

N° :17/2009-M/SN

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene

Faculté des Sciences Biologiques



Présenté pour l'obtention du diplôme de MAGISTER
EN: SCIENCES DE LA NATURE
Spécialité : Biotechnologie et santé

Par : **BOUKARI Ryma**

Réaction inflammatoire locale et systémique induite par le venin
d'*Androctonus australis hector*, ses fractions toxiques et ses toxines
purifiées : Mécanisme d'action

Soutenu le 22 /11/2009, devant le jury composé de :

Mme Touil- Boukkofa C, Professeur, USTHB

Mme Laraba-Djebari F, Professeur, USTHB

Mr Mati A, Professeur, Univ. T. Ouzou

Mme Hammoudi-Triki D, Maître de conférences, USTHB

Mme Hamouli Z, Maître de conférences, USTHB

Présidente

Directrice de thèse

Examineur

Examinatrice

Examinatrice

Résumé

L'envenimation par le venin de scorpion représente un problème de santé publique commun entre plusieurs pays. En Algérie, l'espèce *Androctonus australis hector* (*Aah*) est la plus dangereuse, elle est responsable de la majorité des accidents causés dans l'envenimation scorpionique.

La connaissance des mécanismes induits lors de cet accident souvent mortel, pourrait aider à mieux prendre en charge les victimes dans les cas sévères.

Cette étude montre que le venin *Aah* et ses toxines provoquent une réaction inflammatoire aiguë caractérisée par hyperleucocytose marquée par une neutrophilie systémique associée à une migration des neutrophiles et éosinophiles vers le tissu pulmonaire.

Ces résultats sont associés avec la mise en évidence de l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion cellulaire (ICAM-1) au niveau pulmonaire.

Une élévation importante des médiateurs inflammatoires tels que l'IL1- β , l'IL-6, l'IL-4, l'IL13, IL-12, IL-5 le NO, l'histamine et des molécules ICAM-1s, a été également enregistrée. Tous ces événements seraient à l'origine des effets physiopathologiques observés dans les cas d'envenimation.

Cette étude montre que ce sont les toxines et principalement la toxine Aah II qui sont responsables de l'induction de l'œdème provoqué par le venin. La cinétique de cette activité œdématisante se présente comme un événement biphasique dans lequel plusieurs médiateurs opèrent en séquence pour produire cette réponse inflammatoire.

Les résultats obtenus suggèrent que les toxines du venin et notamment la toxine purifiée Aah II induisent la réponse inflammation systémique et locale. Cette réponse est accompagnée par une modification de la perméabilité vasculaire associée à une infiltration des cellules inflammatoires et une libération des médiateurs inflammatoires. Tous ces événements aboutissent à des lésions tissulaires souvent fatales dans les cas cliniques graves.

Remerciements

Les recherches qui ont fait l'objet de ce travail ont été effectuées dans le laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire de la Faculté des Sciences Biologiques de l'Université des sciences et de la Technologie Houari Boumediene et au niveau du laboratoire de la recherche et du développement sur les venins à l'Institut Pasteur d'Algérie.

J'aimerais en tout premier lieu adresser ma plus sincère gratitude à ma directrice de thèse, le Professeur Laraba-Djebari Fatima, pour m'avoir proposé ce sujet passionnant. Sa confiance, son aide et son soutien ont permis la concrétisation de ce projet.

Je tiens à remercier le Professeur Touil-Boukoffa C, pour avoir bien voulu présider le jury, qu'elle veuille bien trouver ici l'expression de ma considération.

Mes remerciements vont également à Madame le Docteur Hammoudi-Triki D, qui ma fait bénéficier de ses connaissances et de ses conseils durant l'année théorique de la post-graduation, et qui a accepté de participer au jury de cette thèse.

Je tiens à remercier le Professeur Mati A, qui a bien voulu accepter de corriger ce travail.

J'adresse très respectueusement mes remerciements à Madame le Docteur Hamouli Z, qui a bien voulu m'accorder de son temps pour examiner ce travail.

Mes vifs remerciements pour le Docteur Marie France Martin-Eauclaire de nous avoir gracieusement fournie la toxine Aah II purifiée.

Je suis reconnaissante à tout le personnel de l'Institut Pasteur d'Algérie qui m'ont ouvert les portes pour réaliser ce travail.

J'adresse mes remerciements pour les ingénieurs des laboratoires Souad Saadeddine et Assia Kamel pour leur aide et leurs collaborations.

Mes remerciements s'adressent également à tous les membres de l'équipe, à mes collègues de la PG, qui mon aidée de façon directe ou indirecte.

Dédicace

À ma mère Djahida

À mon père Simane

À mes frères Mohamed, Nedjm eddine, Dia eddine et Sid Ali

À ma sœur Hadjer

Pour leur soutien, leurs amitiés et leur appui à mes projets

*Et à tous qui me sont chers ainsi que toutes les personnes qui ont cru,
croient et croiront toujours pour moi.*

Sommaire

Introduction.....	1
Généralités	
I. Scorpion.....	3
I.1. Classification.....	3
I.2. Le Venin de scorpion	3
I.3. Fraction toxique : Les toxines.....	3
I.3. 1. Structure primaire des neurotoxines.....	4
I.3. 2. Classification fonctionnel des toxines.....	4
I.3.2.1. Toxines de scorpion avec ponts disulfures.....	6
I.3.2.1.1. Les toxines longues.....	6
I.3.2.1.2. Les toxines courtes.....	7
I.3.2.2. Toxines de scorpion sans ponts disulfures.....	9
I.3. 3. Structure tridimensionnel des toxines.....	11
I.3. 4. Intérêt des toxines de scorpion.....	11
II. Relation structure fonction.....	13
II.1. Les récepteurs des toxines de scorpion.....	14
III. Bio-distribution du venin d' <i>Aah</i> et ses toxines.....	15
IV. Envenimation scorpionique et symptômes et présentation clinique.....	17
V. Physiopathologie de l'envenimation scorpionique.....	18
V.1. Effets hémodynamique.....	18
V.2. Perturbations hormonale.....	18
V.3. Variations métaboliques.....	19
V.4. Le changement du l'équilibre des électrolytes.....	19
VI. Réaction inflammatoire induite par les venins	22
A-Effet du venin sur le recrutement des cellules inflammatoires.....	22
B- Implication des médiateurs inflammatoires.....	22
C-L'œdème induit par les venins.....	24
II- Matériel et méthodes.....	26
II-1- Matériels biologiques.....	26
II-2 Méthodes.....	26
II.2.1 - Dosage des médiateurs de l'inflammation après envenimation avec le venin ou ses composants toxiques.....	26
II.2.1.1 - Dosage de la Myéloperoxydase (MPO).....	26
II.2.1.2 - Dosage de l'activité Eosinophile peroxydase (EPO).....	28
II.2.1.3 - Dosage de la NO synthase (NOS).....	28
II.2.1.4 - Dosage des cytokines et des adhésines ICAM-1	29
II.2.1.5 - Dosage de l'histamine.....	29
II-2-2 Mise une évidence de l'activité oedématisée induite par le Venin d' <i>Aah</i>	30
II-2-2 -1 Œdème pulmonaire induit par le venin et ses constituants toxiques.....	30
II-2-2-2- Evaluation de l'œdème plantaire induit par le venin et ses constituants toxiques.....	30
II-2-3 Etude des altérations tissulaires engendrées par la toxine AahII au niveau du Foie.....	30
Résultats et discussion.....	32
1. Effet de l'envenimation scorpionique sur l'activité myéloperoxydase (MPO).....	32
2. Effet de l'envenimation scorpionique sur l'activité peroxydase éosinophile (EPO).....	35
3. Effet de l'envenimation scorpionique sur l'activité de la NO synthase.....	39

4. Effet de l'envenimation scorpionique sur les taux des cytokines et des ICAM-1.....	38
5. Effet de l'envenimation scorpionique sur le taux histamine sérique.....	49
7. Induction de l'œdème pulmonaire.....	51
8. Effet oedématisque local du venin d' <i>Aah</i>	57
9. Effets histopathologiques induit par la toxine Aah II au niveau du tissu hépatique.....	57
Discussion générale.....	57
Conclusion.....	61
Bibliographie.....	62
Annexe.....	72

Introduction

Les accidents provoqués par les piqûres de scorpions sont très nombreuses. En Algérie, il est déclaré par le ministère de la santé jusqu'à 50 000 piqûres de scorpion en moyenne par année avec 74 cas de décès.

Les scorpions sont considérés comme l'un des groupes d'animaux le plus ancien sur terre, sur 1500 espèces différentes, il y a 50 dangereuses pour l'Homme, la majorité de ces espèces appartiennent à la famille des *Buthidae* (Froy *et al.*, 1999; Lourenco., 1994).

L'envenimation scorpionique représente un problème de santé publique commun à plusieurs régions du monde. En Algérie, l'espèce *Androctonus australis hector* et *Buthus occitanus tunetanus* représentent les espèces les plus redoutables.

La toxicité du venin d'*Androctonus australis hector*, est due particulièrement aux effets de ses neurotoxines qui agissent sur les canaux ioniques des cellules excitables, en prolongeant l'ouverture du canal sodique.

La composition des venins de scorpion est un mélange très complexe, riche en peptides de faible poids moléculaire, et ont un large volume de distribution.

Les toxines du venin sont essentiellement des neurotoxines. Elles affectent le mécanisme de fermeture et la perméabilité des ions au niveau des cellules excitables. Leurs interactions spécifiques avec les canaux ioniques (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} ou Cl^-), provoquent la libération massive des neurotransmetteurs et de médiateurs inflammatoires. Cette interaction conduit à des perturbations de plusieurs fonctions biologiques.

L'injection du venin de scorpion chez des animaux induit des altérations locales et systémiques avec des symptômes similaires à ceux observés suite à l'envenimation scorpionique accidentelle (Freire-Maia et Compos., 1989).

Ces symptômes sont représentés par des troubles cardio-vasculaires, une hypertension artérielle suivie d'une hypotension, une hyperglycémie, une hypercalcémie et un œdème pulmonaire aiguë. Une leucocytose est souvent observée lors d'envenimation sévère (Gueron *et al.*, 1992; Sofer *et al.*, 1996; Hammoudi-Triki *et al.*, 2007).

La pathogénicité de ces perturbations est multifactorielle et résulte essentiellement de la stimulation du système sympathique et parasympathique. (Sofer et Gueron., 1998; Ismail *et al.*, 1995).

D'autres travaux ont montré que la réaction inflammatoire aiguë observée lors d'une envenimation scorpionique, induit l'activation du système inflammatoire avec libération des médiateurs inflammatoires tels que les cytokines pro et anti-inflammatoires, le PAF, les leucotriènes, les prostaglandines, les chimiokines, le monoxyde d'azote et des substances vasoactives. Une infiltration cellulaire a été également mise en évidence. L'activation de la cascade des événements du système inflammatoire, joue un rôle important dans la pathogénicité de l'envenimation scorpionique (De Matos., 1997; Magalhaes *et al.*, 1999; Petricevich *et al.*, 2004 ; Adi-Bessalem *et al.*, 2008).

La libération des neuropeptides, telle que la substance P par le venin facilite la libération de ces médiateurs inflammatoires à partir des cellules inflammatoires et contribue à la genèse de l'œdème pulmonaire observé après l'envenimation scorpionique (De Matos *et al.*, 2001).

Des expériences entreprises sur des modèles animales, ont montré que les venins de scorpions provoquent une augmentation de la perméabilité vasculaire au niveau du tissu pulmonaire. L'œdème pulmonaire induit par le venin peut être d'origine cardiogénique ou non cardiogénique suite à une stimulation du système adrénergique et à l'activation de la cascade inflammatoire (Freire-Maia et De Matos, 1993; De Matos *et al.*, 1997; Meki *et al.*, 1997).

La prise en charge des victimes des envenimations nécessite la mise au point d'une stratégie thérapeutique efficace basée sur la compréhension des mécanismes impliqués dans la genèse des désordres physiopathologiques provoqués lors d'une envenimation scorpionique.

Des envenimations expérimentales sur des modèles murins (rats et souris) avec le venin natif d'*Aah*, sa fraction toxique majoritaire (FTox-G50) ou sa toxine purifiée Aah II ont été réalisées afin de mieux comprendre et caractériser la réaction inflammatoire provoquée par le venin d'*Aah* lors des envenimations accidentelles.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressées à l'étude du recrutement des cellules inflammatoires (neutrophiles et éosinophiles) suite à l'envenimation expérimentale par le venin et ses principales toxines.

Nous avons également abordé l'étude de la réponse immunitaire par le dosage des cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires, ce volet a été complété par le dosage de d'autres médiateurs inflammatoires incluant, l'histamine et le monoxyde d'azote.

Dans un second temps, nous avons exploré l'activité oedématisante induite par le venin et ses toxines au niveau du tissu pulmonaire des animaux envenimés avec le venin natif ou ses toxines. L'étude préliminaire des mécanismes mise en jeu dans l'effet oedématisant du venin a été initiée, en utilisant des inhibiteurs du métabolisme de l'acide Arachidonique (Dexaméthasone et Indométacine).

L'analyse des lésions provoquées par la toxine purifiée Aah II au niveau du parenchyme hépatique a également fait l'objet de cette étude.

Généralités

Généralités

I. Scorpion

Les scorpions appartiennent à l'embranchement des arthropodes caractérisés par l'existence d'un exosquelette chitineux articulé, les scorpions constituent un ordre numériquement peu important, comportant environ 1500 espèces, toutes venimeuses. Ils sont caractérisés par une morphologie bien particulière : leur post-abdomen, se termine par un telson, renfermant une glande à venin dont le contenu s'évacue par un aiguillon. La glande à venin est entourée d'une couche musculaire striée que l'animal contracte volontairement, de sorte qu'une piqûre peut ne pas s'accompagner d'une inoculation de venin.

I.2. Classification:

Les scorpions appartiennent au phylum des arthropodes, classe des *Arachida*, ordre des *scorpionida*. Ce dernier est composé de six familles: *Bothriusridae*, *Scorpionidae*, *Buthidae*, *Vejovidae*, *Chaerilidae* et *Chactidae*.

La famille des *Buthidae* regroupent les espèces les plus dangereuses pour l'homme, elle est subdivisée en quatre sous-familles en fonction des critères géographiques et morphologiques: *Tityinae* (Amérique du sud), *Centrurinae* (Amérique du Nord et surtout Mexique), *Buthinae* (Afrique du Nord et Asie) et *Isometrinae*.

La famille des *Buthidae* comprend environ 500 espèces, les genres *Androctonus*, *Leiurus*, *Buthus* et *Buthotus* qui représentent les «scorpions de l'ancien monde», sont retrouvées dans le nord de l'Afrique, le moyen orient et l'Inde. Le genre *Parabuthus* est retrouvé en Afrique du Sud, le genre *Centriroides* est répondu dans l'Amérique du nord, Mexique et Amérique centrale, le genre *Tityus* se trouve notamment au Brésil, Venezuela, Colombie et Argentine (Bucherl., 1971).

En Algérie, les espèces les plus dangereuses sont *Androctonus australis hector* et *Buthus occitanus tunetanus*.

I.3. Le venin de scorpion

Le venin est un liquide visqueux sécrété par des glandes venimeuses, il contient une large variété de composés biologiquement actifs (Possani *et al.*, 1989; Catterall *et al.*, 1980), peut être subdivisé en deux fractions, une fraction non toxique composée de mucopolysaccharides, hyaluronidase, phospholipase, protéases, sérotonines et de l'histamines et bien d'autres substances non connues (Voronov *et al.*, 1999), et une fraction toxique constituée de neurotoxines qui sont les composants responsables de la létalité du venin.

Le scorpion *Androctonus australis hector* (Aah) contient essentiellement des neurotoxines de type α qui affecte les canaux sodium des cellules excitables.

I.4. Fraction toxique: Les toxines

C'est la fraction la plus étudiée du venin de scorpion. Les toxines du scorpion constituent une famille de petits polypeptides basiques, de faible poids moléculaire de 3 à 9 kDa, sont

responsables de la neurotoxicité du venin (Dehesa-Davila et Possani., 1994; Possani *et al.*, 1999 a,b; 2000; Srinivasan *et al.*, 2002 ; Srairi-Abid *et al.*, 2005).

Bien que présentant de forte homologues de séquences; les toxines de scorpion ont des cibles animales spécifiques: anti-mammifères, anti-crustacés et anti-insecte et des toxines à double spécificité (anti-mammifères et anti-insecte), avec des degrés de toxicité variés (Couraud *et al.*, 1982 ; Jover *et al.*, 1988).

Les venins des *Buthinae* tels que ceux d'*Androctonus australis* hector et de *Buthus occitanus tunetanus*, contiennent des toxines dirigées préférentiellement contre les mammifères, insectes et crustacées.

I.4. 1. Structure primaire des neurotoxines

Actuellement des centaines de toxines ont été purifiées et séquencées à partir de 20 à 30 espèces de scorpions différentes (Possani *et al.*, 1999, 2000) (Figure 1).

Sur presque 100 000 polypeptides différents présents dans toutes les espèces de scorpion, dans ce total, seule 1% sont connues (Possani *et al.*, 1999; Bosmans et Tytgat., 2007).

Plusieurs séquences d'acides aminés des toxines actives sur les canaux Na⁺ voltage dépendante ont été obtenues par séquençage d'ADNc. Ces nouvelles séquences ne sont pas représentées dans la figure 1, au vu des incertitudes de leurs séquences C terminales au niveau peptides matures (Bosmans et Tytgat., 2007).

I.4. 2. Classification fonctionnelle des toxines

Les toxines de scorpion peuvent être divisées en familles différentes selon plusieurs critères:

1- Masse moléculaire

- Toxines «longues».
- Toxines «courtes».

2- Spécificité d'espèce animale

- Toxines spécifique aux insectes.
- Toxines spécifique aux crustacés.
- Toxines spécifique aux mammifères.
- Toxines à double spécificité: anti-mammifère et anti insectes.

3- Selon le mécanisme d'action

- Neurotoxines.
- Cytotoxines.

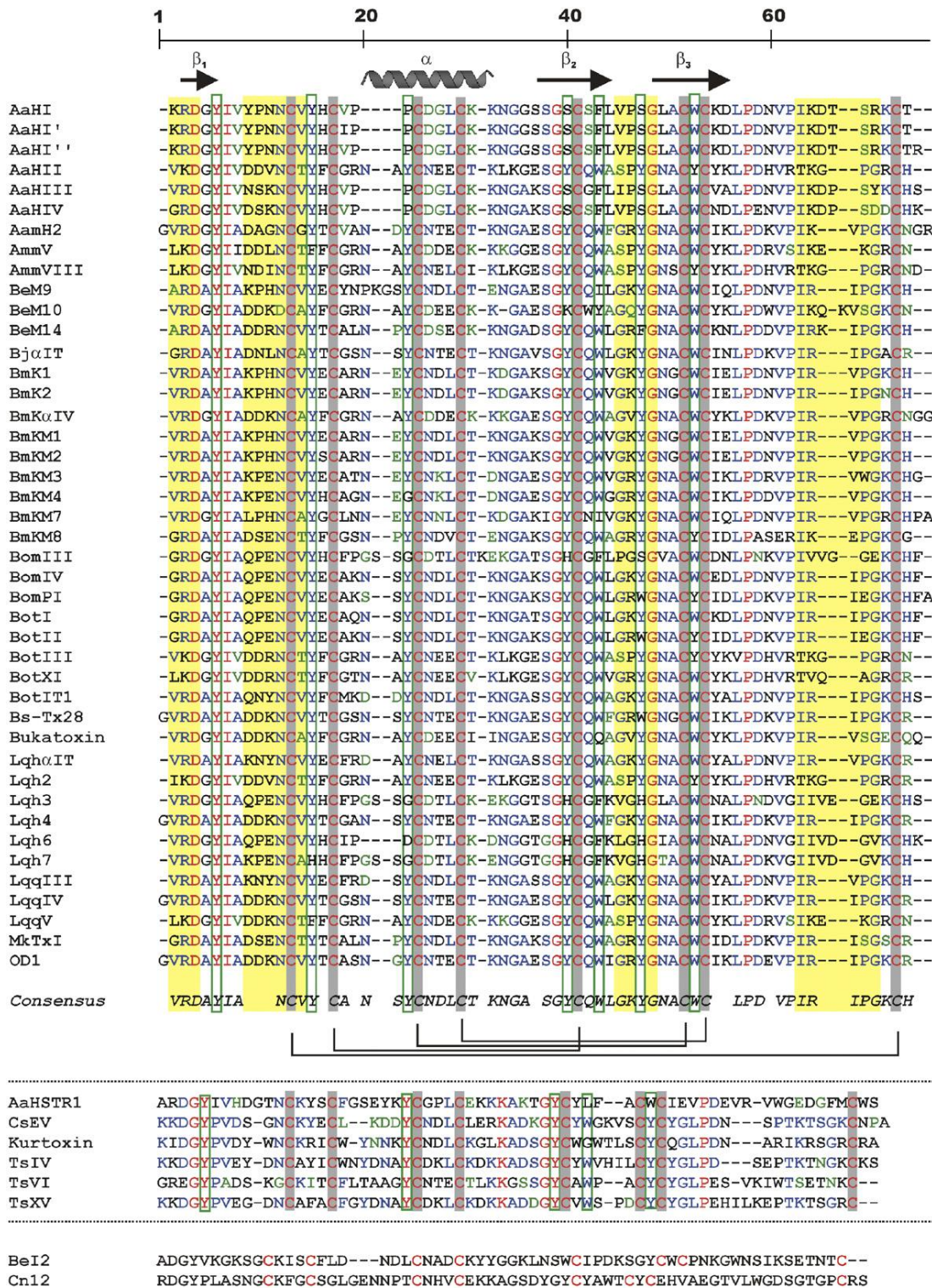


Figure 1: Séquences de quelques toxines de venins de scorpions (Bosmans et Tytgat., 2007).

4- Réticulation et ponts disulfures

- Toxines avec ponts disulfures
- Toxines sans ponts disulfures.

I.4. 2. Toxines de scorpion avec ponts disulfures

I.4. 2.1. Les toxines longues

Ce sont des petits peptides basiques constitués par 60 à 75 résidus d'acides aminés et réticulés par 4 ponts disulfures (Rochat *et al.*, 1979 ; Possani *et al.*, 1984, Fontecilla-Camps *et al.*, 1980 ; Goyffon et Heurtault., 1995; Becerril *et al.*, 1995 ; Loret et Hammock., 2001).

Ces toxines sont responsables de la haute toxicité du venin de scorpion pour les mammifères et les arthropodes, elles sont actives sur les canaux Na⁺

Les toxines actives sur les canaux sodium peuvent être classées selon leurs spécificités d'espèce animale en toxines anti-mammifères (vertébrés) et toxines anti-insectes (invertébrés) (Ji *et al.*, 1980; Possani *et al.*, 1980a ; Xiong *et al.*, 1997).

I.4. 2.1.1 Toxines actives sur les canaux Na⁺ voltage dépendant activent sur les vertébrés:

Les toxines anti-mammifères purifiées à partir du venin de scorpion affectant l'ouverture ou la fermeture des canaux Na⁺ sont subdivisées en deux types principaux α et β , selon leur action pharmacologique sur les canaux sodiques bien que de leurs sites de fixation sur le canal soient différentes (Jover *et al.*, 1980).

I.4. 2.1.1 1 Les neurotoxines de type α :

Les toxines de type α sont principalement responsables de la toxicité des venins de scorpions pour les mammifères, elles ralentissent l'inactivation rapide des canaux Na⁺ voltage dépendant, en se fixant sur le site 3 du canal (Naharashi *et al.*, 1974; Romey *et al.*, 1975; Catterall *et al.*, 1979; Jover *et al.*, 1980; Wheeler *et al.*, 1983, Catterall *et al.*, 1980; Zhijian *et al.*, 2006). Il s'en suit une prolongation du potentiel d'action des membranes des cellules excitables. Ces toxines n'affectent pas l'activation des canaux sodiques. L'affinité des toxines de types α pour le canal Na⁺ est dépendante du potentiel membranaire (Catterall *et al.*, 1976).

Ces toxines sont présentes dans le venin de la sous famille des *Buthinae* comme le venin d'*Androctonus australis*, d'*Androctonus mauretanicus*, *Leirus quinquestriatus* et plusieurs sous espèces de *Buthus* (Martin-Eauclaire et Couraud., 1995), elles sont présentes en petite quantité dans les venins des scorpions américains tel que *Tityus serrumatus* et *Centuroides sculpturatus* (Diniz, 1978; Barharnin *et al.*, 1982; Vijiverberg *et al.*, 1984, De Lima *et al.*, 1992, Martin-Eauclaire et Couraud., 1995).

Les toxines de type α sont principalement responsables de la toxicité des venins de scorpions pour les mammifères, par exemple 90% de la toxicité du venin d'*Androctonus australis* est due aux quatre toxines (Aah I à Aah IV); qui représentent seulement de 2 à 3% du poids du venin natif obtenu par stimulation électrique (Martin et Rochat; 1986 ; Rochat *et al.*, 2000).

La toxine Aah II est la toxine la plus abondante et la plus toxique du venin d'*Aah*, elle représente 1,13% du poids de venin d'*Aah* et responsable de 50% de l'activité toxique pour les souris (injection par voie sous cutanée). Elle est constituée de 64 acides aminés et présente la plus grande affinité pour le site 3 des canaux Na⁺ voltage dépendant des cellules excitables (Rochat *et al.*, 1972; Kopeyan *et al.*, 1974).

Le tableau I représente quelques exemples de toxines de type α et leurs caractéristiques biologiques.

I.4. 2.1.1 2. Neurotoxines de type β

Ces toxines anti-mammifères sont retrouvées généralement dans les venins de scorpions du «nouveau monde». Elles appartiennent aux sous familles des *Centrurinae* et de *Titynae*. Elles se fixent sur le site 4 des canaux sodiques indépendamment du potentiel membranaire et elles affectent le mode d'activation du canal. (Rochat *et al.*, 1978; Jover *et al.*, 1980; Wheeler *et al.*, 1983, Catterall *et al.*, 1980, Garcia *et al.*, 1995; Possani *et al.*, 1998 ; Rochat *et al.*, 2000).

I.4. 2.1.2 Toxines actives sur les canaux Na⁺ voltage dépendant actives sur les invertébrés

La haute toxicité des venins de scorpions pour les insectes est due principalement aux actions des polypeptides sur les canaux sodium voltage dépendant. Selon leurs structures et leurs fonctions différentes, ces toxines peuvent être classées en deux familles distinctes:

- **Toxines excitatrices** : En agissant sur les canaux ioniques des cellules nerveuses, elles provoquent des contractions et des convulsions paralysantes de l'insecte. La toxine Aah IT est la première toxine anti-insecte purifiée à partir du venin *Androctonus australis*.
- **Toxines dépresseurs**: Ces toxines peuvent conduire à une paralysie flasque, progressive suivie par une brève convulsion, de même en agissant sur les canaux sodium
- des cellules excitables. Ces toxines sont présentes dans les venins de *Leirus quinquestriatus hebraeus* (LqhIT2) et *quinquestriatus* (LqqIT2), *Buthotus judaicus* (BjIT2), *Buthus tunetanus* (Bot IT4) et *Buthotus arenicola* (Ba IT2) (Kopeyan *et al.*, 1990 ; Zilberg *et al.*, 1991 ; Zlotkin *et al.*, 1991, 1993 ; Borchani *et al.*, 1997a,b ; Cestela *et al.*, 1997).

Toxines α -like : se sont des toxines agissant sur les mammifères et sur les insectes, se fixe sur les synaptosomes du cerveau de rat.

I.4. 2.2. Les toxines courtes

Ces toxines sont constituées de 22 à 47 résidus d'acides aminés et réticulées par trois ponts disulfures (Possani *et al.*, 1982 ; Garcia *et al.*, 1998 ; Tenenholz *et al.*, 2000 ; Rodriguez de la Vega et Possani., 2004), possédant une grande diversité dans leurs séquences d'acides aminés.

Tableau I : Quelques exemples de toxines de type α et leurs caractéristiques biologiques (Rappuoli *et al.*, 1997).

Toxines	Venin de scorpion	K0.5 (nM)	DL ₅₀ (i.c.v.)/20 g de souris (μ g)	DL ₅₀ (s.c.)/20 g de souris (μ g)
Aah I	<i>Aah</i>	4,5	10,0	0,3
Aah I'		4,5	10,0	0,3
Aah I''		4,5	10,0	0,3
Aah III		3,0	7,0	0,5
Aah IV		50,0	18,0	2,5
Aah II		0,2	0,5	0,2
Lqq V	<i>Lqq</i>	1,0	2,5	0,5
BotI II	<i>Bot</i>	0,5	1,1	0,5
Bot XI		30,0	600,0 3,5	54,0 0,8

Ces toxines sont actives sur les canaux potassium, calcium et chlore (Possani *et al.*, 1984; Garcia., 1995; Possani *et al.*, 1998).

Les toxines de scorpion actives sur les canaux K⁺

La plupart des toxines actives sur les canaux K⁺ sont composées de moins de 40 résidus d'acides aminés. Ces toxines peuvent être divisées en trois familles en fonction de leurs tailles moléculaires, de la localisation des cystéines et de la similarité de leurs structures primaires on distingue:

α KTx: C'est la famille de toxines à chaîne courte qui regroupe la majorité des toxines actives sur les canaux K⁺ et peut être divisée en 19 sous familles. (Batista *et al.*, 2002; Rodriguez de la Vega et Possani., 2004; Xu *et al.*, 2004a; Olamendi-Portugal *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005).

β KTx: Ces toxines sont actives sur les canaux K⁺, quatre toxines ont été identifiées: AaTXKβ, BmTXKβ, BmTXKβ2, TsTXKβ.

