

Purification et d'une molécule bactéricide issue du venin de serpent *Cerastes cerastes*

Ziad-Meziane Hanane-Fadila* and Laraba-Djebari Fatima

USTHB, Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire. Faculté des Sciences Biologiques, BP 32, El-Alia, Bab Ezzouar, 16111 Alger, Algérie.

*Correspondance avec : Ziad-Meziane Hanane-Fadila : hf.ziad@hotmail.com

Abstract

New antibacterial molecules from natural secretions could be beneficial in the development of new drugs against antibiotic bacteria resistance. In this study, *Cerastes cerastes* venom was investigated for its antibacterial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. The antibacterial activity was evaluated by measuring the inhibition area and minimum inhibitory concentration (MIC). Three chromatographic steps were used to extract an L-amino acid oxidase (CcLAAO) from this venom using. CcLAAO presents an antibacterial activity against three bacterial strains (*Staphylococcus aureus*, Methicillin-resistant *S. aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa*) with MIC values of 10, 10, and 20 µg/mL, respectively. CcLAAO presents a bactericidal effect toward *Staphylococcus aureus* with a minimum bactericidal concentration of 40 µg/mL. However, no effect was observed against *Escherichia coli* and yeast strains.

Résumé

De nouvelles molécules antibactériennes de sécrétions naturelles pourraient être utiles dans le développement de nouveaux médicaments à l'encontre de la résistance des bactéries aux antibiotiques. Dans cette étude, le venin du serpent *Cerastes cerastes* a été étudié pour son activité antibactérienne contre les bactéries Gram-positives et Gram-négatives. L'activité antibactérienne a été évaluée par mesure de l'halo d'inhibition et de la concentration minimale inhibitrice (CMI). Une nouvelle L-amino acide oxydase (CcLAAO) a été purifiée à partir de ce venin utilisant trois étapes chromatographiques. La CcLAAO est dotée d'une activité antibactérienne vis-à-vis de trois souches bactériennes (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* résistante à la méthicilline et *Pseudomonas aeruginosa*) avec des valeurs de CMI de 10, 10, et 20 µg/mL, respectivement. CcLAAO présente un effet bactéricide avec une Concentration minimale Bactéricide 40 µg/mL vis-à-vis du *Staphylococcus aureus*. Cependant, aucun effet n'était observé contre *Escherichia coli* et la levure *Candida albicans*.

Mot Clés : *Viperidae*, *Cerastes cerastes*, L-amino acide oxydase, activité Antibactérienne.

Introduction

Ces dernières années, les antibiotiques ont été utilisés massivement et d'une manière inappropriée, c'est le cas par exemple de l'amélioration des viandes chez les bovins ou la moitié des antibiotiques synthétisés y sont destinés. Ces pratiques contribuent à augmenter la résistance au microorganismes, tels que les salmonelles qui peuvent être transmises à

l'homme, selon l'OMS (2001). La prescription inutile d'antibiotiques dans le cas des maladies virales ou l'automédication souvent due à des publicités mal contrôlées, et à finalités exclusivement commerciales sont remises en cause par l'OMS. Le phénomène de résistance bactérienne bien que naturel, est un processus de sélection, de souches mutantes de bactéries devenues « insensibles » aux médicaments et qui arrivent à déjouer les mécanismes des agents anti-microbiens d'une manière efficace et plus rapide que la synthèse de nouvelles molécules antibiotiques en laboratoire.

Ce mécanisme de résistance établi par les bactéries engendre des infections, qui ne répondent plus aux traitements, entraînant l'installation de maladies chroniques, difficiles à traiter et constituant un danger de transmission, un surcout et surtout une augmentation de la mortalité. Certaines parties du globe (Inde, Pakistan, Asie du Sud-Est ou Amérique Latine) ne disposent plus d'antibiotiques d'où la nécessité de trouver de nouvelles molécules antimicrobiennes pour lutter contre toute nouvelle résistance.

Ces dernières décennies les recherches se sont tournées vers l'investigation de nouvelles biomolécules antibactériennes. Les venins de serpents sont de plus en plus étudiés pour leurs intérêts pharmacologiques, et leur composition riche en protéines et peptides (Chippaux and Goyffon 1998). Déjà à l'antiquité, le venin d'abeilles est utilisé pour soulager les traumatismes. Le cas de la «Forapin » qui a été pendant longtemps prescrite comme anti inflammatoire. (Chippaux, Williams et al. 1991). En effet, les venins sont considérés comme des outils pharmacologiques, notamment grâce à l'isolement de leurs constituants (Goyffon and Heurtault 1995).

