

INTRODUCTION

La nanomédecine est actuellement en train de bouleverser non seulement le diagnostic de certaines pathologies mais aussi l'acheminement ciblé de produits biologiquement actifs dans le but de traiter ou de prévenir certaines maladies.

Au fil des années, les chercheurs ont utilisé la vaccination comme principale arme de lutte contre un grand nombre de maladies infectieuses, visant ainsi à développer une réponse immunitaire adaptative de l'organisme. Les vaccins sont généralement constitués de pathogènes inactivés, de virus atténués, de venins ou de toxines inactivées. (Zhao & Leong 1996; Abib & Laraba-Djebari 2003; Oussedik-Oumehdi & Laraba-Djebari 2008). La recherche de nouveaux adjuvants et systèmes innovants de largages des antigènes sont de nos jours l'objectif majeur du développement de vaccins. Beaucoup de vaccins commercialisés sont à base de sous-unités purifiées, protéines recombinantes ou peptides synthétiques (Singh & O'Hagan 1999). Ces vaccins sont connus par l'innocuité de leurs composants mais aussi par leur faible pouvoir immunogène. Ainsi, ils requièrent forcément l'usage d'adjuvants pour induire une réponse immunitaire optimale (Boussag-Abib & Laraba-Djebari 2011). Les avancées dans le domaine des nanotechnologies ont emmené les chercheurs et les ingénieurs à étudier les nanoparticules afin d'améliorer la technologie des vaccins, ce qui a conduit à la naissance de la «nanovaccinologie» (Mamo & Poland 2012).

Comparée aux systèmes thérapeutiques conventionnels, la technologie de libération contrôlée des protéines offre de nombreux bienfaits telles que la préservation de l'activité biologique des protéines, l'augmentation de la biodisponibilité et la diminution des effets secondaires, aboutissant à l'amélioration de l'efficacité thérapeutique (Shuai et *al.* 2004; Yu et *al.* 2008). Cette amélioration a été possible grâce à des systèmes nanométriques tels que les nano-agrégats, les nanocapsules et les nanosphères mesurant au maximum 1000 nm de diamètre (Yi et *al.*, 1999; Brigger et *al.*, 2002; Yu et *al.*, 2008). Ces systèmes peuvent encapsuler des enzymes, des principes actifs ou d'autres composés tels que les antigènes. Ces nano-agrégats, nanocapsules ou nanosphères sont obtenues selon des méthodes spécifiques (Brigger et *al.*, 2002).

De nouvelles stratégies vaccinales ont été développées avec les nanoparticules biodégradables polymériques tels que l'inuline, le pullulan, le chitosane et l'alginate de calcium (Borges et *al.*, 2008; Honda-Okubo et *al.*, 2012). L'alginate de calcium et les nanoparticules à base de chitosane ont été largement étudiées vue leur biocompatibilité, biodégradabilité, nature non toxique mais également par le fait d'être facilement modifiables en plusieurs formes et

dimensions (Borges et *al.*, 2007). Ces nanoparticules ont été utilisées dans la préparation de plusieurs vaccins tels que celui du virus HBV (Borges et *al.*, 2008), celui contre le virus FMD (Nanda et *al.*, 2012) et celui contre la maladie de Newcastle (Liang Zhao et *al.*, 2014).

L'urgence causée par l'envenimation scorpionique est considérée comme un problème de santé publique majeur dans les régions tropicales et subtropicales, surtout chez les enfants et les personnes âgées. L'immunothérapie reste le seul traitement spécifique pouvant faire face à la létalité du venin. En Algérie, Le scorpion *Androctonus australis hector* (*Aah*) est l'espèce la plus dangereuse et la principale cause des graves accidents après envenimation. Son venin contient des neurotoxines qui sont des polypeptides de faible masse moléculaire (~7 kDa), reliées par quatre ponts disulfures et interagissant spécifiquement avec les canaux sodiques membranaires (Laraba-Djebari et *al.*, 1994). Le venin d'*Aah* et sa fraction toxique « FtoxG50 » induisent des symptômes complexes affectant les systèmes respiratoire, nerveux et cardiovasculaire, avec une importante réponse inflammatoire pouvant emmener jusqu'au décès (Laraba-Djebari 1998). La détoxification du venin et de sa fraction toxique par irradiation gamma avec une dose de 2 kGy semble être un outil d'atténuation performant pour utiliser les antigènes irradiés dans une approche vaccinale car elle permet de conserver les propriétés antigéniques et immunogéniques de ces derniers (Abib & Laraba-Djebari 2003).

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés à deux aspects :

- Dans un premier temps, nous avons tenté de contribuer au développement d'une immunoprotection antiscorpionique. Des nanoparticules d'alginate de calcium encapsulant les antigènes natifs et atténués ont été synthétisés et caractérisés par des analyses physico-chimiques. L'immunogénicité et l'effet immunoprotecteur conféré par ces différentes nanoformulations suite à un protocole vaccinal à moyen terme ont été également explorés.
- Dans un deuxième temps, nous avons recherché et évalué la réactogénicité de ces différentes nanoformulations au cours du protocole vaccinal. Les effets secondaires ainsi que la toxicité des nanoparticules ont été analysés dans le but de déterminer l'innocuité des nanoparticules d'alginate de calcium comme adjuvant immunologique.

Chapitre I

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

Chapitre I : Rappels bibliographiques

1. Les scorpions

Parmi les animaux terrestres venimeux, les scorpions constituent un ordre très dangereux pour l'espèce humaine menant à des envenimations graves. Les scorpions sont représentés par 1500 espèces réparties en deux sous ordres : Les *chactoides* et les *buthoides* (Ozkan & Carhan 2008). Ces derniers sont les plus répandus et comptent 50 espèces de scorpions considérés comme étant les plus dangereux pour l'homme. Les genres *Buthus*, *Parabuthus*, *Mesobuthus* (Asie Occidentale), *Centruroides* (Mexique et Etats-Unis), *Tityus* (Amérique du Sud et l'Ile de la Trinité), *Leiurus* et *Androctonus* au Moyen Orient et en Afrique du Nord ont été identifiés. *Androctonus australis hector*, *Androctonus amoreuxi* et *Buthus occitanus tunetanus* sont les espèces les plus impliquées dans les envenimations accidentelles (Correa et al., 1997; Krifi et al., 1998).

Les régions dans lesquelles un nombre élevé d'accidents scorpioniques est enregistré sont l'Afrique du nord et le Moyen Orient, la région pacifique du Mexique et la zone frontalière entre le Mexique et les Etats-Unis, les régions sud-est, centre et nord du Brésil (**Figure 1**). Des accidents isolés ont été également rapportés pour l'Ile de Trinité, le Pérou, le Venezuela et la Colombie (Hommel et al., 2000).

Le genre *Androctonus* comprend plusieurs espèces dangereuses qui couvrent un vaste territoire allant du Maroc à l'ouest de la péninsule arabique. Leur distribution est cependant inégale. Les espèces considérées comme les plus dangereuses sont *A.aenas*, *A. australis*, *A. crassicauda*, *A. mauretanicus*, *A. hoggarensis* et *Leiurus quinquestriatus* (Goyffon 1973; Attamo et al., 2002; Ghalim et al., 2000; Goyffon 2002; Ozkan & Carhan 2008).

Le genre *Buthotus* rassemble des espèces telles que *Buthus tamulus* considéré comme un *Mesobuthus*. *Hottentota franzwernerii gentili* responsable des décès en Afrique sub-saharienne (Touloun et al., 2001), *Buthus occitanus* est aussi souvent à l'origine de piqures mortelles en Afrique du Nord (Goyffon et al. 1982), *Parabuthus granulatus* est considéré en Afrique du Sud comme étant le plus dangereux (Lourenço 1986). *Hemiscorpius lepturus* est le seul Chactotide d'importance médicale.

Les espèces dangereuses du Nouveau Monde sont des *Buthidae* des genres *Centruroides*, *Tityus* et *Rhopalurus*.

Le genre *Centuroides* est surtout présent en Amérique du Nord et en Amérique centrale, en Colombie, au Pérou, Venezuela et en Guyane. Il compte de nombreuses espèces dangereuses. *Centuroides suffusus* est une espèce abondante au Mexique, tout comme *Centuroides noxius*, *Centuroides infamatus* et *Centuroides sculpturatus* (Valdez-Cruz et al., 2004). Le genre *Tityus* est abondant au Sud-Amérique notamment au Brésil (Chávez-Olórtegui et al., 1997). Trois espèces sont particulièrement dangereuses, *Tityus bahiensis*, *Tityus trinitatis* et l'anthrophile *Tityus serrulatus*, agent causal des accidents d'envenimation graves au Brésil (Alvarenga et al., 2005).

2. Les venins de scorpions

Les venins de scorpions sont un mélange complexe de molécules antigéniques n'ayant pas tous la même immunogénicité. Ils sont toxiques pour une large variété de vertébrés et d'invertébrés. Les effets létaux et paralytiques de ces venins sont dus à la présence de diverses protéines neurotoxiques de faible masse moléculaire (Pelhate & Zlotkin 1982). Ces venins sont constitués d'une fraction non toxique comprenant des mucopolysaccharides, de la sérotonine, de l'histamine, des inhibiteurs des protéases, des enzymes et de petits peptides divers et nombreux, pas encore caractérisés.

La fraction toxique ne constitue qu'une faible quantité du poids sec du venin généralement inférieure à 5%, elle est caractérisée par la prédominance et la diversité des neurotoxines qui sont toutes de nature protéique et qui ont pour cibles différents canaux ioniques des membranes excitables nerveuses ou musculaires dont ils perturbent les fonctions physiologiques. Ces neurotoxines affectent les structures moléculaires responsables de la propagation de l'influx nerveux et atteignent ainsi toutes les fonctions vitales de l'organisme régulées par le système nerveux (Legros et al., 1997; Fukuhara et al., 2003; Petricevich 2010).

2.1. Les toxines du venin de scorpion

La diversité des espèces de scorpions implique une diversité des toxines. Les toxines des venins de scorpions peuvent être divisées en différentes familles selon divers critères : la longueur de leurs séquences en acides aminés, la cible animale, leur mécanisme d'action et la présence ou l'absence de ponts disulfures. Les cibles biologiques des toxines à ponts disulfures sont les canaux sodium, potassium, chlore et calcium des cellules excitables (Boudier et al., 1992; Batista et al., 2002; Zhijian et al., 2006).

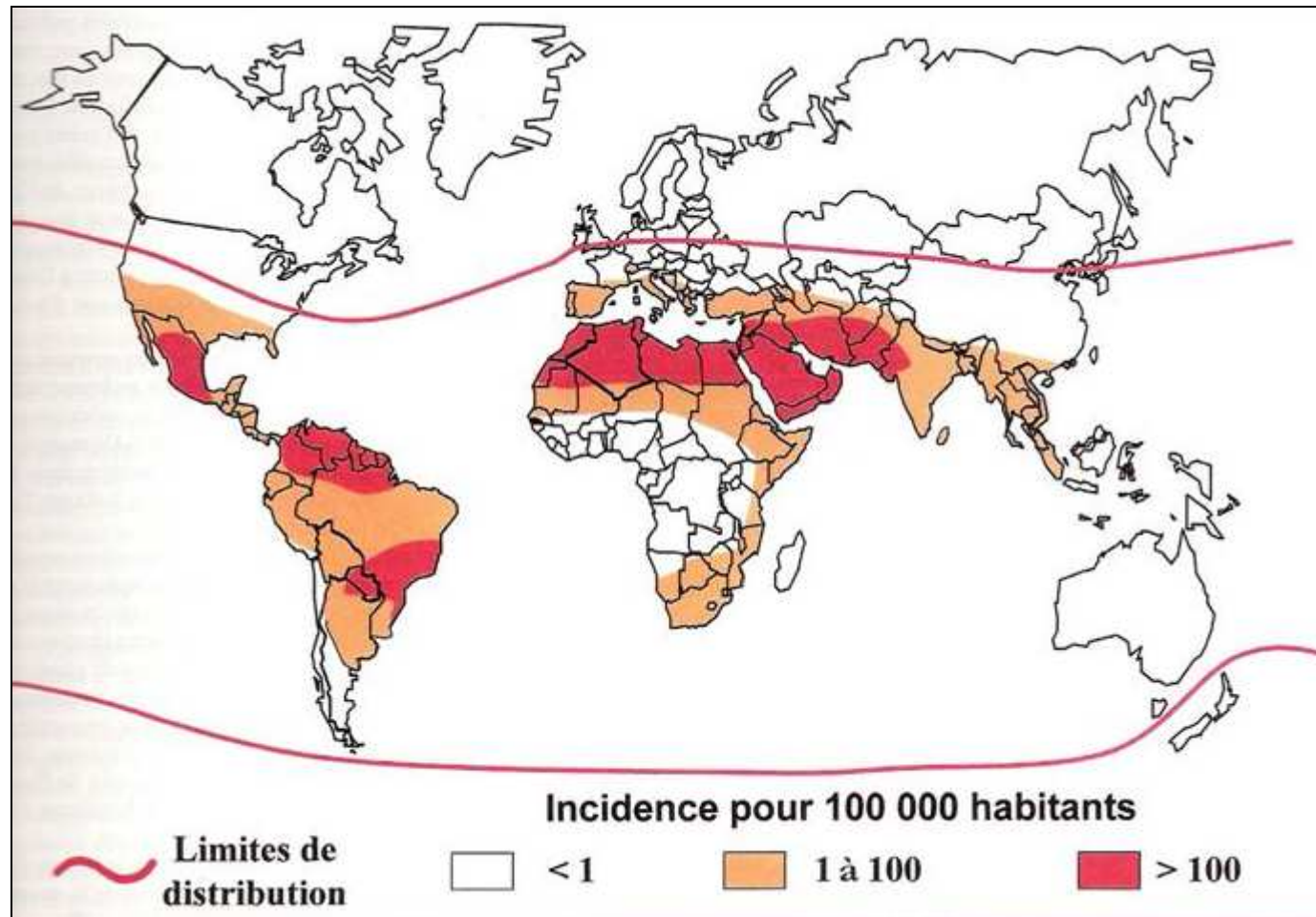


Figure 1 : Incidence des piqûres de scorpions dans le monde/100 000 habitants (Chippaux & Goyffon 2008).

2.1.1. Les toxines longues actives sur les canaux sodium

Les neurotoxines présentes dans les venins de scorpions sont des polypeptides basiques monocaténares de faible masse moléculaire (3 à 7 kDa). Elles sont constituées de 60 à 76 résidus d'acides aminés réticulés par quatre ponts disulfures (Fontecilla-Camps 1988; Devaux et al., 2004). A ce jour, approximativement 230 structures primaires de toxines purifiées actives sur les canaux Na⁺ issues de 40 espèces de scorpions, ont été séquencées (Srinivasan 2002; Kalia et al., 2015). Ces toxines constituent la classe de toxines la plus abondante dans les venins de *Buthidae*, elles induisent chez les mammifères des signes cliniques et des effets létaux. Un motif conservé a été retrouvé dans toutes les structures de ces toxines, il correspond à un ou deux segments courts sous forme d'hélice- α plus un feuillet- β triple brin reliés par des régions variables formant des boucles (**Figure 2**). Certains segments semblent être impliqués dans l'activité de ces toxines, alors que des résidus aromatiques ou chargés positivement sont d'importants éléments dans l'interaction directe avec les canaux sodium, l'arrangement spatial de la toxine et la formation d'un potentiel électrique impliqué dans la reconnaissance des canaux sodiques (Possani et al., 1982).

Les toxines actives sur les mammifères sont divisées en deux types α et β en fonction de leurs effets pharmacologiques et électrophysiologiques (Boudier et al., 1988). Elles partagent un motif de structure commun avec un feuillet- β antiparallèle triple brin, une courte hélice- α et quatre ponts disulfures (Pintar et al., 1999).

✓ **Les toxines α :** Ces polypeptides de 61 à 67 résidus d'acides aminés sont potentiel-dépendants. En se fixant sur le site 3, ils inactivent le potentiel de fermeture du canal sodium des cellules excitables sans modifier le potentiel d'ouverture. La principale conséquence est une prolongation du potentiel d'action et donc une dépolarisation membranaire, suivie dans un deuxième temps d'une perte de l'excitabilité. Ces toxines sont caractéristiques des venins de *Buthidae* paléotropicaux. La toxine Aah II du venin de scorpion d'*Androctonus australis hector* et Lqh2 de *Leiurus quinquestriatus hebraeus* sont les toxines des exemples de toxines de cette sous-famille (Berwald-Netter & Martin-Moutot 1981; Benoit & Dubois 1987; Gordon et al. 2007).

✓ **Les toxines β :** Ces toxines se lient au niveau du site 4 des canaux Na^+ de manière indépendante du potentiel de membrane, elles agissent sur le potentiel d'ouverture du canal. Elles n'ont été identifiées que dans les venins des *Buthidae* néotropicaux, particulièrement dans celui du scorpion du genre *Centruroides*. Les toxines C_{ss} II et C_{ss} IV du venin *Centruroides suffusus suffusus* et la toxine Cn2 du scorpion *Centruroides noxius hoffmann* en sont des exemples (Pintar et al. 1999).

2.1.2. Les toxines courtes actives sur les canaux potassium

La toxine NTX du venin de *Centruroides noxius hoffmann* est l'une des premières toxines actives sur les canaux K^+ à être identifiée (Possani et al. 1982). Depuis, environ 140 structures primaires de toxines actives sur les canaux K^+ ainsi que leurs propriétés physiologiques ont été rapportées (Vega & Possani 2004; Kuzmenkov et al. 2016). Ces toxines sont présentes dans les venins en très faible quantité (< 1% du poids sec), elles sont actives sur les canaux potassiques potentiel-dépendant, leurs séquences comptent vingt à soixante-dix résidus d'acides aminés reliés par trois ponts disulfures. Selon l'homologie de la structure primaire, leur taille moléculaire et la position des cystéines, les toxines activant sur les canaux K^+ sont subdivisées en trois familles : α -KTx, β -KTx et γ -KTx (Eccles et al., 1994; Legros et al., 1998; Tytgat et al., 1999; Gurrola et al., 1999; Zhu et al., 1999; Pardo-Lopez et al., 2002; Xu et al., 2004; Olamendi-Portugal et al., 2005; Wang et al., 2005; Romeo et al., 2008; Abdel-Mottaleb et al., 2008; Shijin et al., 2008; Taibi-Djennah et al., 2015; Sifi et al., 2016).

2.1.3. Les toxines de scorpion sans ponts disulfure

Ces peptides sont un nouveau type de polypeptides bioactifs (Zhijian et al., 2006). Environ 26 peptides de ce type ont été décrits, leur taille varie entre 13 et 50 résidus d'acides aminés (Ferreira et al., 1993; Meki et al., 1995; Ali et al., 1998; Verdonck et al., 2000; Corzo et al., 2001; Diego-García et al., 2005; Zeng et al., 2005). Les toxines de venins de scorpions sans ponts disulfures sont impliquées dans la modulation de la réponse immune, l'initiation du signal moléculaire des cellules, certaines d'entre elles possèdent une activité antimicrobienne (Zeng et al., 2006).

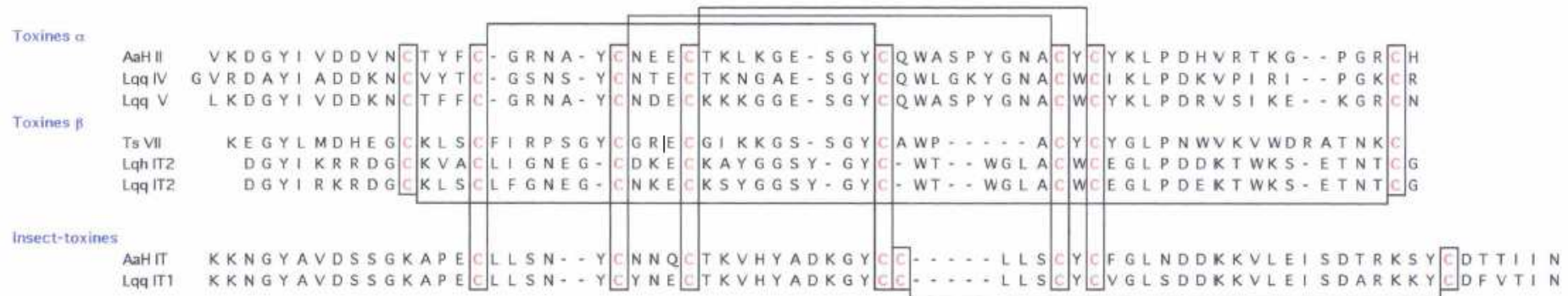


Figure 2 : Alignement des séquences en acides aminés des toxines à chaînes longues de venins de scorpions :

Toxines α: Aah II (*Androctonus australis hector*)

Lqq IV (*Leiurus quinquestriatus*)

Lqq V (*Leiurus quinquestriatus*)

Toxines β: Ts VII (*Tityus serrulatus*)

Lqh IT2 (*Leiurus quinquestriatus hebraeus*)

Lqq IT2 (*Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*)

Toxines d'insectes: Aah IT (*Androctonus australis hector*)

Lqq IT1 (*Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*) (Pintar et al., 1999).

2.2. Les toxines du venin de scorpion *Androctonus australis hector* (Aah)

Le venin de scorpion d'Aah contient diverses neurotoxines qui agissent sur les canaux sodium potentiel-dépendant : quatre d'entre elles sont actives sur les mammifères (Aah neurotoxins I, I', II et III), une présente une activité anti-insecte (Aah insect neurotoxin) et une autre est spécifique aux crustacés (Aah crustacean neurotoxin) (Pelhate & Zlotkin 1982). Les neurotoxines Aah I, Aah I', Aah II et Aah III sont les composantes les plus toxiques du venin (Kopeyan & Martinez 1979; Bougis et al., 1989). Elles appartiennent à deux groupes structurellement et immunologiquement distincts. Les toxines Aah I et Aah III sont membres du même groupe (groupe I) de toxines de venins de scorpions actives sur les mammifères. Leur séquence ne contient pas d'acide glutamique, peu de résidus tyrosine et une abondance de résidus proline par rapport aux toxines du groupe II qui inclut la neurotoxine II d'Aah (Kopeyan & Martinez 1979; Delori et al., 1981).

2.3. Toxicité des venins de scorpions

La toxicité des venins varie selon l'espèce et parfois, pour une espèce donnée, selon la sous-espèce ou une population particulière de l'espèce. Cette toxicité est généralement évaluée en dose létale 50 (DL 50) chez la souris qui est de 0,25 mg/kg de poids corporel pour *Leiurus quinquestriatus* et de 0,85 mg/kg de poids corporel pour *Androctonus australis* (Laraba-Djebari et al., 1994; Krifi et al., 1996; Laraba-Djebari 1998).

3. Epidémiologie de l'envenimation scorpionique

L'envenimation scorpionique est un accident relativement fréquent dans les zones tropicales et subtropicales des cinq continents. Sa fréquence et la morbi-mortalité inhérente font que cet accident si redouté devienne un vrai problème de santé publique. Sa gravité dépend tout d'abord de l'espèce de scorpion mise en cause, de sa taille, de la quantité de venin inoculée, de l'état physiologique de la victime et du temps écoulé entre la pique et l'hospitalisation (Chippaux 2012). Les piqures de scorpions sont enregistrées tout au long de l'année. Sur une moyenne de 40000 cas de piqures rapportés annuellement dans chacun des pays du Maghreb, les manifestations cliniques se limitent dans plus de 70% des cas à une simple douleur localisée à l'endroit de la pique (Abroug et al., 1999; Benguedda et al., 2002). Dans les autres cas, le tableau clinique est complexe, il est caractérisé par des vomissements, un ballonnement abdominal, une diarrhée, une émission d'urine, une dyspnée, une hyperthermie, une hypersudation, des contractions musculaires, une paralysie spastique

évoluant jusqu'au décès de la victime dans les cas les plus sévères. En plus de ces symptômes, il peut survenir une perturbation cardiorespiratoire mettant en jeu le pronostic vital (**Figure 3**). Ces manifestations correspondent à une insuffisance cardiaque se déclinant sous forme d'état de choc et/ou par la formation d'un œdème pulmonaire (Gueron et *al.*, 1992).

4. Médiateurs inflammatoires humoraux et cellulaires impliqués dans l'envenimation scorpionique

La physiopathologie de l'envenimation scorpionique implique principalement les médiateurs inflammatoires telles que les cytokines, les kinines et les substances vasoactives (eicosanoides et PAF) qui contribuent à l'amplification des troubles biologiques observés dans le cas d'envenimations (Ismail 1995; Teixeira et *al.* 2004; Pessini et *al.*, 2006), (**Figure 4**). Des études réalisées sur des envenimations expérimentales avec le venin d'*Aah* ont montré une cinétique rapide d'induction des cytokines pro- et anti-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-4 et IL-10) dans le milieu vasculaire (Hammoudi-Triki et *al.*, 2004; Adi-Bessalem et *al.*, 2008; Raouraoua-Boukari & Sami-Merah 2012). L'implication des cytokines inflammatoires (IL-1 β , IL-6, TNF- α et IL-10) et des chimiokines (IL-8, RANTES) dans la pathogénèse de l'envenimation scorpionique a été également rapporté dans les cas cliniques (Meki & El-Dean 1998; D'suze et *al.*, 2003; Pessini et *al.*, 2003).

La reconnaissance et la fixation des neurotoxines des venins sur le site récepteur provoquent une dépolarisation, induisant une cascade d'événements qui se manifeste par la synthèse et la libération de médiateurs inflammatoires tels que les prostaglandines, l'histamine, les cytokines, le PAF, les leucotriènes et les protéines de la phase aigüe. Le taux de production des médiateurs inflammatoires est corrélé avec la sévérité de l'envenimation (Adi-Bessalem et *al.*, 2008). La régulation de la réponse inflammatoire est assurée par plusieurs médiateurs pro- et anti-inflammatoires. Des études expérimentales ont montré une cinétique rapide d'apparition des cytokines sériques pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, TNF- α) et anti-inflammatoires (IL-4 et IL-10) dès les premières 30 minutes après injection d'une dose sublétales de venin d'*Aah* par voie sous-cutanée (Adi-Bessalem et *al.*, 2008). Les médiateurs lipidiques tels que les eicosanoides sont largement impliqués lors des envenimations scorpioniques. La synthèse de prostaglandines (PGE₂) augmente la perméabilité vasculaire et contribue au recrutement des neutrophiles au niveau du site inflammatoire. Thromboxane (TXA₂) induit l'agrégation plaquettaire, la vasoconstriction et l'expression des molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales notamment les intégrines β_2 .

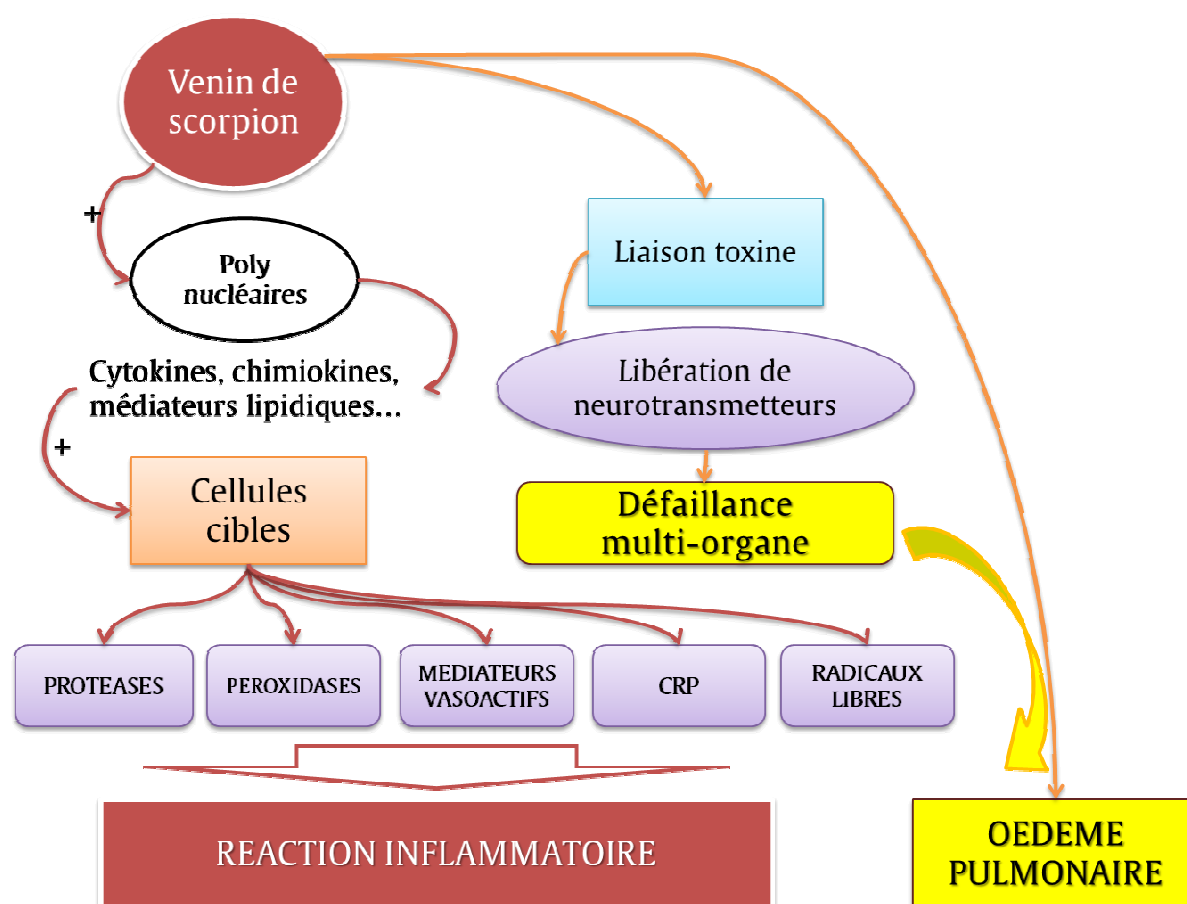


Figure 3 : Schéma général de la réponse inflammatoire induite après envenimation scorpionique (Laraba-Djebari et *al.* 2015).

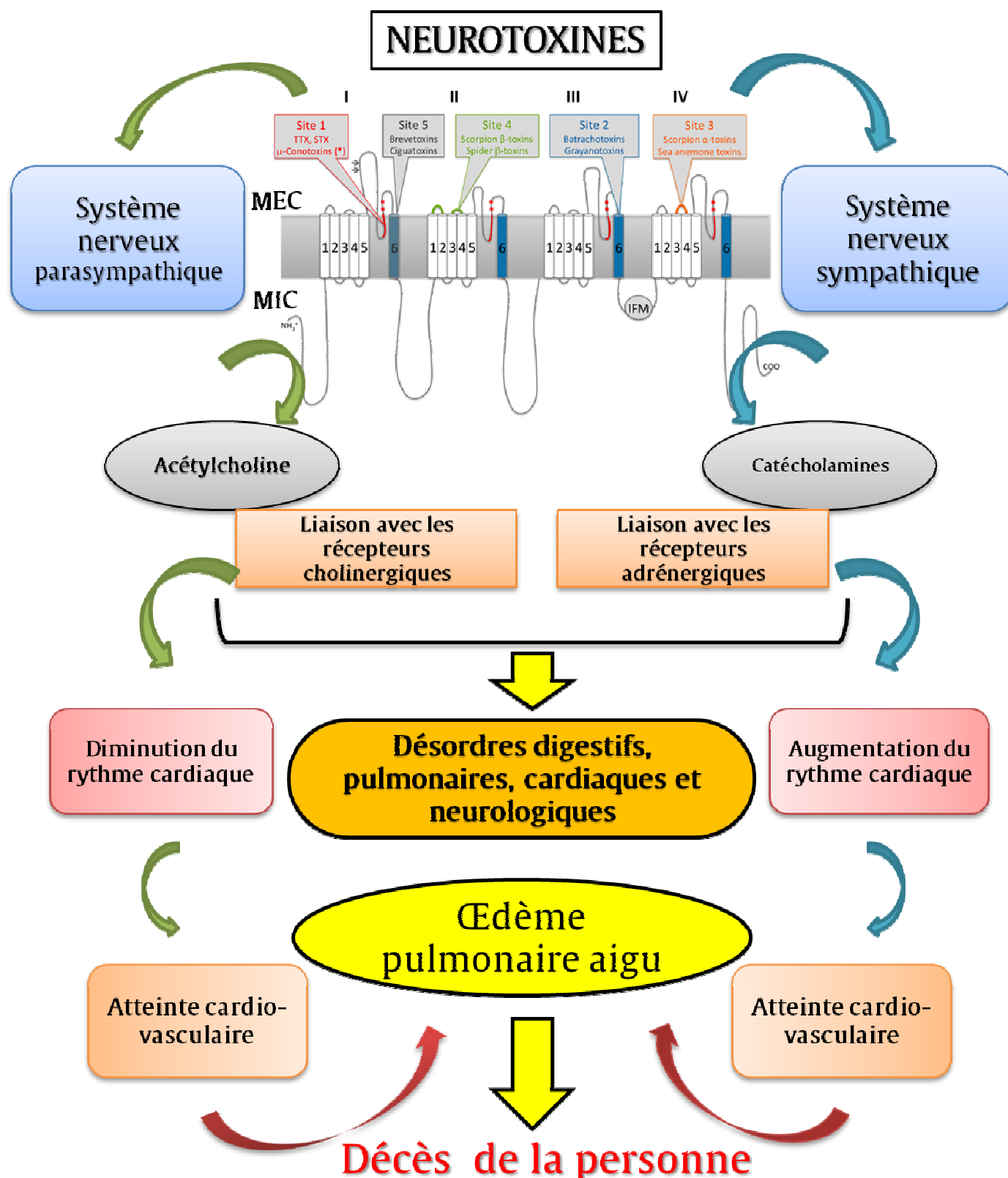


Figure 4 : Physiopathologie de l'envenimation scorpionique (Laraba-Djebari et *al.*,2015).

Les leucotriènes LTD₄ sont des facteurs chimiotactiques pour les éosinophiles, alors que les leucotriènes LTB₄ sont des activateurs des fonctions des neutrophiles et mastocytes (chimiotactisme, agrégation, dégranulation) (Fukuhara et *al.*, 2003; Pessini et *al.*, 2006).

La réponse inflammatoire induite par le venin est aussi caractérisée par une infiltration importante des polynucléaires neutrophiles et éosinophiles. Ces cellules, une fois activées, sont capables de synthétiser et de libérer des enzymes péroxidasiques telles que la myelopéroxydase (MPO) et l'éosinophile péroxidase (EPO) (Greene et *al.*, 1981).

Cette réaction inflammatoire est aussi amplifiée par les médiateurs du compartiment vasculaire intrinsèque tels que la protéine C-réactive (CRP) et les complexes de protéines du complément (C3a et C5a) (Bertazzi et *al.*, 2003; Bertazzi & Assis-Pandochi 2005). En effet, l'augmentation de l'activité lytique du complément a été observée dans le sérum des animaux envenimés avec le venin d'*Aah* mais aussi celui de *Tityus serrulatus* (Bertazzi et *al.*, 2003; Adi-Bessalem et *al.*, 2008). Les fragments libérés tels que les anaphylatoxines C3a et C5a sont responsables de l'augmentation de la perméabilité vasculaire et de l'infiltration leucocytaire (Bertazzi et *al.* 2003; Bertazzi & Assis-Pandochi 2005).

5. Traitement de l'envenimation scorpionique

5.1. Traitement symptomatique

Le traitement symptomatique vise à atténuer les effets secondaires engendrés par l'envenimation. La douleur ainsi que l'hyperthermie sont des signes observés dans le cas d'envenimation scorpionique, elles sont atténuées par des antalgiques et antipyrétiques tel que le paracétamol (Dudin et *al.*, 1990).

L'hypertension artérielle consécutive à une envenimation scorpionique est souvent immédiate et sévère. Elle est liée à une production accrue de catécholamines à l'origine d'une importante vasoconstriction. Les antihypertenseurs vasodilatateurs périphériques sont les plus utilisés (hydralazine, prazosine). Certains auteurs considèrent même la prazosine comme un antagoniste physiologique du venin de scorpion (Bawaskar & Bawaskar 1992). La nicardipine est un inhibiteur des canaux calcium-dépendant, elle est utilisée dans les cas hypertensifs, elle entraîne une vasodilatation artériolaire suivie d'une amélioration du débit sanguin coronaire. En cas de convulsions, les cliniciens utilisent le diazépam en raison du risque de défaillance respiratoire consécutive à d'autres médicaments (Bawaskar & Bawaskar 1992).

Les vomissements sont fréquents dans les cas d'envenimation scorpionique avec une incidence qui peut aller jusqu'à 90% pour certaines espèces de scorpions (Karnad et *al.*, 1989). Par son action sélective antagoniste des récepteurs D2 dopaminergique, la metoclopramide peut traiter les vomissements engendrés par l'envenimation (Cunha-Melo et *al.*, 1991). De même, la chlorpromazine, un antagoniste dopaminergique non sélectif avec une action adrénergique et des activités anti-cholinergique et anti-sérotoninergique, est souvent administrée chez l'enfant dans un but sédatif et antiémétisant (Dudin et *al.*, 1990; Ismail 1995).

5.2. Immunothérapie passive

L'immunothérapie passive contre les envenimations scorpioniques est le seul traitement spécifique contre les piqûres de scorpions. Elle est basée sur l'acquisition d'une immunité spécifique induite chez un animal (cheval ou dromadaire) après administration répétée du venin. Cette propriété est transférée par injection des anticorps spécifiques à une personne envenimée afin de neutraliser les constituants toxiques du venin.

Sur le plan expérimental, il a été clairement établi que le sérum développé contre les venins de scorpions a une capacité de neutralisation adéquate. Cependant des données expérimentales et cliniques mettent en cause l'efficacité de ce traitement. Une étude a montré que lorsque l'administration du sérum est effectuée 20 minutes seulement après celle du venin, l'efficacité du traitement est perturbée (Tarasiuk et *al.*, 1998). Les effets de l'envenimation persistent et peuvent s'aggraver lorsque l'antidote est administré 60 minutes après le venin. Ces effets ont été confirmés lors d'une envenimation avec le venin d'*Androctonus australis* sur des canins. L'administration simultanée du venin et de l'antidote permet de maintenir le débit cardiaque, la pression artérielle, et les résistances vasculaires constants. Cependant, lorsque le sérum est administré 10 minutes seulement après l'envenimation scorpionique, l'antidote ne semble avoir aucun effet protecteur, témoignant ainsi de la limite de l'efficacité des antivenins (Tarasiuk et *al.*, 1998).

Une étude rétrospective sur 422 patients a montré que l'administration du sérum antiscorpionique 30 minutes en moyenne après envenimation n'a eu aucun effet préventif dans 70 % des cas (Tarasiuk et *al.*, 1998).

L'inefficacité de l'immunothérapie est probablement due soit à la libération des médiateurs sur lesquels le sérum antiscorpionique n'a aucun effet, soit aux différences

pharmacocinétiques entre le temps d'action des neurotoxines et des immunoglobulines. L'étude des cinétiques du venin de *Leiurus quinquestriatus* et la pharmacocinétique des immunoglobulines (IgG totaux, et fragments Fab'₂ et Fab) a montré que le venin présentait une demi-vie de distribution de 32 minutes alors que les immunoglobulines avaient une demi-vie de distribution 10 fois supérieure (313 minutes). Cette étude a également montré que la concentration maximale atteinte au niveau des compartiments dans lesquels se distribue le venin, était nettement plus élevée pour le venin que pour les immunoglobulines (Ismail & Abd-Elsalam 1998; Sami-Merah et al., 2008).

5.3. Utilisation d'oligonucléotides fonctionnels en thérapeutique

La potentialité des oligonucléotides à lier des ligands spécifiques est largement utilisée pour le développement de réactifs pharmaceutiques et diagnostiques. Depuis 1990, avec la découverte d'une méthode combinatoire de sélection *in-vitro* « SELEX » (Ellington & Szostak 1990; Stoltenburg et al., 2007), de nombreux aptamères ont été identifiés. Ces composés peuvent également être modifiés, par greffage de divers groupements, les rendant plus stables *in vivo*. Ils peuvent être sélectionnés contre des cibles de natures très diverses (petites molécules organiques, peptides, protéines, acides nucléiques, cellules) et sont en général caractérisés par des affinités élevées pour leur cible et par une spécificité remarquable. Le potentiel thérapeutique d'inhibition des interactions protéine-protéine de ces aptamères repose sur leur taille importante et leur large surface leur permettant d'interagir de manière très spécifique avec les surfaces biologiques. Les acides nucléiques résistants aux nucléases, et qui présentent une forte affinité (K_i de l'ordre du pM) pour le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF), ont été identifiés à partir de bibliothèques d'aptamères ARN (Jellinek et al. 1994) (Figure 5).

5.3.1. Utilisation des aptamères pour neutraliser toxines et venins

Les anticorps qui composent les antivenins sont synthétisés chez les animaux supérieurs en utilisant le plus souvent des toxines inactivées par modifications chimiques ou par la chaleur. Cependant, ces toxines atténuées n'ont pas la même conformation tertiaire que la toxine native. Par contre, les aptamères développés *in-vitro* sont des molécules reconnaissant très spécifiquement les conformations natives des protéines (Ellington & Szostak 1990).

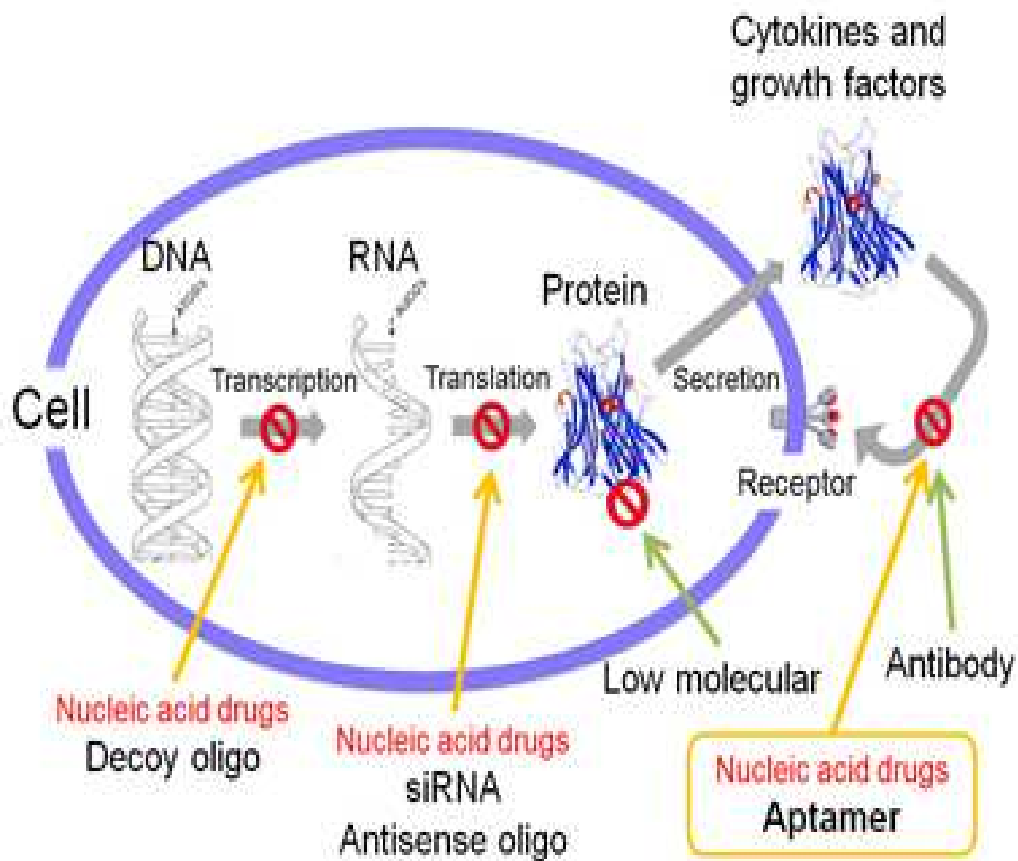


Figure 5 : Site d'action des oligonucléotides : Intracellulaire (Decoy oligo et Antisense oligo) et extracellulaire (aptamères) (Osborne et *al.*, 1997).

