

Numéro d'ordre : 19/2013-M /S.B

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 (FSB)



MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du diplôme de MAGISTER

En : SCIENCES DE LA NATURE

Spécialité : Biochimie-Immunologie

Par : **Mohammed Mahdi DAHMANI**

Thème

**Caractérisation des marqueurs cellulaires et moléculaires
impliqués dans l'apparition du processus de bronchoconstriction
induit par les venins en comparaison avec un modèle allergique**

Soutenue publiquement le 05/02/2013, devant le jury composé de :

M^{me} **F. LARABA-DJEBARI, Professeur, à USTHB Présidente.**

M^{me} **D. HAMMOUDI-TRIKI, Professeur, à USTHB Directrice de thèse.**

M^{me} **C.TOUIL-BOUKOFFA, Professeur, à USTHB Examinatrice.**

M^f **R.DJIDJIK, Professeur, au C.H.U Béni Messous Examineur.**

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Ce modeste travail a été réalisé au sein du laboratoire de biologie cellulaire et moléculaire de la faculté des sciences biologiques en collaboration avec le laboratoire de recherche et développement sur les venins de l'institut Pasteur d'Algérie.

Je remercie en premier le bon Dieu pour m'avoir donné la volonté, la patience et le courage pour élaborer ce travail.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance et mes sincères remerciements à :

M^{me} HAMMOUDI-TRIKI.D, Professeur à la faculté des sciences biologiques, ma directrice de thèse, pour avoir accepté de m'encadrer, ses orientations, sa gentillesse et précieux conseils, que ce travail lui témoigne de ma profonde gratitude.

M^{me} LARABA-DJEBARI.F, Professeur à la Faculté des Sciences Biologiques pour la confiance qu'elle nous a accordée en nous accueillant dans son laboratoire, sa rigueur scientifique et pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant de présider ce jury.

M^{me} TOUIL-BOUKOUFFA.C, Professeur à la Faculté des Sciences Biologiques qui nous a bénéficié de ses connaissances dans l'immunologie cellulaire et moléculaire pendant l'année théorique. Nous la remercions également pour l'honneur qu'elle nous fait en acceptant d'examiner ce travail.

M^r DJIGDJIG. R, Professeur au CHU Béni Messous, et qui malgré ces grandes responsabilités a aimablement accepté l'examen de ce travail. Nous la remercions pour l'honneur qu'elle nous fait en acceptant d'examiner ce travail.

M^r NASRI. R, M^{elle} SAIDI. H et M^{elle} BEKKARI. N pour leur aide et leur encouragement durant la réalisation de ce mémoire.

M^{me} SADEDDINE.O, Ingénieur de Laboratoire de Recherche et Développement sur les Venins (IPA) et M^{me} KAMEL. A Ingénieur au laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire à la Faculté des Sciences Biologiques, pour leur aide, leur compréhension et surtout leur patience.

Enfin notre profonde reconnaissance à toute personne qui a participé de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

Dédicaces

*A mes parents pour leur encouragement, prières,
sacrifice et amour que Dieu le tout puissant leur
accordait sa miséricorde.*

A mes frères et surtout ma petite sœur Amira

SOMMAIRE

INTRODUCTION

I-GENERALITES	1
I-1-Les venins de scorpion.....	1
I-2-Composition et mode d'action des venins.....	1
I-2-1- les toxines longues.....	1
I-2-2- Les toxines courtes.....	3
I-3- Toxicocinétique du venin scorpionique.....	7
I-4- Conséquences cliniques d'une envenimation scorpionique.....	7
I-5- Physiopathologie de l'envenimation scorpionique.....	8
I-5-1- Déséquilibre hémodynamique.....	8
I-5-2- Les Troubles hormonaux.....	11
I-5-3- Défaillance métabolique.....	14
I-5-4-Troubles des électrolytes.....	14
I-5-5- Modifications tissulaires.....	15
I-6-Phénomène de bronchoconstriction induit par les venins.....	15
I-7- Les cellules et les molécules impliquées dans la réaction immunoallergique	18
➤ Les mastocytes.....	20
➤ Les éosinophiles.....	23
➤ Les neutrophiles.....	23
➤ Les lymphocytes T.....	24
➤ Les immunoglobulines E.....	26
➤ Histamine.....	26
➤ Les cytokines.....	27
➤ Les radicaux libres.....	28
I-8- Traitements de l'envenimation scorpionique.....	30
I-8-1- Traitements symptomatiques.....	30
I-8-2- Immunothérapie.....	31
II- Matériels et Méthodes	32
II-1- Matériel.....	32
II-1-1- Matériel biologique.....	32
I-1-1-1- les animaux.....	32
I-1-1-2- le venin.....	32
II-1-2- Matériel non biologique.....	32

II-1-2-1- les produits chimiques.....	32
II-2- Méthodes.....	33
II-2-1- Analyse des marqueurs inflammatoires induits par le venin d'Aah.....	33
II-2-1-1- Dosage de la peroxydase éosinophile.....	33
II-2-1-2- Dosage de l'activité de la myéloperoxydase.....	34
II-2-1-3- Détermination de l'index pulmonaire.....	34
II-2-1-4- Détermination de la teneur en eau pulmonaire.....	34
II-2-1-5- Dosage du monoxyde d'azote.....	35
II-2-1-6- Dosage du peroxyde d'hydrogène.....	35
II-2-1-7- Etude qualitative et quantitative des constituants du sang périphérique.....	36
II-2-1-8- Dénombrement cellulaires dans le sang périphérique et le liquide bronchopulmonaire.....	36
II-2-2- Détermination des concentrations sériques des immunoglobulines G.....	36
II-2-3- Etude du rôle de l'activation des mastocytes après envenimation.....	37
II-2-4- Comparaison de l'immunoréactivité induit par le venin avec un modèle murin allergique.....	37
II-2-5- Etude des modifications tissulaires du poumon après envenimation scorpionique (Aah) en absence et en présence de prétraitements.....	37
- Analyse histologique.....	37
II-2-6- Dosage de la LDH, marqueur de lésion tissulaire.....	38
II-2-7- Expression statistique des résultats.....	39
III- Résultats et Discussion.....	40
III-1- Analyse de l'hyperréactivité bronchopulmonaire induit par le venin d'Aah.....	40
III-1-1- Détermination de l'activité de la peroxydase éosinophile sérique et pulmonaire.....	40
III-1-2- Détermination de l'activité de la myéloperoxydase sérique et pulmonaire.....	42
III-1-3- Détermination de la teneur en eau pulmonaire et détermination de la teneur en eau pulmonaire.....	44
III-1-4- Dosage du monoxyde d'azote sérique et pulmonaire.....	46
III-1-5- Dosage du peroxyde d'hydrogène sérique et pulmonaire.....	46
III-1-6- Etude qualitative et quantitative des constituants du sang périphérique.....	48
- Dénombrements des globules blancs.....	48

- Numération des globules rouges, quantification de l'hémoglobine et estimation de l'hématocrite.....	50
- Quantification des plaquettes.....	52
III-1-7- Etude de l'infiltration cellulaires dans le liquide bronchoalvéolaire.....	55
III-2- Evaluation de la balance immunitaire par la détermination des concentrations sériques des immunoglobulines G (IgG1 et IgG2).....	56
III-3- Analyse du role des mastocytes dans l'immunoréactivité de type allergene provoquée par le venin.....	57
III-4- Etudes comparative de l'immunoréactivité provoquée par le venin avec un modèle allergique.....	63
III-5- Effet du venin d'Aah sur la structure du poumon en présence et en absence de traitement : Comparaison avec un modèle allergique.....	66
III-6-Effets du venin d'Aah sur les activités enzymatiques de LDH.....	67
IV-Discussion Générale	70
V-Conclusion.....	82
Références bibliographique.....	83

Liste des abréviations

Aah : *Androctonus australis hector*.

Ach : Acétylcholine.

CPK : Créatine Phospho Kinase

Cox : Cyclooxygénase

ELISA: Enzym Linked Immunosorbant Assay.

EPC : Eosinophil Cationic Protien.

EDN : Eosinophil Derived Neurotoxin

EPO : Peroxydase éosinophile.

Fab : Fragment antigen binding.

Fc : Fragment cristallisable.

GM-CSF : Garanutocytes/Macrophages- Colony Stimulating Factor.

IFN : Interféron.

kDa : Kilo Dalton.

LDH : Lactate déshydrogénase.

LT : Leucotriènes.

MBP : Major Basic Protien.

MPO : Myéloperoxydase.

NO : Monoxyde d'azote.

NOS : Oxyde Nitrique Synthase

PAF : Platelet Activated Factor.

PG: Prostaglandin.

PNN: Poly Nucléaire Neutrophiles.

s.c: Sous cutanée.

TNF: Tumor necrosis factor.

Introduction

Le scorpionisme, pathologie de l'envenimation scorpionique, est un problème qui sévit à travers les cinq continents et le nombre de piqûres est en augmentation aboutissant parfois à des situations cliniques graves (Chippaux and Goyffon, 2008). Par sa fréquence et sa gravité, il constitue un réel souci pour la santé publique dans de nombreux pays de l'Afrique du nord, Moyen Orient, Inde et l'Amérique du sud (Lourenço, 1996). Les études épidémiologiques rapportent que plus de 5000 personnes dans le monde en meurent chaque année (Polis, 1990).

En Algérie, selon le Ministère de la santé, l'an 2009 est caractérisé par une remontée relativement importante du nombre de cas piqués estimée à plus 4% par rapport à 2008. Le nombre de cas de piqûres recensées est de 51 943 et celui des décès est de 54 repartis essentiellement dans 5 Wilayas (Adrar, Biskra, Djelfa, M'Sila, El Oued). (Laïd, et *al.*, 2009 ; Chippaux et *al.*, 2011). L'œdème pulmonaire représente la cause principale de décès dans le cas des envenimations scorpioniques graves (Ismail *et al.*, 1995). Il est attribué à une augmentation de la perméabilité vasculaire pulmonaire consécutive à une libération accrue des médiateurs de l'inflammation (Amaral et *al.*, 1994). L'inflammation déjà observée dans les envenimations expérimentales, elle est caractérisée par une infiltration des leucocytes au niveau de la cavité péritonéale et du myocarde après injection du venin d'*Androctonus australis Hector* (Aah) ou de sa toxine Aah II (Sami-Merah et *al.*, 2007).

Les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la genèse des perturbations physiologique (état inflammatoire aigu) induit par le venin de scorpion ne sont pas clairement élucidés. Les constituants du venin d'Aah pourraient induire une réaction d'hypersensibilité vu l'infiltration des éosinophiles et l'augmentation de la production des IgE observées après envenimation expérimentale (Adi-Bessalem et *al.*, 2011).

Afin de contribuer à la compréhension du mécanisme d'action du venin d'Aah, des envenimations expérimentales ont été réalisées sur un modèle murin (souris) en comparaison avec un modèle allergique provoqué avec l'ovalbumine. Le travail entrepris consiste en premier lieu à mettre en évidence les différents marqueurs cellulaires et moléculaires impliqués dans l'apparition du processus de bronchoconstriction induit par le venin d'Aah par le dosage de la peroxydase éosinophile (EPO), de la myéloperoxydase (MPO). L'analyse des radicaux libres oxydants (NO et H₂O₂) impliqués probablement dans la détérioration tissulaire, la quantification des paramètres hématologiques et la numération des cellules inflammatoires au niveau du compartiment vasculaire ont été également effectués.

Afin de mettre en exergue la réponse immunitaire prédominante après envenimation, l'évaluation des concentrations sériques des deux isotypes des immunoglobulines G a été effectuée. Par ailleurs une étude de la réactivité bronchopulmonaire a été réalisée par la détermination de l'index pulmonaire, la teneur en eau pulmonaire, la détermination de l'activité de l'EPO et de la MPO au sien de l'arbre bronchopulmonaire et l'identification des populations cellulaires au niveau du liquide bronchopulmonaire (BAL).

Dans un second temps, la mise en évidence de l'implication des mastocytes (cellules primordiales de la réaction immunoallergique) dans le processus inflammatoire après envenimation a été analysée via l'utilisation d'un activateur spécifique des mastocytes le composé 48/80. Enfin nous avons effectuée une étude comparative du profil inflammatoire après envenimation expérimentale avec celui d'un modèle murin allergique par l'évaluation des taux sériques des IgE, de la MPO et de l'EPO. Cette comparaison a été confortée par une étude histologique réalisée sur le poumon.

I-GENERALITES

I-1-Les venins de scorpion

Le venin scorpionique est un liquide clair limpide, sécrété par une glande à venin située au niveau du telson, les scorpions l'utilisent pour capturer leurs proies ou pour se défendre contre des éventuels ennemis. Les venins des scorpions sont parmi les venins les mieux connus (Figure 1), et dont la composition est la plus simple (Goyffon, 2002).

I-2- Composition et mode d'action des venins

Le venin de scorpion se compose de deux fractions : une fraction non toxique qui représente 95% de la composition du venin, essentiellement des mucopolysaccharides, sérotonine, histamine et certains peptides doués d'une activité enzymatique (hyaluronidases et phospholipases) et une fraction toxique qui représente 5% du venin, constituée essentiellement de neurotoxines de faible poids moléculaire ayant une affinité pour les canaux ioniques membranaires des cellules excitables et non excitable (Laraba Djebari, 1996 ; Martin-Eauculaire et *al.*, 1999 ; Stokmman et Goyfon., 1995). Ces neuropeptides sont capables d'interférer l'activité des canaux ioniques membranaires générant ainsi un dysfonctionnement biologique (Petricevich, 2010) (Figure 2). Ils sont classés selon leurs structures et leurs cibles en deux grandes familles :

I-2-1- les toxines longues

Ces toxines sont des polypeptides de 60 à 76 résidus d'acides aminés réticulés par 4 ponts disulfures, de masse moléculaire de 6 à 7 kDa (Possani et *al.*, 2000). Ces toxines se fixent aux canaux sodiques et exercent des effets pharmacologiques en modifiant le potentiel d'action. Elles sont les plus abondantes au niveau de la fraction toxique et responsables de la quasi-totalité de la symptomatologie de l'envenimation. Les toxines longues sont divisées en deux grande classes, α et β , en fonction de leur mode d'action et de leur propriété de liaison (Jover et *al.*, 1980; Couraud et *al.*, 1982; Couraud et Jover, 1984; Gordon et *al.*, 1998; Possani et *al.*, 1999 ; Cestèle et Catterall, 2000).

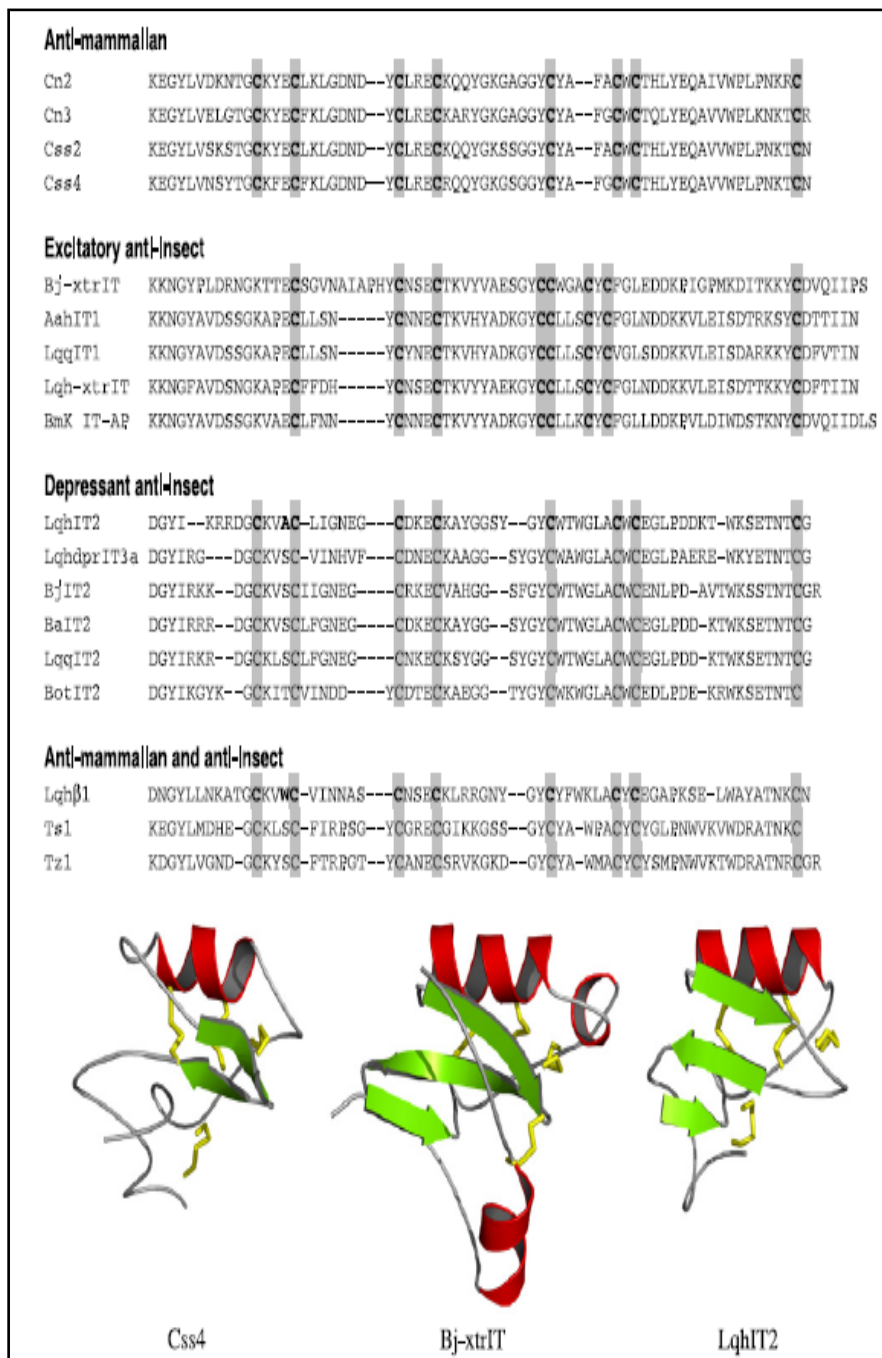


Figure 1 : Alignement des séquences des β -toxines représentant les quatre groupes pharmacologiques distincts (Gurevitz et al., 2007).

Les toxines α

Ces toxines sont présentes essentiellement dans les venins de scorpions de la famille des *Buthidae*, elles affectent les mammifères et les insectes, en se fixant avec une affinité élevée sur le site 3 du canal sodium des cellules excitables provoquant ainsi une perturbation des fonctions biologiques (figure 3) (Martin et Rochat, 1986 ; Legros et Martin-Eauclaire, 1997).

Les toxines β

Elles sont présentes dans les genres *Tityus* et *Centronoides* (Gurevitz et al., 2007). Ces toxines se fixent sur le site 4 du canal soduim de façon indépendante du potentiel membranaire en induisant sont activation et le déclenchement du potentiel d'action (figure 3) (Delori et al., 1981 ; EL Ayeb et al., 1983 ; Martin-Eauclaire et Couraud, 1995). Les toxines β sont divisées en quatre types, selon leur mode d'action soit sur les mammifères ou /et les insectes. (Figure 3).

β toxines anti-mammifère

Parmi ces toxines, la Cn2 a été purifiée du venin de *Centruroides noxius*; (Vazquez et al., 1995; Pintar et al., 1999) et la Css4 à partir de *Centruroides sufussus sufussus* (Martin et al., 1987).

β toxines anti-insecte

Ces toxines sont dépourvues de toutes activités sur les mammifères même si elles sont injectées en milligramme au niveau cérébrale murin (Dianous et al., 1987). Composées de 70 à 76 acide aminés, l'un de leurs ponts disulfures est décalée en comparaison avec d'autres toxines (Oren et al., 1998). Les toxines excitatrices comme AahIT (Zlotkin et al., 1978), LqqIT1 (Zlotkin et al., 1985; Kopeyan et al., 1990), Lqh-xtrIT (Froy et al., 1999a; Regev et al., 2003), et Bj-xtrIT (Froy et Gurevitz, 2003) provoquent des paralysies par une activation répétitive des canaux sodium membranaires (Pelhate et Zlotkin, 1982; Zlotkin et al., 1991). D'autres toxines telles que LqhIT2, BjIT2,et Lqh-dprIT3 (Strugatsky et al., 2005; Karbat et al., 2006) induisent une forte paralysie des insectes (Gurevitz et al.,2007). Les toxines dépérisantes perturbent le potentiell d'action membranaire via une forte dépolarisation membranaire axonale (Strugatsky et al., 2005).