Plusieurs espèces de venins de serpents dotées d'effets antimicrobiens ont été étudiées ces dernières années (Torres, Dantas et al. 2010); (Deolindo, Teixeira-Ferreira et al. 2010); (Phua, Vejayan et al. 2012). Le venin de la vipère à cornes *Cerastes cerastes*, constitue quand à lui un mélange complexe de molécules ayant diverses activités biologiques.

Dans ce travail, nous avons contribué à la connaissance de cette bio-ressource par la mise en évidence d'une nouvelle activité biologique dans le venin de *Cerastes cerastes*. Cette nouvelle activité a été caractérisée comme étant attribuée à une molécule responsable de l'action antibactérienne sur plusieurs souches (Gram positives et Gram négatives). Les propriétés antibactériennes de cette molécule pourraient être utilisées en tant qu'antibiotique dans le cas d'une résistance.

1. Matériels et méthodes

1.1. Matériel biologique

1.1.1. Venin

Le venin de la vipère à cornes *Cerastes cerastes* nous a été fourni sous forme lyophilisée par notre équipe du Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire Recherche de la FSB-USTHB.

1.1.2. Souches microbiennes

Quatre souches bactériennes et une fongique ont été utilisées dans cette étude : *Staphylococcus aureus* sensible ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* résistante à la méthicilline ATCC 43300, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 et la levure, *Candida albicans*.

1.2. Matériel non biologique

1.2.1. Produits chimiques

La plupart des produits chimiques utilisés dans cette étude, ont été fournis par Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), Q5 Applied Biosystems, Pierce et BioRad.

2. Méthodes

2.1. Purification d'une biomolécule à partir du venin de *Cerastes cerastes*

Dans cette étude, le gel Séphadex G-75 est préalablement gonflé dans une colonne (2,5 x 100 cm) avec un tampon acétate d'ammonium 0,1 M, filtré et équilibré à pH 8,5. Le venin de *Cerastes cerastes* (522 mg) est déposé à la surface du gel. L'échantillon est élué à un débit de 18 ml/h avec le tampon acétate d'ammonium (0,1 M; pH 8,5). La lecture de l'absorbance des éluats de colonne est effectuée à 280 nm. Les fractions ont été regroupées selon le profil chromatographique, la fraction active GF1 (80 UDO) issue de la filtration moléculaire G-75 est soumise à une seconde étape chromatographique l'échangeuse d'anions sur DEAE Sephadex A-50 ; utilisant un gradient de force ionique, l'acétate d'ammonium (AcNH₄) (0,1-0,5 M; pH 8,5) comme tampon d'éluion suivi du même tampon à 1 M; pH 8,5 ; puis 2 M au même pH pour une dernière éluion. La fraction active D3 issue de la précédente étape présentant une activité antibactérienne est soumise à une chromatographie liquide haute pression (HPLC) en phase réverse utilisant une colonne de type Beckman C18 (4,5 mm x 25 cm), équilibrée avec l'acide trifluoroacétique TFA (0,1%) pendant 5 minutes à 100%.

Les protéines sont éluées avec un gradient de concentration d'acetonitrile ACN (0% - 80%) dans le TFA (0,1%) pendant 80 minutes avec un débit de 0,5 ml/min. La lecture de l'absorbance est effectuée à 280 nm. Les fractions sont collectées, lyophilisées et stockées à 4°C.

2.2. Caractérisation physico-chimique de la molécule purifiée

2.2.1. Détermination de la masse moléculaire par électrophorèse sur gel polyacrylamide

La fraction purifiée est soumise à un gel de polyacrylamide à 15% présence de SDS (Laemmli 1970). Après chauffage des échantillons à 100°C pendant 5 minutes et refroidissement, le bleu de bromophénol (0,01 %) est ajouté. L'échantillon est ensuite déposé sur le gel qui est soumis à 170 volts. Après migration, l'échantillon et les marqueurs de PM sont soumis à une coloration au bleu de Coomassie R250 dissout dans l'isopropanol (25%) en présence d'acide acétique. Les marqueurs de masse moléculaire utilisés sont :

- Myosine (211 kDa) ; β - Galactosidase (121 kDa); phosphorilase (100 kDa); Glutamic dehydrogenase (54 kDa); carbonic anhydrase (38,7 kDa) ; bovine érythrocyte carbonic anhydrase (29.8 kDa) ; trypsin inhibitor (20,8 kDa) ; et l'aprotinine (7 kDa).

La révélation des bandes protéiques se fait après décoloration dans des bains d'acide acétique (1%). La détermination des masses moléculaires est réalisées par extrapolation sur une courbe étalon $R_f = f(\log M)$.

2.3. Détermination de l'activité antibactérienne

Deux tests antimicrobiens ont été utilisés dans cette étude, selon le National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2006).