Plusieurs aptamères très spécifiques ont été développés contre une variété de différentes toxines bactériennes (De Grasse 2012; Wang et *al.*, 2015) et de venins de serpents (Lauridsen et *al.*, 2012; Ye et *al.*, 2014).

Récemment, des études ont montré que les aptamères pouvaient engendrer une inhibition significative (jusqu'à 25%) de l'activité de sphingomyélinase du venin de *Loxosceles reclusa* (Sapag et *al.*, 2014). Cependant, les venins sont des mélanges moléculaires complexes pouvant inclure des enzymes de dégradation, ainsi que des neurotoxines et des cardiotoxines. Tous ces composants requièrent donc un cocktail d'aptamères "polyclonaux" pour une neutralisation efficace et pour être utilisés en thérapeutique en tant qu'unique antivenin. Ces résultats sont en faveur des aptamères qui pourraient être développés pour lutter efficacement contre les effets néfastes des venins de scorpions, serpents, araignées et insectes. Un autre avantage des aptamères par rapport aux antisérums serait que les aptamères lyophilisés ne nécessiteraient pas de stockage à froid et pourraient donc être conservés à des températures ambiantes (environnements désertiques ou extrêmes) pour le stockage à long terme (Quaak et *al.*, 2010) (**Tableau I**).

La taille de ces aptamères constitue à la fois un avantage (stabilité d'interaction) et des inconvénients (difficultés à traverser les membranes cellulaires, biodisponibilité faible). Les aptamères ne peuvent pas être délivrés oralement et doivent être injectés directement au patient, ou administrés à l'aide de transporteurs, ou par encapsulation dans des liposomes. Même si certaines modifications chimiques permettent une biodisponibilité améliorée, leur coût de production (essentiellement dû à leur taille) constitue une limitation à l'utilisation de ces molécules qui restent cependant moins volumineuses que les anticorps (~ 150 kDa), (Osborne et *al.*, 1997).

5.4. Approche vaccinale et immunoprévention

Différentes approches expérimentales ont été envisagées pour améliorer l'immunothérapie. Des essais d'expression des toxines de venins de scorpions ont été réalisés dans différents systèmes afin d'améliorer et de concevoir un éventuel vaccin recombinant. Cependant, cette approche vaccinale a abouti à un faible taux d'expression associé à une inactivité du produit d'expression (Martin-Euclaire & Søgaaard 1994). La détoxification et atténuation des venins de scorpions par irradiation- γ est une méthode efficace dont les résultats paraissent prometteurs (Hati et *al.*, 1990; Clissa et *al.*, 1999; Abib & Laraba-Djebari 2003).

Tableau I : Comparaison des anti-sérums et aptamères (Walter et al. 2012)

ANTICORPS	APTAMERES
Leur développement nécessite des animaux	Leur développement se fait <i>in-vitro</i>
La production in-vivo induit des variations de lot à lot	La synthèse chimique induit une très grande reproductibilité
La reconnaissance des cibles se fait uniquement dans des conditions physiologiques	Les conditions peuvent être définies de manière à générer des aptamères actifs en ces conditions
Ils sont sensibles à la chaleur, leur dénaturation est irréversible	Ils sont stables face à la température, leur dénaturation est réversible
Durée de vie limitée	Longue durée de vie
Paramètres cinétiques non modifiables	Paramètres cinétiques modifiables
Haut poids moléculaires (environ 150 kDa pour les IgG)	Faible poids moléculaire (13-26 kDa)

Des études utilisant des peptides de synthèse mimant la toxine Aah II ou la toxine TsV II pour immuniser des animaux, ont abouti à la formation d'anticorps neutralisants à forte affinité, mais leur taux de production très bas fut limitant (Bahraoui & Granier 1986; Alvarenga et *al.*, 2002).

Un analogue non toxique de la toxine Aah II, (Abu)8-Aah II, correspondant à la séquence de la molécule où les résidus de demi-cystéine sont substitués par des résidus isoptères alpha-aminobutyryl, a conféré à la fin du protocole d'immunisation, une protection allant jusqu'à 8 DL 50 chez des souris envenimées avec la toxine native d'Aah II. Cependant, le titre en anticorps diminue au cours du temps bien que la protection demeure élevée (Zenouaki et *al.*, 1997; Devaux et *al.*, 1997).

Une autre étude a rapporté la capacité d'une anatoxine naturelle (Amm VIII) à induire des anticorps neutralisants contre la plupart des α -toxines de venins de scorpions, en particulier la toxine Aah II (Alami et *al.*, 2006). Ces anticorps ont un effet immunoprotecteur chez la souris jusqu'à 42 DL 50 vis-à-vis de la toxine Aah II, cependant ils ne neutralisent pas les toxines Bot III et Lqq appartenant au même groupe.

Des peptides naturels (KAah 1 et KAah 2) ont été isolés à partir du venin d'*Aah*. Le peptide KAah 1 est capable d'induire la production d'anticorps ayant une réactivité croisée avec la toxine Aah II et pouvant neutraliser jusqu'à 5 DL 50 de la fraction toxique FtoxG50 du venin d'*Aah* (Srairi-Abid et *al.*, 2008).

Les vaccins à base de peptides synthétiques présenteraient donc plusieurs avantages. Ces peptides pourraient être produits en grande quantité, sans contamination ni par les molécules naturelles ni par les dérivés de mutations. Cependant, ces peptides s'avèrent peu immunogènes. Leur immunogénicité pourrait être augmentée soit par polymérisation, soit par l'utilisation d'adjuvants appropriés.

L'amélioration et l'optimisation d'une approche vaccinale est un défi majeur dans la recherche d'un traitement préventif efficace contre la physiopathologie de l'envenimation scorpionique. La recherche et l'essai de nouveaux adjuvants capables de booster l'immunogénicité des antigènes de venins de scorpions est de nos jours envisagée (Boussag-Abib & Laraba-Djebari 2011; Nouri & Laraba-Djebari 2015).

6. Les adjuvants vaccinaux

La vaccination reste un outil indispensable dans la protection et l'éradication des maladies (Perrie et *al.*, 2008). Depuis les pionniers, Edward Jenner et Louis Pasteur, de nombreux modèles de vaccins à base d'agents viraux vivants atténués ou inactivés ont prouvé leur efficacité. Cependant la balance bénéfices/risques fait pencher la recherche du côté des vaccins à base de sous-unités de ces agents infectieux, comme les protéines, qui offrent une alternative plus sûre. Leur efficacité étant néanmoins plus faible, la nécessité d'utiliser des adjuvants s'est fait ressentir.

Un adjuvant est une substance administrée en combinaison avec un antigène qui induit une réponse immune plus importante que lorsque l'antigène est utilisé seul (Ramon 1926). Les adjuvants sont des composés de structure hétérogène qui sont classés selon leur nature chimique, leur origine ou leurs propriétés physicochimiques. Cependant, des composés proches présentent fréquemment des propriétés immunologiques différentes (Marciani 2003).

Les seuls adjuvants actuellement autorisés pour l'homme sont les sels d'aluminium (États-Unis et Europe) et le MF59 (Europe). La structure requise d'un adjuvant, ainsi que les mécanismes moléculaires et cellulaires qui sont responsables de leur activité *in vivo*, ne sont que très peu connus (Schijns 2000).

Vue leur grande hétérogénéité les rendant difficile à catégoriser, il est cependant possible de les séparer en deux familles : i) il y a d'une part les adjuvants de type particulière, tels que les sels minéraux, les liposomes ou les particules synthétiques ; ii) d'autre part, les adjuvants non particuliers qui sont souvent des stimulants et des modulateurs de la réponse immune, tels que les ligands des récepteurs Toll (Wischke et *al.*, 2009).

6.1. Les adjuvants à base de sels d'aluminium

Les capacités adjuvantes des composés à base d'aluminium ont clairement été établies en 1930, plus particulièrement pour le tétanos et la diphtérie. Leur utilisation est alors devenue courante (Aguado et *al.*, 1999; Knudsen et *al.*, 2016).

L'avantage d'utiliser ces adjuvants à base d'aluminium est le développement rapide d'une réponse anticorps élevée et durable après l'infection primaire (Gupta 1998). Pour les infections qui peuvent être prévenues par induction d'anticorps sériques, les composés à base d'aluminium formulés dans les conditions optimales sont des adjuvants de choix.

L'adsorption des antigènes sur ces composés dépend des interactions électrostatiques entre l'antigène et l'adjuvant. L'hydroxyde d'aluminium possède une structure cristalline et permet l'adsorption de protéines chargées négativement à pH neutre. Le phosphate d'aluminium et les précipités d'alum présentent quant à eux des structures amorphes chargées négativement, ou neutres à pH 7. Leur nature amorphe contribue à leur large surface externe ainsi qu'à leur grande capacité d'adsorption des protéines, principalement pour les protéines chargées positivement (Gupta 1998).

Le mécanisme d'adjuvantation des composés à base d'aluminium inclut plusieurs effets simultanés : le mécanisme physique de formation d'un dépôt, des phénomènes liés à la nature physicochimique des adjuvants, leur nature particulière et leur taille optimale ($< 10 \mu\text{m}$). Ils sont aussi capables de présenter efficacement des antigènes aux cellules présentatrices d'antigènes (CPA), de stimuler des cellules immunitaires d'un organisme à travers une activation du complément et des macrophages, et d'induire des éosinophiles (Gupta 1998; Boussag-Abib & Laraba-Djebari 2011).

7. La vectorisation

A la fin du XIX^{ème} siècle, Paul Ehrlich énonça la théorie du *Magic Bullet*, une balle « magique » capable de transporter des molécules chimiques à l'intérieur de l'organisme, à des concentrations biologiquement actives sans danger pour le patient, et présentant une forte affinité pour les sites d'action. Ainsi furent posées les premières bases du concept de vectorisation, c'est-à-dire l'ensemble des approches permettant de transporter des molécules biologiquement actives (entité chimique, peptide, protéine, acide nucléique, etc.) jusqu'à leur cible à l'intérieur de l'organisme (Winau et al., 2004).

La conception d'un vecteur doit répondre à un grand nombre de défis à la fois théoriques et pratiques. Tout d'abord, le vecteur doit être biocompatible, c'est-à-dire toléré par l'organisme. Il doit transporter une molécule d'intérêt en quantité biologiquement efficace et avoir une forte affinité pour les tissus ciblés. Il doit franchir les barrières biologiques et protéger la molécule jusqu'à son site d'action. Enfin, le vecteur ne doit pas présenter de toxicité pour l'organisme. A cela nous rajouterons qu'un vecteur idéal devra permettre de libérer le principe actif de manière chronobiologique, c'est-à-dire en tenant compte de l'état physiologique et du rythme biologique de l'organisme (Winau et al., 2004).

Depuis l'énoncé de la théorie du *Magic Bullet*, les recherches sur la vectorisation ont fait des progrès considérables. Aujourd'hui la vectorisation est une discipline scientifique à part entière, pluridisciplinaire, qui offre des possibilités nouvelles pour l'administration de médicaments et de vaccins. De nombreux vecteurs sont étudiés en recherche et ils peuvent être d'origine biologique tels que des transporteurs présents dans notre sang (hémoglobine, lipoprotéines), d'origine naturelle mais non biologique (virus modifiés), ou d'origine synthétique (liposomes, nanoparticules). Parmi les stratégies développées, une attention particulière est portée sur la conception de vecteurs biodégradables.

7.1. Vecteurs biodégradables

Les particules biodégradables ont un important potentiel d'application en tant que vecteurs de molécules à activité biologique. Ces molécules peuvent être des principes actifs médicamenteux ou des protéines et acides nucléiques pour des applications à but vaccinal. Il a été montré que des antigènes encapsulés dans des microparticules produites à partir de polymères biodégradables, présentent un bon potentiel pour les systèmes de relargage et pour l'adjuvantation. Ces microparticules permettent un relargage contrôlé de l'antigène ayant pour effet de réduire le nombre de doses d'immunisation ou de développer des vaccins unidose (Eldridge et *al.*, 1989).

Cependant, les capacités de ces microparticules sont limitées par des problèmes de dégradation et de dénaturation de l'antigène après encapsulation et relargage. L'activité adjuvante de ces particules a récemment été décrite comme induisant un inflammasome et complétant l'activité des ligands des Toll-like récepteurs (Rice-Ficht & Arenas-Gamboa 2010). Il apparaît aussi, suite à l'étude sur un panel de différentes particules effectuée par Xiang et collaborateurs, que leur taille et leur nature influent sur le type de réponse induite par l'antigène présenté (Xiang et *al.*, 2006).

Pour cela, la conception de nanoparticules (Nps) au lieu des microparticules s'avère indispensable. Les nanoparticules sont des colloïdes synthétiques de petite taille, biocompatibles et capables d'interagir avec l'environnement biologique. Leur utilisation en médecine et plus particulièrement en vectorisation est en pleine expansion, et laisse entrevoir des résultats prometteurs pour de nombreuses applications tels que le diagnostic des maladies, la délivrance des médicaments et la vaccination.

7.2. Nanoparticules, nanotechnologies, nanomédecine

Le mot nanoparticule vient du grec « nano » qui signifie nain, et de « particule » qui désigne la quantité la plus infime d'un corps. Outre cet aspect étymologique, le préfixe nano- désigne une échelle de grandeur de l'ordre du milliardième de mètre (10^{-9} m). Conformément à la norme européenne ISO TC 229, une nanoparticule est un objet qui a typiquement une taille comprise entre 1 et 100 nm sur au moins une de ses dimensions. Il est désigné par nanoscience ou nanotechnologie, l'étude et la manipulation de matériaux aux échelles atomiques, moléculaires et macromoléculaires, où les propriétés diffèrent significativement de celles à plus grande échelle (Warheit et *al.*, 2008). En 1959, à l'American Physical Society, le physicien prix Nobel Richard Feynman discutait déjà des possibilités immenses qu'offraient les nanosciences (Feynman 1960). En effet, l'émergence des nanosciences est une avancée technologique majeure de ces dernières décennies qui offre des possibilités nouvelles pour de nombreuses applications.

Les nanoparticules sont classées en deux catégories en fonction de leur origine: les nanoparticules naturelles et les nanoparticules anthropiques (produites par l'homme). Les nanoparticules naturelles sont produites dans la nature sans intervention de l'homme. Nous y retrouvons les cendres volcaniques, les poussières ultrafines, les virus, les débris bactériens et les grains de pollen. Les nanoparticules anthropiques quant à elles sont classées en deux catégories, selon qu'elles soient produites de façon intentionnelle ou non. Les nanoparticules anthropiques non-intentionnelles sont principalement des débris de combustion issus de l'activité humaine. Ce sont par exemple des nanoparticules de diesel provenant de la combustion d'hydrocarbures, ou des cendres issues des combustions ménagères et industrielles. Les nanoparticules anthropiques intentionnelles (synthétiques) sont fabriquées volontairement par l'homme pour leur utilisation. En effet, une nanoparticule possède un ensemble de caractéristiques physicochimiques, notamment la taille, la charge de surface, la réactivité, la forme, la porosité ou encore l'hydrophobicité. Chacune de ces caractéristiques lui confère des propriétés uniques et particulières (exemple: résistance, biocompatibilité, magnétisme, propriétés optiques) qui trouvent leurs intérêts dans de nombreuses applications.

La nanomédecine ou nanobiotechnologie est l'application des nanosciences à la recherche biomédicale. Les propriétés particulières d'interaction des nanoparticules avec le vivant en font des outils extrêmement intéressants pour plusieurs domaines de la recherche fondamentale et clinique tels que la fabrication des biomatériaux, le diagnostic,

l'administration de médicaments, la vaccination, la médecine régénératrice, l'imagerie médicale et la purification des biomolécules (Jabbari 2009). Dans tous ces domaines l'utilisation des nanoparticules connaît un essor croissant et montre des résultats prometteurs.

7.2.1. Exemple d'utilisation des nanoparticules dans le domaine biomédical

En thérapie, les nanoparticules apportent de nombreux espoirs. Les médicaments à base de nanoparticules mis sur le marché sont de plus en plus nombreux, tels que l'Ambisome® (formulation liposomale d'amphotéricine B, antifongique), le PEG-Intron® (Interferon- α -PEGylé associé à la ribavirine, traitement des infections chroniques de l'hépatite C chez l'homme) et le Pegasys® (traitement de l'hépatite chronique C chez des adultes).

Un exemple illustrant l'apport des nanoparticules est la thérapie anticancéreuse. Les chimiothérapies utilisées à ce jour sont très contraignantes pour plusieurs raisons : faible solubilité des drogues, faible sélectivité pour les cellules cancéreuses, faible perméabilité dans les tissus tumoraux, libération trop rapide, résistance des cellules cancéreuses, forte toxicité sur les tissus sains (Horcajada et *al.*, 2010; Shapira et *al.*, 2011). Pour pallier à ces problèmes, de nombreuses formulations utilisant des drogues anti tumorales (doxorubicine, gencitabine, praclitaxel, bursufan) associées aux nanoparticules sont étudiées (Estanqueiro et *al.*, 2015).

Des études ont montré que les nanoparticules sont capables de traverser les fenestrations des néo-vaisseaux pour s'accumuler massivement dans les tissus tumoraux par un effet dit « EPR » (Enhanced Permeation Retention) (Reddy et *al.*, 2005; Saha et *al.*, 2010). De plus, cet effet peut être augmenté par le greffage à la surface des nanoparticules de polymères hydrophiles neutres (exemple PEG), qui empêchent leur captation par le système réticulo-endothélial, augmentant la durée de circulation dans le sang (Wang & Thanou 2010; Wang et *al.*, 2012; Danhier et *al.*, 2015). Par ailleurs, le ciblage des tumeurs peut être amélioré par l'utilisation de nanoparticules couplées à des anticorps ou à des ligands spécifiques des tissus tumoraux (Torchilin 2010).

Grâce à ces nombreux travaux, plusieurs formulations anticancéreuses à base de nanoparticules ont été mises sur le marché ou sont en phase clinique de développement. Elles permettent d'augmenter la toxicité des drogues sur les cellules cancéreuses, tout en réduisant significativement les effets indésirables sur les tissus sains. Parmi les plus connus, nous pouvons citer l'Abraxane® qui a obtenu une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) en 2008, pour le traitement en monothérapie du cancer du sein métastatique. C'est une

formulation nanoparticulaire à base de paclitaxel amorphe et d'albumine sérique humaine. Nous pouvons également citer le Doxil®/Caelyx® (PEG-liposome de doxorubicine), utilisé pour le traitement de nombreux cancers, l'Oncospar® (forme PEGylée de L-asparaginase), utilisé pour le traitement de leucémie lymphoblastique aigue et le Neulasta® utilisé pour la réduction de la durée des neutropénies pendant les chimiothérapies.

Les nanoparticules sont également étudiées dans la recherche de nouveaux vaccins. Elles sont développées à la fois comme transporteurs d'antigènes ciblant les cellules immunitaires, mais aussi comme adjuvants vaccinaux capables d'augmenter l'intensité de la réaction immunitaire. En effet, les antigènes purifiés, perdent de leur immunogénicité et sont généralement incapables de stimuler une réaction immunitaire efficace (Jones 2008).

Les nanoparticules sont capables de transporter les antigènes, d'améliorer leur absorption par les cellules immunitaires et de stimuler la réponse immunitaire (Perrie et *al.*, 2008; Ilinskaya & Dobrovolskaia 2016). De plus, les nouvelles formulations nanoparticulaires associent des anticorps ou des ligands spécifiques des cellules présentatrices d'antigènes, initiatrices de la réponse immunitaire permettant leur ciblage (Rice-Ficht & Arenas-Gamboa 2010; Temmerman et *al.*, 2011).

Ces exemples montrent l'intérêt de développer des nanoparticules pour le traitement des maladies complexes et pour améliorer les thérapies existantes. Ces efforts se traduisent par le développement de nanoparticules ayant des cibles spécifiques (maladies métaboliques, thérapie génique, VIH, maladies infectieuses) et une efficacité thérapeutique prouvée (Zale et *al.*, 2016).

7.3. Les différents types de nanoparticules

Il existe un grand nombre de nanoparticules pouvant avoir diverses structures. Ces vecteurs peuvent néanmoins être regroupés en deux grandes familles : les nanoparticules biodégradables qui n'entraînent pas de risques d'accumulation dans les tissus et les nanoparticules non dégradables qui présentent souvent des propriétés optiques pour l'imagerie médicale.

7.3.1. Nanoparticules non dégradables

Cette catégorie regroupe des Nps rigides possédant des formes variées telles que des sphères, ellipses, aiguilles ou tubes. Ce type de Nps est biocompatible mais non biodégradable.

7.3.1.1. Les fullerènes

Ces structures carbonées ont été découvertes en 1985 par Harold Kroto, Robert Curl et Richard Smalley, en vaporisant du graphite par laser dans une enceinte d'hélium et en mesurant le spectre de masse du carbone (Kroto 1985). Les objets prennent la forme d'une sphère, d'un ellipsoïde, d'un nanotube ou encore d'un anneau. Ils comportent 60 à 70 atomes agencés en pentagones et en hexagones, et présentent une grande stabilité (**Figure 6**). Les fullerènes étant des assemblages atomiques creux, peuvent y être introduits des atomes étrangers, notamment métalliques (La, Ni, Na, K, Rb, Cs) utilisés pour l'imagerie médicale ou des principes actifs essentiels au niveau thérapeutique. Les molécules de fullerène peuvent aussi s'arranger selon un réseau cristallin pour former des nanotubes. Ils sont peu solubles dans l'eau ($1,3 \times 10^{-11}$ mg.mL⁻¹) et forment des suspensions colloïdales (Farré et *al.*, 2010; Bouchard & Ma 2008).

7.3.1.2. Les nanoparticules métalliques

Une grande partie des métaux possèdent des propriétés spécifiques à l'échelle nanométrique. Des Nps d'or, d'argent, de silice et de fer sont ainsi développées. Les Nps d'or sont particulièrement étudiées en tant que marqueurs optiques. En effet, elles présentent un spectre de résonance dans le visible sensible aux conditions expérimentales, à la taille et à la forme de la Nps (Parak et *al.*, 2003; Atay et *al.*, 2004; Liu et *al.*, 2007). Les Nps magnétiques sont le plus souvent réalisées à partir d'oxydes de fer super-paramagnétiques (Cheon & Lee 2008). De plus, les oxydes de zinc et de titane sont principalement utilisés dans les crèmes solaires en tant que filtres solaires.

7.3.1.3. Les puits quantiques

Ces structures appelées « quantum dots », ont été découvertes en 1985 par Alexei Ekimov (Ekimov et *al.*, 1985). Ils sont composés de combinaison d'éléments des groupes II et IV ou des groupes III et V du tableau périodique de Mendeleïev. Le plus souvent, les associations suivantes sont retrouvées: cadmium/sélénium, cadmium/tellure, indium/arsenic ou indium/phosphore. Le nombre d'atomes des puits quantiques peut varier de 1 000 à 100 000 et leur association présente des dimensions plus petites que le rayon de Bohr (mesurant entre 2 et 10 nm de diamètre).

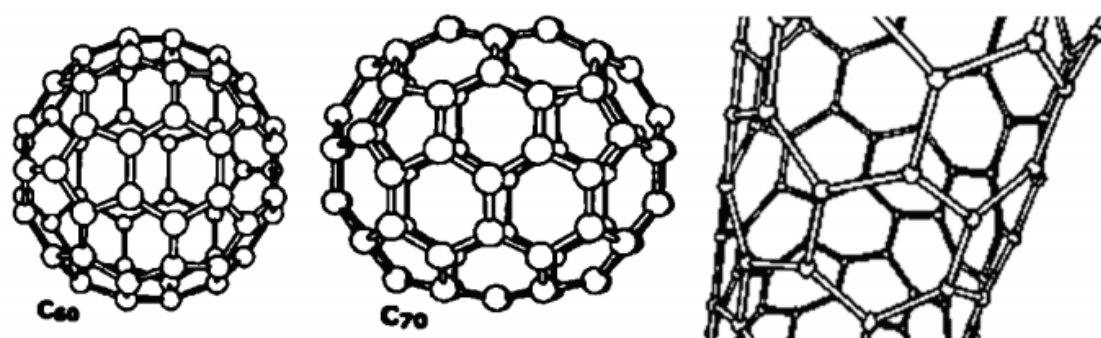


Figure 6 : Représentation des nanoparticules carbonées non dégradables : fullerènes C₆₀, C₇₀, et nanotube de carbone (Ostiguy et *al.*, 2010).

Ils montrent ainsi des propriétés optiques et électroniques dues à leur confinement quantique, ils peuvent, par exemple, absorber la lumière blanche ou ultraviolette et la réémettre à une longueur d'onde spécifique en quelques nanosecondes (Aitken et *al.*, 2006). La flexibilité des puits quantiques et les propriétés optiques associées permettent d'envisager des applications dans le domaine médical. Ils sont notamment mis en œuvre lors de marquages biologiques en tant que sondes cellulaires. Les cellules sont marquées par des « quantum dots », réinjectées au patient et suivies par microscopie (**Figure 7**). Des marquages multi-couleurs sont possibles avec de telles structures. Leur important rapport surface/volume offre la possibilité de les conjuguer à des anticorps, à des protéines et à des oligonucléotides. Ils sont également modifiés afin de vectoriser des médicaments et des outils de diagnostic (Michalet et *al.*, 2005). Néanmoins, leur toxicité *in-vivo* reste un inconvénient majeur.

7.3.2. Nanoparticules biodégradables

Ces Nps sont généralement composées de lipides, de sucres, ou de polymères biodégradables et peuvent être dispersées dans des solutions aqueuses, des crèmes ou d'autres types de formulations. Les particules dispersées peuvent être solides, fluides ou dans un état de gel, rigides ou déformables. En fonction du type de matériau utilisé et du pH, les Nps peuvent être chargées en surface. Cette caractéristique est très importante, elle permet de s'affranchir des phénomènes d'agrégation, les particules chargées se repoussant. De plus, leurs tailles sont très variées s'étendant de quelques dizaines à mille nanomètres.

7.3.2.1. Les nanoparticules lipidiques

7.3.2.1.1. Les liposomes

Les liposomes sont des vésicules formées de bicouches lipidiques concentriques, constituant une zone hydrophobe propre à la vectorisation de molécules hydrophobes et présentant un cœur hydrophile spécifique à la vectorisation de molécules hydrophiles (Mozafari & Johnson 2008) (**Figure 8**). Le plus souvent, ils sont à base de phospholipides et de molécules de cholestérol, et possèdent une taille allant de 30 nm à plusieurs micromètres. Dans le domaine biomédical, ces structures déformables sont des transporteurs de principes actifs thérapeutiques ou d'agents d'imagerie présentant une forte biocompatibilité (Gregoriadis 1976).

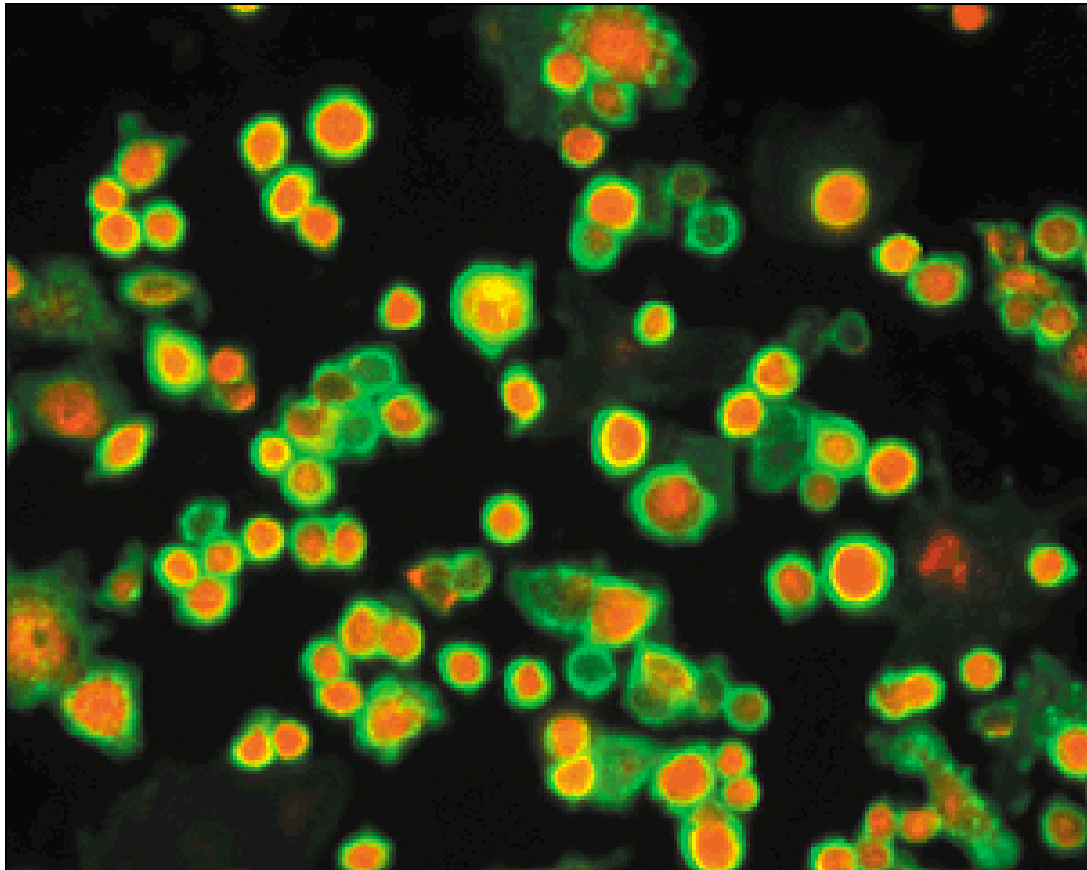


Figure 7 : Récepteurs HER-2 de cellules du cancer du sein, coloration au quantum dots vert (Mitchell 2001).

Le nombre de molécules de cholestérol présentes est étroitement lié à la rigidité de la structure du liposome. Leur caractère non toxique et biocompatible fait de ces colloïdes des systèmes intéressants pour les applications *in-vivo*. Néanmoins, leur utilisation présente quelques limitations incluant une stabilité modérée, une faible capacité d'encapsulation, et une libération précoce des principes actifs (Pinto-Alphandary & Andremonet 2000). Ainsi, une nouvelle génération de liposomes a été développée afin de pallier à ces inconvénients. Ils portent le nom deniosomes, éthosomes et polymersomes. Les niosomes sont préparés à partir d'un mélange de tensioactifs non ioniques et de cholestérol ; parfois une faible quantité de phospholipides est ajoutée (Mukherjee et al., 2007; Ritwiset et al., 2016).

Les éthosomes présentent une plus grande élasticité des vésicules due à la présence de 20 à 45 % d'éthanol. Ce type de particule est généralement anionique et leur membrane lipidique est fluide (Mbah et al., 2014), leur permettant une vectorisation de principes actifs à travers la peau (Ainbinder et al., 2016). Les polymersomes sont composés de copolymères blocs, comportant des zones hydrophiles et hydrophobes, au cœur aqueux (Zhao et al. 2014). Des associations polymersomes/chimiothérapies sont à nos jours testées pour un ciblage spécifique des cancers péritonéaux (Simón-Gracia et al., 2016).

7.3.2.1.2. Les nanoparticules lipidiques solides

Ce type de Nps a été introduit dans les années 90 pour proposer une alternative à l'utilisation de nano-émulsions (Benita et al., 1986; Magenheimer et al., 1993). Les nanoparticules lipidiques solides sont des vecteurs d'intérêt permettant de pallier aux problèmes liés aux autres formes nanoparticulaires, ces inconvénients sont liés aux résidus de solvants organiques restant après la synthèse, aux problèmes de cytotoxicité, de production à grande échelle, ou encore de stabilité dans le temps (Muéller et al., 2000).

Les nanoparticules lipidiques solides sont constituées de lipides solides à températures ambiantes (le plus souvent à base de glycérides, d'acides ou d'esters gras) (Mehnert & Mäder 2001). Elles portent le nom de « Solid Lipid Nanoparticles » (SLNs) (**Figure 9**). Cette matrice lipidique, plus ou moins cristallisée, est stabilisée par une couche de tensioactifs, le plus souvent non ionique. Les principales techniques d'obtention de ces structures sont réalisées en l'absence de solvants organiques. Dans cette catégorie de Nps, sont retrouvées également les nanocapsules lipidiques communément appelés Lipid Nanocapsules (LNCs). À la différence des SLNs, ces dernières possèdent un noyau liquide entouré d'une coque solide (**Figure 9**).

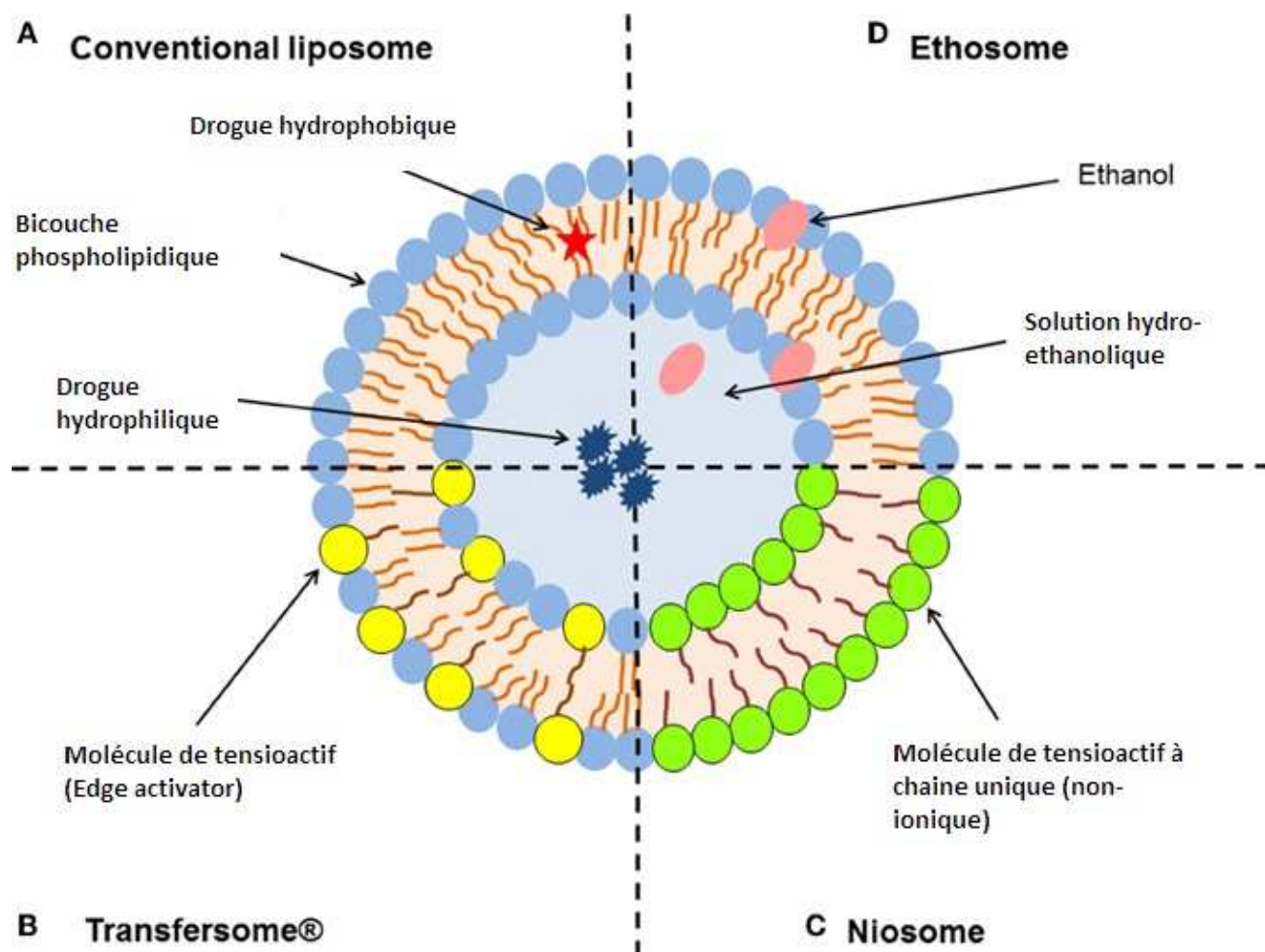


Figure 8 : Représentation schématique de la structure des liposomes (Hua 2015).

De telles structures présentent néanmoins des inconvénients : des phénomènes d'agrégation peuvent être observés dans le temps, les systèmes ont tendance à gélifier spontanément, de manière imprévisible et pour les SLNs des transitions polymorphiques de lipides surviennent parfois (Müller *et al.*, 1995; Muéller *et al.*, 2000).

7.3.2.2. Les nanoparticules polymériques

7.3.2.2.1. Polymères naturels

Les polymères naturels, particulièrement utilisés pour l'élaboration de Nps comme vecteur de vaccination, sont typiquement des polysaccharides : chitosane, alginate de sodium, dextrane et dans une moindre mesure les β -glucanes et les mannanes.

7.3.2.2.1.1. Le chitosane

Le chitosane est un polysaccharide linéaire, non toxique et biodégradable, comprenant des motifs D-glucosamine et N-acétyl-d-glucosamine, liés par des liaisons glycosidiques β -(1-4) (**Figure 10**).

Le chitosane est produit par hydrolyse ou déacétylation des groupes N-acétyl de la chitine. La chitine est retrouvée en grande quantité dans la cuticule des arthropodes : insectes, arachnides, crustacées (crabe, homard, crevette et endosquelette des calamars). La principale source reste les exosquelettes de crevettes. La chitine est alors déminéralisée par traitement à l'acide chlorhydrique, puis déprotéinée en présence de soude ou de potasse, pour être éventuellement décolorée par un agent oxydant tel que le permanganate de potassium. Le chitosane est dégradé *in-vivo* par des enzymes, tels que le lysozyme et la chitosanase, en oligomères puis en résidus N-glucosamine, endogènes au corps humain (Huang *et al.*, 2004). Cependant la biocompatibilité et la biodégradabilité restent dépendantes de plusieurs facteurs, tel que le degré de déacétylation, au-delà de 70% le chitosane est peu dégradé (Huang *et al.*, 2004). L'intérêt de l'utilisation du chitosane est conféré par ses propriétés de muco-adhésion, d'augmentation de la perméabilité des muqueuses au niveau des cellules épithéliales et de diminution de la vitesse de clairance par les cils des muqueuses (Vila *et al.*, 2002; Moschos *et al.*, 2005). Le chitosane peut être associé à de l'ADN ou à des sous-unités de pathogènes pour former soit des complexes soit des particules, qui se révèlent tout aussi efficaces que le LPS pour la maturation des cellules dendritiques, induisant une immunité protectrice des muqueuses (Gamvrellis *et al.*, 2004; Carroll *et al.*, 2016) et favorisant leur capture par les cellules présentatrices d'antigène (Moschos *et al.*, 2005; Bento *et al.*, 2015).

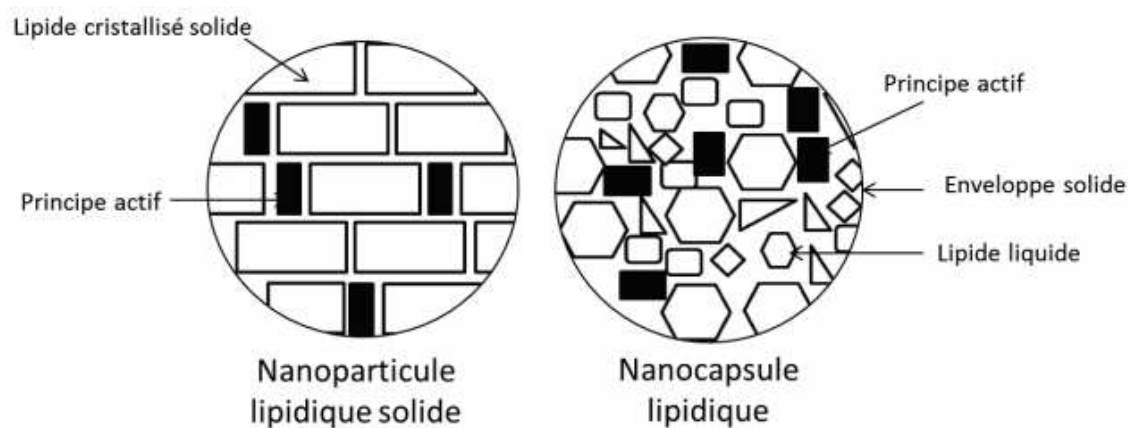


Figure 9 : Représentation schématique de la structure d'une nanoparticule lipidique solide et d'une nanocapsule lipidique (Pardeike et *al.*, 2009).

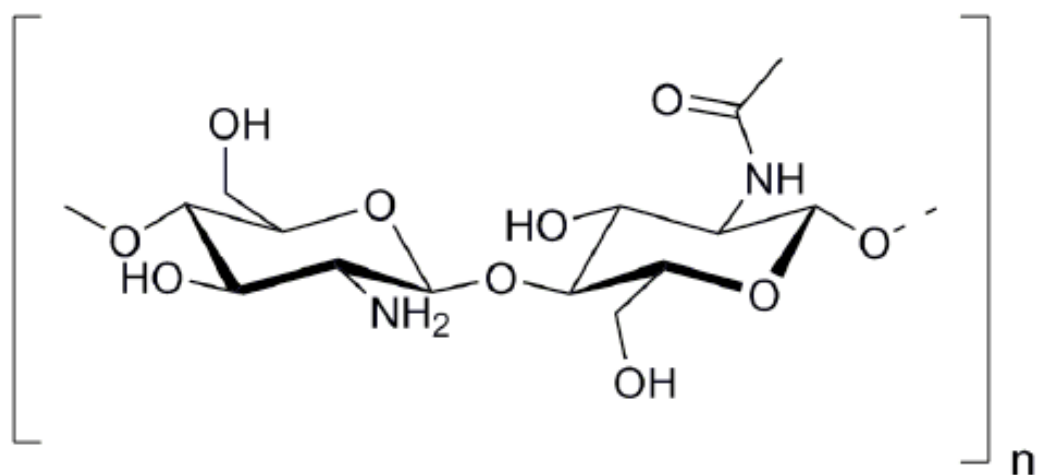


Figure 10 : Structure chimique du chitosane.

