

## **La famille Kunitz/BPTI des venins de serpents: Structure, classification et potentiel pharmacologique**

Maram Morjen, Zaineb Abdelkafi-Koubaa, José Luis, Houcemeddine Othman,  
Najet Srairi-Abid, Mohamed Ayeb, Naziha Marrakchi

### ► **To cite this version:**

Maram Morjen, Zaineb Abdelkafi-Koubaa, José Luis, Houcemeddine Othman, Najet Srairi-Abid, et al..  
La famille Kunitz/BPTI des venins de serpents: Structure, classification et potentiel pharmacologique.  
Archives de l'Institut Pasteur de Tunis, 2014, 91 (1-4), pp.3-13. hal-01481713

**HAL Id: hal-01481713**

**<https://hal-amu.archives-ouvertes.fr/hal-01481713>**

Submitted on 2 Mar 2017

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**(Revue acceptée)**  
**La famille Kunitz/BPTI des venins de serpents:**  
**Structure, classification et potentiel pharmacologique**

**Snake venom Kunitz/BPTI family:**  
**Structure, classification and pharmacological potential**

**La famille Kunitz/BPTI des venins de serpents**

Maram Morjen<sup>1</sup>, Zaineb Abdelkafi-Koubaa<sup>1</sup>, José Luis<sup>2,3</sup>, Houcemeddine Othman<sup>1</sup>, Najet Srairi-Abid<sup>1</sup>, Mohamed El Ayeb<sup>1</sup>, Naziha Marrakchi<sup>1,4</sup>.

<sup>1</sup> Laboratoire des Venins et Biomolécules Thérapeutiques, Institut Pasteur de Tunis, Tunisia.

<sup>2</sup> Aix-Marseille Université, Marseille, France.

<sup>3</sup> Centre de Recherche en Oncologie biologique et Oncopharmacologie (CRO2), INSERM UMR 911, Marseille, France.

<sup>4</sup> Faculté de Médecine de Tunis, Tunisia.

**Corresponding author: E-mail: [naziha.marrakchi@pasteur.rns.tn](mailto:naziha.marrakchi@pasteur.rns.tn)**

**Mots clés :** Venin des serpents, le domaine kunitz/BPTI, conformation canonique, canaux ioniques, tumeur.

**Keywords:** snake venom, Kunitz/BPTI domain, canonical loop, ion channels, tumor.

## **Abstract**

Snake venoms are rich sources of serine proteinase inhibitors that are members of the Kunitz/BPTI (bovine pancreatic trypsin inhibitor) family. Generally, these inhibitors are formed by 60 amino acids approximately. Their folding is characterised by a canonical loop that binds in a complementary manner to the active site of serine protease. Some variants from snake venoms show only weak inhibitory activity against proteases while others are neurotoxic. Moreover, proteases inhibitors are involved in various physiological processes, such as blood coagulation, fibrinolysis, and inflammation. Also, these molecules showed an anti-tumoral potent and anti-metastatic effect. Interestingly, Kunitz/BPTI peptides can have exquisite binding specificities and possess high potency for their targets making them excellent therapeutic candidates.

## **Résumé**

Les venins des serpents sont riches en inhibiteurs de sérine protéases qui sont membres de la famille Kunitz / BPTI (inhibiteur de la trypsine pancréatique bovine). Ces inhibiteurs sont en général formés par environ 60 acides aminés. Leur modèle structural est caractérisé par la présence d'une boucle canonique qui se lie d'une manière complémentaire au site actif des sérines protéases. Certains inhibiteurs ne montrent qu'une faible activité inhibitrice contre la protéase tandis que d'autres sont neurotoxiques. De plus, ces peptides sont impliqués dans de divers processus physiologiques, tels que la coagulation sanguine, la fibrinolyse et l'inflammation. En outre, ces molécules ont montré un puissant effet anti-tumoral et anti-métastatique. Ainsi, les inhibiteurs de type Kunitz/BPTI peuvent avoir des spécificités de liaison et possèdent un potentiel élevé envers leurs cibles qui les rend d'excellents candidats thérapeutiques.

## Introduction

Parmi les différentes sources naturelles de composés biologiquement actifs, les venins représentent une cible de choix pour la recherche médicale. L'analyse biochimique et pharmacologique des venins de serpents réalisée au cours de ces dernières décennies, révèle un polymorphisme structural et fonctionnel de plus en plus important des protéines qu'ils contiennent. Ces dernières induisent leurs effets principalement par deux voies : soit grâce à leurs activités enzymatiques (protéases<sup>1, 2</sup>, L-amino acide oxydase<sup>3</sup> ...), soit grâce à leurs interactions avec des récepteurs membranaires, qui sont dans la plupart des cas les intégrines (les désintégrines<sup>4</sup>, les phospholipases<sup>5</sup> et les lectines de type C<sup>6</sup>).

Plusieurs inhibiteurs de protéases de type kunitz/BPTI ont été isolés à partir des venins de serpents des Viperidae et des Elapidae<sup>7</sup>. La famille des inhibiteurs de protéase de type Kunitz/BPTI, comme en témoigne l'inhibiteur bovin de la trypsine pancréatique (BPTI ou Aprotinine) a été largement étudiée. La première protéine de type Kunitz dans le venin des animaux (Swissprot Non: P00979) a été isolée à partir du venin serpent *Dendroaspis polylepis polylepis* en 1974<sup>8</sup>. Ensuite, plusieurs protéines de type Kunitz/BPTI ont été trouvées chez différents animaux venimeux y compris les serpents, les abeilles, les scorpions et les araignées<sup>9</sup>. Ces inhibiteurs forment une classe de protéines de faible masse moléculaire<sup>10</sup>. Leur fonction ancestrale principale a été l'inhibition d'un large éventail de sérines protéases<sup>11</sup>. Au cours de l'évolution, des activités toxiques comme le blocage des canaux ioniques se sont développées sous l'effet de la sélection darwinienne<sup>8</sup>.