2.3.1. AntibioGramme en milieu gélosé : Méthode des disques

Les géloses ont étéensemencées à l'aide d'un écouvillon à partir d'une suspension de germes 0,5 Mac Farland (une densité optique égale 0,1 à 625 nm) diluée au 1/10 de façon à obtenir une concentration finale de 10^7 UFC/ml, conformément aux recommandations de la NCCLS.

Des disques vierges et stériles d'un diamètre de 6 mm, sont déposés à la surface de la géloseensemencée préalablement par la souche bactérienne étudiée (Figure 14). Un volume de 25 à 50 μ l de venin total, fraction active ou de la CcLAAO (0,05 – 0,4) mg/ml est déposé sur ces disques. Après incubation des boîtes de Petri à 37°C pendant 24 h, les zones d'inhibition sont enregistrées dans des diamètres millimétriques selon les recommandations du NCCLS.

Des disques d'antibiotiques sont utilisés comme témoins positifs.

2.3.2. Technique de détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) en milieu liquide

La CMI est définie comme étant la plus faible concentration d'un agent antimicrobien empêchant la croissance visible d'un micro-organisme dans une gélose ou un milieu liquide (NCCLS, 2006).

Dans cette étude, la CMI a été déterminée selon la méthode de micro-dilution en milieu liquide selon la méthode du NCCLS, avec des modifications.

Les inoculum des suspensions de cultures microbiennes ont été préparés et ajustés à une densité de 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ CFU/ml). La suspension bactérienne est diluée avec du bouillon Muller-Hinton (MHB) pour ajuster la concentration finale. Chaque puits de 100 μ l contient 50 μ l du venin total, de la fraction active ou de la CcLAAO purifiée, en concentrations décroissantes (200, 100, 50, 25, 20, 12,5 ; 10 et 5 μ g/ml). La suspension bactérienne (50 μ l) est ajouté afin d'obtenir la densité bactérienne appropriée de 5×10^3 UFC / ml ($\lambda = 625$). Les plaques sont incubées à 37°C pendant 24 h. Toutes les CMI ont été déterminées en triple test.

2.3.3. Détermination de la concentration minimale Bactéricide

La CMB est définie comme étant la plus faible concentration d'un agent antimicrobien capable d'éliminer une culture bactérienne dans milieu gélosé ou liquide (NCCLS, 2006).

Résultats et Discussion

1. Purification de la molécule douée d'une activité antibactérienne à partir du venin de *Cerastes cerastes*

Le venin de *Cerastes cerastes* a subi plusieurs étapes chromatographiques afin d'isoler la fraction responsable de l'activité antibactérienne. Cette dernière est évaluée après chaque étape de purification.

Le venin de *Cerastes cerastes* (522 mg) a été soumis au fractionnement moléculaire sur gel Sephadex G-75. L'élution est réalisée avec un tampon acétate d'ammonium (0,1 M; pH 8,5) à un débit constant de 18 ml/h. La lecture de l'absorbance de chaque tube est effectuée à 280 nm. Le profil chromatographique du venin fractionné révèle trois pics: GF1, GF2 et GF3 (Figure 1). L'activité antibactérienne est retrouvée dans les deux premières fractions GF1 et GF2. La fraction la plus active (GF1) est soumise à une chromatographie échangeuse d'Anions sur DEAE Sephadex A-50 (Figure 2). Trois fractions (D1, D2 et D3) ont été éluées à l'aide d'un gradient de force ionique discontinu acétate d'ammonium (0,1 - 0,5) M, suivi par le même tampon à 1 M; pH 8,5; puis 2 M au même pH pour une dernière élution de la fraction D3.

Des trois fractions obtenues, seule la fraction D3 semble être douée d'une activité antibactérienne associée à une activité L-amino acide oxidase. Cette fraction est soumise à une dernière étape de purification par chromatographie liquide à haute pression en phase inversée (RP-HPLC) sur colonne Beckman C18 (4,5 mm × 25 cm). L'élution de deux pics s'est effectuée par un gradient d'acetonitrile (ACN) 0 - 80 % dans du trifluoroacetic (TFA) à 0,1% (Figure 3). Le premier pic représente la molécule purifiée de la L-amino acide oxidase issue du venin *Cerastes cerastes*, appelée CcLAAO. Son homogénéité et sa pureté est vérifiée par SDS-PAGE.

Les différentes étapes de chromatographies utilisées durant la purification de ces deux enzymes sont résumées dans le tableau 1. L'enzyme CcLAAO représente 0,22% du venin total.

Tableau 1: Résultats des différentes étapes de purification CcLAAO à partir du venin de *Cerastes cerastes*.