Des particules de chitosane, encapsulant une protéine, peuvent être obtenues selon différentes voies : gélification ionique avec le polyanion tripolyphosphate, précipitation ou coacervation (séparation en deux phases de certaines solutions moléculaires à degrés de polymérisation différentes) (Gan & Wang 2007).

7.3.2.1.2. Alginate de sodium

L'alginate de sodium est un polysaccharide de structure linéaire, biopolymère anionique, extrait des algues brunes, il peut être produit par voie bactérienne (Mjahed et al., 2009). Au niveau industriel, il est essentiellement issu de certaines espèces d'algues brunes: *Macrocystis pyrifera* récoltée aux Etats-Unis, *Laminaria digitata*, *Laminaria hyperborea* ou encore *Ascophyllum nodosum* récoltée en Europe (**Figure 11**). L'alginate est le polysaccharide le plus abondant dans ces organismes, constituant plus de 40% de leur poids sec, couramment utilisé dans des applications biologiques notamment dans le domaine de l'encapsulation cellulaire et de la délivrance contrôlée de molécules à effet thérapeutique. Ce succès est dû notamment à son mode de gélification et à sa biocompatibilité largement démontrée (Wang et al., 2003; Safley et al., 2008).

Les alginates sont des sels d'acide alginique, constitués de deux monomères saccharidiques: acide α -L-guluronique (**G**) et acide β -D-mannuronique (**M**) (**Figure 12**). La séquence des différents blocs (**M**) et (**G**) dépend du type d'algue, de son âge ainsi que de la partie dont est isolé l'alginate. La saison de récolte affecte aussi la composition et les séquences (Jørgensen et al., 2007).

Les alginates possèdent en plus les quatre types de liaisons glycosidiques possibles (**Figure 12**) : diéquatorial (**MM**), diaxial (**GG**), équatorial-axial (**MG**) et axial-équatorial (**GM**). La structure des segments polyacide mannuronique est très proche de celle de la cellulose. Les liaisons entre unités M donnent à ces segments une structure aplatie, de type ruban. Cette structure est stabilisée grâce à des liaisons hydrogènes. Par exemple, le groupement hydroxyle en C3 du monomère M+1 interagit avec l'atome d'oxygène du cycle du monomère M.

Les propriétés physiques de l'alginate ont été décrites pour la première fois dans les années 1970. La principale caractéristique de l'alginate est sa capacité à gélifier en présence de cations multivalents. Cette transition sol/gel n'est pas influencée par la température (Vandamme et al., 2002).



Figure 11 : Espèces d'algues brunes composées d'alginate : *Macrocyctis pyrifera* (a) ; *Laminaria hyperborea* (b) et *Laminaria digitata* (c).

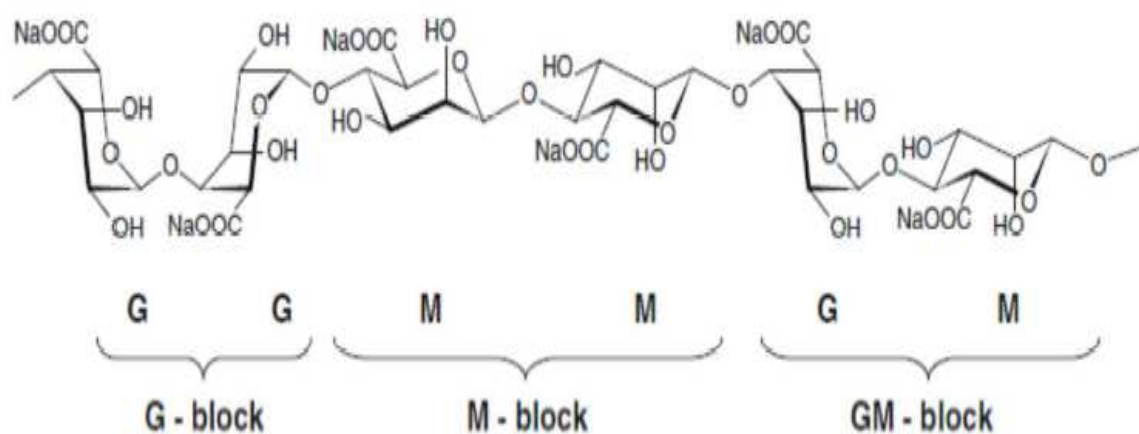


Figure 12 : Structure chimique de la chaîne d'alginate de sodium.

Les sels d'alginate sont solubles dans l'eau et sont capables de gélifier et former des nanoparticules d'alginate en présence de cations multivalents tels que les ions Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{2+} ou encore Al^{3+} grâce à la formation d'une jonction impliquant plusieurs chaînes polysaccharidiques. Cette interaction est décrite par le modèle «Egg-box», dans lequel chaque ion divalent peut interagir avec deux résidus G adjacents ou appartenant à deux chaînes opposées (**Figure 13**) (Grant *et al.*, 1973).

Le sel de cation divalent généralement utilisé pour la gélification des nanoparticules d'alginate est le chlorure de calcium en raison de sa bonne solubilité en milieu aqueux. Il a été montré que 90% des ions sodium contenus dans une solution d'alginate de sodium peuvent être facilement déplacés par les ions calciques (Seely & Hart 1974).

Les ions calcium s'associent préférentiellement aux fragments poly-guluronate plutôt qu'aux fragments poly-mannuronate. En effet, les blocs poly-guluronate, en raison de leur conformation spatiale, permettent une chélation plus énergétique des ions. Ces derniers sont retenus dans un « box » et interagissent avec les fonctions carboxylates et les atomes d'oxygène des fonctions hydroxyles.

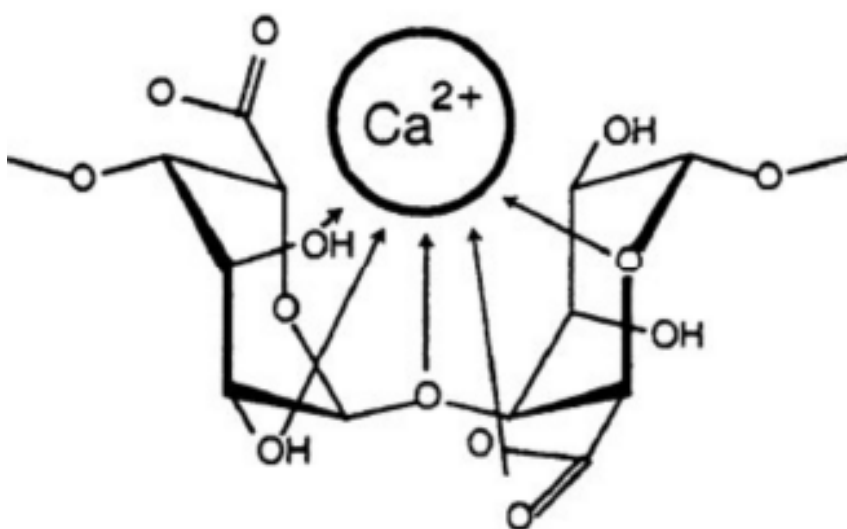


Figure 13 : Liaisons covalentes des ions calcium avec les résidus poly-G des polymères d'alginate (Rajaonarivony & Vauthier 1993).

8. Mécanismes d'action des adjuvants immunologiques

Selon leurs mécanismes d'action, les adjuvants immunologiques ont été divisés en i) systèmes de livraison et ii) adjuvants immunostimulants (O'Hagan & Singh 2003). Les systèmes de livraison d'antigènes agissent en formant un dépôt local au niveau du site d'injection alors que des adjuvants immuno-stimulants agissent directement sur les cellules de l'immunité innée (Pashine *et al.*, 2005) (**Figure 14**). Cette classification n'est plus retenue suite à la découverte que certains systèmes de livraisons tels que les nanoparticules agissent directement sur les cellules de l'immunité innée (Schijns & Lavelle 2011).

Bien que l'utilisation des adjuvants vaccinaux chez l'humain et les animaux soit importante, les mécanismes d'action par lesquels ils potentialisent les réponses immunitaires ne sont pas toujours bien caractérisés. Les adjuvants utiliseraient un ou plusieurs des mécanismes suivants pour induire des réponses immunitaires:

- Un recrutement cellulaire au niveau du site d'injection ;
- Une libération prolongée de l'antigène au niveau du site de l'injection (effet retard) ;
- Une augmentation de l'absorption de l'antigène et la présentation aux CPA ;
- Une activation de l'inflammasome ;
- Une activation et une maturation des CPA (stimulation de l'expression du CMH de classe II et des molécules co-stimulatrices) et une migration vers les ganglions lymphatiques ;
- Une activation des lymphocytes T ou des cellules B (Cox & Coulter 1997; Hoebe *et al.*, 2004).
- Une régulation des cytokines et des chimiokines ;

9. Evaluation de la réactogénicité d'une formulation vaccinale

Plusieurs types d'études doivent être exécutés dans le but d'envisager le développement de vaccins, y compris des essais de toxicité à dose unique, toxicité à doses répétées, tolérance locale et sécurité pharmacologique. Les programmes vaccinaux d'évaluation de la sécurité sont conçus au cas par cas, il n'est donc pas nécessaire d'effectuer tous le test pour une seule formulation vaccinale.

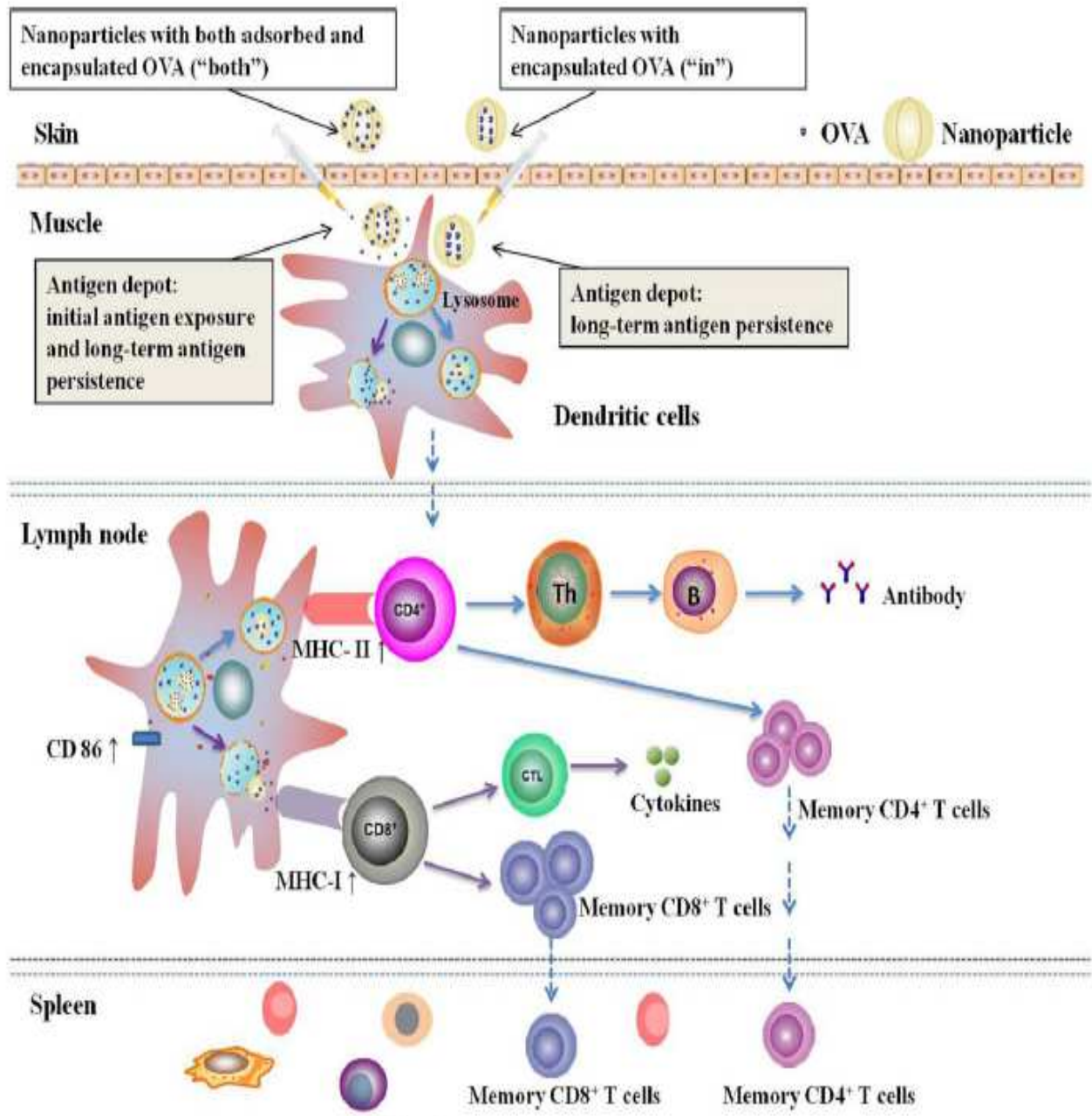


Figure 14 : Schéma représentant la réponse immunitaire induite suite à une vaccination à base de nanoparticules polymériques (Liu et *al.*, 2016).

9.1. Choix du modèle animal pour les études évaluant la réactogénicité d'une formulation vaccinale

Avant d'effectuer les études toxicologiques chez les animaux, les espèces les plus pertinentes doivent être choisies. Pour les vaccins, le choix se fait sur la base de l'immunogénicité du vaccin et sur la sensibilité de l'espèce animale à l'infection par le pathogène. Les programmes d'évaluation de la sécurité des vaccins utilisent généralement une seule espèce : les rongeurs ou les lapins, cependant les primates non-humains pourraient être utilisés comme dernier recours si le vaccin perd son immunogénicité au cours du temps dans les autres espèces (Bodewes & Rimmelzwaan 2010).

L'immunogénicité est évaluée en premier dans une étude exploratoire pour confirmer la pertinence des espèces animales choisies pour l'évaluation de la toxicité définitive (McShane & Williams 2014).

9.2. Evaluation de l'Immunogénicité dans les études préliminaires de la sécurité d'une formulation vaccinale

L'évaluation de la réponse immunitaire et de la toxicité potentiellement engendrée par le vaccin sont des recommandations internationales indiquées dans le guide de l'Organisation Mondiale de la Santé (World Health Organisation 2005). En plus de la confirmation de la présence d'une réponse immunitaire spécifique attendue dans les études de toxicologie, cette évaluation permet de corréler les effets toxiques avec le degré de la réponse immunitaire induite par le vaccin. En fonction du type de vaccin en cours d'étude, des études immunologiques spécifiques sont utilisées. L'étude immunologique classique utilisant des anticorps spécifiques est le test ELISA (Petukhova & Gasanova 2013; Zarrati et al., 2014). Pour les vaccins ciblant l'immunité cellulaire, un screening des cytokines peut être envisagé afin de quantifier les lymphocytes T-spécifiques de l'antigène dans les modèles de toxicité chez l'animal. Par exemple, un test ELISPOT à interféron- γ pourrait être utilisé comme approche efficace et sensible pour évaluer la réponse des lymphocytes T à un ou plusieurs antigènes. Dans un tel essai, des PBMC prélevés sur les animaux ayant reçu la formulation vaccinale sont stimulés *ex-vivo* avec l'antigène peptidique correspondant et le nombre de lymphocytes T sécrétant interféron- γ est évalué (Casimiro et al., 2002; McConkey et al., 2003).

9.3. Les tests toxicologiques

Les tests toxicologiques à une seule dose administrée sont conçus pour évaluer l'inflammation aiguë suite à l'administration du vaccin. Ces études commencent par l'administration d'une dose unique de la formulation vaccinale et le suivi du développement de la réaction immunitaire primaire (~14 jours) en évaluant la mortalité, les signes cliniques, gain/perte du poids corporel et examen macroscopique du site d'injection (Lebron et *al.*, 2005).

Les tests toxicologiques à doses répétées comprennent les études sur la toxicité d'un vaccin *antemortem* et *postmortem*. Les évaluations *antemortem* incluent généralement le suivi de la mortalité, du poids corporel, de la consommation alimentaire, les signes secondaires physiques, analyses hématologiques et biochimiques du sang et l'évaluation de l'immunogénicité de la formulation vaccinale. Les évaluations *postmortem* incluent l'examen macroscopique de tous les organes et tissus importants. L'étude histologique dépend du type de formulation vaccinale, et comprend généralement l'examen des organes qui sont cible de l'antigène introduit. Le site d'injection du nanovaccin doit aussi être examiné (World Health Organisation 2005)

Dans certains cas, des paramètres supplémentaires pourraient être inclus dans les examens toxicologiques. Par exemple, le potentiel systémique de la réponse inflammatoire pourrait être estimé en évaluant le taux de l'interleukine (IL) – 6 sérique, alors que le potentiel pathogène de la réponse auto-immune pourrait être évalué à l'aide d'une analyse immunohistochimie en utilisant des anticorps spécifiques (Fonseca et *al.*, 2009).

10. Toxicité des nanoparticules ou Nanotoxicologie

L'expansion rapide des nanotechnologies a encouragé la communauté scientifique à s'intéresser aux problèmes toxicologiques liés à leur utilisation. Ainsi une nouvelle sous-discipline de la toxicologie a été créée : « la Nanotoxicologie ».

La toxicologie des Nps est réalisée en étudiant la viabilité cellulaire, la réponse inflammatoire, le stress oxydant, ou encore les dommages induits à l'ADN. De manière générale, il a été observé que les Nps présentent certains comportements similaires aux virus notamment au niveau des interactions avec les cellules (Oberdörster et *al.*, 2005).

10.1. Influence de différents paramètres sur la toxicité des nanoparticules

Pour évaluer la toxicité des matériaux plus conventionnels, seules la nature chimique et la concentration massique sont prises en compte. Pour les Nps, ces paramètres ne sont cependant pas suffisants, ils doivent être complétés par la prise en considération d'autres facteurs tels que la taille, la quantité, la structure, la surface spécifique, la réactivité de surface, les capacités d'agrégation, la présence de surfactants, de solvants et enfin la voie d'administration. Trois voies d'entrée sont principalement étudiées aujourd'hui *in-vivo* et surtout *in-vitro* : l'inhalation, l'ingestion et la pénétration transcutanée (Nel et *al.*, 2006; Magrez et *al.*, 2006). Il est difficile d'observer les Nps directement dans les cellules ou dans les tissus au vue de leur taille. Trois méthodes d'observation peuvent être utilisées, il s'agit de la microscopie électronique à balayage, de la microscopie électronique de transmission et de la microscopie de force atomique.

10.1.1. Taille des nanoparticules

La réduction de taille d'une particule à l'échelle nanométrique augmente la surface spécifique, il y a donc plus de molécules chimiques pouvant réagir avec leur environnement et ainsi une augmentation des effets toxiques (Linkov et *al.* 2008; Suh et *al.* 2009). Les Nps pourraient alors être absorbées par les tissus. Après administration, 33 % de Nps de 50 nm, 26 % de Nps de 100 nm, 10 % de Nps de 500 nm ont été retrouvées dans les muqueuses et les tissus lymphatiques de l'estomac. Il a été alors conclu que les Nps de taille inférieure à 100 nm étaient absorbées par les cellules de l'intestin contrairement aux molécules les plus larges et les particules de taille supérieure à 500 nm (Suh et *al.*, 2009). L'absorption des Nps de taille inférieure à 100 nm est augmentée dans les tissus lymphatiques comparée à celle dans les cellules intestinales (Ai et *al.*, 2011). La taille se présente donc comme un facteur clé dans la prédiction du potentiel toxicologique des Nps. Il est important de s'intéresser à la taille mais également au phénomène d'agrégation touchant les Nps. Cette capacité favorise leur pénétration dans l'organisme (Preining 1998; Powers et *al.*, 2006). Un fois dans l'organisme, les Nps peuvent interagir avec des molécules présentes dans les milieux biologiques modifiant leur taille et leurs propriétés de surface (Powers et *al.*, 2006). Sager et collaborateurs ont montré qu'il était difficile de transposer les résultats obtenus *in-vitro* et *in-vivo* ; en effet les caractéristiques des particules sont différentes : en solution les Nps ont tendance à s'agglomérer (Sager et *al.* 2007).

10.1.2. Surface des nanoparticules

Geiser et collaborateurs ont étudié les interactions entre la surface des particules et les cellules recouvrant les poumons. Ainsi en fonction de la nature de leur surface, les particules ne sont pas entièrement absorbées après exposition. Cette expérience montre que la présence d'un film de tensioactifs favoriserait l'absorption, réduisant les tensions de surface (Geiser et *al.*, 2003).

De plus, les groupes réactifs à la surface des Nps pourraient modifier les effets biologiques. La fonctionnalisation des Nps influence donc la cytotoxicité. Les particules de silice recouvertes de quartz présentent une cytotoxicité, une inflammogénicité et une fibrogénicité plus faibles que les particules de silice non modifiées. Ces différences sont dues aux modifications des caractéristiques de surface. En effet, le caractère cytotoxique des Nps de silice au contact des cellules va générer des espèces radicalaires de type ROS entraînant le développement de fibroses et de cancers pulmonaires (Fubini 1997; Schins 2002). Les Nps de fer pourraient également produire ces espèces radicalaires nocives pour les cellules, cet effet est réduit lorsque ces dernières sont recouvertes d'une couche de pullulan, polymère biocompatible (Singh et *al.* 2008; Clift et *al.* 2008; Ai et *al.* 2011). D'autre part, le caractère hydrophile ou hydrophobe des Nps est également estimé pour prédire la toxicité des Nps. L'absorption des Nps produites avec des polymères hydrophobes est plus grande que celle produite avec des polymères hydrophiles (Ai et *al.*, 2011). Plusieurs auteurs présentent la surface spécifique comme l'approche privilégiée mais cette hypothèse reste controversée. Des études ont souligné qu'il n'est pas possible, actuellement, de quantifier spécifiquement le nombre et l'aire de surface d'une particule en particulier. La mesure de la masse en fonction de différentes tranches granulométriques de particules, pour une même espèce chimique, pourrait, selon certains auteurs, représenter une meilleure alternative pour l'évaluation du risque à la santé associée à l'exposition (Oberdörster 1996; Renwick et *al.* 2001; Donaldson et *al.* 2002; Dick et *al.* 2003).

10.1.3. Concentration des nanoparticules

La toxicité et les réponses obtenues dépendent aussi de la concentration de nanoparticules étudiées (Teeguarden et *al.*, 2007). Singh et collaborateurs ont étudié *in-vitro* les effets de deux populations de particules de dioxyde de titane (TiO₂) de tailles comprises entre 40 et 300 nm et entre 20 et 80 nm sur des cellules pulmonaires humaines (A549). Ces chercheurs ont

montré qu'une dose importante de petites particules (20 et 80 nm) serait plus toxique qu'une plus faible dose de grosses particules (40 et 300 nm) (Singh & O'Hagan 1999).

Il n'est pas simple de relier les effets *in-vitro* aux effets mesurés *in-vivo*. En effet, le plus souvent les doses *in-vitro* et *in-vivo* ne sont pas équivalentes. Les Nps présentes dans un même milieu de culture peuvent diffuser ou sédimenter à des vitesses différentes et affecter ainsi les doses cellulaires. A concentration équivalente (cm^2/ml), une nanoparticule d'argent de 15 nm serait 4000 fois plus efficace à induire des effets toxiques qu'une particule d'oxyde de cadmium dont le diamètre est de l'ordre du micron. Cependant, si les quantités respectives de ces Nps ayant effectivement atteint les cellules, la particule d'argent n'est plus que 50 fois plus efficace à induire des effets toxiques que la particule d'oxyde de cadmium. Ainsi, il est important de quantifier les doses réelles de Nps au niveau des cellules cibles afin de valider les tests *in vitro* (Clift et al., 2008). La toxicité des Nps est donc difficile à déterminer et dépend de nombreuses variables. Une évaluation du risque est impossible pour l'instant. Il est donc essentiel de dresser des règles et des standards à l'échelle mondiale (Schrurs & Lison 2012).

11. Cellules jouant un rôle dans l'immunoprotection

Lors de l'administration d'un vaccin, les cellules intervenant dans la réponse immunologique peuvent être classées en deux catégories principales, les cellules présentatrices d'antigènes (cellules dendritiques et les macrophages) et les lymphocytes (B et T) (**Figure 15**).

11.1. Les cellules présentatrices d'antigènes : cible des vaccins à base de nanoparticules

11.1.1. Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (DCs) ont été décrites pour la première fois en 1973 par Ralph Marvin Steinman (Steinman & Cohn 1973). Les DCs définies comme cellules présentatrices d'antigènes (CPA), sont considérées comme les régulateurs des réponses immunes adaptatives (Schraml & Sousa 2015). Par leur localisation stratégique dans les tissus périphériques tels que la peau ou les muqueuses, les DCs sont de véritables sentinelles de l'organisme car elles sont capables d'endocyter rapidement les pathogènes qui ont pénétré l'organisme.

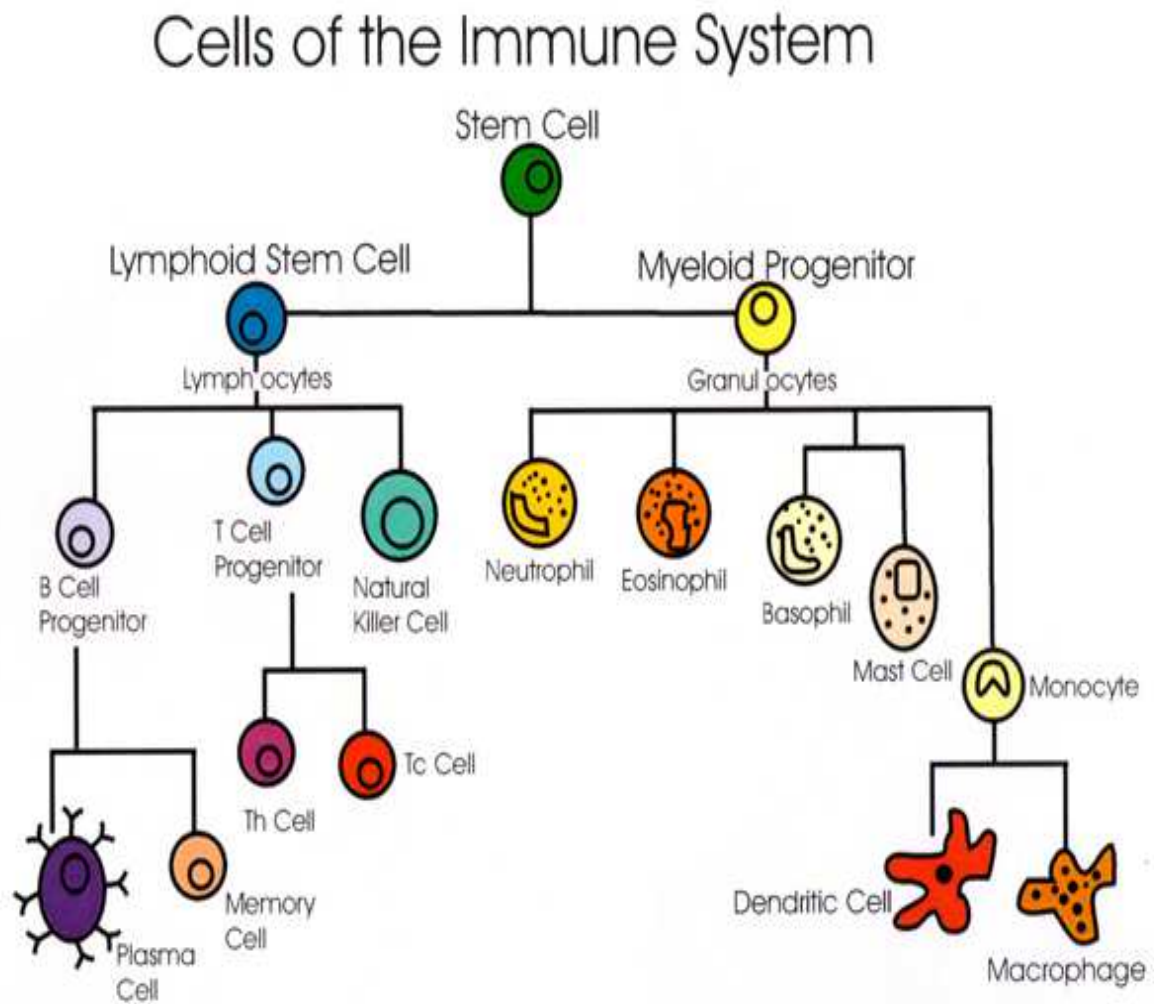


Figure 15 : Origine et différenciation des cellules du système immunitaire (Kenneth 2012).

La capture antigénique est la caractéristique des DCs immatures. Elle se fait au moyen de multiples mécanismes impliquant ou non des récepteurs, et notamment par phagocytose, endocytose ou encore macropinocytose. Après son internalisation, l'antigène est apprêté pour être ensuite associé sous forme de peptides antigéniques sur les molécules du CMH. Suite à la capture et l'apprêtement antigénique, les DCs subissent une maturation phénotypique et fonctionnelle tout en migrant vers les organes lymphoïdes secondaires (OLII) où elles se spécialisent dans la présentation antigénique aux LT et leur activation (Schraml & Sousa 2015).

La maturation des DCs initiée par différents signaux de danger, s'accompagne de changements phénotypiques et fonctionnels. Elle permet la transformation d'une cellule capturant l'antigène en une cellule présentant un peptide antigénique à un LT induisant l'activation de ce dernier (Hackstein & Thomson 2004). La maturation des DCs est intimement liée à leur migration vers OLII (la rate et ganglions lymphatiques). Différents facteurs peuvent induire la maturation des DCs et notamment certaines molécules associées aux pathogènes (LPS, ADN bactérien), des cytokines pro-inflammatoires libérées dans le microenvironnement (TNF- α , IL-1 β) ou encore des cellules nécrotiques (Basu et *al.*, 2000).

La maturation s'accompagne d'une diminution importante de la capacité des DCs à capturer l'antigène mais également d'une augmentation considérable de l'expression membranaire des complexes représentés par le CMH associé au peptide, des molécules de co-stimulation (CD40, CD80, CD86), des molécules d'adhésion telles que LFA-3 et DC-SIGN (DendriticCell-Specific ICAM-Grabbing Non-integrin), et un ensemble de paramètres nécessaires à l'activation des LT (Coquerelle & Moser 2010) (**Figure 16**).

La maturation des DCs s'accompagne également d'une modification dans l'expression de petites molécules chimio-attractantes appelées chimiokines et de leurs récepteurs (McColl 2002). Il y a une perte de l'expression des récepteurs aux chimiokines inflammatoires (CCR1, CCR5) au profit des récepteurs CCR7 et CXCR4. L'expression du récepteur CCR7 à la surface des DCs matures permet la migration de ces dernières vers les OLII (Sozzani 2005). De plus, les DC matures produisent des cytokines proinflammatoires telles que l'IL-12 (DCs myéloïdes) ou l'IL-2. Les changements fonctionnels observés au cours de la maturation s'accompagnent également de changements morphologiques incluant une réorganisation du cytosquelette permettant une plus grande mobilité et favorisant ainsi la migration, mais également la formation de synapses immunologiques.

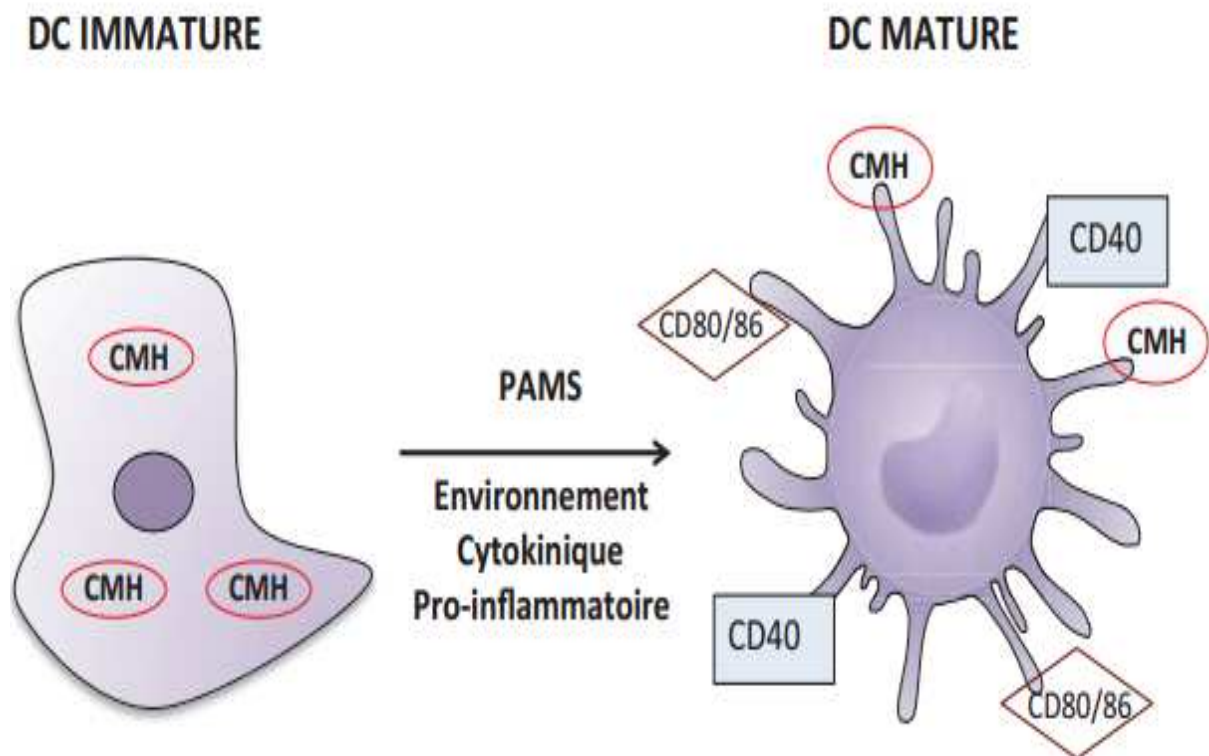


Figure 16 : Maturation des cellules dendritiques. Influence de l'environnement cytokinique et des PAMPS sur la différenciation des cellules dendritiques (Steinman & Nussenzweig 2002).

La migration des DCs vers OLII est un processus concomitant du processus de maturation.

11.1.2. Les macrophages

Les macrophages issus de la lignée monocyttaire jouent le rôle d'effecteur dans les réponses immunitaires innées et de déclencheur dans la réponse immunitaire spécifique.

Ils interviennent à tous les niveaux de la réponse immunologique. Ils dégradent l'antigène en peptides et le présentent aux lymphocytes T, ils participent à la réponse immunitaire grâce à la synthèse de nombreuses cytokines nécessaires à l'initialisation de la réponse immune comme IL-1, ou d'autres cytokines modulant la polarisation de la réponse immunitaire comme l'IL-10, l'IL-12 ou le TGF- β . Les macrophages peuvent aussi acquérir une activité cytolytique ou suppressive sous l'effet des cytokines sécrétés par les lymphocytes T (Koga et al. 1989).

11.1.3. Les lymphocytes

En vaccinothérapie, les lymphocytes sont des cellules jouant un rôle clé dans la spécialisation de la réponse immunitaire.

Il existe deux catégories de lymphocytes : les lymphocytes T (LT) issus de cellules souches originaires de la moelle osseuse mais dont la maturation dépend du thymus et les lymphocytes B (LB) qui se différencient en dehors du thymus, dans la moelle osseuse.

11.1.3.1. Les lymphocytes T

Lors du contact avec l'antigène présenté par le CPA via le TCR qui reconnaît le complexe CMH-peptide antigénique, les lymphocytes T s'activent et subissent une transformation blastique pour donner naissance à des cellules filles responsables des réactions immunologiques cellulaires sous l'effet de l'IL-2.

Au sein des LT matures, il y a deux sous-populations essentielles, différentes par l'expression de deux récepteurs exclusifs, les LT CD4⁺ (LT helper, appelés aussi LT auxiliaires) et les LT CD8⁺ (LT cytotoxiques). Les LT CD4⁺ ont une fonction régulatrice d'**amplification** des réponses immunitaires, par leur capacité à produire d'importantes quantités de diverses cytokines. Les LT CD8⁺ produisent également des cytokines, mais en faible quantité. Ils sont composés en majorité par les lymphocytes T effecteurs ou cytotoxiques.

11.1.3.2. Les lymphocytes B

Les lymphocytes B sont spécialisés dans la production d'anticorps spécifiques et assurent l'immunité humorale qui est à la base des réactions de phagocytose et de la cytolysse des pathogènes en présence du complément.

Les lymphocytes B peuvent être activés directement par des complexes antigènes/nanoparticules (Temchura et *al.*, 2014; Yang & Luo 2016), ou se différencier sous l'influence des lymphocytes CD4⁺ (activation thymo-dépendante) en plasmocytes sécréteurs d'anticorps spécifiques, supports de l'immunité humorale. Ces immunoglobulines sont de différents types: IgM, IgG, IgA, IgD, IgE.

L'activation des LB induit, parallèlement à leur différenciation en plasmocytes, l'apparition de lymphocytes B mémoire (LB mémoires). Ces derniers permettront, après une nouvelle exposition antigénique, l'augmentation rapide et adaptée d'anticorps spécifiques à l'antigène.

11.2. Les réponses B-T dépendantes

L'efficacité des nanovaccins repose fortement sur la capacité de l'organisme à générer une mémoire immunitaire constituée de cellules B et T mémoires spécifiques de l'antigène encapsulé. La génération de cellules B mémoires spécifiques nécessite la maturation d'affinité des cellules ainsi que de commutation isotypique permettant de générer des LB mémoires efficaces. Ces événements immunologiques sont dépendants d'une population spécialisée de LT CD4⁺ auxiliaires appelés les LT CD4 folliculaires ou T_{FH} (Crotty 2011; Moon et *al.*, 2012; Zhang et *al.*, 2014) (**Figure 17**).

11.3. La différenciation des LT CD4⁺

La famille des LT CD4⁺ est très hétérogène. Lors d'une vaccination avec des nanoparticules encapsulant un antigène hexogène, les LT CD4⁺ effecteurs induits par l'interaction spécifique avec les DCs mettent en place une réponse adaptée faisant intervenir un panel de cytokines qui vont permettre l'élimination de cet antigène. Les différentes populations de LT CD4⁺ jusque-là caractérisées peuvent être subdivisées en 2 groupes : effecteurs (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22) et régulateurs (iTreg, Tr1, Th3 et iT35), (**Figure 17**).

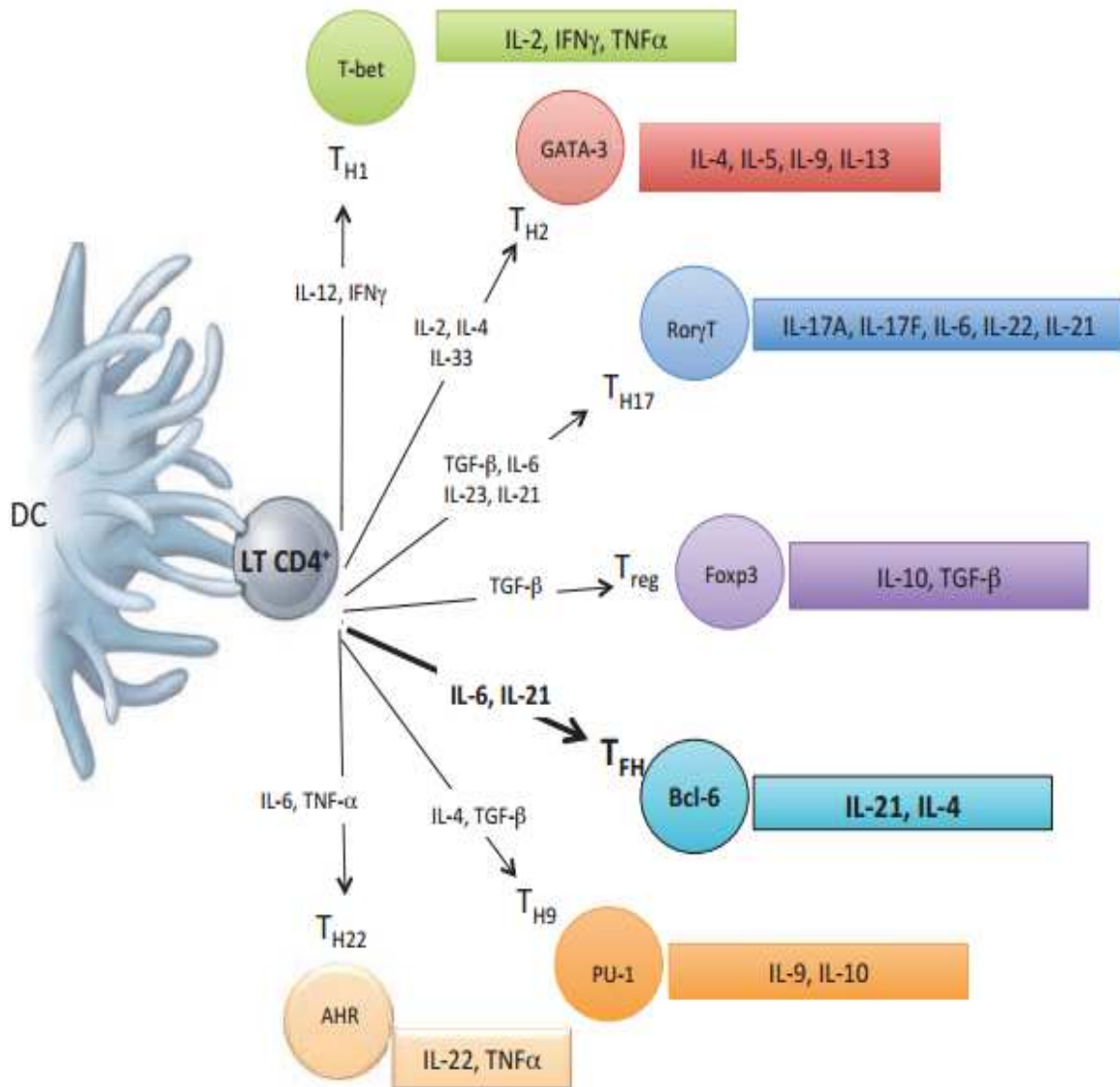


Figure 17 : Principales populations de $LT\ CD4^+$ induites par l'interaction spécifique avec les DCs (Zheng & Flavell 1997; Crotty 2011; Trinchieri et al. 2003).

11.3.1. Les cellules Th1

Les lymphocytes Th1 sont caractérisés par l'expression du facteur de transcription *T-bet* (Tbox transcription factor) et leur capacité à sécréter de fortes quantités d'IFN- γ . Ces cellules effectrices expriment les récepteurs de chimiokines CCR5 et CXCR3 et orchestrent une réponse immune à médiation cellulaire dirigée contre les pathogènes intracellulaires tels que les virus, les bactéries ou les antigènes tumoraux (Mosmann & Coffman 1989; Prete 1992; Paul & Seder 1994).