γ KTx: Elles présentent une séquence d'acides aminés et des ponts de disulfures distincts tel que ErgTx isolée à partir de *Centruroides noxiu*.

Les toxines actives sur les canaux Cl⁻

Les toxines actives sur les canaux Cl⁻ sont des peptides de faible masse moléculaire, composées de 35 à 38 résidus d'acides aminés. La première toxine a été identifiée et purifiée à partir du venin de *Leirus quinquestriatus quinquestriatus*, c'est la chlorotoxine. La chlorotoxine, est capable de bloquer les canaux Cl⁻ dans l'épithélium intestinal (Tytgat *et al.*, 1998; Zeng *et al.*, 2000b).

Les toxines actives sur les canaux Ca⁺⁺

Plusieurs toxines actives sur les canaux Ca⁺⁺ ont été purifiées à partir des venins de scorpions: Deux toxines, IpTxA et IpTxi ont été purifiées à partir du venin de scorpion *Pandinus imperator* (Valdivia et Possani., 1998), la Maurotoxine (Mca) purifiée à partir du venin du scorpion *Scorpio maurus palmatus* (Fajloun *et al.*, 2000), qui active le récepteur ryanodine (RyR). IpTxA et Mca, sont formées par une seule chaîne polypeptidique riche en acides aminés basiques. Elles sont constituées de 33 acides aminés réticulés par trois ponts disulfures.

I.4. 3. Toxines de scorpion sans ponts disulfures

Les peptides de venin de scorpion n'ayant pas de ponts disulfures, constitués de 13 à 50 résidus d'acides aminés (Luo *et al.*, 2005; Zeng *et al.*, 2005a).

Plus de 26 peptides de ce type ont été décrits. Le tableau II représente quelques exemples de ces peptides (Ferreira *et al.*, 1993).

Tableau II : Quelques exemples de toxines de scorpions sans ponts disulfures (Ferreira *et al.*, 1993).

Peptide	Venin	Référence
Peptide T	<i>Tityus serrumatus</i>	Ferreira <i>et al.</i> , 1993
Peptide K12	<i>Buthus occitanus</i>	Meki <i>et al.</i> , 1995
Bs10	<i>Buthus indicus</i>	Ali <i>et al.</i> , 1998
Pandinin1 et 2	<i>Pandinus imperator</i>	Corzo <i>et al.</i> , 2001
Hadrurin	<i>Hadrurus aztecus</i>	Torres-Larios <i>et al.</i> , 2000
IsCT et IsCT2	<i>Opisthacanthus madagascariensis</i>	Dai <i>et al.</i> , 2001,2002
<i>Parabutoporin</i>	<i>Parabuthus schlechteri</i>	(Verdonck <i>et al.</i> , 2000)
Opistoporin 1 et 2	<i>Opistophtalmus carinatus</i>	Moerman <i>et al.</i> , 2002)
BmKbpp, BmKn1, BmKa1, BmKa2 et BmKb1	<i>Buthus martensii</i> Karsch	(Zeng <i>et al.</i> , 2000a,2001a, 2004)

I.4. 4. Structure tridimensionnelle des toxines

La première structure tridimensionnelle a été déterminée par diffraction aux rayons X pour le variant 3 de *Centruroides sculpturatus* (Fontecilla-Camps *et al.*, 1980). Les toxines actives sur les canaux Na⁺ et K⁺, présentes un motif structural commun (Figure: 2).

Les toxines dont la structure tridimensionnelle a été déterminée sont caractérisées par la présence de quatre ponts disulfures dans le cas des toxines qui affectent les canaux Na⁺ et trois ponts disulfures dans le cas des toxines qui affectent les canaux K⁺ (Menezet *et al.*, 1992).

Des arrangements des structures secondaires hautement conservées présentent un motif structural avec trois brins de feuillé β antiparallèles, et une hélice α . L'hélice α est liée au brin β 3 par deux des quatre ponts disulfures, la paire de cystéine présente au niveau d'hélice α est séparée par trois acides aminés alors que la paire de cystéine présente au niveau du motif β est séparée seulement par un seul résidu. Si les résidus Cys sont comptés progressivement de l'extrémité N à l'extrémité C terminale, l'hélice α pourrait contenir les résidus Cys 3, Cys 4 et le brin β 3 pourrait inclure les résidus Cys 6, Cys 7. Ces éléments structuraux sont conservés dans toutes les toxines de venin de scorpions qui affectent les canaux Na⁺. Un troisième pont disulfure structurellement conservé, qui fait le lien entre un résidu Cys localisé sur le brin β 2, Cys 5, Cys 2. Le quatrième pont disulfure des toxines excitatrices est établi de manière atypique entre le résidu Cys contigus dans le brin β 2 et le résidu Cys au niveau de l'extrémité C terminale de la toxine (Cys 8). Le troisième pont disulfure conservé, participe à la stabilisation du « core » qui est également conservé chez les toxines affectant les canaux K⁺ (Matinez *et al.*, 1992).

I.4. 2. Les toxines de venin de scorpion en tant que molécules d'intérêt

Un nombre important de peptides purifiés à partir des venins de scorpion sont décrits comme étant des ligands spécifiques des canaux ioniques des cellules excitables et non excitables (Martin-Eauclaire et Couraud., 1995; Possani *et al.*, 1999a, Possani *et al.*, 1999).

Ces neurotoxines sont utilisées en tant qu'agents disponibles pour l'identification et la caractérisation fonctionnelle des canaux ioniques voltage dépendants car elles représentent des excellents ligands des canaux ioniques et des récepteurs (Blumenthal et Seibert., 2003; Mouhat *et al.*, 2004). En effet, les toxines de venins de scorpions sont utilisées comme un outil pharmacologique pour la compréhension des canaux sodiques voltage dépendants (Cestel *et al.*, 2001).

La haute spécificité et la sélectivité de ces toxines a vu l'intérêt grandissant dans leur utilisation en tant que médicaments (Rjendra *et al.*, 2004). Les dendrotoxines, la charybdotoxine ou encore l'apamine, isolées à partir respectivement des venins des serpents, de scorpions et d'abeilles, s'avèrent être de puissants inhibiteurs des canaux potassium.

La spécificité d'espèce des toxines excitatrices sur les canaux sodiques sélectives aux insectes a permis d'entreprendre l'éventualité de leur développement en tant qu'insecticides (Zlotkin *et al.*, 1999; 2000; Arnon *et al.*, 2005).

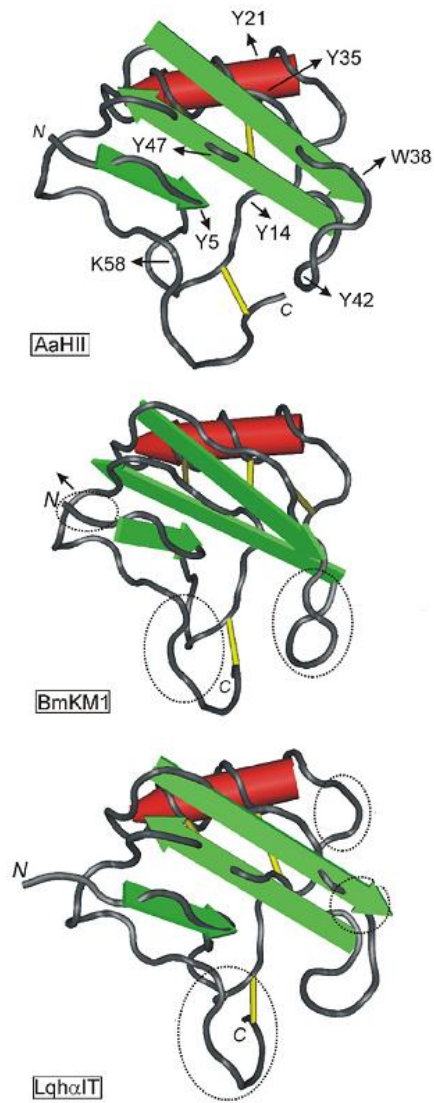


Figure 2: Structures tridimensionnelles de quelques toxines actives sur les canaux Na^+ (Bosmans et Tytgat., 2007).

L'utilisation intense et démesurée des insecticides classiques a conduit au développement des résistances dans plusieurs espèces d'insectes. Le remplacement de ces substances chimiques a été déjà entrepris par de nouvelles molécules. La faible toxicité de la toxine Aah IT chez les mammifères, par exemple, et son haut potentiel d'activité sur les insectes a été utilisée pour renforcer la capacité insecticide naturelle du Baculovirus (Zlotkin *et al.*, 2000). L'insertion du gène codant pour l'Aah IT conduit à une augmentation de l'activité insecticide par le Baculovirus (particulièrement contre les lépidoptères). Des études réalisées sur la stimulation de l'efficacité insecticide du Baculovirus avec des toxines de scorpion qui agissent coopérativement (Regev *et al.*, 2003).

II. Relation structure-fonction

Les études de la relation structure-fonction sont devenues seulement possible après la purification des toxines à grande échelle. Le venin de scorpion n'est pas facile à récolter et sa quantité est généralement faible (en comparant avec ceux des venins de serpents), par conséquent deux techniques ont contribué: l'expression des recombinants et la synthèse chimique.

La toxine insecticide LqhαIT (Zilberberg *et al.*, 1997, 1996) et plusieurs mutants ont été produits par recombinaison et utilisées pour identifier les résidus importants pour leurs activités. Par exemple la toxine α-like BmKM1 a été exprimée chez les levures (Shao *et al.*, 1999).

La synthèse chimique pourrait être considérée comme une alternative de l'expression recombinante des toxines. Cette technique offre la possibilité de faire des mutants avec des résidus inhabituels. Une réussite de la synthèse d'une toxine courte affectant les canaux K⁺ a été rapportée (Giangiacomo *et al.*, 1993; Kharrat *et al.*, 1996; Sabastier *et al.*, 1994; Torreset *et al.*, 2003). Par contre la synthèse des toxines longues est plus difficile à réaliser. La première synthèse chimique effectuée avec succès est celle de la toxine Aah I (M'Barek *et al.*, 2004), qui présente des propriétés physicochimiques, biochimiques, immunologiques et pharmacologiques similaires à ceux de la toxine native (Tytgat *et al.*, 2007).

Les études de Habersetzer-Rochat et ses collaborateurs en 1976 ont porté sur la modification chimique de quelques résidus d'acides aminés fonctionnels au niveau des toxines Aah I, Aah II et Aah III du venin de scorpion d'*Androctonus australis hector* (Habersetzer-Rochat et Sampieri; 1976). Les résultats indiquent que: (1) la réduction ou la méthylation de l'un des ponts disulfures détruit l'activité toxique de l'Aah II; (2) seulement le résidu tryptophane à la position 38 de l'Aah II, n'est pas impliqué dans le site actif de la toxine; (3) la modification des cinq carboxylates, supprime l'activité toxique de l'Aah II; (4) l'acétylation de lysine et de la tyrosine conduit à la perte des deux activités toxique et antigénique de l'Aah II; (5) la citraconylation de l'Aah II conduit à la perte totale l'activité toxique de l'Aah II; la dé-citraconylation restaure l'activité complète; (6) l'alkylation de l'Aah II par l'acide iodacétique affecte les groupes de résidus amine et les résidus histidines. La perte de l'activité toxique est due essentiellement aux résidus lysines (Bosmans et Tytgat., 2007).

La structure tridimensionnelle de la toxine Aah II (Figure 2) et CsE V3 ont été élucidées il y a environ 20 ans. La surface hydrophobe conservée (CHS) contenant essentiellement Tyr 5, Tyr 35 et Trp 47, semblent être responsables de l'effet pharmacologique de ces toxines (Fontecilla-Camps *et al.*, 1982, 1980, 1988). La modification des résidus de ce motif (exemple Trp 38 dans Aah II, Tyr 49 dans LqhαIT) par modification chimique et par mutagenèse montre que ces derniers jouaient un rôle important dans la bio-activité des toxines (Zilberberg *et al.*, 1996, 1997).

II.1. Les récepteurs des toxines de scorpion

Les cellules des tissus excitables notamment les cellules musculaires et nerveuses, ont la capacité de produire des changements rapides et transitoires de leurs potentiel de membranes quant elles sont excités.

Outre leurs transport actif par la pompe Na^+/K^+ , les ions traversent la membrane grâce aux canaux ionique spécifiques.

Deux grands groupes de protéines assurent le transport des ions à travers la membrane:

- 1- Pompe: elles assurent un transport actif en utilisant l'ATP.
- 2- Canaux ioniques ou les récepteurs liés aux protéines G: ces protéines assurent un transport passif des ions.

II.2. Les canaux ioniques

Les canaux ioniques sont des protéines transmembranaires possédant des pores, qui permettent aux ions de taille et de charge approprié de traverser librement la bicouche lipidique, ces canaux sont perméables et sélectifs à un seul ion: Na^+ , K^+ , Ca^{2+} ou Cl^- .

II.3. Potentiel d'action

Le potentiel d'action est une variation rapide, brève et importante du potentiel de membrane qui s'inverse de sorte que l'intérieur de la cellule devient passagèrement plus positif que l'extérieur causé par le flux des ions à travers les canaux ionique.

Il existe trois phases dans le potentiel d'action :

1. Lorsqu'un axone se dépolarise, il apparaît, pour une certaine valeur du potentiel de membrane appelée "valeur seuil", une brusque (environ 1 msec) et ample inversion de la polarisation membranaire est voisine de 100 Mv.
2. La phase de descente du potentiel d'action est également très rapide (1 à 2 msec), le potentiel de membrane revenant alors vers son niveau initial.
3. Puis, à la fin de la phase de descente, le potentiel de membrane atteint une valeur plus négative que le niveau de son potentiel de repos (l'axone s'hyperpolarise). Le retour à la valeur de potentiel initial se fait relativement plus lentement (quelques msec).

La dépolarisation est due à l'ouverture des canaux au Na^+ permettant un influx important d'ions Na^+ dans le neurone. Sous l'effet de la dépolarisation plusieurs canaux K^+ et permettent la sortie massive d'ions K^+ , alors que les canaux sodique s'inactivent rapidement ce qui bloque l'entrée d'ions Na^+ , ces changements sont responsables de la repolarisation (Figure 4).

II.4. Les canaux à voltage dépendant

Les canaux ioniques (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^-) voltage dépendant, sont les canaux dont l'ouverture dépend du potentiel membranaire.

II.4.1 Les canaux sodiques

Les canaux ioniques au sodium sont responsables de la dépolarisation lors du potentiel d'action dans les neurones et la plus part des cellules excitables présentent dans les différents tissus de l'organisme. Ces canaux sont des glycoprotéines composés d'une sous unité α formant un pore (environ 260 kDa), qui peut être associé à des sous unités β différentes (30-40 kDa). La sous unité α est organisée en quatre domaines homologues (DI-IV), chaque domaine contient six hélices transmembranaires (S1-S6) et le pore est localisé entre S5-S6 (Catterall., 2003; Yu *et al.*, 2003; Yu et Catterall *et al.*, 2003; Catterall *et al.*, 2005) (Figure 3).

Des études pharmacologiques par compétition, de mesure du flux ionique (Na^{22}) et de mutagenèse ont permis d'identifier sur les canaux sodium de mammifères six sites récepteurs, numérotés de 1 à 6. Ces sites sont les récepteurs de nombreuses neurotoxines actives sur le canal sodium voltage dépendant (Catterall, 1988, Adams et Olivera, 1994).

Trois toxines purifiées se fixent à haute affinité au niveau du site 1 du canal Na^+ sont la tétrodoxine, la saxitoxine isolées respectivement à partir des cellules excitables et la μ -conotoxine isolée respectivement à partir du venin de mollusque de *Conus geographus*.

- sur le site 2 se fixent la vérratridine et la batrachotoxine et la grayanotoxine.
- sur le site 2 et 3 fixent les toxines de scorpion de type α et β respectivement.
- sur le site 5 se fixent certaines toxines marines telles que la brevatoxine et la ciguatoxine.
- les pyréthroides se fixent sur le sixième site (Rappuoli *et al.*, 1997).

III. Biodistribution du venin d'*Aah* et ses toxines

De nombreux travaux pharmacocinétiques ont été réalisés sur les venins de scorpions et ont démontré que la biodistribution des venins est rapide à partir du site d'injection vers les tissus. La corrélation entre l'activité pharmacologique et les concentrations tissulaires du venin montre que le site d'action du venin est localisé dans les compartiments tissulaires profonds (Ismail *et al.*, 1994). Des taux élevés du venin ont été détectés au niveau du site d'injection, le sérum, le foie puis le cœur après envenimation tandis que la répartition est plus tardive dans le poumon, la rate et le pancréas. Le venin n'est pas détectable dans le système nerveux central, car il ne peut pas traverser la barrière hématoencéphalique (Ismail *et al.*, 1983; Pepin-Covatta *et al.*, 1996; Calderon-Arandad *et al.*, 1999, Krifi *et al.*, 2001 ; Hammoudi-Triki *et al.*, 2004).

La détection rapide du venin à des concentrations élevées dans les différents compartiments, explique les effets physiologiques engendrés après envenimation scorpionique chez les patients tel que hyperthermie (Ismail., 1983; Covatta *et al.*, 1996; Calderon-Arandad., 1999; Krifi *et al.*, 2001). Ces effets sont souvent observés chez l'animale envenimé et sont caractérisés par une hémorragie autour des yeux, un tremblement, une hyper salivation, associés à une agitation.

L'utilisation des tests RIA et ELISA pour la détermination des concentrations des trois toxines du venin *Aah* (*Aah* I-III), montre que ces toxines apparaissent rapidement dans le plasma après injection s.c. du venin *Aah*, comme il a été précédemment décrit pour le venin total (Devaux *et al.*, 2004)

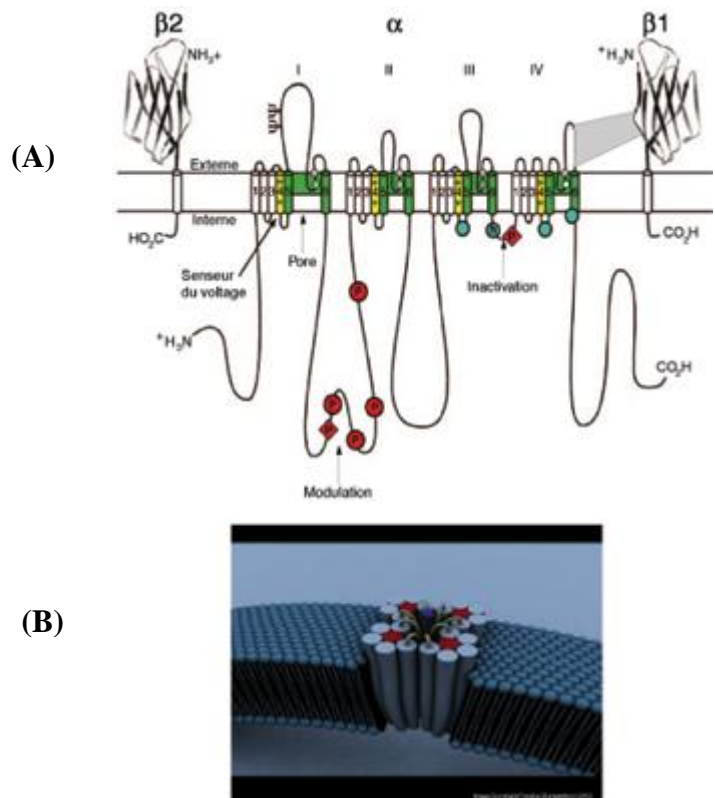


Figure 3: Schéma de la structure des canaux ioniques au sodium. (A), structure primaire des trois sous-unités. En vert, les segments transmembranaires, en jaune les senseurs de voltage (S4), en bleu les segments responsables de l'inactivation et en rouge les sites de modulation. (B), schéma 3D de la sous-unité alpha (Erik Harvey-Girard., 2005).

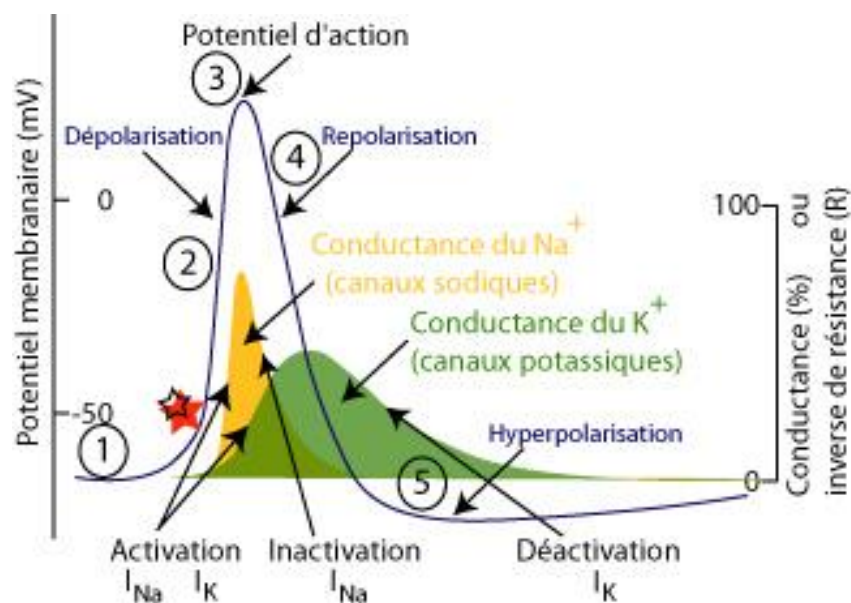


Figure 4: Conductances des canaux ioniques au sodium et au potassium en relation avec les étapes d'un potentiel d'action (Erik Harvey-Girard., 2005).

Par contre, ces toxines disparaissent du sang plus rapidement que les autres composants du venin.

Les toxines ont été également détectées dans les urines, les reins, le cœur et les poumons, mais pas au niveau du cerveau. Les concentrations de la toxine Aah II ont été toujours plus faibles que la toxine Aah I.

La biodistribution rapide des toxines dans le plasma est corrélée avec le temps d'apparition de la majorité des signes cliniques (5-20 min) chez les victimes d'envenimation de scorpionique.

IV. Envenimation scorpionique et présentation clinique:

Les symptômes observés lors d'une envenimation scorpionique vont de puis des signes locaux, qui sont les premiers symptômes à apparaître après une envenimation (agitation, sueur, vomissement, nausées, réaction inflammatoire et engourdissement) jusqu'à l'état de choc (troubles cardiovasculaires et respiratoires), en absence de traitement.

Les symptômes de l'envenimation dépendent du site de piqûre, de l'âge, du poids et de l'état de santé de la victime. D'autre part, Ils peuvent dépendre de l'espèce de scorpion, de la quantité de venin injectée et de la voie d'administration du venin.

Une gradation des manifestations cliniques a été proposée en 1998 lors de la réunion concertée entre instituts Pasteur et instituts associés (ACIP) (Krifi *et al.*, 1998; Krifi *et al.*, 2002). Cette classification est basée sur la l'état de sévérité croissant. Trois grades cliniques de l'envenimation scorpionique, sont proposés selon une sévérité croissante.

IV.1. Le grade clinique I

Ce grade caractérisé par des symptômes locaux représentés essentiellement par une douleur locale, une agitation et une tachycardie (Krifi *et al.*, 1998 ; Krifi *et al.*, 2002).

IV.2. Le grade clinique II

Le tableau clinique de ce grade est caractérisé par la présence des troubles systémiques représentées par les symptômes suivants: agitation, douleur, hyper-salivation, frissonnement hypersudation, nausée, tachycardie, hypertension et une hyperthermie modérée. Les victimes présentant ces symptômes nécessite une hospitalisation (Krifi *et al.*, 1998; Krifi *et al.*, 1999). Ces manifestations systémiques apparaissent 5 à 20 min après piqure et ne comportant de menace pour le pronostic vital des patients envenimés (Krifi *et al.*, 1998; Krifi *et al.*, 1999; Krifi *et al.*, 2002).

IV.3. Le grade clinique III

Le patient présente des signes généraux sévères qui s'installent après un intervalle libre de 2 à 4 h après piqure. Aux signes précédents s'ajoutent des troubles respiratoires majeurs, cardiovasculaires, neuromusculaires avec des manifestations digestives et une altération de la conscience.

Ces signes se compliquent avec des troubles biologiques comme une hyperglycémie transitoire s'associant souvent à une hyperinsulinémie est fréquente tout comme l'hyperamylasémie en cas de piqûre par *Tityus serrulatus*. L'hyperleucocytose est presque constante tout comme l'acidose métabolique avec acidémie dans le tableaux graves (Mohamed *et al.*, 1972; Goyffon *et al.*, 1982; Krifi *et al.*, 2002).

V. Physiopathologie de l'envenimation scorpionique

Plusieurs études cliniques et expérimentales ont été menées afin d'expliquer les effets physiopathologiques du venin de scorpion. L'intérêt de ces études est d'expliquer les mécanismes impliqués lors d'une envenimation accidentelle.

V.1. Effets hémodynamique suite à une envenimation

Le système cardiovasculaire est probablement le système le plus étudié dans l'envenimation scorpionique.

Les effets cardiovasculaires sont souvent fatales induits par le venin chez l'Homme et chez les modèles animaux (Andrade *et al.*, 2004). Ces manifestations représentées par une hypertension prolongée accompagnée par une arythmie et un blocage atrioventriculaire, conduisant à un dysfonctionnement cardiaque et un échec ventriculaire (Ismail *et al.*, 1995; Shapira *et al.*, 1998). Une phase d'hypotension terminale est généralement suivie par un syndrome de choc et une bradycardie sévère (Gueron *et al.*, 1992; Ismail *et al.*, 1995). Ces symptômes sont dus à une large libération des neurotransmetteurs résultant de la fixation des peptides du venin aux canaux sodique voltage dépendant (Fatani *et al.*, 2000). Les mécanismes des lésions cardiaques ne sont pas encore bien élucidés (El-Alfy *et al.*, 2008). Les peptides du venin prolongent le potentiel d'action des cellules excitables avec un ralentissement de l'inactivation des canaux sodiques (Couraud *et al.*, 1982; Weisel-Eler et Libersal., 2004), ce qui conduit à une augmentation de la libération présynaptique de neurotransmetteurs incluant, les catécholamines; l'acétylcholine, le Glutamate et le GABA, conduisant à l'apparition des manifestations cardiovasculaires (Ito *et al.*, 1981; Massensini *et al.*, 1998; Purali; 2003; Gwee *et al.*, 2002; El-Alfy *et al.*, 2008). Les effets cardiovasculaires de l'envenimation scorpionique sont probablement dus à une stimulation du système nerveux autonome (Ismail., 1994).

L'analyse par la microscopie électronique à transmission montre un œdème intracellulaire, une dilatation du système tubulaire et une déposition des lipides (Yarom et Braum, 1971, Gueron et Yarom., 1970). Ainsi qu'une nécrose et une myocytolyse évidentes qui sont généralement observées au niveau du cœur. Deux d'hypothèse ont été proposé par Teixeira *et al* (2001), suggèrent que les lésions myocardiques provoquées par le venin de scorpion pourraient résulter de l'action toxique directe des toxines du venin. Toutefois, cette hypothèse est controversée puisque des données expérimentales ont révélé que le taux de toxines dans le tissu est trop faible pour obtenir des effets cytolytique et nécrotique (Devaux *et al.*, 2004). Les radicaux libres pourraient être délétère et provoquer des lésions au niveau d'organes causées par le venin (El-Alfy *et al.*, 2008).

La peroxydation lipidique conséquence majeure de la génération des radicaux libres, dans le foie et le poumon des rats envenimé par le venin d'*Androctonus* (Dousset *et al.*, 2005).

V.2. Perturbations hormonales suite à une envenimation

L'envenimation scorpionique sévère est caractérisée par une variation de plusieurs systèmes physiologiques qui conduisent souvent au décès de la victime envenimée.

Ces manifestations sont expliquées par la capacité des toxines de venin à activer les canaux sodium des terminaisons nerveuses et au niveau des zones démyélinisés des fibres nerveuses., effet le venin augmente la perméabilité de sodium au niveau de la membrane par l'ouverture

des canaux sodiques sensible au voltage, qui est accompagné d'entrée de calcium (Christian et al., 2005). Le système nerveux autonome comporte deux parties : le système sympathique et le système para-sympathique.

La stimulation du système nerveux autonome sympathique engendre la libération massive des catécholamines dans le tissu (Ismail, 1996), alors que le système parasympathique est aussi mis en jeu par le biais de la libération de l'acétylcholine (Amitai, 1998).

Le venin du scorpion stimule les deux branches du système nerveux autonome, et libère les neurotransmetteurs notamment les catécholamines, l'acétylcholine, la noradrénaline, la substance P et le peptide Y vasoconstricteur (Quartara et Maaggi., 1998; Goyffon., 2002, Matosi., 2003).

En effet, la décharge très intense de catécholamines explique la vasoconstriction, l'hypertension ainsi que le dysfonctionnement ventriculaire gauche (Figure 5).

Les travaux de Matosi, indique l'importance du récepteur NK1 (Récepteur de la substance P) dans la pathogénicité induite par le venin de scorpion et que la libération des neuropeptides pourrait jouer un rôle dans les manifestations systémiques observées dans le cas d'envenimation scorpionique sévère (Matosi., 2003).

V.3. Variations métaboliques suite à une envenimation

Plusieurs études ont montré que le venin de scorpion induit des altérations physiologiques et physiopathologiques au niveau des systèmes : cardiovasculaire, respiratoire, digestive et le système nerveux.

Les lésions tissulaires causées par l'envenimation, conduisent à une libération des enzymes intracellulaires et sont libérées dans le sang, entraînant ainsi leur une diminution des taux de ces enzymes au niveau des organes. L'évaluation de ces activités dans le sérum peut être à corrélée avec l'intensité des lésions tissulaires après une envenimation scorpionique.