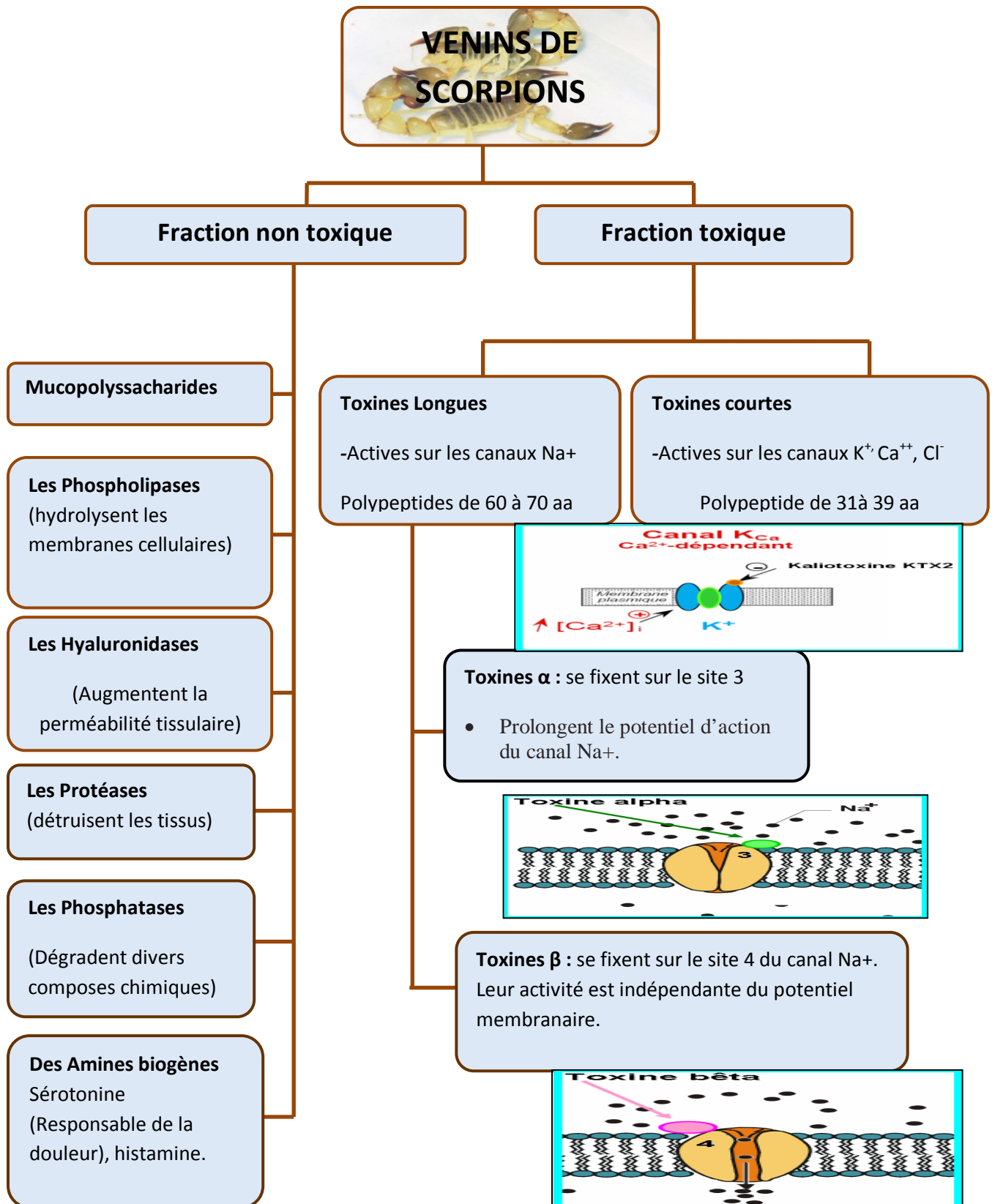


Figure 2 : Composition chimique du venin de scorpion et mode d'action

(Rochat et *al.*, 1974; Laraba-Djebari, 1996)

I-2-2- Les toxines courtes

Elles sont spécifiques des canaux potassiques et calciques (Garcia et *al.*,1998 ; Rodriguez et Possani, 2004). Ce sont des polypeptides de 4 kDa constitués d'une trentaine de résidus d'acide aminés réticulés par 3 à 4 ponts disulfures, elles sont actives sur les canaux potassique (Possani et *al.*, 1999).

Toxines actives sur les canaux potassiques

Les canaux potassiques jouent un rôle primordial au niveau de plusieurs processus biologique. Leurs dysfonctionnements soit par des mutations génétiques ou par interaction avec des biomolécules comme les neurotoxines peuvent provoquer de nombreuses pathologies (Ashcroft et Gribble, 2000 ; Martin-Eauclaire et Tytgat, 2007). Les toxines (KTX) de scorpions qui ciblent les canaux K⁺ sont de petits peptides liés par trois ou quatre ponts disulfures (Tytgat et *al.*, 1999 ; Corona et *al.*,2002 ; Goudet et *al.*, 2002). Le canal potassique joue un rôle dans la réponse immunitaire (Petricevich, 2010). Une étude antérieur a mis en évidence le rôle des canaux potassiques dans la diminution de l'activation des cellules T (Villalonga et *al.*, 2007). Les Butantoxines présentes dans le venin de trois scorpions Brésilien : *T. serrulatus*, *T. bahiensis*, and *T. stigmurus* sont responsables du blocage des canaux potassiques, de l'inhibition de la prolifération des cellules T et de la production de l'IL-2. (Holaday et *al.*, 2000).

Toxines active sur les canaux calciques

Les ions Ca²⁺ joue un rôle clef dans la régulation de plusieurs fonctions cellulaires comme celui de deuxième messenger couplé au récepteur G responsable de l'activation de plusieurs voies de signalisation dont celle de l'excitabilité cellulaire, la synthèse de neurotransmetteurs, le métabolisme intracellulaire et l'expression de gènes (Petricevich, 2010). Les canaux calciques sont présents aux niveaux des cellules des muscles cardiaque, lisse, striés, des neurones et des cellules de glande endocrines (Catterall, 1992 ; Ashcroft et Gribble, 2000). Le venin de scorpion contient également plusieurs peptides qui peuvent interférer et moduler les propriétés fonctionnelles des canaux calciques (Petricevich, 2010).

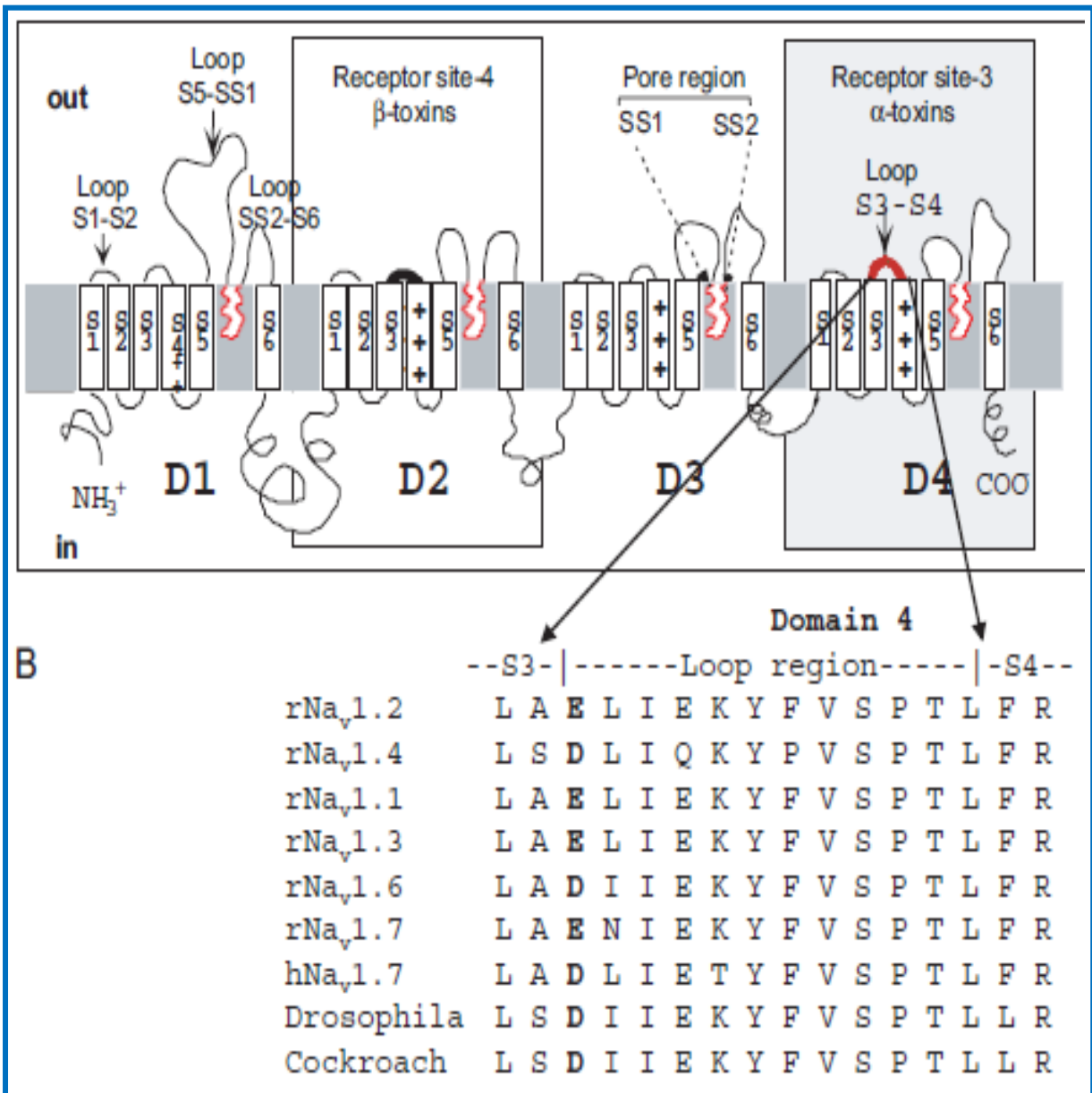


Figure 3 : Structure des récepteurs des toxines de scorpion
(Cestele and Catterall, 2000; Gordon *et al.*, 2004).

I-3- Toxicocinétique du venin scorpionique

L'analyse toxicocinétique des venins de *Tityus serrulatus*, de *Buthus occitanus*, *Androctonus mauritanicus mauritanicus* et d'*Androctonus australis hector* déterminé par le test ELISA a permis de montrer une distribution rapide du venin de site d'injection vers le compartiment vasculaire et tissulaire (Revelo et al., 1996 ; Krifi et al., 2001 ; El Hafny et al., 2002 ; Hammoudi-Triki et al., 2007). La demi-vie des venins de scorpion varie selon l'espèce, la taille du scorpion, la voie d'administration et les conditions climatiques et géographiques (Kankonjar et al., 1998) . Elle est de l'ordre de 4 à 7 min pour le venin d'Aag avec une forte résorption (Krifi et al., 2005). La toxicocinétique des toxines AahI, AahII et AahIII a été explorée. Il a été démontré que les toxines ont une diffusion plus rapide par rapport au venin et une élimination lente par voie rénale (Deveaux et al., 2004).

Le venin injecté par voie intramusculaire se résorbe rapidement avec une forte constante d'absorption (Ka), la concentration sérique maximale (T max) varie entre 30 et 60 min avec une concentration sanguine maximale et optimale. L'injection sous-cutanée du venin chez le lapin a montré que le taux d'absorption est de 70% et atteint dans la circulation sanguine au bout de 15 min (Ismail, 1994).

L'injection de la fraction toxique du venin d'Aah à des rats suit également une cinétique très rapide avec une demi-vie d'élimination de 13 min par voie intraveineuse et de 35 à 53 min par voie sous cutanée (Hammoudi-Triki et al., 2007). Sa biodisponibilité est faible montrant ainsi la forte distribution du venin au niveau tissulaire. La durée d'élimination est de 4 à 13 heures pouvant être détectable par radioactivité jusqu'à la 36^{ème} heure après l'injection (Ismail, 1994).

Une étude menée par l'équipe de Murugesan et collaborateurs (1999) utilisant un élément radioactif le Tc99m a pu mettre en évidence la distribution du venin de *Mesobuthus tamulus concanesis* dans les différents organes en fonction du temps. Ainsi 5 minutes après l'injection du venin marqué, 29,5% passe dans le sang et chute à 6,19% après 3 heures, 10,4% dans le foie et chute à 8,3% après 3 heures, 11,5% dans les reins puis atteint son maximum de 31,9% après 30 min. La rétention du venin marqué au Tc99m par le rein a été observée après 24 h. La concentration du venin dans l'estomac et la thyroïde a été insignifiante. La concentration maximale dans l'intestin grêle est de 14,5% après 3 heures, et dans le gros intestin de 13,3%, 24 heures après envenimation.

I-4- Conséquences cliniques d'une envenimation scorpionique

L'envenimation scorpionique est caractérisée par l'apparition rapide des symptômes dès les cinq à dix minutes qui suivent la piqûre, dont la gravité dépend de plusieurs facteurs (Ismail et *al.*, 1980). Des facteurs liés au scorpion (espèces, taille et quantité de venin injectée à la victime) et des facteurs liés à l'état du système immunitaire des victimes. Une piqure au niveau des membres richement vascularisés est aussi un facteur de gravité. Les enfants, les personnes à système immunitaire fragile et ceux qui présentent des allergies aux venins de scorpions sont les plus affectés après une piqure par les scorpions (Osnaya-Romero et *al.*, 2001). Toutes les perturbations physiologiques sont en général, la conséquence des effets combinés des différents composants contenus dans le venin (neurotoxines, enzymes et bioamines) (Laraba Djebari, 1996).

Les effets physiopathologiques causés par les venins de scorpions peuvent se diversifier et s'aggraver. Ils se manifestent par une sudation, une salivation, des vomissements et des diarrhées. Des études ont montré qu'une envenimation sévère cause une atteinte cardiaque, un œdème pulmonaire aigu et un dysfonctionnement biologique telle qu'une leucocytose, une arythmie cardiaque, une hypertension suivies d'une hypotension artérielle (Hammoudi-Triki et *al.*, 2007).

Une classification basée sur la sévérité croissante des manifestations cliniques de l'envenimation scorpionique a été proposée. Le Grade I (envenimation bénigne) correspond aux manifestations locales isolées ; le Grade II (envenimation modérée) aux manifestations systémiques d'envenimation sans défaillance vitale; le Grade III (envenimation grave) aux envenimations dont les manifestations cliniques peuvent mettre en jeu à court terme le pronostic vital des patients (Tableau 1) (Hammoudi-Triki, 2004).

I-5- Physiopathologie de l'envenimation scorpionique

Lorsqu'une personne subit une piqure scorpionique, plusieurs modifications physiologiques peuvent être observées aux niveaux des différents compartiments de l'organisme tel qu'un déséquilibre hémodynamique, des troubles hormonaux, des variations métaboliques, des altérations tissulaires et une réaction inflammatoire aiguë ; conséquences de la libération accrue des neurotransmetteurs et des médiateurs inflammatoires.

Tableau 1 : Gradation de l'envenimation scorpionique (Hammoudi-Triki, 2004 ; Petricevich, 2010 ; Hamouda et Ben Salah, 2010).

Stade I ou Envenimation scorpionique bénigne (90-95% des cas)

Le patient présente uniquement des signes locorégionaux de type douleur.

Stade II ou Envenimation scorpionique modérée (5-10%)

Le patient présente, en plus des signes locorégionaux, des signes généraux accentués de type de sueur, agitation, vomissements, ballonnement abdominal, perturbation de la pression artérielle, polypnée, extrémités froides.

Stade III ou Envenimation scorpionique grave (1-2%)

Le patient présente, en plus des signes locorégionaux et des signes généraux, une atteinte cardiovasculaire grave de type œdème aigu du poumon, bronchospasme, de choc cardiogénique, de coma et de convulsion.

I-5-1- Déséquilibre hémodynamique

Le trouble hémodynamique est une conséquence d'une envenimation scorpionique (Gueron., 1980 ; Abroug et *al.*, 1999 ; Hammoudi-Triki et *al* 2004 ; Nouira et *al.*, 2005). L'atteinte cardiaque concerne 2% des envenimations scorpioniques (Mabrouk et *al.*, 2005). La pathogénie de l'insuffisance respiratoire et cardiaque après envenimation scorpionique n'est pas complètement élucidée mais les auteurs incriminent une action directe des neurotoxines (cardiotoxines) au niveau du muscle cardiaque et des poumons et /ou une action indirecte des neuropeptides et des autres substances présentes dans le venin de scorpion (Gueron et *al.*, 1990a; Sofer et *al.*, 1991; Abroug et *al.*, 1995; Teixeira et *al* 2001). L'œdème pulmonaire et/ou l'état de choc sont des complications redoutables de l'envenimation scorpionique. Il est la conséquence d'un dysfonctionnement aigu du ventricule gauche suite à une libération accrue des catécholamines et/ou à une atteinte directe des cellules myocardiques (Mazzei de Davila et *al.*, 2002).

➤ Augmentation de catécholamines

Un effet stimulant direct du venin sur les terminaisons nerveuses sympathiques et adrénergiques provoque une augmentation des catécholamines. Cette hypothèse a été confirmée par des études cliniques (Mazzei de Davila et *al.*,2002) et expérimentales (Abroug et *al.*, 2003). L'envenimation scorpionique grave s'accompagne d'une décharge massive d'adrénaline et de noradrénaline. Cette libération de neuromédiateurs résulte de l'action des neurotoxines de venin de scorpion sur les canaux sodiques des cellules excitables, entraînant leur dépolarisation intense (Clot-Faybesse et *al.*, 2000). Cette décharge serait en rapport avec les effets périphériques induit par le venin de scorpion. La libération de catécholamines provoque une augmentation de la pression artérielle systémique et des résistances périphériques, une arythmie ventriculaire, une augmentation de la pression diastolique ventriculaire gauche et une baisse de la compliance ventriculaire (Gueron et Weizmann., 1969). L'activité rénine et l'aldostéronémie sont accrues, ce qui augmente les résistances périphériques et la post-charge ventriculaire gauche. Ces phénomènes entraînent une dysfonction ventriculaire gauche tant systolique que diastolique, expliquant aussi bien l'insuffisance cardiaque aiguë que la nature hémodynamique de l'œdème pulmonaire.

Cette myocardite adrénergique a été appuyée par l'étude histologique de Yarom et Braun 1970. Dans cette étude, l'injection du venin de scorpion chez le chien est responsable de plusieurs anomalies myocardiques. En effet, l'examen histologique du myocarde de ces animaux a montré des lésions de types dégénérescence musculaire, œdème interstitiel, infiltration myocardique par des lymphocytes et des polynucléaires neutrophiles et nécrose myocardique. Les lésions sont plus fréquentes au niveau du septum interventriculaire avec une atteinte du ventricule gauche. La décharge de catécholamines, l'accélération de la fréquence cardiaque, la baisse de la compliance ventriculaire gauche et l'augmentation du métabolisme cellulaire expliquent l'atteinte cardiaque suite à une envenimation scorpionique. D'autres travaux ont montré que l'administration de l'atropine, un bêtabloquant (métoprolol), et la dénervation myocardique par la 6-hydroxydopamine ne réduit pas l'action du venin de *Tityus serrulatus* sur la contractilité myocardique (Bahloul et al., 2005).