En effet, l'IFN- γ sécrété par les cellules Th1 va permettre l'activation d'autres cellules de l'immunité innée comme les Natural Killer (NK) et les macrophages qui à leur tour vont produire des médiateurs solubles permettant l'élimination du pathogène. L'IFN- γ a un effet antiviral en activant les LT CD8⁺ cytotoxiques (LTc). L'IFN- γ et l'IL-12 initient la différenciation des Th1 (Trinchieri et al., 2003).

La sécrétion d'IL-12 par les DCs activées va engendrer la production d'IFN- γ par les cellules NK. L'IFN- γ se fixe sur son récepteur à la surface du LT, active *STAT1* et induit l'expression du facteur de transcription *T-bet* qui va à son tour induire la transcription d'IFN- γ et d'IL-12 (Lighvani et al., 2001). *T-bet* agit ensuite aussi en réprimant des gènes associés à d'autres lignées telles que l'IL-4 (Djuretic et al., 2007), *GATA3* (GATA-binding protein) (Hwang et al., 2005).

11.4. Les cellules Th2

Les lymphocytes Th2 sont des cellules effectrices caractérisées par l'expression du facteur de transcription *GATA3* et de la production de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13 essentiellement, ainsi que de faible quantité d'IL-9, d'IL-10 et d'IL-25. Les anticorps sécrétés dans ces conditions sont de type IgG1 qui opsonisent et neutralisent le pathogène infectieux (Zheng & Flavell 1997; Luckheeram et al., 2012).

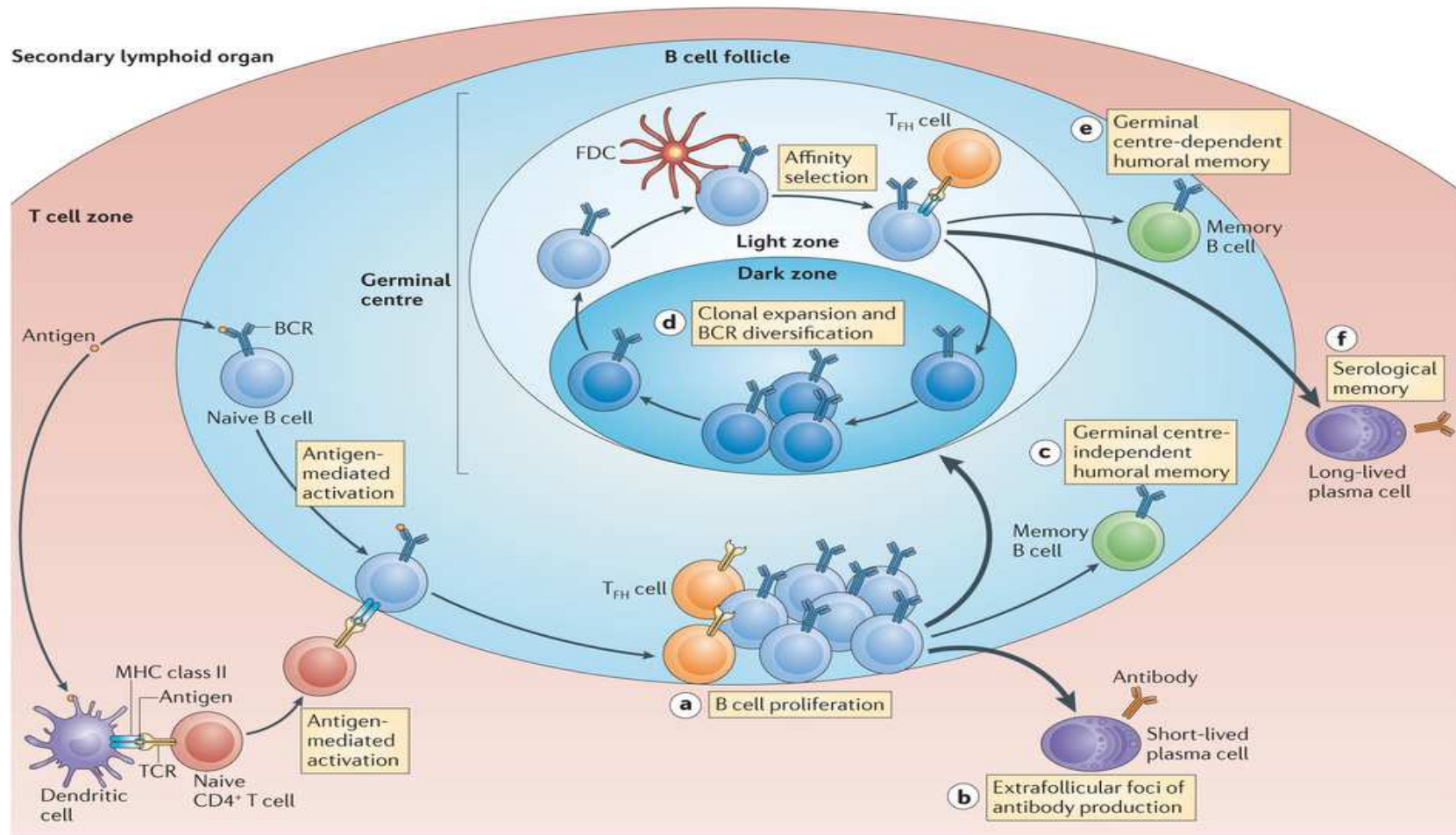
Les cellules Th2 expriment à leur surface le récepteur de la chimiokine CCR4 et la prostaglandine D2 (CD294). L'IL-4 et l'IL-13 sont des cytokines qui permettent la commutation isotypique et la production de l'IgG1 et de l'IgE par les LB. Les IgE sont à leur tour capables de se lier au récepteur Fc ϵ RI à la surface des basophiles et mastocytes ce qui a pour conséquence leur dégranulation et la sécrétion de médiateurs solubles (histamine et sérotonine) (Steinke & Borish 2001).

L'IL-4 et l'IL-2 initient la différenciation en Th2. En effet l'IL-4 va entraîner une cascade de signalisation aboutissant à la phosphorylation de *STAT6*. *STAT6* phosphorylé va à son tour induire la transcription du gène codant pour le facteur de transcription *GATA3* qui va réguler la différenciation en Th2 (Zhu et *al.* 2006). *GATA3* va être responsable de la transcription de l'IL- 5 et de l'IL-13 et renforce aussi celle de l'IL-4. *GATA3* va avoir un rôle répresseur de la différenciation Th1 notamment en réprimant *STAT4* et la transcription consécutive de l'IFN- γ (Usui et *al.*, 2003).

11.5. Les cellules Tfh

Le récepteur aux chimiokines CXCR5 fut décrit en 1996, comme étant le récepteur de la chimiokine CXCL13 responsable de la migration des cellules B au sein des follicules des organes lymphoïdes chez la souris (Förster et *al.*, 1996). Ce n'est qu'en 1999 qu'une population de LT CD4⁺ activés exprimant CXCR5 fut décrite dans les organes lymphoïdes de la souris suite à une immunisation. Le rôle de CXCR5 dans la migration vers les follicules est alors établi (Ansel et *al.*, 1999).

Une étude réalisée dans les années 2000 au niveau des amygdales humaines a permis de mettre en évidence que des LT CD4⁺ CXCR5⁺, contrairement au LT CD4⁺ CXCR5⁻, ont une capacité à induire une production d'anticorps par des LB *in-vitro*. Sur la base de leurs localisations et de leurs fonctions, les LT CD4⁺ CXCR5⁺ portent alors le nom de LT CD4⁺ folliculaires (Breitfeld et *al.*, 2000; Schaerli et *al.*, 2000; Kim et *al.*, 2001). Les Tfh se définissent actuellement comme « la population spécialisée dans l'aide et le soutien des LB » (Crotty 2011) (**Figure 18**).



Nature Reviews | Immunology

Figure 18 : Activation de la réponse immunitaire mémoire via les lymphocytes CD4⁺ Th folliculaires (Kurosaki et al. 2015).

Chapitre II

MATERIEL ET METHODES

Chapitre II : Matériel et méthodes

1. Matériel

1.1. Matériel biologique

1.1.1. Le venin et sa fraction toxique FtoxG50

1.1.1.1. Venin et fraction toxique d'*Androctonus australis hector* sous leur forme native

Le venin natif d'*Aah* (Vn) et sa fraction toxique (Fn) nous ont été fournis par notre équipe de Biochimie-Immunologie du Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire de la Faculté des Sciences Biologiques (LBCM/FSB/USTHB). La dose létale 50 (DL 50) du venin d'*Aah* est estimée à 17 µg pour 20 g de souris (Laraba-Djebari 1998).

1.1.1.2. Venin et fraction toxique d'*Androctonus australis hector* sous leurs formes atténuées

Le venin d'*Androctonus australis hector* et sa fraction toxique détoxifié par irradiation-γ (V* et Fn) nous ont été fournis par notre équipe de Biochimie-Immunologie du Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire de la Faculté des Sciences Biologiques (LBCM/FSB/USTHB). Ces antigènes ont été préalablement irradiés en utilisant une source d'ionisation de Cobalt-60 (2 KGy avec un débit de 765 Gy/h). L'irradiation a été effectuée au Centre National de Recherche Nucléaire à Alger (Abib & Laraba-Djebari 2003). Les solutions antigéniques ont été stockées à une température de -20°C jusqu'à leur utilisation.

1.1.2. Les animaux

1.1.2.1 Les souris et les lapins

Les souris blanches femelles de race NMRI, (18 ± 2 g) proviennent de l'animalerie de la Faculté des Sciences Biologique de l'USTHB. Ces souris ont reçu l'aliment et l'eau de façon contrôlée afin de suivre l'évolution de la prise/perte de poids et de leur état de santé général.

Les lapins de race *Oryctolagus cuniculus* ($2,5 \text{ kg} \pm 0,5 \text{ Kg}$) proviennent de l'animalerie de la Faculté des Sciences Biologiques de l'USTHB. Les lapins ont reçu l'aliment et l'eau potable *ad-libitum*.

Tous les animaux ont été gardés sous des conditions environnementales contrôlées selon le guide du bien-être et de l'utilisation des animaux de laboratoire (Guide for the care and use of laboratory animals, 2011).

1.2. Matériel non biologique

Les réactifs et produits chimiques ainsi que l'appareillage utilisé dans cette thèse ont été fournis par le Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire de la Faculté des Sciences Biologiques (LBCM/FSB/USTHB).

2. Méthodes

2.1. Synthèse des nanoparticules d'alginate de calcium

Afin de déterminer la taille la plus appropriée pour l'encapsulation de l'antigène, des solutions d'alginate de sodium avec différentes concentrations (de 0,03 à 0,4%) ont été obtenues par dissolution dans de l'eau distillée de quantités appropriées de ce polymère, à température ambiante. Des quantités de CaCl_2 ont été dissoutes dans de l'eau distillée pour obtenir deux solutions claires à concentration précise (18 et 36 mM). Après homogénéisation de la solution d'alginate de sodium par agitation mécanique, les solutions de chlorure de calcium ont été ajoutées et laissées sous agitation pendant une heure. Deux solutions de nanoparticules de différentes concentrations ont été obtenues (Daemi & Barikani 2012).

2.2. Préparation de nanoparticules encapsulant l'antigène natif ou détecté

Des nanoparticules encapsulant le venin d'*Aah* natif/irradié (Nps – Vn/Nps – V*) ou sa fraction toxique native/irradiée (Nps – Fn/Nps – F*) ont été préparées selon le protocole de Dounighi et *al.*, 2013. Une solution aqueuse de CaCl_2 a été ajoutée à la solution d'alginate de sodium contenant diverses concentrations d'antigènes natifs ou atténués (Daemi & Barikani 2012).

2.3. Caractérisation physico-chimique des nanoparticules

2.3.1. Caractérisation des nanoparticules par microscopie électronique à transmission (MET)

Les caractéristiques morphologiques des nanoparticules ont été étudiées par microscopie électronique à transmission (MET) (900 LEO ZEISS, Allemagne). Les échantillons ont été

déposés sur des microgrilles en cuivre et soumis à une coloration négative à contraste avec de l'acétate d'uranyle, puis séchés à température ambiante.

2.3.2. Caractérisation des nanoparticules par microscopie électronique à balayage (MEB)

L'analyse au microscope électronique à balayage a été réalisée à l'aide du JEOL JSM-6360 LV (Japon). Les échantillons préalablement lyophilisés ont été soumis à une métallisation de 0,4 nm d'or et de palladium à l'aide d'un pulvérisateur métallique (Cressington Sputter Coater).

2.3.3. Caractérisation des nanoparticules par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR/ATR)

La Spectroscopie Infrarouge à transformée de Fourier (Fourier Transformed InfraRed spectroscopy) est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par l'échantillon analysé. Elle permet via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques, d'effectuer l'analyse des fonctions chimiques présentes dans l'échantillon.

Afin d'analyser les interactions entre les polymères et le CaCl_2 dans les nanoparticules formées, l'échantillon lyophilisé a été analysé par FTIR/ATR (Perkin Elmer U.ATR Spectrum 2). Tous les spectres ont été enregistrés dans un intervalle de longueurs d'onde de 4000-400 cm^{-1} .

2.3.4. Caractérisation de la taille des nanoparticules par granulométrie

La taille des nanoparticules a été mesurée à l'aide d'un Zetasizer nanoseries 383 (Malvern Instruments, Royaume-Uni) en se basant sur la technique de diffusion dynamique de lumière (DLS). Un volume de l'échantillon de nanoparticules dilué a été ajouté dans l'analyseur et les résultats ont été enregistrés quelques minutes plus tard.

2.3.5. Caractérisation des nanoparticules par analyse thermogravimétrique (TGA)

L'analyse thermogravimétrique (TGA) est une technique d'analyse thermique qui consiste en la mesure de la variation de masse d'un échantillon en fonction de la température. Cette technique permet de déterminer la stabilité thermique des nanoparticules d'alginate de calcium. 5 à 10 mg d'échantillon lyophilisé sont mis dans un récipient inerte, réfractaire et analysés par un TA instrument Q50, New Castle, DE.

2.3.6. Efficacité d'encapsulation et capacité de chargement des nanoparticules

La quantité d'antigènes se trouvant à l'intérieur des nanoparticules d'alginate de calcium a été estimée selon la méthode de Bradford à 595 nm en calculant la différence entre la quantité totale de venin irradié et encapsulé et la quantité de venin irradié libre retrouvée dans le surnageant après centrifugation à 12000 g pendant 30 minutes (Bradford 1976). L'efficacité d'encapsulation [EE] et la capacité de chargement [CC] des nanoparticules ont été calculées d'après les équations suivantes :

$$\% EE = [(A-B)/A] \times 100$$

$$\% CC = [(A-B)/C] \times 100$$

A : quantité totale d'antigène irradié dans la solution ; B : quantité totale d'antigène irradié dans le surnageant après centrifugation ; C : poids des nanoparticules pesé après lyophilisation.

2.4. Evaluation de l'immunogénicité des nanoformulations vaccinales

2.4.1. Calendrier vaccinal

Le venin d'*Androctonus australis hector* et sa fraction toxique ont été utilisés comme antigènes sous différentes formes (native ou irradié) dans un protocole d'immunisation.

2.4.1.1. Immunisation des Lapins (calendrier à moyen terme)

Des lapins ont été immunisés avec les nanoparticules d'alginate de calcium encapsulant les antigènes natifs ou irradiés (venin ou fraction toxique FtoxG50), selon un protocole de trois injections, une par mois. Deux lots d'animaux (cinq par lot) ont reçu une fois par mois une injection sous-cutanée de 500 µg de nanoformulations irradiées (Nps – V* ou Nps – F*) et deux autres lots ont été immunisés mensuellement avec 100 µg de nanoformulations natives (Nps – Vn ou Nps – Fn). Deux autres lots de lapins ont été utilisés comme témoins et ont reçu soit 1 ml de solution saline (NaCl) soit les nanoparticules vides (Nps). Un dernier lot d'animaux a reçu des doses sublétales (1500 µg par injection) de venin d'*Aah* (FV). Des prélèvements sanguins ont été réalisés six heures après chaque injection dans le but de

procéder à un dénombrement cellulaire, à une analyse de certains paramètres biochimiques et à une évaluation des titres en anticorps spécifiques IgG anti-venin d'*Aah*.

2.4.1.2. Immunisation des souris (calendrier à court terme)

Les souris ont été immunisées avec des nanoparticules d'alginate de calcium seules ou encapsulant du venin natif ou irradié, suivant un protocole de trois injections, une par semaine (**Figure 20**). Trois lots de 15 souris chacun ont reçu hebdomadairement une injection sous cutanée. Le premier lot servant de témoin a reçu une injection de nanoparticules d'alginate de calcium seule (Nps), le second et le troisième lot ont reçu successivement 200 ou 10 µl de venin irradié ou natif encapsulés dans les nanoparticules d'alginate de calcium. Certains paramètres biologiques tels que la consommation en aliment et en eau et la prise/perte de poids ont été suivis tout au long du protocole d'immunisation. La balance en IgG1/IgG2a a été évaluée par ELISA pour le lot ayant reçu les Nps – V*.

2.4.2. Dénombrement des lymphocytes

Le nombre de lymphocytes dans les échantillons sanguins a été calculé à l'aide de l'analyseur Beckman/Coulter Lh.

2.4.3 Détermination du titre en anticorps IgG totaux des immun-sérum des souris

Une microplaque de 96 puits est sensibilisée avec 5 µg/ml de venin dissout dans un tampon carbonate-bicarbonate 0,1 M à pH 9,5 à raison de 100 µl/puits.

L'adsorption passive de l'antigène sur la phase solide se fait à 4°C pendant une nuit, la microplaque est ensuite soumise à une série de lavages avec un tampon PBS Tween-20 (0,1M à pH 7,4) afin d'éliminer les antigènes non fixées. Les sites non spécifiques sont ensuite saturés par le tampon PBS-lait écrémé à 37°C. Une autre série de lavages est réalisée dans le but d'éliminer l'excès d'anticorps non fixés. Le conjugué anti-IgG de souris couplé à la peroxydase (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) est déposé à raison de 100 µl dans chaque puits et après une série de lavages, la réaction est révélée en présence du substrat de la peroxydase à raison de 100 µl par puits. Après une dernière incubation de 15 minutes, la lecture de l'absorbance est effectuée à une longueur d'onde de 490 nm après arrêt de la réaction avec une solution de H₂SO₄ 2N. Le titre de l'immun-sérum correspond à la dernière dilution présentant une réaction enzymatique positive.

2.4.3. Evaluation de l'immunoprotection

Trois mois après l'administration de la dernière injection vaccinale, tous les lapins ont reçu par voie sous-cutanée des injections de doses croissantes de venin natif. Le taux de survie des animaux a été déterminé 24 h après l'injection et des échantillons sanguins ont été prélevés. La dose létale utilisée est de 850 µg/kg de poids corporel.

2.4.4. Evaluation des titres en IgG1 et IgG2a murins

Les souris ayant reçu trois injections hebdomadaires par voie sous-cutanée de V* encapsulé (100 µg) ont été utilisées pour l'évaluation de la balance IgG1/IgG2a. Les échantillons sanguins ont été prélevés, centrifugés et stockés à -20°C. La balance en IgG1/IgG2a a été évaluée par ELISA dans le but de rechercher le type de réaction immunitaire mise en jeu.

2.4.5. Quantification des cytokines pro- et anti-inflammatoires

La quantification des cytokines pro- (IL-5, IL-6, TNF-α, IL-17a) et anti-inflammatoires (IL-4 et IL-10) est réalisée avec des Kit ELISA sur les sérums prélevés des souris selon le protocole du fournisseur. Les Kits ont été fournis par Invitrogen, Grand Island, New York, USA et par Sigma Aldrich, Allemagne

2.4.6. Etude histologique des organes après envenimation

Les lapins ayant survécu après envenimation ont été sacrifiés, leurs organes (cœur, poumon et foie) ont été prélevés et fixés dans du formol à 10% durant 48 heures, ils ont été ensuite inclus dans la paraffine. Les blocs d'organes obtenus ont été coupés à l'aide d'un microtome pour avoir des coupes de 3 µm d'épaisseur. Ces coupes ont été colorées à l'hématoxyline-éosine et observées en utilisant un microscope optique (Motic Digital Microscope PAL System).

2.5. Evaluation de la réactogénicité et des éventuels effets secondaires des nanoformulations vaccinales

2.5.1. Evaluation de l'innocuité de la préparation antigénique

L'évaluation de l'innocuité des préparations antigéniques est primordiale dans le développement d'un vaccin, pour cela un suivi journalier de l'état des animaux immunisés a été réalisé.

2.5.2. Evaluation de l'inflammation au niveau systémique

2.5.2.1. Dénombrement des neutrophiles

Le nombre de neutrophiles dans les échantillons sanguins a été calculé à l'aide de l'analyseur Beckman/Coulter LH.

2.5.2.2. Evaluation de la réponse inflammatoire du protocole d'immunisation

La réponse inflammatoire induite pendant le protocole d'immunisation a été évaluée par la détermination de l'activité de la myelopéroxydase et de la peroxydase éosinophile.

2.5.2.2.1. Evaluation de l'activité de la myelopéroxydase (MPO)

L'activité de la myelopéroxydase est quantifiée par une technique colorimétrique basée sur la mesure de l'intensité de la couleur du produit d'oxydation de l'O-dianisidine, obtenue sous l'activation de la myelopéroxydase en présence du substrat peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

L'évaluation de l'activité sérique de la MPO est effectuée en faisant agir l'échantillon sérique (dilué au 1/100^{ème}) avec le milieu réactionnel spécifique contenant le substrat de l'enzyme, la lecture de la densité optique (DO) est réalisée à 460 nm à t_0 et t_{5min} (Teixeira et *al.*, 2003).

2.5.2.2.2. Evaluation de l'activité de la peroxydase éosinophile (EPO)

Les échantillons sériques sont déposés à raison de 100 μ l/puits, suivis par l'addition de 100 μ l de solution du substrat chromogène. La microplaque est ensuite incubée pendant une heure à 37°C à l'abri de la lumière. L'activité enzymatique est évaluée après la lecture de l'absorbance à l'aide d'un lecteur ELISA à 490 nm.

2.5.2.3. Evaluation de l'atteinte hépatique

2.5.2.3.1. Evaluation de l'activité de l'alanine aminotransférase

L'alanine aminotransférase (ALAT), appelée aussi glutamique pyruvique transaminase (GTP), est une enzyme hépatique spécifique. L'évaluation de son activité est souvent utilisée dans le diagnostic, le suivi et le traitement des atteintes hépatiques.

L'alanine aminotransférase catalyse la transamination réversible de la l-alanine et de l' α -oxoglutarate en pyruvate et L-glutamate. Le pyruvate est ensuite réduit en lactate en présence de lactate déshydrogénase (LDH) simultanément à l'oxydation du NADH en NAD^+ .

L'activité de l'ALAT dans un échantillon plasmatique est proportionnelle à la variation de la cinétique de son absorbance à 340 nm.

2.5.2.3.2. Evaluation de l'activité de l'Aspartate aminotransférase

L'aspartate aminotransférase (ASAT) autrefois appelée transaminase glutamique oxaloacétique (GOT) est présente dans le cytoplasme et les mitochondries des cellules, appartenant à la famille de transaminase. L'ASAT est communément trouvée dans divers tissus humain, le muscle cardiaque est celui qui présente l'activité la plus importante. Physiologiquement, l'activité de l'ASAT dans le cerveau, le foie, la muqueuse gastrique, le muscle squelettique et les reins est faible, cependant lorsque ces tissus sont altérés, cette enzyme est libérée dans le sang et son activité sérique s'élève (Huang et *al.*, 2006).

L'ASAT catalyse la transamination réversible de la L-aspartate et α -oxoglutarate en oxaloacétate qui est ensuite réduit en malate en présence de malate déshydrogénase avec l'oxydation du NADH en NAD^+ , la diminution du NADH est directement proportionnelle à la vitesse de formation d'oxaloacétate et de l'activité d'ASAT, L'absorbance est lue à 340 nm (Keiding et *al.*, 1974; Montemartini et *al.*, 1993).

2.5.2.3.3. Phosphatase alcaline (PAL)

Les phosphatases alcalines (PAL) sont présentes dans de nombreux tissus dont les os, le foie, les intestins et le placenta. La détermination de l'activité de la PAL dans le sérum présente un intérêt particulier pour le diagnostic des maladies hépatobiliaires et osseuses (Gundberg et *al.*, 2002; Fernandez & Kidney 2007).

En milieu alcalin les phosphatases alcalines catalysent l'hydrolyse du p-nitrophénylphosphate en p-nitrophénol et en phosphate. La vitesse d'apparition du nitrophénol, suivie par la variation de l'absorbance à 405 nm, est proportionnelle à l'activité PAL dans l'échantillon

2.6. Evaluation de l'innocuité des préparations antigéniques au niveau du site d'injection

Cinq nanoformulations contenant des Nps seules, Nps – Vn (100 μg), Nps – V* (250 et 500 μg) ou venin irradié seul, ont été injectées par voie sous cutanée à des lapins à raison de 1 ml par injection, le premier et le quinzième jour selon un protocole vaccinale de 20 jours.

L'observation de l'état général des lapins, l'apparition d'œdème/érythème et l'histologie du site d'injection ont été effectuées (**Figure 21**).

2.6.1. Test dermique de Draize

L'étude de la réactogénicité locale appelé « test de Draize » a été évaluée sur des lapins au niveau du site d'injection pendant 5 jours à compter du jour de l'injection. Le test effectué est basé sur le classement de l'apparition d'œdèmes et d'érythèmes à l'aide d'un score allant de 0, pour l'absence de symptômes, à 4 pour les symptômes les plus graves (**Tableau II**). Les lapins ont été sacrifiés après la dernière observation et la peau a été soigneusement prélevée afin d'entreprendre une analyse histologique (Price et *al.*, 2013; Baldrick 2016).

2.6.2. Réalisation de coupes histologiques au niveau du site d'injection

La réalisation de coupes histologiques a été entreprise dans le but de mettre en évidence la réaction inflammatoire locale. La peau a été prélevée, fixée dans du formol à 10% durant 48 heures et inclus dans la paraffine. Les coupes ont été ensuite colorées à l'hémaroxyline-éosine et observées au microscope optique (Motic Digital Microscope PAL System).

2.7 Etude statistique

L'étude statistique a été effectuée en utilisant le test *t* de Student. Les résultats ont été exprimés en moyenne $\pm$ erreur standard (SEM, $n=3$). Les valeurs de $P < 0,05$ ont été considérées comme étant statistiquement significatives.

Tableau II : Score du test Dermal Draize Observation (Price et *al.*, 2013)

Score	Grade	Œdèmes	Erythèmes
0	Aucun	Pas de gonflement	Couleur normale
1	Minime	Leger gonflement : bordures indéfinies	Rose clair
2	Léger	Enflure avec bordures distincte	Rose vif, rouge pale
3	Modéré	Gonflement avec des bords enflés < 1mm	Rouge vif distinct
4	Sévère	Gonflement avec des bords enflés $\geq$ 1mm	Rouge sombre prononcé

Chapitre III

RESULTATS ET DISCUSSION

PREMIERE PARTIE

Caractérisation des nanoparticules d'alginate de
calcium vides ou encapsulant l'antigène :

Propriétés physico-chimiques

Chapitre III : Résultats et discussion

1. Caractérisation

L'obtention de systèmes nanométriques de délivrance ciblée des antigènes scorpioniques possédant des propriétés adjuvantes, nécessite obligatoirement des particules de taille contrôlée et bien séparées les unes des autres en solution. Nous avons donc été amenés dans un premier temps à caractériser la taille, la charge de surface, la thermogravimétrie, la capacité d'encapsulation et l'état d'agrégation des nanoparticules d'alginate de calcium vides et de celles encapsulant le venin irradié (Nps – V*). Pour ce faire, nous avons utilisé des méthodes de spectroscopie telles que la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR), de granulométrie telle que la diffusion dynamique de la lumière (DLS), de calorimétrie telle que l'analyse thermogravimétrique (TGA/TGD), de microscopie électronique à transmission (MET) et à balayage (MEB).

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier ou FTIR permet de donner des indications très précises sur le changement de l'alginate de sodium (Alg) de la conformation linéaire vers une conformation plutôt sphérique suite à l'ajout d'ions bivalents Ca^{2+} , et cela en étudiant l'apparition et disparition du spectre d'absorption infrarouge de certaines liaisons chimiques caractéristiques des différentes conformations du polysaccharide.

La diffusion dynamique de la lumière ou DLS permet de donner des mesures précises de la taille, de l'indice de polydispersité et du potentiel- ζ des nanoparticules d'alginate de calcium.

L'analyse thermogravimétrique ou TGA renseigne sur la stabilité thermique des nanoparticules et les techniques de microscopie électroniques (MET et MEB) indiquent la forme et l'état d'agrégation des nanoparticules en solution.

Pour aboutir à cette caractérisation, une étape de synthèse des nanoparticules d'alginate de calcium ayant une taille adéquate a été entreprise.

1.1. Synthèse et caractérisation des nanoparticules d'alginate de calcium

Dans cette étude, différentes concentrations d'alginate de sodium (0,1 ; 0,2 ; 0,3 et 0,4 %) ont été utilisées avec une seule concentration de chlorure de calcium (0,1 %) afin de synthétiser des nanoparticules (**Tableau III**). Le temps et la vitesse de l'homogénéisation ont été pris en considération. Des agrégats sous forme de microgel ayant un large diamètre ont été formés avec une concentration d'alginate de sodium de 0,1 ; 0,2 et 0,4 % en masse volumique.

Tableau III : Synthèse des différentes formulations de nanoparticules vides et des formulations contenant le venin irradié (500 µg) : Effet du changement des paramètres physico-chimiques.

Formulation	X1	X2	X3	X4	Apparence	Taille (nm)
F1	0,1	0,1	60	1500	microgel gel	> 1000
F2	0,2	0,1	60	1500	microgel gel	> 1000
F3	0,4	0,1	60	1500	Gel solide	> 1000
F4	0,3	0,1	30	1500	microgel gel	> 1000
F5	0,3	0,1	60	500	microgel gel	> 1000
F6	0,3	0,1	60	1500	nanoparticules	185
F6 – V*	0,3	0,1	60	1500	nanovaccin	362

X1: concentration Na-Alg (% w/v), X2: concentration CaCl ₂ (% w/v), X3: temps d'homogénéisation (min), X4: débit d'homogénéisation (rpm).
--

1.2. Détermination de la taille des nanoparticules par granulométrie (DLS)

La distribution des tailles des particules peut renseigner sur la distribution *in-vivo*, le devenir biologique, la toxicité et la capacité de ciblage d'un système de nanoparticule. Plus la taille des particules est petite, plus grande est la surface spécifique pour l'absorption du médicament (Mohanraj & Chen 2007; Redhead et al., 2001).

Les résultats de l'analyse au DLS des nanoparticules vides et encapsulant le venin irradié montrent respectivement des tailles de 185 et 362 nm ayant un même potentiel- ζ (-29 mV) et un même indice de polydispersité (PDI) de 0,240 (**Figures 19a et b**). Ces données sont en accord avec des études antérieures sur la synthèse des nanoparticules d'alginate de calcium ayant des caractéristiques similaires (Moradhaseli et al., 2013; Daemi & Barikani 2012). La différence de taille entre ces deux nanoformulations peut s'expliquer par l'encapsulation de l'antigène à l'intérieur des nanoparticules, conduisant au gonflement de ces dernières (Kumari et al., 2010; Behnke et al., 2011).

L'indice de polydispersité est un indice qui renseigne sur l'état de dispersion des nanoparticules et sur la possibilité de formation d'agrégats. Des $PDI \leq 0,3$ confirment l'absence d'agrégat (Ahmad et al., 2007; Motwani et al., 2008). Les nanoparticules obtenues dans cette étude présentent des caractéristiques de taille, charge et d'indice de polydispersité idéales pour une délivrance efficace de l'antigène.

1.3. Analyse thermogravimétrique (ATG)

L'analyse thermogravimétrique (ATG), en anglais « thermogravimetric analysis (TGA) », est une technique d'analyse thermique qui consiste en la mesure de la variation de masse d'un échantillon en fonction du temps, pour une température ou un profil de température donné. L'ATG est souvent employée dans la recherche et les essais pour déterminer les caractéristiques de matériaux tels que les polymères, pour estimer la cinétique d'oxydation en corrosion à haute température, pour déterminer les températures de dégradation, l'humidité absorbée par le matériau, la quantité en composés organiques et inorganiques d'un matériau, le point de décomposition d'un explosif et des résidus de solvants (Laux et al., 2000; Haddadine et al., 2014; Griffete et al., 2015).

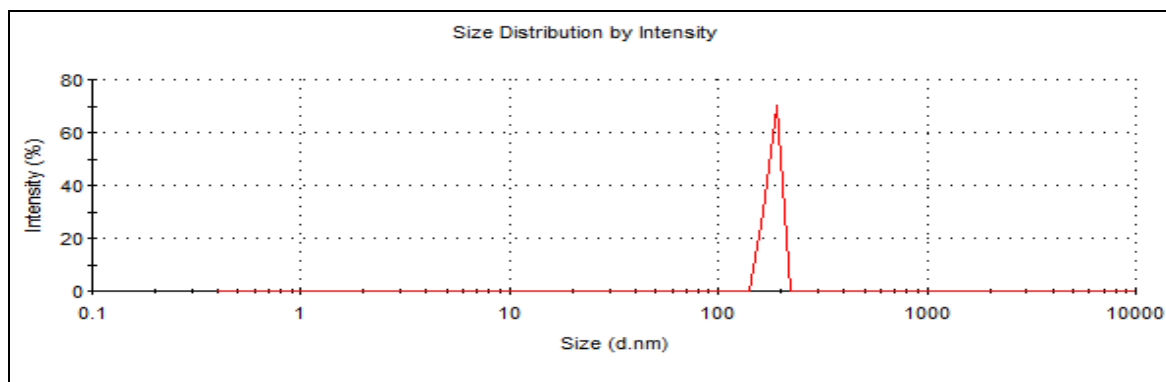


Figure 19a : Distribution granulométrique de la taille des nanoparticules d'alginate de calcium vides (Nps vides) selon l'intensité du signal. Taille moyenne : 185 nm.

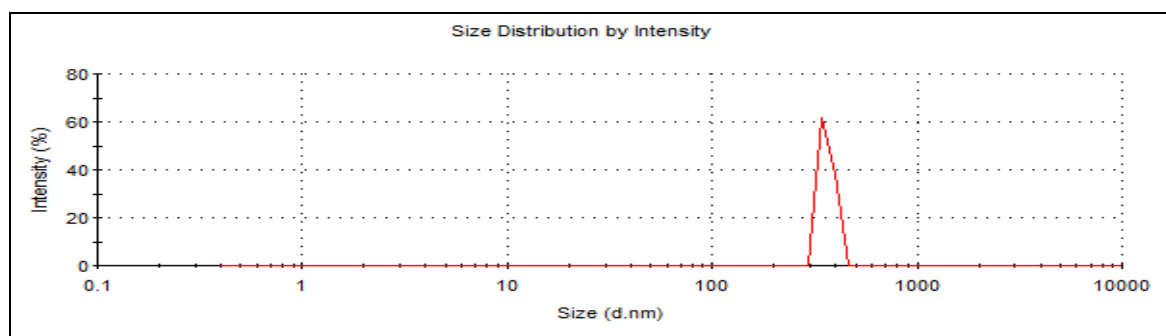


Figure 19b : Distribution granulométrique de la taille des nanoparticules encapsulant le venin irradié (Nps – V*) selon l'intensité du signal. Taille moyenne : 362 nm.

Les thermogrammes obtenus lors de l'analyse thermogravimétrique de l'Alginate de sodium (Na-Alg) et des nanoparticules d'alginate de Calcium (Ca-Alg) sont présentés ci-dessus (**Figure 20**).

D'après les courbes représentant la perte de masse relative en fonction de la température (ATG) et les courbes représentant la dérivée de cette perte de masse (TGD), nous pouvons remarquer ce qui suit :

- 1- Il apparaît un processus de perte similaire de poids pour les deux composés. L'allure des courbes nous permet de déduire que la dégradation se fait en deux étapes. La première étape se situe entre 30 et 90°C correspondant à l'évaporation de l'eau alors que la deuxième étape se situe entre 200 et 300°C correspondant à la dégradation des polymères Na-Alg ou des nanoparticules Ca-Alg.
- 2- Les nanoparticules d'alginate de calcium présentent une **stabilité thermique** plus importante que les polymères d'alginate de sodium, la température maximale de dégradation de l'alginate pur est de 250°C, celle des nanoparticules d'alginate de sodium est de 290°C.
- 3- Une perte de masse plus importante est observée pour l'alginate pur (-58% de masse) comparée à celle des nanoparticules d'alginate de calcium (-33%), qui sont plus résistantes à l'augmentation de la température.

1.4. Détermination des liaisons chimiques par Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR/ATR)

L'étude des liaisons chimiques rentrant en jeu dans la formation des nanoparticules d'alginate suite à l'ajout de l'ion calcium bivalent, nécessite une caractérisation par FTIR afin de comparer l'échantillon brut d'alginate de sodium (Alg) avec l'échantillon de nanoparticules d'alginate de calcium vides (Nps). Les spectres de la réflexion totale atténuée (ATR) respectifs ont été enregistrés et comparés. Le spectre de l'alginate de sodium présente des bandes d'absorption importantes en ce qui concerne les groupes hydroxyle, éther et les groupements fonctionnels carboxyliques. Des vibrations d'étirement (stretching) des liaisons O-H de l'alginate apparaissent dans l'intervalle d'absorbance 3000-3600 cm^{-1} . Les bandes observées à 1700 et 1400 cm^{-1} sont attribuées respectivement aux vibrations asymétriques et symétriques d'étirement des ions carboxylate.

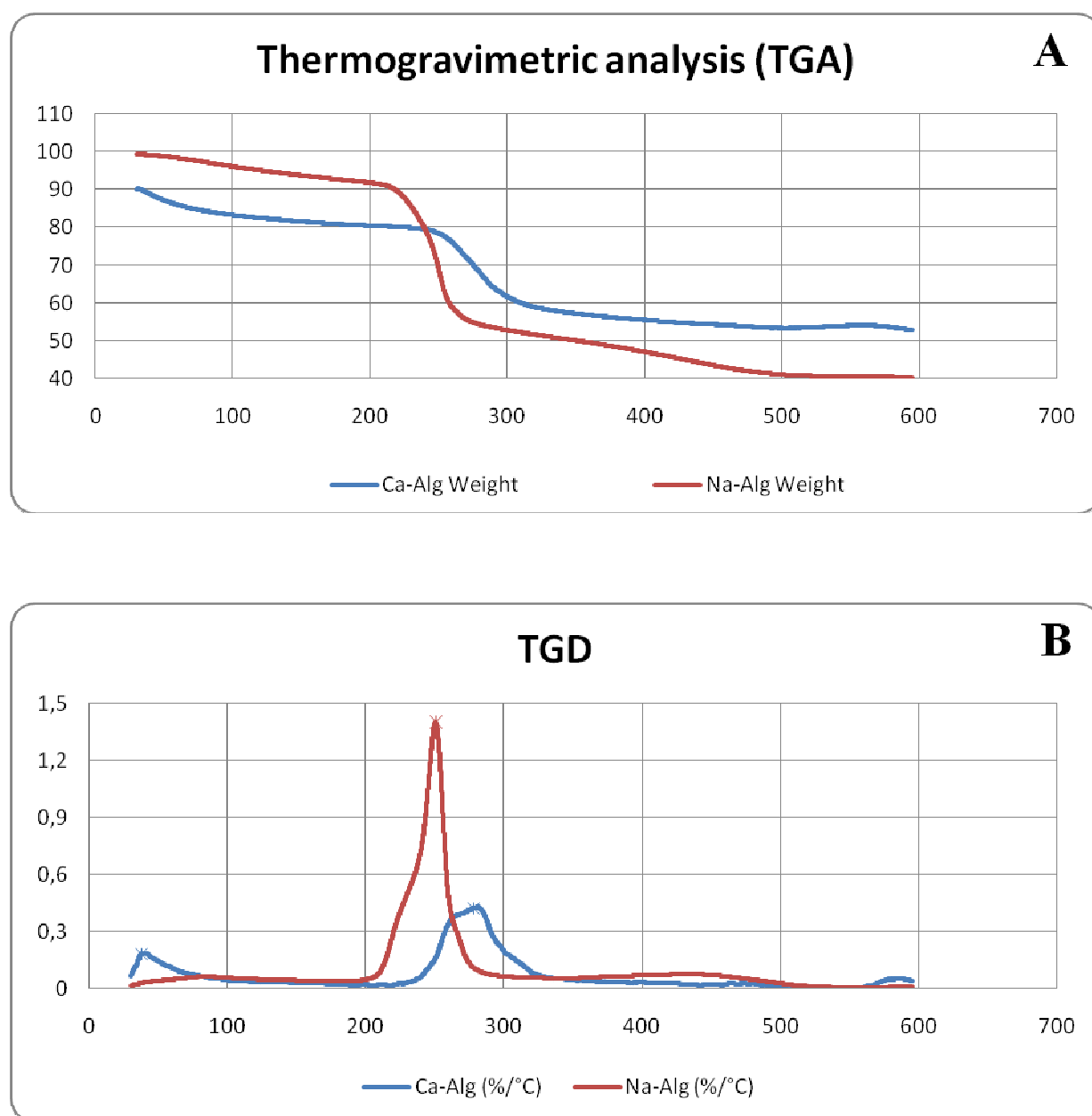


Figure 20 : Analyse thermogravimétrique de l’alginate de sodium (Na-Alg) et des nanoparticules d’alginate de calcium (Ca-Alg). A : TGA ; B : TGD.

Les pics suivants sont très importants et peuvent être utilisés pour la caractérisation de la structure de l'alginate (finger-print). Les bandes à 1107 et 935 cm^{-1} sont attribuées aux vibrations d'élongation de la liaison C-O de l'anneau pyranosyl et de l'étirement de la liaison C-O (**Figure 21**).

Les nanoparticules d'alginate de calcium présentent des bandes significativement différentes en comparaison avec le spectre de l'alginate de sodium (Alg). La région d'absorption de la liaison O-H dans les nanoparticules alginate de calcium (Nps), apparaît plus étroite que celle de l'Alg. Cette différence est due à la participation des radicaux hydroxyles et des groupes carboxyliques d'alginate avec l'ion bivalent calcium pour former la structure de chélation et une diminution conséquente de la liaison hydrogène entre les groupes fonctionnels hydroxyles. Les vibrations asymétriques d'élongation de l'ion carboxylate -COO^- sont déplacées vers des longueurs d'ondes plus faibles car lorsque les ions de métaux de calcium remplacent les ions de sodium de l'alginate de sodium, la densité de charge, le rayon et le poids atomique du cation sont modifiés et, par conséquent, ce déplacement doit être prévu (Daemi et Barikani., 2012). Le groupe carboxylique de la molécule d'alginate interagit donc avec l'ion bivalent calcium pour former la nanoparticule (Moradhaseli et *al.*, 2013).