En effet, une augmentation significative des taux de l'Aspartate aminotransférase (AST), de la lactate déhydrogénase (LDH), de la créatinine phosphokinase (CK), et l'amylase ont été observé après envenimation (Correa *et al.*, 1997; Pessini *et al.*, 2001; Adi-Bessalem *et al.*, 2008).

V.4. Le changement de l'équilibre des électrolytes suite à une envenimation

Les canaux ioniques sont la cible biologique des toxines des venins de scorpions. L'interaction de ces toxines avec leurs récepteurs, provoque une modification de la perméabilité des cellules excitables aux ions, qui pourrait conduire à des modifications de l'équilibre physiologique des ions.

Une augmentation significative des ions K^+ au niveau sérique est observé après injection du venin de *Buthus minas* (Ismail *et al.*, 1976) et *Bothus occitanus* et *Androctonus amoreuxi* (Ismail *et al.*, 1980; Ismail et Abd-Essalem., 1988).

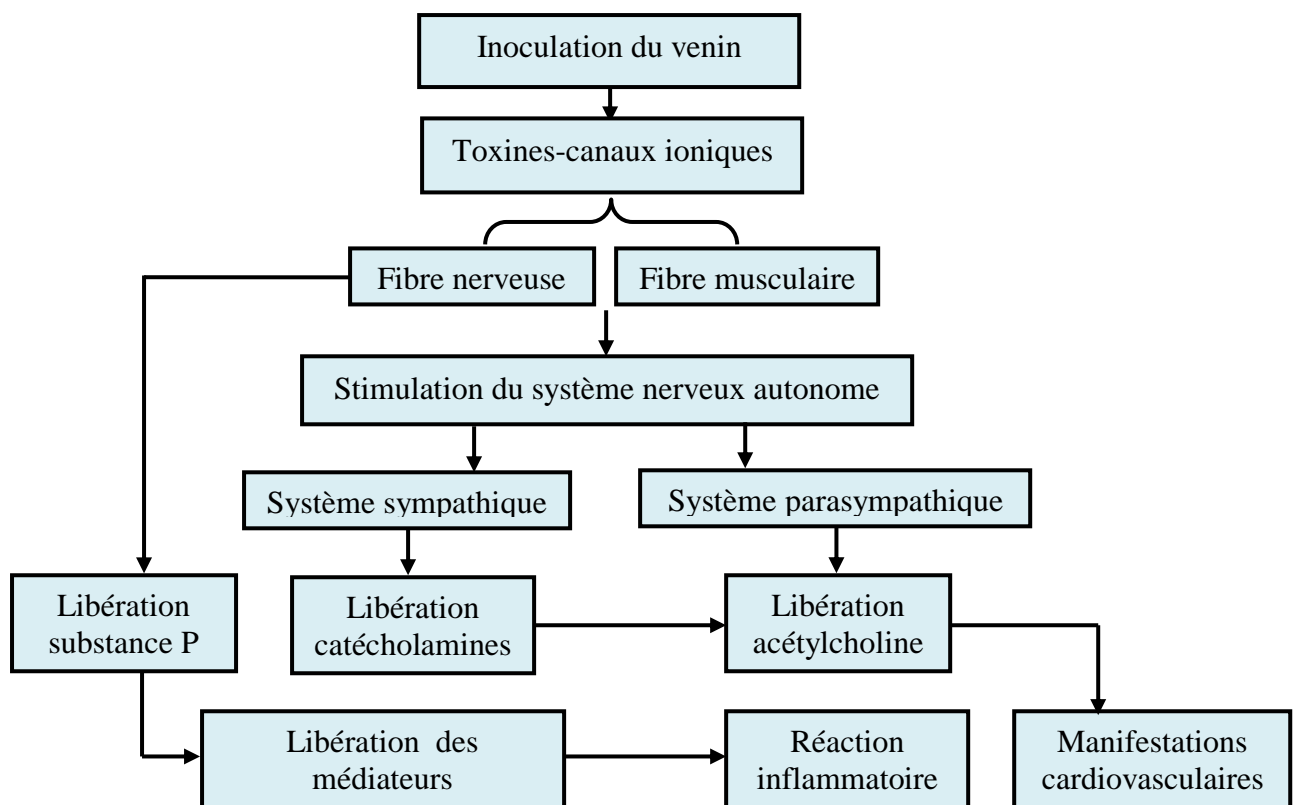


Figure 5 : Neuromodulation des perturbations physiopathologiques engendrées après une envenimation scorpionique

D'autres études ont rapporté que les venins de *Leiurus quinquestriatus* et *Bothus minas* provoquent une diminution significative des taux sériques de sodium, du calcium et du magnésium et une augmentation du phosphate inorganique chez les animaux d'expérimentation (El-Asmar *et al.*, 1975; Ismail *et al.*, 1978; Tash *et al.*, 1982; Hagag *et al.*, 1983; Ismail *et al.*, 1994). Le venin de *Buthus minas* et deux de ses toxines purifiées diminuent le taux du calcium sérique et le phosphore chez les rat et augmentent la déposition du calcium au niveau du cœur (Hagag *et al.*, 1983). Il a été proposé que la diminution des taux du sodium sérique et le phosphore chez les rats et l'augmentation du taux de potassium suite à une envenimation scorpionique, sont probablement dues des altérations de la perméabilité des cellules de l'organisme tel que l'érythrocyte et les glandes exocrines, en affectant le fonctionnement des canaux ionique (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) (Mohammed *et al.*, 1954).

VI. Réaction inflammatoire

L'inflammation est un phénomène de défense non spécifique répondant à une agression, qui vise à maintenir l'intégrité du soi. Une fois que l'agression reconnue, se met en jeu un ensemble complexe de cellules et de médiateurs humoraux.

La réaction inflammatoire est une composante de la réponse immune. Elle est impliquée dans l'immunité naturelle en réponse à un signal de danger. Elle favorise ainsi l'induction de la réponse immune spécifique.

La réaction inflammatoire peut être locale (vasodilatation locale, exsudation plasmatique et afflux local de cellules inflammatoires au niveau cutané à la suite d'une plaie ou au niveau de la muqueuse bronchique dans l'asthme allergique par exemple) ou générale (signes généraux comme la fièvre, la production hépatique des protéines de la phase aiguë ; exemple du syndrome inflammatoire aigu systémique).

Trois séquences d'événements complexes et intriquées composent la réponse inflammatoire : elle débute par une phase vasculaire initiale durant laquelle il ya une vasodilatation, une transsudation plasmatique, un œdème et une fibrinof ormation locale.

L'œdème inflammatoire est dû au passage dans le tissu conjonctif interstitiel ou les cavités séreuses d'un liquide appelé exsudat fait d'eau et de protéines plasmatiques. L'œdème inflammatoire résulte d'une augmentation de la pression hydrostatique due à la vasodilatation et surtout d'une augmentation de la perméabilité de la paroi des petits vaisseaux sous l'effet de médiateurs chimiques, dont l'histamine.

La phase cellulaire est caractérisée par un afflux extravasculaire interstitiel de leucocytes.

La migration des leucocytes en dehors de la microcirculation et leur accumulation dans le foyer lésionnel. Elle intéresse d'abord les polynucléaires (pendant les 6 à 24 premières heures), puis un peu plus tard (24 à 48 heures) les monocytes et les lymphocytes. Il s'agit d'une traversée active des parois vasculaires qui comporte plusieurs étapes :

- Margination des leucocytes à proximité des cellules endothéliales, favorisée par le ralentissement du courant circulatoire.

- Adhérence des leucocytes aux cellules endothéliales, par la mise en jeu de molécules d'adhésion présentes sur la membrane des leucocytes et sur l'endothélium.

- Passage trans-endothélial des leucocytes. Ils émettent des pseudopodes qui s'insinuent entre les jonctions inter-cellulaires des cellules endothéliales puis les leucocytes traversent la membrane basale grâce à une dépolymérisation transitoire provoquée par leurs enzymes.

La phase de résolution finale est caractérisée par la mise en jeu des facteurs conduisant à la cicatrisation tel que l'activation des fibroblastes (Abramson *et al.*, 1984).

VII. Réaction inflammatoire induite par les venins

L'inflammation est caractérisée par l'accumulation de cellules et de facteurs humoraux en réponse à un traumatisme causé par un stress, une lésion ou la présence de pathogènes.

A-Effet du venin sur le recrutement des cellules inflammatoires

Le recrutement des leucocytes au niveau du site de la lésion est l'événement clé de la défense de l'hôte contre les agents agresseurs et une partie de l'inflammation.

Il a été suggéré que le venin de scorpion provoque une réaction inflammatoire. En effet, des études cliniques indiquent que le venin induit une augmentation du nombre de leucocytes circulantes chez les patients victimes d'une envenimation scorpionique (Magalhaes *et al.*, 1998).

Les résultats de Sami-Merah et ses collaborateurs en 2008, montrent que le venin d'*Aah* et ces composants induits un recrutement des leucocytes vers la cavité péritonéale, de même une étude récente de Adi-Besalem *et al* en 2008, indique que le venin d'*Aah* provoque une hyperleucocytose au niveau du sang périphérique. De même, des études expérimentales confirment que les venins de scorpions *Tityus serrulatus* et *Adroctonus australis hector*, provoquent une réaction inflammatoire caractérisée par une leucocytose locale (cavité péritonéale et pleurale) et systémique, ainsi qu'une stimulation de la migration cellulaire au niveau du tissu pulmonaire des animaux envenimés (Borges *et al.*, 2000; De Matos *et al.*, 2001; D'Suze *et al.*, 2003; Bertazzi *et al.*, 2003; Coelho *et al.*, 2007; D'Suze *et al.*, 2007).

B- Implication des médiateurs inflammatoires

Il a été précédemment décrit que l'envenimation scorpionique peut développer un syndrome de la réponse inflammatoire systémique (SIRS) qui peut causer un choc, un dysfonctionnement cardiaque et une détresse pulmonaire (Sequera., 1993; Porras *et al.*, 1994; Rucarechi *et al.*, 1995; Amaral *et al.*, 1992, 1994; Rossomando *et al.*, 1997; D'Suze *et al.*, 1999).

Plusieurs études précédentes ont confirmé l'implication des médiateurs pro-inflammatoires dans les manifestations physiopathologiques dans le cas de l'envenimation scorpionique humaine (Meki et Mohey-El Dean., 1998).

L'envenimation scorpionique peut stimuler les axes neuroendocrino-immunologiques par sa capacité de libérer les catécholamines, corticoïdes, bradykinines et les prostaglandines. Ces facteurs sont prouvés être capables d'induire la libération des médiateurs immunologiques telle que les cytokines et les chimiokines (Chaudry *et al.*, 1989). En effet, les patients envenimés par *Tityus discrepans* développent des désordres adrénergiques et cholinergiques

(Motosd *et al.*, 1994). La libération des neurotransmetteurs peut induire une libération des cytokines (Chaudry *et al.*, 1989).

L'envenimation par les scorpions implique l'activation du système inflammatoire avec libération et activation des cytokines pro- et anti-inflammatoires, des médiateurs chimiotactiques et d'autres médiateurs vasoactifs. L'activation du système inflammatoire et de sa cascade d'événements, joue un rôle important dans la pathogénicité de l'envenimation scorpionique humaine et serait responsable de certaines manifestations systémiques (Magalhaes *et al.*, 1999; Petricivich *et al.*, 2004).

En effet, des travaux précédents ont démontré que le taux de l'IL-6, l'IL1- α , l'IL1- β , l' α -AT, NO, l'INF- γ et le GM-CSF augmentent après une piqûre de *Buthotus* ou de *Tityus* (Sofer *et al.*, 1996; Barbouche *et al.*, 1996; Barraviera *et al.*, 1997; Meki et Mohey-El Dean., 1998; Magalhaes *et al.*, 1999; Fukuhara *et al.*, 2003; Hammoudi-Triki *et al.*, 2004). De plus, Les taux du TNF- α , IL1- β , IL-6 et IL-8 ont été significativement élevés chez les patients avec cas d'envenimation modéré et sévère et les niveaux des cytokines est positivement corrélé avec la sévérité de l'envenimation, comme il a été évalué par les profils cliniques et la concentration plasmatique du venin de *Tityus serrulatus*. (Petricevich *et al.*, 2002; Fucuhara *et al.*, 2003).

L'étude de Petricevich en 2006, a montré que la balance pro et anti-inflammatoire des cytokines sériques, est significativement élevé chez les souris BALB/c traitées avec le venin *centruroides noxius* (Petricevich., 2006).

De plus, une augmentation du taux de NO a été également mise en évidence chez les patients piqués par le scorpion (Meki et Mohey El-Dean, 1998).

En outre, la réponse inflammatoire intense est amplifiée dans le compartiment vasculaire impliquant la protéine réactive C intrinsèque et l'activation du complément. Le complément est l'un des premiers effecteurs de la réponse immune à être activé. Les éléments du complément présents sous une forme inactive dans le plasma peuvent être activés rapidement pour assister à la réponse innée et spécifique.

L'activation du système complément a été également décrite après envenimation par des scorpions (*Aah*, *Tityus*) et par les serpents.

L'augmentation de l'activité lytique du complément a été observée dans le sérum des rats envenimés par la dose sublétales du venin d'*Aah* et *Tityus serrulatus* et sa toxine majoritaire TsTX-I. Le clivage de la fraction C3, C5b, est facteur chimio-attracteur leucocytaire. Les résultats montrent que CS est impliqué dans la réaction inflammatoire induite par le venin de *Tityus serrulatus* et par conséquent il pourrait contribuer dans la genèse de l'œdème pulmonaire, l'hémolyse, la leucocytose, et plusieurs manifestations de l'envenimation sévère (Bertazzi *et al.*, 2003, 2005; Adi-Bessalem *et al.*, 2007; Paneque *et al.*, 2009).

De nombreuses cytokines sont retrouvées au sein des foyers inflammatoires. Ces cytokines jouent un rôle clé dans la médiation des réactions inflammatoires aiguës, à savoir l'IL-1, le TNF- α , l'IL-6, l'IL-11, l'IL-8 et autres chimiokines, le G-CSF, et le GM-CSF. Parmi eux, l'IL-1 (α et β) et TNF sont des molécules inflammatoires extrêmement puissantes: ce sont les cytokines primaires qui interviennent durant inflammation aigüe induite chez l'animal par injection intradermique de lipopolysaccharide bactérien et deux des principaux médiateurs du choc septique (Carol *et al.*, 1997).

Le TNF- α et IL-1 partagent plusieurs propriétés pro-inflammatoires. Ces deux cytokines stimulent la production de l'IL-6. Comme l'IL-1, le TNF- α peut induire la fièvre, soit directement par stimulation de synthèse du PGE2 par l'endothélium vasculaire de l'hypothalamus, soit indirectement en induisant une libération de l'IL-1 β .

Les effets de l'IL-1 β au niveau local conduisent à la libération des médiateurs dérivés lipidiques (le PAF et les eicosanoïdes) et une migration des neutrophiles, des monocytes et des lymphocytes. Cette migration est due à deux événements contrôlés par l'IL-1 qui sont l'induction de la synthèse des chimiokines tel que l'IL-8 et l'augmentation des molécules d'adhérences. De plus, l'IL-1 β , peut stimuler la prolifération des lymphocytes T. En outre, l'IL-1 provoque la libération d'histamine par les mastocytes au site de l'inflammation. L'histamine par la suite déclenche une vasodilatation précoce et une augmentation de la perméabilité vasculaire. L'IL-6 est très abondante lors des processus inflammatoires et l'augmentation de sa production a été observée dans plusieurs pathologies inflammatoires. Elle induit la production des protéines de la phase aiguë de l'inflammation par les hépatocytes (Cavaillon., 1995). L'IL-6 agit également comme un facteur de croissance des cellules B matures, leur maturation en cellules productrices d'anticorps (plasmocytes) et il est impliqué dans l'activation des lymphocytes T (Carol *et al.*, 1997).

D'autre part, les cytokines anti-inflammatoires tels que l'IL-4, l'IL-10, l'IL-13 et le TGF β , permettent de limiter l'induction, l'entretien ou l'amplification de la réponse inflammatoire en inhibant les productions des cytokines pro-inflammatoires d'IL-1, d'IL-6, d'IL-8 et de TNF. La notion du « réseau des cytokines » illustre parfaitement la participation de ces médiateurs au cours des mécanismes inflammatoires (Figure : 6).

C- L'Oedème induit par les venins

L'œdème pulmonaire est la complication la plus fréquemment rencontrée dans le cas d'envenimation scorpionique sévère (Andrade *et al.*, 2002; Rabai *et al.*, 2003).

Des études expérimentales ont montré que l'œdème produit par le venin de *Tityus serrulatus* suite à une augmentation de la perméabilité vasculaire et une production des médiateurs dérivés lipidique de l'inflammation incluant les PAF, leucotriène, prostaglandines (Freira-Maia., 2002).

Gueron et ces collaborateurs en 1992, ont démontré le rôle des kinines et des prostaglandines dans l'induction de l'œdème pulmonaire. L'augmentation de leurs taux peut conduire à une augmentation de la perméabilité vasculaire, qui pourrait à l'origine de l'œdème pulmonaire et promouvoir la migration des neutrophiles, l'induction de la production de d'autres médiateurs dont les cytokines, le NO, les prostaglandines et les leucotriènes, et d'autres médiateurs. (Bhoola *et al.*, 1992; Freira-Maia *et al.*, 1993). Les résultats de Fuchahara en 2003, indiquent que le système des kinines peut être impliqué dans la pathogénèse de l'envenimation chez l'Homme par venin de *Tityus serrulatus*.

L'un des mécanismes expliquant l'origine de l'œdème pulmonaire dans le cas d'envenimation scorpionique se réfère au dysfonctionnement du ventricule gauche chez les patients avec un œdème pulmonaire, résultant de la libération massive des catécholamines et des lésions directe provoquées par le venin (Freira-Maia *et al.*, 1978 ; Freira-Maia et Campos., 1989; Gueron *et al.*, 1990; Amaral *et al.*, 1991; Hering *et al.*, 1993; Cupo *et al.*, 1994; Abrough *et al.*, 1995; Bucarechi *et al.*, 1995; Zeghal *et al.* , 2000; Mazzei *et al.*, 2002).

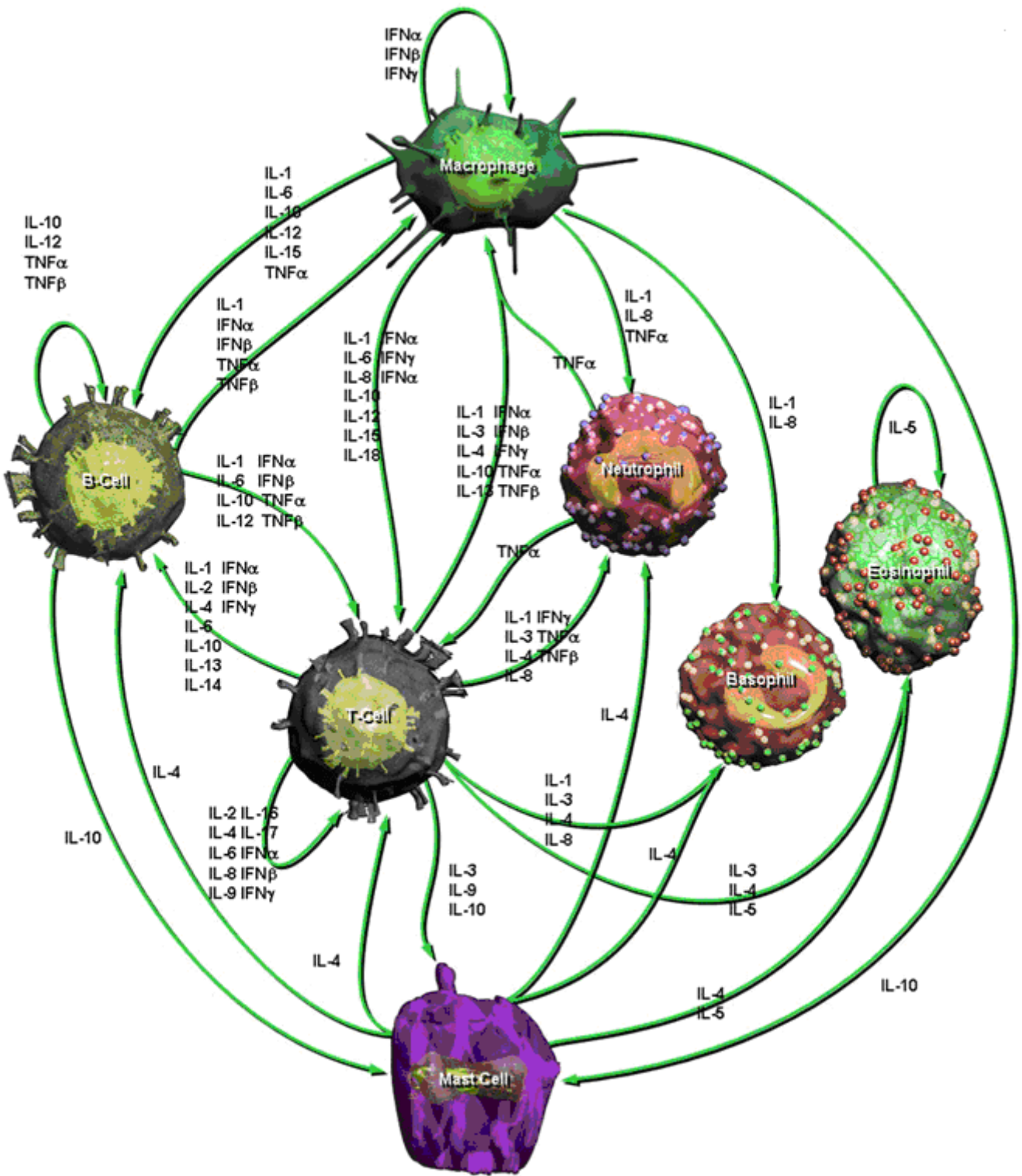


Figure 6: Représentation du réseau cytokinique (Heinrich., 1998 ; Jason., 2001 ; Townsend., 2000)

Matériel
et
méthodes

II- Matériel et méthodes

II-1- Matériels biologiques

II.1.1 – Le venin d’*Androctonus australis hector*

Le venin d’*Androctonus australis hector* est obtenu par stimulation électrique. Il nous a été fourni sous forme lyophilisée, par le Laboratoire de Recherche et Développement sur le Venin de l’Institut Pasteur d’Algérie. La DL50 du venin d’*Aah* est estimée à 0.85 mg/kg d’animaux (Laraba-Djebari et Hammoudi-Triki., 1998).

II.1.2 – La fraction toxique majoritaire du venin d’*Aah* (FToxG50 *Aah*)

La fraction toxique majoritaire du venin d’*Aah* (FToxG50) a été obtenue après fractionnement du venin total par chromatographie d’exclusion moléculaire sur Sephadex G50. Cette fraction nous a été fournie par le Laboratoire de Recherche et Développement sur le venin à l’IPA. Sa DL50 est estimée chez la souris à 0,45 mg/kg d’animal (Laraba-Djebari et Hammoudi-Triki, 1998).

II.1.3 – Toxine Aah II

La toxine Aah II purifiée nous a été gracieusement fournie par le Docteur Marie France Martin-Eauclaire. Sa DL50 est estimée à 5 µg/kg.

Les rats:

Les rats *Rattus norvegicus* de sexe mâle (180 ± 30 g), ont été fournis par l’animalerie de l’IPA.

II-2 Méthodes

II.2.1 - Dosage des médiateurs de l’inflammation après envenimation avec le venin ou ses composants toxiques

Le dosage de certains marqueurs de la réaction inflammatoire est effectué au niveau des sérums et des homogénats de poumons dans un tampon adéquat après injection intrapéritonéale du venin *Aah*, de la FToxG50 ou de la toxine Aah II à la dose sublétales (Figure 1).

II.2.1.1 - Dosage de la Myéloperoxydase (MPO)

La MPO est une hémoprotéine caractéristique des granules azurophiles des polynucléaires, elle est responsable de la production d’un puissant agent bactéricide, l’ion hypochlorite dans le phagosome.

L’infiltration des polynucléaires neutrophiles (PN) est révélée par le dosage de l’activité enzymatique myéloperoxydase (MPO), elle mesurée par l’augmentation de l’absorbance due à l’oxydation de l’orthodiazotidine mesurée à 460 nm.

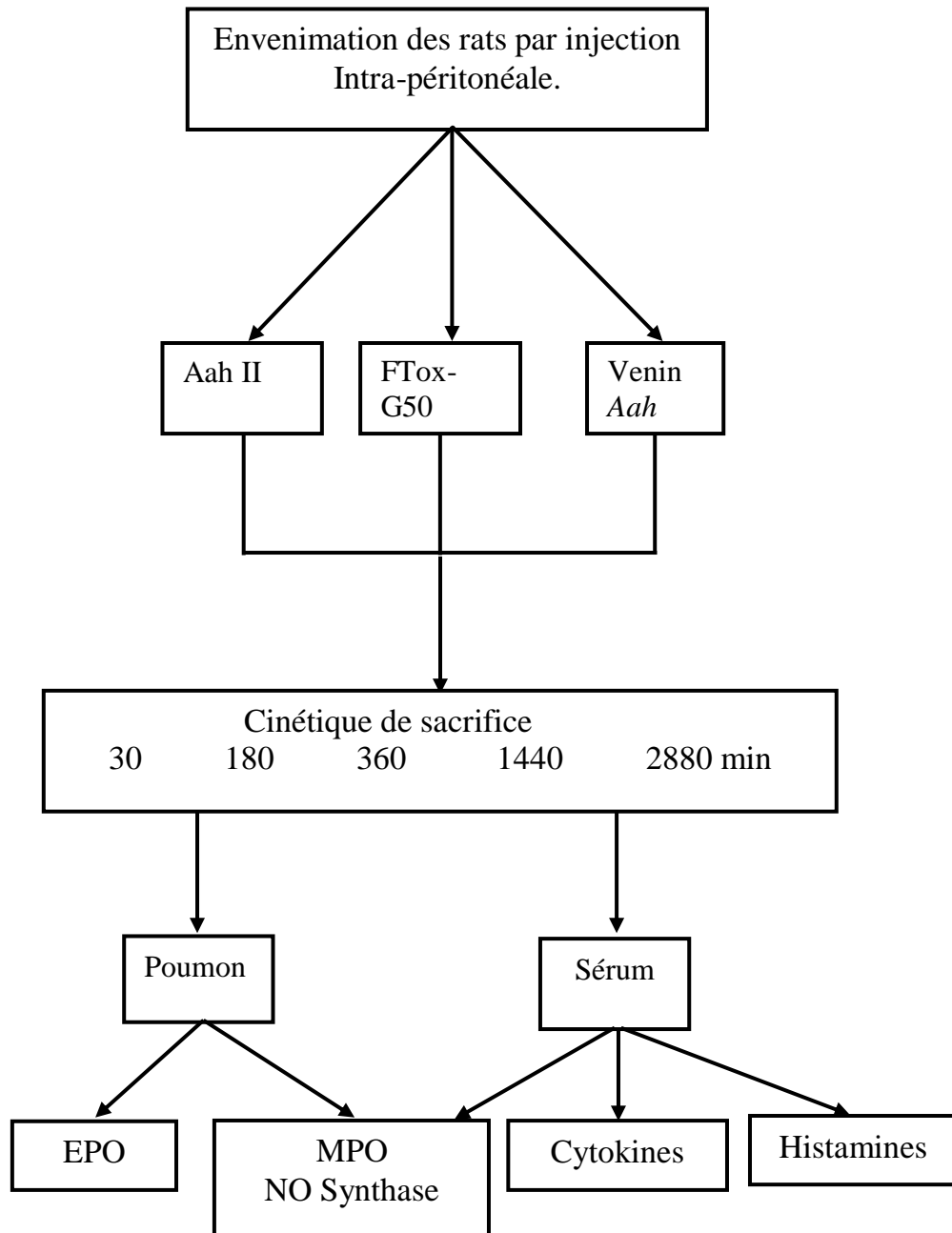


Figure 1: Démarche expérimentale utilisée pour étudier certains médiateurs impliqués dans le processus inflammatoire induit après une envenimation avec le venin d'*Aah* ou ses composants toxiques.

L'activité MPO a été mesurée au niveau des sérums et dans les homogénats pulmonaires récupérées à partir des animaux envenimés.

Les échantillons tissulaires sont broyés à 4°C à l'aide d'un homogénéisateur de type ultraturax T25 à 9500 trs /min dans un phosphate 50 mM pH 6 contenant 1% triton X100 et 1 mM EDTA, à raison de 200 mg par 1 ml de tampon

Les homogénats subissent trois cycles de congélation-décongélation suivis d'une centrifugation à 10 000 g pendant 10 min à 4C.

Le surnageant et le sérum sont mélangés avec le milieu réactionnel contenant du tampon phosphate 50 mM pH 6; 0.5% triton X100 et 1,6 mM d'orthodiazotidine (V/V). Après une incubation à 37°C la réaction de l'oxydation du substrat est déclenchée par une solution H₂O₂ à 0,0005%.

II.2.1.2 - Dosage de l'activité Eosinophile peroxydase (EPO)

L'éosinophile peroxydase (EPO), est un marqueur de l'infiltration des éosinophiles dans l'arbre broncho-pulmonaire. Elle est libérée par les éosinophiles activés par les différents médiateurs de la cascade inflammatoire (IL-5 et IL-3), (Pelmont., 1993, Roit., 2002).

Le dosage de l'EPO est effectué au niveau des homogénats de poumons d'animaux traités avec le venin d'*Aah*, la FToxG50 ou de la toxine Aah II.