➤ **Atteinte directe des cellules myocardiques**

Le venin affecte soit directement les membranes des cellules myocardiques et change leurs perméabilités et leurs propriétés électriques, soit indirectement à travers des flux anormaux d'électrolytes. L'hypothèse a été supportée par l'étude clinique de Gureon et collaborateurs (1967) ainsi que par l'étude expérimentale de Yarom et Braun (1970) qui ont observé par microscopie électronique une atteinte diffuse des myofibrilles avec une dégénérescence cellulaire, un œdème interstitiel, une congestion vasculaire et des nécroses focales. Plusieurs études ont montré un effet direct du venin sur le myocarde (myocardite scorpionique) (Wang et al., 1994). La myocardite toxique a été observée par l'étude échocardiographique lors d'une envenimation grave (Nouira et al., 1995). Les toxines de scorpion sont également capables de stimuler les cellules myocardiques en culture (Teixeira et al., 2001). Une étude expérimentale a rapporté que l'administration du venin de *T. serrulatus* chez le rat entraîne une bradycardie suivie d'une tachycardie et d'une augmentation de la force contractile du cœur (Figure 4).

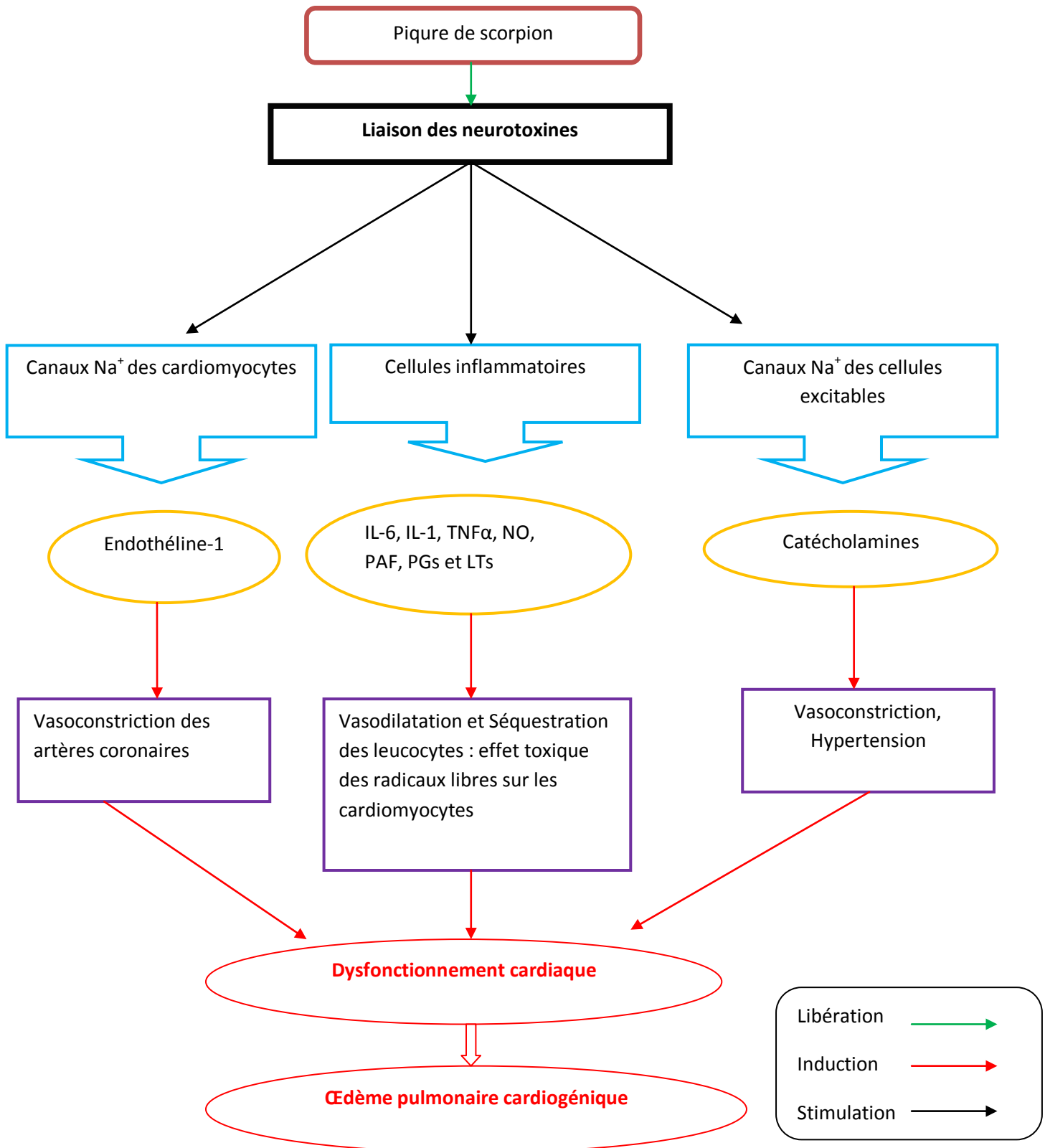


Figure 4 : Trouble hémodynamique après envenimation scorpionique (Texeira et al., 2001 ; Bahloul et al., 2005 ; Adi-Bessalem et al., 2008 ; Sami-Merah et al., 2008, 2009).

I-5-2- Les Troubles hormonales

Les neurotoxines agissent aux niveaux des canaux ioniques des fibres nerveuses induisant ainsi une dépolarisation de la membrane axonale, dont la conséquence est la perturbation dans la libération des neurotransmetteurs ce traduisant par une sécrétion massive des catécholamines et de l'acétylcholine, des neuropeptide P et Y et du facteur natriurétique (FNA). Cette décharge de neurohormones provoquent des troubles physiologiques et des lésions tissulaires aux niveaux de plusieurs organes (Goyffon., 2002 ; Ismail, 1995 ; Abroug, 2002). Ces neuropeptides sont impliqués dans la pathogénèse de l'asthme par la contraction des muscles lisse, de l'augmentation de la perméabilité vasculaire et la production de mucus.

I-5-3- Défaillance métabolique

Une envenimation scorpionique induit des variations métaboliques assez importantes. En effet, de nombreuses études ont montré une augmentation sérique de plusieurs enzymes (Corréa et al., 1997). Le venin d'*Androctonus australis hector* et de *Leiurus quinquestriatus* provoquent une élévation sérique de la AST, ALT, CK et de la LDH (Ismail, 1995 ; Bessalem et al., 2003 ; Abdoon et Fatani, 2009). Une augmentation des taux sériques de l'aspartate aminotransférase (AST), de la lactate déshydrogénase (LDH), de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) et de la glutamate pyruvate transaminase (GPT) a été également rapportée (Radmanes, 1990 ; Gajalakshmi 1978). Des travaux ont rapporté aussi une élévation sérique de la GPT et de la GOT chez une jeune fille de 15 ans après piqure par le scorpion (Jain et al., 1970). Le taux de CPK reste élevé même 48 H après l'envenimation (Kankonkar et al., 1992). Une hyperglycémie transitoire associée à une hyperinsulinémie ainsi qu'une hyperamylasémie ont été également observées. L'hyperleucocytose et l'acidose métabolique avec acidémie sont présentes dans les tableaux cliniques graves. L'insuffisance rénale est rare, souvent fonctionnelle par déshydratation, parfois organique par atteinte tubulaire ou provoquée par l'hémolyse (Bouaziz et al., 1996).

Par ailleurs, le venin de scorpion provoque d'autres perturbations dans l'équilibre métabolique. Une augmentation de taux des acides gras circulants a été également rapportée (Abroug et al., 1994). Cette élévation des acides gras circulants est la conséquence de l'action des hormones lypolytiques telles que, le cortisol et le glucagon, libérées après envenimation scorpionique (Sofer et Gueron, 1988).

I-5-4-Troubles des électrolytes

L'envenimation scorpionique expérimentale et accidentelle conduit à une modification dans le taux sérique des électrolytes via la fixation des toxines sur les canaux ioniques. Le venin de *Buthus minax* induit une diminution des taux de potassium sérique et une hypocalcémie (Ismail et al., 1988). Une étude rétrospective sur 223 patients victimes de piqûres de scorpions *Mesobuthus* a révélé une hyponatrémie accompagnée d'une augmentation du taux sérique de potassium et une hypocalcémie (Krishina-Murthy, 2000). Par ailleurs, des concentrations sériques élevées de potassium et de sodium ont été observées après administration du venin de *Tityus serrulatus* à des rats (Andrade et al., 2004).

I-5-5- Modifications tissulaires

Les venins de scorpions des genres *Tityus* et *Androctonus* induisent des lésions profondes aux niveaux de plusieurs organes tels que le cœur, le poumon, le foie, le rein et le pancréas (D'Suze et al., 2004 ; Adi-Bessalem et al., 2008; Sami-Merah et al., 2008). Le poumon reste l'organe le plus sensible à l'action du venin. En effet, l'analyse histologique du parenchyme pulmonaire des animaux envenimés avec les venins de *Tityus serrulatus*, *Androctonus australis hector*, *Tityus confluens* ont montré la présence des œdèmes interstitiels et intra alvéolaires associés ou non à des hémorragies, une infiltration des cellules inflammatoires et dans certain cas un dépôt de fibrine (Andrade et al., 2007 ; Adi-Bessalem et al., 2008 ; De Roodt et al., 2009).

I-6-Phénomène de bronchoconstriction induit par les venins

La bronchoconstriction est due à la fixation de l'acétylcholine sur les récepteurs induisant une contraction des muscles lisses des bronches au niveau des poumons. Elle crée une obstruction des bronches qui peut entraîner une difficulté respiratoire. Elle est l'une des manifestations importantes de l'asthme mais s'observe aussi après des envenimations sévères. Les effets des venins peuvent être responsables d'une paralysie respiratoire par atteinte de la jonction neuromusculaire (Mion et al., 2007). La liaison de l'acétylcholine aux récepteurs nicotiniques postsynaptiques provoque l'ouverture de canaux calciques, la dépolarisation et la contraction musculaire.

Les neurotoxines postsynaptiques (α -neurotoxines) se fixent spécifiquement sur les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine. Les toxines présynaptiques (β -neurotoxines) inhibent le recyclage de l'acétylcholine dans les vésicules synaptiques. La dendrotoxine (toxines présynaptique facilitatrices) et la fasciculine (inhibiteur de l'acétylcholinestérase) sont des toxines des venins de *Dendroaspis spp* qui provoquent une bronchoconstriction par dépolarisation. Par ailleurs, la liaison des neurotoxines de scorpion au niveau des canaux sodiques (Na^+) des cellules excitable provoque une décharge de neuromédiateurs (catécholamines et acétylcholine) qui aura comme conséquence une constriction bronchique suivie d'une sécrétion bronchique et une détresse respiratoire. En effet une bronchoconstriction et une modification du rythme respiratoire est observé chez les rats après administration du venin d'Aah (Hammoudi-Triki et *al.*, 2007).

Parallèlement, les neurotoxines induisent aussi l'activation des fibres sensorielles C, générant ainsi une dépolarisation membranaire qui aura comme conséquence la libération du neuropeptide P, une tachykinine. La liaison du neuropeptide P aux cellules inflammatoires (mastocytes, neutrophiles, éosinophiles et lymphocytes) induit une sécrétion massive de médiateurs inflammatoires (l'histamines, la sérotonine, les cytokines, Prostaglandines et les leucotriènes)(Waraoto et *al.*, 1993 ; De Matos, 1993 ; Fukuhara et *al.*, 2003). L'ensemble de ces médiateurs sont responsables d'une bronchoconstriction et d'une augmentation de la perméabilité vasculaire suivi de la formation d'un œdème pulmonaire responsable du de la détresse respiratoire (Anderson et *al.*, 2008).

Les toxines peuvent également activer la cascade de coagulation à l'origine de la libération des kinines. Ces molécules provoquent une vasodilatation, une activation et la migration des polynucléaires neutrophiles qui libèrent à leur tour le NO, les prostaglandines et les leucotriènes (Fukuhara et *al.*, 2004) (figure 5). l'augmentation des médiateurs inflammatoires observée chez le modèle murin envenimés avec le venin d'Aah, pourrait expliquer la formation d'œdème pulmonaire (Adi-Bessalem et *al.*, 2008 ; Sami-Merah et *al.*, 2008). L'ensemble de ces mécanismes aura comme conséquence une hypersécrétion de mucus, une bronchoconstriction et une obstruction des bronches observée aussi chez les personnes qui présentent un asthme chronique (figure 6).

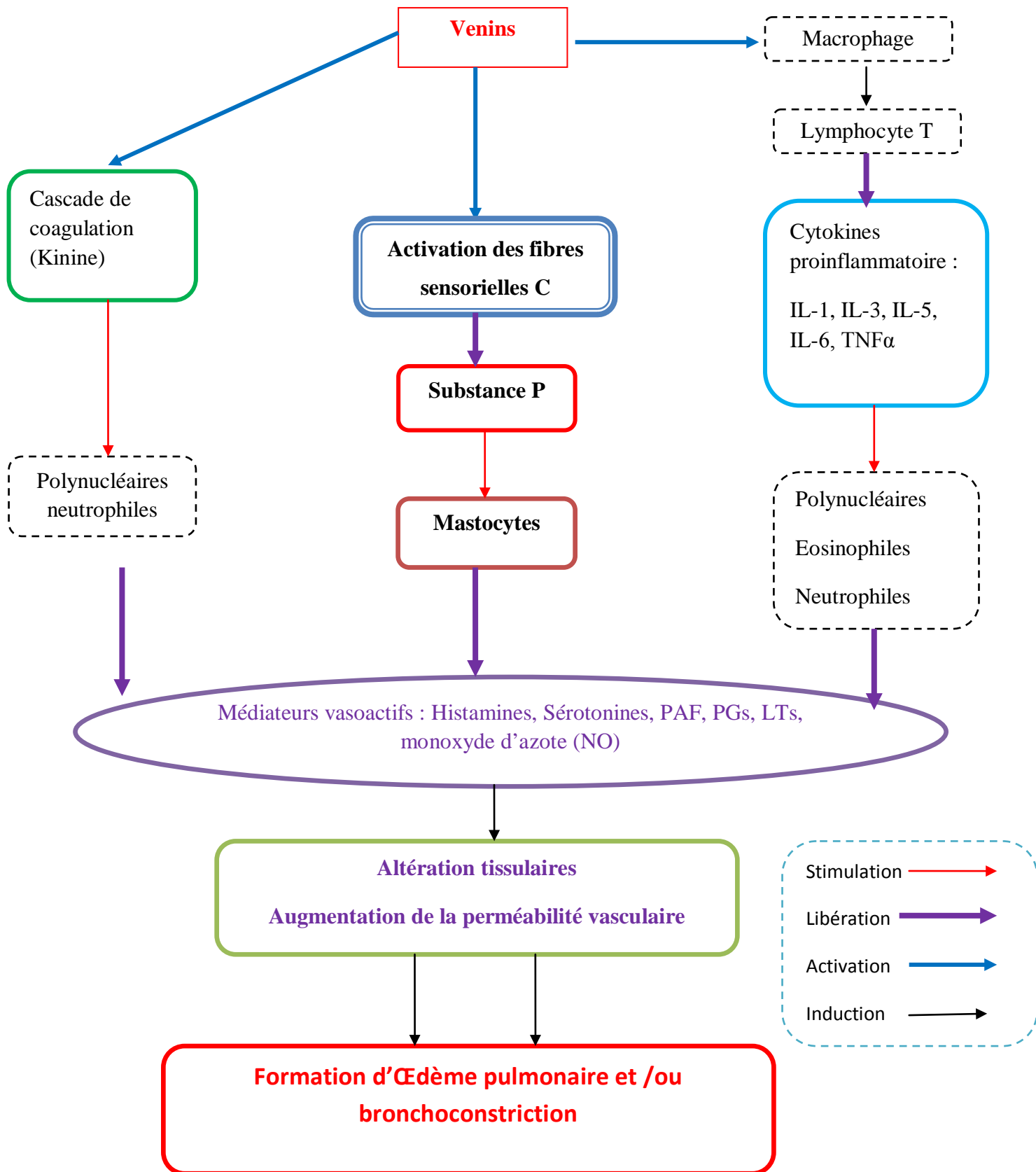


Figure 5 : Mécanismes d'induction de la bronchoconstriction par le venin de scorpion (De Matos et *al.*, 1997, 2001 ; Kalil-Gaspar et *al.*, 2003 ; Coelho et *al.*, 2007 ; Abdoon et Fatani, 2009 ; Galvao et *al.*, 2010).

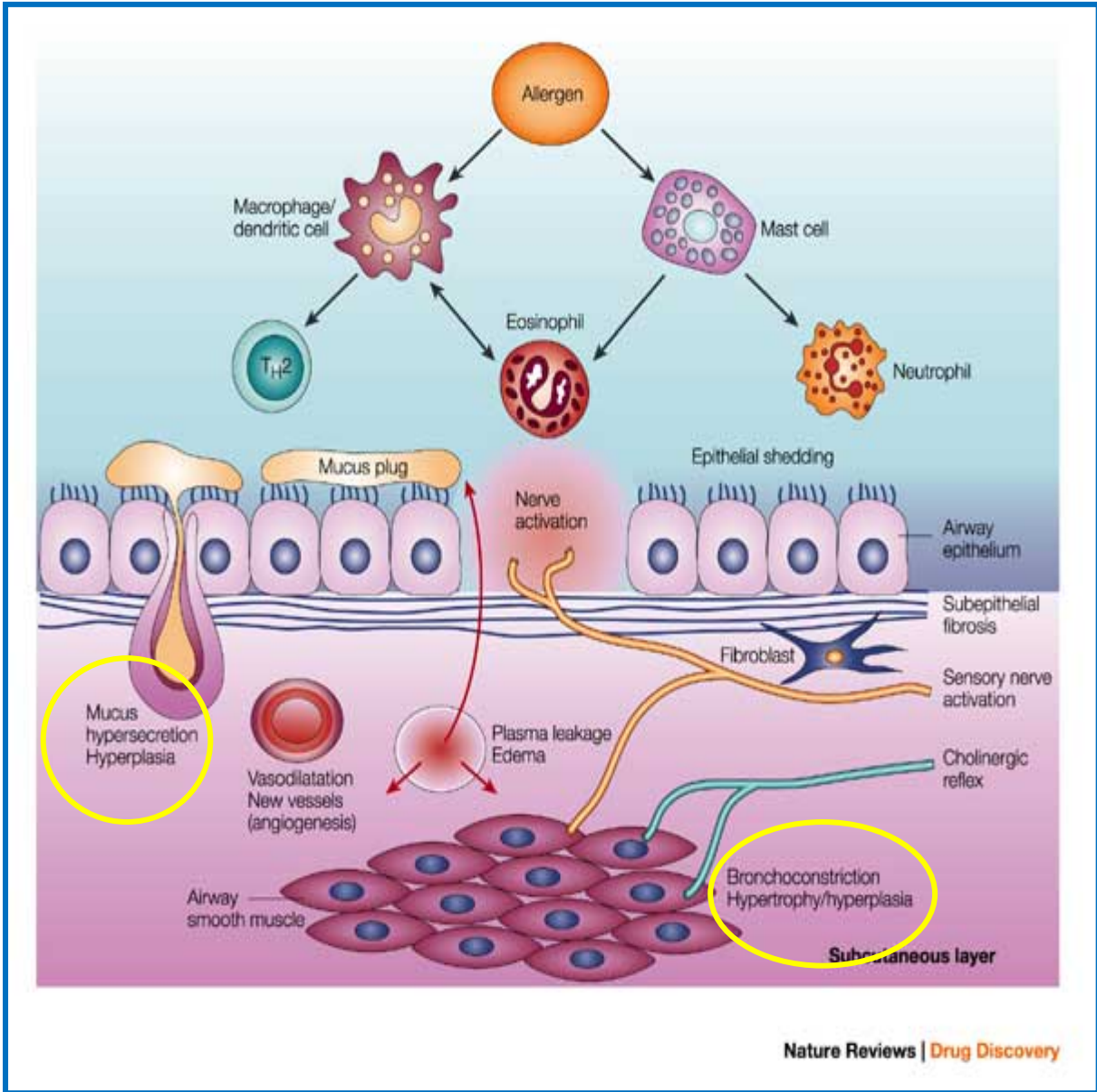


Figure 6 : Mécanisme d'apparition de la bronchoconstriction et de l'hypersecretion de mucus (Barnes, 2004).