Les bandes relatives aux groupes carboxylates peuvent être utilisées comme bandes utiles pour suivre les changements dans la structure des différents polymères de l'alginate (**Figure 21**).

1.5. Efficacité d'encapsulation et capacité de chargement des nanoparticules

L'efficacité d'encapsulation a été obtenue par séparation de la matière active non encapsulée (V^* , antigène scorpionique) et de la matière active encapsulée au sein de la matrice polymérique (Nps – V^*).

Le rendement de l'encapsulation est un paramètre essentiel pour l'évaluation de vecteurs de principes actifs dans des systèmes biologiques : plus un vecteur a une efficacité d'encapsulation grande, plus grande sera la quantité de principe actif délivré. L'efficacité d'encapsulation des nanoparticules (EE) d'alginate de calcium synthétisée dans notre étude et leur capacité à charger 500 μg de V^* (CC) est respectivement de 94,99 et 38,37% (**Tableau IV**). Ces valeurs sont en accord avec d'autres études ayant utilisé des nanoparticules d'alginate de calcium encapsulant le rasveratrol (Istenič et *al.*, 2015; Raei et *al.*, 2015) ou la venlafaxine (Haque et *al.* 2014) et qui ont eu des efficacités d'encapsulation de 98 et 99%.

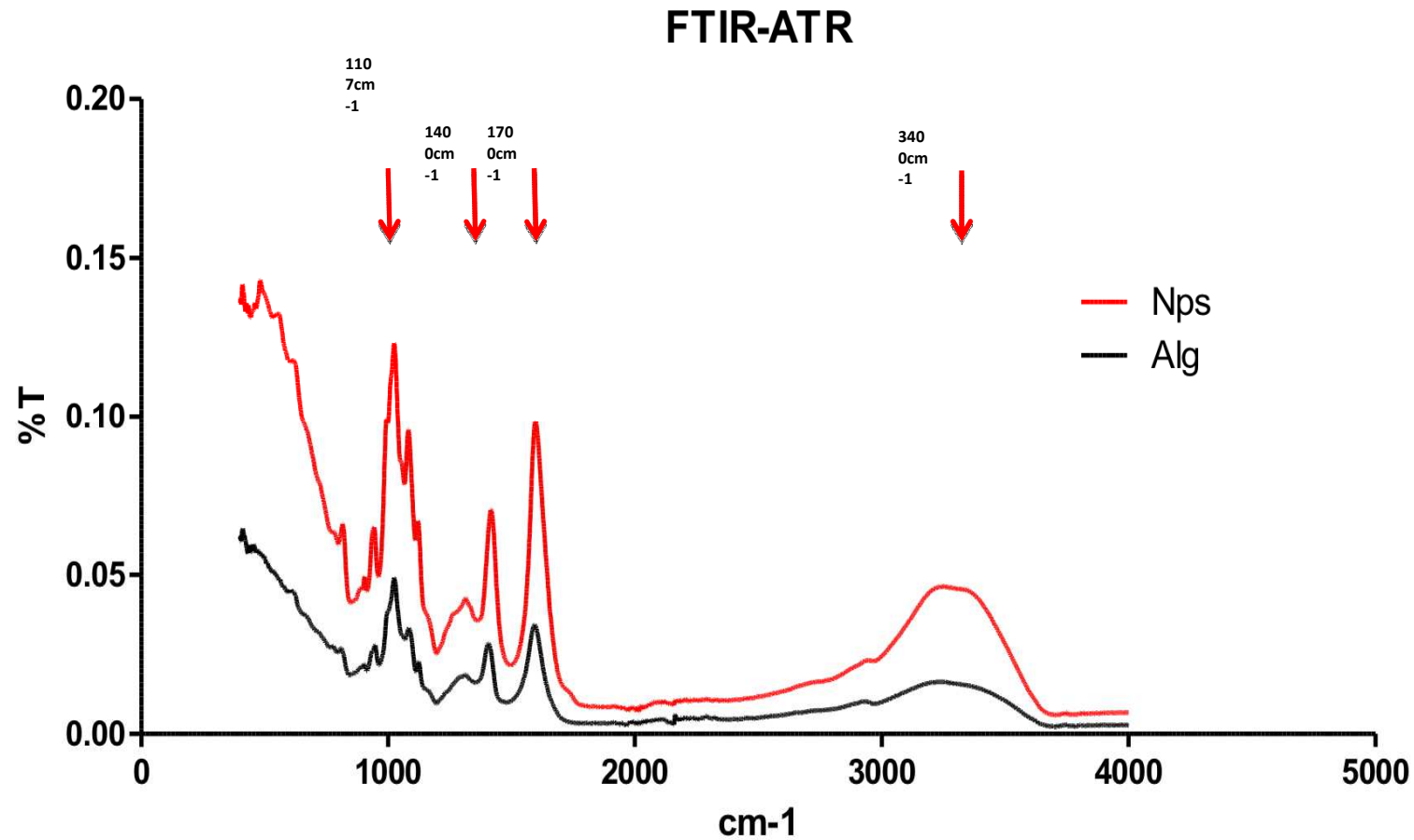


Figure 21 : Spectre d'absorption infrarouge des polymères. En noir : alginate de sodium (Alg) ; En rouge : nanoparticules d'alginate de calcium seul (Nps seules). Nps : Nanoparticules vides ; Alg : Alginate de sodium.

1.6. Analyse morphologique des nanoparticules par microscopie électronique à transmission (MET)

Les propriétés physico-chimiques des nanoparticules, telles que la forme et la taille de ces dernières, jouent un rôle important dans l'interaction avec la membrane plasmique des cellules présentatrices d'antigènes (cellules dendritiques et macrophages) et leur phagocytose (Chithrani & Chan 2007). L'analyse des nanoparticules d'alginate de calcium seules et des Nps encapsulant le venin irradié (Nps – V*) par Microscopie Electronique à Transmission montre une taille de nanoparticules allant de 100 à 450 nm (**Figure 22**). Il a été démontré qu'en raison de la grande surface disponible et des forces d'attraction entre les nanoparticules, il y a plus des chances d'avoir des nanoparticules sous forme agrégé (Poovi et *al.*, 2011). Cependant, les images MET montrent des nanoparticules individuelles non agrégées, ce qui pourrait être dû à la présence d'une charge de surface négative (-29 mV), conduisant à la répulsion des nanoparticules (Moradhaseli et *al.*, 2013). La visualisation des Nps a montré que la synthèse par gélation ionique a permis l'obtention de nanoparticules sphériques, homogènes et ne formant pas d'agrégats.

1.7. Analyse morphologique des nanoparticules par microscopie électronique à balayage (MEB)

L'analyse par Microscopie Electronique à Balayage montre que la morphologie des Nps seules et des Nps encapsulant le venin irradié est similaire. Les résultats obtenus montrent des nanoparticules de forme relativement sphériques de moins de 500 nm de diamètre (**Figure 23**). Le phénomène de « gonflement » des nanoparticules Nps – V*, qui passent de 150 nm à 300 nm est observé après encapsulation de l'antigène. Leur forme toujours sphérique confirme les résultats obtenus par l'analyse au MET. Les résultats de caractérisation microscopique sont en accord avec des études ayant caractérisé des nanoparticules d'alginate de calcium ne dépassant pas la taille de 500 nm (Daemi & Barikani 2012; Moradhaseli et *al.*, 2013). La conception des nanoparticules de forme et de taille définie influence leur demi-vie, clairance, sélectivité tissulaire et cellulaire. Les grosses particules et les gros agrégats particuliers (> 1 µm) sont généralement opsonisées et s'accumulent dans le foie et la rate en provoquant des toxicités locales. Les petites nanoparticules sont rapidement éliminées par extravasation capillaire et clairance rénale. La clairance rénale dépend aussi de la charge des nanoparticules de l'élimination préférentielle des particules chargée positivement. Les nanoparticules d'alginate de calcium, de nature polymérique et de taille intermédiaire (50 –

500 nm) possèdent le plus grand potentiel pour des applications *in-vivo*, car elles circulent plus longtemps dans l'organisme, elles ont des tailles idéales pour échapper à l'opsonisation et à la clairance rénale. De plus, les nanoparticules de cette taille sont plus facilement internalisées par les cellules de l'immunité (CPA) pour un ciblage spécifique lors d'une approche vaccinale (Zolnik et *al.*, 2010; Felber et *al.*, 2011).

Les résultats de la caractérisation physico-chimique, montrent que la synthèse des nanoparticules d'alginate de calcium aboutit à des Nps de forme relativement sphérique, ayant une taille inférieure à 400 nm et une capacité d'encapsulation antigénique de 95%. Ceci permet de tester *in-vivo* les nanoparticules encapsulant les antigènes utilisés dans cette thèse dans différents protocoles immunitaires pour étudier leur effet adjuvant, leur immunogénicité et leur réactogénicité tout au long du protocole vaccinal.

Tableau IV : Efficacité d'encapsulation de la nanoformulation d'alginate de calcium encapsulant le venin irradié (Nps – V*)

Formulation	Facteurs physico-chimiques				Apparence	Taille (nm)	%EE	%LC
	X1	X2	X3	X4				
F6 – V*	0,3	0,1	60	1500	Nanoparticules	100-350	94,99	38,37

X1: concentration Na-Alg (% w/v), X2: concentration CaCl₂ (% w/v), X3: temps d'homogénéisation (min), X4: débit d'homogénéisation (rpm).

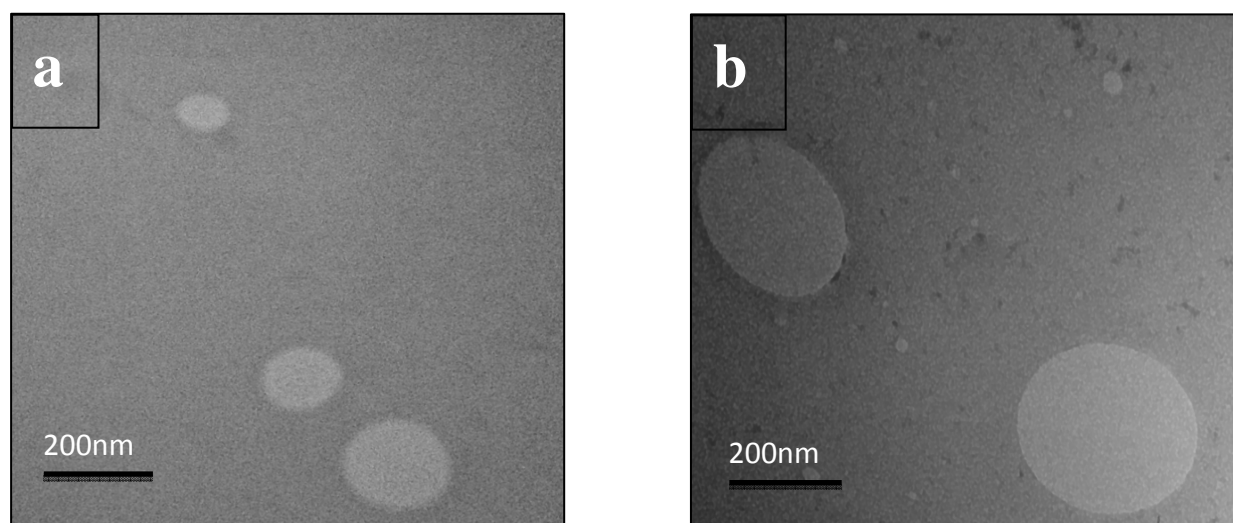


Figure 22: Caractérisation des nanoparticules d'alginate de calcium par Microscopie Electronique à Transmission. **a** : image des Nps seules, **b** : image des Nps-V*. Nps : Nanoparticules vides ; Nps-V* : Nanoparticules encapsulant le venin irradié.

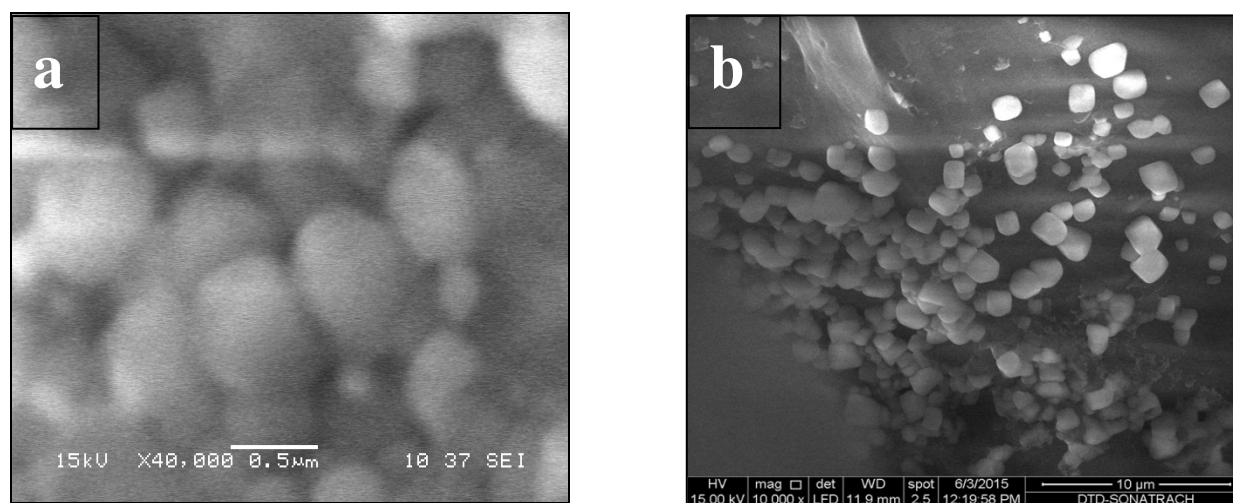


Figure 23: Caractérisation des nanoparticules d'alginate de calcium par Microscopie Electronique à Balayage. **a** : image des Nps d'Alg-Ca seules, **b** : image des Nps-V*. Nps : Nanoparticules vides ; Nps-V* : Nanoparticules encapsulant le venin irradié.

DEUXIEME PARTIE

Evaluation de l'immunogénicité des différentes
nanoformulations vaccinales

Chapitre III : Résultats et discussion

2. Evaluation de l'immunogénicité des nanoformulations

L'immunogénicité d'un vaccin se définit comme étant la capacité d'un vaccin de provoquer une réponse immunitaire spécifique. L'immunogénicité d'un vaccin est causée principalement par l'adjuvant qui le compose.

Le but dans le développement d'une formulation vaccinale innovante antiscorpionique est de cibler la réponse immunitaire adaptative, de par la nature protéique du venin et de sa toxicité aigüe. Pour cela, l'efficacité de la nanoformulation vaccinale se traduit par la mise en place d'une réponse immunitaire humorale à long terme, protégeant l'organisme des dégâts causés par le venin d'*Androctonus australis hector*, et sa fraction hautement toxique FtoxG50.

Le protocole utilisé dans cette étude est le protocole vaccinal à moyen terme sur 6 lots de lapins ayant reçu des nanoformulations différentes (Nps, Nps – V*, Nps – Vn, Nps – F*, Nps – Fn, FV). L'étude de l'immunogénicité de ces différentes nanoformulations au cours et à la fin du protocole vaccinal s'est fait en évaluant les marqueurs de la réponse immunitaire spécifique, tels que le dénombrement de la population lymphocytaire circulante, l'évaluation des titres en anticorps anti-IgG de venin d'*Aah* spécifiques et l'évaluation de l'immunoprotection des animaux contre l'injection de doses croissantes de venin d'*Aah*. L'étude de l'immunogénicité de ces nanoformulation s'est fait aussi en évaluant le titre en anticorps spécifiques anti-IgG1 et anti-IgG2a et en dosant la concentration du TNF- α , IL-10 et IL-17 sériques pour rechercher le type de réponse immunitaire (Th1/Th2/Th17) et évaluer une éventuelle réaction d'hypersensibilité due aux nanoparticules d'alginate de calcium.

2.1. Evaluation du nombre des lymphocytes circulants

L'activation des lymphocytes est un élément clé de la réponse immunitaire aux vaccins. Le dénombrement des lymphocytes circulants permet de suivre la variation de leur nombre tout au long du protocole d'immunisation. Le dénombrement des lymphocytes des animaux immunisés avec les nanoformulations de Nps seules, ne montre aucune augmentation significative par rapport au témoin (NaCl), 3 heures après chaque injection. Nous remarquons une augmentation non significative du nombre de lymphocytes chez les animaux ayant reçu les nanoformulations vaccinales d'antigènes natifs (Nps – Vn et Nps – Fn), alors que les nanoformulations encapsulant les antigènes irradiés (Nps – V* et Nps – F*) activent de

manière significative (* $p < 0,05$) les lymphocytes, au bout de la deuxième injection. (**Figure 24**).

Plusieurs études ont clairement montré que l'activation des lymphocytes est une caractéristique propre à l'association antigène-adjuvant (Lycke & Holmgren 1986; Iwasaki & Medzhitov 2015; Carroll et al., 2016). L'antigène atténué (V*) n'étant pas assez immunogène seul (Abib & Laraba-Djebari 2003), il devient capable d'activer les lymphocytes T en l'associant avec des adjuvants comme l'adjuvant complet de Freund ou MF59 (Boussag-Abib & Laraba-Djebari 2011; Nouri & Laraba-Djebari 2015). Ces résultats nous confirment l'activation de la population lymphocytaire suite aux injections des nanoformulations.

2.2. Evaluation du titre des IgG totaux

L'évaluation du pouvoir immunogène des nanoformulations a été effectuée sur les immun-sérums des lapins immunisés au cours du protocole d'immunisation. Les titres en anticorps anti-IgG spécifiques sont déterminés par ELISA sur une microplaque préalablement sensibilisée avec le venin natif d'Aah. Les résultats indiquent que le titre en anticorps des immuns sérums obtenus après immunisation des lapins avec les nanoparticules encapsulant les antigènes irradiés (Nps – V*, Nps – F*) est 4 fois supérieur à celui obtenu après immunisation avec les nanoparticules encapsulant les antigènes natifs (Nps – Vn, Nps – Fn). La nanoformulation encapsulant le venin irradié Nps – V* s'est avéré être la plus immunogène, en atteignant le titre le plus élevé (2 048 000) en anticorps au bout de la deuxième injection. (**Figure 25**).

Les études de Bharali et collaborateurs, 2008 et de Smith et collaborateurs, 2013, ont montré une grande efficacité immunostimulante des nanoparticules polymériques encapsulant ou adsorbant différents antigènes tels que des virus ou des antigènes tumoraux (Bharali et al., 2008; Smith et al., 2013). Parmi les nanoparticules polymériques ayant des caractéristiques physico-chimiques comparables à celles des nanoparticules d'alginate de calcium, les nanoparticules de poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) sont connues comme étant capables d'activer la maturation des cellules dendritiques après phagocytose et libération des antigènes au niveau des endosomes. Une fois matures, ces CD initient une réaction à caractère humorale en activant les lymphocytes B sécréteurs d'IgG et IgA selon la formulation et la voie d'administration (Mundargi et al., 2008). Une étude portant sur l'immunogénicité des alginates, a montré que son action génère une forte réponse immunitaire humorale due à la présence de l'acide α -mannuronique qui active, entre autre, la sécrétion de cytokines de la voie humorale Th2 (Otterlei et al., 1991; Gombotz & Wee 2012).

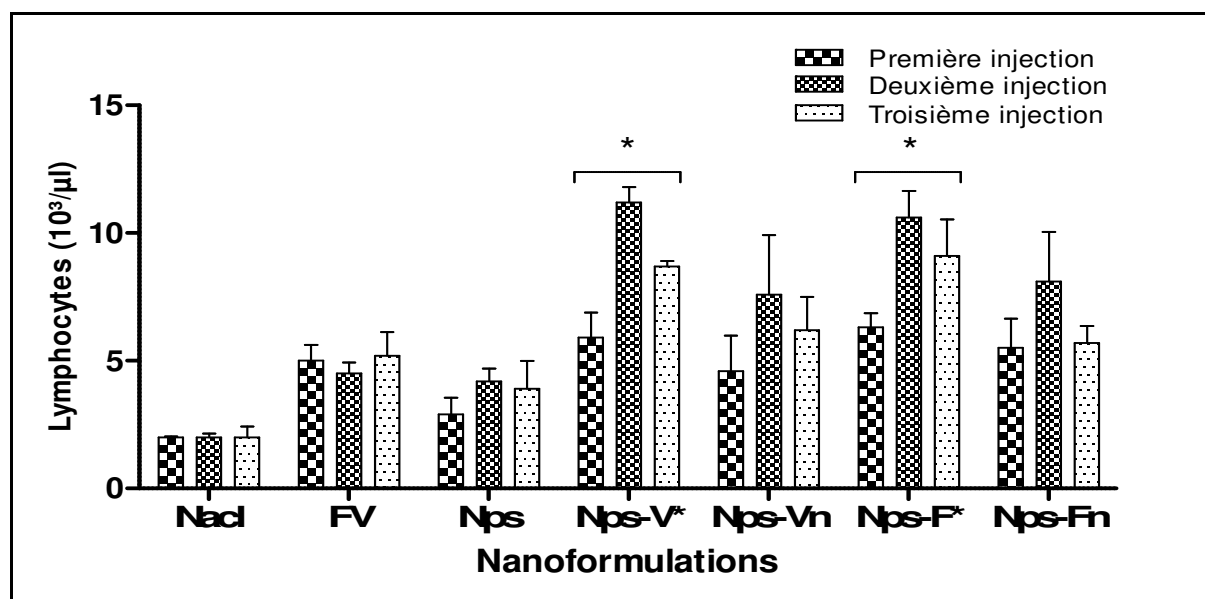


Figure 24 : Evaluation de l'activation des lymphocytes par les nanoformulation vaccinales chez les lapins. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ écart type (n=6). *p<0,05 comparé aux valeurs du témoin NaCl. NaCl : témoin négatif ; FV : témoin venin (1500 μ g) ; Nps : Nanoparticules seules ; Nps-V* : Nanoparticules encapsulant le venin irradié (500 μ g) ; Nps-Vn : Nanoparticules encapsulant le venin natif (100 μ g) ; Nps-F* : Nanoparticules encapsulant la fraction toxique irradiée (500 μ g) ; Nps-Fn : Nanoparticules encapsulant la fraction toxique native (100 μ g).

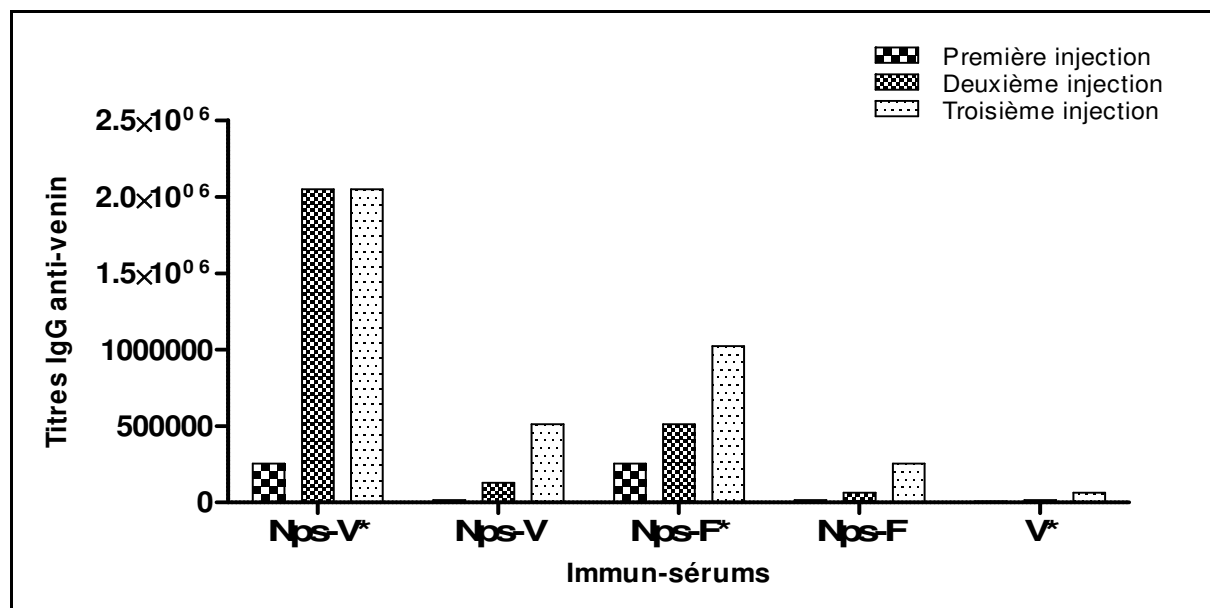


Figure 25: Détermination par ELISA du titre en anticorps des immun-sérums des lapins immunisées avec les différentes nanoformulations. Nps-V*: Nanoparticules encapsulant le venin irradié (500 µg) ; Nps-F* : Nanoparticules encapsulant la fraction toxique irradiée (500 µg) ; Nps-Vn : Nanoparticules encapsulant le venin natif (100 µg) ; Nps-Fn : Nanoparticules encapsulant la fraction toxique native (100 µg) ; V* : Venin irradié seul (500 µg).

En plus de l'action adjuvante des Nps, le venin d'*Androctonus australis hector* atténué gagne en immunogénicité après son irradiation aux rayons- γ qui coupent les ponts disulfures (S=S) et exposent d'autres sites antigéniques du venin (Abib & Laraba-Djebari 2003).

Bien que la demi-vie des IgG sériques soit de 21 jours, le titre d'anticorps est maintenu dès la deuxième injection à 2 048 000. Cet effet peut s'expliquer par la sécrétion constante des anticorps à longue durée de vie par les plasmocytes spécifiques résidant dans la moelle osseuse. Leur persistance est indépendante de la différenciation à partir des LB mémoires ainsi que des contacts ultérieurs avec l'antigène (MacLennan et al., 2001; Gustafson et al. 2008).

2.3. Evaluation des titres en anticorps des isotypes IgG1/IgG2a chez la souris

Le type de la réponse immunitaire induite par la nanoformulation la plus immunogène, Nps – V*, a été évalué par la détermination du titre des isotypes IgG1 et IgG2a des immun-sérums des souris après leur immunisation selon un protocole à court terme. Les résultats obtenus indiquent qu'un mois après la troisième injection (45^{ème} jour), la nanoformulation encapsulant le venin irradié était capable d'induire la synthèse d'un taux élevé d'IgG1 (256 000) comparé à celui d'IgG2a (32 000) (**Figure 26**). Cette différence remarquable entre le titre des deux sous-classes d'IgG s'explique par l'action ciblée des nanoparticules d'alginate de calcium. Une étude très récente a montré que la taille des nanoparticules est un paramètre clé dans l'orientation du type de réponse immunitaire. Les nanoparticules inférieures à 500 nm et plus particulièrement celles de moins de 200 nm génèrent une forte réponse immunitaire Th2, ce qui engendre une très forte production d'IgG1 (10^6) (Kumar et al., 2015). D'autres études ont montré que les nanoparticules sont 15 à 250 fois plus phagocytées par les cellules dendritiques que les microparticules et génèrent une réponse immunitaire humorale plus rapide et plus importante (Oyewumi et al., 2010; Adams & Mallapragada 2014). Ces résultats indiquent que la voie humorale Th2 et l'immunité adaptative sont principalement activées avec les nanoformulations encapsulant le venin d'*Aah* irradié.

2.4. Evaluation des taux de cytokines chez la souris, au cours du protocole vaccinal

Une évaluation plus détaillée du type de réaction immunitaire a été faite en dosant la concentration de l'IL-10, IL-17 et TNF- α par méthode ELISA.

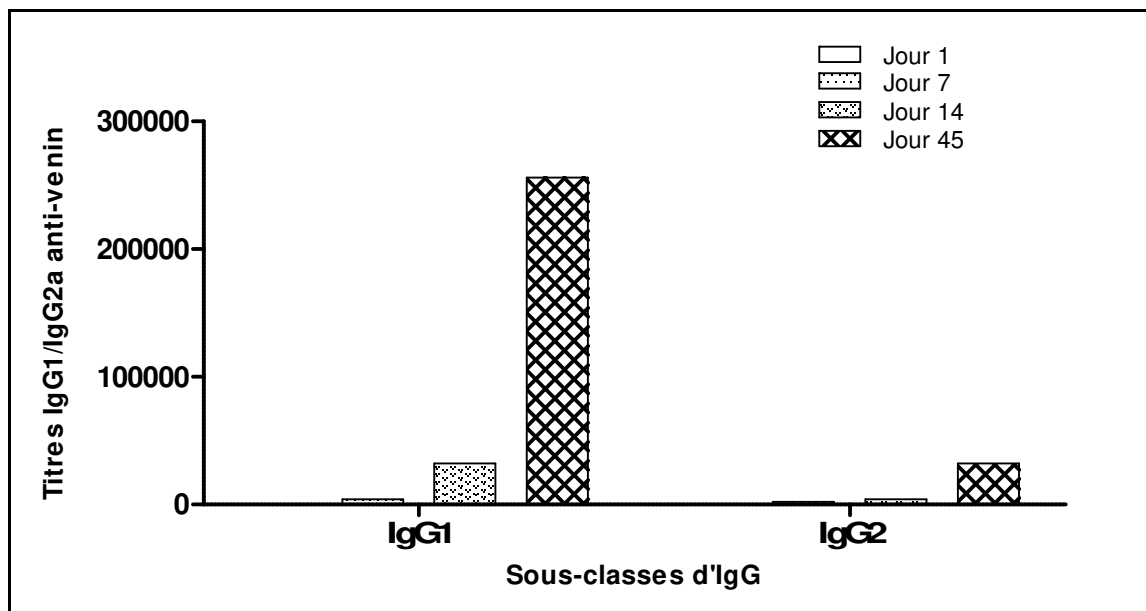


Figure 26 : Evaluation des titres en anticorps IgG1 et IgG2a lors de l'immunisation des souris avec la nanoformulation Nps – V*. Calendrier vaccinal de courte durée, trois injections hebdomadaires.

Nous constatons une augmentation remarquablement importante pour le taux des trois cytokines étudiées chez les souris ayant reçu les nanoformulations d'alginate de calcium encapsulant le venin natif (TNF- α : 505pg/ml ; IL-10 : 11430 pg/ml ; IL-17 : 618 pg/ml), comparés à ceux du témoin NaCl (TNF- α : 110 pg/ml ; IL-10 : 280 pg/ml ; IL-17 : 1,2 pg/ml). Cependant, les nanoformulations encapsulant les antigènes irradiés (Nps – V* et Nps – F*) et plus précisément Nps – V*, une fois injectés induisent uniquement l'augmentation et la sécrétion de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 (IL-10 : 6630) (**Figure 27**).

Le TNF- α est la plus importante des cytokines pro-inflammatoires. Elle agit au niveau du foie lors d'une infection en induisant la synthèse des molécules de la phase aigüe de l'inflammation. Le TNF- α stimule aussi la production de chimiokines par les cellules endothéliales permettant le recrutement des leucocytes (neutrophiles, éosinophiles, monocytes ou les cellules NK) vers le foyer inflammatoire (Salinas et *al.*, 2013; Sterner-Kock et *al.*, 2016). Du fait de son activité pro-inflammatoire, de fortes concentrations de TNF- α orientent la réponse immunitaire vers le type cellulaire Th1. Inversement, la voie humorale Th2 a été évaluée en dosant la concentration sérique de la cytokine anti-inflammatoire IL-10. Cette cytokine réprime la réponse des macrophages et inhibe la sécrétion des autres cytokines pro-inflammatoires. A leur tour, les lymphocytes Th2 sécrètent d'autres cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-6, l'IL-5 et l'IL-4 qui vont stimuler la croissance des plasmocytes sécréteurs d'anticorps spécifiques, stimuler la prolifération des lymphocytes Th2 (auto amplification) et stimuler la croissance des éosinophiles (Sher et *al.*, 1991; X. Liu et *al.*, 2016).

Pendant longtemps, l'existence des lymphocytes de type Th1 et de type Th2 a permis à elle seule d'expliquer la plupart des réponses immunes mises en place dans les maladies infectieuses et inflammatoires. Une troisième classe de lymphocytes T helper, la voie Th17, a cependant donné un nouvel éclairage sur plusieurs de ces maladies (Mignon 2010). En effet, les lymphocytes Th17 ont un rôle important et parfois déterminant dans la mise en place d'une réponse immune protectrice lors d'infections bactériennes et fongiques.

L'IL-17 peut être produite soit par les cellules T auxiliaires spécialisés (Th17) après fixation de l'IL-23 produite par les CPA sur leur récepteur (IL-23R), ou bien par les cellules épithéliales spécialisées T (cellules dites $\gamma\delta$ T), les cellules NK, les polynucléaires neutrophiles ou les macrophages. De même que la voie Th1, la voie Th17 est aussi une voie pro-inflammatoire (Foerster & Bachman 2015).

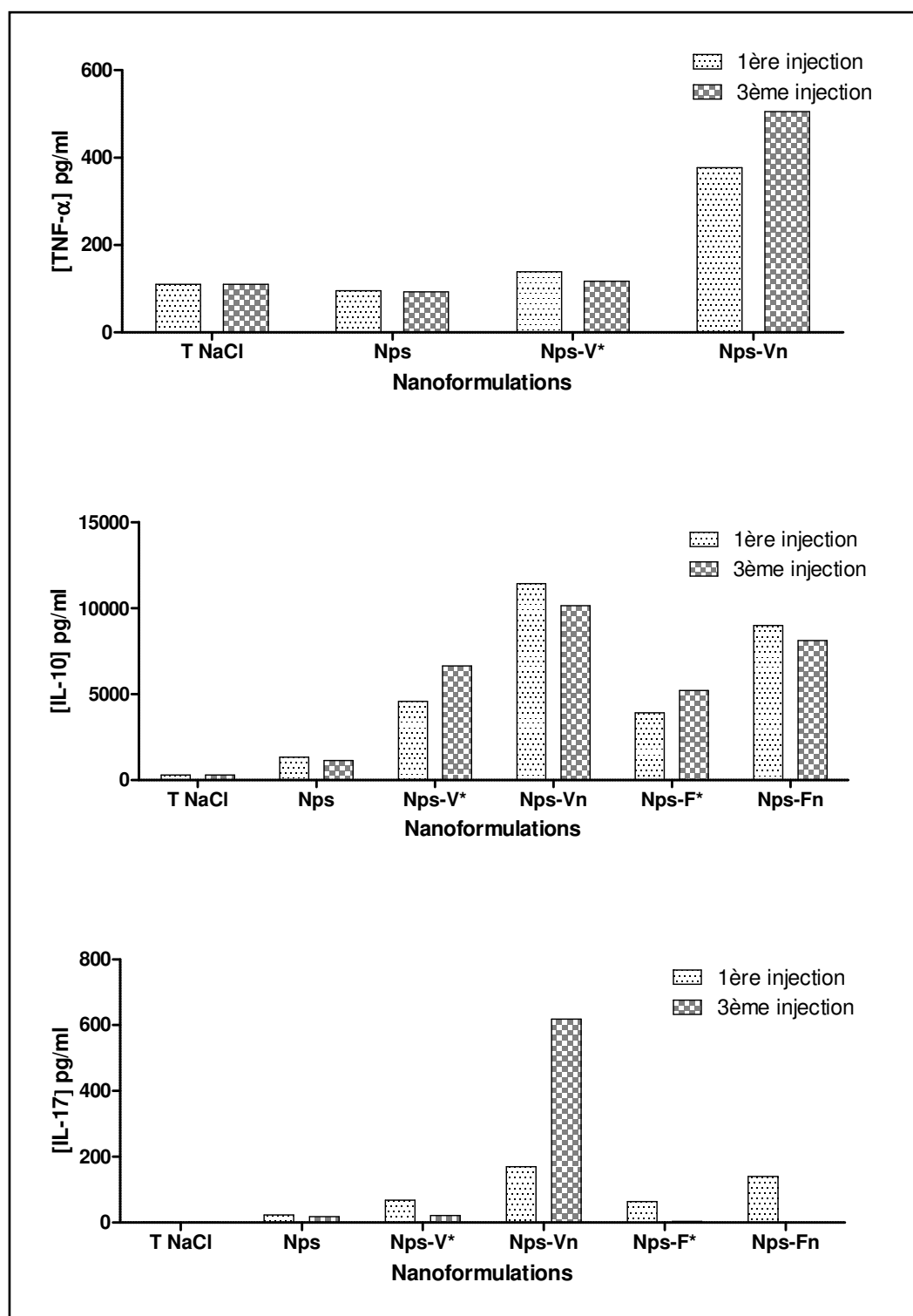


Figure 27 : Evaluation des taux sériques du TNF-α, IL-10 et IL-17 chez les souris ayant reçu les différentes nanoformulations vaccinales. Seules les valeurs de la première et de la troisième injection ont été comparées. ; Nps : Nanoparticules seules ; Nps-V* : Nanoparticules encapsulant le venin irradié (200 µg) ; Nps-Vn : Nanoparticules encapsulant le venin natif (10 µl) ; Nps-F* : Nanoparticules encapsulant la fraction toxique irradiée (200 µg) ; Nps-Fn : Nanoparticules encapsulant la fraction toxique native (10 µl).

Les résultats obtenus dans cette étude montrent que les nanoformulation vaccinales encapsulant le venin irradié orientent la réaction immunitaire vers la voie Th2, de par l'action ciblée des nanoparticules d'alginate de calcium sur les cellules dendritiques et la caractéristique du venin atténué par irradiation- γ , qui produit des amas protéiques immunogènes et qui favorisent la voie Th2. Cependant, les nanoparticules d'alginate de calcium encapsulant le venin natif (Nps – Vn) activent les deux voix Th1/Th2 avec une prédominance de la voie cellulaire Th1, confirmée aussi par les concentrations sériques d'interleukine pro-inflammatoire IL-17. Ceci est sûrement dû à l'action toxique résidentielle du venin natif présent à faibles doses (10 μ g) dans la nanoformulation et qui active la réaction inflammatoire (Abib & Laraba-Djebari 2003).

2.5. Evaluation de l'immunoprotection

Afin d'évaluer l'efficacité de protection de la stratégie vaccinale, les lapins immunisés ont reçu un mois après la troisième injection, différentes doses létales de venin d'*Aah* (1, 3 et 6 DL 50), dans le but d'observer la survie des animaux contre l'envenimation scorpionique (**Tableau V**). Les résultats ont montré que les deux formulations de nanoparticules encapsulant l'antigène irradié (Nps – V* et Nps – F*) confèrent une immunoprotection totale (100% de survie) contre 3 et 6 DL 50 de venin natif. Cette immunoprotection impliquerait une population de lymphocytes B particuliers : les plasmocytes à longue durée de vie.

Une fois matures, les lymphocytes B quittent la moelle osseuse et entrent dans les organes lymphoïdes périphériques où peuvent reconnaître un antigène spécifique via leur BCR. Si l'antigène est T-dépendant, il y a alors une interaction entre les lymphocytes B activés et les lymphocytes T (LeBien & Tedder 2008).

Un centre germinatif, dans lequel se produisent la maturation d'affinité et la commutation de classe, est créé permettant aux cellules B de produire des immunoglobulines de types A, E ou G. Suite à la rencontre et l'activation par l'antigène, il y a donc une prolifération de la cellule B spécifique pour cet antigène, appelée expansion clonale (Radbruch et *al.*, 2006).

Les plasmocytes à longue durée de vie, c'est-à-dire ceux qui sont en mesure de persister tout au long de la vie d'un individu, constituent seulement 10 à 20% de la totalité des plasmocytes générés au cours de la réaction du centre germinatif et leurs immunoglobulines doivent être continuellement sécrétées afin de maintenir une protection convenable contre l'antigène étranger (Slifka et *al.*, 1998; Mei et *al.*, 2009).

Tableau V: Evaluation de l'immunoprotection des lapins ayant reçu des doses croissantes de venin d'*Aah*.

Doses létales DL50	Lapins protégés après injection des doses létales (%)				
	Nps – V*	Nps – F*	Nps – Vn	Nps – Fn	NaCl
1	100	100	100	100	50
3	100	100	100	50	0
6	100	100	25	25	0

Nps-V* : Nanoparticules encapsulant le venin irradié (500 mg) ; Nps-Vn : Nanoparticules encapsulant le venin natif (100 mg) ; Nps-F* : Nanoparticules encapsulant la fraction toxique irradiée (500 mg) ; Nps-Fn : Nanoparticules encapsulant la fraction toxique native (100 mg). NaCl : témoin négatif. 1 DL50 (Venin Natif) est égal à 0,85 mg/Kg (Laraba-Djebari & Hammoudi, 1998)

En fait, une cellule B activée peut générer 400 plasmocytes qui sécréteront quotidiennement jusqu'à 10^{12} anticorps spécifiques pour l'antigène préalablement rencontré (Abbas et *al.*, 2012).

Des résultats antérieurs ont montré une immunoprotection élevée chez les souris, six mois après la fin du protocole d'immunisation utilisant le venin irradié (V*) mélangé avec ACF, et ce malgré le faible titre en anticorps (Boussag-Abib & Laraba-Djebari 2011). Ces résultats seraient justifiés par la capacité des adjuvants vaccinaux communs tels que les sels d'aluminium à conférer une immunoprotection efficace à long terme, explicable par la présence de plasmocytes à longue durée de vie et sécréteurs des anticorps anti-venin d'*Aah*.

Cependant, une étude sur la réponse humorale induite par un vaccin contre le malaria à base de nanoparticules lipidiques, a rapporté une grande efficacité des vecteurs particuliers dans le déclenchement de l'immunité humorale par une expansion clonale des lymphocytes Tfh spécifiques à l'antigène (Moon et *al.*, 2012). Les nanovaccins pourraient ainsi aboutir à une immunoprotection plus rapide et à long terme.

2.6. Etude histologique du parenchyme pulmonaire, hépatique et du myocarde après envenimation

Trois mois après la dernière injection, les animaux ont été envenimés avec le venin natif d'*Aah* et le myocarde, le parenchyme pulmonaire et hépatique ont été analysés.

Les résultats ont montré que la structure du myocarde des animaux immunisés avec les nanoparticules encapsulant les antigènes irradiés est semblable à celui des animaux témoins (**Figures 28A, C et D**). Le myocarde ventriculaire des lapins ayant reçu les nanoformulations encapsulant les antigènes natifs et envenimés, ont révélé un œdème interstitiel marqué avec une hémorragie et une importante infiltration leucocytaire (**Figures 28E et F**).

L'analyse des parenchyms pulmonaires des animaux immunisés avec Nps – V* et Nps – F* sont également semblables à ceux des animaux témoins (**Figures 28M, O et P**). Cependant, celle du parenchyme pulmonaire des animaux immunisés avec les nanovaccins natifs (Nps – Vn et Nps – Fn) a révélé une hémorragie, un œdème pulmonaire, un épaississement des septums inter alvéolaires et une infiltration de cellules immunitaires (**Figures 28Q et R**).