Etapes de purification	Venin	Sephadex	DEAE	HPLC
Quantité de protéines (mg)	522	138	38	1,2
Activité totale (U)	600	573	250	20
Activité spécifique (U/mg)	1,14	4,15	6,57	16,66
Rendement (%)	100	26,4	7,2	0,22
Facteur de purification	1	3,6	5,7	14,6
Taux d'activité (%)	100	95	41	3,3

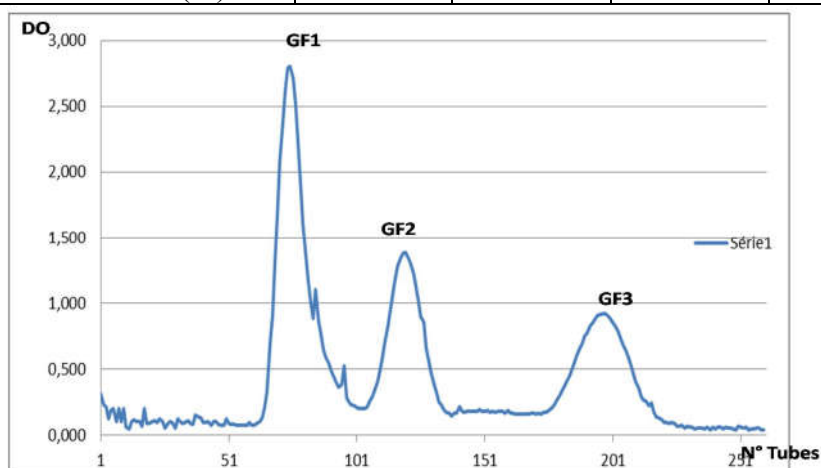


Figure 1 : Fractionnement du venin de *Cerastes cerastes* (522 mg) par filtration moléculaire sur une colonne (5×60) cm. Tampon d'éluion : Ac NH₄ 0,1M; pH 8,5. Débit constant à 18 ml/heure. Obtention de 3 pics, GF1, GF2 et GF3. La fraction GF1 est la plus active (DO à 280 nm).

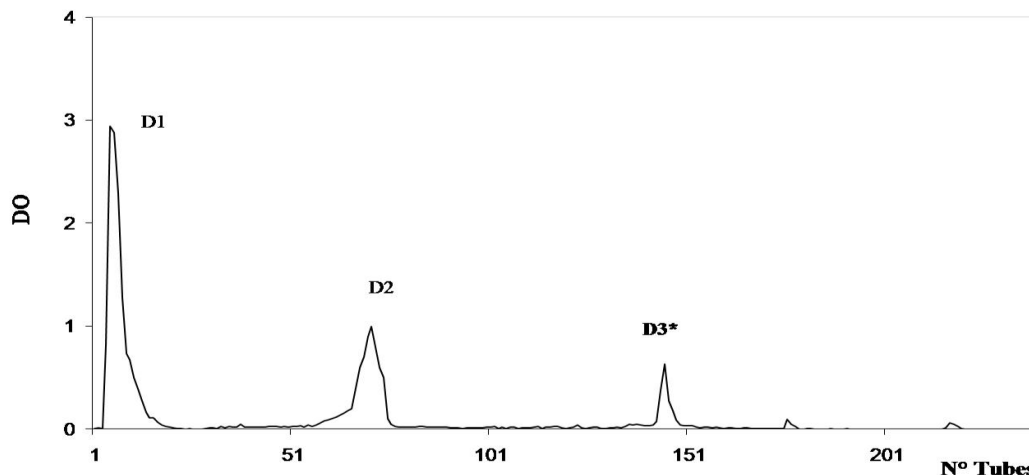


Figure 2 : Chromatographie échangeuse d'anions de la fraction antibactérienne GF1 issue de la gel filtration du venin de *Cerastes cerastes*. Un gradient de force ionique: AC NH₄ (0,1 - 0,5) M; pH 8,5 suivi par le même tampon d'éluion à 1 M puis 2 M à pH 8,5. Obtention de 3 sous fractions, D3 est la fraction active.