Les poumons sont homogénéisés dans un tampon phosphate 50 mM pH 8 contenant 0,5% Triton X100 puis centrifugés à 10 000 g pendant 10 min à 4C.

La peroxydase éosinophile est mesurée par ELISA. Pour cela, un volume de 50 µl de surnageant est déposé dans les puits de la microplaque. Après une incubation d'une heure en présence de 100 µl du milieu réactionnel contenant du tampon phosphate 50 mM pH 8; 0,5% Triton X100 et 1mM d'OPD. L'absorbance est mesurée par spectrophotométrie à 490 nm.

II.2.1.3 - Dosage de l'activité NO synthase (NOS)

L'activité NO synthase a été mesurée par la quantification du monoxyde d'azote (NO). La détermination des taux du NO dans les milieux biologiques est effectuée par le dosage de ses métabolites stables, nitrites (NO₂) et nitrates (NO₃), en utilisant la méthode de Griess modifiée.

L'activité NOS a été mesurée au niveau des sérums et dans les homogénats pulmonaires récupérées à partir des animaux envenimés.

Les nitrites sont mesurés par diazotation du sulfanilamide et couplage avec N-naphtylethylène diamine (réactif de Griess). Afin de doser les nitrites totaux (NO₂+NO₃), les échantillons sont incubés en présence du cadmium (V/V), sous agitation pendant 30 min à température ambiante puis centrifugés à 12 000 g pendant 2 min.

Les surnageants sont incubés avec le réactif de Griess pendant 20 min. La lecture de l'absorbance est effectuée à 540 nm.

Les résultats sont extrapolés sur une courbe étalon préalablement établie avec le NaNO₂ (150µM), pour calculer les concentrations des nitrites (Annexe).

II.2.1.4 - Dosage des cytokines

L'identification et la quantification des cytokines testées ont été réalisées par la méthode d'ELISA en présence des anticorps monoclonaux anti-cytokine : l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-4, l'IL-5, l'IL-12, ICAM-1 au niveau des sérums des animaux envenimés par le venin et ses composés toxiques. Les taux des ICAM-1 dans les homogénats pulmonaires ont été également déterminés.

Le dosage des cytokines est réalisé par la technique ELISA sandwich selon les recommandations du fabricant (Sigma).

Les plaques de microtitration préalablement recouvertes avec le premier anticorps monoclonal anti-cytokine, sont incubées avec les sérums (rat et de souris) et les standards de chaque cytokine. Une autre incubation est effectuée avec un deuxième anticorps biotinylés puis avec le conjugué streptavidine-HRP. L'activité enzymatique est révélée après l'addition du substrat Tetraméthylbenzidine (TMB). La réaction est ensuite arrêtée et la lecture de l'absorbance est effectuée à l'aide d'un lecteur de microplaque à 405 nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration des cytokines présentes dans l'échantillon et le standard. L'extrapolation des valeurs de densité optique (DO) des échantillons se fait à l'aide d'une courbe étalon (DO = f [standard]).

II.2.1.5 - Dosage de l'histamine

Le dosage quantitative immuno-enzymatique de l'histamine a été effectué en utilisant un kit « Histamine Enzyme Immuno Assay » de type sandwich. Ce dosage par compétition entre histamine libre des échantillons biologiques et des standards avec l'histamine marqué par la HRP fournie dans le kit est effectué en plusieurs étapes :

II.2.1.5.1 - Préparation des échantillons par acylation

L'acylation de l'histamine présente dans les échantillons et des standards (20 μ l) a été effectuée en ajoutant un milieu réactionnel contenant du tampon d'acylation (25 μ l), le réactif « équilibrant » (25 μ l) et du réactif d'acylation (10 μ l) par puits. Le mélange est incubé pendant une heure à température ambiante sous agitation (400-500 rpm). Une autre incubation est effectuée (30 min à température ambiante) après addition d'eau distillée (200 μ l).

II.2.1.5.2 - Etape immunologique

Les échantillons et les standards acylés (20 μ l) ont été déposés sur une microplaque recouverte d'anticorps monoclonal d'anti-Histamine, l'addition d'antisérum d'histamine (100 μ l), a été suivie par une incubation pendant 15 à 20 h à 4°C. Après addition du conjugué d'histamine couplé à la peroxydase (100 μ l), une série de lavages a été réalisée, elle est suivie par une incubation pendant une heure à température ambiante sous agitation (400-500 rpm). Après lavage des puits l'activité enzymatique est mesurée après addition à l'obscurité du substrat chromogène Tetraméthylbenzidine (TMB), incubé 30 min à température ambiante. La réaction est ensuite arrêtée par addition de la solution d'Arrée à raison de (100 μ l) par puits. L'absorbance est lue à 450 nm en utilisant un lecteur ELISA.

II-2-2 Mise en évidence de l'activité oedématisante induite par le Venin d'Aah

II-2-2 -1 Œdème pulmonaire induit par le venin et ses constituants toxiques

La différence entre le poids humide et le poids sec a été utilisée pour la mesure de l'œdème pulmonaire. Le poumon gauche des animaux traités avec le venin d'Aah, la FTox-G50 et la toxine Aah II a été prélevé et pesé (poids humide), ensuite séché à l'étuve à 65° C pendant 48 h. Les organes ainsi séchés sont repesés (poids sec), La différence entre le poids humide et le poids sec a été déterminée. Cette technique nous a permis de mettre en évidence l'œdème pulmonaire induit par le venin natif et ces constituants toxiques en présence et en absence de traitement (Dexaméthasone et Indométacine) (Figure 2).

II-2-2-2- Evaluation de l'œdème plantaire induit par le venin et ses constituants toxiques

L'évaluation de l'œdème local induit par le venin et ses composants toxiques a été déterminée en calculant l'augmentation du poids exprimé en pourcentage du poids de la patte droite traitée ayant reçu une dose sublétales sous l'aponévrose plantaire de venin d'Aah, par rapport au poids de la patte gauche témoin ayant reçu le même volume d'une solution saline stérile.

II-2-3 Etude des altérations tissulaires engendrées par la toxine Aah II au niveau du foie en comparaison à celle induite par le venin

L'étude histologique est réalisée afin de visualiser les altérations tissulaires au niveau du tissu hépatique après une envenimation par la toxine purifiée Aah II et ce afin de les comparer avec celles observées avec le venin ou la FTox-G50 déjà étudiées par notre équipe. Dans cette étude, les animaux sont envenimés par une voie intra péritonéale et sacrifiés après 24 heures. Cette technique comprend plusieurs étapes selon Martoja (voir annexe).

Le foie des rats témoins et du rat envenimé avec la dose sublétales de la toxine purifiée Aah II, sont prélevés dans un délai de 24 h d'envenimation, ils sont ensuite lavés rapidement avec l'eau physiologique puis fixés dans une solution de formol à 4% pendant 48 h afin de conserver les structures tissulaires, puis traité selon le protocole d'histologie de Martoja (voir annexe). Des coupes de 7 µm sont réalisées à l'aide d'un microtome rotatif puis étalés sur des lames imprégnées de l'eau gélatinée 0.4%. La coloration des coupes est réalisée avec de l'hématoxyline-éosine. Ces coupes sont ensuite hydratées, montées entre lame et lamelles à l'aide d'une résine hydrophobe (Baume de Canada) (Annexe), puis observées à l'aide d'un microscope photonique type Motic.

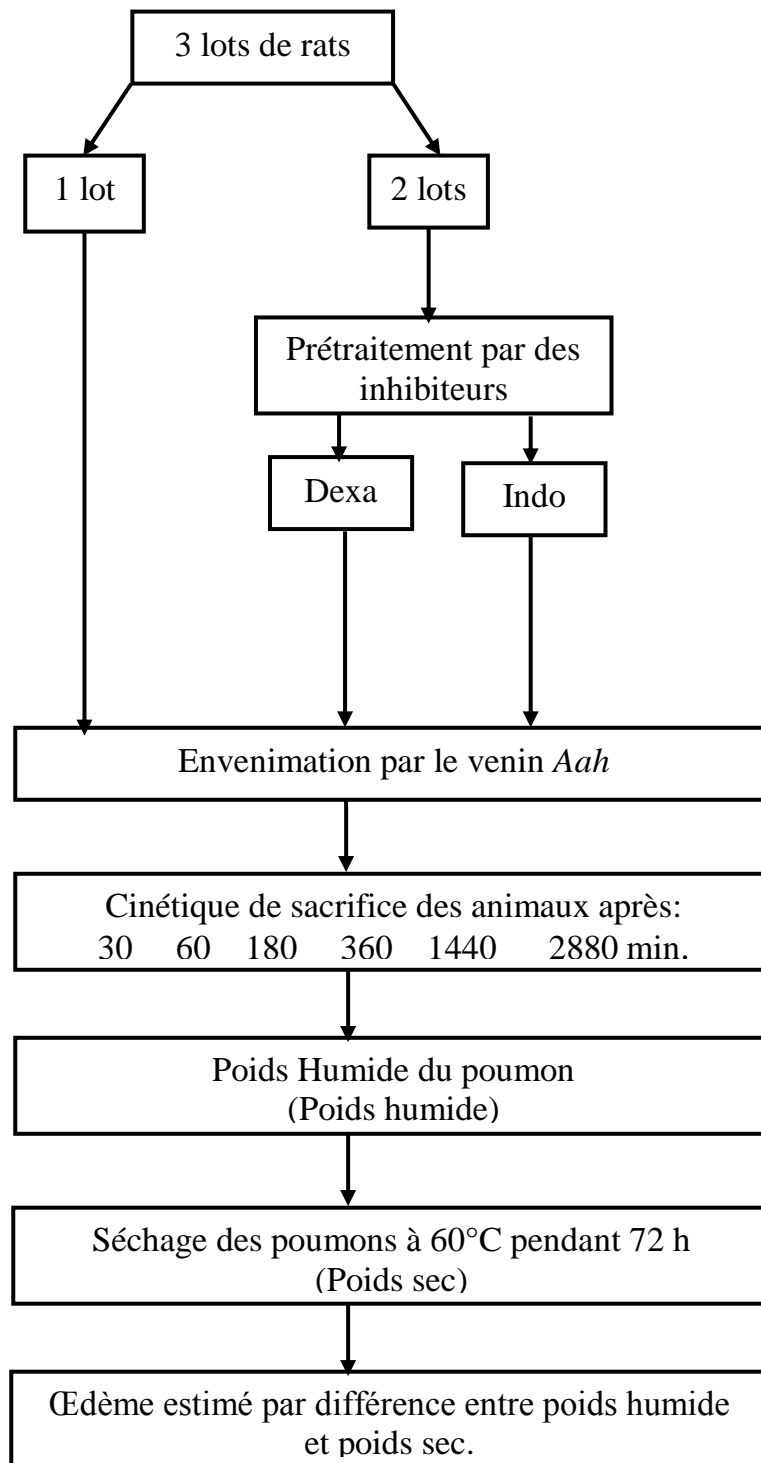


Figure 2: Démarche expérimentale pour l'étude de l'effet oedématisant au niveau pulmonaire du venin d'*Aah*.

Résultats et discussion

1. Effet de l'envenimation scorpionique sur l'activité myéloperoxydase (MPO)

Les neutrophiles sont des cellules phagocytaires mobiles qui jouent un rôle clé dans l'immunité et la réaction inflammatoire aiguë (Fauschou., 2003). Lorsque la réaction inflammatoire devient incontrôlée, la dégranulation massive des neutrophiles libère la myéloperoxydase (MPO) et d'autres enzymes protéolytiques, qui induisent des lésions tissulaires. La MPO est l'une des enzymes principales libérées dès l'activation des PN. (Lau *et al.*, 2005).

La MPO est utilisée comme marqueur de l'accumulation des neutrophiles dans de nombreuses pathologies inflammatoires. L'augmentation de son taux vasculaire est un marqueur des maladies inflammatoires systémiques et vasculaires tels que le sepsis et l'ischémie/reperfusion (Deby-Dupont *et al.*, 1999; Witko-Sarsat *et al.*, 2000; Poon *et al.*, 2001; Cohen, 2002 ; Serteyn *et al.*, 2003).

Les résultats obtenus après envenimation des rats avec le venin et ses composants toxiques montrent que l'administration du venin d'*Aah*, sa fraction toxique et sa toxine Aah II, par voie intra-péritonéale provoquent une augmentation significative de l'activité myéloperoxydase sérique (*Aah*: $0,544 \pm 0,043$ mM/min; FTox-G50: $0,418 \pm 0,035$ mM/min, Aah II: $0,66 \pm 0,06$ mM/min) et au niveau des homogénats du tissu pulmonaire (*Aah*: $0,543 \pm 0,179$ mM/min, FTox-G50: $0,709 \pm 0,17$ mM/min, Aah II: $0,642 \pm 0,08$ mM /min) après seulement 30 min de l'envenimation, en comparaison avec les taux observés au niveau des sérums et dans les homogénats de poumon récupérés à partir des animaux témoins $0,301 \pm 0,16$ mM/min et $0,34 \pm 0,19$ mM /min respectivement. Le maximum d'activité MPO a été obtenu à 1440 min après envenimation où il a été noté pour les sérums d'animaux traités par venin d'*Aah*, fraction toxique et la toxine Aah II des taux de $1,08 \pm 0,14$ mM /min; $1,327 \pm 0,21$ mM/min et $1,62 \pm 0,45$ mM/min respectivement, et pour les homogénats pulmonaires les taux suivants : (*Aah*: $1,26 \pm 0,065$ mM/min; FTox-G50: $1,377 \pm 0,055$ mM/min; Aah II: $2,73 \pm 0,032$ mM/min) ($p \leq 0,05$).

De plus les résultats indiquent une diminution des taux de la MPO au niveau des sérums et dans les homogénats pulmonaires à 48 h après envenimations.

Ces résultats montrent que le venin d'*Aah* et ses toxines provoquent une augmentation du recrutement des neutrophiles au niveau du sang périphérique et dans les poumons des animaux envenimés. Cet effet est plus marqué avec les toxines, indiquant ainsi que ce sont elles et essentiellement la toxine Aah II, qui sont responsables de l'augmentation de l'infiltration et de l'activation de neutrophiles (Figure 1 et 2).

L'inflammation est un mécanisme de défense complexe, caractérisée par une migration leucocytaire du sang périphérique vers les tissus endommagés.

L'une des caractéristiques majeures de l'inflammation aiguë est que l'infiltration leucocytaire est initialement et principalement neutrophilique (Lau *et al.*, 2005).

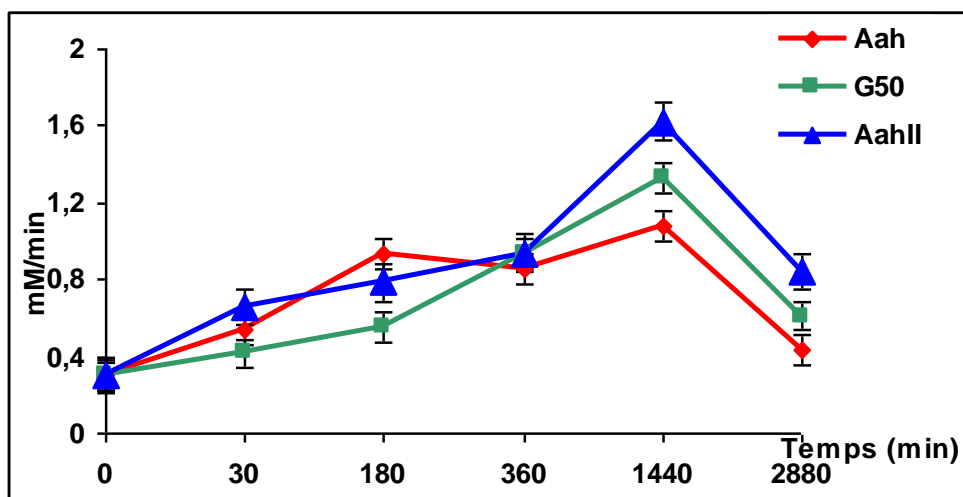


Figure 1: Activité myéloperoxydase sérique après envenimation avec venin le d'Aah, FTox-G50 et la toxine Aah II.

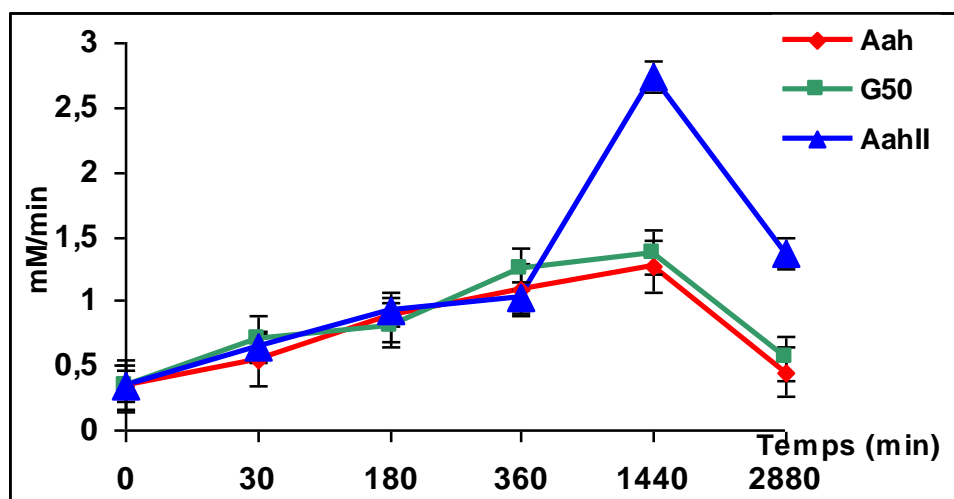


Figure 2: Activité myéloperoxydase pulmonaire après envenimation avec le venin d'Aah, FTox-G50 et la toxine Aah II.

Cependant au delà de 24 h à 48h, les neutrophiles disparaissent *in situ* par apoptose alors que les cellules monoculaires tels que les macrophages et les lymphocytes s'accumulent au niveau du site inflammatoire (Ryan *et al.*, 1977; Doherty *et al.*, 1988; Melnicoff *et al.*, 1989; Kaplanski *et al.*, 2003).

Les résultats obtenus suggèrent que le venin et essentiellement ses toxines induisent une réaction inflammatoire aiguë caractérisée par une potentialisation du recrutement et de l'activation des neutrophiles, suivie par une transition du recrutement cellulaire avec une diminution de la séquestration des neutrophiles. Cette infiltration neutrophilique pourrait être remplacée par des cellules mononucléaires de 1440 à 2880 h après envenimation. (Figure 1,2).

Les résultats obtenues dans ce travail sont similaires à ceux déjà obtenus par notre équipe, montrant que l'injection du venin d'*Aah* par voie sous cutanée, provoque une leucocytose dans le sang périphérique (systémique) avec prédominance des polynucléaires neutrophiles et des cellules mononuclées (Adi-Bessalem *et al.*, 2008).

D'autres résultats suggèrent que l'injection par voie intra- péritonéale du venin d'*Aah* et de sa toxine Aah II provoquent une leucocytose dans la cavité péritonéale et la cavité pleurale avec prédominance de neutrophiles, des cellules mononuclées et des lymphocytes. Une augmentation du recrutement des neutrophiles vers le tissu pulmonaire, a été également rapportée. Cet afflux est plus important lorsque la toxine Aah II est injectée (Sami-Merah *et al.*, 2007, 2008 ; Adi-Bessalem *et al.*, 2008).

Des résultats similaires obtenus indiquent que les venins de scorpion provoquent une réaction inflammatoire caractérisée par une leucocytose systémique importante due à une neutrophilie chez des patients envenimés. Un afflux de leucocytes a été trouvé dans le poumon des patient ayant eu une envenimation modéré à sévère par le venin de *Tytilus serrulatus* (Campos *et al.*, 1980; Meki et Mohey El-Dean., 1998; Magalhaes *et al.*, 1999; Abdel-haleem *et al.*, 2006).

De même, des travaux réalisés avec le venin de *Tytilus serrulatus*, sa fraction TsTX-1et le venin de *Tytilus discrepans*, ont montré l'apparition d'une leucocytose aussi bien locale que systémique ainsi qu'une augmentation du recrutement des neutrophiles vers le poumon des animaux d'expérimentation (Borges *et al.*, 2000; De Matos *et al.*, 2001 ; D'Suze *et al.*, 2004 ; Coelho *et al.*, 2007) .

Le mécanisme par lequel le venin induit une infiltration des neutrophiles n'est pas encore bien élucidé. Par ailleurs, les manifestations cliniques décrites après une envenimation par le scorpion *Tytilus serrulatus* sont dues à la capacité des neurotoxines présentes dans le venin à stimuler système nerveux périphérique entraînant une libération des neurotransmetteurs (catécholamines et acétylcholine) (Freire-Maia *et al.*, 1989).

En effet, la leucocytose provoquée par le venin pourrait être expliquée par la libération de catécholamines (Campos., 1980).

Différentes stimulus peuvent induire une mobilisation des neutrophiles de la moelle osseuse par libération de catécholamines à partir des glandes adrénales, en agissant soit sur les β -adrenorecepteurs ou sur les $\alpha 1$ -adrenorecepteurs (Altenburg *et al.*, 1994; Altenburg *et al.*, 1997).

Il a été également suggéré que le venin affecte le système immunitaire par une mobilisation des leucocytes suite à la libération des médiateurs inflammatoires tels que le facteur activateur

des plaquettes (Platelet activated factor :PAF) ainsi que l'activation de son récepteur, les leucotriènes, les prostaglandines, les cytokines et les chimiokines (Magalhaes *et al.*, 1999; De Matos *et al.*, 2001; Meki and Mohey El-Dean., 1998; Matos *et al.*, 1999 a, b; Sofer *et al.*, 1996; Petricevich et Penna., 2002; Petricevich., 2002, 2004; D'Suze *et al.*, 2003; Fukuhara *et al.*, 2003, Matos *et al.*, 2007).

Des travaux réalisés sur le venin *Tityus serrulatus*, ont démontré que ce dernier induit une libération des neuropeptides (telle la substance P), qui activent l'expression du récepteur tachykinine (R-NK1) au niveau des leucocytes (mastocyte et macrophages) (Brain *et al.*, 1997), ce qui conduit à une libération du PAF dans les tissu comme le poumon et la moelle osseuse.

Les résultats de Borges indiquent que le PAF jouerait un rôle important dans la mobilisation des neutrophiles matures de la moelle osseuse (Borges *et al.*, 2000), il pourrait agir localement pour stimuler les cellules impliquées dans le processus inflammatoire tels que les leucocytes et les cellules endothéliales par activation de son récepteur (PAFR) (Borges *et al.*, 2000).

2. Effet de l'envenimation scorpionique sur l'activité peroxydase éosinophile (EPO)

La peroxydase éosinophile (EPO) est un indicateur de l'activation et de l'infiltration des éosinophiles dans la l'arbre broncho-pulmonaire.

Les résultats obtenus indiquent que l'envenimation avec une dose sub létale du venin *Aah*, de la fraction FTox-G50 ou de la toxine purifiée *Aah II*, provoque une élévation importante et précoce du taux de l'EPO au bout de 30 min de l'envenimation (*Aah*: $2,35 \pm 0,43$ UDO, FTox-G50: $2,022 \pm 0,21$ UDO, *Aah II*: $3,45 \pm 0,39$ UDO), par rapport au taux basal observé chez les animaux témoins ($0,72$ UDO $\pm 0,25$ UDO).

Un deuxième pic important est observé à 360 min après envenimation où il a été noté des taux de $3,13 \pm 0,40$, $2,752 \pm 0,25$ UDO, $2,88 \pm 0,35$ UDO après envenimation par le venin *Aah*, FTox-G50 ou la toxine *Aah II* ($p \leq 0,05$) (Figure 3).

L'activité éosinophile peroxydase est fortement affectée après envenimation par le venin d'*Aah* et ses toxines. La séquestration des éosinophiles dans le poumon des animaux envenimés semble être plus importante avec les toxines et principalement la toxine *Aah II*.

L'éosinophile est la cellule la plus caractéristique (mais non spécifique) de l'inflammation de la muqueuse bronchique au cours des allergies notamment de l'asthme.

L'activation de ces cellules dans la muqueuse bronchique entraîne la libération de substances hautement réactives et toxiques ainsi que de nombreuses cytokines qui influencent les réponses immunitaires, amplifient la réponse inflammatoire et créent des processus de lésions-remodelage de la paroi bronchique.

Les granules cytoplasmiques des polynucléaires éosinophiles contiennent de nombreux médiateurs en particulier des enzymes cytotoxiques et des protéines cationiques de l'éosinophile :

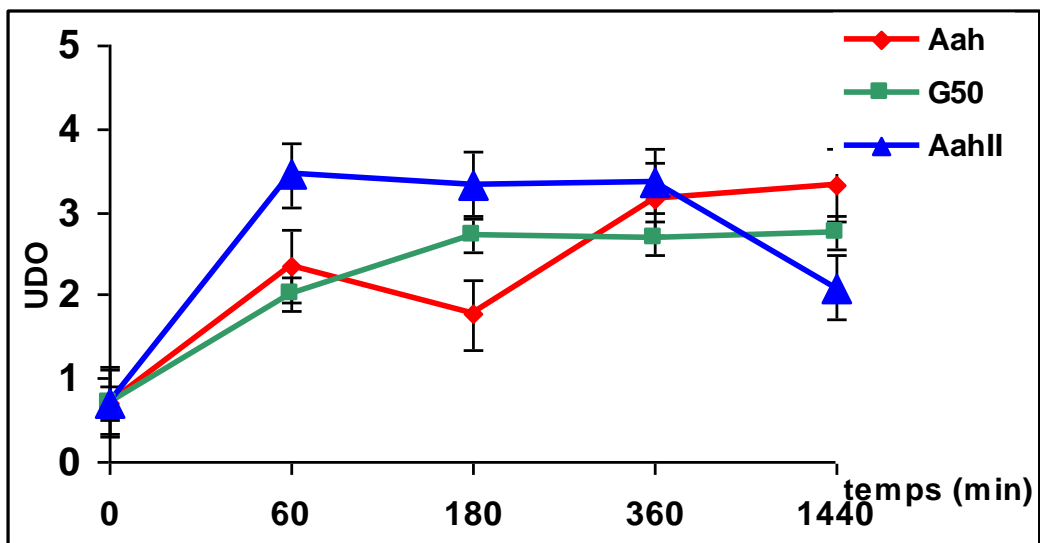


Figure 3: Cinétique de l'activité éosinophile peroxydase pulmonaire après envenimation avec le venin d'*Aah*, FTox-G50 et la toxine Aah II.

Protéine basique majeure ou «major basic protein» (MBP), protéine cationique de l'éosinophile ou «eosinophil cationic protein» (ECP), peroxydase de l'éosinophile ou «eosinophil peroxidase» (EPO) et neurotoxine dérivée de l'éosinophile ou «eosinophil derived neurotoxin» (EDN).

La présence de polynucléaires éosinophiles au niveau du parenchyme pulmonaire à des taux élevé peut entraîner des lésions cellulaires et du tissu pulmonaire avec:

- Une lyse des pneumocytes.
- Une altération des fonctions ciliaires de l'épithélium bronchique.

Les résultats obtenus suggèrent que les toxines du venin d'*Aah* sont capables de provoquer une hyper-éosinophilie pulmonaire et probablement une réaction inflammatoire de type allergique.

Plusieurs facteurs solubles de la famille des cytokines possèdent des fonctions spécifiques attractantes des éosinophiles. Trois cytokines: IL-3, IL-5, GM-CSF.

Chez l'homme, l'éosinophile est la cible de l'IL-5 (Mc Gillis *et al.*, 1990), Cette cytokine induit la mobilisation de ces cellules *in vitro* et *in vivo*, et également l'adhérence aux cellules endothéliales. Dans le cas de l'allergie, l'orientation de synthèse des cytokines vers la production des cytokines (IL-4, IL-5) conduit à l'infiltration spécifique des éosinophiles dans un premiers temps au moins. Les éosinophiles et cellules endothéliales sont deux cibles privilégiées pour l'IL-4 et l'IL-5 respectivement, après interaction avec leurs récepteurs spécifiques.

Ces deux cytokines induisent l'expression de deux molécules d'adhérence: VCAM-1 pour les cellules endothéliales et VLA-4 ($\beta 1$ integrin) pour les éosinophiles. L'interaction de ces deux molécules conduit à l'adressage vers le site inflammatoire.

L'expression du récepteur pour iC3b (MAC-1, CR3) sur les neutrophiles et les éosinophiles peut être modulée par un signal d'activation. L'IL5 induit l'expression du CD11b sur les éosinophiles et le couple Mac-1/ICAM-1 intervient également dans l'adhérence spécifique des éosinophiles à l'endothélium (Lotz *et al.*, 1987).

Parmi les mécanismes d'activation des éosinophiles au niveau des muqueuses bronchiques, il y a la voie d'activation médiée par les complexes immuns, la stimulation médiée par les récepteurs pour IgE qui conduit à la libération de l'EPO (O'Byrne *et al.*, 1992).

L'EPO stimule la libération de l'histamine à partir des mastocytes, l'activation de l'éosinophile conduit également à la production et la libération des substances néosynthétisées. Il s'agit notamment de dérivés du métabolisme oxydatif comme les radicaux libres ou ceux du métabolisme lipidique comme les leucotriènes et les prostaglandines ou le PAF.

D'autre part, l'activation des éosinophiles pourrait initier la réponse lymphocytaire spécifique à l'antigène et la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires tels que: l'IL-1- β , l'IL-6 et le TNF α . (Russo-Marie *et al.*, 1998).

3. Effet de l'envenimation scorpionique sur l'activité de la NO synthase

Le taux des nitrites totaux au niveau des sérums d'animaux témoins recevant une solution d'eau physiologique est de $1,204 \pm 0,045 \mu\text{M}$ et un taux basal plus faible de au niveau du tissu pulmonaire de $0,515 \pm 0,053 \mu\text{M}$.