I-7- Les cellules et les molécules impliquées dans la réaction immunoallergique

L'inhalation de l'allergène par des personnes hypersensibles peut entraîner une bronchoconstriction. Le mécanisme dépend de la fixation de l'IgE à des récepteurs FcεRI sur les mastocytes des voies respiratoires. Les IgE, déjà fixées à la membrane plasmique des mastocytes ou des basophiles et activées par l'arrivée d'un antigène spécifique, qui réunit les fragments Fab des IgE, provoquent par l'intermédiaire de leur fragment Fc, la dégranulation des mastocytes de ses constituants bioactifs (Siraganian, 2003). Cette cascade mène à la libération de médiateurs préformés, comme l'histamine et la tryptase, et à la stimulation de synthèse *de novo*, des produits du métabolisme de l'acide arachidonique (PG et LT) et des cytokines comme le TNFα, l'IL-4 et l'IL-5. L'allergène peut aussi s'attacher à des récepteurs de faible affinité (FcεRII) sur les macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes B. Dans l'activation du FcεRII des macrophages, il y a sécrétion de médiateurs spasmogéniques comme le Thromboxane A2 (TxA2), des leucotriènes cystényles variés et du PAF en plus des radicaux oxygénés et des enzymes lysosomales (Towes, 1997) (Figure 7). La réaction inflammatoire de type allergique est caractérisée par l'afflux au sien de la muqueuse bronchique de nombreuses cellules parmi lesquelles prédominent les éosinophiles activées, lymphocytes T mais aussi les macrophages et les neutrophiles. Cette accumulation de cellules inflammatoires résulte de leur attraction *in situ* sous l'effet de facteurs chimiotactiques (Histamine, LTB4 et PAF) mais aussi de nombreuses cytokines. En effet, l'IL-5 a un effet chimiotactique sélectif sur l'éosinophile mais aussi prolonge la survie des éosinophiles à l'échelon tissulaire en s'opposant à leur apoptose. L'IL-8 appartenant à la famille des chimiokines α, intervient sur l'activation des neutrophiles, lymphocytes T, basophiles et éosinophiles (Gosset *et al.*, 1998). Pour réguler la migration des cellules inflammatoires du sang circulant vers le site inflammatoire l'organisme met en jeu un système complexe d'interaction impliquant des molécules d'adhérences (Carlos *et al.*, 1994 ; Bloemen *et al.*, 1998). Elles interviennent en couple : la E-sélectine, présente sur l'endothélium activé, reconnaît des déterminants carbohydratés sur les leucocytes et des membres de la superfamille des immunoglobulines tel que ICAM-1 et VCAM-1 interagissent avec les intégrines leucocytaires, respectivement les intégrines β2 (CD18 qui forme le LFA-1) et β1 (VLA-4). Ces molécules sont modulées par les cytokines. L'infiltration des polynucléaires éosinophiles, l'augmentation des ICAM-1 et la production des IgE est observée après une envenimation expérimentale (Adi-Bessalem *et al.*, 2011 ; Raouaraoua-Boukari *et al.*, 2012).

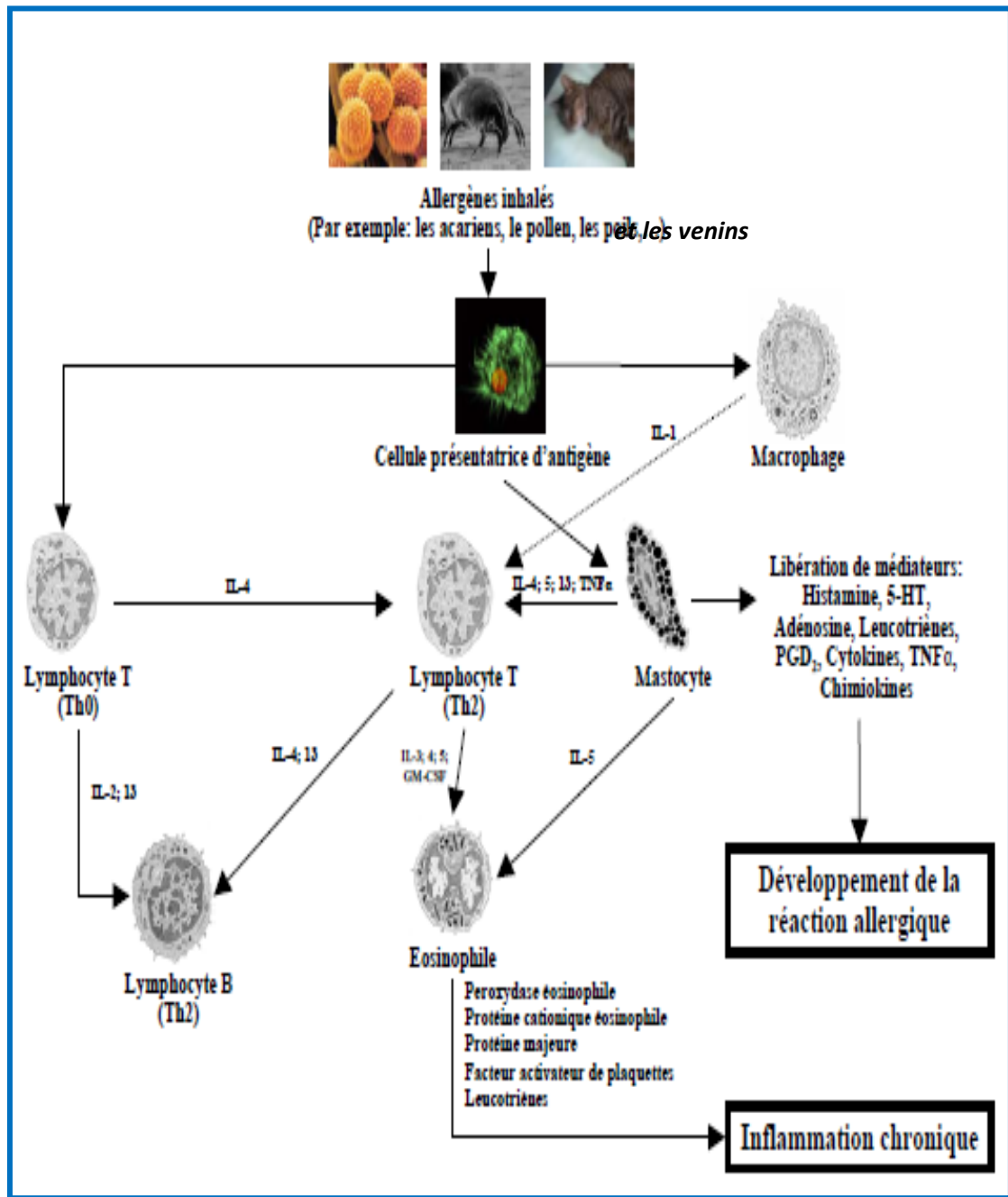


Figure 7 : Les mécanismes impliqués dans la réaction immunitaire de type allergique (Wolber, 2005)

La réaction inflammatoire de type allergique est un processus complexe qui fait intervenir plusieurs acteurs du système immunitaire ou les mastocytes jouent un rôle clé (Zuo et *al.*, 2003).

❖ Les mastocytes

Le mastocyte est une cellule granuleuse présente essentiellement dans les tissus conjonctifs, qui se caractérise par la présence dans son cytoplasme de très nombreuses granulations contenant des médiateurs inflammatoires préformés et par son rôle primordial dans les mécanismes allergiques (Amin et *al.*, 2000). Lorsqu'ils sont en contact avec un allergène et qu'ils présentent à leurs surfaces les IgE spécifiques, ils se dégranulent et libèrent des médiateurs vasoactifs (l'histamine) et des médiateurs à effet retardé (les prostaglandines) (Roitt et *al.*, 2002). Cette libération se fait par un mécanisme d'exocytose. Il déclenche ainsi des réactions allergiques immédiates, parfois graves, comme un choc anaphylactique et des troubles hémodynamiques. L'ensemble des médiateurs préformés ou néoformés peuvent être responsables d'une augmentation de la perméabilité vasculaire pulmonaire (figure 8) (Noxon, 1991; Amaral et *al.*, 1994). Les mastocytes par la libération de la tryptase et d'autres protéases telles que la chymase semblent jouer un rôle crucial dans le remodelage des voies aériennes (Amin, 2010). Une activation des mastocytes a été rapportée dans le cas des envenimement expérimentale (De Matos et *al.*, 1999 ; Furunno et *al.*, 2004 ; Bonavita et *al.*, 2006 ; André Gustavo et *al.*, 2006) caractérisée par une augmentation des taux sérique d'histamine (Nusslein et *al.*, 1986). Des travaux ont montré que l'incubation des mastocytes *in vitro* avec le venin engendre leurs dégranulations massives (Dutta et Deshapande, 2011). Une activation des mastocytes *in vivo* ou *in vitro* est possible en utilisant un composé chimique spécifique nommé composé 48/80 (C₁₁H₁₅NO) issu de la condensation du N-méthylp-methoxy phenethylamine et du formaldéhyde (Byrne et *al.*, 2007).

Le composé 48/80 est un agent de dégranulation mastocytaires très sélectif mais non immunologique active directement la protéine Gi couplée à la GTP (Shefler et Sagi-Eisenberg, 2001) (Figure 9). Le Composé 48/80 est un polyamine basique, sa liaison aux récepteurs membranaires des mastocytes entraîne l'ouverture des canaux calciques et la dégranulation des médiateurs inflammatoires préformés par les mastocytes (Enerback et Lundin, 1974 ; Norrby et Enestrom, 1984 ; Nawa et *al.*, 1994 ; Zhuang et *al.*, 1996).

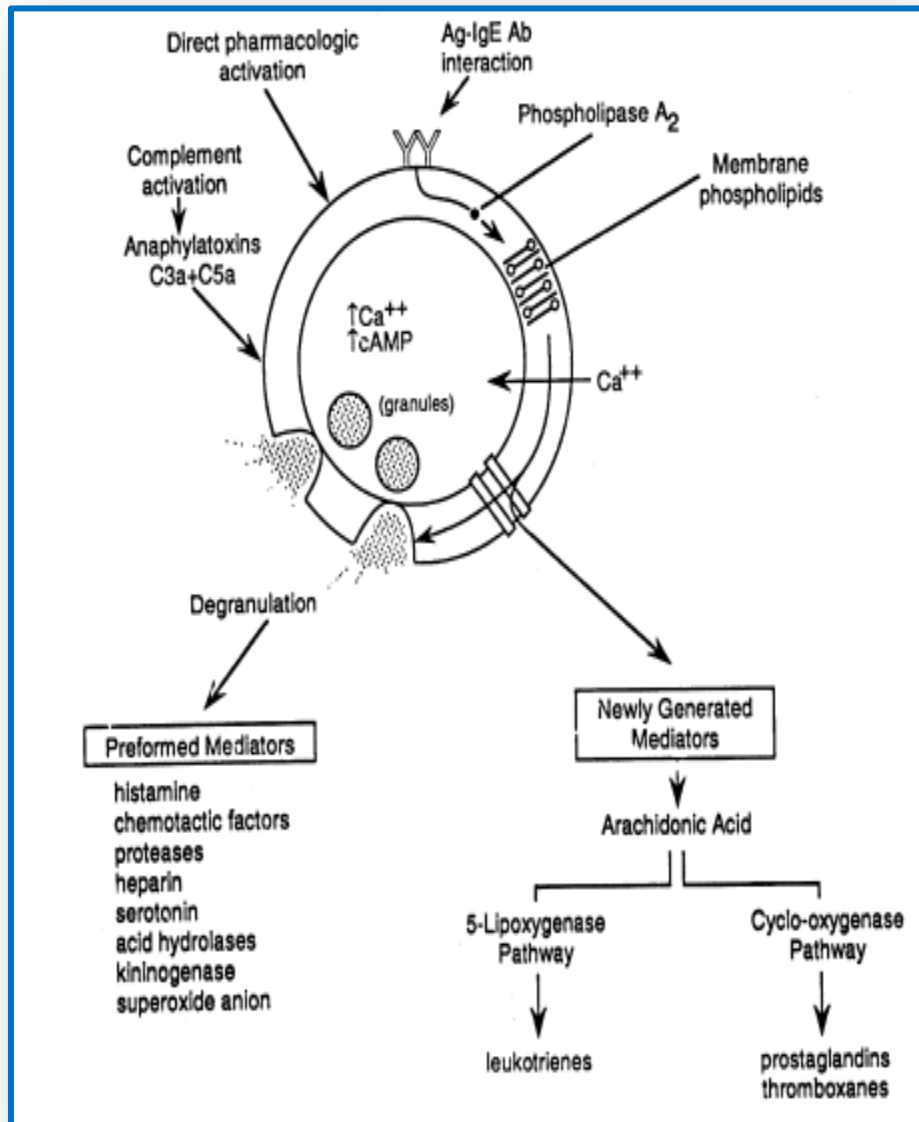


Figure 8 : Médiateurs préformés et néoformés excrètent par les mastocytes près activation par réaction croisé des IgE avec l'Ag (David et *al.*, 2001).

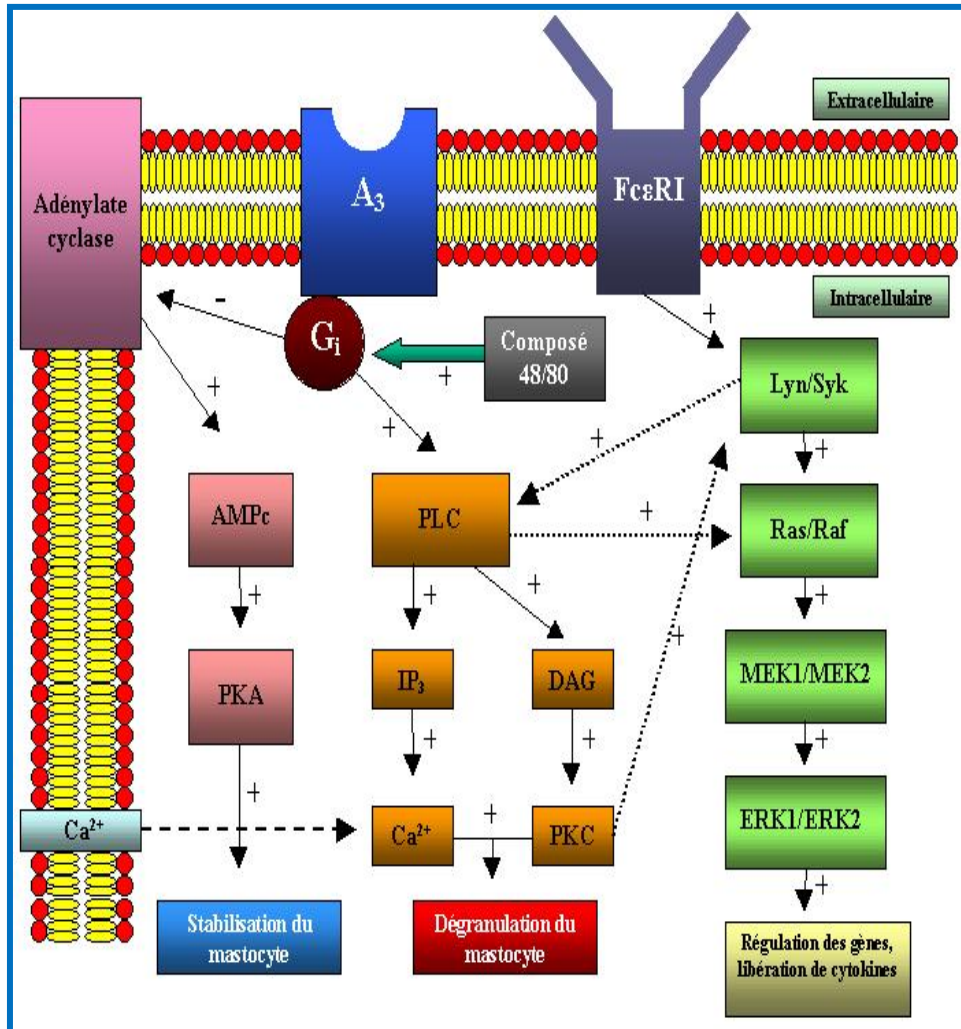


Figure 9 : Représentation schématique du mécanisme d'action intracellulaire du composé 48/80 (Shefler et Sagi-Eisenberg, 2001).

❖ Les éosinophiles

Les fonctions cellulaires assurées par les polynucléaires éosinophiles (PE) sont nombreuses. Ces cellules sont immunomodulatrices produisant des cytokines incluant principalement IL-5, l'IL-3 et le GM-CSF. Le polynucléaire éosinophile mature circule dans le sang pendant environ une journée avant d'être recruté dans les bronches ou le poumon.

Le recrutement des éosinophiles est un processus dynamique et complexe qui implique l'attraction de la cellule, son adhérence à la paroi du vaisseau, la diapédèse et un processus chimiotactique par des cytokines dont l'IL5, l'éotaxine et le RANTES, processus étroitement régulé *in situ* par le réseau des chémokines. Une fois dans les tissus, les éosinophiles ont la capacité, lorsqu'ils sont activés par l'IL-5, de libérer de nombreux produits de sécrétion et médiateurs impliqués dans la réponse inflammatoire non spécifique et la protection contre les micro-organismes infectieux. Ces produits incluent des cytokines inflammatoires, des dérivés de l'acide arachidonique dont les leucotriènes, des enzymes, des agents oxydants et des protéines spécifiques de l'éosinophile (Rothenberg et Hogan, 2006), leurs conférant ainsi en plus de l'immunomodulation un pouvoir proinflammatoires produisant en particulier les protéines cationiques de l'éosinophile qui comportent la MBP, l'ECP, l'EDN, l'EPO et l'homologue de la MBP décrite plus récemment (Kahn et *al.*, 2010). L'ensemble de ces molécules participent aux lésions tissulaires des maladies éosinophiliques (Cottin, 2008).

La place de l'éosinophile dans l'inflammation bronchique de l'asthmatique est définie depuis de nombreuses années (Tillie-Leblon et Thorette, 2004). Les PE sont présents dans le lavage bronchoalvéolaire (BAL) et dans l'épithélium de la muqueuse bronchique sous forme activée (Bousquet et *al.*, 1990). Le venin d'Aah induit une élévation des éosinophiles sériques et une séquestration des PE aux niveaux du BAL des les premières heures qui suivent une envenimation expérimentale (Adi-Bessalem et *al.*, 2008).

❖ Les neutrophiles

Les neutrophiles cellules actives du système immunitaire sécrètent de nombreux radicaux libres de l'oxygène, cytokines (IL-1, TNF α , IL-8, IL-12), médiateurs lipidiques comme le LTB4 ou le PAF et enzymes (métalloprotéinases de la matrice, élastase, collagénase, gélatinase).

Cet arsenal lui permet de jouer son rôle de défense mais il peut également être impliqué dans les processus d'agression tissulaire qui sont décrits dans la fibrose pulmonaire, les bronchectasies ou le syndrome de détresse respiratoire aigu.

Dans l'asthme, le rôle de cette cellule a récemment été évoqué, particulièrement dans l'asthme aigu grave (Tillié-Leblon et Thorette, 2004). Le neutrophile est susceptible de majorer l'inflammation bronchique et la bronchoconstriction par plusieurs mécanismes. Le neutrophile augmente le degré d'hyperréactivité bronchique (Wegner et *al.*, 1991), la déplétion en neutrophiles chez le chien et le lapin prévient la survenue de l'hyperréactivité bronchique induite par l'exposition à l'ozone (O'Byrne et *al.*, 1984) ; Cette neutrophilie est également associée à l'interaction entre le neutrophile et l'épithélium bronchique : les sérines protéinases et les défensines induisent des lésions épithéliales, diminuent la fréquence des battements ciliaires, augmentent la sécrétion de mucus et induisent la synthèse de médiateurs comme l'IL-8 par la cellule épithéliale qui vont amplifier l'inflammation neutrophilique (Hiemstra et *al.*, 1998). L'élastase neutrophilique est un puissant sécrétagogue des cellules glandulaires et peut induire l'obstruction bronchique. Le PNN secrète aussi des médiateurs comme la métalloprotéinase 9 (MMP-9), des dérivés de l'acide arachidonique ou des médiateurs oxydatifs qui sont impliqués dans la lésion tissulaire et l'augmentation de la perméabilité épithéliale et endothéliale (Belleguic et *al.*, 2002) . L'œdème pulmonaire résultant de ce trouble de perméabilité peut contribuer à l'élévation des résistances et à la réduction du calibre bronchique (Macklem et *al.*, 1996) . Nombreux sont les auteurs qui ont mis en exergue l'implication des PNN après envenimation, En effet les constituants des venins induisent une augmentation dans le recrutement des neutrophiles au niveau de l'arbre bronchopulmonaire tels que les venins d'Aah (Adi-Bessalem et *al.*, 2008), *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus* (Abdoon et Fatani., 2009), et de *Tityus serrulatus* (Fialho et *al.*, 2011).