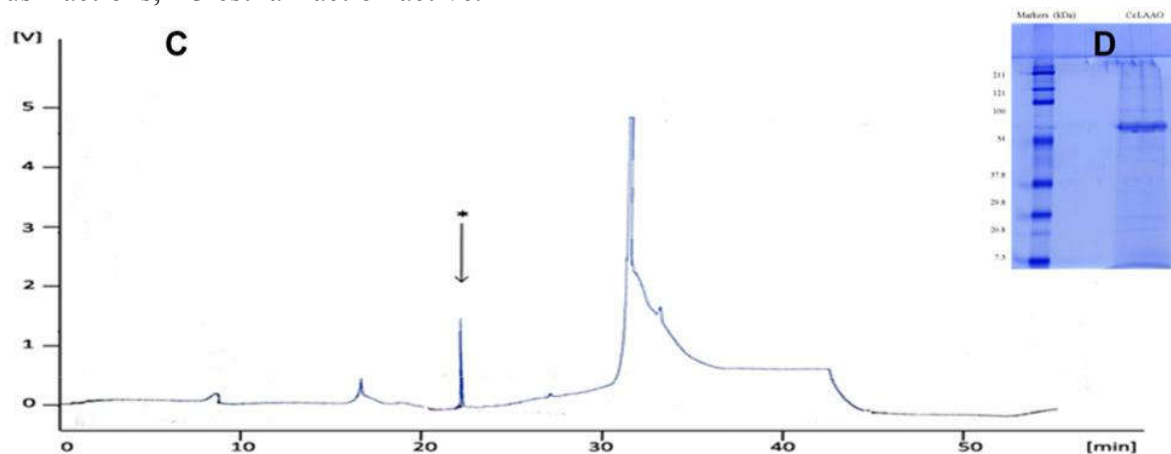


Figure 3 : profil chromatographique de la fraction D3 issue de la chromatographie échangeuse d'anions soumise à une chromatographie liquide à haute pression en phase inversée (RP- HPLC) sur une colonne C18 (4,5 mm × 25 cm). L'éluion des protéines se fait à l'aide d'un gradient discontinu d'ACN (0 - 80)% dans du TFA 0,1% dans l'eau, pendant 80 min. Le débit d'éluion est réglé à 0,5 ml/min. l'absorbance est enregistrée à 220 nm. Fraction purifiée issue de la RP-HPLC par électrophorèse sur gel de polyacrilamide en présence de SDS 15%. La bande protéique apparaissant correspond à la CcLAAO. Elle est estimée à 60 kDa.

2. Détermination de l'activité antibactérienne

2.1. Méthode des disques :

L'action antibactérienne du venin total, des fractions GF1, D3 et de la CcLAAO a été déterminée par la méthode de l'antibiogramme (selon le NCCLS, 2006) sur milieu solide, la détermination de l'activité est estimée par la mesure de la largeur des zones d'inhibitions.

En vue des résultats observés lors de la diffusion des disques contenant, venin brut, fractions actives GF1, D3 et CcLAAO purifié, ces dernières présentent le pouvoir d'inhiber la croissance bactérienne. Les zones d'inhibitions ont été mesurées et comparées (figure 3B). Cependant, aucun effet n'a été observé pour *E. coli* et la levure *C. albicans*.

La MIC a été déterminée en utilisant la méthode de microdilution de en bouillon avec des concentrations décroissantes de venin, D3 et CcLAAO purifié à chaque fois (Tableau 2).

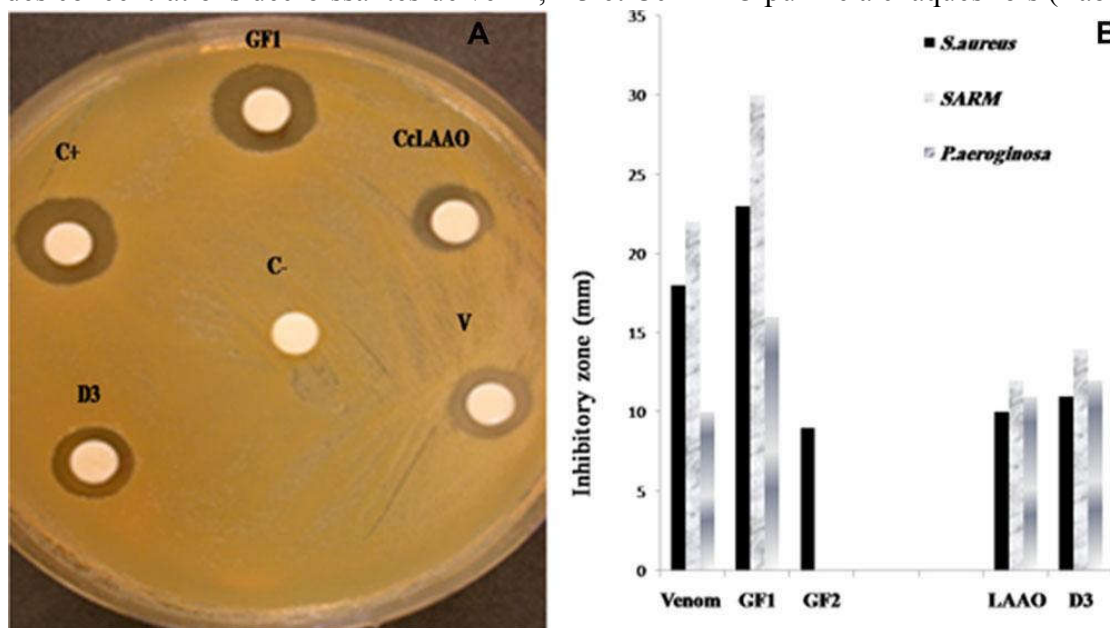


Figure 4: (A) Evaluation de l'activité antibactérienne : (V) venin brut, fractions actives (GF1, D3) et CcLAAO (0,2-0,01 mg / L) ajoutées dans des disques stériles (diamètre de 6 mm) placés sur des plaques de gélose Muller-Hinton contenant *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, incubé à 37 ° C pendant 24 h.