### I/ Structure des inhibiteurs de protéases de type kunitz/BPTI

Les inhibiteurs de protéases de type kunitz sont des protéines de faible masse moléculaire ( $\approx 7$  kDa). Ils sont formés par environ 60 acides aminés. Leur structure est monomérique avec 6 cystéines réticulées par 3 ponts disulfures<sup>8, 10, 12, 13</sup> (Figure 1). Cette structure conservée constitue le domaine Kunitz des inhibiteurs de protéase à serine. Ce domaine Kunitz a été découvert la première fois dans l'inhibiteur bovin de la trypsine pancréatique (BPTI)<sup>14</sup>. Ce dernier est considéré comme une protéine de référence de la famille des inhibiteurs des sérines protéases<sup>15</sup>. Il possède une structure tertiaire conservée et stabilisée par 3 ponts disulfures<sup>16</sup>. La structure du BPTI (Figure 2A) montre la présence de deux régions  $\alpha$  hélicoïdales ; l'hélice  $3_{10}$ :H1 forme un tour et demi à proximité de l'extrémité N-terminale alors que l'hélice  $\alpha$ : H2 forme trois tours près de l'extrémité C-terminale. La partie centrale de la protéine contient deux feuillets  $\beta$ ,  $\beta 1$  et  $\beta 2$ . Ces derniers sont reliés par une boucle de un tour (T1) qui forme la  $\beta$ -hairpin. Comme on l'a mentionné précédemment, les six résidus

de cystéines conservées dans la BPTI forment trois liaisons disulfures qui stabilisent la structure tridimensionnelle de la protéine. Les Cys5 et Cys55 forment le premier pont disulfure qui relie les extrémités N-et C-terminales de la BPTI. Les Cys14 et Cys38 font le deuxième pont qui relie l'extrémité libre des deux feuillets  $\beta$ . Le troisième pont disulfure formé par Cys30 et Cys51 relie l'hélice  $\alpha$  (H2) au feuillet  $\beta$ 2<sup>15, 17</sup>. Une caractéristique clé dans la structure des inhibiteurs de type Kunitz/BPTI est la boucle L1 située entre l'hélice 3<sub>(10)</sub> (H1) et le feuillet  $\beta$ 1 du polypeptide. Cette boucle est constituée de six acides aminés. Les molécules appartenant à la famille kunitz/BPTI ont en commun une boucle inhibitrice exposée vers l'extérieur, de séquence variable mais dont la conformation P3-P3' est très similaire, est appelée de ce fait, boucle canonique (Figure 2B)<sup>10, 14</sup>. Une seconde boucle L2 située entre l'hélice  $\alpha$  (H2) et le feuillet  $\beta$ 2 du polypeptide, consolide par un pont disulfure la boucle canonique<sup>14</sup>. Plusieurs études ont montré que les architectures moléculaires des inhibiteurs de type kunitz des venins de serpents sont essentiellement similaires à la structure du BPTI<sup>10, 15, 18, 19</sup>.

## **II/Classification des protéines de la famille Kunitz/BPTI des venins des serpents**

Les inhibiteur de type Kunitz/BPTI des venins de serpents ont été classés en trois groupes sur la base de leur fonction : le premier groupe comprend les inhibiteurs des protéases à serines, le deuxième groupe est formé par les inhibiteurs des canaux ioniques et le troisième groupe est formé par les homologues des Kunitz/BPTI bifonctionnelles.

### **1/ Les inhibiteurs des protéases à serines**

Ce premier groupe contient les peptides des venins des Elapidae et des Viperidae non neurotoxiques. Ces derniers possèdent une forte activité inhibitrice des serines protéases<sup>1, 2</sup>. On peut citer la OH-TCI issue du venin de *Ophiophagus hannah* qui inhibe à la fois l'activité de la trypsine et de la chymotrypsine<sup>7</sup>. A partir du venin de Leaf-nosed vipère, un inhibiteur de trypsine a été isolé<sup>21</sup>. Egalement, *Naja atra*, un inhibiteur de la chymotrypsine a été caractérisé à partir du venin de *N. atra*<sup>22</sup>. La textilinine-1 qui est purifiée et caractérisée à partir du venin du serpent Australien, *Pseudonaja textilis* bloque l'activité d'une gamme de protéases à sérine, y compris la plasmine et la trypsine<sup>23</sup>. Cet inhibiteur de protéase de type Kunitz est le plus étudié dans le venin des serpents<sup>10, 24, 25, 26</sup>.

La plupart des inhibiteurs de type kunitz/BPTI inhibent les sérines protéases à travers leur site antiprotéinase qui est hautement conservé. Les Inhibiteurs de type Kunitz interagissent avec les sérines protéases par la fixation au niveau du site actif de l'enzyme principalement par la boucle L1 exposée dans une conformation canonique P3-P3' (Figure 2A et B). La spécificité envers les protéases à serines est définie par le résidu P1 et la petite séquence dans la région

qui interagit avec les protéases<sup>27, 28</sup>. Selon Schechter et Berger (1967) une nomenclature pour décrire la position de ces acides aminés a été identifiée généralement comme P3, P2, P1, P1', P2', P3', respectivement<sup>27</sup>. Au niveau de l'aprotinine (BPTI), cet hexapeptide est Pro13-Cys14-Lys15-Arg17-Ala16-Ile18<sup>29</sup>, alors que dans la textilinine-1, il correspond au Pro15-Cys16-Arg17-Val18-Arg19-Phe20<sup>14</sup> (Figure 1). Comme indiqué par Laskowski et Kato (1980), dans les inhibiteurs de la protéase, la spécificité envers les enzymes est généralement corrélée au résidu P1. Ainsi, les inhibiteurs ayant P1 la Lys ou l'Arg ont tendance à inhiber la trypsine. Cependant, dans le cas des inhibiteurs qui ont tendance à inhiber la chymotrypsine, le résidu P1 pourrait être soit une Leu, Met, Phe, Tyr ou Trp<sup>28</sup>.

Une seconde boucle : L2 (Figure 2 A) a également le potentiel d'interagir avec les sérines protéases. La seule différence dans la séquence d'acides aminés dans les boucles secondaires de l'aprotinine et de la textilinine-1 est en position 36, qui est une valine dans l'aprotinine et une isoleucine pour la textilinine-1 (Figure 1)<sup>14</sup>.

L'analyse structure-fonction du BPTI a montré que la boucle canonique exposée au solvant est hautement complémentaire au site actif de l'enzyme (de la poche S1), dans lequel le résidu P1 (Lys15 dans BPTI) pénètre profondément et interagit avec Asp 189 au fond de la poche S1<sup>30, 31</sup> (Figure 2). L'Aprotinine est capable d'inhiber un large spectre de sérines protéinases dont la trypsine, la chymotrypsine, la plasmine et le plasma kallikréine<sup>8, 26</sup>.

La superposition du modèle structural du PIVL isolé à partir du venin de *Macrovipera lebetina transmediterranea* avec la Textilinine-1 co-cristallisé avec la trypsine (3D65) montre une complémentarité électrostatique relative (Figure 3). L'orientation du PIVL vers la trypsine prédit un rôle important de résidu P1 (N17). Cependant un contact pourrait être établi avec des groupes carbonyle de S214 et C191 de la trypsine. Le résidu Y19 du PIVL peut également interagir avec le résidu Y151 de l'enzyme en occupant un espace hydrophobe réduit sur la surface moléculaire de la trypsine<sup>12</sup>.