❖ Les lymphocytes T

Les lymphocytes T ont un rôle important dans l'initiation et le maintien de l'inflammation dans les voies respiratoires. Les lymphocytes T sont classés en quatre sous-populations (Th1, Th2, Th17 et Treg) qui au travers de leurs différent motif de libération de cytokines induisent la réponse allergique à l'asthme (figure 10). Dans l'atopie la balance penche en faveur des cellules Th2 qui libèrent des cytokines et des interleukines, IL-4, IL-5 et IL-13 (Corrigan et Kay, 1997; Kay, 2003).

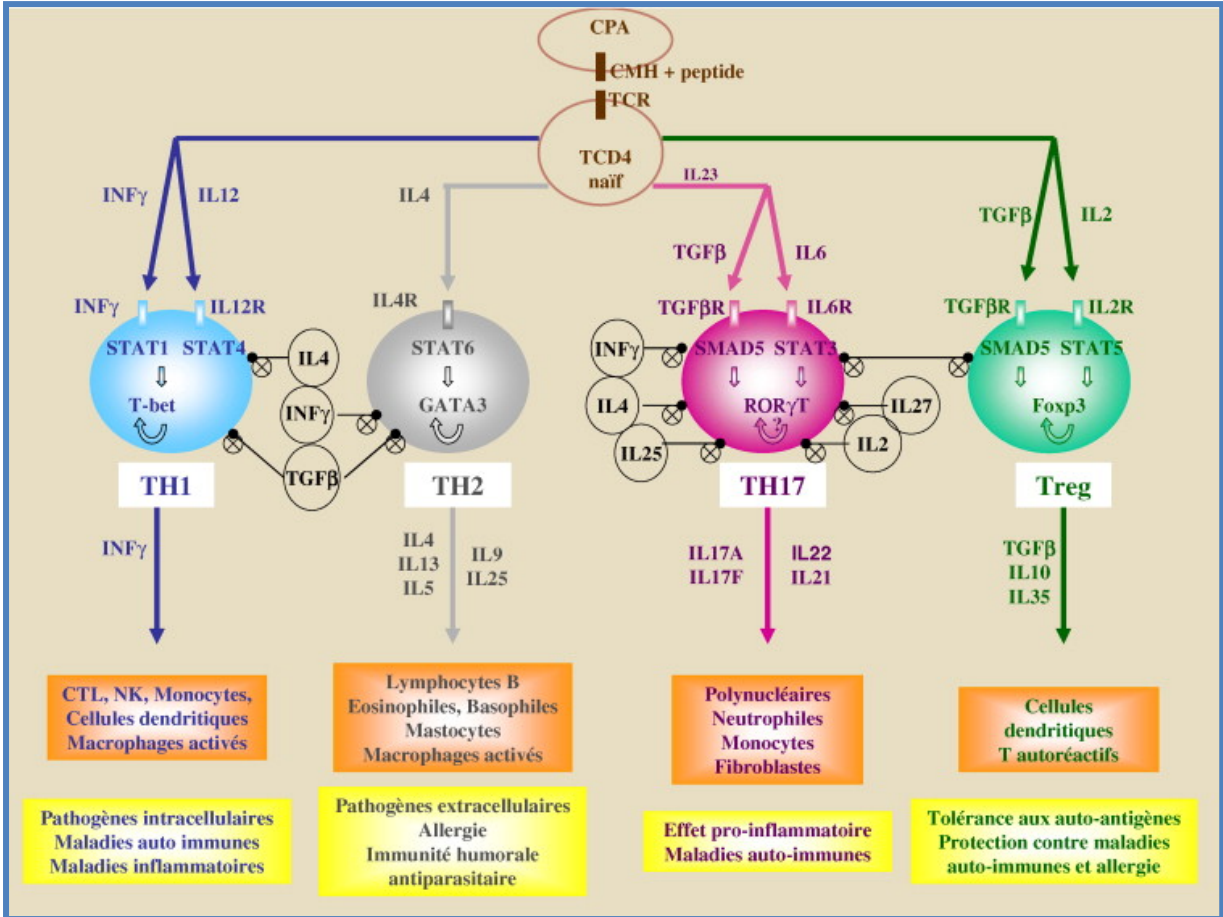


Figure 10 : Rôle des sous-populations des lymphocytes T dans la pathogénèse auto-immune et inflammatoire (Essakalli et *al.*, 2009).

L'activation du récepteur CD81 des lymphocytes T par une leucotriène la LTB₄ induit une libération de l'IL-13, cette cytokine est indispensable dans le processus de recrutements des cellules inflammatoires au sein de l'arbre bronchopulmonaire et le développement d'une réaction de type immunoallergique

La suppression de la voie de signalisation Kinase 1 et 2 des cellules T induit une réduction des pathologies allergiques des voies respiratoires, une déplétion des polynucléaires éosinophiles pulmonaires ainsi qu'une régression des taux de cytokines Th2 (Ohnishi et *al.*, 2009).

De plus une étude entreprise sur un modèle murin allergique a mis en exergue l'importance des récepteurs CCR4 des lymphocytes T dans leurs migrations vers les voies respiratoires.

En effet l'utilisation de souris déficientes en récepteurs CCR4 induit une diminution des taux de cytokines proinflammatoire Th2, une réduction du nombre de polynucléaires éosinophiles activés et une réduction de mucus pulmonaires (Thottingal et *al.*, 2006).

❖ Les immunoglobulines E

Les IgE sont capables de déclencher des réactions fréquentes et qui peuvent être sévères, de type allergiques. La plupart de nos connaissances sur cette classe d'anticorps provient de recherches sur les mécanismes de certaines allergies et sur le système immunitaire antiparasites. Le taux des IgE sériques totales est corrélé avec le développement des maladies atopiques (Sigurs et *al.*, 1994). Les venins peuvent induire la synthèse des IgE totaux ou spécifiques (de Medeiros et *al.*, 2008 ; Adi-Bessalem et *al.*, 2011).

❖ Histamine

L'histamine est synthétisée par décarboxylation de l'histidine par la L-histidine décarboxylase. Elle est stockée dans les granules des mastocytes et des basophiles ; en plus grande quantité dans les mastocytes (3–6 pg) que dans les basophiles (1–2 pg). Il a été récemment montré que les lymphocytes T, en particulier les lymphocytes Th2, et les cellules dendritiques expriment l'histidine décarboxylase et que l'histamine produite peut agir par un mécanisme autocrine et paracrine sur la différenciation de ces cellules immunocompétentes et la prolifération des lymphocytes T (Szeberenyi et *al.*, 2001).

Par ailleurs, l'expression et l'activité de l'histidine décarboxylase sont augmentées en présence d'IL-4, GM-CSF, IL-3, IL-1 α , IL-12, IL-18 et TNF α suggérant une régulation cytokine-dépendante de la synthèse d'histamine par ces cellules (Adkis et *al.*, 2003). L'obtention de lignées de souris knockout pour le gène de l'histidine décarboxylase a permis de confirmer le rôle de l'histamine dans des modèles de pathologies allergiques mais aussi son effet inhibiteur sur le recrutement des neutrophiles et la défense antibactérienne dans un modèle de péritonite à *Escherichia coli* (Ohtsu et *al.*, 2003).

De plus, ces lignées ont permis de révéler le rôle régulateur de l'histamine dans l'ostéof ormation ; les souris knockout pour le gène de l'histidine décarboxylase étant protégées de la perte osseuse induite par une ovariectomie (Fitzpatrick et *al.*, 2003).

Cette bioamine est libérée lors du processus de dégranulation des mastocytes ou des basophiles, ou produite par les lymphocytes T et les cellules monocytaires/dendritiques, est inactivée en quelques minutes principalement par méthylation (50– 80 %) via l'histamine N-méthyl-transférase et à un moindre degré, par oxydation (20–50 %) via la diamine oxydase (Adkis et *al.*, 2003). L'histamine agit sur quatre types de récepteurs membranaires spécifiques (H1, H2, H3 et H4) (Devillier, 2003). Les récepteurs H1 sont très largement exprimés dans l'organisme aussi bien au niveau du système nerveux central qu'au niveau des organes périphériques. Dans le contexte des réactions inflammatoires allergiques, la stimulation des récepteurs H1 par l'histamine provoque une vasodilatation et une extravasation des protéines plasmatiques, la contraction des muscles lisses bronchiques, une hypersécrétion de mucus et une stimulation des terminaisons nerveuses sensibles.

Plusieurs études en mis en exergue le rôle de l'histamine dans les mécanismes inflammatoires induit par les venins. En effet le venin de *Buthus martensi Karch*, ainsi que celui de *Loxosceles intermedia* induisent une augmentation des taux d'histamine après envenimation expérimentale (Liu et *al.*, 2007 ; Rattmann et *al.*, 2008).

❖ Les cytokines

Les cytokines sont des messagers qui régulent et orchestrent le développement et la nature de la réponse immunitaire. Il est maintenant bien établie que les cytokines jouent un rôle important dans la physiopathologie de l'asthme (Finkelman et *al.*, 2010). La surexpression pulmonaire de l'IL-4 est associée à une infiltration tissulaire par des macrophages, éosinophiles, lymphocytes et neutrophiles.

De façon similaire, la surexpression d'IL-13 entraîne une augmentation du nombre de macrophages et d'éosinophiles dans le tissu pulmonaire, alors que celle d'IL-5 est caractérisée par une augmentation du nombre d'éosinophiles uniquement (Bachoual et Boczkowski, 2005). Les taux et l'expression de nombreuses cytokines sont augmentés chez les patients atteints d'allergie respiratoire, ainsi une augmentation significative des taux d'IL-1, d'IL-2, d'IL-4, d'IL-5, d'IL-6, d'IL-13, du récepteur soluble de IL-2 (sIL-2R), du GM-CSF, du SCF et du TNF α a été observée dans le liquide bronchopulmonaire des malades atteints d'asthme allergique (Humbert et Garcia, 2003 ; Thottingal *et al.*, 2006).

La souris délétée pour le gène de l'IL-4 et immunisée avec un allergène ne présente pas d'hyperréactivité après une provocation allergénique, ce qui souligne le rôle de cette cytokine dans l'hyperréactivité des voies aériennes observée dans l'asthme (Brusselle *et al.*, 1994 ; Hamelman *et al.*, 2000). L'effet de l'IL-4 est lié probablement à son action sur la maturation des lymphocytes vers un phénotype Th2. Des études ont examiné l'effet d'une provocation allergénique chez des souris présentant la surexpression d'une cytokine déterminée. Ainsi, la surexpression de GM-CSF potentialise l'éosinophilie induite par une provocation allergénique chez des souris immunisées. (Stampfli *et al.*, 1999). Des résultats similaires sont observés suite à la surexpression de l'IL-9 caractérisé par le recrutement des polynucléaires éosinophiles au niveau du site inflammatoire. Les constituants du venin d'*Androctonus australis hector* et de *Tityus serrulatus* induisent une augmentation des taux sériques des cytokines notamment le TNF α , IL-6 et IL-10 (Hammoudi-Triki *et al.*, 2004 ; Adi-Bessalem *et al.*, 2008 ; Fialho *et al.*, 2011).

Les radicaux libres

Les radicaux libres sont produits par un grand nombre de mécanismes tant endogènes qu'exogènes. La mitochondrie est la source de production majeure d'O $^{2-}$ dans la cellule. Dans les conditions physiologiques, la formation de ce radical est liée à l'activité physique et par là même à l'intensité d'oxygénation (Figure 11). Cette production peut également s'intensifier lorsqu'interviennent des désordres mitochondriaux génétiques, inflammatoires ou nutritionnels. L'inflammation est par ailleurs une source importante de radicaux oxygénés produits directement par le complexe enzymatique NADPH oxydase des cellules phagocytaires activées. Ce mécanisme lorsqu'il est contrôlé est capital dans la lutte anti-infectieuse car il permet la phagocytose des bactéries et des corps étrangers.

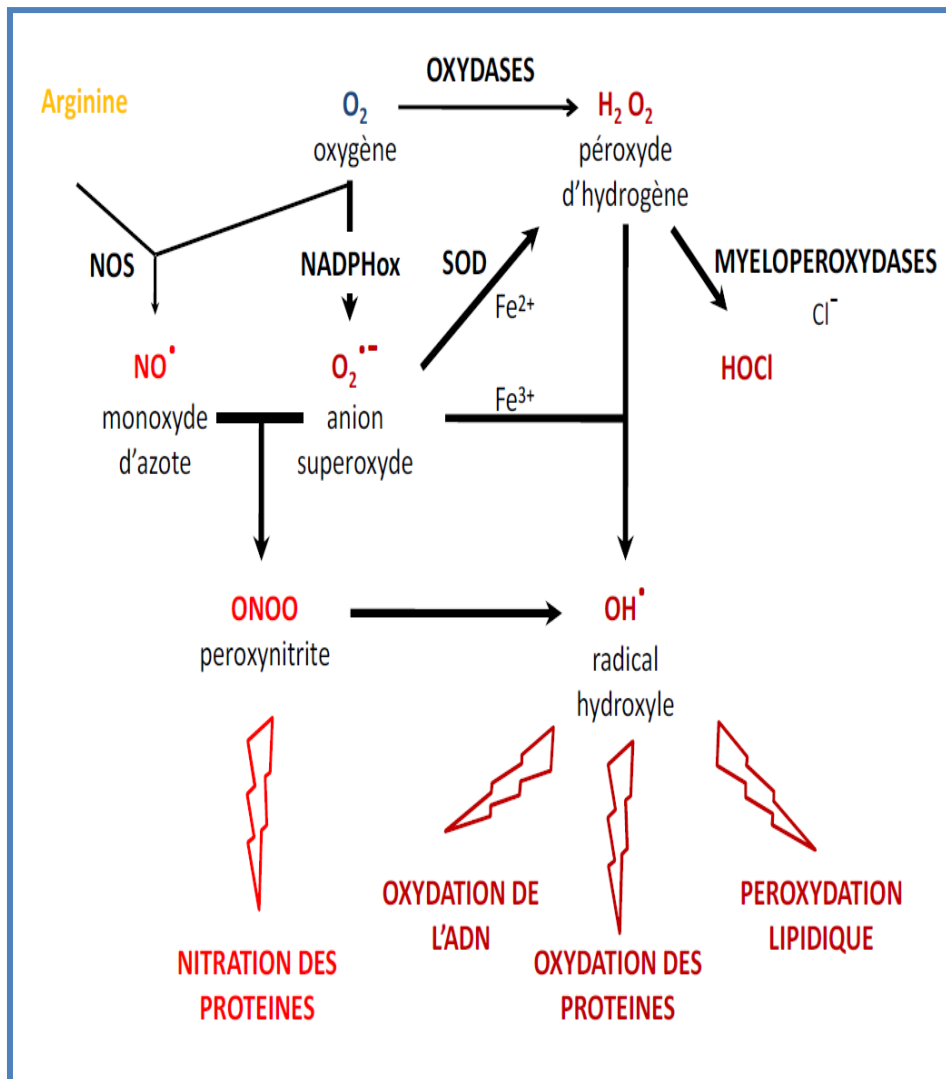


Figure 11 : Les espèces réactives de l'oxygène et l'azote
(Afonso et al., 2007)

De plus les cellules inflammatoires et immunes peuvent produire des cytokines comme le TNF- α qui est capable de produire des radicaux libres par les mitochondries des cellules cible. L'implication du NO dans l'inflammation de type allergique a été mise en évidence (Tetu et *al.*, 2007). En effet en présence d'O₂⁻, le NO métabolisé en anion peroxy-nitrite est une cause d'hyperréactivité bronchique. Ainsi la production en excès de NO résultant de l'expression de la NOS inducible par les cellules inflammatoires des voies aériennes a une double signification. D'une part, l'excès de NO dans l'arbre bronchopulmonaire est considéré comme un reflet de l'inflammation pulmonaire, d'autre part, le NO constitue une source d'agression directe du tissu pulmonaire par le stress oxydatif qu'il induit (Riccioni et *al.*, 2012 ; Bahna, 2012). L'envenimation induit une production intense de radicaux libres. En effet, les venins d'*Androctonus australis hector*, *Tityus serrulatus*, de *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*, de *Crotalus durissus terrificus* et de *Bothrops* induisent une production accrue du monoxyde d'azote (NO) (Zallen et *al.*, 1998 ; Petricevich et Pena, 2002 ; Picolo et Cury, 2004 ; Abdoon et Fatani, 2009 ; Raouraoua-Boukari et *al.*, 2012).

I-7- Traitement de l'envenimation scorpionique

Le traitement de l'envenimation scorpionique préconisé actuellement pour réduire les effets physiopathologiques de l'envenimation est l'immunothérapie associée à des traitements symptomatiques.

I-7-1- Traitements symptomatiques

Le traitement symptomatique varie selon l'état de gravité de la piqure, il a pour but de corriger les différents désordres et à atténuer les manifestations cliniques installées après envenimation, tels que la douleur, l'hypertension artérielle, l'hyperthermie, la bradycardie, la tachycardie et les vomissements. Ils sont principalement constitués des antalgiques, des anticonvulsants (Barbituriques et Diazépam), les antipyrétiques, l'oxygénation, les vasodilatateurs, les anti-inflammatoires, les anticholinergiques (Atropine), l'insuline, antihistaminiques (Prolamine, Théralène et Phenergan) (Ismail., 1995) et l'héparine pour la prévention de la thrombose veineuse profonde.

I-7-2- Immunothérapie

La sérothérapie a été découverte en 1985 par Calmette (Hawgood, 1999 ; Calmette, 1984) et elle reste le seul traitement spécifique de l'envenimation scorpionique et ophidienne (Laraba-Djebari et Hammoudi-Triki, 1998 ; Murthy et *al.*, 1992; Krifi et *al.*, 1999 ; 2001 ; Lalloo et Theakston, 2003).

En Algérie, le protocole expérimentale adopté consiste à immuniser des chevaux avec la fraction toxique (Ftox-G-50) d'*Androctonus australis hector*, dans le but d'améliorer la spécificité de l'antivenin et par conséquent l'augmentation de la capacité neutralisante (Laraba-Djebari et Hammoudi-Triki, 1998). Cependant, les différences pharmacocinétiques entre le venin et les antivenins peuvent diminuer l'efficacité de l'immunothérapie (Ismail, 1998 ; Abroug et *al.*, 1999 ; Hammoudi-Triki et *al.*, 2007). Plusieurs approches ont été élaborées pour améliorer le traitement antivenimeux. La détoxification des toxines et la synthèse chimique des toxines de venins dépourvus de toxicité ont été envisagées pour une meilleure efficacité des antivenins (Kharat et *al.*, 1997 ; Alvarenga et *al.*, 2002).

Une autre voie d'approche a consisté en une production d'anticorps recombinants (Aubrey et *al.*, 2004), les anticorps recombinants présentent des propriétés pharmacocinétiques très intéressantes, mais leur stabilité et capacité neutralisante reste insuffisante.

Plus récemment Hmila et collaborateurs (2010) ont mis au point une nouvelle génération d'antisérums plus performants, plus spécifiques et surtout plus légers, les « nanobodies » (Nb). Le principe de synthèse des nanobodies consiste à faire une immunisation classique à des chameaux soit avec la fraction toxique G50 ou avec la toxine AahI ou bien les deux en même temps par la suite le sang périphérique des chameaux est récupéré, les lymphocytes sont alors isolés pour récupérer leurs ARNm et après une succession d'étapes de génétiques et de protéomiques, les auteurs ont réussi à produire des nanobodies d'un poids moléculaire de 15kDa. Le faible poids moléculaire des Nb (15kDa) leur confère une diffusion plus rapide au niveau du compartiment vasculaire et une augmentation des capacités neutralisantes. L'utilisation de toxines modifiées par l'irradiation gamma dans la préparation des anticorps neutralisants a été également abordée. En effet, l'immunisation d'animaux avec le venin d'*Androctonus australis hector* irradié avec des rayons gamma (2KGy) a permis d'obtenir des immunsérums ayant une meilleure capacité neutralisante des (Boussag-Abib et Laraba-Djebari, 2011).