La zone d'inhibition formée autour du disque a été mesurée. C +: érythromycine, témoin positif et C -: eau physiologique, témoin négatif. (B) Comparaison des diamètres des zones d'inhibitions relatives au venin brut, fractions actives et de la CcLAAO testées sur des souches bactériennes.

Tableau.2 Estimation des Zones d'Inhibitions de l'activité antibactérienne du venin *Cerastes cerastes* et de ses fractions actives (mm)

Venin	Souches bactériennes			
	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> résistante	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
Venin total	20	23	10	20
GF1	23	30	16	20
GF2	9	0	0	11
D3	11	14	12	/
CcLAAO	10	12	11	/
Antibiotiques	31	15	20	21

2.2 Concentration minimale bactéricide (CMB)

La concentrations minimale bactéricides (CMB) dont la valeur est de 40 μ g/ml agit seulement sur le *staphylococcus aureus* (figure 5). Aucun autre effet n'a été enregistré sur les autres souches bactériennes.

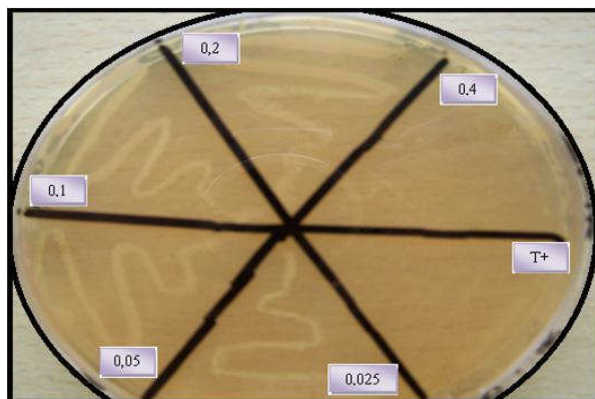


Figure 5 : Détermination de la CMB chez la souche S.aureus par la méthode de microdilution en milieu gélosé . T+: Oxacilline.

Discussion générale

Les LAAOs de venins de serpents (SV-LAAOs) font l'objet de beaucoup d'études pharmacologiques, structurales et moléculaires.

En effet, ce sont des enzymes multifonctionnelles présentant un large éventail d'activités biologiques. Dans cette étude, une SV-LAAO issue du venin de *Cerastes cerastes* a été purifiée et caractérisée.

La purification de la CcLAAO a révélé une activité spécifique de 16,66 unités/mg/min, représentant 3,3% de l'activité catalytique totale du venin et 0,22 % de son poids total.

Le facteur de purification de cette molécule est de 14,6.

La Cc-LAAO présente une activité antibactérienne contre des bactéries Gram positif et Gram négatif. Cette inhibition est dose-dépendante pour les trois souches bactériennes testées, *S.aureus*, *S.aureus résistante à la méhticilline* et *P.aeruginosa*, tels que déjà rapporté pour d'autres SV-LAAOs, tels que *BmarLAAO* issue du venin de *Bothrops marajoensis* ((Torres, Dantas et al. 2010) et *CdcLAAO* issue du venin de *Crotalus durissus cumanensis* (Vargas, Quintana et al. 2013).

Les diamètres de la zone d'inhibition indiquent que la CcLAAO est plus efficace en vers les bactéries à Gram positif que les bactéries à Gram négatif. L'halo d'inhibition chez *S.aureus* était plus important que chez *P.aeruginosa*. Cela serait dû à la différence dans la composition de la paroi bactérienne.

Ultérieurement à nos travaux, une autre CC-LAAO a été isolée du venin de *Cerastes cerastes* de Tunisie par Abdelkafi-Koubaa. Elle serait douée d'une activité antibactérienne contre la souche *E. Coli* contrairement à la CcLAAO. Cette molécule, présente des différences au niveau de la structure, de la masse et des séquences polypeptidiques. En effet, la CC-LAAO de poids moléculaire 115 kDa reste active même soumise à une température de plus de 60 °C. (Abdelkafi-Koubaa, Jebali et al. 2014).

L'absence d'interaction entre CcLAAO et *E. coli*/ *Candida albicans* serait due à une affinité de la molécule d'intérêt pour certaines souches microbiennes (*S. aureus*, *P. aeruginosa*) contrairement à d'autres. Le mécanisme d'action exacte des SV-LAAOs reste non élucidé jusqu'à ce jour.