La cinétique de production du monoxyde d'azote montre que l'envenimation avec le venin d'*Aah* natif, la fraction FTox-G50 ou avec la toxine purifiée Aah II, induit une augmentation significative des taux des nitrites sériques et dans les homogénats du tissu pulmonaire.

Les concentrations maximales sont obtenues à 360 min après envenimation: au niveau sérique, le venin d'*Aah*, FTox-G50 et la toxine Aah II, provoquent une augmentation presque de 17 fois le taux obtenu avec le témoin (*Aah*: $23,13 \pm 1,45 \mu\text{M}$, FTox-G50: $21,68 \pm 0,96 \mu\text{M}$, Aah II: $18,09 \pm 0,9 \mu\text{M}$). De même, une augmentation de 25 fois a été observée au niveau du tissu pulmonaire (*Aah*: $13,13 \pm 1,26 \mu\text{M}$, FTox-G50: $15,18 \pm 1,52 \mu\text{M}$, Aah II: $18,39 \pm 1,02 \mu\text{M}$) ($p \leq 0,05$).

Ces résultats obtenus montrent que le venin natif d'*Aah* ainsi que ces composants toxiques potentialisent la production du NO au niveau du sang périphérique et dans le tissu pulmonaire, ce qui révèle que les toxines du venin d'*Aah* induisent l'expression et l'induction de la forme inductible de la NO synthase (iNOS) (Figure 4 et 5).

D'autres travaux ont montré que des concentrations élevées de cytokines pro-inflammatoires et du NO ont été détectées chez des patients envenimés à la suite d'une piqure par les scorpion de *Leirus quinquestriatus* et *Buthus occitanus*, de *Leirus quinquestriatus hebroeus* (Sofer *et al.*, 1996; Meki *et al.*, 1997; Mekki et Mohey-Dean, 1998).

L'augmentation du NO peut être expliquée par la libération des cytokines, comme l'IFN- γ et l'IL1- β , activant l'isoforme inductible de la NO synthase (iNOS) au niveau des cellules endothéliales et des leucocytes, responsable de la libération de quantités élevées de NO.

D'autre part, les isoformes constitutifs (nNOS et eNOS) peuvent être activés sous l'effet de la libération de l'acétylcholine et de la bradykinines libérés au cours de l'envenimation scorpionique (Busse *et al.*, 1993).

Le NO est un médiateur hautement réactif, il joue un rôle important dans plusieurs processus physiologique incluant la régulation de la broncho relaxation. Le NO est également impliqué dans la cytotoxicité médiée par le macrophage et dans la régulation de la prolifération cellulaire (Feder et Laskin, 1994; Laskin *et al.*, 1994). L'excès de la production du NO peut être impliqué non seulement dans les lésions tissulaires, mais également dans la régulation de la régénération de l'épithélium alvéolaire après une lésion (Debra *et al.*, 1998).

4. Effet de l'envenimation scorpionique sur les taux des cytokines

Les cytokines sont des médiateurs directs de la réaction inflammatoire et immunologique. Elles peuvent être subdivisées en cytokines pro-inflammatoires telles l'IL-1b, l'IL-6 et TNF- α et des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10, l'IL-4 et l'IL-13.

Chez les animaux témoins, les cytokines: IL-1 β , l'IL-6, l'IL-12, l'IL-13, l'IL-4, l'IL-5, ICAM-1 et ICAM-1s montre respectivement les taux suivants: 141 ; 75.7 ; 564 ; 141 ; 3,8 ; 3.48 ; 164 ; 90 pg/ml. Les résultats du dosage des cytokines sont représentés après soustraction des valeurs des taux obtenus chez les animaux témoins.

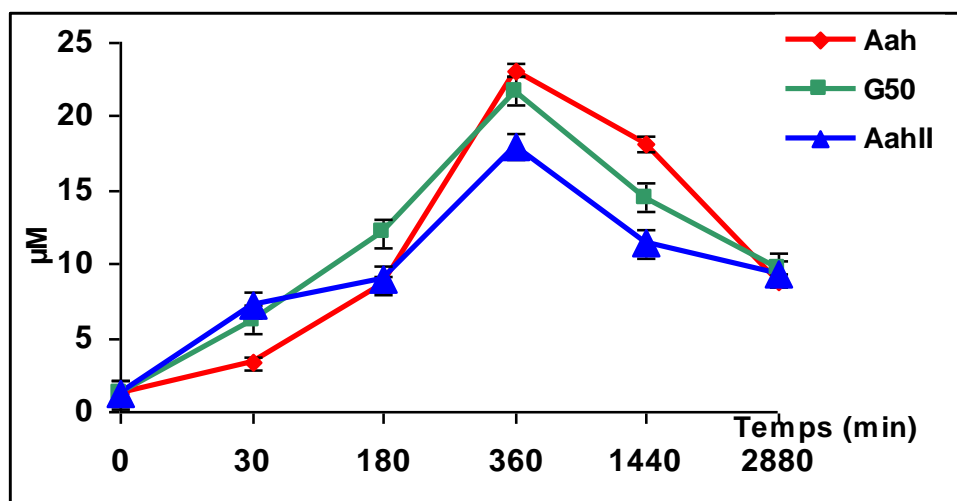


Figure 4: Dosage du NO sérique après envenimation avec le venin d'*Aah*, FTox-G50 ou la toxine Aah II.

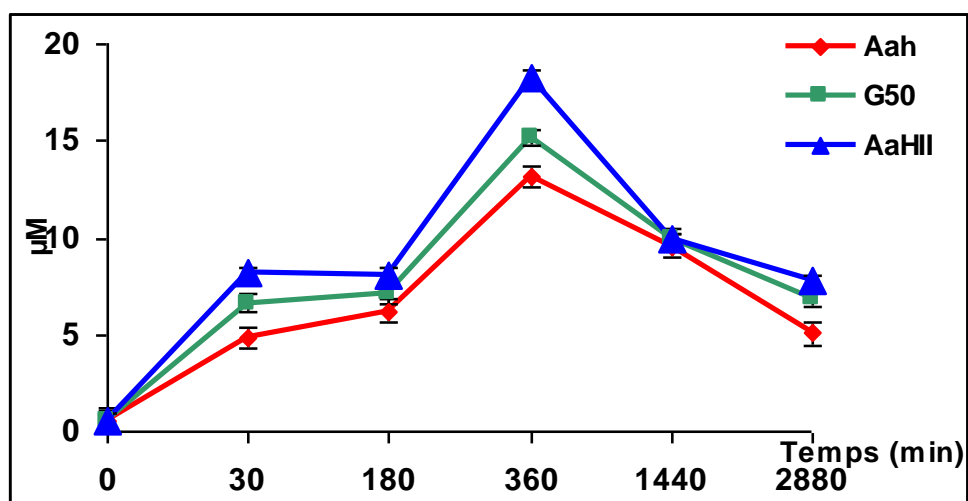


Figure 5: Dosage du NO pulmonaire après envenimation avec le venin d'*Aah*, FTox-G50 et la toxine Aah II.

La cinétique de la production de l'IL-1 β révèle un profil biphasique, le premier pic est obtenu après 30 min de l'envenimation (*Aah* : 854,08 pg/ml, FTox-G50 : 608,4 pg/ml, *Aah* II : 1457 pg/ml), suivi d'un autre maximum de 506,25 pg/ml, 588 pg/ml à 360 min après injection du venin d'*Aah*, FTox-G50 respectivement, et un taux de 663,42 pg/ml à 1440 min après injection de la toxine purifiée *Aah* II (Figure 6).

Les concentrations de l'IL-6 sont rapidement augmentées pour atteindre des taux de 97,13 pg/ml, 128,57 pg/ml, 77,13 pg/ml après 30 min de l'injection du venin d'*Aah*, FTox-G50 ou de la toxine purifiée *Aah* II respectivement, des concentrations maximales sont obtenues à 360 min après envenimation (*Aah*: 120,58 pg/ml, FTox-G50: 381,43 pg/ml, *Aah* II: 231.43 pg/ml) (Figure 7).

La cinétique de l'IL-12 montre une augmentation progressive, les concentrations maximales sont obtenues à 180 min d'envenimation (*Aah*: 369 pg/ml, FTox-G50: 841 pg/ml, *Aah* II: 336 pg/ml) (Figure 8).

Le dosage des concentrations des cytokines anti-inflammatoires l'IL-4 et IL-13 montre une augmentation retardée. Les concentrations maximales sont obtenues à 360 min après envenimation. Pour l'IL-4 nous avons noté des taux de 64,51 pg/ml, 50,42 pg/ml et 64.75 pg/ml après injection du venin d'*Aah*, FTox-G50 ou de la toxine purifiée *Aah* II respectivement (Figure : 9). La cinétique du dosage de l'IL-13 montre des taux maximaux de 721.1 pg/ml, 210 pg/ml et 2111.1 pg/ml après envenimation par le venin d'*Aah*, FTox-G50 ou de la toxine purifiée *Aah* II (Figure : 10)

La cinétique du dosage des taux de l'IL-5 montre des concentrations détectables à partir de 30 min et atteint des taux maximaux à 180 min après l'envenimation (*Aah*: 22,70 pg/ml, FTox-G50: 20,47 pg/ml, *Aah* II: 15,23 pg/ml) (Figure : 11)

Par ailleurs, Les concentrations des molécules d'adhésions cellulaires au niveau des sérums (ICAMs) et des homogénats pulmonaires (ICAM-1), des animaux envenimés ont été également déterminées.

Les résultats révèlent que la cinétique des concentrations des ICAM-1 au niveau des homogénats du tissu pulmonaire, montrent une augmentation importante au bout de 30 min de l'envenimation. Des concentrations maximales de 472,36 pg/ml ; 622,72 pg/ml et 554,18 pg/ml sont obtenues à 180 min après envenimation par le venin *Aah*, la FTox-G50 et la toxine purifiée *Aah* II respectivement (Figure : 12)

De même, des taux élevés des ICAM-1s ont été observés au bout de 30 min de l'envenimation. Les concentrations maximales sont obtenues à 180 min après envenimation avec des taux de 18,82 pg/ml ; 223,86 pg/ml et 224,68 pg/ml après envenimation par le venin *Aah*, la FTox-G50 et la toxine purifiée *Aah* II respectivement.

Les taux des ICAM-1s sériques et dans le homogénats pulmonaires restent élevés jusqu'à 1440 min de l'envenimation (Figure : 12).

L'ensemble des résultats obtenus révèle que les toxines du venin d'*Aah*, FTox-G50 induisent une augmentation des taux sériques des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β , l'IL-6 et des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-4 et l'IL-13.

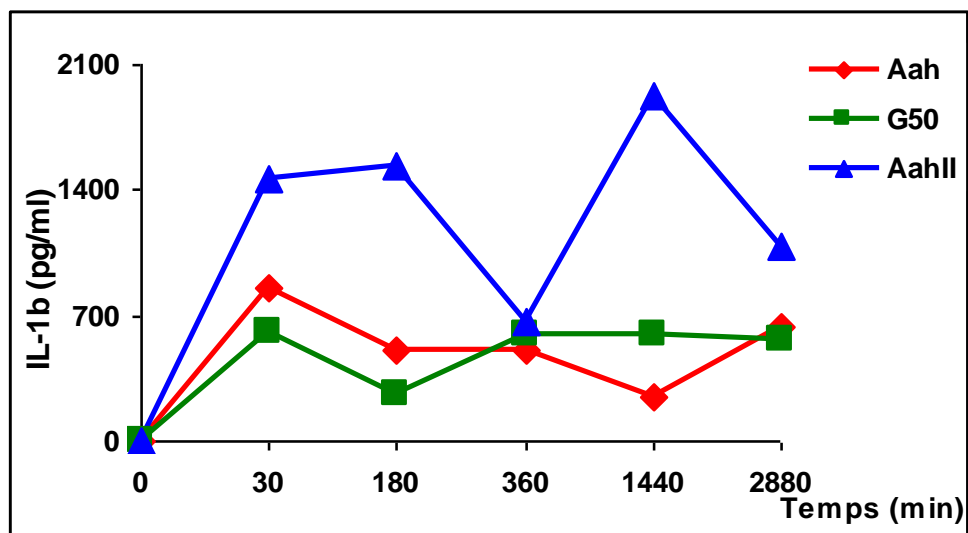


Figure 6: Dosage d'IL-1 β sérique après envenimation avec le venin d'*Aah*, FTox-G50 et la toxine Aah II.

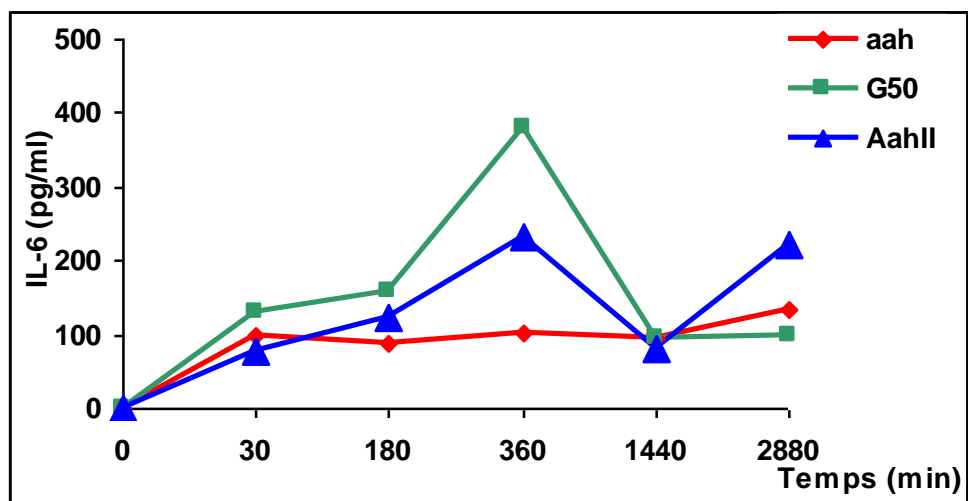


Figure 7: Dosage d'IL-6 sérique après envenimation avec venin d'*Aah*, FTox-G50 et la toxine Aah II.

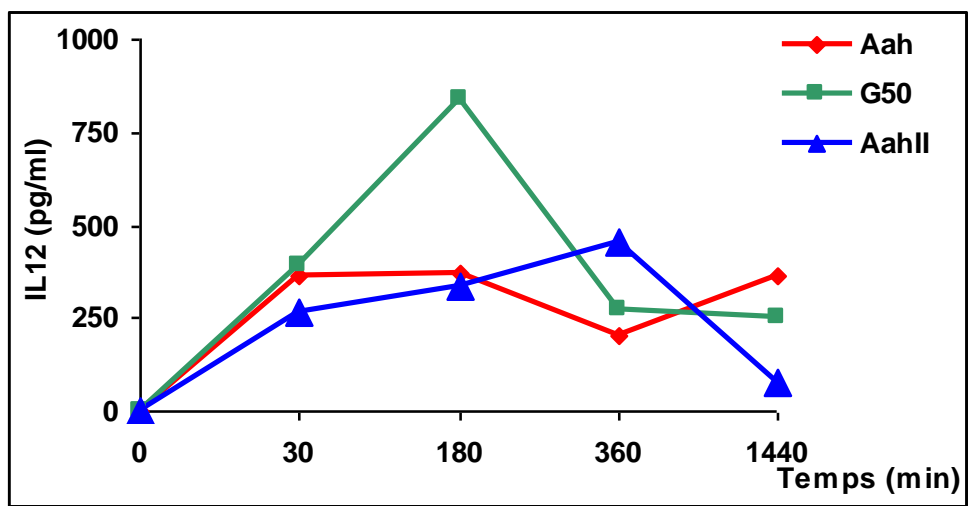


Figure 8: Dosage de l'IL-12 sérique après envenimation avec le venin d'*Aah*, FTox-G50 et la toxine Aah II.

L'augmentation des taux de l'IL-4 et de l'IL-5 indique que les toxines du venin d'*Aah* semblent être impliqués dans l'activation des éosinophiles et causer une réaction inflammatoire de type allergique (Figure 9 et 10).

De même, Les résultats révèlent que les toxines du venin *Aah*, notamment sa toxines Aah II induisent l'augmentation de l'expression des ICAM-1 sur l'endothélium pulmonaire. Lorsque ce dernier est activé, ces molécules permettent l'adhésion irréversible des leucocytes à sa surface et facilitent leurs transmutations a travers l'endothélium.

Les molécules ICAM-1 jouent également un rôle dans l'interaction entre cellules immunitaires et la transduction du signal qui médie plusieurs fonctions incluant l'activation, la prolifération, cytotoxicité et la production des cytokines (Stanciu *et al.*, 1999).

En plus de sa forme membranaire, la molécule d'ICAM-1 existe également sous une forme soluble : ICAM-1s.

Il semble que cette molécule soit issue d'un clivage protéolytique de la molécule membranaire (région extracellulaire d'ICAM-1) et qu'elle soit capable de se lier à ses récepteurs les intégrines leucocytaires LFA-1 (CD 11a/CD 18) et Mac-1 (CD 11b/CD 18), ayant ainsi la propriété de moduler les interactions adhésives entre les cellules circulantes et l'endothélium. Les taux d'ICAM-1s sont fortement augmentés dans de nombreuses pathologies à composante immune, inflammatoire et/ou cancéreuse. Cette élévation du taux d'ICAM-1s plasmatique servir de marqueurs moléculaires présenter un marqueur des maladies inflammatoires (Comez *et al.*, 2000 ; Gilain *et al.*,2000). De plus, une étude récente a démontré que les taux de cette dernière ont été fortement élevés suite à une envenimation par le venin *Aah* et ses toxines. qui pourraient indiquer la participation de ces molécules dans la réaction inflammatoire provoquée par le venin d'*Aah* (Figure12 et 13).

Des études précédentes ont révélé que la plupart des cytokines sont un groupe de protéines régulatrices et immunomodulatrices impliquées dans certains nombre de processus physiologiques. Le rôle des cytokines durant l'inflammation est d'initier et de réguler l'ensemble du processus: certains initient amplifient la réponse, d'autres soutenues ou atténuent le. Le dérèglement de la leurs production, induise des lésions tissulaire et médiées des complications de la réponse inflammatoire (Disaia et Greesman., 1989; Petricevich., 2006). Ces travaux suggèrent la relation qui pourrait exister entre la surproduction de certaines cytokines telles que l'IL-6 et la morbidité ainsi que la mortalité de certaines maladies inflammatoires (Roumen *et al.*, 1993).

Plusieurs études suggèrent l'implication des médiateurs pro-inflammatoires dans les manifestations physiopathologiques de l'envenimation scorpionique humaine (Meki et Mohey El-Dean., 1998). L'envenimation scorpionique implique l'activation et la libération des cytokines pro-inflammatoire, des chimiokines et d'autre médiateurs vasoactives. L'activation du système inflammatoire et de sa cascade d'événements joue un rôle important dans la pathogénicité de l'envenimation scorpionique.

La production des cytokines a été étudiée dans le cas d'envenimation scorpionique. En effet, des altérations dans les taux sanguins de cytokines ont été observées aussi bien dans le cas d'envenimation clique qu'expérimentales.

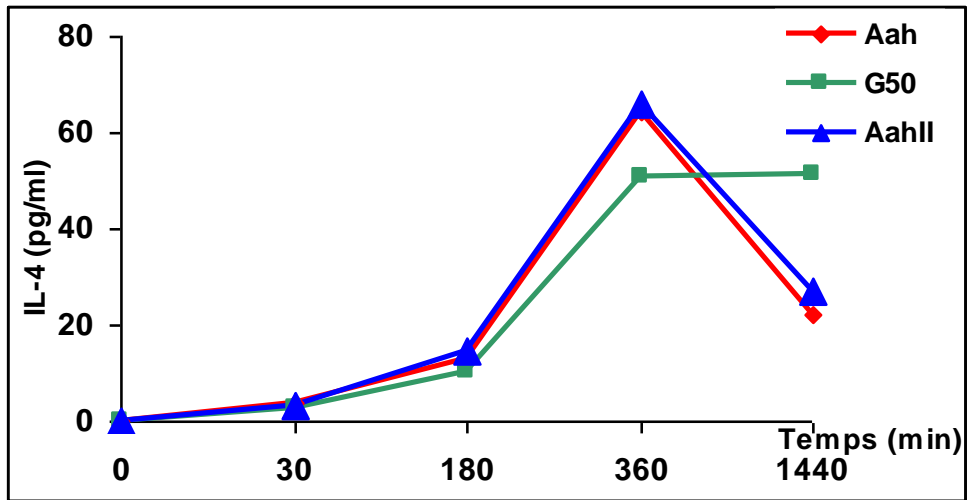


Figure 9: Dosage de l'IL-4 sérique après envenimation avec le venin d'*Aah*, FTox-G50 et la toxine Aah II.

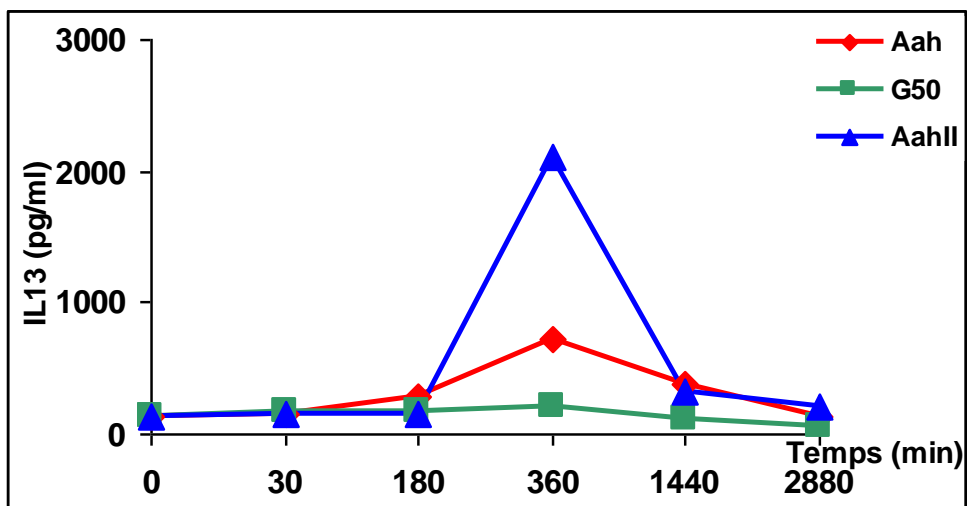


Figure 10: Dosage de l'IL-13 sérique après envenimation avec le venin d'*Aah*, FTox-G50 et la toxine Aah II.

Les piqûres de scorpion provoquent des lésions tissulaires qui pourraient induire une réaction inflammatoire systémique et par conséquent une libération des cytokines (Chaudry *et al.*, 1989). Les cytokines libérées pourraient jouer un rôle dans la pathogénicité de l'envenimation scorpionique.

Plusieurs travaux ont montré une élévation importante des concentrations sériques de l'IL1- α , l'IL1- β , l'IL-10, TNF- α , l'IFN- γ et le NO, est observée chez les souris envenimées par le venin de *Tityus serrulatus* et sa toxine majoritaire TsTX-1 (Ts1) (Petricevich *et al.*, 2002, Pessini *et al.*, 2003), de *Tityus discrepans* (D'Suze *et al.*, 2004), de *Androctonus australis hector* (Adi-Bessalem *et al.*, 2007), de *Centruroides noxius* (Petricivich., 2006).

D'autres études ont montré que les taux sériques de l'IL-6, l'IL1- α , l'IL1- β , IL-10, α 1AT, l'IFN- γ , GM-CSF et le NO, augmentent après piqûres par *Leirus quinquestratus*, *Buthus* ou *tityus* (Sofer *et al.*, 1996 ; Barbouche *et al.*, 1996 ; Meki et Mhhey-Eldean, 1998 ; Magalhaes *et al.*, 1999), ainsi qu'une augmentation de l'expression chimiochimokines RANTES au niveau de tissu pulmonaire suite à une envenimation scorpionique modérée à sévère par le venin de *Buthus occitanus* et *Leirus quinquestritus* (Abdel-Haleem *et al.*, 2006).

L'activation et la libération des cytokines, pourraient jouer un rôle physiopathologique dans l'envenimation après piqûre de scorpion et pourraient être responsable de certaines manifestations inflammatoires systémiques et d'échecs d'organes.

Une surproduction des cytokines pro et anti-inflammatoires a été suggérée pour être impliquée dans la pathogénicité de l'envenimation scorpionique modérée et sévère, mais leur signification clinique et comme un outil de diagnostic n'est pas encore bien élucidé (Petritzivitch *et al.*, 2002, 2006., D'Suze *et al.*, 2002; Fucuhara *et al.*, 2003).

Des études précédentes ont montré que les manifestations physiopathologiques et inflammatoires de l'envenimation peuvent être médiées au moins en partie par l'augmentation de la libération des cytokines tel que TNF- α , l'IL1- β , l'IL1- α , l'IL-6, l'IL-8, l'IL-10 et le GM-CSF chez les patients envenimés par le venin de *Tityus serrulatus* et que les taux sont positivement corrélés avec les manifestations cliniques et avec la concentration plasmatique du venin (Petricivech., 2006)

La balance des cytokines pro et anti-inflammatoires représentée par la détermination du rapport (IL-6/IL-4) après une envenimation avec le venin d'*Aah*, sa fraction toxique FTox-G50 et sa toxine Aah II a été également déterminée. Ce rapport montre une valeur de 1,99 déterminée chez les animaux témoins.

La cinétique de dévolution du rapport IL-6/IL-4 montre une augmentation progressive qui atteint des valeurs maximales à 180 min après envenimations (*Aah* : 7,12 ; FTox-G50 : 9,93, AahII : 56,56), indiquant un déséquilibre de la balance cytokinique en faveur de la production des cytokines pro-inflammatoires. Cette phase est suivie par une diminution de ce rapport à des valeurs plus faibles que celle obtenue avec le témoin à 360 min après envenimation avec des valeurs de (*Aah* : 0,94 ; FTox-G50 : 1.21, Aah II : 1.08). Ce résultat indique une deuxième phase de surproduction des cytokines anti-inflammatoires (Figure14).

De plus, la comparaison entre les résultats obtenus avec le venin et ses constituants toxiques révèle que la toxine Aah II, pourraient exercer un effet immunomodulateur de la réponse immunitaire.

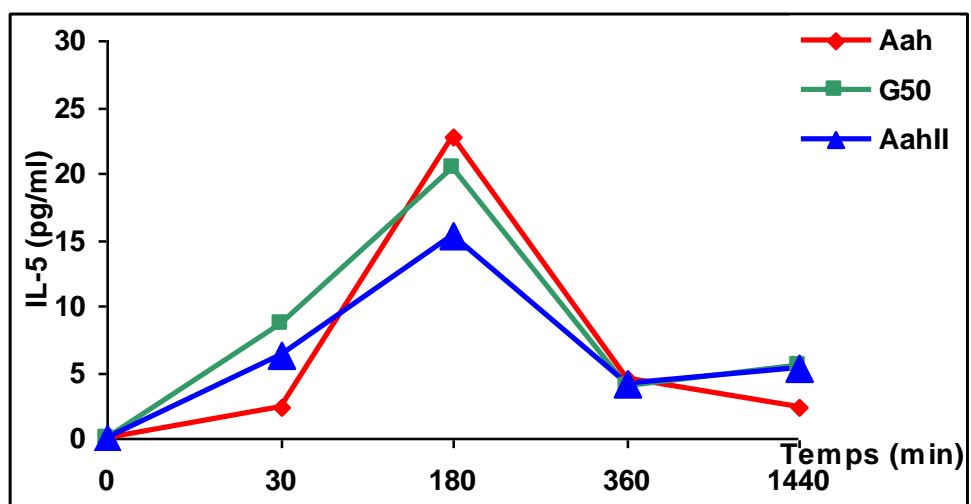


Figure 11: Dosage de l'IL-5 sérique après envenimation avec le venin d'*Aah*, FTox-G50 et la toxine Aah II.

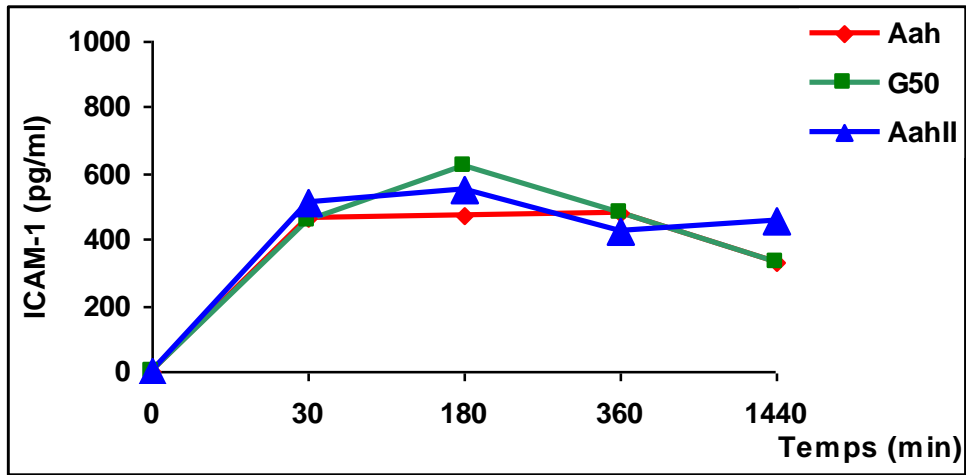


Figure 12 : Dosage d'ICAM-1 pulmonaire après envenimation avec le venin d'*Aah*, FTox-G50 et la toxine Aah II.

