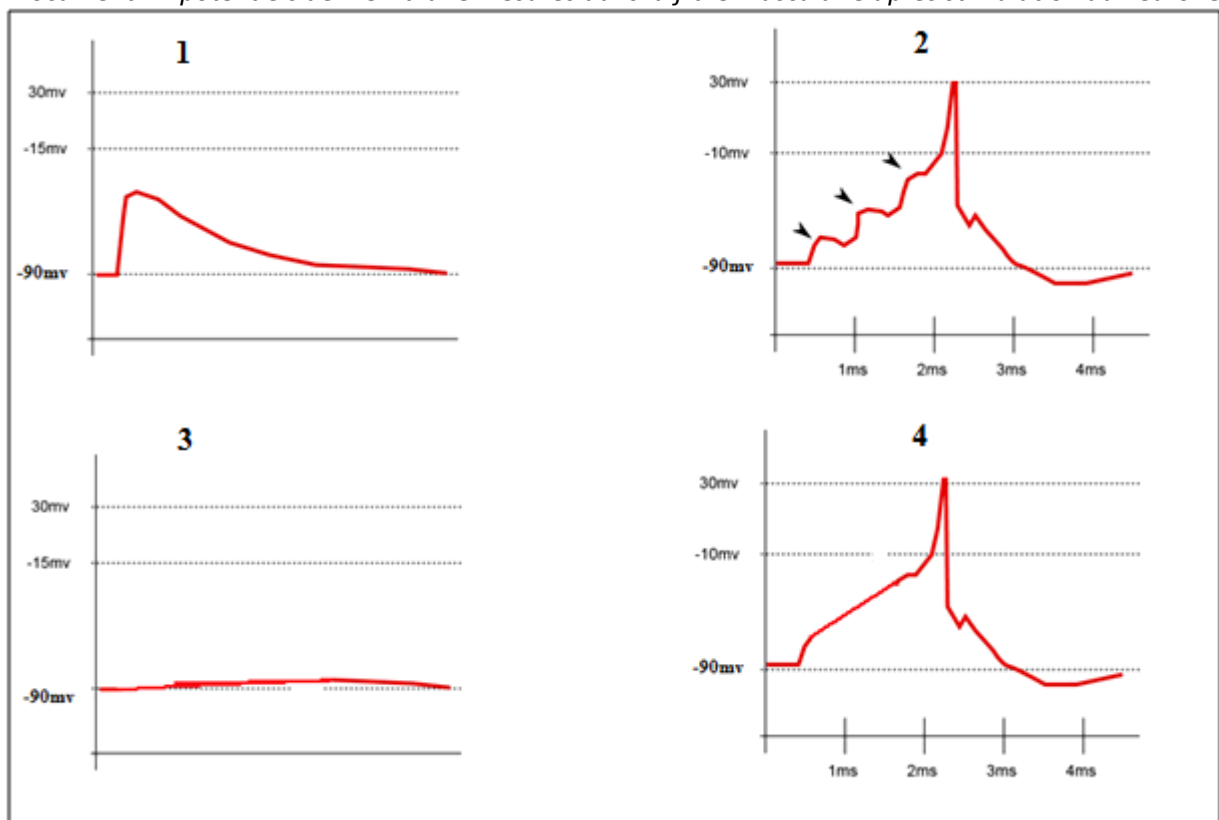
<sup>10</sup> La cellule, Alberts et al. Ed. Flammarion Médecine Sciences

### Annexe 18 (Suite)

Document C : schéma du montage permettant de mesure le potentiel de membrane de la fibre musculaire



Document D : potentiels de membrane mesurés dans la fibre musculaire après stimulation du neurone