La Textilinine-1 se lie à la trypsine dans un mode canonique, par contre son interaction à la microplasmine humaine s'effectue par un mode atypique<sup>10</sup>. En fait, la structure cristalline du complexe microplasmine-Textilinine-1 montre que la Textilinine-1 interagit avec l'histidine catalytique de la microplasmine (Figure 4). Lorsque la chaîne latérale de l'histidine est placée dans la triade catalytique (S741, H603 et D646 en plasmine humaine)<sup>32</sup>, un encombrement stérique aurait lieu avec la chaîne latérale d'un résidu P1', V18 de la Textilinin-1<sup>10</sup>. Une propriété importante en terme de potentiel thérapeutique est que la Textilinine-1 interagit beaucoup plus rapidement avec la plasmine par rapport à l'Aprotinine. Il n'existe pas encore de structure cristalline pour le complexe Aprotinine-plasmine, mais le résidu P1' de

l'Aprotinine qui est l'alanine, est plus petit par rapport au résidu P1' de la Textilinine-1 qui est la V18. Par conséquent, il est probable que la triade catalytique reste intacte lorsque l'Aprotinine se lie à la plasmine. Dans le cas de la Textilinine-1 liée à la plasmine, la dissociation du complexe pourrait être facilitée par le mouvement de l'histidine dans sa position dans la triade catalytique. Ceci induit une libération rapide de l'inhibiteur de la plasmine. De plus, la boucle canonique dans la molécule libre de la Textilinine-1 peut adopter une structure inversée qui est stabilisée par des interactions entre V18, T12 et I35<sup>14</sup>. Cette souplesse peut être une propriété de la Textilinine-1 puisqu'elle facilite la libération rapide de l'enzyme. Ce mode inhabituel d'interaction explique la sélectivité de la Textilinine-1 à la plasmine parmi les kallicréines. Cette différence peut être exploitée pour la conception d'un futur médicament anti coagulant<sup>10,14</sup>.

## 2/ Les inhibiteurs des canaux ioniques

Les dendrotoxines (Dtxs) sont appelés inhibiteurs de protéases neurotoxiques<sup>18, 33</sup>. Ces derniers ont perdu leur activité protéasique<sup>34, 35</sup>. Ils bloquent des sous-types particuliers de canaux potassiques voltage-dépendants dans les neurones<sup>19, 20, 35</sup>. Des études montrent que l' $\alpha$ -dendrotoxine, isolée à partir du venin *Dendroaspis angusticeps* bloque les canaux Kv1.1, Kv1.2 et Kv1.6<sup>36</sup>. La dendrotoxine- $\kappa$  (DTX- $\kappa$ ) de *Dendroaspis polylepsis polylepsis* bloque préférentiellement les canaux Kv1.1<sup>19, 37</sup>. Ainsi, de nombreuses études ont tenté d'identifier les résidus d'acides aminés impliqués dans l'interaction des dendrotoxines à leurs cibles, les canaux potassiques. Harvey et al<sup>33</sup>, ont montré que les résidus chargés positivement sont essentielles pour l'activité de la dendrotoxine-I. Ils ont rapporté que l'acétylation de la Lys5 à proximité de la région N-terminale et la Lys29 de la région bêta-hairpin a conduit à une diminution importante de l'affinité de liaison du Dtx-I<sup>38</sup>. Des résultats similaires ont été représentés avec dendrotoxine- $\kappa$  en utilisant la mutagenèse dirigée en remplaçant les résidus de la lysine et de l'arginine chargés positivement par les alanines qui sont neutres. Ces résultats, ainsi que de nombreux autres, ont mis en évidence que les lysines dans l'extrémité N-terminale, en particulier la Lys5 au niveau de l'hélice 3<sub>10</sub>, jouent un rôle important dans l'interaction des dendrotoxines avec les canaux potassiques<sup>39, 40</sup>. Par contre, la mutation des lysines K28, K29 et K30 par respectivement Ala, Ala et Gly n'a pas abouti à un changement dans l'activité biologique de l' $\alpha$ -Dtx. Ceci confirme que la lysine 5 joue un rôle crucial dans l'activité biologique de toutes les dendrotoxines, tandis que les résidus supplémentaires, pourraient jouer un rôle dans la spécificité des dendrotoxines<sup>40, 41</sup> (Figure 5).

D'autre part, les analogues structuraux des dendrotoxines ont contribué à définir les propriétés de reconnaissance moléculaire de différents types de canaux K<sup>+</sup>. Parce que les dendrotoxines

sont des marqueurs utiles des canaux  $K^+$  *in vivo*, elles ont été largement utilisées pour étudier la fonction de ces canaux dans la physiologie et la physiopathologie <sup>19,42</sup>.

La Calciclude, une toxine de type kunitz isolée à partir du venin de mamba vert *Bungarus fasciatus*, a été identifiée comme bloqueur des canaux  $Ca^{2+}$  de type L, N et P <sup>43</sup>. Le mode d'interaction de la protéine avec ces canaux calciques n'est pas encore élucidé. En effet, le positionnement du segment 1-7 au niveau de l'extrémité N-terminale par rapport au reste de la protéine est caractéristique de la Calciclude. L'implication de ce segment en plus de la lysine K31 au niveau de la tour bêta-hairpin pourraient être responsables de l'activité biologique de la calciclude <sup>44</sup>.

### **3/ Les homologues du Kunitz/BPTI bifonctionnelles.**

La Dtx B et la Dtx E du venin *Dendroaspis polylepis polylepis* et leurs homologues du venin *Dendroaspis angusticeps* (O-Dtxs) montrent une forte activité inhibitrice des protéases et une faible inhibition des canaux  $K^+$  <sup>45,46</sup>. Sur la base de l'activité biologique et les différences structurales, il a été proposé que les O-Dtxs ont des caractéristiques fonctionnelles et structurales qui sont intermédiaires entre les inhibiteurs de protéases et leurs homologues neurotoxiques <sup>46</sup>. De plus, la BF9 isolée à partir du venin de serpent *Bungarus fasciatus* est aussi un peptide de type kunitz bifonctionnel <sup>29</sup>. En fait, la BF9 possède à la fois une activité anti-protéasique en inhibant l' $\alpha$  chymotrypsine et des propriétés électrophysiologiques en bloquant le canal potassique Kv1.3 avec une  $IC_{50}$  de 120 nM. Ces propriétés inhibitrices des canaux potassium et des sérines protéases fournissent de nouvelles indications sur une évolution divergente et des applications fonctionnelles des peptides de type Kunitz des venins de serpents <sup>47</sup>.