Le parenchyme hépatique des animaux ayant reçu des injections de nanoformulations encapsulant les antigènes natifs (Nps – Vn et Nps – Fn) présentait des altérations tissulaires au niveau du foie caractérisées par une hypertrophie des hépatocytes et une congestion au niveau de l'espace porte et de la veine centrolobulaire. Une infiltration des cellules immunitaires et une hémorragie ont aussi été observées au niveau de l'espace porte associé à une nécrose hépatocytaire (**Figure 29K et L**). Cependant la structure du parenchyme hépatique des animaux ayant reçu les nanoformulation vaccinales irradiés étaient semblables au tissu témoin (**Figure 29G, I et J**).

La protection des animaux après challenge avec 6 doses létales 50 de venin natif 3 mois après la fin du protocole vaccinale est due aux titres en anticorps spécifiques élevés persistants à long terme, produits suite au protocole vaccinal avec nanoformulations d'alginate de calcium encapsulant les antigènes natifs et atténués de venin de scorpion. Les résultats obtenus indiquent que les nanoformulations d'alginate de calcium à base d'antigènes irradiés (Nps – V* et Nps – F*) ont été capables de protéger les animaux vis-à-vis de la cardiotoxicité et l'hépatho-toxicité et d'induire une forte et efficace protection contre les altérations pulmonaires induites par le venin natif d'*Aah*. La protection majeure conférée par la vaccination des lapins avec Nps – V* est due aux propriétés immunostimulantes de ces nanovaccins qui permettent d'avoir des titres en anticorps anti-venin d'*Aah* arrivant jusqu'à 2048000. Ces mêmes observations ont été mentionnées par d'autres études menées par notre équipe qui ont suggéré, en plus de l'effet protecteur des anticorps neutralisants, l'existence d'autres facteurs intervenant dans la protection des animaux à long terme, tels que la persistance de plasmocytes à longue durée de vie (Boussag-Abib & Laraba-Djebari 2011; Nouri & Laraba-Djebari 2015).

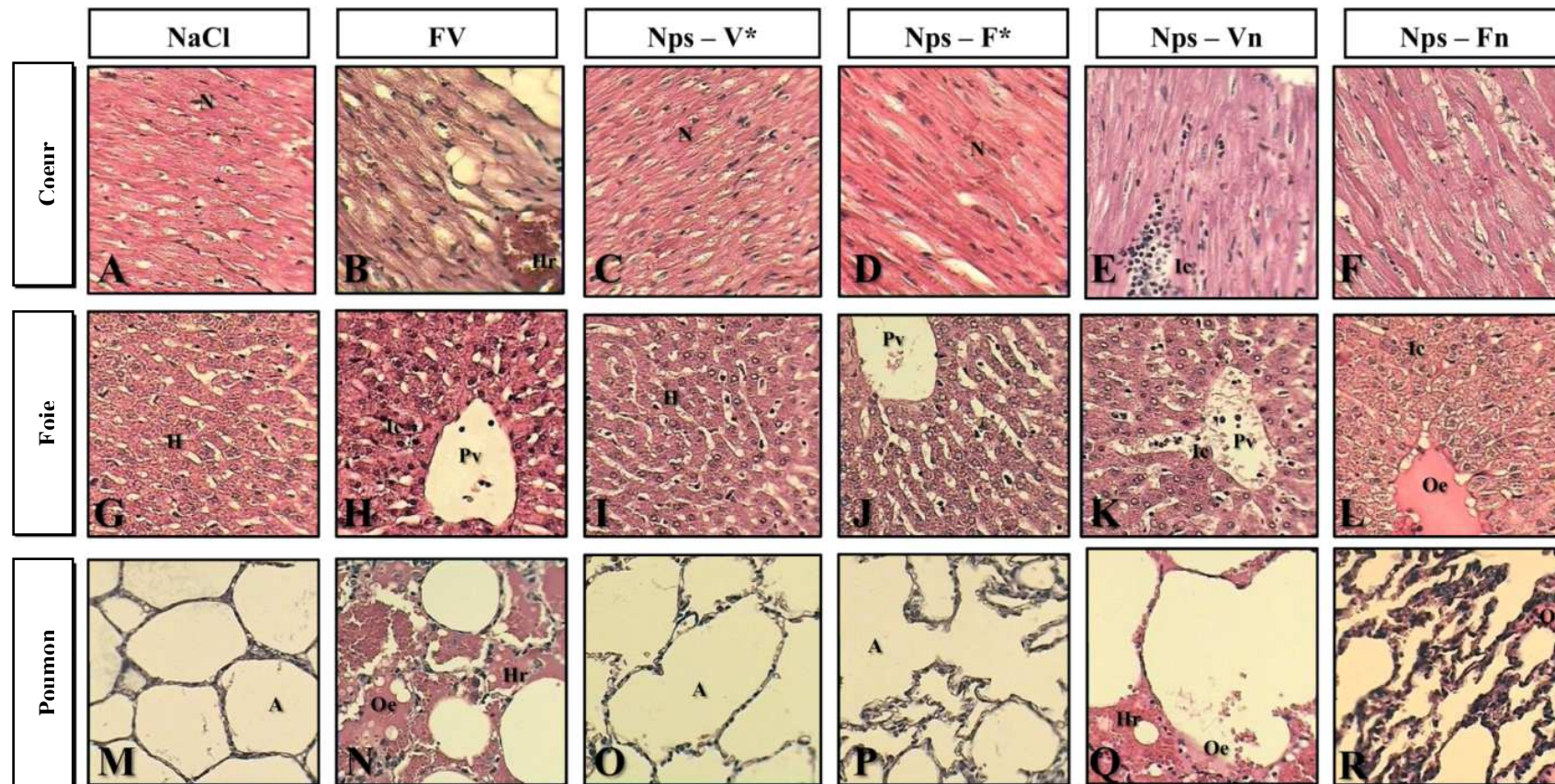


Figure 28 : Analyse histologique du myocarde et des parenchymes hépatiques et pulmonaires des lapins envenimés avec 6 DL 50 de venin d'*Aah* et ayant reçu au préalable des injections de Nps – V* (C-I-O), Nps – F* (D-J-P), Nps – Vn (E-K-Q) et Nps – Fn (F-L-R). Coupes A-G-M: lot témoin, coupes B-H-N: lot venin natif. Abréviations: noyaux (N), alvéole (A), hémorragie (Hr), œdème (E), hépatocytes (H), cellules inflammatoires (Ic), veine porte (Pv). NaCl : témoin négatif ; FV : témoin venin ; Nps-V* : Nanoparticules encapsulant le venin irradié (500 mg) ; Nps-Vn : Nanoparticules encapsulant le venin natif (100 mg) ; Nps-F* : Nanoparticules encapsulant la fraction toxique irradiée (500 mg) ; Nps-Fn : Nanoparticules encapsulant la fraction toxique native (100 mg). Grossissement G x400. 1 DL50 (Venin Natif) est égal à 0,85 mg/Kg (Laraba-Djebari & Hammoudi, 1998)

TROISIEME PARTIE

Evaluation de la réactogénicité des différentes
nanoformulations vaccinales

Chapitre III : Résultats et discussion

3. Réactogénicité

Au stade préclinique, toute étude sur le développement d'une nouvelle formulation vaccinale doit recevoir une évaluation complète et détaillée de la réactogénicité qu'elle provoque chez les animaux, tout au long du protocole vaccinal. Cela implique le suivi de l'état de santé de l'animal et de l'apparition de signes secondaires directement ou indirectement liés à l'action du vaccin. L'évaluation de la réactogénicité des nanoformulations obtenus se divise en deux parties : i) l'étude de la réactogénicité systémique, en évaluant la réponse inflammatoire et en recherchant une éventuelle atteinte hépatique; ii) l'étude de la réactogénicité locale, directement sur le site d'injection. Le nombre importants d'études réalisées nous a amené à réaliser, 3 calendriers vaccinaux (moyen, court et très court terme) sur des lapins et sur des souris. Les résultats obtenus permettent la caractérisation d'une formulation vaccinale.

4. Etat physiologique des souris

Du fait de la plus grande immunogénicité des nanoparticules d'alginate de calcium encapsulant le venin irradié (Nps – V*), cette nanoformulation vaccinale a été choisie pour l'évaluation de la réactogénicité. En premier lieu, le suivi de l'état de santé tout au long du calendrier vaccinal des souris immunisées a montré qu'il n'y a pas eu de variation significative entre l'évolution du poids des animaux ayant reçu Nps seule, Nps – V* et Nps - Vn (**Figure 29**). La perte de poids rapide chez des animaux recevant un médicament ou un vaccin est le signe d'une réaction inflammatoire ou immunitaire exagérée et dangereuse. Ce phénomène rentre dans la liste des effets indésirables, négatifs, d'un vaccin (Mutoloki et *al.*, 2004; Wyatt et *al.*, 2004; Wang et *al.*, 2008).

4.1. Evaluation de la réactogénicité systémique

4.1.1. Evaluation de la réaction inflammatoire

Afin d'évaluer le déclenchement de la réponse inflammatoire suite à l'injection des nanoformulations vaccinales aux lapins, une numération des populations leucocytaires sanguines a été effectuée au cours du calendrier vaccinale. Les polynucléaires neutrophiles (PNN) jouent un rôle crucial dans la lutte contre les agents pathogènes par leur capacité à effectuer une série de fonctions effectrices y compris la phagocytose et la libération de granules et métabolites toxiques (Smith 1994).

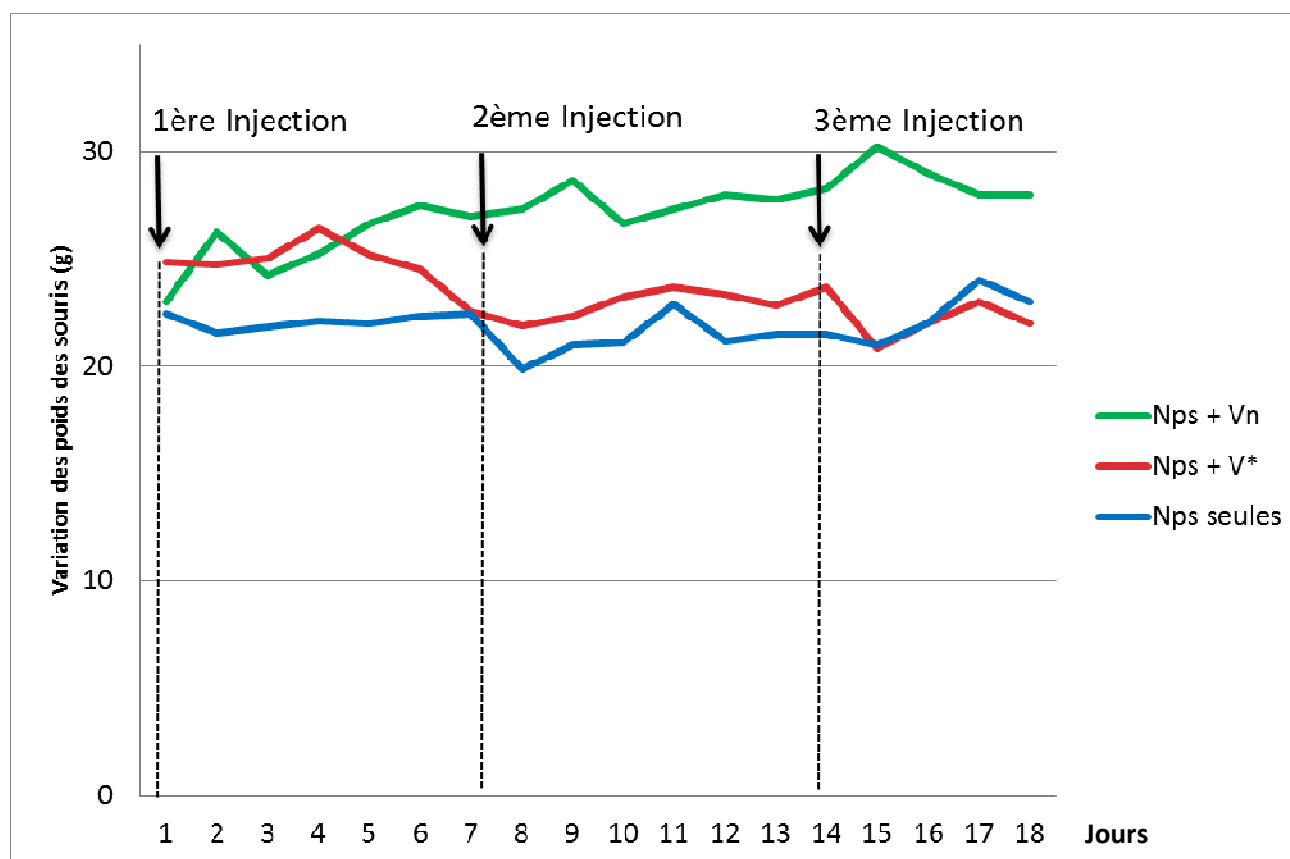


Figure 29 : Détermination du poids moyen des animaux des trois lots au cours des injections des nanovaccins. Nps seules : Nanoparticules seules ; Nps + Vn : Nanoparticules encapsulant le venin natif ; Nps + V* : Nanoparticules encapsulant le venin irradié.

Par chimiotactisme, les PNN se mobilisent au niveau du site d'injection, produisent et libèrent des espèces réactives de l'oxygène telle que la myelopéroxydase (MPO) qui aggrave les altérations des cellules endothéliales et l'induction des lésions tissulaires (Coelho et *al.*, 2007; Adi-Bessalem et *al.*, 2012; Raouraoua-Boukari & Sami-Merah 2012).

4.1.1.1. Evaluation du nombre des polynucléaires neutrophiles sériques

Dans cette étude, le dénombrement des neutrophiles au cours du protocole d'immunisation a montré une faible variation de cette population cellulaire chez les souris immunisées avec les différentes nanoformulations (**Figure 30**). Des valeurs proches du témoin NaCl ($0,25 \times 10^3$ cellules/ml) chez les souris ayant reçu 3 injections de nanoparticules d'alginate de calcium vides (Nps) sont observées. Ce résultat renseigne sur l'absence de la réaction inflammatoire dépendante des Nps. Il en est de même pour les souris recevant les nanoformulations encapsulant le venin irradié (200 μ l), où une faible augmentation non-significative est observée lors de la première injection, probablement due à la libération de l'antigène immunogène. Seulement les nanoformulations encapsulant le venin natif (10 μ l) activent de manière significative (* $p < 0,05$), le recrutement des neutrophiles au niveau du site d'injection. Le déclenchement d'une inflammation est observé uniquement chez les souris ayant reçu Nps-Vn.

L'effet du venin d'*Aah* sur le recrutement des cellules inflammatoires a été étudié au niveau du sang périphérique (Adi-Bessalem et *al.*, 2008). Ils ont indiqué que le venin d'*Aah*, une fois injecté à la souris, provoquerait une hyper-leucocytose à prédominance polynucléaire neutrophiles. Le taux maximum de ces cellules est observé dans les 3 heures suivant l'envenimation (Adi-Bessalem et *al.*, 2008).

4.1.1.2. Evaluation de l'activité de la Myelopéroxydase (MPO)

La myelopéroxydase (MPO) est une peroxydase hémique présente dans les granules azurophiles des polynucléaires neutrophiles. Elle est impliquée en cas de stimulation des neutrophiles par un antigène exogène et amplifie la réaction inflammatoire suite à sa libération dans le milieu extra cellulaire (Bradley et *al.*, 1982). Cette enzyme utilise le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) comme substrat de la synthèse de nombreuses espèces oxydantes qui participent à la défense de l'hôte. La MPO est considérée comme un marqueur inflammatoire dans de nombreuses pathologies liées à l'activation des neutrophiles et à leur infiltration tissulaire telles que les pathologies inflammatoires, cardiovasculaire et infectieuse

(Borregaard & Cowland 1997; Adi-Bessalem *et al.* 2008). La présence de toute concentration élevée en MPO dans le milieu extracellulaire est le signe d'une réaction inflammatoire, indiquant un recrutement des neutrophiles par chimiotactisme au niveau du site inflammatoire (Eiserich *et al.*, 1998).

L'immunisation des souris avec les Nps – Vn induit une augmentation légèrement significative de l'activité de la myelopéroxydase lors de la seconde injection en comparaison avec le témoin NaCl (* $p < 0,05$) et le lot ayant reçu des nanoparticules seules (# $p < 0,05$), (**Figure 31**). Une absence d'activité de la myelopéroxydase au niveau des sérums des souris recevant les trois injections de venin irradié encapsulé (Nps – V*) est cependant observée probablement due à une faible toxicité de V* par rapport à Vn, et aussi à la biocompatibilité des polymères d'alginate de calcium, qui ne sont pas réactogènes une fois introduits dans l'organisme (Abib & Laraba-Djebari 2003; Safley *et al.*, 2008).

4.1.1.3. Evaluation de l'activité de l'éosinophile peroxydase (EPO)

Les polynucléaires éosinophiles sont des cellules inflammatoires effectrices qui contiennent dans leurs granules azurophiles une protéine cationique proche de la myelopéroxydase, la peroxydase éosinophile (EPO), qui est un marqueur de l'infiltration des éosinophiles. L'EPO est une enzyme libérée par les éosinophiles activés lors d'une réaction inflammatoire et elle convertit l' H_2O_2 par oxydation en présence d'ortho-phenylenediamine (OPD) (Bradley *et al.*, 1982; Strath *et al.*, 1985; Luo *et al.*, 2015; Saffari *et al.*, 2016).

L'évaluation de l'activité de l'EPO au cours du protocole vaccinal montre qu'aucune nanoformulation d'alginate de calcium n'induit une variation significative comparée à celle des animaux témoins recevant uniquement 3 injections de NaCl. Une légère augmentation non-significative de cette activité est observée chez les animaux ayant reçu les nanoparticules encapsulant l'antigène natif et irradié (**Figure 32**). Ces résultats sont concordants avec les l'évaluation de l'activité de la myelopéroxydase qui ne montrait pas de variation de l'activité MPO pour les lots de souris recevant les nanoformulations encapsulant le venin irradié (Nps – V*). De plus, l'absence d'activité significative de l'EPO au-delà de la première injection pourrait indiquer l'absence d'hypersensibilité allergique provoquée par l'adjuvant polymérique, confirmant la biocompatibilité de l'alginate de calcium (Asada *et al.*, 1997; Borges *et al.*, 2007).

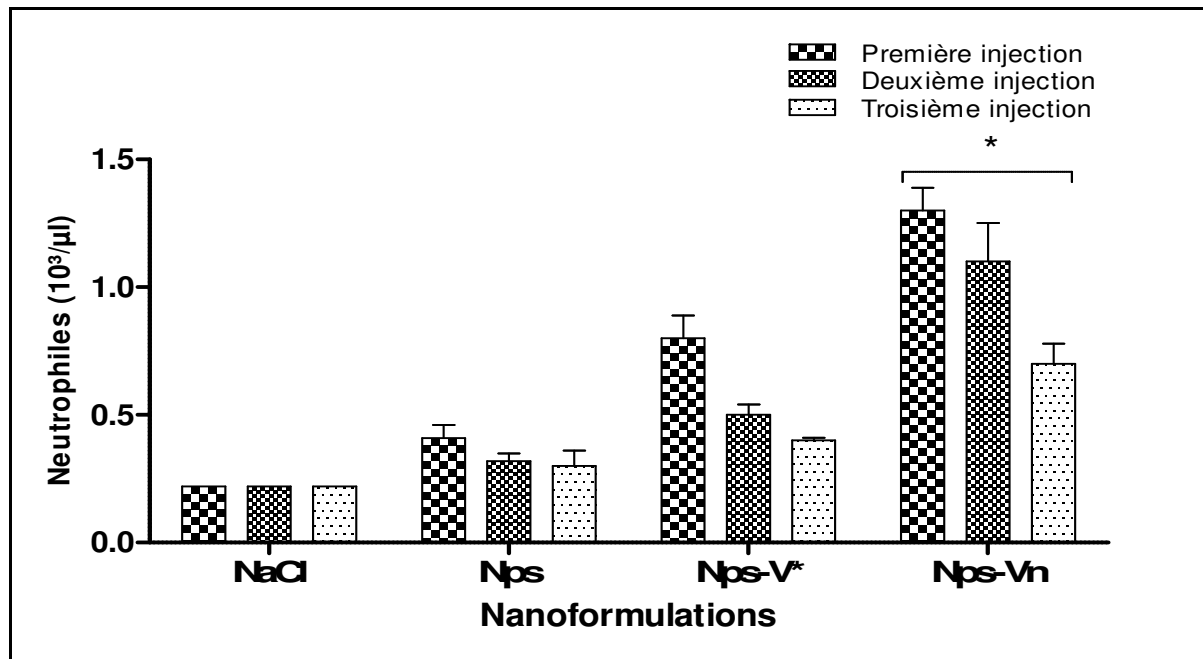


Figure 30 : Détermination du nombre des neutrophiles dans le sang périphérique des souris immunisées. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ écart type (n=15). *p<0,05 comparé aux valeurs du témoin NaCl. NaCl : témoin négatif ; Nps : Nanoparticules seules ; Nps-V* : Nanoparticules encapsulant le venin irradié (200 μ g) ; Nps-Vn : Nanoparticules encapsulant le venin natif (10 μ l).

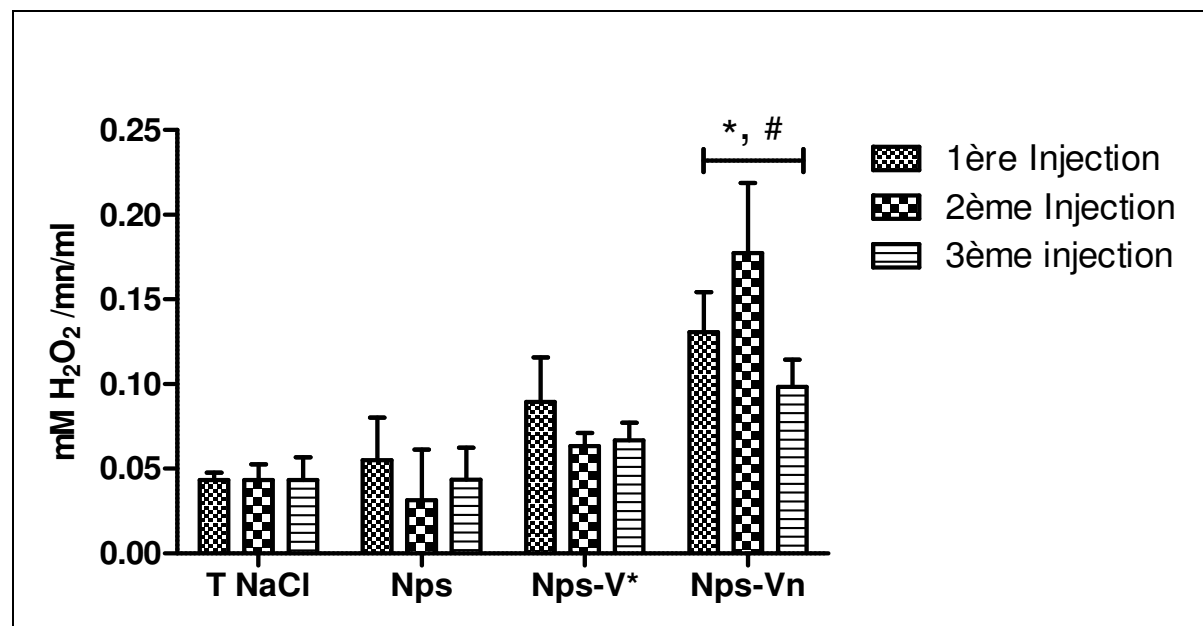


Figure 31 : Détermination de l'activité sérique de la myéloperoxydase (MPO) chez les souris au cours du protocole d'immunisation. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ écart type (n=15). *p<0,05 comparé aux valeurs du témoin NaCl ; #p<0,05 comparé aux valeurs du témoin Nps. T NaCl : témoin négatif ; Nps : Nanoparticules seules ; Nps-V* : Nanoparticules encapsulant le venin irradié (200 μ g) ; Nps-Vn : Nanoparticules encapsulant le venin natif (10 μ l).

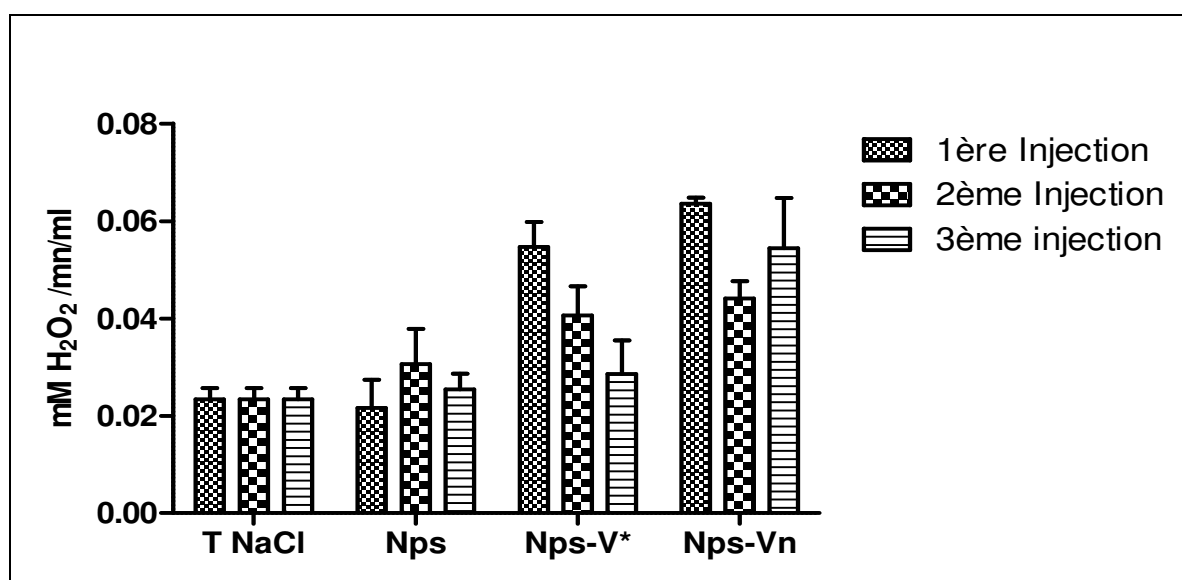


Figure 32 : Détermination de l'activité sérique de l'éosinophile peroxydase (EPO) chez les souris au cours du protocole d'immunisation. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ écart type (n=15). T NaCl : témoin négatif ; Nps : Nanoparticules seules ; Nps-V* : Nanoparticules encapsulant le venin irradié (200 μ g) ; Nps-Vn : Nanoparticules encapsulant le venin natif (10 μ l).

4.1.2. Evaluation des marqueurs systémiques d'une éventuelle atteinte hépatique

4.1.2.1. Evaluation de l'activité des transaminases (ASAT/ALAT)

Les transaminases ASAT (Aspartate amino-transférase) et ALAT (Alanine amino transférase) sont des enzymes cellulaires libérées dans la circulation sanguine en cas de lésions tissulaires. Le seul mécanisme aboutissant à leur augmentation est une lésion des myocytes du muscle strié ou des hépatocytes. L'évaluation de l'activité des transaminases est souvent liée à une suspicion de trouble hépatique et cardiaque (Killip & Payne 1960).

Adi-Bessalem et collaborateurs, ont trouvé que les souris envenimées avec une dose sublétales de venin d'*Aah* (10 µg/20 g) présentaient des taux élevés de transaminases suite à leur libération dans le milieu extracellulaire après altération tissulaire (Adi-Bessalem et al. 2008). La détermination des activités sériques de l'ASAT et ALAT chez les souris ayant reçu les nanoparticules d'alginate de calcium encapsulant le venin irradié et le venin natif (Nps – V* et Nps – Vn) ne révèle aucune variation significative par rapport à l'activité ASAT/ALAT des souris ayant reçu les nanoparticules vides (Nps) ou NaCl. Une légère augmentation non-significative de l'activité de ces transaminases chez les souris ayant reçu Nps – Vn est observée, probablement due à la toxicité résidentielle du venin natif d'*Aah* (**Tableaux VI et VII**). De par leur très petite taille et biocompatibilité, les nanoparticules d'alginate de calcium et d'andrographolide une fois dans l'organisme, n'induisaient pas d'augmentation des taux des transaminases sériques, expliquant la très faible réactogénicité et la sécurité d'utilisation des nanoparticules polymériques dans des approches vaccinales (Prakash & Manavalan 2012; Bhattacharyya et al., 2016).

4.1.2.2. Evaluation l'activité de la Phosphatase alcaline (PAL)

Les phosphatases alcalines (PAL) sont des iso-enzymes membranaires regroupant les PAL non-spécifiques du foie et des os, les PAL placentaires, les PAL intestinales et les PAL des cellules germinales. Des taux élevés de la PAL sérique indiquent des lésions tissulaires principalement hépatiques (Kim & Wyckoff 1991).

Dans cette étude, les résultats obtenus montrent une augmentation significative (**p<0,01) de l'activité de la PAL chez les souris ayant reçu les injections de Nps – Vn comparée à l'activité retrouvée chez les souris témoin. Cette augmentation est surtout retrouvée lors de la première injection. L'absence d'activité de PAL chez les souris ayant reçu la nanoformulation vaccinale contenant le venin irradié (Nps – Vn) est observée (**Figure 33**). Les enzymes

cytosoliques PAL, ALAT et ASAT sont libérées dans le milieu extracellulaire après atteinte cellulaire suite à la modification de la perméabilité membranaire, et a plus forte raison s'il y a nécrose cellulaire (Cales, 2003). Une précédente étude a montré que l'injection sous cutanée d'une dose sub létale ou d'une DL50 de venin d'*Aah* provoque des changements histopathologiques au niveau du parenchyme hépatique et du myocarde des souris, conduisant à la libération de ces enzymes cytosoliques au niveau du sang (Adi-Bessalem et al. 2008). Les résultats de cette étude montrent que suite à l'injection de nos nanoparticules d'alginate de calcium encapsulant l'antigène irradié (Nps – V*), aucune atteinte à l'intégrité hépatique n'est à signaler, avec des activités PAL, ASAT et ALAT comparables à une souris témoin.

Tableau VI : Détermination de l'activité sérique de l'ASAT chez les souris, 3 heures après chaque injection des différentes nanoformulations. NaCl : témoin négatif ; Nps : Nanoparticules seules ; Nps-V* : Nanoparticules encapsulant le venin irradié (200 µg) ; Nps-Vn : Nanoparticules encapsulant le venin natif (10 µl).

Nanoformulations	Activité sérique ASAT (UI/l)		
	1 ^{ère} injection	2 ^{ème} injection	3 ^{ème} injection
NaCl	155 ± 4	157 ± 5	151 ± 8
Nps	161 ± 8	159 ± 5	157 ± 8
Nps-V*	167 ± 7	173 ± 5	166 ± 3
Nps-Vn	187 ± 9	190 ± 5	179 ± 7

Tableau VII : Détermination de l'activité sérique de l'ALAT chez les souris, 3 heures après chaque injection des différentes nanoformulations. NaCl : témoin négatif ; Nps : Nanoparticules seules ; Nps-V* : Nanoparticules encapsulant le venin irradié (200 µg) ; Nps-Vn : Nanoparticules encapsulant le venin natif (10 µl).

Nanoformulations	Activité sérique ALAT (UI/l)		
	1 ^{ère} injection	2 ^{ème} injection	3 ^{ème} injection
NaCl	45 ± 2	44 ± 1	50 ± 4
Nps	51 ± 4	52 ± 2	50 ± 3
Nps-V*	51 ± 1	54 ± 2	54 ± 4
Nps-Vn	82 ± 9	90 ± 5	79 ± 7

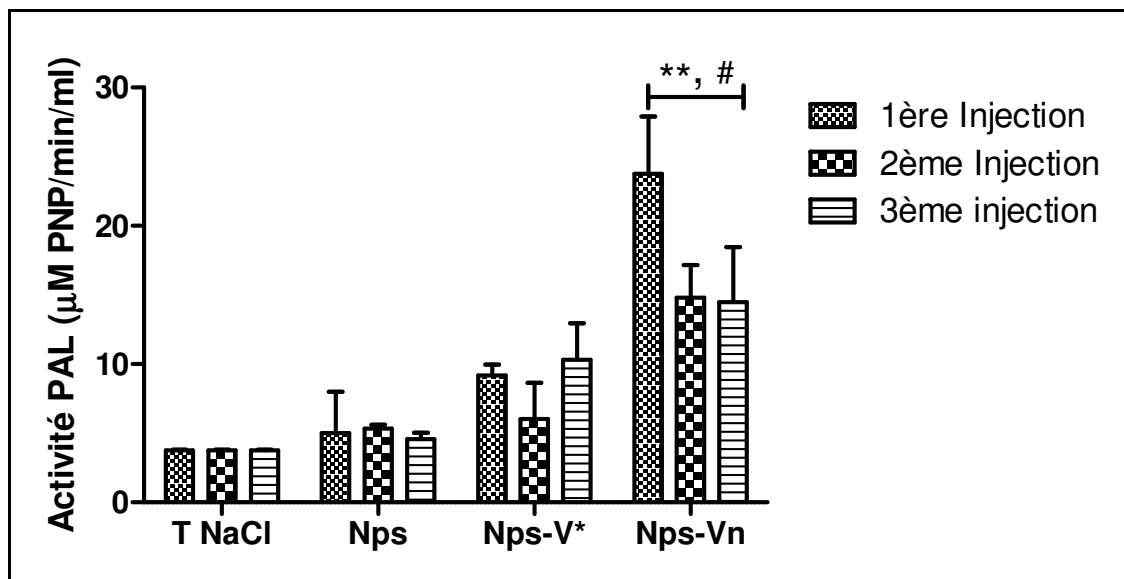


Figure 33 : Evaluation de l'activité sérique de la phosphatase alcaline (PAL) chez les souris au cours du protocole d'immunisation. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ écart type (n=15). **p<0,01 comparé aux valeurs du témoin NaCl ; #p<0,05 comparé aux valeurs du témoin Nps. T NaCl : témoin négatif ; Nps : Nanoparticules seules ; Nps-V* : Nanoparticules encapsulant le venin irradié (200 μ g) ; Nps-Vn : Nanoparticules encapsulant le venin natif (10 μ l).

5. Evaluation de la réactogénicité locale

Une évaluation de la réactogénicité locale a été effectuée en analysant macroscopiquement et microscopiquement le site d'injection chez des lapins. Pour cela, un protocole vaccinal de 20 jours comportant 2 injections à 15 jours d'intervalle a été suivi pour 5 lots de lapins recevant différentes nanoformulations (Nps vides, Nps – V* (250 µg), Nps – V* (500 µg), Nps – Vn (100 µg) et V* seul). L'analyse macroscopique s'est déroulée d'après le «Dermal Draize Observation» en observant l'apparition et la disparition des Œdèmes/Erythèmes dans le site d'injection pendant les 5 jours après chaque injection, alors que l'analyse microscopique a comporté l'étude histologique de la peau au niveau du site d'injection, 5 jours après la deuxième injection (Jour 20).

5.1. Détermination de la réactogénicité au niveau du site d'injection : « Dermal Draize Observation »

Afin de déterminer si les différentes nanoformulations vaccinales injectées sous-cutanée peuvent entraîner des effets secondaires locaux, un test de Draize a été effectué à J1, J2, J3, J4 et J5 après chaque injection, afin de donner un grade à l'irritation cutanée.

L'analyse macroscopique du site d'injection pendant les 5 jours post-injection a montré que l'administration des différentes nanoformulations n'induit pas d'œdèmes dans le site d'injection alors que quelques érythèmes légers (grade 2) sont à remarquer chez les lapins recevant les nanoformulations d'alginate de calcium encapsulant le venin natif (Nps – Vn) (**Tableau VIII**). Ces irritations de la peau disparaissent quasi-totalement au bout du 4^{ème} jour post-injection, suggérant une toxicité minime et un effet protecteur des nanoparticules d'alginate de calcium.

5.2. Analyse histologique au niveau du site d'injection

Cinq jours après la deuxième injection, les lapins ont été sacrifiés et le site d'injection recueilli pour étude histologique. L'observation des coupes histologiques réalisées au niveau de la peau révèle une infiltration leucocytaire presque inexistante avec maintien de l'architecture de la peau (Epiderme-Derme-Hypoderme) chez les lapins ayant reçu des injections de Nps seules et venin irradié seul (V*) alors qu'une légère infiltration (Im) de cellules inflammatoires caractérisant une réaction inflammatoire minime est retrouvée chez les lapins recevant Nps – V*(250 µg) (**Figure 34**). L'injection de Nps-V*(500 µg) quant à elle a provoqué un épaissement de l'épiderme appelé « acanthose » reflétant d'une réaction

inflammatoire locale du au recrutement de polynucléaires neutrophiles et macrophages. De plus gros dommages sont observés lors de l'administration des nanoformulations d'alginate de calcium encapsulant le venin natif (Nps – Vn), caractérisés par une perte de l'architecture histologique de la peau et d'une grande infiltration intradermique, due probablement à l'action toxique du venin natif d'*Androctonus australis hector*. Les résultats de notre étude sont meilleurs que ceux trouvés par Shearer et collaborateurs, 2014, lorsqu'ils ont analysé l'histologie du site d'injection après injection d'un vaccin recombinant botulinum (rBV/AV) avec alhydrogel® (adjuvant d'alum). Un œdème/érythème temporaires de grade moyen (3) avait été trouvé, causé principalement par le dépôt toxique des sels d'aluminium (Shearer et al., 2012).

Les résultats de l'évaluation de la réactogénicité locale nous confirment une fois de plus la biosécurité, biodégradabilité et non toxicité des nanoparticules d'alginate de calcium.

Tableau VIII : Score du « Dermal Draize Observation », pendant 5 jours après chaque injection de nanoformulations vaccinales. NaCl : témoin négatif ; Nps : Nanoparticules seules ; Nps-V* : Nanoparticules encapsulant le venin irradié (250 ou 500 µg) ; Nps-Vn : Nanoparticules encapsulant le venin natif (100 µg) ; V* : Venin irradié seul (500 µg)

Jours	Erythèmes					Œdèmes				
	Nps	Nps - V* (250 µg)	Nps - V* (500 µg)	Nps-Vn (100 µg)	V*	Nps	Nps - V* (250 µg)	Nps - V* (500 µg)	Nps-Vn (100 µg)	V*
Première injection										
J1	1	1	0	2	0	0	0	0	1	0
J2	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
J3	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
J4	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0
J5	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0
Deuxième injection										
J1	1	0	1	2	0	0	0	0	1	0
J2	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
J3	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
J4	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0
J5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

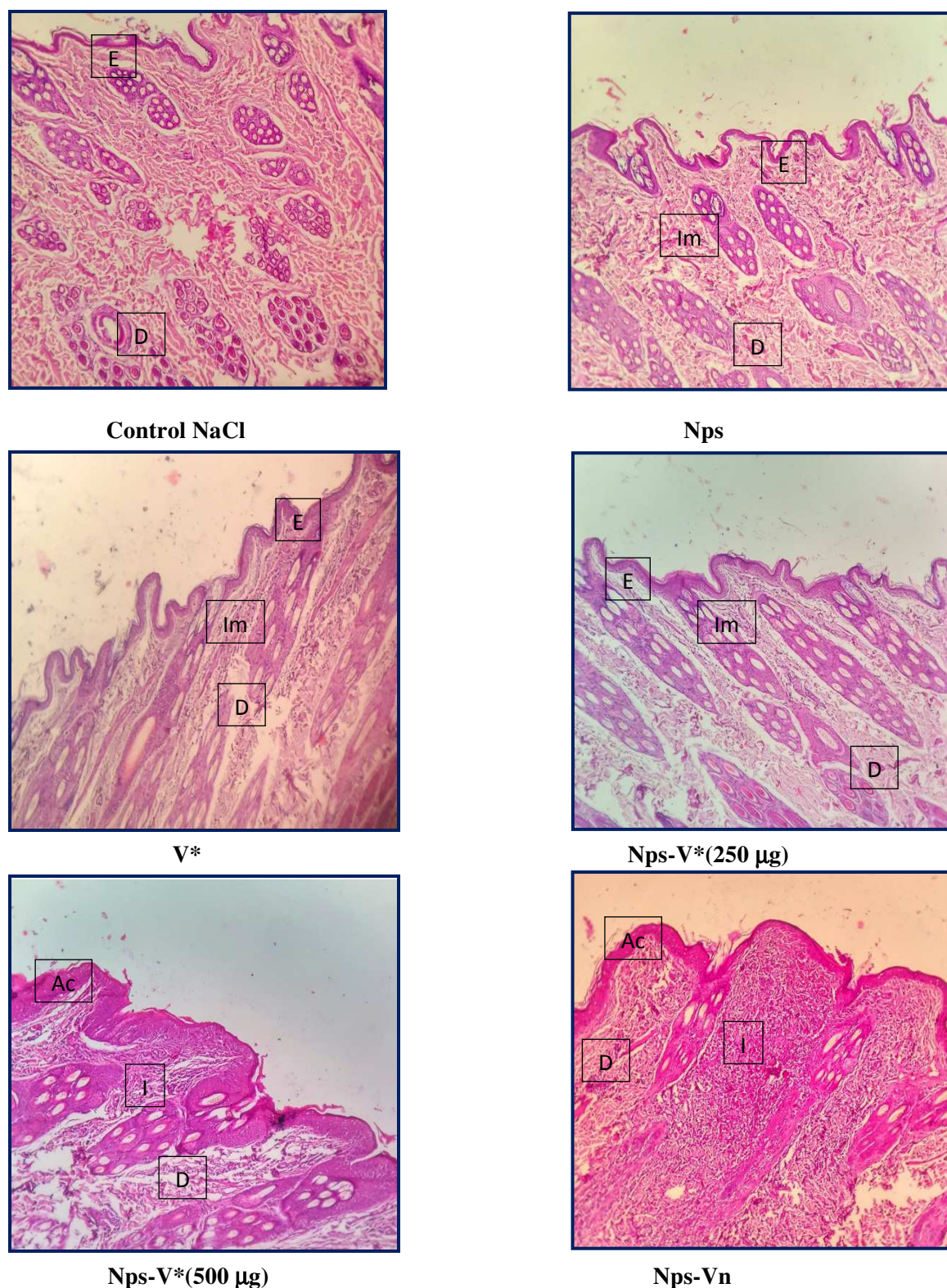


Figure 34 : Analyse histologique du site d'injection 5 jours après la deuxième injection au microscope photonique. (E) : Epiderme, (D) : Derme, (Im) : Infiltration minime, (I) : Infiltration importante, (Ac) : Acanthose de l'épiderme. G x 400. Nps : Nanoparticules seules ; Nps-V* : Nanoparticules encapsulant le venin irradié (250 ou 500 µg) ; Nps-Vn : Nanoparticules encapsulant le venin natif (100 µg) ; V* : Venin irradié seul (500 µg)

DISCUSSION GENERALE

Une approche vaccinale a été réalisée à l'aide de nanoparticules d'alginate de calcium comme véhicule pour l'administration d'un vaccin, dans le but d'étudier une nouvelle immunothérapie efficace contre les envenimations scorpioniques accidentelles au niveau des régions à risque. La méthode décrite dans ce travail de thèse s'inspire d'une précédente étude sur l'effet immunoprotecteur des antigènes d'*Aah* en utilisant des adjuvants macromoléculaires tels qu'alum et MF59. Notre thèse s'inscrit dans une continuité dans le but de déterminer la meilleure façon d'induire une protection humorale contre l'envenimation scorpionique (Nouri et Laraba-Djebari 2015).