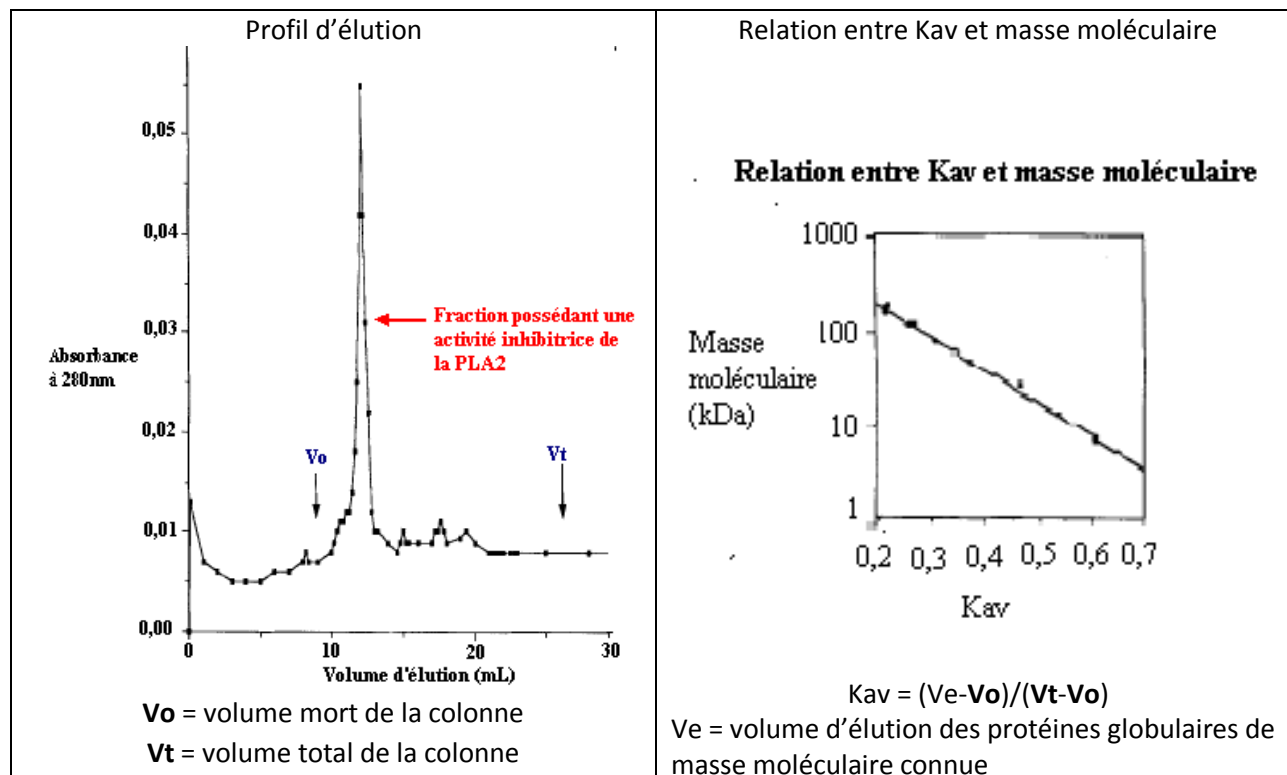


- 1 : Une stimulation sur l'axone
- 2 : Trois stimulations sur l'axone
- 3 : Plusieurs stimulations sur une jonction neuromusculaire traitée par PLA<sub>2</sub>
- 4 : Jonction neuromusculaire traitée par PLA<sub>2</sub> avec injection d'Acétylcholine

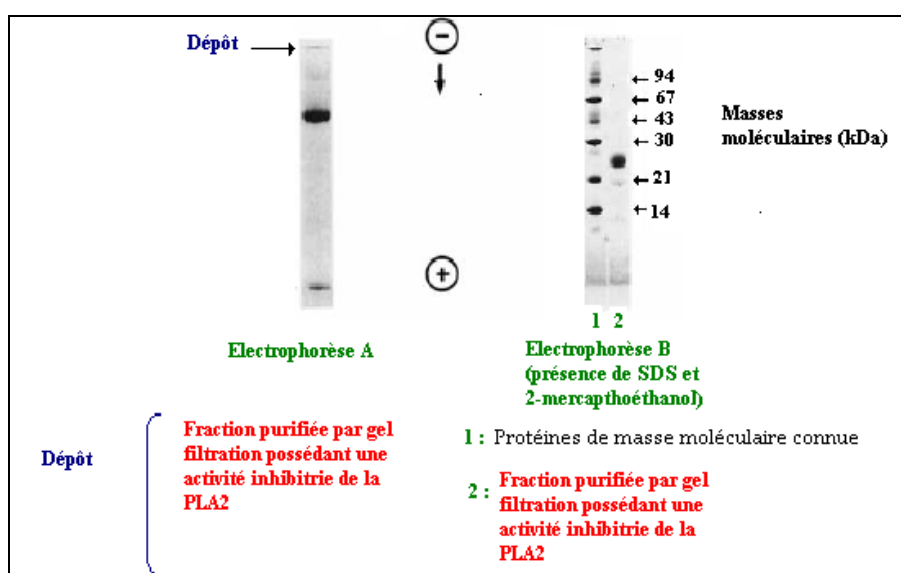
## Annexe 19

Etude de la structure de l'inhibiteur de la crotoxine<sup>11</sup>

Document A : Détermination de la masse moléculaire de l'inhibiteur de crotoxine par gel filtration (FPLC Superdex 200)