## **II Activités physiologiques des protéines de la famille Kunitz/BPTI**

Les inhibiteurs des sérines protéases de type Kunitz sont impliqués dans divers processus physiologiques : comme la coagulation du sang, la fibrinolyse et l'inflammation <sup>8, 14, 25, 48</sup>. Dans le venin de serpent, certains inhibiteurs des sérines protéases de type Kunitz ont montré une forte activité anti-fibrinolytique. En fait, la Textiline-1, isolée à partir du venin du serpent Australien, *Pseudonaja textilis*, est capable d'inhiber fortement et spécifiquement la plasmine humaine. De ce fait, elle est actuellement proposée comme un médicament expérimental (Q8008, VENOMICS Pty Ltd) et est considérée comme un nouvel agent anti-saignement pour remplacer l'aprotinine <sup>14, 25, 26</sup>. Cependant, l'Aprotinine (Trasylol®) a été largement utilisée durant 40 ans comme un agent thérapeutique pour diminuer la perte de sang chez les patients subissant des interventions chirurgicales <sup>49</sup>. Néanmoins, une étude



approfondie menée par Fergusson et ses collègues impliquant plus de 2000 patients à haut risque de la chirurgie cardiaque a montré que son utilisation est associée à un risque significativement accru d'accident vasculaire cérébral, d'insuffisance cardiaque, d'infarctus du myocarde et d'encéphalopathie<sup>10, 50</sup>. D'un autre côté, la DrKIn-II isolée à partir de venin de la vipère Russell diminue puissamment l'activité amidolytique de la plasmine. La DrKIn-II possède également une activité antifibrinolytique. En outre, le traitement avec la DrKIn-II a empêché l'augmentation des produits de la dégradation de la fibrine (FDP) dans la coagulation chez les souris stimulées et a réduit de façon significative le temps de saignement dans la queue du modèle murin<sup>51</sup>.

### **III/ Effet anti-tumoral des protéines de la famille Kunitz/BPTI**

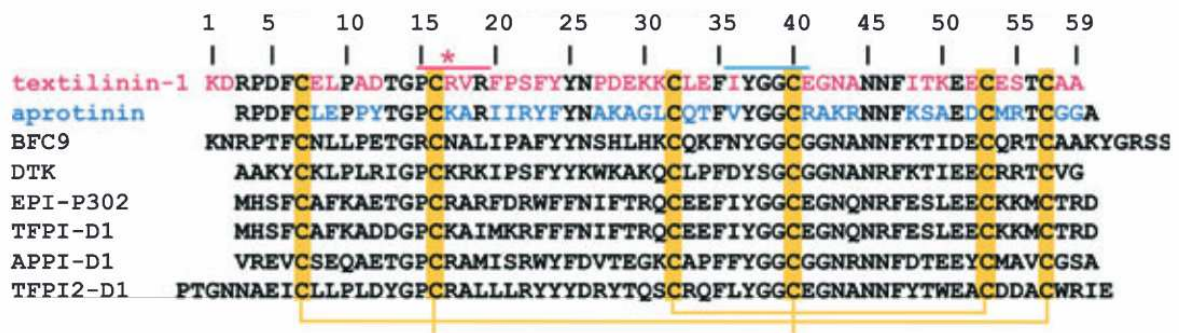
Pendant quelques décennies, les thérapies traditionnelles, comprenant la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie, sont utilisées et représentent les seuls moyens de lutte contre le cancer. Ces thérapies restent lourdes et provoquent beaucoup d'effets secondaires. Ainsi, de nouvelles études sont orientées vers la recherche de molécules biologiquement actives afin d'améliorer les traitements conventionnels et à développer de nouveaux traitements anti-cancéreux. Plusieurs inhibiteurs de la protéase de type Kunitz tel que la Bikunine, le « Tissue factor pathway inhibitor-2 » (TFPI-2) et « l'activator inhibitor-2 » (HAI-2) qui empêchent l'invasion tumorale et les métastases ont été décrits<sup>52, 53, 54, 55</sup>. A partir des venins de serpent, deux inhibiteurs de protéase homologues de type Kunitz PILP-2 et PLP-3 isolés à partir du venin de *Bungarus multicinctus* possèdent un effet anti-tumoral. Ils induisent la diminution de la migration et de l'invasion des cellules SK-N-SH du neuroblastome humain<sup>56</sup>. Récemment, nous avons décrit un nouvel inhibiteur de protéase isolé à partir du venin de *Macrovipera lebelina* « PIVL » ayant un important potentiel anti-tumoral<sup>12</sup>. L'effet de ce peptide a été testé sur les cellules de glioblastome humain. En fait, PIVL inhibe totalement l'adhésion des cellules de glioblastome Humain U87 sur fibrinogène (Fg) et fibronectine (Fn)<sup>12</sup>. Ce peptide est 10 fois plus puissant que PILP-2 et PILP-3. Il est capable de bloquer totalement la migration et l'invasion des cellules tumorales à une dose de 1µM. Par contre, PILP-3 et PILP-2 inhibent respectivement de 70% et 20% la migration et l'invasion de ces cellules à la dose de 10 µM. D'autre part, PIVL inhibe l'adhésion des cellules de glioblastomes aux matrices extracellulaires à travers les intégrines de type RGD dépendantes. De plus, cette interaction fait intervenir un motif RGD-like qui correspond à la région<sup>41</sup>RGN<sup>43</sup> du PIVL<sup>12</sup>. Ce processus est décrit pour la première fois pour les kunitz issus des venins de serpents. Cependant, les propriétés anti-tumorales du PILP-3 du venin de

*Bungarus multicinctus* sont reliées à son pouvoir d'inhiber l'activité des métalloprotéinases matricielles 2 (MMP-2)<sup>56,57</sup>. De plus, l'alignement des séquences du PIVL, PILP-3 et PILP-2 montre que la région <sup>41</sup>RGN<sup>43</sup> du PIVL n'est pas conservée chez les deux autres inhibiteurs de type Kunitz (Figure 6). Nous avons montré que ce motif joue un rôle déterminant dans l'inhibition et le blocage de la progression de la tumeur. Par conséquent, ce peptide synthétique englobant la région <sup>41</sup>RGN<sup>43</sup> du PIVL ainsi que des analogues cycliques pourraient se révéler comme un futur traitement pertinent contre le développement du cancer. En outre, certaines dendrotoxines montrent également un effet anti-tumoral à travers le blocage des canaux ioniques des cellules cancéreuses. En effet,  $\gamma$ -dendrotoxine ( $\gamma$ -DTX) bloque des canaux K<sup>+</sup> de large conductance activés par Ca<sup>2+</sup> dans les cellules de neuroblastome (N1E 115)<sup>58</sup>. De plus, d'autres études suggèrent que la DTX- $\kappa$  présente un effet anti-tumoral sur les cellules d'adénocarcinome humain A549. Ainsi, Le blocage des canaux voltage-dépendants Kv1.1 par la dendrotoxine- $\kappa$  (DTX- $\kappa$ ) induit la diminution du développement de la tumeur chez les souris. En outre, le traitement par DTX- $\kappa$  a augmenté l'expression des protéines p21<sup>Waf1/Cip1</sup>, p27<sup>Kip1</sup>, and p15<sup>INK4B</sup> et a diminué de manière significative l'expression des protéines de la cycline D3 dans les tissus tumoraux par rapport au témoin<sup>59</sup>.