Les nanoparticules, notamment celles de nature polymériques tels que l'alginate de calcium, sont capables : i) de stabiliser les antigènes en les protégeant de l'environnement biologique, ii) d'augmenter sa biodisponibilité, iii) d'améliorer le ciblage des cellules présentatrices d'antigènes (CPA), notamment les cellules dendritiques (Panyam & Labhasetwar 2003; Liang Zhao et al., 2014). Les principales caractéristiques des nanoparticules sont la taille, l'efficacité d'encapsulation et la capacité de chargement de ces dernières (Mohanraj & Chen 2007).

Dans ce travail de thèse, nous avons synthétisé par gélification ionique des nanoformulations d'alginate de calcium (Nps, Nps – V*) de forme relativement sphérique et avec un diamètre compris entre 100 et 500 nm. L'étude de l'immunogénicité des nanoformulations a montré des taux importants d'immunoglobulines (IgG), persistantes et spécifiques contre le venin d'*Aah* conférant une immunoprotection jusqu'à 6 DL50 de venin natif. Une différence d'efficacité de l'induction d'une réponse immunitaire spécifique est observée avec les Nps – V* comparées aux Nps – Vn. Ceci est dû à une immunogénicité accrue du venin irradié (Abib & Laraba-Djebari 2003; Cardi et al. 1998) associé à la caractéristique du groupement β -D-mannuronate de l'alginate de calcium qui induit une forte réponse humorale (Wee & Gombotz 1998).

Les nanoparticules d'alginate encapsulant le venin irradié ont montré également une prédominance de l'isotype IgG1 par rapport à l'isotype IgG2a, indiquant une prédominance de la voie humorale de type Th2. La principale cytokine de la voie Th2, l'IL-10, favorise chez les souris, la production des IgG1 et inhibe la production des IgG2a. D'autre part, il a été rapporté que le TNF- α , une cytokine de la voie Th1, induit la réponse contraire. De plus la

taille des nanoparticules rentre en compte car celles inférieures à 500 nm et plus particulièrement celles de moins de 200 nm génèrent une forte réponse immunitaire Th2, ce qui engendre une très forte production d'IgG1 (10^6) (Kumar et al. 2015). Une autre étude a montré que les nanoparticules sont 15 à 250 fois plus phagocytées par les CPA que les microparticules et génèrent une réponse immunitaire humorale plus importante (Oyewumi et al. 2010; Adams & Mallapragada 2014).

Le choix de l'injection sous cutanée a pour but d'activer plus facilement les CPA en particulier les cellules dendritiques présentes en masse dans le derme des souris et ainsi activer une réponse immunitaire spécifique (Malissen et al. 2014). De plus, d'autres études ont montré que les nanoparticules polymériques induisent une maturation des cellules dendritiques (Babensee 2008; Kim et al. 2010; Akagi et al. 2011). Cette maturation se traduit par l'augmentation de l'expression des différents marqueurs de surface et des molécules co-stimulatrices tels que CD40, CD80, CMH I et CMH II de manière dose et taille-dépendante. La maturation des cellules dendritiques est essentiellement affectée par les interactions entre les deux surfaces des Nps et les cellules dendritiques. Ces nanoparticules sont capables de faciliter la diffusion des antigènes aux organes lymphoïdes tels que la rate et les ganglions lymphatiques. Le complexe « nanoparticule-antigènes » possède une morphologie particulière qui facilite la phagocytose cellulaire comparé aux antigènes libres. Cette propriété permet aux antigènes d'être efficacement pris en charge et métabolisés. La libération contrôlée de ces antigènes peut conduire à une présentation prolongée aux CPA (Sozzani 2005; Schraml & Sousa 2015).

La réponse adaptative a été capable de protéger l'organisme contre l'injection de différentes doses létales de venin. Cette protection n'était que de 4 DL50 de venin natif, un mois après le protocole vaccinal utilisant l'adjuvant ACF (Boussag-Abib & Laraba-Djebari 2011). Toutefois, dans cette étude, trois mois après la dernière injection, une immunoprotection a été observée pour tous les animaux ayant reçu plus de 6 DL50 de venin natif, révélant que des vaccins à base de nanoparticules semblent être plus efficaces que les adjuvants couramment utilisés (Leleux & Roy 2013).

L'immunoprotection a été aussi confirmée par une analyse histologique de tissus (cœur, poumons et foie) affectés dans les cas d'une envenimation expérimentale. Les tissus des animaux immunisés et ayant reçu du venin d'*Aah* natif semblent présenter une structure

similaire à celles des témoins montrant ainsi l'efficacité des nanoparticules encapsulant le venin et la FtoxG50 irradiés à amplifier la réponse immunitaire en conférant une protection immunitaire contre les lésions histologiques provoquées par le venin de scorpion.

Lors de la mise au point d'une vaccinothérapie, il est nécessaire d'évaluer la réactogénicité (effets secondaires et hyper sensibilité) de la formulation vaccinale, c'est à dire celle de l'antigène et de l'adjuvant. De nombreux antigènes présentent une faible immunogénicité et sont incapables de déclencher une réponse immunitaire suffisamment forte pour créer une réponse mémoire (Petrovsky & Aguilar 2004).

Pour cela, toute substance incorporée dans un vaccin pour stimuler une réponse immunitaire est désigné comme étant un adjuvant. Les fonctions de base d'un adjuvant peuvent inclure un effet dépôt, une biocompatibilité, une durée de vie pour la libération prolongée de l'antigène et la modulation immunitaire (Petrovsky & Aguilar 2004). Les sels d'aluminium, dénommé «alum», sont les adjuvants les plus répandus en vaccination humaine et vétérinaire. Ils présentent des avantages tels que la stabilité de l'antigène, une expérience prouvée dans l'activation de la réponse immunitaire humorale mais possèdent des limitations comprenant l'allergénicité, l'inefficacité pour certains antigènes et un potentiel neurotoxique (Akagi *et al.*, 2014).

La toxicité d'une molécule peut causer dans l'organisme une inflammation locale mais aussi systémique caractérisée par une augmentation des cellules inflammatoires tels que les neutrophiles et une augmentation des activités myéloperoxydase (MPO) et peroxydase des éosinophiles (EPO) (Eiserich *et al.*, 1998).

En nanotechnologie, les principaux effets adverses des nanoparticules sont représentés par leur toxicité immunitaire, notamment vis-à-vis des cellules immunitaires (Zolnik *et al.* 2010; Ilinskaya & Dobrovolskaia 2016).

Dans cette étude, les résultats du dénombrement des neutrophiles, de l'évaluation de l'activité de la MPO et de l'EPO n'ont montré aucune activation de la réponse inflammatoire par les nanoparticules d'alginate de calcium encapsulant les antigènes irradiés (Nps – V* et Nps – F*) tandis que les nanoformulations encapsulant les antigènes natifs (Nps – Vn et Nps – Fn) ont entraîné l'activation de l'inflammation de manière peu significative durant le calendrier

vaccinal. Ceci peut être expliqué par les caractéristiques des nanoparticules d'alginate, qui grâce à leur biocompatibilité et biodégradabilité n'entraînent pas l'activation de la réponse inflammatoire. En plus de cela, la détoxification des antigènes par irradiation gamma à 2 kGy explique la perte de toxicité des antigènes irradiés par rapport aux antigènes natifs. En effet, le venin irradié est détoxifié au-delà de 20 DL50 (Abib & Laraba-Djebari 2003).

Dans cette étude les nanoparticules polymériques d'alginate de calcium n'ont démontré aucune forme de réactogénicité systémique significative par rapport au control. Au niveau local, des altérations tissulaires minimales et réversibles ont été observées au niveau des coupes histologiques.

CONCLUSION

Le travail que nous avons réalisé est une contribution au développement d'une stratégie vaccinale antiscorpionique. Ce travail de thèse a eu pour but d'évaluer l'immunogénicité et la réactogénicité d'une préparation vaccinale à base de nanoparticules d'alginate de calcium encapsulant du venin natif ou atténué d'*Aah*.

La stratégie vaccinale mise au point dans cette étude s'accompagne d'une faible réponse inflammatoire mobilisant des polynucléaires neutrophiles et d'un érythème cutané, non significatif par rapport au témoin NaCl pour la nanoformulation de venin atténué. Cependant, une réponse immunitaire avec une production d'anticorps 5 fois supérieure pour les Nps – V* par rapport aux Nps – Vn a été enregistrée.

A la lumière des résultats obtenus, nous pouvons conclure que les nanoparticules d'alginate de calcium encapsulant du venin irradié et natif, sont capables d'induire une réponse immunitaire adaptative adéquate avec une bonne production d'anticorps neutralisant et protégeant les souris contre des doses élevés de venin natif d'*Aah*.

De plus, les nanoparticules d'alginate de calcium utilisées dans cette étude ont joué un rôle important dans l'efficacité de cette stratégie d'immunisation grâce à leur capacité immunostimulatrice de la réponse immunitaire humorale.

PERSPECTIVES : afin d'étoffer cette étude, il serait intéressant de :

- Etudier l'effet immunoprotecteur sur un plus grand nombre d'animaux afin d'augmenter les doses de challenge ;
- Elucider les mécanismes exacts de l'immunoprotection antiscorpionique stimulée par les nanoparticules en prenant en considération le nombre des LB et LT mémoires au cours de la réponse immunitaire par cytométrie de flux ;
- Synthétiser des nanoparticules d'alginate polymannuronique pour une plus forte immunostimulation ;
- Etudier *in-vitro*, les interactions existantes entre les nanoparticules d'alginate et l'expression des protéines de surfaces des CPA, en particulier les cellules dendritiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbas, A., Lichtman, A. & Pillai, S., 2012. Basic immunology: functions and disorders of the immune system. Available at: https://books.google.fr/books?hl=fr&lr=&id=jOwdl_MEr7sC&oi=fnd&pg=PP1&dq=BASIC+Immunology:+functions+and+disorders+of+the+immune+system&ots=U6TMILCGQi&sig=H8g-19ZmyLemjU832wvjvoGm7wM [Accessed September 2, 2016].
- Abdel-Mottaleb, Y., Vandendriessche, T. & Clynen, E., 2008. OdK2, a Kv1.3 channel-selective toxin from the venom of the Iranian scorpion *Odontobuthus doriae*. *Toxicon*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010108001074> [Accessed May 21, 2016].
- Abib, H. & Laraba-Djebari, F., 2003. Effects of ^{60}Co gamma radiation on toxicity and hemorrhagic, myonecrotic, and edema-forming activities of *Cerastes cerastes* venom. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 81(12), pp.1125–30.
- Abib, L. & Laraba-Djebari, F., 2003. Effect of gamma irradiation on toxicity and immunogenicity of *Androctonus australis* hector venom. *Canadian journal of physiology*. Available at: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/y03-115> [Accessed May 21, 2016].
- Abroug, F. et al., 1999. Serotherapy in scorpion envenomation: a randomised controlled trial. *The Lancet*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673698120834> [Accessed May 21, 2016].
- Adams, J.R. & Mallapragada, S.K., 2014. Enhancing the immune response through next generation polymeric vaccine adjuvants. *TECHNOLOGY*, 2(1), pp.1–12.
- Adi-Bessalem, S. et al., 2012. Lung Immunoreactivity and Airway Inflammation: Their Assessment After Scorpion Envenomation. *Inflammation*, 35(2), pp.501–508.
- Adi-Bessalem, S., Hammoudi-Triki, D. & Laraba-Djebari, F., 2008. Pathophysiological effects of *Androctonus australis* hector scorpion venom: Tissue damages and inflammatory response. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 60(4), pp.373–380.
- Aguado, T. et al., 1999. Novel adjuvants currently in clinical testing November 2–4, 1998, Fondation Mérieux, Annecy, France: a meeting sponsored by the World Health Organization. *Vaccine*, 17(19), pp.2321–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10392611> [Accessed May 21, 2016].
- Ahmad, Z., Sharma, S. & Khuller, G., 2007. Chemotherapeutic evaluation of alginate nanoparticle-encapsulated azole antifungal and antitubercular drugs against murine tuberculosis. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1549963407000871> [Accessed June 20, 2016].
- Ai, J. et al., 2011. Nanotoxicology and nanoparticle safety in biomedical designs. *Int J*. Available at: https://www.researchgate.net/profile/Jafar_Ai2/publication/51243058_Nanotoxicology_and_nanoparticle_safety_in_biomedical_designs/

- links/0fcfd50dc66af524e7000000.pdf [Accessed May 21, 2016].
- Ainbinder, D., Godin, B. & Touitou, E., 2016. Ethosomes: Enhanced Delivery of Drugs to and Across the Skin. *Percutaneous Penetration Enhancers*. Available at: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-662-47862-2_4 [Accessed August 21, 2016].
- Aitken, R., Chaudhry, M. & Boxall, A., 2006. Manufacture and use of nanomaterials: current status in the UK and global trends. *Occupational*. Available at: <http://occmed.oxfordjournals.org/content/56/5/300.short> [Accessed May 21, 2016].
- Akagi, T. et al., 2014. Biodegradable nanoparticles composed of enantiomeric poly (γ -glutamic acid)-graft-poly (lactide) copolymers as vaccine carriers for dominant induction of cellular. *Biomaterials Science*.
- Akagi, T., Shima, F. & Akashi, M., 2011. Intracellular degradation and distribution of protein-encapsulated amphiphilic poly(amino acid) nanoparticles. *Biomaterials*, 32(21), pp.4959–67.
- Alami, M. et al., 2006. Genomic characterisation of the toxin Amm VIII from the scorpion *Androctonus mauretanicus mauretanicus*. *Toxicon*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010106000262> [Accessed May 21, 2016].
- Ali, S. et al., 1998. Purification and primary structure of low molecular mass peptides from scorpion (*Buthus sindicus*) venom. *and Physiology Part A:* Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S109564339810140X> [Accessed May 21, 2016].
- Alvarenga, L., Diniz, C. & Granier, C., 2002. Induction of neutralizing antibodies against *Tityus serrulatus* scorpion toxins by immunization with a mixture of defined synthetic epitopes. *Toxicon*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S00410101001970> [Accessed May 21, 2016].
- Alvarenga, L.M. et al., 2005. Molecular characterization of a neutralizing murine monoclonal antibody against *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon*, 46(6), pp.664–671.
- Ansel, K., McHeyzer-Williams, L. & Ngo, V., 1999. In vivo-activated CD4 T cells upregulate CXC chemokine receptor 5 and reprogram their response to lymphoid chemokines. *The Journal of*. Available at: <http://jem.rupress.org/content/190/8/1123.abstract> [Accessed June 18, 2016].
- Asada, M. et al., 1997. Inhibitory Effect of Alginic Acids on Hyaluronidase and on Histamine Release from Mast Cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 61(6), pp.1030–1032. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1271/bbb.61.1030> [Accessed September 3, 2016].
- Atay, T., Song, J. & Nurmikko, A., 2004. Strongly interacting plasmon nanoparticle pairs: from dipole-dipole interaction to conductively coupled regime. *Nano letters*. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/nl049215n> [Accessed August 20, 2016].
- Attamo, H., Diawara, N.A. & Garba, A., 2002. [Epidemiology of scorpion envenomations in the pediatric service of the Agadez hospital

- center (Niger) in 1999]. *Bulletin de la Société de pathologie exotique (1990)*, 95(3), pp.209–11. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12404874> [Accessed May 21, 2016].
- Babensee, J.E., 2008. Interaction of dendritic cells with biomaterials. *Seminars in immunology*, 20(2), pp.101–8.
- Bahraoui, E. & Granier, C., 1986. Specificity and neutralizing capacity of antibodies elicited by a synthetic peptide of scorpion toxin. *The Journal of*. Available at:
<http://www.jimmunol.org/content/136/9/3371.short> [Accessed May 21, 2016].
- Baldrick, P., 2016. Dose site reactions and related findings after vaccine administration in safety studies. *Journal of Applied Toxicology*, p.n/a-n/a.
- Basu, S. et al., 2000. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF- κ B pathway. *International*. Available at:
<http://intimm.oxfordjournals.org/content/12/1/1539.short> [Accessed June 18, 2016].
- Batista, C. et al., 2002. Scorpion toxins from *Tityus cambridgei* that affect Na⁺-channels. *Toxicon*. Available at:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010101002525> [Accessed May 21, 2016].
- Bawaskar, H. & Bawaskar, P., 1992. Management of the cardiovascular manifestations of poisoning by the Indian red scorpion (*Mesobuthus tamulus*). *British heart journal*. Available at:
<http://heart.bmj.com/content/68/11/478.short> [Accessed May 21, 2016].
- Behnke, T. et al., 2011. Encapsulation of hydrophobic dyes in polystyrene micro-and nanoparticles via swelling procedures. *Journal of*. Available at:
<http://link.springer.com/article/10.1007/s10895-010-0632-2> [Accessed June 20, 2016].
- Benguedda, A., Laraba-Djébari, F. & Ouahdi, M., 2002. Expérience de quinze années de lutte contre l'envenimation scorpionique en Algérie. *Bull Soc Pathol*. Available at:
<http://s1.e-monsite.com/2008/06/13/67661133envenimation-scorpioniques-algerie-pdf.pdf> [Accessed May 21, 2016].
- Benita, S., Friedman, D. & Weinstock, M., 1986. Physostigmine emulsion: a new injectable controlled release delivery system. *International journal of pharmaceuticals*. Available at:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378517386901341> [Accessed May 21, 2016].
- Benoit, E. & Dubois, J., 1987. Properties of maintained sodium current induced by a toxin from *Androctonus scorpion* in frog node of Ranvier. *The Journal of physiology*. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1183059/> [Accessed May 21, 2016].
- Bento, D. et al., 2015. Development of a novel adjuvanted nasal vaccine: C48/80 associated with chitosan nanoparticles as a path to enhance mucosal immunity. *European Journal of*. Available at:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939641115001575> [Accessed August

- 21, 2016].
- Bertazzi, D. & Assis-Pandochi, A. de, 2005. Activation of the complement system and leukocyte recruitment by *Tityus serrulatus* scorpion venom. *International*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567576905000494> [Accessed May 21, 2016].
- Bertazzi, D., Assis-Pandochi, A. de & Azzolini, A., 2003. Effect of *Tityus serrulatus* scorpion venom and its major toxin, TsTX-I, on the complement system in vivo. *Toxicon*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010102003914> [Accessed May 21, 2016].
- Berwald-Netter, Y. & Martin-Moutot, N., 1981. Na⁺-channel-associated scorpion toxin receptor sites as probes for neuronal evolution in vivo and in vitro. *Proceedings of the*. Available at: <http://www.pnas.org/content/78/2/1245.short> [Accessed May 21, 2016].
- Bharali, D. et al., 2008. Novel nanoparticles for the delivery of recombinant hepatitis B vaccine. , *Biology and Medicine*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1549963408000889> [Accessed August 30, 2016].
- Bhattacharyya, A. et al., 2016. Development of pH sensitive polyurethane–alginate nanoparticles for safe and efficient oral insulin delivery in animal models. *RSC Advances*. Available at: <http://pubs.rsc.org/is/content/articlehtml/2016/ra/c6ra06749b> [Accessed September 3, 2016].
- Bodewes, R. & Rimmelzwaan, G., 2010. Animal models for the preclinical evaluation of candidate influenza vaccines. *review of vaccines*. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1586/erv.09.148> [Accessed August 23, 2016].
- Borges, O. et al., 2008. Alginate coated chitosan nanoparticles are an effective subcutaneous adjuvant for hepatitis B surface antigen. *International*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567576908002610> [Accessed May 21, 2016].
- Borges, O. et al., 2007. Evaluation of the immune response following a short oral vaccination schedule with hepatitis B antigen encapsulated into alginate-coated chitosan nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 32(4), pp.278–290.
- Borregaard, N. & Cowland, J., 1997. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*. Available at: <http://www.bloodjournal.org/content/89/10/3503.short> [Accessed September 3, 2016].
- Bouchard, D. & Ma, X., 2008. Extraction and high-performance liquid chromatographic analysis of C 60, C 70, and -phenyl C 61-butyric acid methyl ester in synthetic and natural waters. *Journal of Chromatography A*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967308011953> [Accessed May 21, 2016].
- Boudier, J., Jover, E. & Cau, P., 1988. Autoradiographic localization of voltage-dependent sodium channels on the mouse neuromuscular junction using 125I-alpha scorpion toxin. I. Preferential labeling of. *The Journal of neuroscience*. Available at:

- <http://www.jneurosci.org/content/8/5/1469.short> [Accessed May 21, 2016].
- Boudier, J., Treut, T. Le & Jover, E., 1992. Autoradiographic localization of voltage-dependent sodium channels on the mouse neuromuscular junction using 125I-alpha scorpion toxin. II. Sodium distribution on. *The Journal of neuroscience*. Available at: <http://www.jneurosci.org/content/12/2/454.short> [Accessed May 21, 2016].
- Bougis, P., Rochat, H. & Smith, L., 1989. Precursors of *Androctonus australis* scorpion neurotoxins. Structures of precursors, processing outcomes, and expression of a functional recombinant toxin II. *Journal of Biological Chemistry*. Available at: <http://www.jbc.org/content/264/32/19259.short> [Accessed May 21, 2016].
- Bradford, M.M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.*, 72, p.248–254.
- Bradley, P., Priebat, D. & Christensen, R., 1982. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *Journal of Investigative*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022202X15463018> [Accessed September 3, 2016].
- Breitfeld, D. et al., 2000. Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *The Journal of*. Available at: <http://jem.rupress.org/content/192/11/1545.abstract> [Accessed June 18, 2016].
- Brigger, I. et al., 2002. Poly (ethylene glycol)-coated hexadecylcyanoacrylate nanospheres display a combined effect for brain tumor targeting. *of Pharmacology and ...*. Available at: <http://jpet.aspetjournals.org/content/303/3/928.short> [Accessed May 21, 2016].
- CALES, P., 2003. Marqueurs sanguins de fibrose hépatique. *THS la revue des addictions*. Available at: <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=15381950> [Accessed September 3, 2016].
- Cardi, B.A. et al., 1998. Differential biodistribution of native and 2 kGy 60Co irradiated crotoxin in tissues of CBA/J mice. *Natural toxins*, 6(1), pp.19–25.
- Carroll, E. et al., 2016. The Vaccine Adjuvant Chitosan Promotes Cellular Immunity via DNA Sensor cGAS-STING-Dependent Induction of Type I Interferons. *Immunity*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S107476131630019X> [Accessed August 21, 2016].
- Casimiro, D. et al., 2002. Vaccine-induced immune responses in rodents and nonhuman primates by use of a humanized human immunodeficiency virus type 1 pol gene. *Journal of*. Available at: <http://jvi.asm.org/content/76/1/185.short> [Accessed August 23, 2016].
- Chávez-Olórtegui, C. et al., 1997. Neutralizing capacity of antibodies elicited by a non-toxic protein purified from the venom of the scorpion *Tityus serrulatus*. *Toxicon*, 35(2), pp.213–221.

- Cheon, J. & Lee, J., 2008. Synergistically integrated nanoparticles as multimodal probes for nanobiotechnology. *Accounts of chemical research*. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ar800045c> [Accessed May 21, 2016].
- Chippaux, J., 2012. Epidemiology of snakebites in Europe: a systematic review of the literature. *Toxicon*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010111003229> [Accessed May 21, 2016].
- Chippaux, J.-P. & Goyffon, M., 2008. Epidemiology of scorpionism: A global appraisal. *Acta Tropica*, 107(2), pp.71–79.
- Chithrani, B. & Chan, W., 2007. Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano letters*. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/nl070363y> [Accessed August 28, 2016].
- Clift, M., Rothen-Rutishauser, B. & Brown, D., 2008. The impact of different nanoparticle surface chemistry and size on uptake and toxicity in a murine macrophage cell line. *Toxicology and applied*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X08002640> [Accessed May 21, 2016].
- Clissa, P., Nascimento, N. do & Rogero, J., 1999. Toxicity and immunogenicity of *Crotalus durissus terrificus* venom treated with different doses of gamma rays. *Toxicon*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010198002499> [Accessed May 21, 2016].
- Coelho, F. et al., 2007. Platelet activating factor receptors drive CXC chemokine production, neutrophil influx and edema formation in the lungs of mice injected with *Tityus serrulatus* venom. *Toxicon*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010107001547> [Accessed September 2, 2016].
- Coquerelle, C. & Moser, M., 2010. DC subsets in positive and negative regulation of immunity. *Immunological reviews*. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.0105-2896.2009.00887.x/full> [Accessed June 18, 2016].
- Correa, M. et al., 1997. Biochemical and histopathological alterations induced in rats by *Tityus serrulatus* scorpion venom and its major neurotoxin tityustoxin-I. *Toxicon*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004101019600219X> [Accessed May 21, 2016].
- CORZO, G., ESCOUBAS, P. & VILLEGAS, E., 2001. Characterization of unique amphipathic antimicrobial peptides from venom of the scorpion *Pandinus imperator*. *Biochemical*. Available at: <http://www.biochemj.org/content/359/1/35.abstract> [Accessed May 21, 2016].
- Cox, J. & Coulter, A., 1997. Adjuvants—a classification and review of their modes of action. *Vaccine*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X96001831> [Accessed May 21, 2016].
- Crotty, S., 2011. Follicular helper CD4 T cells (T_{fh}). *Annual review of immunology*.

- Available at:
<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-immunol-031210-101400>
[Accessed June 18, 2016].
- Cunha-Melo, J. et al., 1991. Acute gastric mucosal injury induced by toxins from *Tityus serrulatus* scorpion venom: a novel experimental model in the rat. *Toxicon*. Available at:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004101019190127D> [Accessed May 21, 2016].
- D'suze, G. et al., 2003. Relationship between plasmatic levels of various cytokines, tumour necrosis factor, enzymes, glucose and venom concentration following *Tityus* scorpion sting. *Toxicon*. Available at:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010102003318> [Accessed May 21, 2016].
- Daemi, H. & Barikani, M., 2012. Synthesis and characterization of calcium alginate nanoparticles, sodium homopolymannuronate salt and its calcium nanoparticles. *Scientia Iranica*, 19(6), pp.2023–2028.
- DeGrasse, J.A., 2012. A Single-Stranded DNA Aptamer That Selectively Binds to *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B K. Kourentzi, ed. *PLoS ONE*, 7(3), p.e33410. Available at:
<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0033410> [Accessed June 18, 2016].
- Delori, P., Rietschoten, J. Van & Rochat, H., 1981. Scorpion venoms and neurotoxins: an immunological study. *Toxicon*. Available at:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010181900441> [Accessed May 21, 2016].
- 2016].
- Devaux, C. et al., 1997. Monoclonal antibodies neutralizing the toxin II from *Androctonus australis hector* scorpion venom: usefulness of a synthetic, non-toxic analog. *FEBS letters*. Available at:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014579397008260> [Accessed May 21, 2016].
- Devaux, C. et al., 2004. Quantitative variability in the biodistribution and in toxinokinetic studies of the three main alpha toxins from the *Androctonus australis hector* scorpion venom. *Toxicon*, 43(6), pp.661–669.
- Dick, C. et al., 2003. The role of free radicals in the toxic and inflammatory effects of four different ultrafine particle types. *Inhalation toxicology*. Available at:
<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/08958370304454> [Accessed May 21, 2016].
- Diego-García, E., Batista, C. & García-Gómez, B., 2005. The Brazilian scorpion *Tityus costatus* Karsch: genes, peptides and function. *Toxicon*. Available at:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010104004453> [Accessed May 21, 2016].
- Djuretic, I. et al., 2007. Transcription factors T-bet and Runx3 cooperate to activate Ifng and silence Il4 in T helper type 1 cells. *Nature*. Available at:
<http://www.nature.com/ni/journal/v8/n2/abs/n1424.html> [Accessed June 18, 2016].
- Donaldson, G., Seemungal, T. & Bhowmik, A., 2002. Relationship between exacerbation frequency and lung function decline in chronic obstructive pulmonary disease.

- Thorax*. Available at:
<http://thorax.bmj.com/content/57/10/847.short> [Accessed May 21, 2016].
- Dounighi, Nm. et al., 2013. Alginate Nanoparticles as a Promising Adjuvant and Vaccine Delivery System. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 75(4), p.442. Available at:
<http://www.ijpsonline.com/text.asp?2013/75/4/442/119829> [Accessed August 24, 2016].
- Dudin, A., Rambaud-Cousson, A. & Thalji, A., 1990. Scorpion sting in children in the Jerusalem area: a review of 54 cases. *Annals of tropical*. Available at:
<http://europepmc.org/abstract/med/1719920> [Accessed May 21, 2016].
- Eccles, C. et al., 1994. Tityustoxin-K α , from scorpion venom, blocks voltage-gated, non-inactivating potassium current in cultured central neurons. Available at:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0028390894901252> [Accessed May 21, 2016].
- Eiserich, J. et al., 1998. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature*. Available at:
<http://www.nature.com/nature/journal/v391/n6665/abs/391393a0.html> [Accessed September 3, 2016].
- Ekimov, A.I., Efros, A.L. & Onushchenko, A.A., 1985. Quantum size effect in semiconductor microcrystals. *Solid State Communications*, 56(11), pp.921–924. Available at:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0038109885800259> [Accessed August 20, 2016].
- Eldridge, J. et al., 1989. Biodegradable microspheres: vaccine delivery system for oral immunization. *New Strategies for Oral*. Available at:
http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-74529-4_6 [Accessed May 21, 2016].
- Ellington, A. & Szostak, J., 1990. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *nature*. Available at:
https://www.researchgate.net/profile/Jack_Szostak/publication/21459179_In_Vitro_Selection_of_RNA_Molecules_that_Bind_Specific_Ligands/links/5440f9960cf2a6a049a35767.pdf [Accessed June 18, 2016].
- Estanqueiro, M., Amaral, M. & Conceição, J., 2015. Nanotechnological carriers for cancer chemotherapy: the state of the art. *Colloids and Surfaces B*: Available at:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776514007280> [Accessed August 20, 2016].
- Farré, M. et al., 2010. First determination of C 60 and C 70 fullerenes and N-methylfulleropyrrolidine C 60 on the suspended material of wastewater effluents by liquid chromatography. *Journal of*. Available at:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022169409004910> [Accessed May 21, 2016].
- Felber, A., Castagner, B. & Elsabahy, M., 2011. siRNA nanocarriers based on methacrylic acid copolymers. *Journal of controlled*. Available at:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365910010266> [Accessed August 28, 2016].

- Fernandez, N. & Kidney, B., 2007. Alkaline phosphatase: beyond the liver. *Veterinary clinical pathology*. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-165X.2007.tb00216.x/full> [Accessed August 27, 2016].
- Ferreira, L., Alves, E. & Henriques, O., 1993. Peptide T, a novel bradykinin potentiator isolated from *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/004101019390253F> [Accessed May 21, 2016].
- Foerster, J. & Bachman, M., 2015. Beyond passive immunization: toward a nanoparticle-based IL-17 vaccine as first in class of future immune treatments. *Nanomedicine (London, England)*, 10(8), pp.1361–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25955128> [Accessed September 3, 2016].
- Fonseca, J. et al., 2009. Interleukin-6 as a key player in systemic inflammation and joint destruction. *Autoimmunity reviews*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568997209000172> [Accessed August 23, 2016].
- Fontecilla-Camps, J., 1988. Orthorhombic crystals and three-dimensional structure of the potent toxin II from the scorpion *Androctonus australis Hector*. *Proceedings of the*. Available at: <http://www.pnas.org/content/85/20/7443.short> [Accessed May 21, 2016].
- Förster, R. et al., 1996. A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen. *Cell*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867400817985> [Accessed June 18, 2016].
- Fubini, B., 1997. Surface reactivity in the pathogenic response to particulates. *Environmental health perspectives*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1470126/> [Accessed May 21, 2016].
- Fukuhara, Y., Reis, M. & Dellalibera-Joviliano, R., 2003. Increased plasma levels of IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- α in patients moderately or severely envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. *Toxicon*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010102002088> [Accessed May 21, 2016].
- G., R., 1926. Procédes pour accroître la production des antitoxines. *Ann. Inst. Pasteur. Pans*, 40, pp.1–10.
- Gamvrellis, A. et al., 2004. Vaccines that facilitate antigen entry into dendritic cells. *Immunology and cell*. Available at: <http://www.nature.com/icb/journal/v82/n5/abs/icb200477a.html> [Accessed May 21, 2016].
- Gan, Q. & Wang, T., 2007. Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier—systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776507001671> [Accessed May 21, 2016].
- Geiser, M., Schürch, S. & Gehr, P., 2003. Influence of surface chemistry and topography of

- particles on their immersion into the lung's surface-lining layer.
- Journal of Applied Physiology*
- . Available at:
- <http://jap.physiology.org/content/94/5/1793.short>
- [Accessed May 21, 2016].
- Ghalim, N. et al., 2000. Scorpion envenomation and serotherapy in Morocco. *The American journal of*. Available at: <http://www.ajtmh.org/content/62/2/277.short> [Accessed May 21, 2016].
- Gombotz, W. & Wee, S., 2012. Protein release from alginate matrices. *Advanced drug delivery reviews*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X12002670> [Accessed August 31, 2016].
- Gordon, D. et al., 2007. The differential preference of scorpion α -toxins for insect or mammalian sodium channels: implications for improved insect control. *Toxicon*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010106004296> [Accessed May 21, 2016].
- Goyffon, M., 2002. Le scorpionisme. *Revue Française des Laboratoires*, 2002(342), pp.41–48.
- Goyffon, M. and J.L., 1973. Une nouvelle sous-espèce d' *Androctonus australis* (L.) (Scorpion, Buthidae): *A. australis garzonii* n. ssp. Caractéristiques morphologiques, écologiques et biochimiquesNo Title. *Bull. Soc. Zool*, 98, pp.137–144.
- Goyffon, M., Vachon, M. & Broglio, N., 1982. Epidemiological and clinical characteristics of the scorpion envenomation in Tunisia. *Toxicon*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010182902409> [Accessed May 21, 2016].
- Grant, G. et al., 1973. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model. *FEBS letters*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0014579373807707> [Accessed May 21, 2016].
- GREENE, B., TAYLOR, H. & AIKAWA, M., 1981. Cellular killing of microfilariae of *Onchocerca volvulus*: eosinophil and neutrophil-mediated immune serum-dependent destruction. *Journal of Immunology*. Available at: <http://www.cabdirect.org/abstracts/19822901616.html> [Accessed May 21, 2016].
- Gregoriadis, G., 1976. The carrier potential of liposomes in biology and medicine. *New England Journal of Medicine*. Available at: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM197609232951305> [Accessed May 21, 2016].
- Griffete, N. et al., 2015. Design of magnetic molecularly imprinted polymer nanoparticles for controlled release of doxorubicin under an alternative magnetic field in athermal conditions. *Nanoscale*. Available at: <http://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2015/nr/c5nr06133d> [Accessed June 20, 2016].
- Gueron, M., Ilia, R. & Sofer, S., 1992. The cardiovascular system after scorpion envenomation. A review. *Journal of Toxicology: Clinical*. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/15563659209038636> [Accessed May 21, 2016].
- Gundberg, C. et al., 2002. Patterns of osteocalcin

- and bone specific alkaline phosphatase by age, gender, and race or ethnicity. *Bone*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S875632820200902X> [Accessed August 27, 2016].
- Gupta, R., 1998. Aluminum compounds as vaccine adjuvants. *Advanced drug delivery reviews*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X98000088> [Accessed May 21, 2016].
- GURROLA, G., ROSATI, B. & ROCCHETTI, M., 1999. A toxin to nervous, cardiac, and endocrine ERG K⁺ channels isolated from *Centruroides noxius* scorpion venom. *The FASEB Journal*. Available at: <http://www.fasebj.org/content/13/8/953.short> [Accessed May 21, 2016].
- Gustafson, R. et al., 2008. Rapid subcutaneous immunoglobulin administration every second week results in high and stable serum immunoglobulin G levels in patients with primary antibody deficiencies. *Clinical & Experimental Immunology*, 152(2), pp.274–279. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2249.2008.03620.x> [Accessed August 31, 2016].
- Hackstein, H. & Thomson, A., 2004. Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs. *Nature Reviews Immunology*. Available at: <http://www.nature.com/nri/journal/v4/n1/abs/nri1256.html> [Accessed June 18, 2016].
- Haddadine, N. et al., 2014. Preparation and characterization of carbopol/silver nanoparticles composites obtained by heating process for antimicrobial application. *Journal of Polymer*. Available at: <http://link.springer.com/article/10.1007/s10965-014-0477-5> [Accessed June 20, 2016].
- Hammoudi-Triki, D. et al., 2004. Epidemiological data, clinical admission gradation and biological quantification by ELISA of scorpion envenomations in Algeria: effect of immunotherapy. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 98(4), pp.240–250.
- Haque, S. et al., 2014. Development and evaluation of brain targeted intranasal alginate nanoparticles for treatment of depression. *Journal of Psychiatric Research*, 48(1), pp.1–12.
- Hati, R., Mandal, M. & Hati, A., 1990. Active immunization of rabbit with gamma irradiated Russell's viper venom toxoid. *Toxicon*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0041010190900194> [Accessed May 21, 2016].
- Hoebe, K., Janssen, E. & Beutler, B., 2004. The interface between innate and adaptive immunity. *Nature immunology*. Available at: <http://www.nature.com/ni/journal/v5/n10/full/ni1004-971.html> [Accessed May 21, 2016].
- HOMMEL, D., HULIN, A. & LOURENCO, W.R., Accident scorpionique létal par tityus Cambridgei Pocock : À propos d'un cas en Guyane Française. *Concours médical*, 122(7), pp.481–484.
- Honda-Okubo, Y., Saade, F. & Petrovsky, N., 2012. AdvaxTM, a polysaccharide adjuvant derived from delta inulin, provides improved

- influenza vaccine protection through broad-based enhancement of adaptive immune responses. *Vaccine*, 30(36), pp.5373–5381.
- Horcajada, P. et al., 2010. Porous metal-organic-framework nanoscale carriers as a potential platform for drug delivery and imaging. *Nature materials*. Available at: <http://www.nature.com/nmat/journal/v9/n2/abs/nmat2608.html> [Accessed June 17, 2016].
- Hua, S., 2015. Lipid-based nano-delivery systems for skin delivery of drugs and bioactives. *Frontiers in Pharmacology*, 6, p.219. Available at: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fphar.2015.00219/abstract> [Accessed August 21, 2016].
- Huang, M., Khor, E. & Lim, L., 2004. Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles: effects of molecular weight and degree of deacetylation. *Pharmaceutical research*. Available at: <http://link.springer.com/article/10.1023/B:PHAM.0000016249.52831.a5> [Accessed May 21, 2016].
- Huang, X. et al., 2006. Aspartate aminotransferase (AST/GOT) and alanine aminotransferase (ALT/GPT) detection techniques. *Sensors*. Available at: <http://www.mdpi.com/1424-8220/6/7/756/htm> [Accessed August 27, 2016].
- Hwang, E., Szabo, S. & Schwartzberg, P., 2005. T helper cell fate specified by kinase-mediated interaction of T-bet with GATA-3. *Science*. Available at: <http://science.sciencemag.org/content/307/5708/430.short> [Accessed June 18, 2016].
- Ilinskaya, A. & Dobrovolskaia, M., 2016. Understanding the immunogenicity and antigenicity of nanomaterials: Past, present and future. *Toxicology and applied pharmacology*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X16300059> [Accessed August 20, 2016].
- Ismail, M., 1995. The scorpion envenoming syndrome. *Toxicon*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0041010195000057> [Accessed May 21, 2016].
- Ismail, M. & Abd-Elsalam, M., 1998. Pharmacokinetics of 125 I-labelled IgG, F(ab')₂ and Fab fractions of scorpion and snake antivenins: merits and potential for therapeutic use. *Toxicon*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010198001445> [Accessed May 21, 2016].
- Istenič, K. et al., 2015. Encapsulation of resveratrol into Ca-alginate submicron particles. *Journal of Food Engineering*, 167, pp.196–203.
- Iwasaki, A. & Medzhitov, R., 2015. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature immunology*. Available at: <http://www.nature.com/ni/journal/v16/n4/abs/ni.3123.html> [Accessed August 29, 2016].
- Jabbari, E., 2009. Targeted delivery with peptidomimetic conjugated self-assembled nanoparticles. *Pharmaceutical research*. Available at: <http://link.springer.com/article/10.1007/s11095-008-9802-1> [Accessed June 17, 2016].
- Jellinek, D. et al., 1994. Inhibition of receptor binding by high-affinity RNA ligands to vascular endothelial growth factor.