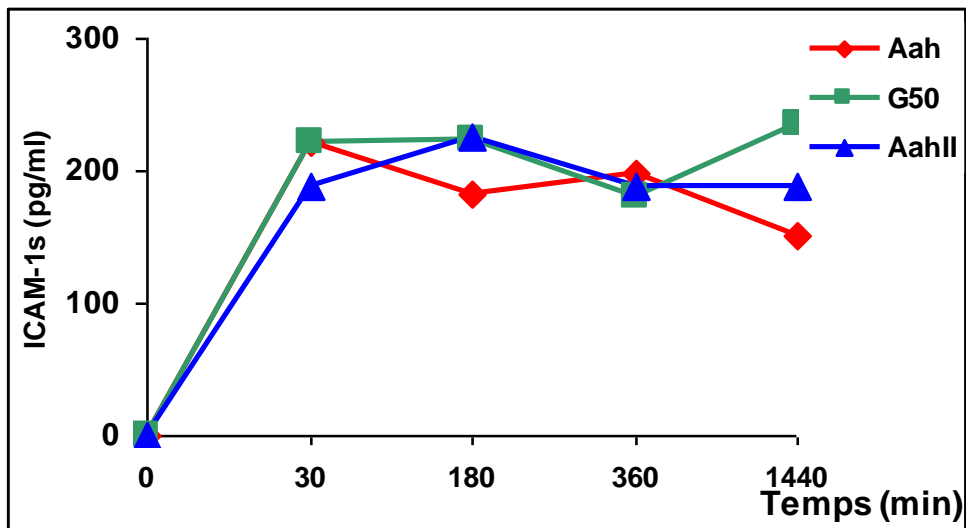


Figure 13 : Dosage d'ICAM-1 sérique (ICAM1-s) après envenimation avec le venin d'*Aah*, FTox-G50 et la toxine Aah II.

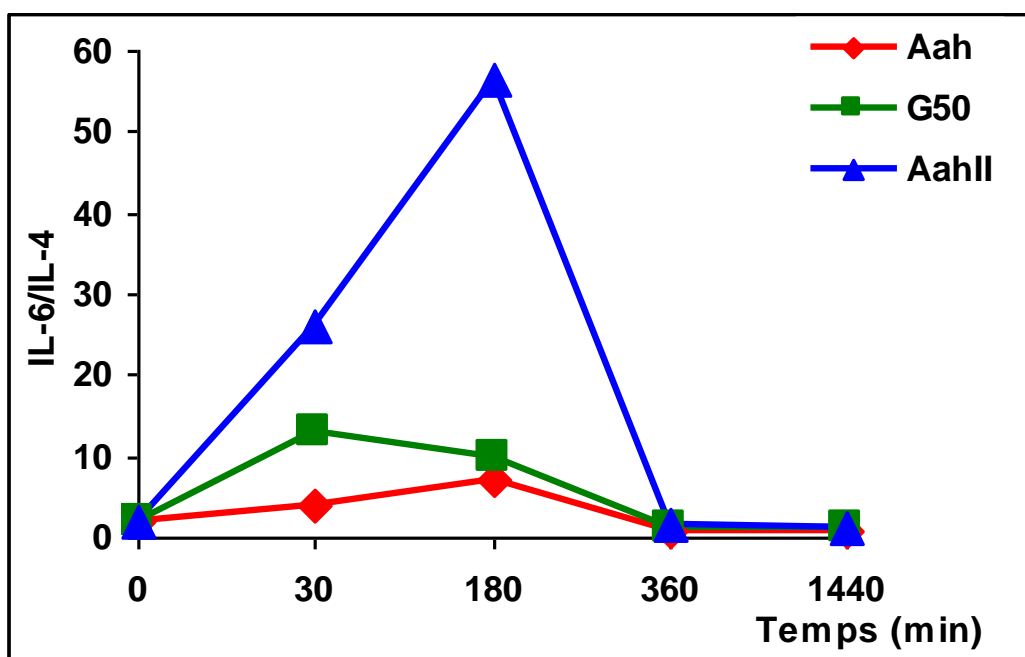


Figure 14: La cinétique de la balance de cytokines pro et anti-inflammatoires après envenimation avec le venin d'*Aah* et ses toxines.

5. Effet de l'envenimation scorpionique sur le taux histamine sérique

L'Histamine est médiateur essentiel de multiples pathologies allergique et inflammatoire, elle est synthétisée essentiellement par les cellules inflammatoires et immunocompétentes tel que les mastocytes.

Le dosage des taux de l'histamine au niveau des sérums des animaux envenimés par le venin total et sa toxine purifiée Aah II, indique que le venin provoque une augmentation importante et rapide des taux sériques d'histamine environ de dix fois du taux basale déterminé chez le contrôle. De même, la toxine Aah II induit une élévation progressive et atteint un taux maximal à 1440 min après envenimation avec une concentration comparable à celle obtenue avec le venin total (Figure 15).

L'histamine libérée agit en se fixant sur des récepteurs cellulaires qui lui sont spécifique et dont il existe deux formes. Les récepteurs de type 1(H1) sont présents partout dans le corps et sont impliqués dans l'inflammation, tandis que les récepteurs de type 2 (H2) sont présents au niveau de l'estomac et interviennent dans la sécrétion acide de l'estomac. Une fois libérée l'histamine va entraîner une vasodilatation qui, on outre augmente la perméabilité capillaire (Jamet *et al.*, 2006).

Il a été démontré que l'histamine pourrait avoir en plus de son effet dans l'inflammation et allergie, un rôle dans l'orientation de la balance Th1/Th2 en intervenant dans la cascade des cytokines et en régulant leur production (Ishikawa *et al.*, 2000).

Des travaux précédant ont révélé que la dégranulation du mastocyte et la libération de l'histamine sont impliquées dans la douleur et l'inflammation provoqué par le venin de scorpion tel que *Tityus serrulatus* et *Buthus martensi Karch* (Liau *et al.*, 2007; Nascimento *et al.*, 2005).

Par ailleurs, dans l'envenimation scorpionique, l'histamine à deux sources:

Une source endogène: elle est libérée à partir des mastocytes et induit un œdème chez l'homme et plusieurs espèces animales incluant les rongeurs, via la stimulation des récepteurs H₁ de l'histamine. Une étude réalisée sur le venin de *Tityus serrulatus* a montré que l'histamine peut être libéré à partir du poumon et de l'estomac après injection du venin (Cunha-Melo *et al.*, 1987; Freire-Maia and Campos, 1989).

Une source exogène: c'est l'histamine contenue dans le venin. Cette histamine a été trouvée dans le venin de plusieurs scorpions tel que le venin du scorpion *L. laevifrons* et le venin de *Tityus serrulatus* (Basu *et al.*, 1990 ; Nascimento *et al.*, 2005).

L'augmentation précoce du taux de l'histamine observée suite à l'injection du venin *Aah*, serait du à l'apport exogène de l'histamine contenue dans le venin total d'*Aah*. Alors qu'une deuxième phase d'augmentation de concentration d'histamine est notée à 1440 min après envenimation ce qui est corrélée avec le taux maximal induit par la toxine purifiée Aah II. Cette élévation pourrait être expliquée par la stimulation de l'activation des mastocytes qui sont considérés comme une source majeure de l'histamine.

La toxine Aah II semble jouer un rôle significatif dans l'activation des mastocytes, d'une manière directe sur les mastocytes ou d'une manière indirecte suite à la production de la substance P.

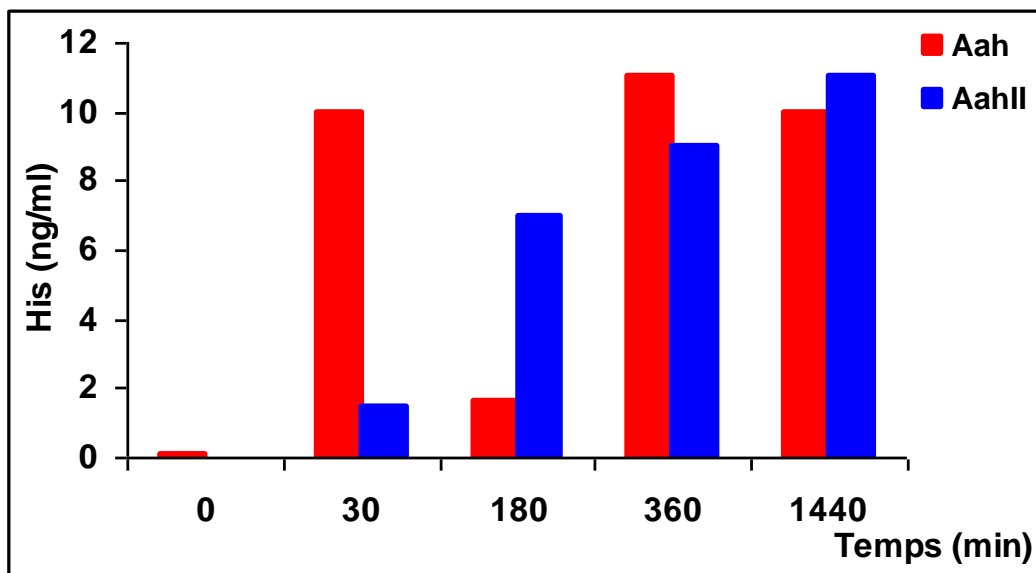


Figure 15 : Dosage d'histamine sérique après envenimation avec le venin d'*Aah*, FTox-G50 et la toxine Aah II.

Une étude réalisée avec le venin de *Loxosceles intermedia* a montré une extravasation et relaxation vasculaire, qui serait fortement reliées à la libération des médiateurs tels que l'histamine et la sérotonine à partir des mastocytes (Rattmann *et al.*, 2007)

D'autres travaux réalisés sur le venin de *Tityus serrulatus* montrent que l'inhibition de l'œdème provoqué par la prométhazine, indique que l'histamine agit au niveau des récepteurs H1 et elle pourrait jouer un rôle important dans l'induction de l'œdème.

L'histamine a été mise en évidence dans les venins de *L. laevifrons* et le venin de *Tityus serrulatus* (Basu *et al.*, 1990; Nascimento *et al.*, 2005), cependant, ce taux est trop faible, mais il peut agir en synergie avec d'autres amines trouvées dans le venin comme la cadaverine et le 5-hydroxy-tryptamine (5-HT) (qui peuvent potentialiser l'effet de l'histamine (Bjeldanes *et al.*, 1978; Lavich *et al.*, 2003, Nascimento *et al.*, 2005).

7. Induction de l'œdème pulmonaire

L'augmentation de perméabilité vasculaire et l'œdème sont les événements précoces de la réaction inflammatoire suivie par l'infiltration leucocytaire (Van, 1993). Ces événements sont initiés et maintenus par une séquence de médiateurs inflammatoires d'origine cellulaire et plasmatique (Van, 1993).

La réaction inflammatoire causée par le venin d'*Aah* est caractérisée par un œdème pulmonaire.

Les résultats de la cinétique d'évolution des taux de l'œdème pulmonaire montrent une augmentation significative après injection du venin ou de ses composés toxique en comparaison avec le taux observé chez les animaux témoins qui ont reçu une solution saline montre un taux de $0,046 \pm 0,015$ g d'eau. Un premier pic a été observé au bout de 180 min avec des taux de $0,366 \pm 0,08$ g d'eau, $0,35 \pm 0,043$ g d'eau, $0,469 \pm 0,0107$ g, après envenimation par le venin d'*Aah*, la fraction FTox-G50 ou la toxine Aah II respectivement et un second pic à été noté après 1440 min de l'envenimation (*Aah* : $0,229 \pm 0,034$ g d'eau, FTox-G50 : $0,298 \pm 0,037$ g d'eau, Aah II : $0,369 \pm 0,0349$ g d'eau), alors que les poumons des animaux témoins (Figure : 16). ($p \leq 0,05$)

Ces résultats indiquent que le venin d'*Aah* et ses toxines provoquent un œdème pulmonaire. Les toxines et notamment la toxine Aah II semblent être à l'origine de l'activité oedématisante du venin total d'*Aah* (Figure 16).

L'utilisation des inhibiteurs qui interfèrent avec le métabolisme de l'acide Arachidonique tel que l'indométacine (inhibiteur non sélectif et de la Cyclooxygénase), et de la dexaméthasone (inhibiteur de l'activité phospholipase A2), montre que aucun effet est observé sur le taux de l'œdème induit par le venin total puisqu'à 30 min d'envenimation les poumons prétraités avec les inhibiteurs présentent un œdème similaire à celui induit par le venin natif (Indo: $0,146 \pm 0,039$ g; Dexa: $0,161 \pm 0,048$ g) alors que les traités par le venin montre un taux de ($0,182 \pm 0,0432$ g) (Figure : 17) ($P \leq 0,05$).

Cependant, ces deux inhibiteurs réduisent significativement le taux de l'œdème pulmonaire à 180 min d'envenimation par le venin d'*Aah* (Indo: $0,21 \pm 0,039$ g; Dex: $0,116 \pm 0,030$ g) en comparaison avec le venin qui montre un taux de ($0,366 \pm 0,08$ g d'eau). De 1440 min à 2880 min, l'indométacine n'a aucun effet sur l'œdème pulmonaire, alors que le dexametasone continu à réduire de manière significative l'œdème pulmonaire induit par le venin total d'*Aah* (Figure 17). ($P \leq 0,05$)

L'œdème pulmonaire induit par le venin d'*Aah* est décrit comme un événement biphasique dans lequel plusieurs médiateurs opèrent de manière séquentielle pour produire cette réponse inflammatoire.

L'œdème apparaissant à la phase initiale (0-180 min) qui n'est pas inhibée par les médicaments qui interfèrent avec le métabolisme de l'acide arachidonique tel que l'indométacine, pourrait être attribué à la libération de l'histamine. Cependant, au niveau de la seconde phase (180-2880 min), où l'œdème est inhibé par ces médicaments, il pourrait être corrélé avec la surproduction des eicosanoïdes (Prostaglandines et Leucotriènes), des cytokines et probablement le NO.

Les résultats obtenus sont similaires avec ceux rapportés par Nascimento en 2005 qui montrent que l'œdème immédiat (0-120 min) n'est pas inhibé par Dexaméthasone et l'indométacine. La dexaméthasone inhibe la production de plusieurs médiateurs inflammatoires, dont les cytokines et les eicosanoïdes (Brattsand et Linden., 1996) et présente un effet inhibiteur de l'afflux des leucocytes ainsi que le taux du NO et la NO synthase sont fortement inhibés (Paya *et al.*, 1997). L'œdème immédiat causé par les venins de scorpion associé avec le manque d'inhibition par le dexaméthasone et l'indométacine, les cytokines et eicosanoïdes ne pourraient pas être impliqués

La réponse immédiate provoquée par le venin pourrait être due à l'action directe du venin et de ses composants ou à l'action des médiateurs endogènes qui sont déjà stockés et rapidement libérés à partir des cellules inflammatoires (Nascimento *et al.*, 2005).

L'œdème pulmonaire est une complication très plus fréquente, pouvant être fatale. LE mécanisme de l'œdème pulmonaire provoqué par le venin de scorpion n'est pas totalement élucidé, mais deux facteurs principaux peuvent contribuer:

Un facteur cardiogénique: directement lié à un dysfonctionnement cardiaque du ventricule gauche et une libération massive des catécholamines et de l'acétylcholine (Geron *et al.*, 1990; Abourg *et al.*, 1991, 1995; Freire-Maira et De Matos 1993; Amaral *et al.*, 1997; Rezende *et al.*, 1997; Daisley *et al.*, 1999).

Un facteur non cardiogénique: induit par la libération des médiateurs inflammatoires tels que le facteur activateur des plaquettes (PAF) et les prostaglandines. Le PGE2 est produit par plusieurs types cellulaires de l'organisme incluant les fibroblastes, les macrophages, les neutrophiles et quelque type de cellules malignes (Harris *et al.*, 2002).

Le PGE2 est puissant médiateur impliqué dans l'inflammation et la douleur. Il provoque une hyperglycémie, vasodilatation, associée à extravasation du fluide vers les tissus adjacents, favorisant la formation d'œdème. (James *et al.*, 2001). Ce médiateur pourrait contribuer tardivement dans la genèse de l'œdème pulmonaire provoqué par le venin.

Des études précédant ont démontré que l'induction de l'œdème pulmonaire provoqué par l'administration du venin *Tityus serrulatus* chez des rats serait associée à une libération des médiateurs dérivés des lipides, incluant le PAF, les leucotriènes et les prostaglandines

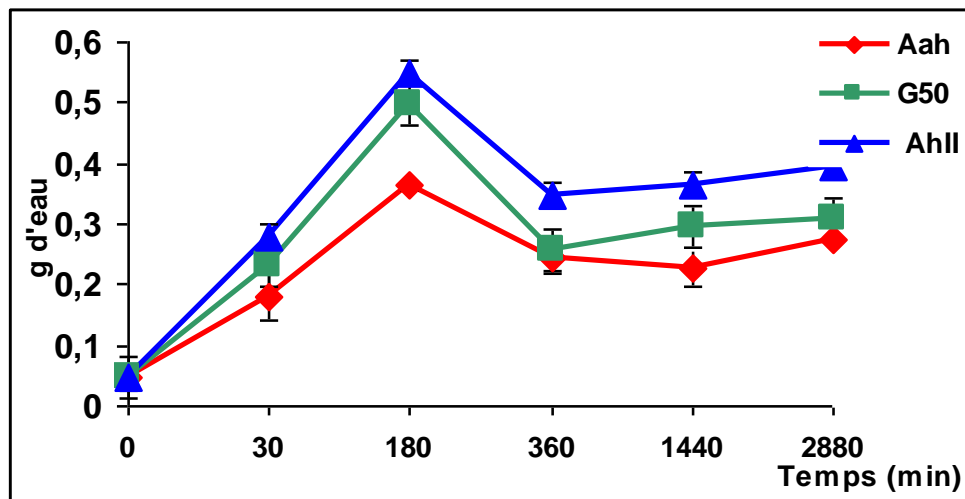


Figure 16 : Effet oedématisé provoqué avec le venin d'*Aah*, FTox-G50 et la toxine Aah II.

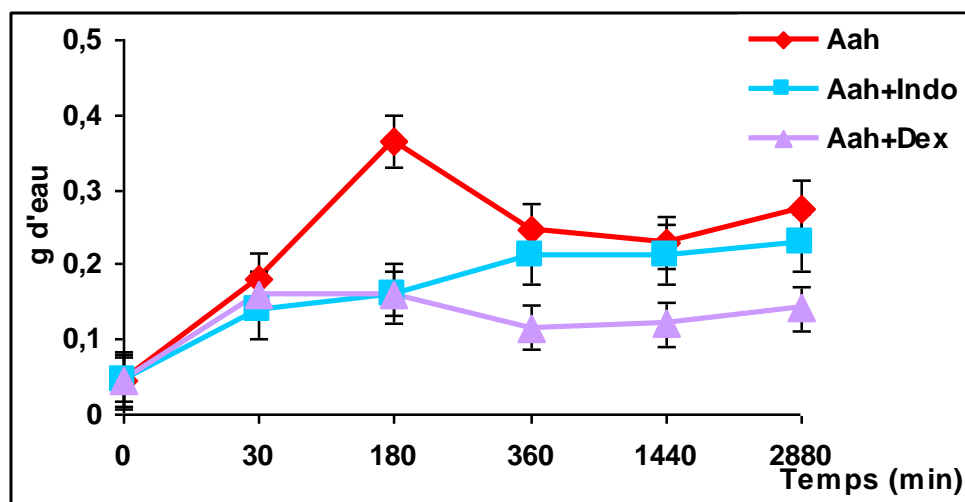


Figure 17: Effet des inhibiteurs du métabolisme de l'acide Arachidonique sur l'œdème pulmonaire induit avec le venin d'*Aah*.

(Azevedo *et al.*, 1983; Freire-Maia et de Matos., 1993; De Matos *et al.*, 1997, 1999, 2001; Borges *et al.*, 2000).

Les travaux de Bertazzi *et al* en 2005, montrent que l'activation du système complément peut contribuer aux lésions tissulaires et l'œdème pulmonaire observé lors d'une envenimation.

L'activation du système complément a plusieurs impacts biologiques tels que l'augmentation de la perméabilité vasculaire, chimiotactisme des leucocytes vers le site de l'inflammation, dégranulation des cellules inflammatoires (PN, PE) et induction d'une bronchoconstriction.

8. Effet oedématisant du venin d'*Aah*

Les résultats d'évolution de l'œdème montrent que l'injection intra-plantaire du venin d'*Aah* provoque un œdème local qui se traduit par une augmentation du pourcentage d'œdème d'une manière temps-dépendante, le maximum est observé à 180 min après envenimation.

La dose minimale oedematogénique responsable de plus de 20 % de l'effet oedematique du venin *Aah* est estimée de 5 µg par 20 g d'animaux (Figure : 18).

Des travaux précédant ont montré que l'administration intra-plantaire du venin de scorpion provoque une réaction inflammatoire évidente chez les rats envenimés avec les venins de *Buthus martensi*, et *Tityus serrulatus*, associé à un œdème plantaire, une extravasation du plasma et une leucocytose (Bai *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2002).

9. Effets histopathologiques induit par la toxine Aah II au niveau du tissu hépatique

L'analyse histologique du foie de rat traité par la dose sublétales de la toxine Aah II, a montré que la toxine engendre des lésions tissulaires et des signes inflammatoires en comparaison avec le témoin. Ces altérations sont caractérisées par une infiltration des cellules inflammatoires dans l'espace porte, essentiellement des PN et un œdème. Le parenchyme hépatique semble être désorganisé avec présence des hépatocytes avec des noyaux pycnotiques. (Figure : 19).

Ces résultats sont semblables avec ceux obtenus par des études précédentes. En effet, les modifications tissulaires provoquées par une envenimation par le venin d'*Aah* sont caractérisées par une altération du parenchyme hépatique, une dilatation des espaces sinusoidaux et la présence d'un œdème interstitiel.

Les hépatocytes ont présenté des noyaux pycnotiques et une infiltration lymphocytaire (Adi-Bessalem *et al.*, 2003).

De même, le venin de *Tityus discrepans* provoque également des altérations tissulaires au niveau du tissu hépatique des animaux, caractérisés par une nécrose des hépatocytes qui entoure la veine porte ainsi qu'une infiltration des neutrophiles et des lymphocytes (D'Suze *et al.*, 2004).

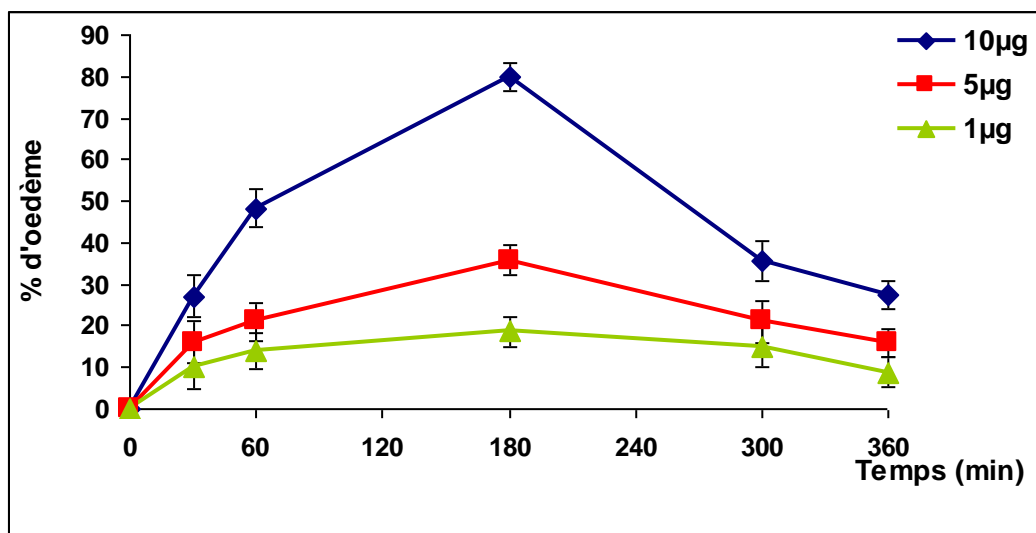


Figure 18 : Détermination de la dose minimale oedématisante du venin d'*Aah* après injection intra-plantaire.

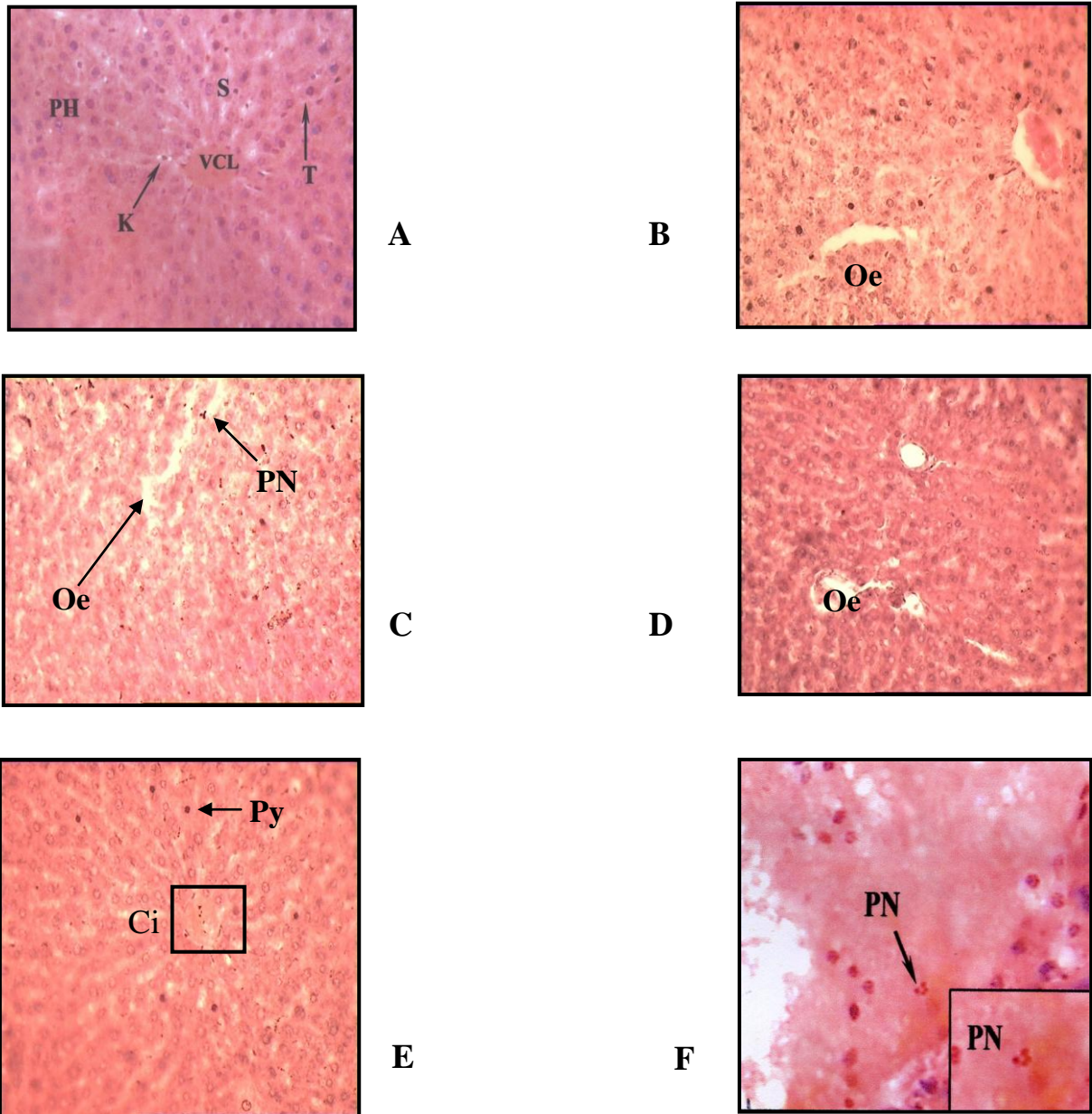


Figure 19 : Altérations histopathologiques au niveau du foie provoquées par la toxine Aah II. **A** : Parenchyme hépatique témoin. **B** et **D** : Œdème au niveau du parenchyme hépatique **C** : Parenchyme hépatique désorganisé montrant une infiltration de PN. **E** : Infiltration des neutrophiles au niveau de veine centrolobulaire. H-E. G X 40. **F** : Grossissement au niveau de la zone encadrée en **E**. H-E. G X 100.

K : Kupfer. S : Sinusoïde. VCL : Veine centrolobulaire.

Pyc : Pycnose, Oe œdème, Ci : cellules inflammatoires. PH : Parenchyme hépatique. PN : Polynucléaire neutrophiles.

*Discussion
générale*

Discussion générale

Les interactions leucocytes-endothélium résultantes de la réaction inflammatoire, semblent jouer un rôle important dans la pathogénicité des lésions pulmonaires aiguës et le syndrome de la détresse respiratoire pulmonaire aiguë (Abraham., 2003 ; Moraes *et al.*, 2003).

Les leucocytes sont les éléments clé de la réaction inflammatoire, par leurs activités phagocytaires et sécrétoires.

Les résultats révèlent que les toxines du venin d'*Aah* provoquent une réaction inflammatoire aiguë caractérisée par une leucocytose.

Le dosage de l'activité MPO indique que les toxines des canaux sodium du venin d'*Aah* provoquent une hyper-neutrophilie systémique ainsi qu'une potentialisation de l'infiltration des neutrophiles dans le tissu pulmonaire.

De plus, des nouvelles fonctions sont attribuées à la MPO venant des neutrophiles, elle semble également pouvoir moduler l'activation, la migration et l'infiltration d'autres leucocytes qui sont liés à la progression de la réaction inflammatoire vasculaire ainsi de jouer des fonctions cytokine-like (Johansson *et al.*, 1999, Libby *et al.*, 2002).