Cependant, certains auteurs ont observé que les effets antibactériens des LAAOs de venins de serpents sont significativement diminués par la catalase, qui a pour effet abolissant sur l'H₂O₂, suggérant l'importance du rôle du peroxyde d'hydrogène dans l'activité de la LAAO (Toyama, Toyama et al. 2006); (Stiles, Sexton et al. 1991); (Lu, Wei et al. 2002). En effet, depuis que ces activités peuvent être inhibées par l'addition de catalase, Il est communément admis que le H₂O₂ joue un rôle important dans les effets pharmacologiques des SV-LAAO (Guo, Liu et al. 2012).

D'autres parts, il semblerait que l'effet antibactérien du venin de *Cerastes cerastes* ne serait pas exclusivement dû à la L-amino acide oxidase.

Bien que l'activité antibactérienne a bien été attribuée à la CcLAAO, la fraction GF1 obtenue de chromatographie par gel-filtration présente un important effet antibactérien, plus important que chez les autres fractions testés. Ce qui suggère la présence d'autres éléments impliqués dans l'activité antibactérienne du venin de *Cerastes cerastes*. Ces molécules pourraient agir en même temps que la CcLAAO, comme l'enzyme phospholipase A₂, précédemment isolée du venin de *Cerastes cerastes* (Djebari and Martin-Eauclaire 1990) et largement décrite par d'autres auteurs pour son activité antibactérienne (Samy, Gopalakrishnakone et al. 2010) (Sun, Guo et al. 2010).

Références bibliographiques

- Abdelkafi-Koubaa, Z., I. Aissa, et al. (2016). "Interaction of a snake venom l-amino acid oxidase with different cell types membrane." Int J Biol Macromol 82: 757-764.
- Abdelkafi-Koubaa, Z., J. Jebali, et al. (2014). "A thermoactive L-amino acid oxidase from *Cerastes cerastes* snake venom: Purification, biochemical and molecular characterization." Toxicon 89: 32-44.
- ABE, Y., Y. SHIMOYAMA, et al. (1998). "Characterization of an apoptosis-inducing factor in Habu snake venom as a glycyrrhizin (GL)-binding protein potently inhibited by GL in vitro." Biological and Pharmaceutical Bulletin 21(9): 924-927.
- Abouzeed, Y. M., S. Baucheron, et al. (2008). "ramR mutations involved in efflux-mediated multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium." Antimicrob Agents Chemother 52(7): 2428-2434.
- Aird, S. D. (2002). "Ophidian envenomation strategies and the role of purines." Toxicon 40(4): 335-393.
- Alekshun, M. N. and S. B. Levy (2007). "Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance." Cell 128(6): 1037-1050.
- Ali, S. A., S. Stoeva, et al. (2000). "Isolation, structural, and functional characterization of an apoptosis-inducing L-amino acid oxidase from leaf-nosed viper (*Eristocophis macmahoni*) snake venom." Archives of biochemistry and biophysics 384(2): 216-226.
- Alves, R. M., G. A. Antonucci, et al. (2008). "Evidence of caspase-mediated apoptosis induced by L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops atrox* snake venom." Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology 151(4): 542-550.
- Alexander, G., Grothusen, J., Zepeda, H., Schwartzman, R. J. (1988). Gyroxin, a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*, is a thrombin-like enzyme. Toxicon 26 (10): 953-960
- Ande, S. R., P. R. Kommoju, et al. (2006). "Mechanisms of cell death induction by L-amino acid oxidase, a major component of ophidian venom." Apoptosis 11(8): 1439-1451.