- Biochemistry*. Available at:
<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi00200a028> [Accessed June 18, 2016].
- Jones, K.S., 2008. Biomaterials as vaccine adjuvants. *Biotechnology Progress*, 24(4), pp.807–814. Available at:
<http://doi.wiley.com/10.1002/btpr.10> [Accessed June 17, 2016].
- Jørgensen, T., Sletmoen, M. & Draet, K., 2007. Influence of oligoguluronates on alginate gelation, kinetics, and polymer organization. Available at:
<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm070208d> [Accessed May 21, 2016].
- Karnad, D. et al., 1989. Captopril for correcting diuretic induced hypotension in pulmonary oedema after scorpion sting. *BMJ*. Available at:
<http://www.bmj.com/content/bmj/298/6685/1430.full.pdf> [Accessed May 21, 2016].
- Keiding, R., Hörder, M. & Denmark, W., 1974. Recommended methods for the determination of four enzymes in blood. *Journal of Clinical* Available at:
<http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/00365517409082499> [Accessed August 27, 2016].
- Kenneth Todar, 2012. *The Good, the Bad, and the Deadly*. Available at:
http://textbookofbacteriology.net/adaptive_2.html.
- KILLIP, T. & Payne, M., 1960. High serum transaminase activity in heart disease circulatory failure and hepatic necrosis. *Circulation*. Available at:
<http://circ.ahajournals.org/content/21/5/646.short> [Accessed September 3, 2016].
- Kim, C., Rott, L. & Kunkel, E., 2001. Rules of chemokine receptor association with T cell polarization in vivo. *The Journal of*. Available at:
<http://www.jci.org/articles/view/JCI200113543> [Accessed June 18, 2016].
- Kim, H. et al., 2010. Amphiphilic Poly(Amino Acid) Nanoparticles Induce Size-Dependent Dendritic Cell Maturation. *Advanced Functional Materials*, 20(22), pp.3925–3931.
- Koga, T., Wand-Wurttenberger, A. & DeBruyn, J., 1989. T cells against a bacterial heat shock protein recognize stressed macrophages. Available at:
<http://science.sciencemag.org/content/245/4922/1112.short> [Accessed May 21, 2016].
- KOPEYAN, C. & MARTINEZ, G., 1979. Amino acid sequence of neurotoxin III of the scorpion *Androctonus australis Hector*. *European Journal of*. Available at:
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1432-1033.1979.tb12931.x/full> [Accessed May 21, 2016].
- Krifi, M. et al., 1998. Development of an ELISA for the detection of scorpion venoms in sera of humans envenomed by *Androctonus australis garzonii* (Aag) and *Buthus occitanus*. *Toxicon*. Available at:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010197001360> [Accessed May 21, 2016].
- Krifi, M., Ayeb, M. & Dellagi, K., 1996. procedures and parameters for better evaluation of *Androctonus australis garzonii* (Aag) and *Buthus occitanus tunetanus* (Bot) scorpion envenomations and specific *Toxicon*. Available at:

- <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010195001301> [Accessed May 21, 2016].
- Kroto, H.W., C 60 —The Third Man.
- Kumar, S. et al., 2015. Shape and size-dependent immune response to antigen-carrying nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 220(Pt A), pp.141–148.
- Kumari, A., Yadav, S. & Yadav, S., 2010. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776509004111> [Accessed June 20, 2016].
- Kurosaki, T., Kometani, K. & Ise, W., 2015. Memory B cells. *Nature Reviews Immunology*, 15(3), pp.149–159. Available at: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nri3802> [Accessed October 19, 2016].
- Kuzmenkov, A.I. et al., 2016. Kalium: a database of potassium channel toxins from scorpion venom. *Database*, 2016, p.baw056. Available at: <http://database.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/database/baw056> [Accessed August 17, 2016].
- Laraba-Djebari, F. et al., 1994. The kaliotoxin family enlarged. Purification, characterization, and precursor nucleotide sequence of KTX2 from *Androctonus australis* venom. *Journal of Biological*. Available at: <http://www.jbc.org/content/269/52/32835.short> [Accessed May 21, 2016].
- Laraba-Djebari, F., Adi-Bessalem, S. & Hammoudi-Triki, D., 2015. Scorpion Venoms: Pathogenesis and Biotherapies. In *Scorpion Venoms*. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 63–85. Available at: http://link.springer.com/10.1007/978-94-007-6404-0_2 [Accessed May 21, 2016].
- LARABA-DJEBARI F., H.D., 1998. Utilisation de la fraction toxique majoritaire isolée à partir du venin de scorpion *Androctonus australis* Hector d'Algérie dans la valorisation du sérum anti-scorpionique. *Arch. Inst. Pasteur d'Algérie*, 62, pp.254–266.
- Lauridsen, L.H. et al., 2012. Rapid One-Step Selection Method for Generating Nucleic Acid Aptamers: Development of a DNA Aptamer against α -Bungarotoxin M. Antopolsky, ed. *PLoS ONE*, 7(7), p.e41702. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0041702> [Accessed June 18, 2016].
- Laux, H., Butz, T. & Rahimian, I., 2000. Thermogravimetric investigation of the influence of colloidal phase on the processing properties of crude oil residues. *Oil & Gas Science*. Available at: http://ogst.ifpenergiesnouvelles.fr/articles/ogst/abs/2000/03/laux_v55n3 [Accessed June 20, 2016].
- LeBien, T. & Tedder, T., 2008. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*. Available at: <http://www.bloodjournal.org/content/112/5/1570.short> [Accessed September 2, 2016].
- Lebron, J., Wolf, J. & Kaplanski, C., 2005. Ensuring the quality, potency and safety of vaccines during preclinical development.

- review of vaccines*. Available at:
<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1586/14760584.4.6.855> [Accessed August 23, 2016].
- Legros, C. et al., 1998. Evidence for a new class of scorpion toxins active against K⁺ channels. *FEBS letters*. Available at:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014579398007807> [Accessed May 21, 2016].
- Legros, C., Bougis, P. & Martin-Eauclaire, M., 1997. Genomic organization of the KTX2 gene, encoding a “short” scorpion toxin active on K⁺ channels. *FEBS letters*. Available at:
[http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1016/S0014-5793\(96\)01492-5/full](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1016/S0014-5793(96)01492-5/full) [Accessed May 21, 2016].
- Leleux, J. & Roy, K., 2013. Micro and Nanoparticle-Based Delivery Systems for Vaccine Immunotherapy: An Immunological and Materials Perspective. *Advanced Healthcare Materials*, 2(1), pp.72–94.
- Lighvani, A., Frucht, D. & Jankovic, D., 2001. T-bet is rapidly induced by interferon- γ in lymphoid and myeloid cells. *Proceedings of the*. Available at:
<http://www.pnas.org/content/98/26/15137.short> [Accessed June 18, 2016].
- Lila, B.-A. & Laraba-Djebari, F., 2011. Enhanced immune sera and vaccine: Safe approach to treat scorpion envenoming. *Vaccine*, 29(48), pp.8951–8959.
- Linkov, I., Satterstrom, F. & Corey, L., 2008. Nanotoxicology and nanomedicine: making hard decisions. : *Nanotechnology, Biology and ...*. Available at:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1549963408000026> [Accessed May 21, 2016].
- Liu, L. et al., 2016. Immune responses to vaccines delivered by encapsulation into and/or adsorption onto cationic lipid-PLGA hybrid nanoparticles. *Journal of Controlled Release*. Available at:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365916300451>.
- Liu, X. et al., 2007. Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. Available at:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776506002554> [Accessed May 21, 2016].
- Liu, X. et al., 2016. Vaccination with a co-expression DNA plasmid containing GAD65 fragment gene and IL-10 gene induces regulatory CD4⁺ T cells that prevent experimental. *research and reviews*. Available at:
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/dmrr.2780/pdf> [Accessed September 3, 2016].
- LOURENCO, W.R., Diversité de la faune scorpionique de la région amazonienne; centres d’endémisme; nouvel appui à la théorie des refuges forestiers du Pléistocène. *Amazoniana*, 94(4), pp.559–580.
- Luckheeram, R.V. et al., 2012. CD4⁺T cells: differentiation and functions. *Clinical & developmental immunology*, 2012, p.925135. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22474485> [Accessed June 18, 2016].
- Luo, H. et al., 2015. Eosinophil Degranulation and the Release of Eosinophil Peroxidase

- Contributes to the Induced Inflammation Occurring in Mice Following Skin Exposure to TMA. *Journal of Allergy*. Available at: <http://search.proquest.com/openview/bf140f8cae9d10b3c18ae07cdae6d975/1?pq-origsite=gscholar> [Accessed September 3, 2016].
- Lycke, N. & Holmgren, J., 1986. Strong adjuvant properties of cholera toxin on gut mucosal immune responses to orally presented antigens. *Immunology*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1453161/> [Accessed August 29, 2016].
- MacLennan, J. et al., 2001. Immunologic memory 5 years after meningococcal A/C conjugate vaccination in infancy. *The Journal of infectious diseases*, 183(1), pp.97–104. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11087205> [Accessed August 31, 2016].
- Magenheim, B., Levy, M. & Benita, S., 1993. A new in vitro technique for the evaluation of drug release profile from colloidal carriers-ultrafiltration technique at low pressure. *International journal of pharmaceutics*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378517393900158> [Accessed May 21, 2016].
- Magrez, A. et al., 2006. Cellular toxicity of carbon-based nanomaterials. *Nano*. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/nl060162e> [Accessed May 21, 2016].
- Malissen, B., Tamoutounour, S. & Henri, S., 2014. The origins and functions of dendritic cells and macrophages in the skin. *Nature Reviews Immunology*, 14(6), pp.417–428.
- Mamo, T. & Poland, G.A., 2012. Nanovaccinology: The next generation of vaccines meets 21st century materials science and engineering. *Vaccine*, 30(47), pp.6609–6611.
- Marciani, D., 2003. Vaccine adjuvants: role and mechanisms of action in vaccine immunogenicity. *Drug discovery today*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359644603028642> [Accessed May 21, 2016].
- MARTIN-EAUCLAIRE, M. & SØGAARD, M., 1994. Production of active, insect-specific scorpion neurotoxin in yeast. *European Journal of*. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1432-1033.1994.tb19036.x/full> [Accessed May 21, 2016].
- Mbah, C., Builders, P. & Attama, A., 2014. Nanovesicular carriers as alternative drug delivery systems: ethosomes in focus. *Expert opinion on drug delivery*. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1517/17425247.2013.860130> [Accessed May 21, 2016].
- McColl, S., 2002. Chemokines and dendritic cells: a crucial alliance. *Immunology and cell biology*. Available at: <http://www.nature.com/icb/journal/v80/n5/abs/icb200268a.html> [Accessed June 18, 2016].
- McConkey, S. et al., 2003. Enhanced T-cell immunogenicity of plasmid DNA vaccines boosted by recombinant modified vaccinia virus Ankara in humans. *Nature medicine*. Available at: <http://www.nature.com/nm/journal/v9/n6/abs/nm881.html> [Accessed August 23, 2016].

- McShane, H. & Williams, A., 2014. A review of preclinical animal models utilised for TB vaccine evaluation in the context of recent human efficacy data. *Tuberculosis*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1472979213001984> [Accessed August 23, 2016].
- Mehnert, W. & Mäder, K., 2001. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Advanced drug delivery reviews*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X01001053> [Accessed May 21, 2016].
- Mei, H. et al., 2009. Blood-borne human plasma cells in steady state are derived from mucosal immune responses. *Blood*. Available at: <http://www.bloodjournal.org/content/113/11/2461.short> [Accessed September 2, 2016].
- Meki, A. & El-Dean, Z., 1998. Serum interleukin-1 β , interleukin-6, nitric oxide and α 1-antitrypsin in scorpion envenomed children. *Toxicon*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010198001068> [Accessed May 21, 2016].
- Meki, A., Nassar, A. & Rochat, H., 1995. A bradykinin-potentiating peptide (peptide K 12) isolated from the venom of Egyptian scorpion *Buthus occitanus*. *Peptides*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0196978195020365> [Accessed May 21, 2016].
- Michalet, X. et al., 2005. Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. Available at: <http://science.sciencemag.org/content/307/5709/538.short> [Accessed May 21, 2016].
- Mignon, B., 2010. Rôle des cellules Th17 dans les maladies infectieuses et auto-immunes. *Ann. Méd. Vét*, 10(154), pp.104–112.
- Mitchell, P., 2001. Turning the spotlight on cellular imaging. *Nature biotechnology*. Available at: http://www.nature.com/nbt/journal/v19/n11/box/nbt1101-1013_BX2.html [Accessed May 21, 2016].
- Mjahed, H. et al., 2009. Hole formation induced by ionic strength increase in exponentially growing multilayer films. *Soft Matter*. Available at: <http://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2009/sm/b819066f> [Accessed May 21, 2016].
- Mohanraj, V. & Chen, Y., 2007. Nanoparticles-a review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. Available at: <http://www.ajol.info/index.php/tjpr/article/view/14634> [Accessed June 15, 2016].
- Montemartini, M., Santome, J. & Cazzulo, J., 1993. Purification and partial structural and kinetic characterization of tyrosine aminotransferase from epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical*. Available at: <http://www.biochemj.org/content/292/3/901.abstract> [Accessed August 27, 2016].
- Moon, J., Suh, H. & Li, A., 2012. Enhancing humoral responses to a malaria antigen with nanoparticle vaccines that expand Tfh cells and promote germinal center induction. *Proceedings of the*. Available at: <http://www.pnas.org/content/109/4/1080.short> [Accessed August 22, 2016].

- Moradhaseli, S. et al., 2013. Preparation and Characterization of Sodium Alginate Nanoparticles Containing ICD-85 (Venom Derived Peptides). *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 4(3), pp.534–542.
- Moschos, S. et al., 2005. Comparative immunomodulatory properties of a chitosan-MDP adjuvant combination following intranasal or intramuscular immunisation. *Vaccine*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X04007820> [Accessed May 21, 2016].
- Mosmann, T. & Coffman, R., 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual review of immunology*. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.iy.07.040189.001045> [Accessed June 18, 2016].
- Motwani, S. et al., 2008. Chitosan–sodium alginate nanoparticles as submicroscopic reservoirs for ocular delivery: formulation, optimisation and in vitro characterisation. *European Journal of*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939641107003086> [Accessed June 20, 2016].
- Mozafari, M.R. & Johnson, C., 2008. Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. *Journal of liposome*. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/08982100802465941> [Accessed May 21, 2016].
- MuÈller, R., MaÈder, K. & Gohla, S., 2000. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery—a review of the state of the art. *European journal of pharmaceutics and*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939641100000874> [Accessed August 21, 2016].
- Mukherjee, B., Patra, B. & Layek, B., 2007. Sustained release of acyclovir from nano-liposomes and nano-niosomes: an in vitro study. *International journal of*. Available at: https://www.researchgate.net/profile/Arup_Mukherjee3/publication/6116897_Sustained_release_of_acyclovir_from_nano-liposomes_and_nano-niosomes_An_in_vitro_study/links/5452f1c60cf26d5090a3806e.pdf [Accessed May 21, 2016].
- Müller, R. et al., 1995. Solid lipid nanoparticles (SLN): an alternative colloidal carrier system for controlled drug delivery. *European Journal of*. Available at: <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=3411729> [Accessed May 21, 2016].
- Mundargi, R., Babu, V. & Rangaswamy, V., 2008. Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly (D, L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. *Journal of Controlled*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016836590700541X> [Accessed August 30, 2016].
- Mutoloki, S., Alexandersen, S. & Evensen, Ø., 2004. inflammatory reactions relative to side-effects and growth of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) following intraperitoneal injection with oil-adjuvanted vaccines. *Fish & Shellfish*

- Immunology*. Available at:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464803001475> [Accessed September 2, 2016].
- Nanda, R.K. et al., 2012. An effective mannosylated chitosan nanoparticle DNA vaccine for FMD virus. *Virologica Sinica*, 27(6), pp.372–375. Available at:
<http://link.springer.com/10.1007/s12250-012-3269-2> [Accessed May 21, 2016].
- Nel, A. et al., 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*. Available at:
<http://science.sciencemag.org/content/311/5761/622.short> [Accessed May 21, 2016].
- Nouri, A. & Laraba-Djebari, F., 2015. Enhancement of long-lasting immunoprotective effect against *Androctonus australis hector* envenomation using safe antigens: Comparative role of MF59 and Alum adjuvants. *Vaccine*, 33(43), pp.5756–5763.
- O'Hagan, D. & Singh, M., 2003. Microparticles as vaccine adjuvants and delivery systems. *Expert review of vaccines*. Available at:
<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1586/14760584.2.2.269> [Accessed May 21, 2016].
- OBERDÖRSTER, G., 1996. Significance of particle parameters in the evaluation of exposure-dose response relationships of inhaled particles. *Particulate Science and Technology*. Available at:
<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/02726359608906690> [Accessed May 21, 2016].
- Oberdörster, G., Oberdörster, E. & Oberdörster, J., 2005. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental health*. Available at:
<http://www.jstor.org/stable/3436201> [Accessed May 21, 2016].
- Olamendi-Portugal, T., Somodi, S. & Fernández, J., 2005. Novel α -KTx peptides from the venom of the scorpion *Centruroides elegans* selectively blockade Kv1. 3 over IKCa1 K⁺ channels of T cells. *Toxicon*. Available at:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010105001960> [Accessed May 21, 2016].
- Osborne, S., Matsumura, I. & Ellington, A., 1997. Aptamers as therapeutic and diagnostic reagents: problems and prospects. *Current opinion in chemical*. Available at:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1367593197801020> [Accessed June 18, 2016].
- Ostiguy, C. et al., 2010. Studies and Research Projects Engineered Nanoparticles Chemical Substances and Biological Agents. *irsst canada*.
- Otterlei, M., Østgaard, K. & Skjåk-Bræk, G., 1991. Induction of cytokine production from human monocytes stimulated with alginate. *Journal of*. Available at:
http://journals.lww.com/immunotherapy-journal/Abstract/1991/08000/Induction_of_Cytokine_Production_from_Human.7.aspx [Accessed August 31, 2016].
- Oussedik-Oumehdi, H. & Laraba-Djebari, F., 2008. Irradiated *Cerastes cerastes* Venom as a Novel Tool for Immunotherapy. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 30(1), pp.37–52. Available at:
<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/>

- 08923970701812324 [Accessed May 21, 2016].
- Oyewumi, M.O., Kumar, A. & Cui, Z., 2010. Nano-microparticles as immune adjuvants: correlating particle sizes and the resultant immune responses. *Expert review of vaccines*, 9(9), pp.1095–107.
- Ozkan, O. & Carhan, A., 2008. The neutralizing capacity of *Androctonus crassicauda* antivenom against *Mesobuthus eupeus* scorpion venom. *Toxicon*, 52(2), pp.375–379.
- Panyam, J. & Labhasetwar, V., 2003. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Advanced drug delivery reviews*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X02002284> [Accessed June 19, 2016].
- Parak, W. et al., 2003. Conformation of oligonucleotides attached to gold nanocrystals probed by gel electrophoresis. *Nano Letters*. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/nl025888z> [Accessed May 21, 2016].
- Pardeike, J., Hommoss, A. & Müller, R., 2009. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *International journal of pharmaceutics*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517308006996> [Accessed May 21, 2016].
- Pardo-Lopez, L. et al., 2002. Mapping the Binding Site of a Human ether-a-go-go-related Gene-specific Peptide Toxin (ErgTx) to the Channel's Outer Vestibule. *Journal of Biological*. Available at: <https://www.jbc.org/content/277/19/16403.full> [Accessed May 21, 2016].
- Pashine, A., Valiante, N. & Ulmer, J., 2005. Targeting the innate immune response with improved vaccine adjuvants. *Nature medicine*. Available at: <http://www.nature.com/nm/journal/v11/n4s/full/nm1210.html> [Accessed May 21, 2016].
- Paul, W. & Seder, R., 1994. Lymphocyte responses and cytokines. Review. *Cell*. Available at: [http://www.cell.com/cell/pdf/0092-8674\(94\)90332-8.pdf](http://www.cell.com/cell/pdf/0092-8674(94)90332-8.pdf) [Accessed June 18, 2016].
- Pelhate, M. & Zlotkin, E., 1982. Actions of insect toxin and other toxins derived from the venom of the scorpion *Androctonus australis* on isolated giant axons of the cockroach (*Periplaneta americana*). *Journal of Experimental Biology*. Available at: <http://jeb.biologists.org/content/97/1/67.short> [Accessed May 21, 2016].
- Perrie, Y. et al., 2008. Vaccine adjuvant systems: enhancing the efficacy of sub-unit protein antigens. *International journal of*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517308003438> [Accessed May 21, 2016].
- Pessini, A. et al., 2006. Mediators involved in the febrile response induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom in rats. *Toxicon*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010106002376> [Accessed May 21, 2016].
- Pessini, A., Souza, A. de & Faccioli, L., 2003. Time course of acute-phase response induced by *Tityus serrulatus* venom and TsTX-I in mice.

- International*. Available at:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S156757690300078X> [Accessed May 21, 2016].
- Petricevich, V.L., 2010. Scorpion Venom and the Inflammatory Response. *Mediators of Inflammation*, 2010, pp.1–16. Available at:
<http://www.hindawi.com/journals/mi/2010/903295/> [Accessed May 21, 2016].
- Petrovsky, N. & Aguilar, J.C., 2004. Vaccine adjuvants: current state and future trends. *Immunology and cell biology*, 82(5), pp.488–96.
- Petukhova, N. & Gasanova, T., 2013. Immunogenicity and protective efficacy of candidate universal influenza A nanovaccines produced in plants by tobacco mosaic virus-based vectors. *Current*. Available at:
<http://www.ingentaconnect.com/content/ben/cpd/2013/00000019/00000031/art00013> [Accessed August 23, 2016].
- Pintar, A., Possani, L. & Delepierre, M., 1999. Solution structure of toxin 2 from *Centruroides noxius* Hoffmann, a β -scorpion neurotoxin acting on sodium channels. *Journal of molecular biology*. Available at:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283699926116> [Accessed May 21, 2016].
- Pinto-Alphandary, H. & Andreumont, A., 2000. Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications. *International journal of*. Available at:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924857999001211> [Accessed May 21, 2016].
- Poovi, G. et al., 2011. Preparation and Characterization of Repaglinide Loaded Chitosan Polymeric Nanoparticles. *Research Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 1(1), pp.12–24. Available at:
<http://www.scialert.net/abstract/?doi=rjnn.2011.12.24> [Accessed August 28, 2016].
- Possani, L., Martin, B. & Svendsen, I., 1982. The primary structure of noxiustoxin: a K⁺ channel blocking peptide, purified from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Carlsberg Research*. Available at:
<http://link.springer.com/article/10.1007/BF02907789> [Accessed May 21, 2016].
- Powers, K., Brown, S. & Krishna, V., 2006. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials. Part VI. Characterization of nanoscale particles for toxicological evaluation. *Toxicological*. Available at:
<http://toxsci.oxfordjournals.org/content/90/2/296.short> [Accessed May 21, 2016].
- Prakash, S. & Manavalan, R., 2012. Development, characterization and/toxicity evaluation of nanoparticles of andrographolide. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci*. Available at:
<http://www.ijppsjournal.com/Vol4Suppl1/3329.pdf> [Accessed September 3, 2016].
- Preining, O., 1998. The physical nature of very, very small particles and its impact on their behaviour. *Journal of Aerosol Science*. Available at:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021850297100465> [Accessed May 21, 2016].
- Prete, G., 1992. Human Th1 and Th2 lymphocytes: their role in the pathophysiology of atopy. *Allergy*. Available at:

- <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1398-9995.1992.tb00662.x/full> [Accessed June 18, 2016].
- Price, J.L. et al., Preclinical safety assessment of a recombinant plague vaccine (rF1V). *International journal of toxicology*, 32(5), pp.327–35.
- Quaak, S.G.L. et al., 2010. Naked plasmid DNA formulation: effect of different disaccharides on stability after lyophilisation. *AAPS PharmSciTech*, 11(1), pp.344–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20204715> [Accessed June 18, 2016].
- Radbruch, A., Muehlinghaus, G. & Luger, E., 2006. Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Reviews Immunology*. Available at: <http://www.nature.com/nri/journal/v6/n10/abs/nri1886.html> [Accessed September 2, 2016].
- Raei, M. et al., 2015. Nano-encapsulation of isolated lactoferrin from camel milk by calcium alginate and evaluation of its release. *International Journal of Biological Macromolecules*, 79, pp.669–673.
- Rajaonarivony, M. & Vauthier, C., 1993. Development of a new drug carrier made from alginate. *Journal of*. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jps.2600820909/abstract> [Accessed May 21, 2016].
- Raouraoua-Boukari, R. & Sami-Merah, S., 2012. Immunomodulation of the inflammatory response induced by *Androctonus australis* hector neurotoxins: biomarker interactions. Available at: <http://www.karger.com/Article/Abstract/330241> [Accessed May 21, 2016].
- Reddy, L. et al., 2005. Influence of administration route on tumor uptake and biodistribution of etoposide loaded solid lipid nanoparticles in Dalton's lymphoma tumor bearing mice. *Journal of controlled*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365905001252> [Accessed June 17, 2016].
- Redhead, H., Davis, S. & Illum, L., 2001. Drug delivery in poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles surface modified with poloxamer 407 and poloxamine 908: in vitro characterisation and in vivo evaluation. *Journal of Controlled Release*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365900003679> [Accessed June 16, 2016].
- Renwick, L., Donaldson, K. & Clouter, A., 2001. Impairment of alveolar macrophage phagocytosis by ultrafine particles. *Toxicology and applied*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X01991288> [Accessed May 21, 2016].
- Rice-Ficht, A. & Arenas-Gamboa, A., 2010. Polymeric particles in vaccine delivery. *Current opinion in*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527409001805> [Accessed May 21, 2016].
- Ritwiset, A., Kongsuk, S. & Johns, J., 2016. Molecular structure and dynamical properties of niosome bilayers with and without cholesterol incorporation: A molecular dynamics simulation study. *Applied Surface Science*. Available at:

- <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169433216302616> [Accessed August 21, 2016].
- Romeo, S. et al., 2008. A positive charge at the N-terminal segment of Discrepin increases the blocking effect of K⁺ channels responsible for the IA currents in cerebellum granular cells. *et Biophysica Acta (BBA)* Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304416508000287> [Accessed May 21, 2016].
- Saffari, H. et al., 2016. Measurement of Inflammation in Eosinophilic Esophagitis Using an Eosinophil Peroxidase Assay. *The American journal of*. Available at: <http://www.nature.com/ajg/journal/vaop/ncurrent/full/ajg2016184a.html> [Accessed September 3, 2016].
- Safley, S., Cui, H. & Cauffiel, S., 2008. Biocompatibility and immune acceptance of adult porcine islets transplanted intraperitoneally in diabetic NOD mice in calcium alginate poly-L-lysine microcapsules. *Journal of diabetes*. Available at: <http://dst.sagepub.com/content/2/5/760.short> [Accessed August 21, 2016].
- Sager, T. et al., 2007. Improved method to disperse nanoparticles for in vitro and in vivo investigation of toxicity. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/17435390701381596> [Accessed May 21, 2016].
- Saha, R., Vasanthakumar, S. & Bende, G., 2010. Nanoparticulate drug delivery systems for cancer chemotherapy. *Molecular Membrane*. Available at:
- <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/09687688.2010.510804> [Accessed June 17, 2016].
- Salinas, G.F. et al., 2013. Anti-TNF treatment blocks the induction of T cell-dependent humoral responses. *Annals of the rheumatic diseases*, 72(6), pp.1037–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22968102> [Accessed September 3, 2016].
- Sami-Merah, S. et al., 2008. Combination of two antibody fragments F(ab')₂/Fab: An alternative for scorpion envenoming treatment. *International Immunopharmacology*, 8(10), pp.1386–1394.
- Sapag, A., Salinas-Luypaert, C. & Constenla-Muñoz, C., 2014. First report of in vitro selection of RNA aptamers targeted to recombinant *Loxosceles laeta* spider toxins. *Biological research*, 47(1), p.2. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25027855> [Accessed June 18, 2016].
- Schaerli, P. et al., 2000. CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *The Journal of*. Available at: <http://jem.rupress.org/content/192/11/1553.abstract> [Accessed June 18, 2016].
- Schijns, V. & Lavelle, E., 2011. Trends in vaccine adjuvants. *Expert review of vaccines*. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1586/erv.11.21> [Accessed May 21, 2016].
- Schijns, V.E., 2000. Immunological concepts of vaccine adjuvant activity. *Current opinion in immunology*, 12(4), pp.456–63. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10899018> [Accessed May 21, 2016].

- Schins, R., 2002. Mechanisms of genotoxicity of particles and fibers. *Inhalation toxicology*. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/089583701753338631> [Accessed May 21, 2016].
- Schraml, B. & Sousa, C. e, 2015. Defining dendritic cells. *Current opinion in immunology*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0952791514001484> [Accessed June 18, 2016].
- Schrurs, F. & Lison, D., 2012. Focusing the research efforts. *Nature nanotechnology*. Available at: http://www.toxi.ucl.ac.be/documents/siteweb4/Schrurs_Lison.pdf [Accessed May 21, 2016].
- Seely, G. & Hart, R., 1974. The binding of alkaline earth metal ions to alginate. *Macromolecules*. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ma60041a030> [Accessed May 21, 2016].
- Shapira, A., Livney, Y. & Broxterman, H., 2011. Nanomedicine for targeted cancer therapy: towards the overcoming of drug resistance. *Drug resistance updates*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1368764611000045> [Accessed June 17, 2016].
- Shearer, J., Manetz, T. & House, R., 2012. Preclinical safety assessment of recombinant botulinum vaccine A/B (rBV A/B). *Vaccine*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X12000503> [Accessed September 4, 2016].
- Sher, A. et al., 1991. Production of IL-10 by CD4+ T lymphocytes correlates with down-regulation of Th1 cytokine synthesis in helminth infection. *The Journal of*. Available at: <http://www.jimmunol.org/content/147/8/2713>.short [Accessed September 3, 2016].
- Shijin, Y. et al., 2008. Characterization of a new Kv1.3 channel-specific blocker, J123, from the scorpion *Buthus martensii* Karsch. *Peptides*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S019697810800212X> [Accessed May 21, 2016].
- Shuai, X. et al., 2004. Micellar carriers based on block copolymers of poly (ϵ -caprolactone) and poly (ethylene glycol) for doxorubicin delivery. *Journal of Controlled Release*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365904002688> [Accessed May 21, 2016].
- Sifi, N., Martin-Eauclaire, M. & Laraba-Djebari, F., 2016. K⁺ channel blocker-induced neuroinflammatory response and neurological disorders: immunomodulatory effects of astaxanthin. *Inflammation Research*. Available at: <http://link.springer.com/article/10.1007/s00011-016-0945-y> [Accessed May 21, 2016].
- Simón-Gracia, L. et al., 2016. Paclitaxel-Loaded Polymersomes for Enhanced Intraperitoneal Chemotherapy. *Molecular cancer*. Available at: <http://mct.aacrjournals.org/content/15/4/670>.short [Accessed August 21, 2016].
- Singh, M. & O'Hagan, D., 1999. Advances in

- vaccine adjuvants. *Nature biotechnology*. Available at: http://www.nature.com/nbt/journal/v17/n11/abs/nbt1199_1075.html [Accessed May 21, 2016].
- Singh, R., Saini, G. & Kennedy, J., 2008. Pullulan: microbial sources, production and applications. *Carbohydrate Polymers*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861708000027> [Accessed May 21, 2016].
- Slifka, M. et al., 1998. Humoral immunity due to long-lived plasma cells. *Immunity*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074761300805415> [Accessed September 2, 2016].
- Smith, D., Simon, J. & Jr, J.B., 2013. Applications of nanotechnology for immunology. *Nature Reviews Immunology*. Available at: <http://www.nature.com/nri/journal/v13/n8/abs/nri3488.html> [Accessed August 30, 2016].
- Smith, J., 1994. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *Journal of leukocyte biology*. Available at: <http://www.jleukbio.org/content/56/6/672.short> [Accessed September 2, 2016].
- Sousa, B. et al., Characterization of organophilic clay by using XRF, XRD, thermo differential and thermogravimetric analyses. *inis.iaea.org*. Available at: https://inis.iaea.org/search/search.aspx?orig_q=RN:35031103 [Accessed June 20, 2016].
- Sozzani, S., 2005. Dendritic cell trafficking: more than just chemokines. *Cytokine & growth factor reviews*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359610105000651> [Accessed June 18, 2016].
- Srairi-Abid, N. et al., 2008. Immunological characterization of a non-toxic peptide conferring protection against the toxic fraction (AahG50) of the *Androctonus australis hector* venom. *Toxicon*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010107003662> [Accessed May 21, 2016].
- Srinivasan, K., Gopalakrishnakone, P. & Tan, P., 2002. SCORPION, a molecular database of scorpion toxins. *Toxicon*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010101001829> [Accessed May 21, 2016].
- Steinke, J. & Borish, L., 2001. Th2 cytokines and asthma—Interleukin-4: its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists. *Respiratory research*. Available at: <http://www.biomedcentral.com/1465-9921/2/66/> [Accessed June 18, 2016].
- Steinman, R. & Cohn, Z., 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *The Journal of experimental medicine*. Available at: <http://jem.rupress.org/content/137/5/1142.abstract> [Accessed August 21, 2016].
- Steinman, R.M. & Nussenzweig, M.C., 2002. Avoiding horror autotoxicus: The importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(1), pp.351–358. Available at:

- http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.231606698 [Accessed November 5, 2016].
- Sterner-Kock, A., Haider, W. & Sacchini, F., 2016. Morphological characterization and immunohistochemical detection of the proinflammatory cytokines IL-1 β , IL-17A, and TNF- α in lung lesions associated with. *Tropical animal health*. Available at: <http://link.springer.com/article/10.1007/s11250-016-0994-9> [Accessed September 3, 2016].
- Stoltenburg, R., Reinemann, C. & Strehlitz, B., 2007. SELEX—a (r) evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomolecular engineering*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389034407000664> [Accessed June 18, 2016].
- Strath, M., Warren, D. & Sanderson, C., 1985. Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an assay for eosinophil differentiation factors. *Journal of immunological methods*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/002217598590242X> [Accessed September 3, 2016].
- Suh, W. et al., 2009. Nanotechnology, nanotoxicology, and neuroscience. *Progress in neurobiology*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301008208001056> [Accessed May 21, 2016].
- Taibi-Djennah, Z. & Matin-Eauclaire, M., 2015. Systemic responses following brain injuries and inflammatory process activation induced by a neurotoxin of *Androctonus scorpion* venom. Available at: <http://www.karger.com/Article/FullText/371493> [Accessed May 21, 2016].
- Tarasiuk, A., Khvatskin, S. & Sofer, S., 1998. Effects of antivenom serotherapy on hemodynamic pathophysiology in dogs injected with *L. quinquestriatus* scorpion venom. *Toxicon*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010198000117> [Accessed May 21, 2016].
- Teeguarden, J., Hinderliter, P. & Orr, G., 2007. Particokinetics in vitro: dosimetry considerations for in vitro nanoparticle toxicity assessments. *Toxicological*. Available at: <http://toxsci.oxfordjournals.org/content/95/2/300.short> [Accessed May 21, 2016].
- Teixeira, A. et al., 2003. Melatonin protects against pro-oxidant enzymes and reduces lipid peroxidation in distinct membranes induced by the hydroxyl and ascorbyl radicals and by peroxynitrite. *Journal of pineal research*, 35(4), pp.262–8.
- Teixeira, C. et al., 2004. Nitric oxide release from human corpus cavernosum induced by a purified scorpion toxin. *Urology*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0090429503007854> [Accessed May 21, 2016].
- Temchura, V. V. et al., 2014. Targeting and activation of antigen-specific B-cells by calcium phosphate nanoparticles loaded with protein antigen. *Biomaterials*, 35(23), pp.6098–6105.
- Temmerman, M. De, Rejman, J. & Demeester, J., 2011. Particulate vaccines: on the quest for optimal delivery and immune response. *Drug*

- discovery today*. Available at:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359644611001334> [Accessed June 17, 2016].
- Torchilin, V., 2010. Passive and active drug targeting: drug delivery to tumors as an example. *Drug delivery*. Available at:
http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-00477-3_1 [Accessed June 17, 2016].
- Touloun, O., Slimani, T. & Boumezzough, A., 2001. Epidemiological survey of scorpion envenomation in southwestern Morocco. *Journal of Venomous*. Available at:
http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0104-79302001000200006&script=sci_arttext [Accessed May 21, 2016].
- Trinchieri, G., Pflanz, S. & Kastelein, R.A., 2003. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity*, 19(5), pp.641–4. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14614851> [Accessed June 18, 2016].
- Tytgat, J. et al., 1999. A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: α -KTx molecular subfamilies. *Trends in*. Available at:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016561479901398X> [Accessed May 21, 2016].
- Usui, T. et al., 2003. GATA-3 suppresses Th1 development by downregulation of Stat4 and not through effects on IL-12R β 2 chain or T-bet. *Immunity*. Available at:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074761303000578> [Accessed June 18, 2016].
- Valdez-Cruz, N. et al., 2004. Biochemical, genetic and physiological characterization of venom components from two species of scorpions: *Centruroides exilicauda* Wood and *Centruroides*. *Biochimie*. Available at:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300908404000641> [Accessed May 21, 2016].
- Vandamme, T., Lenourry, A. & Charrueau, C., 2002. The use of polysaccharides to target drugs to the colon. *Carbohydrate*. Available at:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861701002636> [Accessed May 21, 2016].
- Vega, R. de la & Possani, L., 2004. Current views on scorpion toxins specific for K⁺-channels. *Toxicon*. Available at:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010104001345> [Accessed May 21, 2016].
- Verdonck, A. et al., 2000. A novel class of pore-forming peptides in the venom of *Parabuthus schlechteri* Purcell (Scorpions: Buthidae). Available at:
<https://lirias.kuleuven.be/handle/123456789/138679> [Accessed May 21, 2016].
- Vila, A. et al., 2002. Design of biodegradable particles for protein delivery. *Journal of Controlled*. Available at:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365901004862> [Accessed May 21, 2016].
- Walter, J., Stahl, F. & Scheper, T., 2012. Aptamers as affinity ligands for downstream processing. *Engineering in Life Sciences*. Available at:
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/els>

- c.201100197/full [Accessed June 18, 2016].
- Wang, A., Langer, R. & Farokhzad, O., 2012. Nanoparticle delivery of cancer drugs. *Annual review of medicine*. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-med-040210-162544> [Accessed June 17, 2016].
- Wang, E. et al., 2008. Chimeric alphavirus vaccine candidates for chikungunya. *Vaccine*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X0800981X> [Accessed September 2, 2016].
- Wang, J. et al., 2005. Novel insect resistance in *Brassica napus* developed by transformation of chitinase and scorpion toxin genes. *Plant cell reports*. Available at: <http://link.springer.com/article/10.1007/s00299-005-0967-3> [Accessed May 21, 2016].
- Wang, K. et al., 2015. Neutralization of staphylococcal enterotoxin B by an aptamer antagonist. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(4), pp.2072–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25624325> [Accessed June 18, 2016].
- Wang, L. et al., 2003. Evaluation of sodium alginate for bone marrow cell tissue engineering. *Biomaterials*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961203001674> [Accessed May 21, 2016].
- Wang, M. & Thanou, M., 2010. Targeting nanoparticles to cancer. *Pharmacological Research*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043661810000794> [Accessed June 17, 2016].
- Warheit, D. et al., 2008. Health effects related to nanoparticle exposures: environmental, health and safety considerations for assessing hazards and risks. *Pharmacology & therapeutics*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163725808001216> [Accessed June 17, 2016].
- Wee & Gombotz, 1998. Protein release from alginate matrices. *Advanced drug delivery reviews*, 31(3), pp.267–285.
- Winau, F., Westphal, O. & Winau, R., 2004. Paul Ehrlich—in search of the magic bullet. *Microbes and Infection*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1286457904001388> [Accessed June 17, 2016].
- Wischke, C., Neffe, A. & Lendlein, A., 2009. Controlled drug release from biodegradable shape-memory polymers. *Shape-Memory Polymers*. Available at: http://link.springer.com/chapter/10.1007/12_2009_29 [Accessed May 21, 2016].
- World Health Organisation, 2005. WHO GUIDELINES ON NONCLINICAL EVALUATION OF VACCINES. *WHO Expert Committee on biological Standardization*. Available at: http://www.who.int/entity/biologicals/publications/nonclinical_evaluation_vaccines_nov_2003.pdf [Accessed August 23, 2016].
- Wyatt, L., Earl, P. & Eller, L., 2004. Highly attenuated smallpox vaccine protects mice with and without immune deficiencies against pathogenic vaccinia virus challenge. *Proceedings of the*. Available at:

- <http://www.pnas.org/content/101/13/4590.short> [Accessed September 2, 2016].
- Xiang, S. et al., 2006. Pathogen recognition and development of particulate vaccines: does size matter? *Methods*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046202306001563> [Accessed May 21, 2016].
- Xu, C. et al., 2004. BmBKTx1, a novel Ca²⁺-activated K⁺ channel blocker purified from the Asian scorpion *Buthus martensi* Karsch. *Journal of Biological*. Available at: <https://www.jbc.org/content/279/33/34562.full> [Accessed May 21, 2016].
- Yang, Y.-W. & Luo, W.-H., 2016. Cellular biodistribution of polymeric nanoparticles in the immune system. *Journal of Controlled Release*, 227, pp.82–93.
- Ye, F. et al., 2014. Recognition of *Bungarus multicinctus* venom by a DNA aptamer against β -bungarotoxin. *PloS one*, 9(8), p.e105404. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25144237> [Accessed June 18, 2016].
- Yi, Y., Yang, T. & Pan, W., 1999. Preparation and distribution of 5-fluorouracil 125I sodium alginate-bovine serum albumin nanoparticles. *World journal of gastroenterology*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4688503/> [Accessed May 21, 2016].
- Yu, C.-Y. et al., 2008. Sustained release of antineoplastic drugs from chitosan-reinforced alginate microparticle drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*, 357(1), pp.15–21.
- Zale, S. et al., 2016. Long circulating nanoparticles for sustained release of therapeutic agents. *US Patent 9,308,179*. Available at: <https://www.google.com/patents/US9308179> [Accessed August 20, 2016].
- Zarrati, S. et al., 2014. Humoral immune responses in DNA vaccine formulated with poly (methyl methacrylate) against *Leishmania major*. *J Entomol Zool*. Available at: <http://www.entomoljournal.com/vol2Issue5/pdf/32.1.pdf> [Accessed August 23, 2016].
- Zeng, X., Corzo, G. & Hahin, R., 2005. Scorpion venom peptides without disulfide bridges. *IUBMB life*. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1080/15216540500058899/full> [Accessed May 21, 2016].
- Zeng, X., Luo, F. & Li, W., 2006. Molecular dissection of venom from Chinese scorpion *Mesobuthus martensii*: identification and characterization of four novel disulfide-bridged venom peptides. *Peptides*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196978106000684> [Accessed May 21, 2016].
- Zenouaki, I. et al., 1997. In vivo protection against *Androctonus australis* hector scorpion toxin and venom by immunization with a synthetic analog of toxin II. *Vaccine*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X97001448> [Accessed May 21, 2016].
- Zhang, W. et al., 2014. Immune responses to vaccines involving a combined antigen–nanoparticle mixture and nanoparticle-encapsulated antigen formulation.

- Biomaterials*. Available at:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961214003962> [Accessed August 22, 2016].
- Zhao, L. et al., 2014. A review of polypeptide-based polymersomes. *Biomaterials*. Available at:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961213013070> [Accessed May 21, 2016].
- Zhao, L. et al., 2014. Nanoparticle vaccines. *Vaccine*, 32(3), pp.327–337.
- Zhao, Z. & Leong, K.W., 1996. Controlled Delivery of Antigens and Adjuvants in Vaccine Development. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 85(12), pp.1261–1270.
- Zheng, W. & Flavell, R., 1997. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell*. Available at:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867400802408> [Accessed June 18, 2016].
- Zhijian, C. et al., 2006. Genetic mechanisms of scorpion venom peptide diversification. *Toxicon*. Available at:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004101010500406X> [Accessed May 21, 2016].
- Zhu, J. et al., 2006. GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-. *Cell research*. Available at:
<http://www.nature.com/cr/journal/v16/n1/abs/7310002a.html> [Accessed June 18, 2016].
- Zhu, X., Teng, M. & Niu, L., 1999. Structure of acutolysin-C, a haemorrhagic toxin from the venom of *Agkistrodon acutus*, providing further evidence for the mechanism of the pH-dependent proteolytic. *Acta Crystallographica Section D: Biological*. Available at: <http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?GR0927> [Accessed May 21, 2016].
- Zolnik, B., Gonzalez-Fernandez, A. & Sadrieh, N., 2010. Minireview: nanoparticles and the immune system. Available at:
<http://press.endocrine.org/doi/abs/10.1210/en.2009-1082> [Accessed August 28, 2016].