II- Matériels et Méthodes

II-1- Matériel

II-1-1- Matériel biologique

I-1-1-1- les animaux

Les souris de race *NMRI* ($20 \pm 2g$) sont fournies par l'animalerie de la Faculté des Sciences Biologiques (FSB) de l'USTHB.

I-1-1-2- le venin

Le venin d'*Androctonus australis hector* (Aah) est fourni par le laboratoire de Recherche et de Développement sur les Venins de l'institut Pasteur d'Algérie (IPA).

II-1-2- Matériel non biologique

II-1-2-1- les produits chimiques

Tous les réactifs sont de qualité analytique et proviennent de plusieurs firmes :

Acétate de sodium (Merck), Acide chloridrique (Panreac), Acide sulfurique (Merck), Alcool (Panreac), Bicarbonate de sodium, Bisacrylamide (Merck), Carbonate de sodium, Chlorure de sodium, Dihydrogénophosphate de potassium, Dipotassium hydrogénophosphate, Eau oxygéné (Merck), Eukit (Fluka), Eosine B (Sigma), Glycine (Merck), Hématoxyline (Sigma), Hydroxyde de sodium (Prolabo), O Diazinidine (sigma) O-Phénylén Diamine OPD (Sigma), Paraffine (Panreac), Pepsine (Sigma), Sulfate d'ammonium (Merck), TEMED, Tris HCl (sigma), Tween-20 (Pharmacia), Aluminium hydroxyde (Pharmacia), Eau oxygénée (Sigma), Eukit (Fluka), HCl (Prolabo), Ovalbumine (Fluka), Paraffine (Biotrol), Triton X-100 (Sigma), Xylène carbonate et bicarbonate de sodium (Biocrom), EDTA, Ethanol, Formol, (Gifrer, Barbzat), Lactate Déshydrogénas (LDH) (SPINREACT), Acide citrique (Merck), Eosine (Fluka), Hématoxyline (Fluka), Compound 48/80 (Sigma).

II-2- Méthodes

Le travail que nous avons entrepris consiste d'une part, à mettre en évidence les marqueurs cellulaires et moléculaires responsables du phénomène de bronchoconstriction après envenimation des souris avec le venin d'Aah. D'autre part, afin de montrer l'implication des mastocytes dans l'inflammation bronchopulmonaire induite par le venin d'Aah, des séries expérimentations ont été réalisées sur des lots de souris en présence d'activateurs spécifique (composé 48/80).

Enfin, une étude comparative de l'immunoréactivité induite par le venin d'Aah avec un modèle murin allergique a été réalisée. La structure histologique du parenchyme pulmonaire en présence et en absence du composé 48/80 a été également examinée.

Les sérums des différents lots de souris sont récupérés après une centrifugation du sang total à 3700 rpm pendant 20 min, puis aliquotés et conservés à -20 °C afin de doser les paramètres inflammatoires. Les poumons sont également prélevés soigneusement et immergés dans un fixateur en vue de réaliser une étude histologique. Les autres poumons sont homogénéisés dans du tampon tris HCL triton X 100 grâce à un broyeur. Après centrifugation pendant 30 minutes à 6 000 rpm, les surnageants sont récupérés et stockés pour la réalisation des dosages de marqueurs inflammatoires (Figure 12).

II-2-1- Analyse des marqueurs inflammatoires induits par le venin d'Aah

II-2-1-1- Dosage de la peroxydase éosinophile

Le dosage de la peroxydase éosinophile à partir des poumons, permet de mettre en évidence la séquestration des polynucléaires éosinophiles, dans le tissu pulmonaire. C'est un marqueur de l'infiltration des éosinophiles dans l'arbre broncho-pulmonaire. L'EPO catalyse la formation des radicaux libres d'oxygène ou de bromure. Ces radicaux libres sont extrêmement instables et oxydants ce qui explique l'activité bactéricide et cytotoxique attribuée à l'EPO. La technique utilisée est celle de Van Osterhout (1993). Les poumons soigneusement prélevés et stockés à -20°C, sont broyés dans un tampon Tris-HCl 0,05 M pH 8, Triton X 100 0,1%, à 4°C. Les homogénats obtenues sont centrifugés à 10 000 g pendant 10 minutes. Les surnageants sont récupérés puis conservés à 4°C.

Dans une microplaque, 50 µl de chaque surnageant sont répartis en duplicates. Après addition de 100 µl de solution tampon Tris-HCl 0,05 M pH 8, contenant l'O-Phénylènediamine Dihydrochloride (OPD) (20 mg) et 4 mM du H₂O₂, la microplaque est mise en incubation pendant 1 heure à 37°C. L'évaluation de l'activité enzymatique est réalisée après la lecture de l'absorbance à l'aide d'un lecteur de plaques à 490 nm /100mg de tissu.

II-2-1-2- Dosage de l'activité de la myéloperoxydase

Le dosage de la myéloperoxydase (MPO) permet de mettre en évidence la séquestration des neutrophiles dans le tissu pulmonaire et au niveau sérique caractéristique d'une réaction inflammatoire. L'activité enzymatique de la MPO est quantifiée selon la méthode de Straus (1958) modifiée. Les poumons sont soigneusement prélevés et stockés à -20°C et repris dans un tampon Tris-HCl 0,05M, pH 6,6 à 4°C avec une dilution 1/20^{ème} pour chaque poumon. Une homogénéisation et une centrifugation à 10 000 g pendant 30 min à 4°C sont réalisées. Le premier surnageant (S1) est récupéré et stocké à 4°C, les culots sont repris pour les soumettre à des séries de congélation (-20 °C) décongélation, puis repris dans 1 ml de tampon Tris-HCl 0,05M, pH 6,6 suivie d'une seconde centrifugation à 10 000 g pendant 30 min à 4°C. Le deuxième surnageant (S2) est additionné au premier (S1). Chaque mélange (S1+S2) est dilué au 1 /10, auquel est ajouté le substrat chromogène O-Dianizidine (0,167 Mm O-Dianizidine préparé dans 10 ml de tampon Tris-HCl 0,05M, pH 6,6 et 4 mM du H₂O₂ dans un rapport volume à volume. L'évaluation de l'activité enzymatique est réalisée après la lecture de l'absorbance à l'aide d'un spectrophotomètre à 460 nm. Les résultats sont exprimés en unité de densité optique (UDO /100 mg de tissu).

II-2-1-3- Détermination de l'index pulmonaire

L'index pulmonaire (IP) permet d'évaluer l'œdème au niveau pulmonaire, il est calculé selon la formule suivante : poids du poumon (g) x 100/ poids des souris en (g).

II-2-1-4- Détermination de la teneur en eau pulmonaire

Cette technique permet de mettre en évidence la perméabilité vasculaire, calculée par le rapport des poids humides et le poids sec pulmonaire.

Le poids humide est déterminé après prélèvement des poumons et le poids sec après incubation des poumons à 60°C pendant 48 h (Ipktchi *et al.*, 2006).

II-2-1-5- Dosage du monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote (NO) joue un rôle clé dans les mécanismes physiologiques (Moncada *et al.*, 1991). Dans un état pathologique, comme une inflammation (Curzen *et al.*, 1994), la production du NO est augmentée (Navarro-Gonzalvez *et al.*, 1998).

La mesure du monoxyde d'azote a été faite suivant le protocole optimisé par Navarro-Gonzalvez (1998). Les échantillons (300 µl) sont récupérés et soumis à une déprotéinisation en présence de 250 µl de ZnSO₄ à 75 mmol/l puis une centrifugation pendant 1 min à 10 000g. Après récupération des surnageants, 350 µl de NaOH 55 mmol/l sont ajoutés et mis à centrifuger pendant 3 min à 10 000 g. Les surnageants sont dilués en ajoutant 250 µl du tampon glycine (4 g/l, pH 9,7). L'activation du cadmium a consisté à mettre des granules de cadmium (2-2,5g) dans de l'eau distillée puis dans une solution de CuSO₄ et un tampon glycine-NaOH (15 g/l, pH 9,7) pendant 5 min. Une fois les granules de cadmium actives, elles sont mises en contact avec les échantillons déprotéinés. Une courbe d'étalonnage des nitrates (0-100 µmol/l) est réalisée.

II-2-1-6- Dosage du peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) est mesuré par la méthode de l'oxydation catalytique du rouge phénol par la peroxydase de raifort (HRP). Les échantillons sont déposés en duplicates dans une microplaque de 96 puits et 100µl d'une solution de rouge phénol (eau physiologique ; 5,5 mM D-glucose et 5,5 mM HRP) sont ajoutés. Après une heure d'incubation à 37°C, la réaction est arrêtée par l'ajout de 10 µl de NaOH 1 M dans chaque puits. La détermination de l'absorbance est effectuée à l'aide d'un lecteur ELISA à une longueur d'onde de 630 nm.

II-2-1-7- Etude qualitative et quantitative des constituants du sang périphérique

La numération des cellules inflammatoires, des globules rouges, de l'hémoglobine, de l'hématocrite et des plaquettes au niveau du sang périphérique des animaux est effectuée par un automate hématocytomètre.

II-2-1-8- Dénombrement cellulaire au niveau du liquide bronchopulmonaire

Les animaux sont sacrifiés par dislocation cervicale, une incision est réalisée pour introduire un cathéter dans la trachée. On procède alors à l'aide d'une seringue à des lavages par injection intra-trachéale d'une solution d'eau physiologique avec un volume de 1 ml, la numération des cellules est réalisée grâce à un hématocytomètre.

II-2-2- Détermination des concentrations sériques des immunoglobulines

➤ Dosage des concentrations sériques des immunoglobulines G (IgG)

La quantification des IgG est réalisée sur les échantillons sanguins prélevés après envenimation des souris, à des intervalles de temps de : 1, 4, 6, 24 et 48 heures.

Une microplaque est sensibilisée avec le venin d'Aah à 5 µg/ml dans un tampon carbonate/bicarbonate 0,1 M ; pH 9,5 à raison de 100 µl par puits, pendant une nuit à 4 °C.

Après 4 lavages avec le tampon PBS 0,1 M, pH 7,4 ; 0,1 % Tween 20, la saturation des sites non spécifiques est réalisée avec une solution de PBS 0,1M plus lait écrémé 5 %, à raison de 50 µl/puits, pendant 1h à 37°C. Une série de lavage avec le tampon PBS-Tween 20 est suivie d'une répartition des échantillons sériques à tester. Après une incubation de 1 h et 30 min à 37°C et suivie de 4 lavages tampon PBS-Tween 20, le conjugué : Anticorps anti-IgG (IgG1 et IgG2) est réparti à raison de 50 µl/puits préalablement dilué au 1/1000. La réaction est incubée pendant 1 heure à 37°C. Les lavages au PBS-Tween 20 (0,1%), une solution de tampon phosphate 0,01 M ; pH 7,4 est ajoutée, contenant 20 mg d'O-Phénylène Diamine dihydrochloride (OPD) et 10 µl d'H₂O₂. Les mesures de l'absorbance sont réalisées à 490 nm.

➤ Dosage des concentrations sériques des immunoglobulines E (IgE)

Le dosage sérique des IgE totales a été effectué par l'automate (Mini VIDAS), qui utilise une technique Immuno-enzymatique de type ELISA.

II-2-3- Etude du rôle de l'activation des mastocytes après envenimation

Pour mettre en évidence la réponse inflammatoire de type allergique induit par le venin d'*Androctonus australis hector*, les animaux sont traités avec le composé 48/80 avant envenimation expérimentale. Une comparaison des taux sériques de la MPO, l'EPO et du NO après envenimation en absence et en présence du prétraitement a été réalisée. L'évaluation de l'index pulmonaire et le dénombrement des cellules inflammatoires au niveau du liquide bronchopulmonaire (BAL) ont été également réalisés (Figure13).

II-2-4- Comparaison de l'immunoréactivité induit par le venin avec un modèle murin allergique

Un modèle allergique expérimentale a été mis au point grâce à une sensibilisation des animaux à l'ovalbumine (OVA). Le protocole a consisté à injecter par voie intrapéritonéale une solution d'ovalbumine avec des rappels, Les souris sont mises ensuite en contact avec un gaz contenant 3% d'ovalbumine après le 21, 22 et le 23^{ème} jour d'immunisation. Les souris sont ensuite sacrifiées au 25^{ème} et les sérums sont récupérés pour le dosage de la MPO, l'EPO et des IgE et les poumons sont soigneusement prélevés pour l'estimation de l'index pulmonaire.

II-2-5- Etude des modifications tissulaires du poumon après envenimation scorpionique (Aah) en absence et en présence de prétraitements

➤ Analyse histologique

L'examen histologique des organes d'animaux envenimés permet de mettre en exergue les différentes altérations tissulaires induites par le venin d'*Aah*, Les poumons proviennent des lots de souris envenimées par voie sous-cutanée (10 µg/20g) et prétraitées avec le composé 48 /80 avant envenimation. Les tissus prélevés sont soumis à différentes étapes :

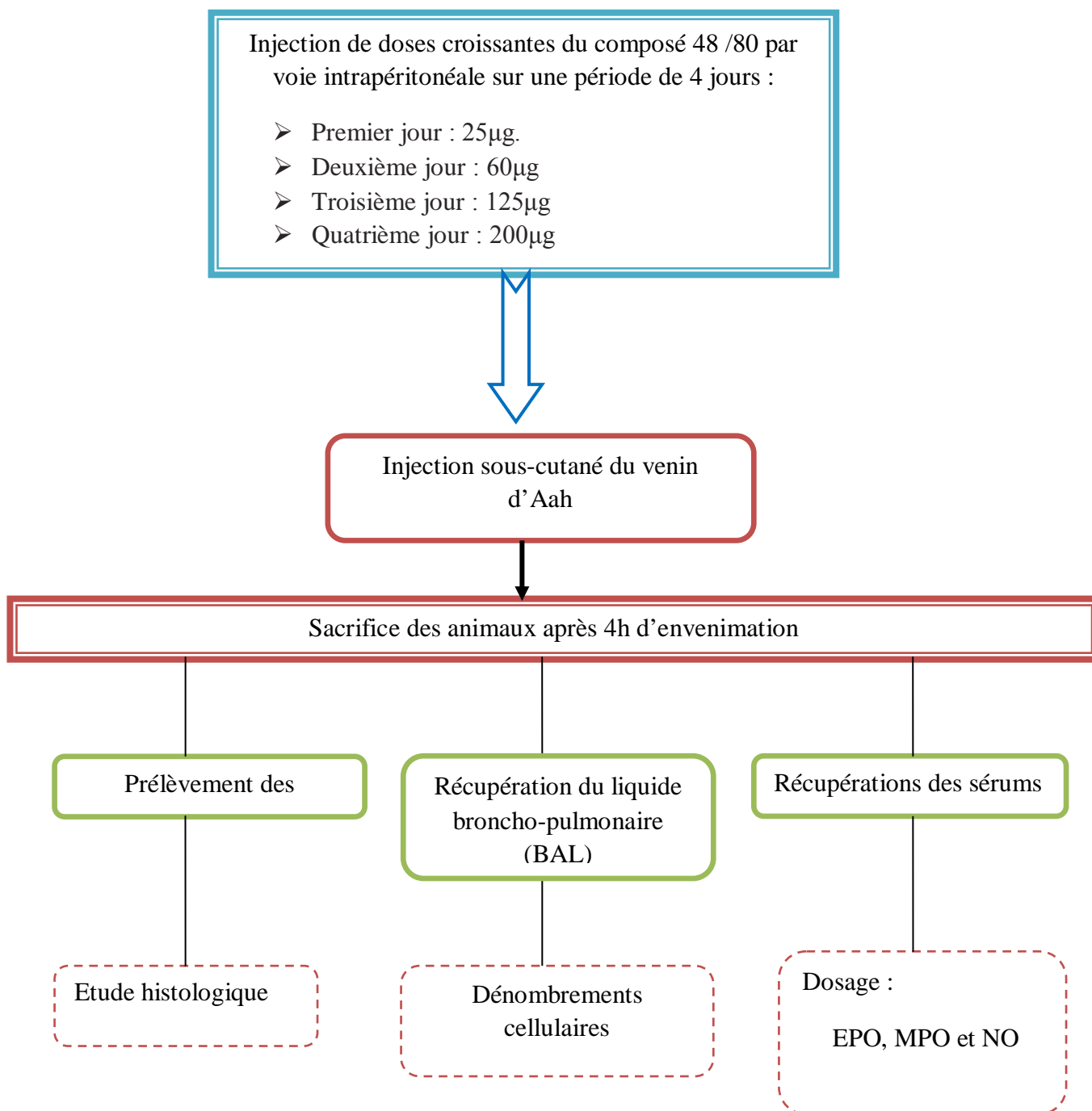


Figure 13 : Deuxième démarche expérimentale

Fixation

Les poumons sont soigneusement prélevés puis plongés dans une solution de fixation de formol à 10%.

Déshydratation et éclaircissement

Après fixations les poumons subissent une série de bains d'éthanol de degrés croissants (70°-90°-100°), suivie d'un éclaircissement avec 3 bains de xylème, pendant 10min.

Imprégnation et inclusion

Les poumons sont imprégnés dans la paraffine fondue à 60°C pendant 2 heures.

Préparation des coupes et coloration

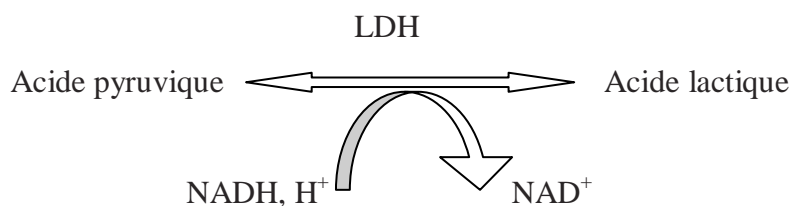
Les blocs de poumons sont coupés à l'aide d'un microtome, puis étalées sur des lames et incubées au minimum 2 heures à 60°C ensuite une réhydratation est effectuée par deux bains de xylème et trois bains d'alcool absolu et un bain d'eau de robinet. Les coupes sont colorées à l'hématoxyline-Eosine (HE).

Après coloration, les coupes sont montées entre lame et lamelle avec une résine (Eukit), les observations et prise de photos sont faites à l'aide d'un microscope plus appareil photos (MOTIC).

II-2-6- Dosage de la LDH, marqueur de lésion tissulaire

Le dosage du lactate Déshydrogénase (LDH) est réalisé au niveau du sérum et de l'homogénat de poumons récupéré après envenimation des souris par 10 µg/mg du venin d'Aah.

Le LDH catalyse la réduction du pyruvate en lactate avec oxydation du NADH, H* selon la réaction suivante :



La vitesse de l'oxydation du NADH, H^+ est proportionnelle à l'activité catalytique de l'enzyme. Cette réaction directe est déterminée par la mesure de la diminution de l'absorbance à 340 nm.

II-2-7- Expression statistique des résultats

Tous les résultats ont été exprimés en moyenne \pm écart-type. Une analyse de comparaison de moyenne selon le test d'*ANOVA* a été effectuée.