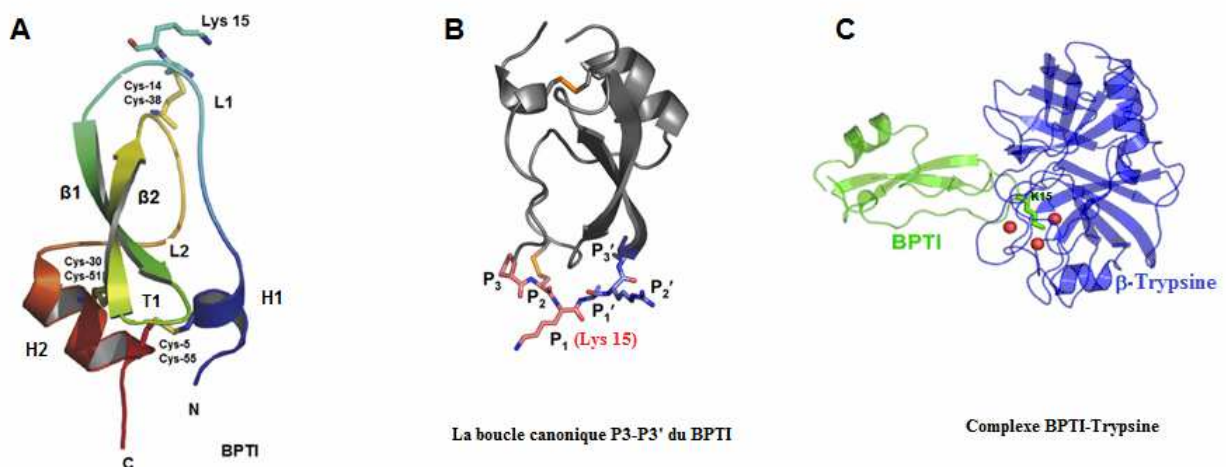
## Conclusion

Dans cette revue, nous avons décrit les propriétés structurelles et fonctionnelles des inhibiteurs de protéases kunitz/BPTI. Ces derniers ont une structure très compacte due notamment à la présence de plusieurs ponts disulfures, rendant ces inhibiteurs stables et résistants à la protéolyse. Ils interagissent avec leurs protéases cibles de façon très spécifique via leur boucle inhibitrice, qui est hautement complémentaire au site actif des protéases cibles. Ces molécules ont souvent des propriétés pharmacologiques intéressantes, compte tenu de la diversité des mécanismes physiologiques dans lesquels sont impliquées les protéases. La plupart des inhibiteurs de type Kunitz/BPTI agissent comme des neurotoxines ou des inhibiteurs potentiels de la cascade de la coagulation et de la fibrinolyse. Au regard de leurs nombreuses fonctions, ces peptides inhibent la croissance tumorale et empêchent les métastases. Ceci exige la poursuite des études structure-fonction vers la conception d'une nouvelle génération de médicaments anti-cancéreux.

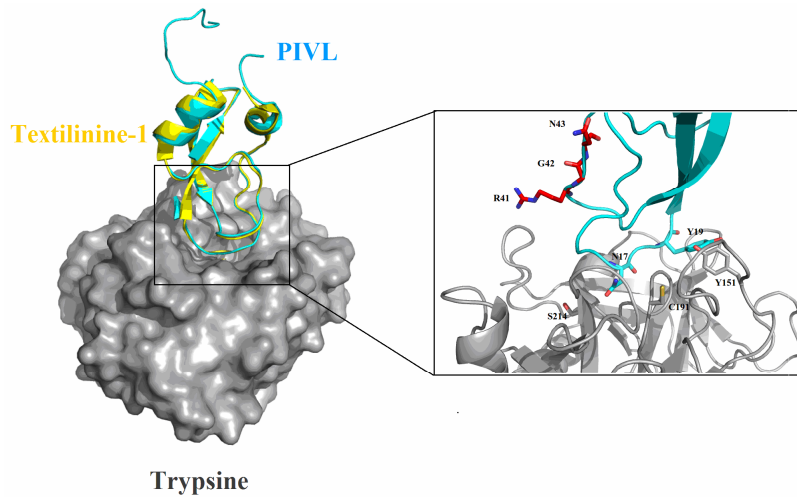
## Figures et Légendes



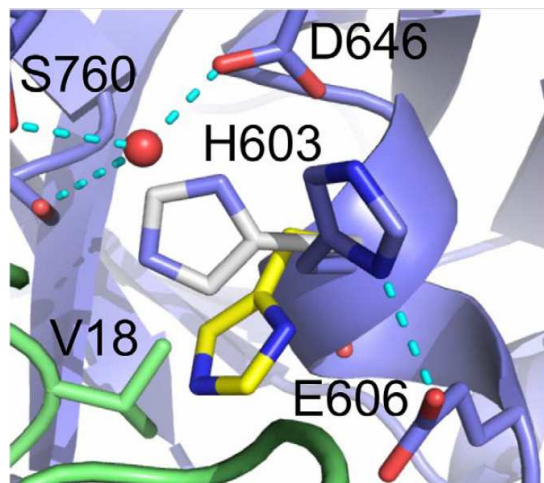
**Figure 1 : Alignement des séquences de la famille des inhibiteurs de protéase de type Kunitz.** L'alignement des séquences entre des protéines appartenant à la famille des inhibiteurs de protéase de type Kunitz. Les lignes jaunes indiquent les connectivités de liaison disulfure. La région de la boucle canonique et celle de la boucle secondaire sont respectivement désignées par des barres rouges et bleues, et l'astérisque rouge désigne le résidu de P1<sup>14</sup>.



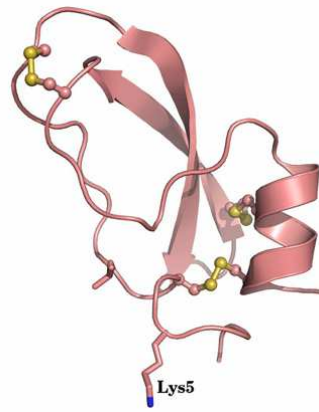
**Figure 2 : Représentation de la structure 3D du Complexe trypsine-BPTI :** (A) Structure 3D du BPTI. L1 : boucle canonique, L2 : boucle secondaire,  $\beta$ 1 : Feuillet 1,  $\beta$ 2 : Feuillet 2 H1 : hélice 3(10), H2 : hélice  $\alpha$ , T1 : boucle  $\beta$ -hairpin<sup>15</sup>. (B) L'aprotinine interagit très fortement avec la trypsine par l'intermédiaire d'un site réactif inhibiteur (P3 à P'3) (C) Lorsque le complexe est formé, la lysine (K15) (en vert) forme une liaison électrostatique avec un résidu Aspartate du fond de la poche primaire de la protéase<sup>60</sup>.