D'autre part, une hyper-éosinophilie est mise en évidence dans les poumons des animaux envenimés par le venin et ses toxines.

Le mouvement des leucocytes de la circulation sanguine vers les tissus endommagés est un événement important de la réaction inflammatoire. Ce processus implique une séquence d'événements de capture, d'adhésion ferme à l'endothélium activé, suivi par une transmigration des leucocytes vers les tissus. Toutes ces étapes dans la cascade d'événements du recrutement sont favorisées par les molécules adhésion ICAM.

L'adhésion des neutrophiles aux cellules endothéliales se fait par l'intermédiaire des adhésines exprimées sur les cellules endothéliales comme les ICAM-1; qui est une famille de superantigène des immunoglobulines, originalement décrit comme récepteurs aux intégrines CD11b/CD18 exprimés sur les neutrophiles. Les ICAM-1 sont retrouvés exprimés constitutivement sur les cellules endothéliales, est régulés en réponse à l'endotoxine, le TNF, l'IL-1 et l'anaphylotoxine C5a. Ces molécules d'adhésion jouent un rôle important dans la médiation des événements inflammatoires dépendants des neutrophiles au niveau du poumon (Hannedouche et Moulin., 2000).

Dans cette étude les résultats indiquent que les toxines du venin d'*Aah* semblent induire l'augmentation de l'expression de ces molécules d'adhérence ICAM-1 au niveau du tissu pulmonaire, expliquant l'influx leucocytaire et pourraient être impliquées dans les lésions pulmonaires dépendantes de neutrophiles.

Les résultats suggèrent que l'envenimation scorpionique affecte le système immunitaire conduisant aux variations des taux de cytokines.

En effet, les toxines du venin d'*Aah* semblent être responsables de l'augmentation de la production des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β et l'IL-6 et des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-4 et l'IL-13. Une augmentation des concentrations de l'IL-5 et l'IL-12 a été également mise évidence après envenimation par le venin et ses toxines.

Ces derniers semblent être capables d'activer la lignée monocytes-macrophages qui seraient à l'origine de la libération des cytokines telle que l'IL-1 β , l'IL-6 et l'IL-12, observée après l'envenimation.

Les monocytes-macrophages activés libèrent de grandes quantités de cytokines et participent activement à la régulation des réponses inflammatoires et immunitaires. L'interleukine IL-1 est l'une des cytokines majeures participant à l'initiation et la persistance de l'inflammation.

Les concentrations de cette cytokine sont fortement augmentées après injection des toxines du venin *Aah*. L'IL-1 et TNF peuvent activer directement les voies de transduction de signal qui affectent les tissus conjonctifs de la matrice et induisent la production et la synthèse d'enzymes protéolytiques (Dinarello, 1996)

De plus, l'IL-1 induit la production de chémokines CXC qui participent à la médiation de l'infiltration des neutrophiles et augmente l'activité d'élastase des neutrophiles et de l'activation des enzymes MMP-9 et MMP-12 qui probablement contribuent à l'induction des lésions de tissus au cours de l'inflammation pulmonaire (Lappalainen *et al.*, 2005).

D'autre part, la cinétique de variation du rapport cytokines pro-inflammatoires/cytokines anti-inflammatoires (IL-6/IL-4), révèle une variation des taux de production de cytokines après envenimation par le venin d'*Aah* et ses toxines. Cette production est caractérisée par un modèle biphasique mise en évidence par une production initiale de cytokines pro-inflammatoires, suivi par une phase de surproduction des cytokines anti-inflammatoires.

L'ensemble des résultats du dosage des différentes cytokines suggèrent que les toxines du venin *Aah* et essentiellement la toxine Aah II, stimule le système immunitaire caractérisé par une activation déséquilibrée des cellules Th1 et Th2.

Les lymphocytes T auxiliaires Th1 et Th2, qui se distinguent par les cytokines qu'ils produisent et y répondent et les réponses immunitaires qu'ils sont impliqués. Les cellules Th1 produisent des cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN- γ , l'IL-12 et le TNF, tandis que les cellules Th2 produisent des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6 et l'IL-13.

Les profils de production des cytokines après envenimation suggèrent que les toxines favorisent probablement la voie Th2. Les cytokines Th2 comme l'IL-4 jouent un rôle dans la différenciation des cellules Th2 et stimulent généralement la production d'anticorps. L'IL-5 stimule les réponses des éosinophiles, qui font également partie de la réponse immunitaire et inflammatoire.

Les résultats obtenus dans cette étude montrent que les toxines du venin d'*Aah* provoquent une augmentation des concentrations des intégrines ICAM-1 sériques. Une forme soluble de la molécule ICAM-1 correspondant au domaine extracellulaire clivée par protéolyse, et détectée dans les sérums au cours des maladies inflammatoires (Rhumatisme articulaire) et infectieuses (choc septique) ou des cancers (Parillo *et al.*, 1992. Gomez-Scotto *et al.*, 2000). De ce fait les ICAM-1s pourraient être impliqués dans la sévérité de la réponse inflammatoire provoquée suite à une envenimation scorpionique.

Un autre médiateur important dans l'inflammation aiguë et chronique est le monoxyde d'azote. Le NO semble jouer un rôle important dans plusieurs processus physiologiques et physiopathologiques (Haley *et al.*, 1992; Kolesnikov *et al.*, 1992; Babbedje *et al.*, 1993).

Les résultats du dosage des taux du NO au niveau des sérums et des tissus pulmonaires, montrent que les toxines du venin d'*Aah* provoquent une élévation importante des taux de ce médiateur qui pourrait être due à l'induction de l'iNOS des leucocytes. Certaines cytokines comme l'INF- γ , le TNF- α et l'IL-1 induisent l'iNOS une potentialisation du taux de NO (Franco-Pentead., 2000).

Le NO pourrait être impliqué dans la réponse oedématogénique causée par les toxines. En effet, plusieurs études suggèrent que le NO provoque une dilatation des vaisseaux sanguins (Gardiner *et al.*, 1990) et favorise la perméabilité vasculaire résultant la formation d'œdème (Hughes *et al.*, 1990; Giraldelo *et al.*, 1994). De plus le NO, augmente la synthèse et la libération des médiateurs pro-inflammatoires tel que les cytokines et les espèces réactives de l'oxygène (Marcunkiewicz *et al.*, 1995) et les prostaglandines (Santebin *et al.*, 1995).

Par ailleurs, le NO réagit avec l'anion superoxyde pour former le peroxy-nitrite, qui est une espèce oxydante potentiel capable de produire une peroxydation lipidique et des lésion tissulaires (Backman *et al.*, 1990 ; Radi *et al.*,1991 ; Rubbo *et al.*,1994). Le NO pourrait être impliqué comme médiateur inflammatoire au cours de la réaction inflammatoire provoquée par le venin et ses toxines au cours de l'envenimation.

L'étude de l'effet oedématisant montre que le venin et ses toxines provoquent un œdème pulmonaire et plantaire chez les rats dont le maximum est obtenu à 180 min après envenimation. Les toxines semblent être responsables de l'effet oedématisant du venin natif. La dose minimale oedématisante du venin *Aah* a été estimée de 5 μ g/20 g d'animaux.

La détermination de l'indice oedématisant pulmonaire du venin chez les groupes d'animaux envenimés et prétraités par le dexaméthasone ou par l'indométacine montre que l'inhibition du métabolisme de l'acide arachidonique semble diminuer le taux de l'œdème pulmonaire au temps précoce. Ce résultat indique l'implication de voie PLA2 dans l'induction l'œdème précoce causé par le venin et ses toxines et pourrait être également attribué à l'action directe des composés de venin ou à la libération des facteurs vasoactives, incluant, la sérotonine et l'histamine.

A partir de l'ensemble des résultats obtenus nous proposons un mécanisme d'action hypothétique de la réaction inflammatoire induite par le venin d'*Aah* et ses toxines de type α .

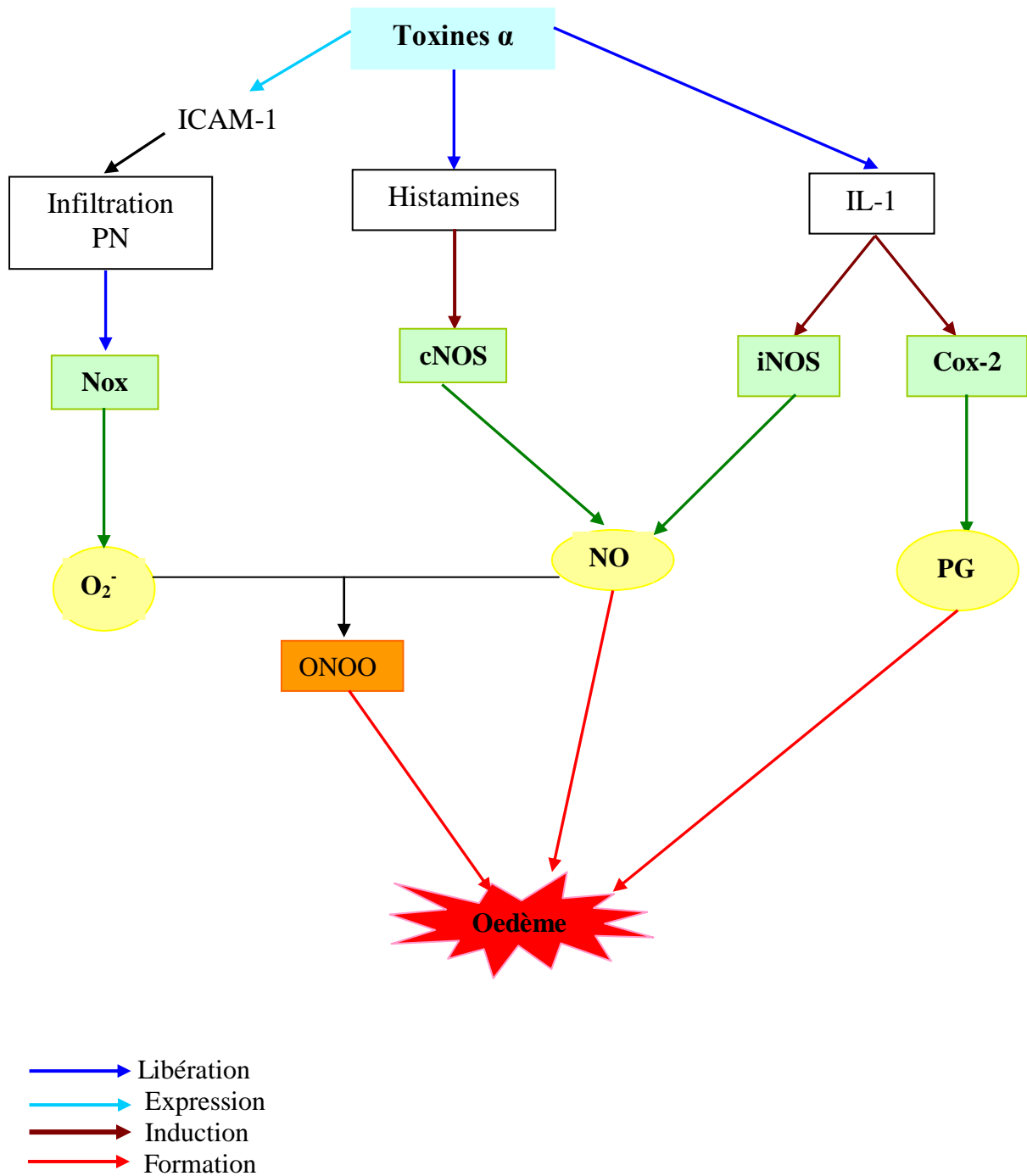


Figure 20 : Mécanisme d'action hypothétique de la réaction inflammatoire provoquée par le venin d'Aah et ses toxines.

Conclusion

Conclusion:

Ce travail a été réalisé dans le but d'élucider et de caractériser le mécanisme de la réaction inflammatoire déclenchée par le venin d'*Androctonus australis hector* et ses toxines lors des envenimations expérimentaux.

Les résultats obtenus montrent que les toxines de type α présentes dans ce venin sont largement impliquées dans le déclenchement de la réaction inflammatoire provoquée par le venin natif d'*Aah*.

Une potentialisation du recrutement des cellules inflammatoires est mise en évidence par une hyper-neutrophilie sérique et une accumulation des neutrophiles et des éosinophiles dans le tissu pulmonaire. Cet effet est associé à une augmentation de l'expression des molécules adhérence ICAM-1.

La séquestration des éosinophiles provoquée par les toxines du venin d'*Aah* au niveau du tissu pulmonaire serait associée à la libération de l'IL-5 et l'IL-4. L'IL-5 représente l'une des cytokines les plus importantes pour la prolifération et la différenciation des éosinophiles.

Les éosinophiles et les neutrophiles libèrent des protéines toxiques et des espèces réactives d'oxygènes endommageant les cellules adjacentes, qui pourraient participer à la pathogénicité de l'envenimation scorpionique induit par le venin d'*Aah*.

Les toxines du venin *Aah* semblent être capables de stimuler le système immunitaire conduisant à une augmentation de la libération des médiateurs inflammatoires.

Les deux forces, cytokines pro et anti-inflammatoires sont élevées durant ce processus.

En effet, des concentrations élevées des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-12 et anti-inflammatoires telles que l'IL-4, l'IL-13, ont été mise en évidence.

De plus, les résultats obtenus révèlent également l'élévation des taux de d'autres médiateurs inflammatoires tel que l'histamine et le monoxyde d'azote ainsi que les concentrations de la forme soluble des ICAM-1. Les ICAM-1s pourraient être considéré comme un marqueur de la sévérité de la réponse inflammatoire provoquée suite à une envenimation scorpionique.

Les résultats indiquent que le venin provoque un œdème pulmonaire et plantaire.

L'œdème pulmonaire induit par le venin d'*Aah* est décrit comme étant un événement bi-phasique dans lequel plusieurs médiateurs opèrent en séquence pour provoquer cette réponse inflammatoire. Les toxines du venin et notamment la toxine Aah II, semblent augmenter la perméabilité vasculaire qui peut être à l'origine de l'activité oedématisée induite par le venin.

L'étude des effets histopathologiques induits par cette toxine au niveau du tissu hépatique, montre également que la toxine Aah II serait responsable des lésions tissulaires engendrées au niveau du tissu hépatique.

L'ensemble des résultats obtenus dans ce travail suggèrent que les toxines du venin *Aah* et notamment la toxine purifiée Aah II seraient responsables de la réponse inflammatoire provoquée par le venin d'*Aah*. Cette réponse inflammatoire est accompagnée par la libération des médiateurs inflammatoires et une modification de la perméabilité vasculaire associée à une infiltration des cellules inflammatoires.

Bibliographie

Bibliographie:

Articles

A

- Abdel-Haleem A. Abdel-Haleem, Abdel-Raheim M.A. Meki, Hanan A. Noaman, Zaghoul T. Mohamed. Serum levels of IL-6 and its soluble receptor, TNF- α and chemokine RANTES in scorpion envenomed children: Their relation to scorpion envenomation outcome. *Toxicon* 47 (2006) 437-444.
- Adi-Bessalem, Djelila Hammoudi Triki, Fatima-djebari. Pathological effects of *Androctonus australis hector* scorpion venom: Tissue damages and inflammatory response. *Experimental and Toxicological Pathology* 60 (2008) 373-380.
- Ali, S.A., Stoeva, S., Schutz, J., Kayed, R., Abassi, A., Zaidi, Z.H., Voelter, W., 1998. Purification and primary structure of low molecular mass peptides from scorpion (*Buthus indicus*) venom. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 121, 323–332.
- Altenburg, S. P., Bozza, P. T., Martins, M. A., Silva, R. A., Tibirica, E. V., Silva, P. M. R., Cordeiro, R. S. B., Castro-Faria-Neto, H. C. (1994) Adrenergic modulation of the blood neutrophilia induced by platelet α_1 . 37- 37.
- Altenburg, S. P., Martins, M. A., Silva, R. A., Cordeiro, R. S. B., Castro-Faria-Neto, H. C. (1997) LPS-induced blood neutrophilia is inhibited by α_1 -adrenoceptor antagonists: a role for catecholamines. *J. Leukoc. Biol.* 61, 689–694.
- Amaral C.F.S., Barbora, A.J.A., Leite, V.H.R. Tafuri, W.L., De Resende, N.A 1994. Scorpion sting-induced pulmonary edema: evidence of alveolocapillary membrane permeability. *Toxicon* 32, 999-1003.
- Amaral C.F.S., De Rezende, N.A., Freire-Maia, K., 1992. Acute pulmonary edema after *Tityus serrulatus* scorpion sting in children *Am. J. Cardiol.* 71, 242-245.
- Amaral, C.F.S. Both cardiogenic and non cardiogenic factors are involved in the pathogenesis of pulmonary edema after scorpion envenomation. *Toxicon* .1997 ; 345 (1), 9978.
- Andrade, M.V., Carmez, M.P.R., Abreu, E.M., Donikoff, M., Omar, E.D., Velasco, I.T., Cunha-Melo, J.R., 2004. Lung compliance, plasma electrolyte levels and acid–base balance are affected by scorpion envenomation in anesthetized rats under mechanical ventilation. *Comp. Biochem. Physiol. C* 138, 97–104.

- Arnon, T., Potikha, T., Sher, D., Elazar, M., Mao, W., Tal, T., Bosmans, F., Tytgat, J., Ben-Arie, N., Zlotkin, E., 2005. B α IT: a novel scorpion alpha-toxin selective for insects unique pharmacological tool. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35, 187–195.

B

- Barbouche, M., R., Haguiga, H., Nouira, S., Krifi., M.N. Ahroug, F., Bouchoucha, S., Dellagi, K., 1996. Inflammatory cytokines and scorpion envenimation : analysis of serological levels in 46 tunisian patients. *Toxicon* 34, 156.
- Barhanin, J., Giglio, J.R Leopold, P., Schmid, A., Sampaio, S.V et Lazdunski, M. (1982) *Tityus serrulatus venom*, contains 2 classes of toxins. *Tityus gamma-toxin* is new tool with a very high affinity for studying the Na⁺ channe. *J. Biol. Chem.* 257, 12553-12558.
- Batista, C.V., Gomez-Lagunas, F., Rodriguez de la Vega, R.C., Hajdu, P., Panyi, G., Gaspar, R., Possani, L.D., 2002. Two novel toxins from the Amazonian scorpion *Tityus cambridgei* that block Kv1.3 and Shaker B KC-channels with distinctly different affinities. *Biochim. Biophys. Acta* 1601, 123–131.
- Becerril, B., Corona, M., Garcia, C., Bolovar, F et Possani, L.D. (1995) cloning of genes encoding scorpion toxins: an interpretative review. *J. Toxicol Rev.* 14, 339-357.
- Bertazzi Daniela Trinca, Ana Isabel de Assis-Pandochi, Vinicius Luis Talhaferro, Ana Elisa Caleiro Seixas Azzolini, Luciana Simon Pereira Crott, Eliane Candiani Arantes. Activation of the complement system and leukocyte recruitment by *Tityus serrulatus* scorpion venom. *International Immunopharmacology, Volume 5, Issue 6, June 2005, Pages 1077-108.*
- Bertazzi Daniela Trinca, de Assis-pandochi AL, Talhaferro VL, Lazzarini, Caleiro Seixas, Azzoloni AE, et al. Effet of *Tityus serrulatus* scorpion venom and its major toxin TsTX-I, on the complement system in vivo. *Toxicon* 2003 ; 41 :501-8.
- Bjeldanes, L.F., Schutz, D.E., Morris, M.M., 1978. On the aetiology of scombroid poisonig : cadaverine of histamine toxicity in guinea-pig. *Food cosmet. Toxicol.* 16, 157-159.
- Borges Cynthia M., Micheline R. Silveira, M. Aparecida C. L. Beker, Lineu Freire-Maia, and Mauro M. Teixeira Scorpion venom-induced neutrophilia is inhibited by a PAF receptor antagonist in the rat. *Journal of Leukocyte Biology* Volume 67, April 2000-515.
- Bossman. F. Tytgat.J. (2007). Voltage-gated sodium channel modulation by scorpion α -toxins. Laboratory of Toxicology, University of Leuven, O&n 2, Postbus 922, Herestraat 49,300 Belgium. *Toxicon* 49(2007) 142-158.

- Brain, S. D. (1997) Sensory neuropeptides: their role in inflammation and wound healing. *Immunopharmacol.* 37, 133–152.
- Bucherl, w. (1971). Scorpionism in the world. In *Venomous Animal and Their Venoms* (Bucherl, W.&Buckley,E.E.,eds),Vol.III, pp.317-347.Academic Press, New York.
- Busse, R., Mulsch, A., Fleming, I. and Hedcer, M. (1993) Mechanisms of nitric oxide release from the vascular endothelium. *Circulation* 87 (Suppl. V), V18±V25.

C

- Campos. A., Silva, O. S. Freire-Maia, L., Campos, J. A. (1989). Pathophysiology and treatment of scorpion poisoning. In *Natural Toxins* (D. Eaker and T. Wadstrom, eds.) Oxford, UK: Pergamon, 139–159.
- Catterall, W.A (1980) Neurotoxines that act on voltage sensitive sodium channels in excitable membranes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*20.15-43.
- Catterall, W.A, Ray., and Morrow, C. (1976). Membrane potential dependant binding of scorpion toxin to the action potential sodium ionophore. *Prod. Natl. Acad. Sci. USA*, 73, 2682-6.
- Catterall, W.A., 1979. Binding of scorpion toxin to receptor sites associated with sodium channels in frog muscle. *J. Gen. Physiol.* 74, 375–391.
- Catterall, W.A., Goldin, A.L., Waxman, S.G., 2005. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure–function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol Rev.* 57, 397–409.
- Cestele, S., Scheuer, T., Mantegazza, M., Rochat, H., Catterall, W.A., 2001. Neutralization of gating charges in domain II of the sodium channel alpha subunit enhances voltage-sensor trapping by a beta-scorpion toxin. *J. Gen. Physiol.* 118, 291–302.
- Chaudry, I.H., Stephan, R.N., Harkema, J.M., Dean, R.E., 1989. Immunological alterations following simple hemorrhage. In : *Faits, F., Ninneman, Green, D. (eds.), immune consequences of trauma, Shoch and Sepsis*, Springer, Berlin, pp. 363-373.
- Coelho Matos Fernanda, Andrea C. Pessini, Annada M. Coelho, Vanessa S. Pinho, Denielle G. Souza, Eliance C. Arantes, Mauro M. Teixeira, Antonio. Teixeira. Platelet activating factor receptor drive CXC production, neutrophil influx and edema formation in lungs of mice injected with *Tityus serruatus* venom. *Toxicon* 50 (2007) 420-427.

- Cohen, J. (2002). *Nature*. 420, 885-891.
- Corr ea, M.M Sampaio, S.V., Lopes, R.A., Mancuso, L.C., Cunda, O.A.B., Franco, J.J., Giglo, J.R., 1997. Biochemical and histological alterations induced in rats by *Tityus serruatus* venom and its neurotoxin Tityutoxin-I. *Toxicon* 35 (7), 1053-1067.
- Couraard, F., Jover, E., Dubois, J.M., Rochat, H., 1982. Two types of scorpion toxin receptor sites, one related to the activation, and the other to the inactivation of the action potential sodium channel. *Toxicon* 1, 9–16.

D

- D’Suz G, Comellas, A., Pesce, L., sevcik, C., Sanchez-de-Leire. R. 1999. *Tityus discrepans* venom produces a respiratory distress syndrome in rabbits through and indirect mechanism. *Toxicon* 37, 173-180.
- D’Suz G, Moncada S , Gonzalas C, Sevcik c, Aguilar v, Alagon a. Relationship between plasmatic levels of varios cytokines, tumor necrosis factor, enzymes, glucose and venom concentrations following *Tityus serrulatus* scorpion sting. *Toxicon* 2003; 41:367-75.
- D’Suz G, Patricia Diaz, Victor Salazar, Carlos Sevcik, Josmary Brazon. Effect of leucocyte inhibitors benzydamine and cyclophosphamide, on lung injury caused by *Tityus discrepans* scorpion venom. *Toxicon* 50 (2007) 1116-1125.
- D’Suz G, Salazar v, diaz p, sevcik c, azpururua h, bracho n. histological changes and inflammatory response induced by *Tityus serrulatus* vnom in rams. *Toxicon* 2004; 44:851-60.
- Dai, L., Corzo, G., Naoki, H., Andriantsiferana, M., Nakajima, T., 2002. Purification, structure–function analysis, and molecular characterization of novel linear peptides from scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293, 1514–1522.
- Dai, L., Yasuda, A., Naoki, H., Corzo, G., Andriantsiferana, M., Nakajima, T., 2001. IsCT, a novel cytotoxic linear peptide from scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 286, 820–825.
- De Lima., M.E. et Martin –Eauclaire, M.F. (1995) The toxins puriefied from *Tityus serrulatus* (Lutz and Mello) vemon. *J. Toxicol. Toxin Rev.* 14,457-481.
- Deby- Dupont G., Deby, C. et Lamy, M (1999) *Intensivmed.* 36, 500-513.

- Dehesa-Davila, M., Possani, L.D., 1994. Scorpionism and serotherapy in Mexico. *Toxicon* 32, 1015–1018.
- De-Matos, Talvani. AOOA, Freira L, Teixeira MM. Evidence for the role of mast cells in the lung edema induced by *Tityus serrulatus* venom. *Toxicon* .2001 ; 39:61-7.
- Devaux, C., Jouirou, B., Krifi, M.N., Clot-Faybesse, O., El- Ayeb, M., Rochat, H., 2004. Quantitative variability in the biodistribution and toxicokinetic studies of the main alpha toxins from *Androctonus Australis* Hector scorpion venom. *Toxicon* 43, 661–669.
- Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 1996;87:2095–2147.
- Doherty, D.E. et al. (1988) Monocyte retention and migration in pulmonary inflammation. Requirement for neutrophils. *Lab. Invest.* 59, 200–213.
- Dousset, E., Carrega, L., Steinberg, J.G., Clot-Faybesse, O., Jouirou, B., Sauze, N., Devaux, C., Autier, Y., Jammes, Y., Martin-Eauclaire, M.F., Guieu, R., 2005. Evidence that free radical generation occurs during scorpion envenomation. *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.* 140, 221–226.

E

- El-Alfy, A T. Amany A.E. Ahmed, Amal J. Fatani, Farida Kader. Amelioration of the cardiovascular manifestations of the yellow scorpion *Leiurus quinquestriatus* envenomation in rats by redgrape seeds proanthocyanidins. *Toxicon* 51 (2008) 321–333.

F

- Fajloun, Z., Kharrat, R., Chen, L., Lecomte, C., Di Luccio, E., Bichet, D., El Ayeb, M., Rochat, H., Allen, P.D., Pessah, I.N., De Waard, M., Sabatier, J.M., 2000. Chemical synthesis and properties of alpha-helical, cationic peptides in the venom of scorpions from southern Africa. *Eur. J. Biochem.* 269, 4799–4810.
- Fatani, A.J., Harvey, A.L., Furman, B.L., Rowan, E.G., 2000. The effects of lignocaine on actions of the venom from the yellow scorpion *Leiurus quinquestriatus* in vivo and in vitro. *Toxicon* 38, 1787–1801.
- Faurschou Mikkel and Niels Borregaard. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbs and infection* Volume 5, Issue 14 November 2003, Pages 1317-1327 .Forum in Immunology on neutrophils.
- Ferreira, L.A., Alves, E.W., Henriques, O.B., 1993. Peptide T, a novel bradykinin potentiator isolated from *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon* 31, 941–947.

- Fontecilla-Camps, J.C., Alamassy, R.J., Suddath, F.L., Watt, D.D. et Bugg, C.E (1980) Three- domentional structure of protein from scorpion venom : A new structure class of neurotoxins. Proc. Natl Acad. Sci. USA 77, 6496-6500.
- Franco-Penteado C.F, De Souza I, Teixeira S.A, Ribeiro-Da Silva G, De Nucci G, Antunes E. 2001. Involvement of nitric oxide on peritoneal neutrophil influx induced by staphylococcal enterotoxin B in mouse. *Toxicon*. 39 (9) : 1383-6.
- Freira-Maia L, De Matos IM. Heparin or PAF antagonist (BN-52021) prevents the acute pulmonary edema induced by *Tityus serrulatus* scorpuion in the rat. *Toxicon* 1993 ; 31:1207-20.
- Freire-Maia, L., Campos, J. A. (1989). Pathophysiology and treatment of scorpion poisoning. In *Natural Toxins* (D. Eaker and T. Wadstrom, (EDS.) Oxford, UK: Pergamon, 139–159.
- Froy, O, Sagiv, T., Poreh, M., Urbach, D., Zilberberg, N., Gurevitz, m., 1999. Dynamic divertification from a putative common ancestor of scorpion toxins affecting sodiums, potassium, and chloride chanals.j. *Mol. evol.*48, 187-196.
- Fukuhara, Y.D., Reis, M.L., Dellalibera-Joviliano, R., Cunha, F.Q., Donadi, E.A., 2003. Increased plasma levels of IL-1beta, IL-6, IL-8, IL-10 and TNF-alpha in patients moderately or severely envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. *Toxicon* 41 (1), 49–55.