- $P < 0,05$ significatif « * »
- $P < 0,01$ très significatif « ** »
- $P < 0,001$ hautement significatif « *** »

III- Résultats et Discussion

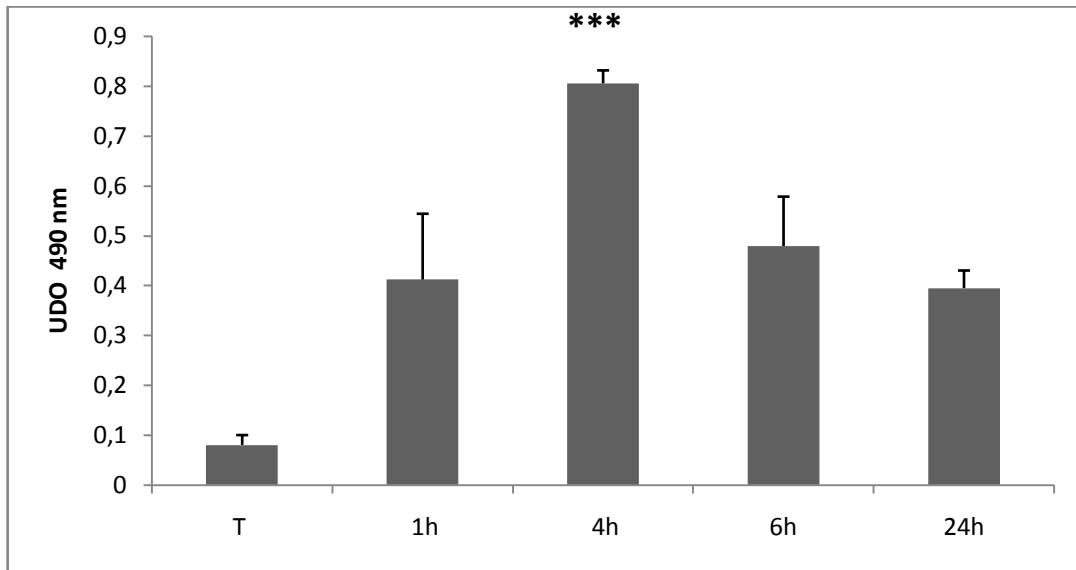
III-1- Analyse de l'hyperréactivité bronchopulmonaire induits par le venin d'Aah

L'œdème aigu du poumon représente la cause principale de décès après envenimation scorpionique. Les études cliniques et expérimentales suggèrent l'implication de l'augmentation de la perméabilité vasculaire pulmonaire dans la genèse de cette perturbation. Cette augmentation est due à l'action des médiateurs inflammatoire secrétés par les leucocytes (Sami-Merah et *al.*, 2009). Le poumon est très sensible à l'action des constituants du venin.

III-1-1- Détermination de l'activité de la peroxydase éosinophile sérique et pulmonaire

Ces types de granulocytes sont associés aux infections parasitaires et aux manifestations allergiques. L'éosinophile est une cellule effectrice capable de libérer des protéines basiques cytolytiques, la Major Basic Protéine (MPB), l'Eosinophil Protein Cationic (EPC), la neurotoxine dérivée de l'éosinophile (EDN) et La peroxydase de éosinophile (EPO) (Capron et *al.*, 2002). La peroxydase éosinophile (EPO) est un marqueur de l'infiltration des polynucléaires éosinophiles (PE). Cette protéine est constituée de deux sous-unités de 12,7 et 53 kDa qui catalyse la formation de radicaux libres de bromures ou d'oxygène à partir du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Ces radicaux libres sont instables et oxydants, responsables des activités cytotoxique et bactéricide. L'analyse de l'activité enzymatique de l'EPO a été entreprise sur les sérums puis sur les surnageants pulmonaire des lots de souris envenimées avec le venin d'Aah (10µg/20g). Les résultats obtenus à différents intervalles de temps ont montré une variation des taux de cette enzyme. Une élévation significative des concentrations de l'EPO (0,411 UDO ± 0,13) est observée. L'activité de la peroxydase éosinophile atteint sa valeur maximale après 4 heures d'envenimation (0,805 UDO ± 0,09) comparativement aux souris témoins (0,121 UDO ± 0,022) pour revenir aux concentrations normales, 24 heures après injection du venin (Figure 14). Le dosage de l'EPO au niveau des surnageants pulmonaires montre une augmentation significative après 4 h (2,5 UDO ± 0,113) d'envenimation. Au-delà de 4 h, l'activité de la peroxydase éosinophile diminue progressivement pour revenir à un taux basal après 24 h d'envenimation (Figure 14). Une importante séquestration des polynucléaires éosinophiles au niveau du parenchyme pulmonaire est aussi observée après envenimation avec le venin *Tityus discrepans* (D'Suze et *al.*, 2004).

A



B

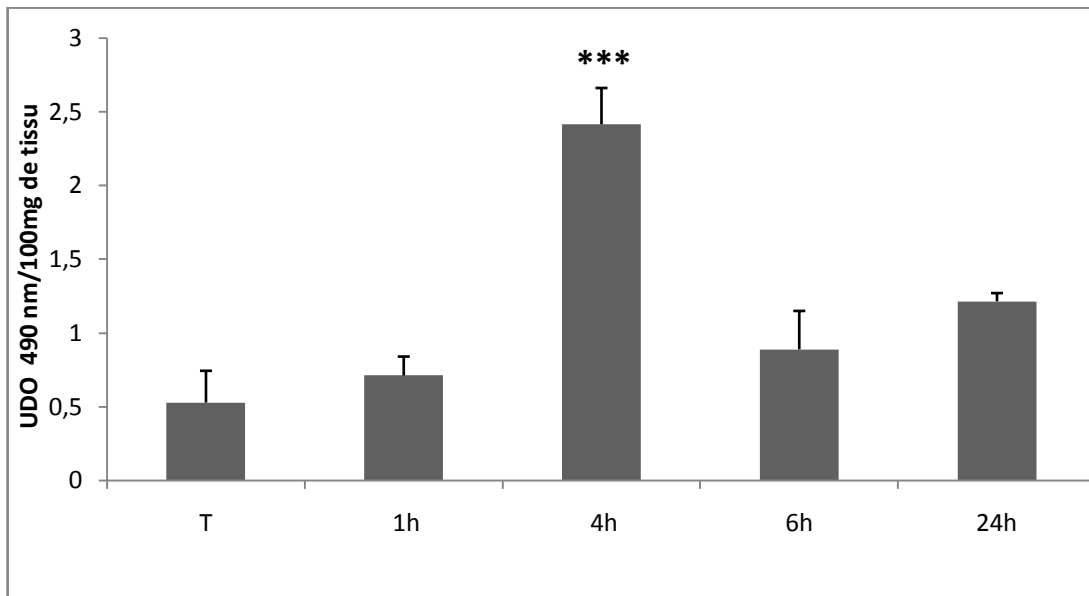


Figure 14 : Cinétique de dosage de la peroxydase éosinophile sérique (A) et pulmonaire (B) après envenimation.

III-1-2- Détermination de l'activité de la myéloperoxydase sérique et pulmonaire

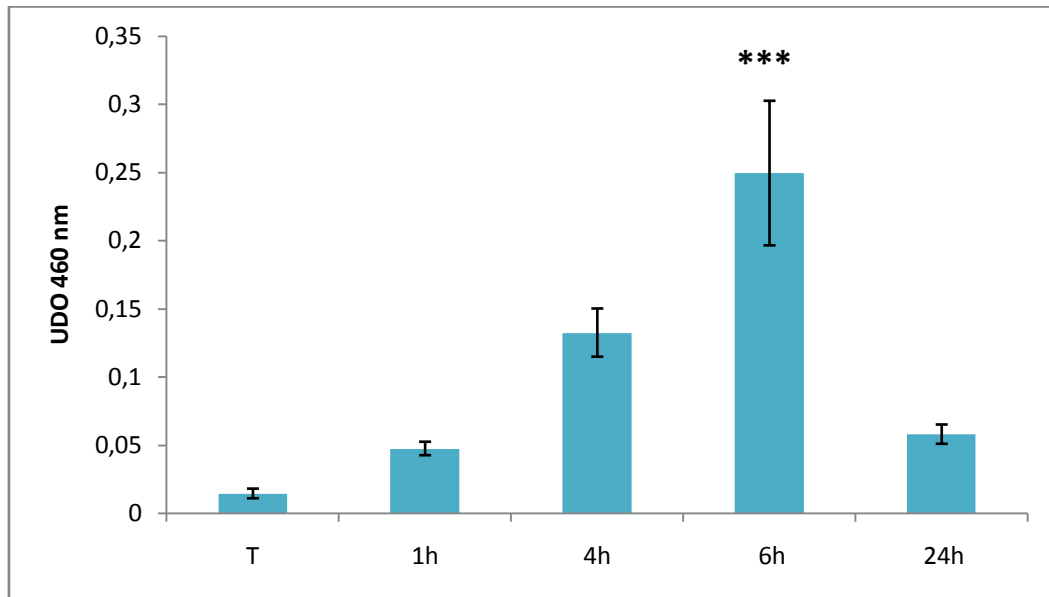
Les polynucléaires neutrophiles (PN) jouent un rôle majeur dans le processus de défense immunitaire. Récemment le neutrophile a été considéré comme un acteur majeur de la réaction inflammatoire de type allergique. En effet les auteurs suggèrent une contribution directe des PN via la libération massive de médiateurs proinflammatoires telle que l'histamine et le PAF suite à l'agrégation des récepteurs activateurs des IgG (FcγRIIIA et FcγRIVA) (Bruhns, 2012).

La myéloperoxydase (MPO) est une enzyme hémique présente en concentrations importantes ($\pm 5\%$ en poids) dans les granules primaires des cellules PN.

La myéloperoxydase est le marqueur des granulocytes neutrophiles (PN) dans les sites inflammatoires. La MPO intervient dans la seconde étape de l'explosion oxydative qui résulte de la transformation en H_2O_2 de l'anion superoxyde libéré dans le phagosome ou le milieu extracellulaire. Le peroxyde d'hydrogène peut réagir avec un métal et donner naissance à des espèces réactives de l'oxygène très oxydant. L'injection du venin d'*Aah* par voie sous-cutanée à différents lots d'animaux nous a permis d'apprécier la séquestration des polynucléaires neutrophiles au niveau pulmonaire à des intervalles de temps allant de 1h jusqu'à 24h d'envenimation. En effet, l'analyse de l'activité enzymatique de la MPO a été entreprise sur les sérums puis sur les surnageants pulmonaire des lots de souris envenimés avec le venin d'*Aah*. Les résultats obtenus, montrent une augmentation significative des concentrations sériques de l'activité de la MPO. Le taux maximal de l'activité enzymatique est observé 6 h ($0,249 \pm 0,0053$ UDO) après envenimation des animaux comparativement au souris témoins ($0,0145 \pm 0,003$ UDO) (Figure 15).

Les résultats obtenus ont permis de montrer une infiltration maximale des polynucléaires neutrophiles au niveau des voies respiratoires 6 h ($0,875$ UDO $\pm 0,035$) après envenimation des souris (Figure 15). Le taux basal des concentrations de la myéloperoxydase est atteint après 24 heures d'envenimation. Ces observations permettent de confirmer que l'envenimation scorpionique induit une infiltration des PN au niveau de l'arbre bronchopulmonaire (Yshii et al., 2009 ; Adi-Bessalem et al., 2011). Ces résultats sont également en accord avec ceux d'Abdon et Fatani (2009) après injection du venin *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus* (LQQ).

A



B

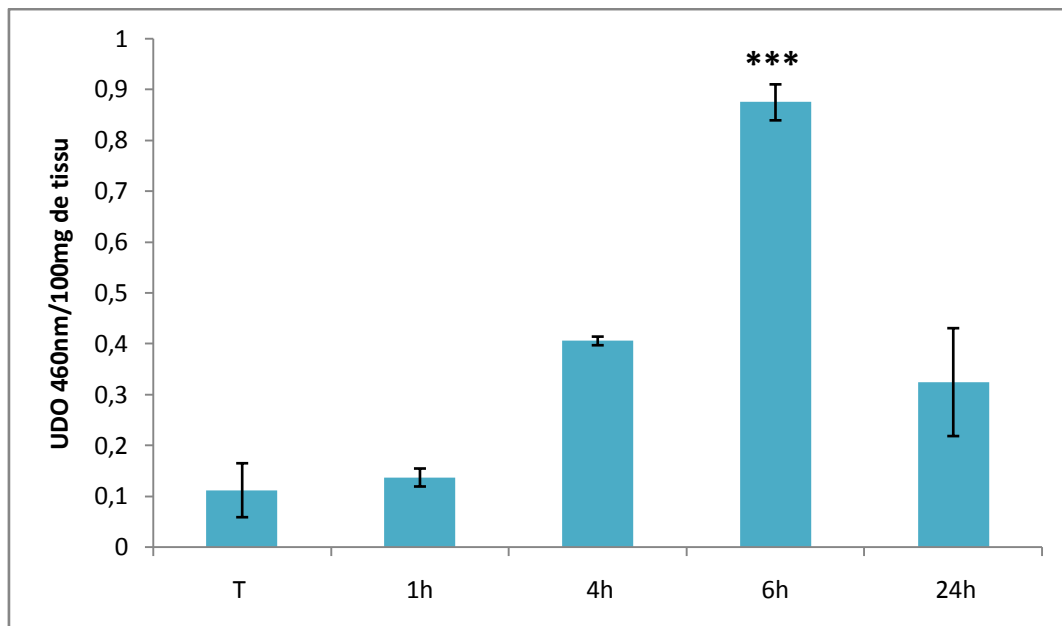


Figure 15 : Cinétique dosage de la myéloperoxydase sérique (A) et pulmonaire (B) après envenimation.

III-1-3- Détermination de l'index pulmonaire et de la teneur en eau pulmonaire

La détermination de l'index pulmonaire (IP) permet d'apprécier l'œdème pulmonaire induit après envenimation expérimentale. L'œdème pulmonaire est la conséquence de l'augmentation de la perméabilité vasculaire provoquée par les constituants des venins (Paneque Peres et *al.*, 2009).

L'injection sous-cutanée d'une dose sub létale du venin d'*Aah* a induit une augmentation significative de l'index pulmonaire, 1h après envenimation (IP = $0,88 \pm 0,03$) comparativement aux témoins (IP= $0,6 \pm 0,03$), pour atteindre un maximum 6 h (IP = $1,21 \pm 0,045$) après injection du venin suivie d'une restauration quasi-totale après 24 h d'envenimation ($0,875 \pm 0,028$) (Figure 16). Les souris envenimées présentaient des signes cliniques pouvant mettre en jeu leur pronostic vital dès les premières minutes de l'envenimation, se manifestant par des troubles respiratoires conséquence à la formation des œdèmes hémorragiques pulmonaires observées après autopsie.

Parallèlement à la détermination de l'index pulmonaire, la teneur en eau pulmonaire a été évaluée tout au long de la cinétique d'envenimation. L'augmentation significative de la teneur en eau pulmonaire est observée chez les souris envenimées après 1h d'envenimation ($7,98 \pm 1,3$) comparativement aux souris témoins ($2,66 \pm 1,64$), suivie d'une légère restauration après 24 h d'envenimation ($6,3 \pm 1,01$) (Figure 17). Cette variation de la teneur en eau est probablement due à l'apparition d'œdème au niveau de l'arbre bronchopulmonaire consécutive à l'effet direct et/ou indirect des constituants du venin d'*Aah*. Ces résultats sont en accord avec ceux de Sami-Merah et collaborateurs (2009).

Les résultats obtenus montrent clairement que l'envenimation scorpionique provoque une induction précoce d'un œdème pulmonaire conséquence de l'infiltration des cellules inflammatoires et d'une sécrétion importante de médiateurs inflammatoires. En effet le rôle important des marqueurs inflammatoires telle que les PGs, les LTs et le PAF dans la pathogénèse de l'œdème pulmonaire après envenimation a déjà été rapporté (Matos et *al.*, 1999 ; Havet et *al.*, 2001 ; Coelho et *al.*, 2007 ; Figueiredo et *al.*, 2008).

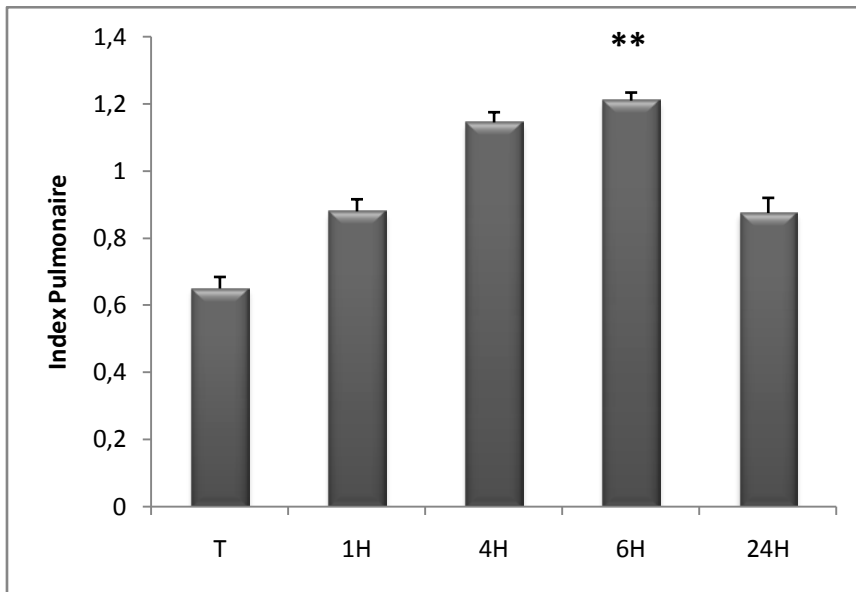


Figure 16 : Cinétique de variations des index pulmonaires induits par le venin d'Aah.

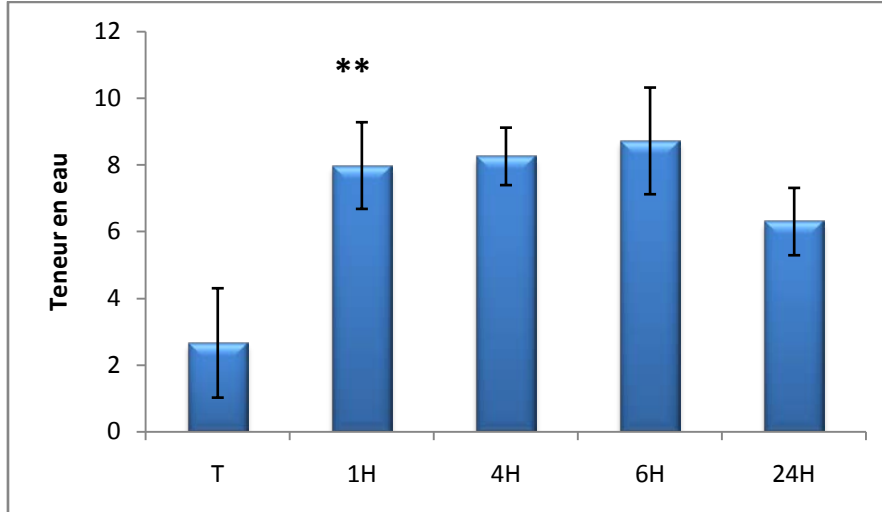


Figure 17 : Cinétique de variations de la teneur en eau pulmonaire induit par le venin d'Aah.

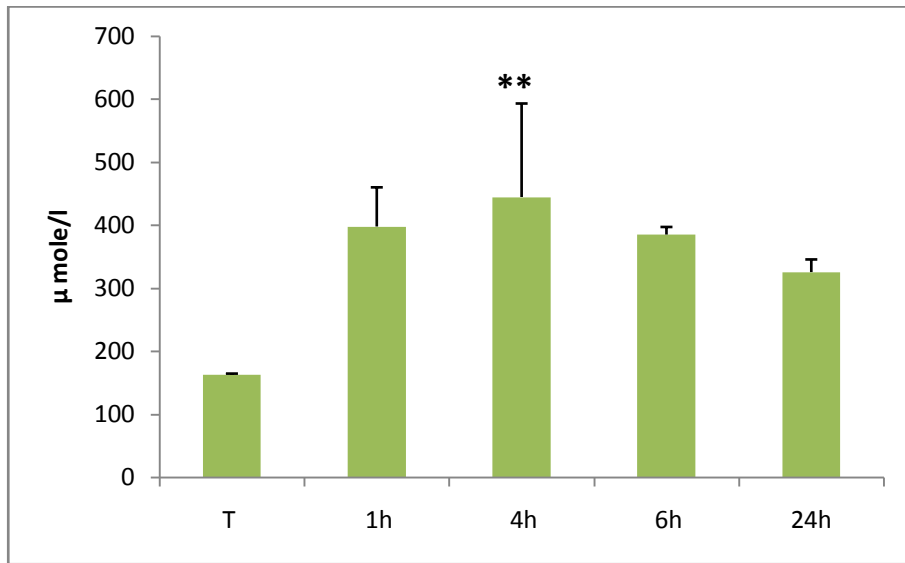
III-1-4-Dosage du monoxyde d'azote sérique et pulmonaire

Il est maintenant bien établi que le monoxyde d'azote (NO) est impliqué dans la modulation de médiateurs endogènes qui contrôlent le système vasculaire (Moncada et *al.*, 1991 ; Petricevich et Pena, 2002). Les cellules pulmonaires peuvent exprimer les deux isoformes (constitutive et inductible) de la NOS. Ainsi la synthèse du monoxyde d'azote a été mise en évidence avec de types cellulaires aussi variés que les macrophage, les polynucléaires neutrophiles et éosinophiles, les fibroblastes, l'endothélium vasculaire, l'épithélium des voies aériennes et les terminaisons nerveuses (Busse et *al.*, 1991). Le monoxyde d'azote est impliqué dans la genèse de plusieurs états physiopathologiques telles que l'inflammation, les réactions immunoallergiques, l'athérosclérose et l'hypertension artérielle (Olsen et *al.*, 1972 ; Busse et *al.*, 1991). La cinétique du NO sérique après envenimation expérimentale avec le venin d'*Aah* montre une augmentation significative du monoxyde d'azote pour atteindre un maximale de $(444,83 \pm 148,25 \mu\text{M/l})$ après 4 h d'envenimation comparativement aux témoins $(162,9 \pm 2,001 \mu\text{M/l})$, et revenir en suite progressivement à un taux basal (Figure 18). Le venin d'*Aah* a induit également une augmentation des concentrations du monoxyde d'azote aux niveaux des surnageants pulmonaires des souris envenimées. Le profil obtenu montre une élévation progressive du NO pour atteindre un maximum de $(0,0714 \pm 0,022 \mu\text{M}/100 \text{ mg de tissu})$ après 24 h d'envenimation (Figure 18). Le venin *Tityus serrulatus* induit également une variation des concentrations sériques du NO avec un premier pic observé 2 h après envenimation et un second pic 6 h après injection du venin (Petricevich et Pena, 2000) ainsi que celui d'*Aah* et de sa toxine AahII (Raouraoua-Boukari et *al.*, 2012).