- Andres, E. and J. Dimarcq (2007). "[Cationic antimicrobial peptides: from innate immunity study to drug development. Up date]." Médecine et maladies infectieuses 37(4): 194-199.
- Angulo, Y., C. E. Nunez, et al. (2001). "Immunochemical properties of the N-terminal helix of myotoxin II, a lysine-49 phospholipase A(2) from Bothrops asper snake venom." Toxicon 39(6): 879-887.
- Ariaratnam, C., W. Meyer, et al. (1999). "A new monospecific ovine Fab fragment antivenom for treatment of envenoming by the Sri Lankan Russell's viper (*Daboia Russelii Russelii*): a preliminary dose-finding and pharmacokinetic study." Am J Trop Med Hyg 61(2): 259-265.
- Bauchot, R., C. Bon, et al. (2005). Serpents, Editions Artémis.
- Bechinger, B., M. Zasloff, et al. (1993). "Structure and orientation of the antibiotic peptide magainin in membranes by solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy." Protein science: a publication of the Protein Society 2(12): 2077.
- Bergmeyer, H. and J. Bergmeyer (1983). "L-amino acid oxidase." Methods in enzymatic analysis 2: 149-150.
- Bessalle, R., H. Haas, et al. (1992). "Augmentation of the antibacterial activity of magainin by positive-charge chain extension." Antimicrob Agents Chemother 36(2): 313-317.
- Bjarnason, J. B. and J. W. Fox (1994). "Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms." Pharmacol Ther 62(3): 325-372.
- Blair, J. M. and L. J. Piddock (2009). "Structure, function and inhibition of RND efflux pumps in Gram-negative bacteria: an update." Curr Opin Microbiol 12(5): 512-519.
- Blondelle, S. E., K. Lohner, et al. (1999). "Lipid-induced conformation and lipid-binding properties of cytolytic and antimicrobial peptides: determination and biological specificity." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes 1462(1): 89-108.
- Bocchinfuso, G., A. Palleschi, et al. (2009). "Different mechanisms of action of antimicrobial peptides: insights from fluorescence spectroscopy experiments and molecular dynamics simulations." Journal of Peptide Science 15(9): 550-558.
- Bon, C., Arocas, V., Braud, S., Francischeti, I., Maraun R., Sailor B., Wisner A., Zhang Y., Zingal (2001). Snake venom in thrombosis and haemostasis. Iram. Biomed. J. 83: 2-3.
- Boffa, M.-C. and G. A. Boffa (1974). "Correlations between the enzymatic activities and the factors active on blood coagulation and platelet aggregation from the venom of *Vipera aspis*." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects 354(2): 275-290.
- Boman, H. (2003). "Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts." J Intern Med 254(3): 197-215.
- Borkow, G., J. Gutiérrez, et al. (1993). "Isolation and characterization of synergistic hemorrhagins from the venom of the snake *Bothrops asper*." Toxicon 31(9): 1137-1150.
- Bortoleto, R. K., M. T. Murakami, et al. (2002). "Purification, characterization and crystallization of Jararacussin-I, a fibrinogen-clotting enzyme isolated from the venom of *Bothrops jararacussu*." Toxicon 40(9): 1307-1312.
- Boué, H. C. "Titulo: Zoologie, par H. Boué, R. Chanton Notas: Bibliografia: p.[513]-514 (v. 1). Contenido: v. 1. Invertébrés.--v. 2. Procordés et vertébrés. La biblioteca posee v. 1."
- Boukhalfa-Abib, H., A. Meksem, et al. (2009). "Purification and biochemical characterization of a novel hemorrhagic metalloproteinase from horned viper (*Cerastes cerastes*) venom." Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 150(2): 285-290.
- Braud, S., C. Bon, et al. (2000). "Snake venom proteins acting on hemostasis." Biochimie 82(9): 851-859.
- Bregge-Silva, C., M. C. Nonato, et al. (2012). "Isolation and biochemical, functional and structural characterization of a novel L-amino acid oxidase from *Lachesis muta* snake venom." Toxicon 60(7): 1263-1276.
- Brogden, K. A. (2005). "Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?" Nature Reviews Microbiology 3(3): 238-250.
- Buckland, A. G. and D. C. Wilton (2000). "The antibacterial properties of secreted phospholipases A 2." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids 1488(1): 71-82.
- Bush, K. and G. A. Jacoby (2010). "Updated functional classification of β -lactamases." Antimicrob Agents Chemother 54(3): 969-976.

- Butaye, P., A. Cloeckeaert, et al. (2003). "Mobile genes coding for efflux-mediated antimicrobial resistance in Gram-positive and Gram-negative bacteria." *Int J Antimicrob Agents* 22(3): 205-210.
- Chabbert, Y. and J. Baudens (1962). Souches de staphylocoques résistant naturellement a la methicilline et a la 5-methyl-3-phenyl-4-iso-oxazolyl-penicilline (p 12). annales de l institut pasteur, masson editeur 120 blvd saint-germain, 75280 paris 06, France.
- Chakrabarty, D., K. Datta, et al. (2000). "Haemorrhagic protein of Russell's viper venom with fibrinolytic and esterolytic activities." *Toxicon* 38(11): 1475-1490.
- Chaslus-Dancla, E., Cloeckeaert, A. Payot, S., Baucheron, S. (2002). Les multiples façons de faire de la résistance aux antibiotiques. In C. Legrand (ed.), *Antibiothérapie bovine Acquis et consensus. Le Point Vétérinaire, Maison-Alfort*.
- Chippaux, J.-P. (2006). Les serpents d'Afrique occidentale et centrale, IRD éditions.
- Chippaux, J.-P. and M. Goyffon (1998). "Venoms, antivenoms and immunotherapy." *Toxicon* 36(6): 823-846.