I

- Ismail M. The scorpion envenoming syndrome, *Toxicon* 33 (1995) 825-858.
- Ismail, M., Abd-Elsalam, M. A. and Al-Ahaidib, M. S. (1994) *Androctonus crassicauda* (Olivier), a dangerous and unduly neglected scorpion. I-Pharmacological and clinical studies. *Toxicon* 32, 1599-1618.
- Ismail, M., Abdulah, M. E., Morad, A. M. and Age& A. M. (1980) Pharmakokinetics of ‘251-labelled venom from the scorpion *Androctonus amoreuxi* (Aud.-& Sav.).*Toxicon* i8, 301-308.
- Ismail, M., Shibl, A. M., Morad, A. M. and Abdullah, M. E. (1983) Pharmacekinetics of ‘251-labelled antivenin to the venom from the scorpion *Androctonus amoreuxi*. *Toxicon* 21, 47-56.
- Ito, S., Nakazato, Y., Ohga, A., 1981. Further evidence for the involvement of the sodium channels in the release of adrenal catecholamines: the effect of scorpion venom and grayanotoxin I. *Br. J. Pharmacol.* 72, 61–67.

J

- Ji, Y.H., Terakawa, S., Xu, K., 1994. Primary structure of depressant insect-selective neurotoxin from venom of scorpion *Buthus martensi* Karsch. *Chin. Sci. Bull.* 39, 945–949.
- Jover, E., Couraud, F., Rochat, H., 1980. Two types of scorpion neurotoxins characterized by their binding to two separate receptor sites on rat brain synaptosomes. *Biochem. Biophys. Rev. Comm.* 95, 1607-1614.
- Jutel M, S. Klunker, M. Akdis, J. Małolepszy, Oliver A.R. Thomet, T. Żak-Nejmark, K. Blaser, C.A. Akdis. Histamine Upregulates Th1 and Downregulates Th2 Responses due to Different Patterns of Surface Histamine 1 and 2 Receptor Expression. *Int Arch Allergy Immunol* 2001;124:190-192.
- Jamet A, K. Botturi, B. Diquet, and M. Mollimard. Histamine : le rôle du médiateur The role of histamine as a mediator. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*, Volume 46, Issue 5, September 2006, Pages 474-479.

G

- Garcia, M.L., Hanner, M., Kaczorowski, G.J., 1998. Scorpion toxins : tools for studying K^+ channels. *Toxicon* 36, 1641-1650.
- Giangiacomo, K.M., Sugg, E.E., Garcia-Calvo, M., Leonard, R.J., McManus, O.B., Kaczorowski, G.J., Garcia, M.L., 1993. Synthetic charybdotoxin-iberiotoxin chimeric peptides define toxin binding sites on calcium-activated and voltagedependent potassium channels. *Biochemistry* 32, 2363–2370.
- Gilain L.; Guichard C.; Beaujon G.; Mom T.; Monneyron E ; Saleh H.; Advenier D.; Caillaud D.; Taux d'ICAM-1 soluble nasal dans les rhinites allergiques = Nasal soluble levels of ICAM-1 in allergic rhinitis 2000, vol. 117, n 2, pp. 91-97 (41 ref).
- Gomez-scotto E Seigneur M. ; Rnard M.; Houbouyan-Reveillard L.-L; Boisseau m. R; Intérêt des variations plasmatiques d'ICAM-1 soluble: De la physiologie à l'application clinique = Interest of circulating ICAM-1 plasma levels: from physiology to clinical applications. 2000, *Journal des maladies vasculaires* ISSN 0398-0499 Coden Jmvd. Vol. 25, n 3, pp. 156-165 (81 r).
- Goyffon M, Vachon M, Broglio N - Epidemiological and clinical characteristics of the scorpion envenomation in Tunisia. *Toxicon* 1982 ; 20 : 337-44.
- Gueron, M., Ilia, R., Shahak, E., Sofer, S., 1992. Renin and aldosterone levels and hypertension following envenomation in humans by the yellow scorpion *Leiurus quinquestriatus*. *Toxicon* 30, 765–767.
- Gueron. M. and Yarom. R. (1970). Cardiovascular manifestations of severe scorpion sting. *Chest* 57. 1566162.

- Gwee, M.C., Nirthanan, S., Khoo, H.E., Gopalakrishnakone, P., Kini, R.M., Cheab, L.S., 2002. Autonomic effects of some scorpion venom and toxin. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 29, 795–801.

K

- Kaplanski Gilles, Valerie Marin¹, Fe´lix Montero-Julian², Alberto Mantovani³ and Catherine Farnarier. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *TRENDS in Immunology* Vol.24 No.1, 2003.
- Kopeyan, C., Mansuelle, P., Sampieri, F., Brando., T., Bahraoui, E.M., Rochat, H. et Granier., C. (1990) Primary structure of scorpion anti-insect toxins isolated from the venom of *Leirus quinquestriatus*. *FEBS Lett.* 261, 423-426.
- Kharrat, R., Mabrouk, K., Crest, M., Darbon, H., Oughideni, R., Martin-Eauclaire, M.F., Jacquet, G., el Ayeb, M., Van Rietschoten, J., Rochat, H., Sabatier, J.M., 1996. Chemical synthesis and characterization of maurotoxin, a short scorpion toxin with four disulfide bridges that acts on K⁺ channels. *Eur. J. Biochem.* 242, 491–498.
- Krifi M.N., Kharrat H., Zghal K., Abdouli M., Abroug F., Bouchoucha S., Detlagi K., AI Ayeb M. Development of an Elisa for the detection of scorpion venoms in sera of humans envenomed by *Androctonus australis garzonii* (Aag) and *Buthus occitanus tunetanus* (Bot) : correlation with clinical severity of envenoming in Tunisia, *Toxicon* 38 (1998) 887-900.
- Krifi M.N., Miled, K., Abderrazek, M., El-ayeb, M., 2001. Effects of antivenom on *Buthus occitanus tunetanus* (Bot) scorpion venom pharmacocinetics : Towards an optimisation of antivenom immunotherapy in a rabbit model. *Toxicon* 39, 1317-1326.
- Krifi N, Kharrat H, El ayab M. Evaluation of antivenom therapy in children severely envenomed by *Androctonus australis garzonii* (Aag) and *Buthus occitanus tunetanus* (Bot) scorpions. *Toxicon.* 1999; 37: 1627-1634.

L

- Lappalainen Urpo, Jeffrey A. Whitsett, Susan E. Wert, Jay W. Tichelaar, and Kristina Bry. Interleukin-1 Causes Pulmonary Inflammation, Emphysema, and Airway Remodeling in the Adult Murine Lung. *American journal of respiratory cell and molecular biology* vol 32 2005. 32 (4): 311.
- Laraba-Djebari F, H ammoudi-Triki D, Utilisation de la fraction toxique majoritaire isolée à partir du venin d'*Androctonus australis hector* d'Algerie dans la valorisation du sérum anti-scorpionique. *Arch Pasreur Alderie* 1998 ; 60 : 254-66.
- Lau D, Hanke Mollnau, Jason P. Eiserich, Bruce A. Freeman, Andreas Daiber, Ursula M. Gehling, Jens Brummer, Volker Rudolph, Thomas Munzel, Thomas Heitzer,

Thomas Meinertz, and Stephan Baldus. Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by associated with CD11b/CD18 integrins. PNAS (2005) vol. 102 n 2.433.

- Lopez, M., Freire-Maia, L. (1980) Signs, symptoms and treatment of severe scorpion poisoning in children. In *Natural Toxins* (C. L. Ownby and G. V. Odell, Eds) Oxford, UK: Pergamon, 61–68. Activating factor in rats. Eur. J. Pharmacol. 256, 45–49.
- Lourenco, w.r (1994). Diversity and endemism in Tropical versus Template scorpion communities. *Biogeographica* 70,155-160.
- Luo, F., Zeng, X.C., Hahin, R., Cao, Z.J., Liu, H., Li, W.X., 2005. Genomic organization of four novel nondisulfide-bridged peptides from scorpion *Mesobuthus martensii* Karsch: gaining insight into evolutionary mechanism. *Peptides* (Jul 22 [Epub ahead of print]).

H

- Habersetzer-Rochat, C., Sampieri, F., 1976. Structure–function relationships of scorpion neurotoxins. *Biochemistry* 15, 2254–2261.
- Hammoudi-Triki D, F. Laraba-Djebari. Effets du venin d`*Androctonus australis hector* sur le taux sanguins d`immunoglobulines et de cytokines. Rencontre en Toxinologie," Envenimations et Toxicologie " Lavoisier Editions TEC et DOC, pp 181-182 (2004).

N

- Narahashi, T., 1974. Chemicals as tools in the study of excitable membranes, *Plügers Arch.* 399,813–889.
- Nascimento JR., E.B., Costa, K.A., Bertollo, C.M., Oliveira, A.C., Rocha, L.T., Souza, A.L., Gloria, M.B., Moraes-Santos, T., Coelho, M.M., 2005. Pharmacological investigation of the nociceptive response and edema induced by venom of the scorpion *Tityus serrulatus*. *Toxicon* 45,585–593.
- Nirathanan, S., Pil, J., Abdel-Mottaleb, Y., Sugahara, Y., Gopalakrishnakone, P., Joseph, J.S., Sato, K., Tytgat, J., 2005. Assignment of voltage-gated potassium channel blocking activity to kappa-KTx1.3, a non-toxic homologue of kappahefutoxin-1, from *Heterometrus spinifer* venom. *Biochem. Pharmacol.* 69, 669–678.

M

- M'Barek, S., Fajloun, Z., Cestele, S., Devaux, C., Mansuelle, P., Mosbah, A., Jouirou, B., Mantegazza, M., Van Rietschoten, J., El Ayeb, M., et al., 2004. First chemical synthesis of a scorpion alpha-toxin affecting sodium channels: the Aah I toxin of *Androctonus australis hector*. *J. Pept. Sci.* 10, 666–677.

- Magalhaes MM, Pereira ME, Amral CF, Rezend NA, Campolina D, Bucarechi F, et al. Serum levels of cytokines in patients envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. *Toxicon* 1999; 17:1155-64.
- Martin MF, Rochat H. Large scale purification of toxin from the venom of the scorpion *Androctonus australis hector*. *Toxicon* 1986; 24:1131-9.
- Martin-Eauclaire, M.F., Couraud, F., 1995. Scorpion neurotoxins : effects and mechanisms. In Chang, L.W., and Dyer, R.S. (eds), *Handk. Neurotoxicology*, Marcel Dekker, New York, NY, 683–716.
- Massensini, A.R., Moraes-Santos, T., Gomez, M.V., Romano- Silva, M.A., 1998. Alpha and beta scorpion toxins evoke glutamate release from rat cortical synaptosomes with different effects on [Na⁺]_i and [Ca²⁺]_i. *Neuropharmacology* 37, 289–297.
- Meki, A.R., Nassar, A.Y., Rochat, H., 1995. A bradykininpotentiating peptide (peptide K12) isolated from the venom of Egyptian scorpion *Buthus occitanus*. *Peptides* 16, 1359–1365.
- Meki, A.R.M.A., Mmhey-Eldean, Z.M., 1998. Serum interleukin-1 β , interleukin 6, nitric oxide and α 1antitrypsin in scorpion envenomed children. *Toxicon* 36, 185-1859.
- Melnicoff, M.J. et al. (1989) Kinetics of changes in peritoneal-cell populations following acute inflammation. *Cell. Immunol.* 118,178–191.
- Melnicoff, M.J. et al. (1989) Kinetics of changes in peritoneal-cell populations following acute inflammation *Cell. Immunol.* 118, 178–191.
- Menez, A., Bontems, F., Roumestand, C., Gilquin, B. et Toma, F. (1992) structural basis for functinal diversity of animal toxins. *Proc. R. Soc. Edinburg* 99B, 83-103.
- Miranda, F., Kopeyan, C., Rochat, H., Rochat, C. and Lissitxky, S. (1970). Purification of animal neurotoxins. Isolation and characterization of eleven neurotoxins from the venom of the scorpions *Androcrons uustralis* Hector, *Buthus occimnus mnetanus*, and *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*. *Eur. J. Biochem.* 16, 514-523.
- Moerman, L., Bosteels, S., Noppe, W., Willems, J., Clynen, E., Schoofs, L., Thevissen, K., Tytgat, J., Van Eldere, J., Van Der Walt, J., Verdonck, F., 2002. Antibacterial and antifungal C. Zhijian et al. / *Toxicon* 47 (2006) 348–355 353 properties of alpha-helical, cationic peptides in the venom of scorpions from southern Africa. *Eur. J. Biochem.* 269, 4799–4810.
- Mohammed, A. H., Rohayem, H. and Zaki, O. (1954) The action of scorpion toxin on blood sodium and potassium. *J. @op. Med. Hyg.* 57, 85-87.

- Mouhat, S., Jouirou, B., Mosbah, A., De Waard, M., Sabatier, J.M., 2004. Diversity of folds in animal toxins acting on ion channels. *Biochem. J.* 378, 717–726.

O

- O’Byrne EM, Blancuzzi VI, Wilson DE, Wong, Peppard, Sinke, Jeng AY Increased intra-articular substance P and Prostaglandines E2 following injection of interleukine-1 in rabbits. *Int, Tiss Reac* 1992; 1; 11-4.
- Olamendi-Portugal, T., Somodi, S., Fernandez, J.A., Zamudio, F.Z., Becerril, B., Varga, Z., Panyi, G., Gaspar, R., Possani, L.D., 2005. Novel alpha-KTx peptides from the venom of the scorpion *Centruroides elegans* selectively blockade Kv1.3 over IKCa1 KC channels of T cells. *Toxicon* 46, 418–429.

P

- Petricevich Vera L and Carlos F. Peña The dynamics of cytokine and nitric oxide secretion in mice injected with *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Mediators of Inflammation* Volume 11 (2002), Issue 3, Pages 173-180.
- Petricevich VL, Teixeira CFP, Tambourgi DV, Gutierrez JM. Increments in serum cytokine and nitric oxide levels in mice injected with *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms. *Toxicon*. 2000; 38(9):1253–1266
- Petricevich Vera L. Balance Between Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines in Mice Treated With *Centruroides noxius* Scorpion Venom. *Mediators of Inflammation*. Volume 2006, Article ID 54273, Pages 1–11.
- Petricevich VL. Cytokine and Nitric oxide production following severe envenomation. *Current Drug Targets: Inflammation and Allergy*. 2004; 3(3): 325–332.
- Possani, L.D., Becerril, B., Delepierre, M., Tytgat, J., 1999a. Scorpion toxins specific for NaC-channels. *Eur. J. Biochem.* 264, 287–300.
- Possani, L.D., Selisko, B., B., Gurrola, G.B., 1999b. Structure and function of scorpion toxins affecting K⁺ channels. *Perspect. Drug Design* 15/16, 15-40.
- Possani, L.D., Merino, E., Corona, M., Bolivar, F., Becerril, B., 2000. Peptides and genes coding for scorpion toxins that affection-channels. *Biochimie* 82, 861–868.
- Possani, L.D. (1984) Structure of scorpion toxins. In *Handbook of Natural Toxins* (Tu, A.T., ed), Vol.2, pp.513-550. Marcel Dekker, inc., New York.
- Possani, L.D., Martin, B., Svendsen, I. (1982) The primary structure of noxiustoxin: A K⁺ channel blocking peptide from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Carlsberg Res. Comm.* 47, 258-289.

- Parillo J.E. Fauci. A.S. Mechanism of glucocorticoids. *J Neur Immun* 1992 ; 40 :281-6.
- Purali, N., 2003. Stimulation of GABA release by scorpion venom in an isolated synapse in the crayfish (*Astacus leptodactylus*). *Toxicon* 41, 383–389.
- Pessini A.C, Souza am, Faccioli LH, Gregorio ZM, Arantes EC. Time course of acute-phase response induced by *Tityus serrulatus* venom and TsTX-I in mice. *Int immunopharmacol* 2003 ; 3 : 765-74.
- Paneque Peres A. C, Paula Naomi Nonaka, Paulo de Tarso Camillo de Carvalho, Marcos Hikari Toyama, Cesar Augusto Melo e Silva, Rodolfo de Paula Vieira, Marisa Dolhnikoff, Stella Regina Zamuner, Luis Vicente Franco de Oliveira. Effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom on lung mechanics and inflammation in mice. *Toxicon* (2009) 1-7.
- Poon, I., Leto, Ward, C. A., Cooper, C. B., Giles W.R Burns, A. R et Kubcs, P. (2001) *J. Cell Biol*, 152, 857-866.
- Paya M, Pablo Garcia Pastor, Julio Coloma et M. José Alcaraz. Nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase pathways in the inflammatory response induced by zymozan in the rat air pouch. *British Journal of pharmacology* (1997) 120, 1445-1452.

R

- Ryan, G.B. and Majno, G. (1977) Acute inflammation. *Am. J. Pathol.* 86, 185–274.
- Rodriguez de la Vega, R.C., Possani, L.D., 2004. Current views on scorpion toxins specific for KC-channels. *Toxicon* 43, 865–875.
- Romey G, Chicheportiche R, Lazdunski M, Rochat H, Miranda F, Lissitzky S. Scorpion neurotoxin-a presynaptic toxin which affects both Na⁺ and K⁺ channels in axons. *Biochem Biophys Res Commun.* 1975 May 5; 64(1):115–121.
- Regev, A., Rivkin, H., Inceoglu, B., Gershburg, E., Hammock, B.D., Gurevitz, M., Chejanovsky, N., 2003. Further enhancement of baculovirus insecticidal efficacy with scorpion toxins that interact cooperatively. *FEBS Lett.* 537, 106–110.
- Rochat H., Bernard P., Couraud E, Scorpions toxins : chemistry and mode of action, *Adv. Cytopharmacol.* 3 (1979) 325-334.
- Rossomando, A., Rosillo, M., E., 1997. Pancreatitis aguda por emponzonamiento escorpionico. *GEN venezuela* 51, 259-262.

S

- Sabatier, J.M., Fremont, V., Mabrouk, K., Crest, M., Darbon, H., Rochat, H., Van Rietschoten, J., Martin-Eauclaire, M.F., 1994. Leiurotoxin I, a scorpion toxin specific

for Ca (2+)- activated K⁺ channels. Structure-activity analysis using synthetic analogs. *Int J. Pept. Protein Res.* 43, 486–495.

- Sami-Merah sassa, Djelila Hammoudi –Triki, Djamila Aroune, Mari-France Martin-Euclaire, Fatima Laraba-Djebari. Incidence de la fraction toxique du venin d'*Androctonus australis hector*. Toxines et fonctions chollinergiques neuronales et non neuronales. Rencontre en toxicologie. 2008. Edition de la SFET.
- Sami-Merah sassa, Djelila Hammoudi –Triki, Marie-France Martin-Euclaire, Fatima Laraba-Djebari. Latoxine AahII d'*Androctonus australis hector*: effet inflammatoire et histopathologique. Toxines émergentes: Nouveaux risques. Rencontre en toxicologie, 2007; 203-205.
- Sequera. L., Sandoval, L., Chavez, A., 1993. Emponzonamiento en minos pore scorpion *Tityus discrepans*. *Arch Venez Puerto Pediatr.* 56, 44-47.
- Serteyn D, Grulke S, Frank T, Mouithys-Michalad A, Deb-Dupont G.2003. La myeloperoxydase des neutrophiles, une enzyme de defence aux capacites. *Ann. Méd.Vét.*147:79-93.
- Shao, F., Xiong, Y.M., Zhu, R.H., Ling, M.H., Chi, C.W., Wang, D.C., 1999. Expression and purification of the BmK M1 neurotoxin from the scorpion *Buthus martensii* Karsch. *Protein Expr. Purif.* 17, 358–365.
- Shapira, M.Y., Haviv, Y.S., Svir, S., 1998. Second degree atrioventricular block and cardiotoxicity secondary to envenomation by the scorpion *Leiurus quinquestriatus* (Yellow Scorpion) as an indication for serotherapy? *Hum. Exp. Toxicol.* 17, 541–543.
- Sofer, S., Gueron, M., White, RM, Liftshitz.,M., Apte. RN.1996. Interleukin 6 release following scorpion sting in children. *Toxicon*, 34, 389-392.
- Srairi-Abid, N., Guijarro, J.I., Benkhalifa, R., Mantegazza, M., Cheikh, A., Ben Aissa, M., Haumont, P.Y., Delepierre, M., El Ayeb, M., 2005. A new type of scorpion NaC-channel-toxinlike polypeptide active on KC channels. *Biochem. J.* 388, 455–464.
- Srinivasan, K.N., Gopalakrishnakone, P., Tan, P.T., C. Cheng, b, Kini, R.M Koh, J.L., Seah, Brusica, v., 2002. SCORPION, a molecular database of scopions toxins. *Toxicon* 40, 23-31.

T

- Tenenholz, T.C., Klenk, K.C., Matteson, D.R., Blaustein, M.P., Weber, D.J., 2000. Structural determinants of scorpion toxin affinity: the charybdotoxin (alpha-KTX) family of K⁺-channel blocking peptides. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 140, 135–185.

- Torres, A.M., Bansal, P., Alewood, P.F., Bursill, J.A., Kuchel, P.W., Vandenberg, J.I., 2003. Solution structure of CnErg1 (Ergtoxin), a HERG specific scorpion toxin. FEBS Lett. 539, 138–142.
- Torres-Larios, A., Gurrola, G.B., Zamudio, F.Z., Possani, L.D., 2000. Hadrurin, a new antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Hadrurus aztecus*. Eur. J. Biochem. 267, 5023– 5031.
- Tytgat, J., Debont, T., Rostoll, K., Muller, G.J., Verdonck, F., Daenens, P., van der Walt, J.J., Possani, L.D., 1998. Purification and partial characterization of a 'short' insectotoxin-like peptide from the venom of the scorpion *Parabuthus schlechteri*. FEBS Lett. 441, 387–391.
- Tytgat, J., Debont, T., Rostoll, K., Muller, G.J., Verdonck, F., Daenens, P., van der Walt, J.J., Possani, L.D., 1998. Purification and partial characterization of a 'short' insectotoxin-like peptide from the venom of the scorpion *Parabuthus schlechteri*. FEBS Lett. 441, 387–391.

V

- Valdivia, H.H., Possani, L.D., 1998. Peptide toxins as probes of ryanodine receptor structure and function. TCM 8, 111–118.
- Verdonck, F., Bosteels, S., Desmet, J., Moerman, L., Noppe, W., Willems, J., Tytgat, J., van der Walt, J., 2000. A novel class of pore-forming peptides in the venom of *Parabuthus schlechteri* Purcell (Scorpions: Buthidae). Cimbebasia 16, 247–260.
- Voronov, E., Apte, R.N., Sofer, S., 1999. The systemic inflammatory response syndrome related to the release of cytokines following severe envenomation. J. Venom. Anim. Toxins 5 (1), 19–23.

W

- Wang, C.G., Cai, Z., Lu, W., Wu, J., Xu, Y., Shi, Y., Chi, C.W., 2005. A novel short-chain peptide BmKX from the Chinese scorpion *Buthus martensi* Karsch, sequencing, gene cloning and structure determination. Toxicon 45, 309–319.
- Weisel-Eichler, A., Libersat, F., 2004. Venom effects on monoaminergic systems. J. Comp. Physiol. 190, 683–690.
- Wheeler, K.P., Watt, D.D. et Lazdunski, M. (1983) Classification of Na channel receptors specific for various scorpion toxins, Pflufers Archiv (Eur. J. Physiol.) 397, 164-165.

- Wilko-Sartsat, V., Ricu, P., Descamps-Latscha, B., Lesavrc, P et Halbwachs-Mecarelli, L. (2000) *Lab. Invest.* 80, 617-653.

X

- Xiong, Y.M., Ling, M.H., Wang, D.C., Chi, C.W., 1997. The cDNA and genomic DNA sequences of a mammalian neurotoxin from the scorpion *Buthus martensii* Karsch. *Toxicon* 35, 1025–1031.
- Xu, C.Q., Brone, B., Wicher, D., Bozkurt, O., Lu, W.Y., Huys, I., Han, Y.H., Tytgat, J., Van Kerkhove, E., Chi, C.W., 2004. BmBKTx1, a novel Ca²⁺-activated K⁺ channel blocker purified from the Asian scorpion *Buthus martensii* Karsch. *J. Biol. Chem.* 279, 34562–34569.

Y

- Yarom, R. and Braun, K. (1971) Electron microscopic studies of the myocardial changes produced by scorpion venom injections in dogs. *Lab. Invest.* 24, 21-30.
- Yu, F.H., Catterall, W.A., 2003. Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biol* 4, 207.
- Yu, F.H., Westenbroek, R.E., Silos-Santiago, I., McCormick, K.A., Lawson, D., Ge, P., Ferreira, H., Lilly, J., DiStefano, P.S., Catterall, W.A., et al., 2003. Sodium channel beta 4, a new disulfide-linked auxiliary subunit with similarity to beta2. *J. Neurosci.* 23, 7577–7585.

Z

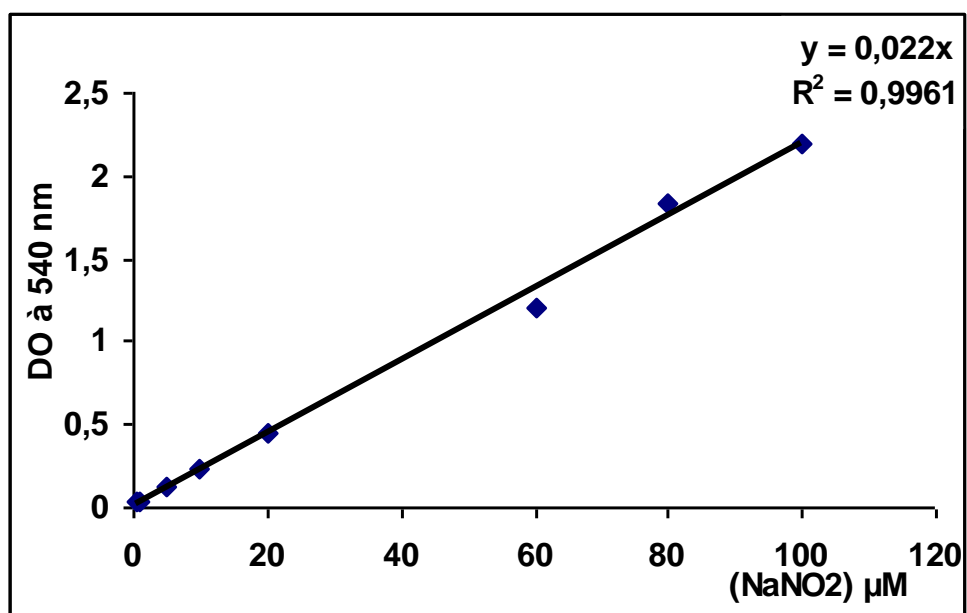
- Zeng, X.C., Corzo, G., Hahin, R., 2005a. Scorpion venom peptides without disulfide bridges. *IUBMB Life* 57, 13–21.
- Zeng, X.C., Li, W.X., Peng, F., Zhu, Z.H., 2000a. Cloning and characterization of a novel cDNA sequence encoding the precursor of a novel venom peptide (BmKbpp) related to a bradykinin-potentiating peptide from Chinese scorpion *Buthus martensii* Karsch. *IUBMB Life* 49, 207–210.
- Zeng, X.C., Li, W.X., Wang, S.X., Zhu, S.Y., Luo, F., 2001a. Precursor of a novel scorpion venom peptide (BmKn1) with no disulfide bridge from *Buthus martensii* Karsch. *IUBMB Life* 51, 117–120.
- Zeng, X.C., Li, W.X., Zhu, S.Y., Peng, F., Zhu, Z.H., Wu, K.L., Yiang, F.H., 2000b. Cloning and characterization of a cDNA sequence encoding the precursor of a chlorotoxin-like peptide from the Chinese scorpion *Buthus martensii* Karsch. *Toxicon* 38, 1009–1014.

- Zeng, X.C., Wang, S.X., Zhu, Y., Zhu, S.Y., Li, W.X., 2004. Identification and functional characterization of novel scorpion venom peptides with no disulfide bridge from *Buthus martensii* Karsch. *Peptides* 25, 143–150.
- Zhijian, C, Luo Feng, Wu Yingliang, Mao Xin, Li Wenxin. Genetic mechanisms of scorpion venom peptide diversification. State Key Laboratory of Virology, College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, People's Republic of China. *Toxicon* 47 (2006) 348–355.
- Zilberberg, N., Froy, O., Loret, E., Cestele, S., Arad, D., Gordon, D., Gurevitz, M., 1997. Identification of structural elements of a scorpion alpha-neurotoxin important for receptor site recognition. *J. Biol. Chem.* 272, 14810–14816.
- Zilberberg, N., Gordon, D., Pelhate, M., Adams, M.E., Norris, T.M., Zlotkin, E., Gurevitz, M., 1996. Functional expression and genetic alteration of an alpha scorpion neurotoxin. *Biochemistry* 35, 10215–10222.
- Zlotkin, E. (1993) Insect selective neurotoxins from scorpion venoms affecting sodium conductance. In *Toxins and Signal Transduction* (Lazarowici, P. et Gutman, Y., EDS), pp. 95-117. Harwood Press, Amesterdam.
- Zlotkin, E., 1999. The insect voltage-gated sodium channel as target of insecticides. *Annu. Rev. Entomol.* 44, 429–455.
- Zlotkin, E., Etitan, M., Dindokas, V.P., Adams, Moyer, M., Burkhard, W. et Foler, E. (1991) Functio duality and structural uniqueness of depressant insect-selective neurotoxins. *Biochemistry* 30, 4814-4821.

Ouvrage :

- *Animal Toxins. Facts and Protocol.* Hervé Rochat, Marie-France Martin-Eauclaire. (2000). Birkhause.
- *Guidbook to Protein Toxins and Their Use in Cell Biology.* Rappuoli Rino et Cesare Montecucco. (1998). Asambrook et Tooze Publication at Oxford University Press.
- *Inflammation,* Françoise Russo-Marie, André Peltien, Barbras S, P olla. Edition John Libbey Eurotext., 1998. Paris.

Annexe



Courbe étalon des nitrites.