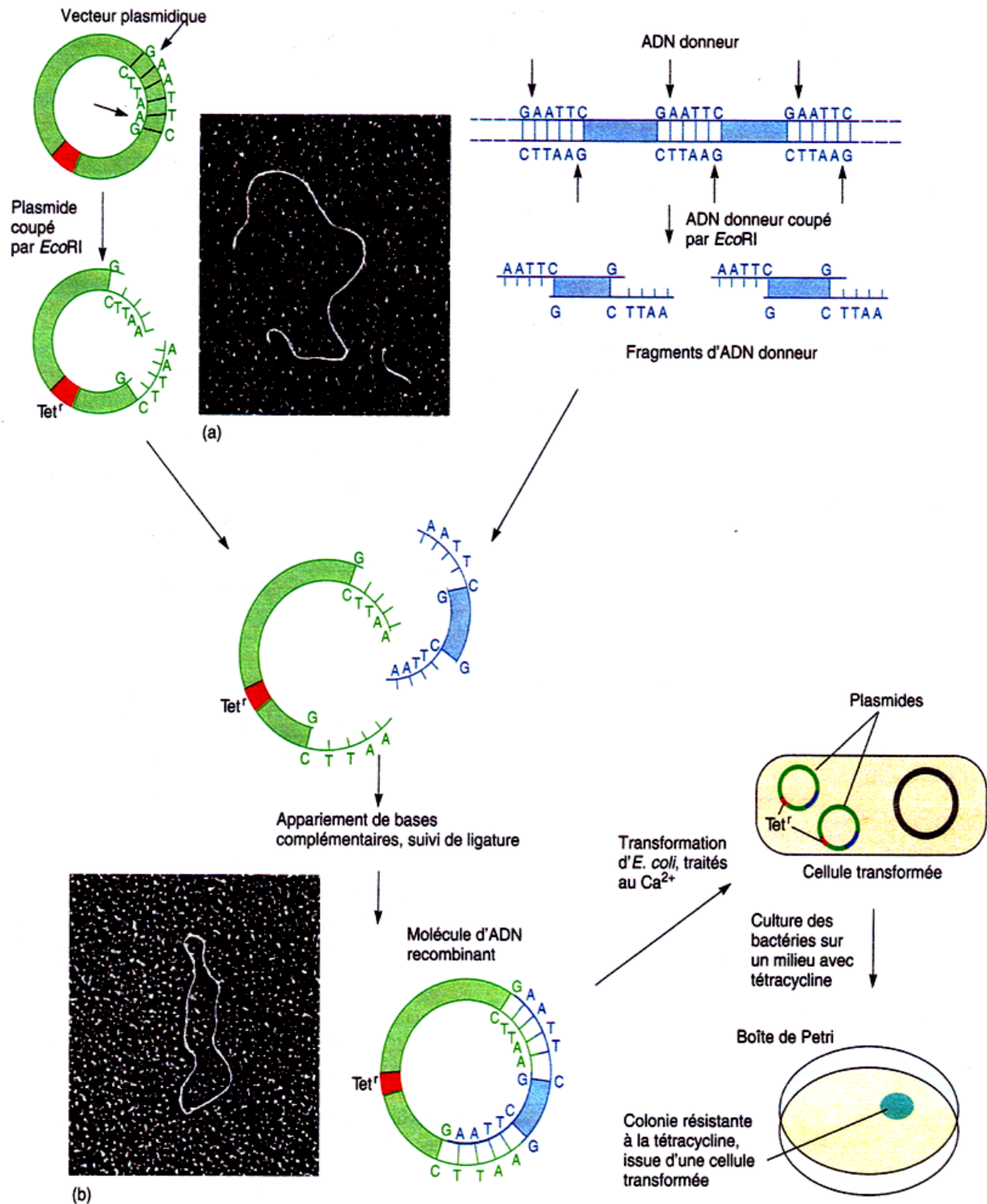


Document B : Caractérisation de l'inhibiteur de crotoxine par électrophorèse en gel de polyacrylamide



<sup>11</sup> Molecular structure and mechanism of action of the crotoxin inhibitor from *Crotalus durissus terrificus* serum, Perales et al. Eur. J. Biochem. 1995 ; 227, 19-26

## Annexe 20

Construction et clonage de plasmides recombinants<sup>12</sup>

- a : image au microscope électronique d'un plasmide linéarisé par une enzyme de restriction et un fragment d'ADN donneur
- b : image au microscope électronique d'un plasmide recombinant

<sup>12</sup> Microbiologie de Prescott, Harley, Klein, ed. De Boeck Universités