**Figure 3 : La modélisation moléculaire et l'analyse structurale du PIVL : (A)** La superposition du PIVL modèle (Bleu) sur la structure cristalline de la textiline-1 (Jaune) formant un complexe avec la trypsine (code PDB: 3D65).



**Figure 4 : La triade catalytique de la microplasmine et les interactions avec la textiline-1.** La Microplasmine, telle qu'elle apparaît dans le complexe avec la textiline-1, est identifiée par les atomes de carbone en bleu alors que le résidu P1' (V18) de la textiline-1 est de couleur verte<sup>10</sup>.



**Figure 5: Structure 3D de l' $\alpha$ -Dendrotoxin (code PDB: 1DTX).** L' $\alpha$ -Dendrotoxin issu du venin *Dendroaspis angusticeps* interagit avec les canaux Kv1.1 par la Lys5<sup>40,41</sup>.

```

PIVL      ZDRPKFCYLPADPAECNAYMPRFYYDSASNKCKEFIYGGCRGNANNFKNRAECPHTCVASRKGIQP
PIPL-2    KNRPPFCNLLPEPGRCNAINVRAFYFNSRPRKCLEFPYGGCGGNANNFKTIEECQRTCAG-----
PIPL-3    RKRHQFCNVVPEPGRCNAINVRAFYFNPRLRKCIEFSYGGCGGNANNFKSRGECRKTCAE-----
          . *  ** :  . : * . *** :  *** : .  . ** ** **** ***** .  ** : ** .

```

**Figure 6 : L'alignement des séquences avec PIVL :** L'alignement des séquences de PIVL (*Macrovipera lebetina*) avec PILP-2 et PILP-3 (*Bungarus multicinctus*) montre une similarité de respectivement 52% et 54%. La comparaison de séquences en acides aminés déduites des différents domaines Kunitz des protéines issus des deux venins de serpents *Macrovipera lebetina* et *Bungarus multicinctus* montre que le motif RGN du PIVL (la région encadrée) n'est pas conservé chez PILP-2 et PILP-3.

## Références

- 1- **N. Marrakchi, R. B. Zingali, H. Karoui, C. Bon et M. el Ayeb** (1995). Cerastocytin, a new thrombin-like platelet activator from the venom of the Tunisian viper *Cerastes cerastes*. *Biochim Biophys Acta.*, **1244**, 147-156.
- 2- **N. Marrakchi, R. Barbouche, S. Guermazi, C. Bon et M. el Ayeb** (1997). Procoagulant and platelet-aggregating properties of cerastocytin from *Cerastes cerastes* venom. *Toxicon*, **35**, 261-272.
- 3- **A. F. Costa Torres, R. T. Dantas, M. H. Toyama, E. Diz Filho, F. J. Zara, M. G. Rodriguesde Queiroz, N. A. Pinto Nogueira, M. Rosa de Oliveira, D. de Oliveira Toyama, H. S. Monteiro et A. M. Martins** (2010). Antibacterial and antiparasitic effects of *Bothrops marajoensis* venom and its fractions: Phospholipase A2 and L-amino acid oxidase. *Toxicon*, **55**, 795-804.
- 4- **O. Kallech-Ziri, J. Luis, M. El Ayeb et N. Marrakchi** (2007). Snake venom disintegrins: classification and therapeutic potential. *Arch Inst Pasteur Tunis.*, **84**, 29-37.
- 5- **R. Kessentini-Zouari, J. Jebali, S. Taboubi, N. Srairi-Abid, M. Morjen, O. Kallech-Ziri, S. Bezzine, J. Marvaldi, M. El Ayeb, N. Marrakchi et J. Luis** (2010). CC-PLA2-1 and CC-PLA2-2, two *Cerastes cerastes* venom-derived phospholipases A2, inhibit angiogenesis both in vitro and in vivo. *Lab Invest.*, **90**, 510-519.
- 6- **S. Sarray, E. Delamarre, J. Marvaldi, M. El Ayeb, N. Marrakchi et J. Luis** (2007). Lebectin and lebecetin, two C-type lectins from snake venom, inhibit alpha5beta1 and alphaV-containing integrins. *Matrix Biol.*, **26**, 306-313.
- 7- **Y. Y. He, S. B. Liu, W. H. Lee, J. Q. Qian et Y. Zhang** (2008). Isolation, expression and characterization of a novel dual serine protease inhibitor, OH-TCI, from king cobra venom. *Peptides*, **29**, 1692-1699.
- 8- **C. H. Yuan, Q. Y. He, K. Peng, J. B. Diao, L. P. Jiang, X. Tang et S. P. Liang** (2008). Discovery of a distinct superfamily of Kunitz-type toxin (KTT) from tarantulas. *PLoS One*, **3**, e3414.
- 9- **Z. Y. Chen, Y. T. Hu, W. S. Yang, Y. W. He, J. Feng, B. Wang, R. M. Zhao, J. P. Ding, Z. J. Cao, W. X. Li et Y. L. Wu** (2012). Hg1, novel peptide inhibitor specific for Kv1.3 channels from first scorpion Kunitz-type potassium channel toxin family. *J Biol Chem.*, **287**, 13813-13821.
- 10- **E. K. Millers, L. A. Johnson, G. W. Birrell, P. P. Masci, M. F. Lavin, J. de Jersey et L.W. Guddat** (2013). The structure of human microplasmin in complex with textilinin-1, an aprotinin-like inhibitor from the Australian brown snake. *PLoS One*, **8**, e54104.
- 11- **J. Lu, H. Yang, H. Yu, W. Gao, R. Lai, J. Liu et X. Liang** (2008). A novel serine protease inhibitor from *Bungarus fasciatus* venom. *Peptides*, **29**, 369-374.
- 12- **M. Morjen, O. Kallech-Ziri, A. Bazaa, H. Othman, K. Mabrouk, R. Zouari-Kessentini, L. Sanz, J. J. Calvete, N. Srairi-Abid, M. El Ayeb, J. Luis et N. Marrakchi** (2013). PIVL, a new serine protease inhibitor from *Macrovipera lebetina transmediterranea* venom, impairs motility of human glioblastoma cells. *Matrix Biol.*, **32**, 52-62.
- 13- **A. K. Mukherjee, S. P. Mackessy et S. Dutta** (2014). Characterization of a Kunitz-type protease inhibitor peptide (Rusvikunin) purified from *Daboia russelii russelii* venom. *Int J Biol Macromol.*, **67C**, 154-162.
- 14- **E. K. Millers, M. Trabi, P. P. Masci, M. F. Lavin, J. de Jersey et L. W. Guddat** (2009). Crystal structure of textilinin-1, a Kunitz-type serine protease inhibitor from the venom of the Australian common brown snake (*Pseudonaja textilis*). *Febs J.*, **276**, 3163-3175.

- 15- **S. X. Dai, A. D. Zhang et J. F. Huang** (2012). Evolution, expansion and expression of the Kunitz/BPTI gene family associated with long-term blood feeding in *Ixodes Scapularis*. *BMC Evol Biol.*, **12**, 4.
- 16- **C. Y. Dy, P. Buczek, J. S. Imperial, G. Bulaj et M. P. Horvath** (2006). Structure of conkunitzin-S1, a neurotoxin and Kunitz-fold disulfide variant from cone snail. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.*, **62**, 980-990.
- 17- **B. Kassell et M. Laskowski, Sr** (1965). The basic trypsin inhibitor of bovine pancreas. V. The disulfide linkages. *Biochem Biophys Res Commun.*, **20**, 463-471.
- 18- **L. Cardle et M. J. Dufton** (1997). Foci of amino acid residue conservation in the 3D structures of the Kunitz BPTI proteinase inhibitors: how do variants from snake venom differ. *Protein Eng.*, **10**, 131-137.
- 19- **A. L. Harvey et B. Robertson** (2004). Dendrotoxins: structure-activity relationships and effect on potassium ion channels. *Curr Med Chem.*, **11**, 3065-3072.
- 20- **V. Zupunski, D. Kordis et F. Gubensek** (2003). Adaptive evolution in the snake venom Kunitz/BPTI protein family. *FEBS Lett.*, **547**, 131-137.
- 21- **A. R. Siddiqi, Z. H. Zaidi et H. Jornvall** (1991). Purification and characterization of a Kunitz-type trypsin inhibitor from Leaf-nosed viper venom. *FEBS Lett.*, **294**, 141-144.
- 22- **X. D. Zhou, Y. Jin, Q. M. Lu, D. S. Li, S. W. Zhu, W. Y. Wang and Y. L. Xiong** (2004). Purification, characterization and primary structure of a chymotrypsin inhibitor from *Naja atra* venom. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.*, **137**, 219-224.
- 23- **G. W. Birrell, S. T. Earl, T. P. Wallis, P. P. Masci, J. de Jersey, J. J. Gorman et M. F. Lavin** (2007). The diversity of bioactive proteins in Australian snake venoms. *Mol Cell Proteomics*, **6**, 973-986.
- 24- **L. St Pierre, S. T. Earl, I. Filippovich, N. Sorokina, P. P. Masci, J. De Jersey et M. F. Lavin** (2008). Common evolution of waprin and kunitz-like toxin families in Australian venomous snakes. *Cell Mol Life Sci.*, **65**, 4039-4054.
- 25- **P. P. Masci, A. N. Whitaker, L. G. Sparrow, J. de Jersey, D. J. Winzor, D. J. Watters, M. F. Lavin et P. J. Gaffney** (2000). Textilinins from *Pseudonaja textilis* *textilis*. Characterization of two plasmin inhibitors that reduce bleeding in an animal model. *Blood Coagul Fibrinolysis.*, **11**, 385-393.
- 26- **S. T. Earl, R. Richards, L. A. Johnson, S. Flight, S. Anderson, A. Liao, J. de Jersey, P. P. Masci et M. F. Lavin** (2012). Identification and characterisation of Kunitz-type plasma kallikrein inhibitors unique to *Oxyuranus* sp. snake venoms. *Biochimie.*, **94**, 365-373.
- 27- **I. Schechter et A. Berger** (1967). On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun.*, **27**, 157-162.
- 28- **M. Laskowski, Jr. et I. Kato** (1980). Protein inhibitors of proteinases. *Annu Rev Biochem.*, **49**, 593-626.
- 29- **C. Chen, C. H. Hsu, N. Y. Su, Y. C. Lin, S. H. Chiou et S. H. Wu** (2001). Solution structure of a Kunitz-type chymotrypsin inhibitor isolated from the elapid snake *Bungarus fasciatus*. *J Biol Chem.*, **276**, 45079-45087.
- 30- **A. Ruhlmann, D. Kukla, P. Schwager, K. Bartels et R. Huber** (1973). Structure of the complex formed by bovine trypsin and bovine pancreatic trypsin inhibitor. Crystal structure determination and stereochemistry of the contact region. *J Mol Biol.*, **77**, 417-436.
- 31- **J. Otlewski, M. Jaskolski, O. Buczek, T. Cierpicki, H. Czapinska, D. Krowarsch, A. O. Smalas, D. Stachowiak, A. Szpineta et M. Dadlez** (2001) Structure-function relationship of serine protease-protein inhibitor interaction. *Acta Biochim Pol.*, **48**, 419-28.
- 32- **A. Wong, S. M. Hwang, K. Johanson, J. Samanen, D. Bennett, S. W. Landvatter, W. Chen, J. R. Heys, F. E. Ali, T. W. Ku, W. Bondinell, A. J. Nichols, D. A. Powers et J.**

- M. Stadel** (1998). Binding of [3H]-SK&F 107260 and [3H]-SB 214857 to purified integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3: evidence for a common binding site for cyclic arginyl-glycyl-aspartic acid peptides and nonpeptides. *J Pharmacol Exp Ther.*, **285**, 228-235.
- 33- A. L. Harvey, E. G. Rowan, H. Vatanpour, A. Engstrom, B. Westerlund and E. Karlsson** (1997). Changes to biological activity following acetylation of dendrotoxin I from *Dendroaspis polylepis* (black mamba). *Toxicon*, **35**, 1263-1273.
- 34- M. J. Dufton**, 'Proteinase inhibitors et dendrotoxins (1985). Sequence classification, structural prediction and structure/activity. *Eur J Biochem.*, **153**, 647-654.
- 35- A. Meta, H. Nakatake, T. Imamura, C. Nozaki et K. Sugimura** (2009). High-yield production and characterization of biologically active recombinant aprotinin expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expr Purif.*, **66**, 22-29.
- 36- S. W. Munday, S. R. Williams et R. F. Clark** (2003). Dendrotoxin poisoning in a neurobiochemist. *J Toxicol Clin Toxicol.*, **41**, 163-168.
- 37- W. I. Jeon, P. D. Ryu et S. Y. Lee** (2013). Effects of voltage-gated K<sup>+</sup> channel blockers in gefitinib-resistant H460 non-small cell lung cancer cells. *Anticancer Res.*, **32**, 5279-5284.
- 38- E. Katoh, H. Nishio, T. Inui, Y. Nishiuchi, T. Kimura, S. Sakakibara et T. Yamazaki** (2000). Structural basis for the biological activity of dendrotoxin-I, a potent potassium channel blocker. *Biopolymers*, **54**, 44-57.
- 39- W. Wang, B. Mao et H. Bu** (1999). Expression of vascular endothelial growth factor in brain astrocytoma and its clinical evaluation. *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao*, **30**, 88-91.
- 40- S. Gasparini, J. M. Danse, A. Lecoq, S. Pinkasfeld, S. Zinn-Justin, L. C. Young, C. C. de Medeiros, E. G. Rowan, A. L. Harvey et A. Menez** (1998). Delineation of the functional site of alpha-dendrotoxin. The functional topographies of dendrotoxins are different but share a conserved core with those of other Kv1 potassium channel-blocking toxins. *J Biol Chem.*, **273**, 25393-25403.
- 41- T. Skarzynski** (1992). Crystal structure of alpha-dendrotoxin from the green mamba venom and its comparison with the structure of bovine pancreatic trypsin inhibitor. *J Mol Biol.*, **224**, 671-683.
- 42- A. L. Harvey and A. J. Anderson** (1985). Dendrotoxins: snake toxins that block potassium channels and facilitate neurotransmitter release. *Pharmacol Ther.*, **31**, 33-55.
- 43- H. Schweitz, C. Heurteaux, P. Bois, D. Moinier, G. Romey et M. Lazdunski** (1994). Calcicludine, a venom peptide of the Kunitz-type protease inhibitor family, is a potent blocker of high-threshold Ca<sup>2+</sup> channels with a high affinity for L-type channels in cerebellar granule neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **91**, 878-882.
- 44- B. Gilquin, A. Lecoq, F. Desne, M. Guenneugues, S. Zinn-Justin et A. Menez** (1999). Conformational and functional variability supported by the BPTI fold: solution structure of the Ca<sup>2+</sup> channel blocker calcicludine. *Proteins*, **34**, 520-532.
- 45- D. J. Strydom et F. J. Joubert** (1981). The amino acid sequence of a weak trypsin inhibitor B from *Dendroaspis Polylepis polylepis* (black mamba) venom. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.*, **362**, 1377-1384.
- 46- R. Sigle, M. Hackett et S. D. Aird** (2002). Primary structures of four trypsin inhibitor E homologs from venom of *Dendroaspis angusticeps*: structure-function comparisons with other dendrotoxin homologs. *Toxicon*, **40**, 297-308.
- 47- W. Yang, J. Feng, B. Wang, Z. Cao, W. Li, Y. Wu and Z. Chen** (2013). BF9, the First Functionally Characterized Snake Toxin Peptide with Kunitz-Type Protease and Potassium Channel Inhibiting Properties. *J Biochem Mol Toxicol.*, **28**, 76-83.
- 48- Y. M. Choo, K. S. Lee, H. J. Yoon, Y. Qiu, H. Wan, M. R. Sohn, H. D. Sohn et B. R. Jin** (2012). Antifibrinolytic role of a bee venom serine protease inhibitor that acts as a plasmin inhibitor. *PLoS One*, **7**, e32269.



- 49- **J. Carter, U. Buerke, E. Rossner, M. Russ, S. Schubert, H. Schmidt, H. Ebel, D. Pruefer, A. Schlitt, K. Werdan et M. Buerke** (2008). Anti-inflammatory actions of aprotinin provide dose-dependent cardioprotection from reperfusion injury. *Br J Pharmacol.*, **155**, 93-102.
- 50- **D. A. Fergusson, P. C. Hebert, C. D. Mazer, S. Fremes, C. MacAdams, J. M. Murkin, K. Teoh, P. C. Duke, R. Arellano, M. A. Blajchman, J. S. Bussieres, D. Cote, J. Karski, R. Martineau, J. A. Robblee, M. Rodger, G. Wells, J. Clinch et R. Pretorius** (2008). A comparison of aprotinin and lysine analogues in high-risk cardiac surgery. *N Engl J Med.*, **358**, 2319-2331.
- 51- **A. C. Cheng et I. H. Tsai** (2013). Functional characterization of a slow and tight-binding inhibitor of plasmin isolated from Russell's viper venom. *Biochim Biophys Acta.*, **1840**, 153-162.
- 52- **H. Kobayashi, M. Suzuki, Y. Hirashima et T. Terao** (2003). The protease inhibitor bikunin, a novel anti-metastatic agent. *Biol Chem.*, **384**, 749-754.
- 53- **E. Sierko, M. Z. Wojtukiewicz et W. Kisiel** (2007). The role of tissue factor pathway inhibitor-2 in cancer biology. *Semin Thromb Hemost.*, **33**, 653-662.
- 54- **M. Suzuki, H. Kobayashi, Y. Tanaka, Y. Hirashima, N. Kanayama, Y. Takei, Y. Saga, M. Suzuki, H. Itoh et T. Terao** (2003). Suppression of invasion and peritoneal carcinomatosis of ovarian cancer cell line by overexpression of bikunin. *Int J Cancer.*, **104**, 289-302.
- 55- **E. K. Tung, C. M. Wong, T. O. Yau, J. M. Lee, Y. P. Ching et I. O. Ng** (2009). HAI-2 is epigenetically downregulated in human hepatocellular carcinoma, and its Kunitz domain type 1 is critical for anti-invasive functions. *Int J Cancer.*, **124**, 1811-1820.
- 56- **W. M. Chou, W. H. Liu, K. C. Chen et L. S. Chang** (2010). Structure-function studies on inhibitory activity of Bungarus multicinctus protease inhibitor-like protein on matrix metalloprotease-2, and invasion and migration of human neuroblastoma SK-N-SH cells. *Toxicon*, **55**, 353-360.
- 57- **H. Inagaki, H. Kimoto, Y. Yamauchi, M. Toriba et T. Kubo** (2012). Functional characterization of Kunitz-type protease inhibitor Pr-mulgins identified from New Guinean *Pseudechis australis*. *Toxicon*, **59**, 74-80.
- 58- **B. W. Day, B. W. Stringer, M. D. Spanevello, S. Charmsaz, P. R. Jamieson, K. S. Ensbey, J. C. Carter, J. M. Cox, V. J. Ellis, C. L. Brown, D. G. Walker, P. L. Inglis, S. Allan, B. A. Reynolds, J. D. Lickliter et A. W. Boyd** (2011). ELK4 neutralization sensitizes glioblastoma to apoptosis through downregulation of the anti-apoptotic protein Mcl-1. *Neuro Oncol.*, **13**, 1202-1212.
- 59- **S. H. Jang, P. D. Ryu et S. Y. Lee** (2011). Dendrotoxin-kappa suppresses tumor growth induced by human lung adenocarcinoma A549 cells in nude mice. *J Vet Sci.*, **12**, 35-40.
- 60- **D. Dell'Orco, P. G. De Benedetti and F. Fanelli**, (2007). In silico screening of mutational effects on enzyme-proteic inhibitor affinity: a docking-based approach. *BMC Struct Biol.*, **7**, 37.