III-1-5- Dosage du peroxyde d'hydrogène sérique et pulmonaire

Le peroxyde d'hydrogène est un radical libre secrété par les cellules inflammatoires telles que les neutrophiles au niveau du site inflammatoire. En effet en plus de son action délétère directe sur le tissu pulmonaire, le H₂O₂ subit une chloration par adition d'ions chlorures pour former l'acide hypochloreux, un composé extrêmement toxique sous l'action enzymatique de la MPO (Roos et *al.*, 2003). Si ces produits sont libérés en grande quantité dans le milieu extracellulaire, ils peuvent engendrer des dommages tissulaires dus à la peroxydation lipidique, une désorganisation membranaire, ou encore une altération des protéines et acides nucléiques (Gougerot-Pocidallo et *al.*, 2002).

A



B

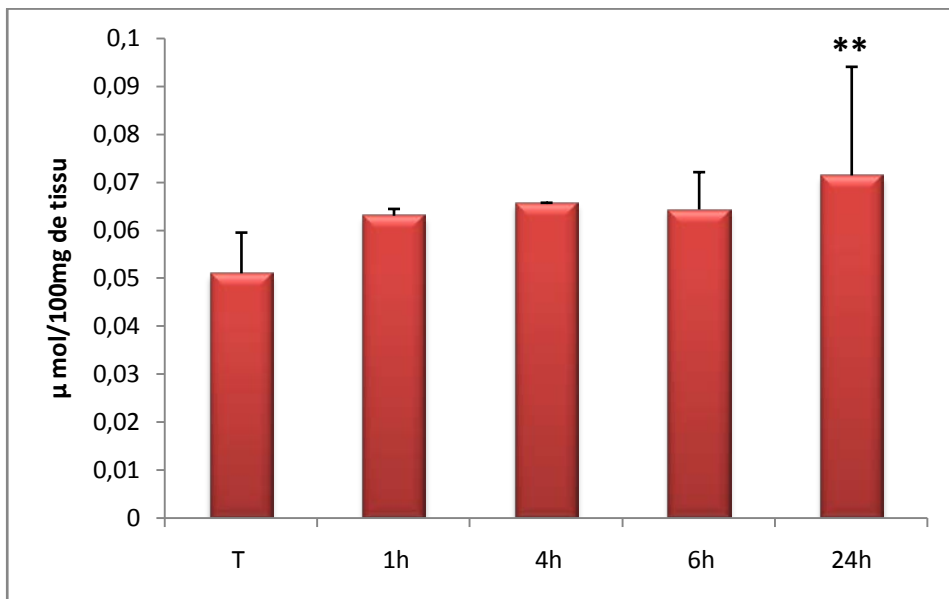


Figure 18 : Cinétique de dosage du monoxyde d'azote sérique (A) et pulmonaire (B) après envenimation.

L'étude de la cinétique des concentrations du H₂O₂ sériques réalisée sur des souris envenimées avec le venin d'Aah indique une augmentation significative des taux de peroxyde d'hydrogène d'allure biphasique. Un premier pic est observé 1 h ($0,0875 \pm 0,017$ UDO) après injection du venin en comparaison avec les souris témoins ($0,065 \pm 0,007$ UDO), suivie d'un deuxième pic après 6 h d'envenimation et une restauration quasi-totale du taux d' H₂O₂ après 24 heures envenimation (Figure 19). Des résultats quasi similaires ont été rapportés après envenimation avec les venins de *Bothrops jararaca* (BjV) et de *Bothrops asper* (Carneiro et al., 2002 ; Zulian et al., 2005). Parallèlement, le dosage du H₂O₂ pulmonaire a été effectué après injection du venin d'Aah. Les résultats obtenus montrent une augmentation significative des taux de peroxyde d'hydrogène 1 h ($0,825 \pm 0,106$ UDO) après envenimation comparativement aux témoins ($0,375 \pm 0,1$ UDO). Cette augmentation est suivie d'une diminution progressive jusqu'à atteindre un taux similaire aux animaux témoins, 24 h après injection du venin (Figure 19). L'élévation des taux de peroxyde d'hydrogène sanguin suivie d'une augmentation tissulaire dans l'arbre bronchopulmonaire pourrait probablement être due à l'infiltration des cellules inflammatoires activées aux niveaux des voies aériennes. En effet des études ont montré que la séquestration des polynucléaires dans les poumons provoque de profonde lésions tissulaires et une production accrue de radicaux libres (Nonaka et al., 2008).

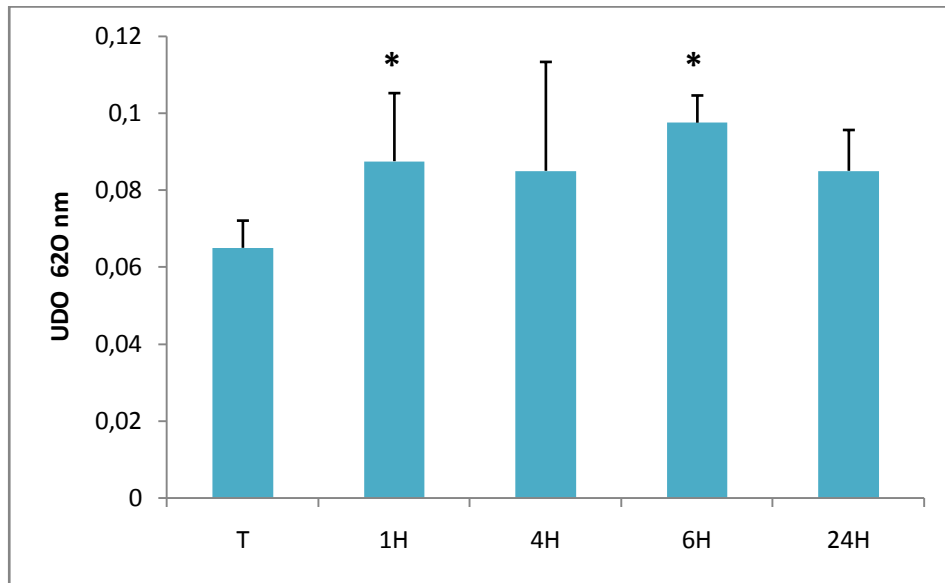
III-1-6-Etude qualitative et quantitative des constituants du sang périphérique

Le dénombrement des éléments figurés du sang permet de mettre en évidence, non seulement le taux totale de leucocytes et les différentes sous population mais il permet aussi d'apprécier aussi l'hémogramme (taux global des globules rouges, des plaquettes mais aussi l'estimation des taux d'hémoglobine et de l'hématocrite). L'hémogramme peut s'accompagner de certaines anomalies au cours d'un syndrome inflammatoire.

❖ Dénombrements des globules blancs

L'envenimation des souris avec le venin d'Aah induit une élévation du nombre de leucocytes pour atteindre un maximale de $10,9 \pm 2,26 \times 10^3/\mu\text{l}$, après 4 h envenimation comparativement aux animaux témoins ($3,45 \pm 0,1 \times 10^3/\mu\text{l}$). Au-delà de 4 h le nombre de globules blancs diminue pour atteindre un nombre de $3,9 \pm 0,77 \times 10^3/\mu\text{l}$ après 6 h d'envenimation. L'écotaxie des cellules inflammatoires du compartiment vasculaire vers les sites inflammatoires, sous l'effet des médiateurs chimioattractants expliquerait probablement ces variations (Figure 20).

A



B

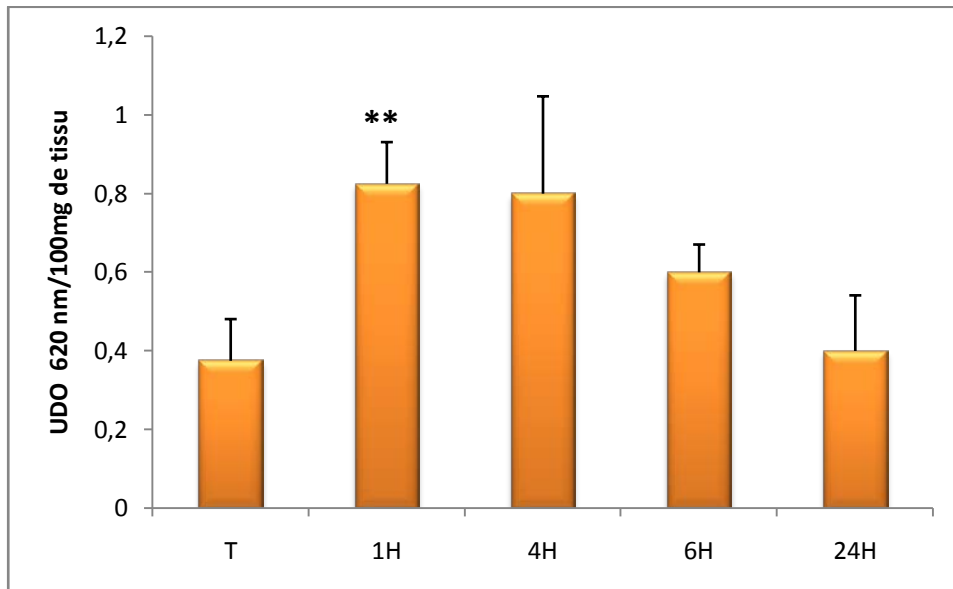


Figure 19 : Cinétique de dosage du peroxyde d'hydrogène sérique (A) et pulmonaire (B) après injection du venin à des souris.

Par ailleurs,, l'analyse des différentes sous-populations leucocytaires après injection du venin d'Aah montre une variation au sein des différents types cellulaires se traduisant par une diminution des lymphocytes ($59,6 \pm 5,72\%$) après 1 h d'envenimation comparativement aux témoins ($69,35 \pm 5,44\%$) pour revenir à un taux basal après 24 h d'envenimation ($65,4 \pm 4,49\%$). Une augmentation progressive du taux des polynucléaires a été observée après 6 h d'envenimation pour atteindre un maximum ($34,85 \pm 1,97\%$) en comparaison avec le lot de souris témoin ($19,2 \pm 2,97$). L'envenimation induit également une élévation du taux des monocytes ($20,4 \pm 6,5\%$) après 4 h d'envenimation pour revenir au même taux des animaux témoins ($11,45 \pm 2,47\%$) (Figure 21). Des variations similaires des leucocytes ont été déjà rapportées après envenimation par le venin d'Aah (Adi-Bessalem et al., 2008).

❖ Numération des globules rouges, quantification de l'hémoglobine et estimation de l'hématocrite

Le dénombrement des globules rouges après injection d'une dose sub létale du venin d'Aah a montré une augmentation significative du taux des érythrocytes avec un pic ($10,17 \pm 0,33 \times 10^6$ cellules / μ l) après 4h d'envenimation par rapport aux animaux témoins ($5,6 \pm 0,41 \times 10^6$ cellules/ μ l). Cette élévation persiste jusqu'à 6h d'envenimation pour diminuer après 24 h ($9,06 \pm 0,03 \times 10^6$ cellules / μ l) (Figure 22). Cusinato et collaborateurs (2010) ont montré une augmentation des globules rouges après envenimation avec le venin de *Tityus serrulatus*. Les résultats de la cinétique de quantification de l'hémoglobine montrent une augmentation significative du taux d'hémoglobine pour atteindre un maximum de $173,5 \pm 13,4$ mg/ml après 4h d'envenimation comparativement aux lots des souris témoins qui est de $86 \pm 2,8$ mg/ml. Cette augmentation est suivie d'une diminution pour atteindre un taux de $144,5 \pm 3,5$ mg/ml quasi similaire aux animaux témoins après 24 h d'envenimation (Figure 23). Les mêmes résultats ont été observés par Chaubey (2010) après injection du venin de *Mesobuthus tamulus gangeticus* par voie sous-cutanée à des souris. L'hématocrite est le pourcentage relatif du volume des érythrocytes circulant dans le sang par rapport au volume total du sang. Ce pourcentage correspond au rapport entre le volume qu'occupe les cellules circulantes du sang après centrifugation d'un prélèvement sanguin veineux et le volume centrifugé. L'envenimation des animaux avec le venin d'Aah, a provoqué une nette élévation du pourcentage d'hématocrite d'environ 40% après 4 heures d'envenimation ($49,95 \pm 0,77\%$) en comparaison au lot de souris témoins ($27,25 \pm 0,91\%$). Au-delà de 4 h, le pourcentage d'hématocrite revient progressivement au taux basal (Figure 23).

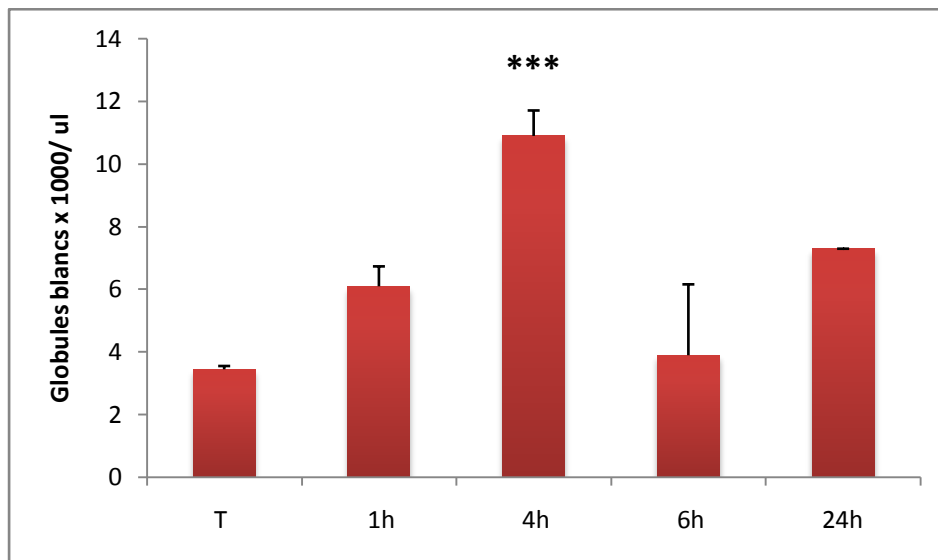


Figure 20: Cinétique d'infiltration des leucocytes au niveau de sang totale après envenimation des souris avec une dose sub létale du venin d'Aah.

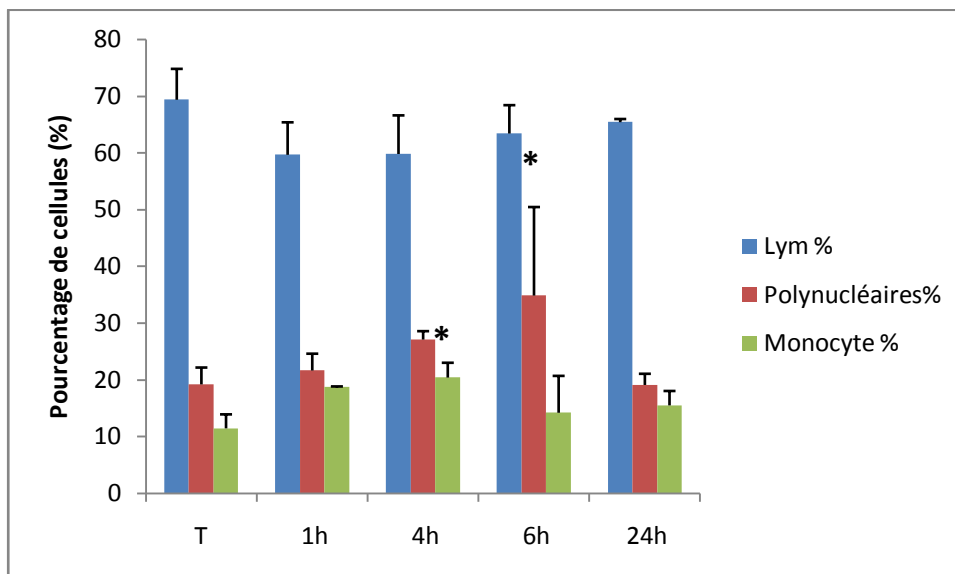


Figure 21: Cinétique d'infiltration des polymorphonucléaires au niveaux vasculaire après envenimation des souris avec une dose sub létale du venin d'Aah.

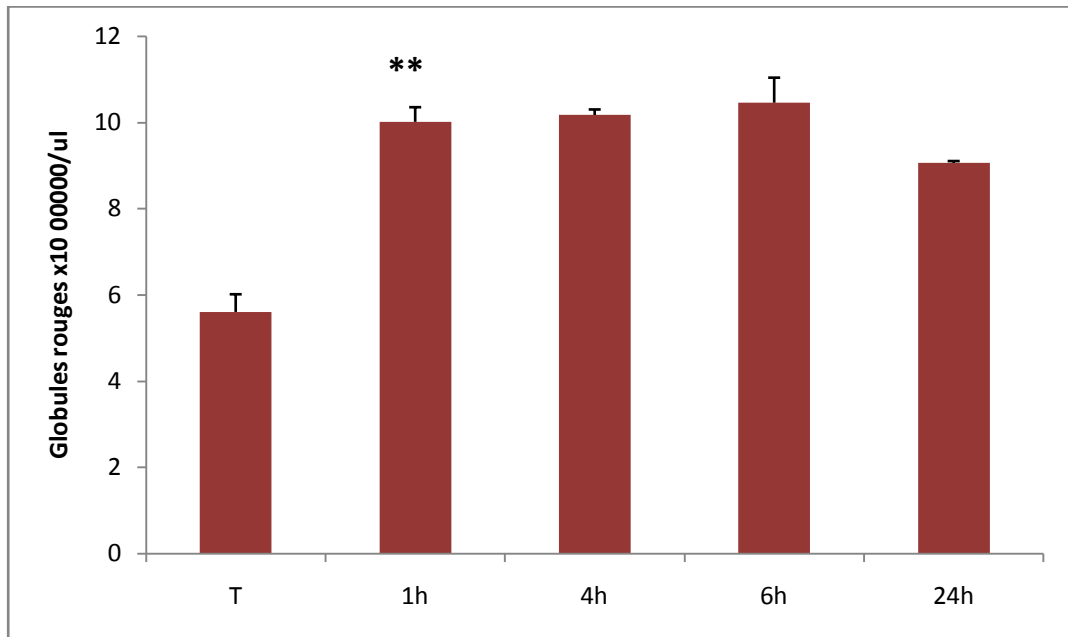
❖ Quantification des plaquettes

Les plaquettes sont des cellules sanguines sans noyau, qui jouent un rôle important dans l'initiation de la coagulation et de la thrombose. La plaquette comporte une membrane sur laquelle sont situés des facteurs de coagulation, des protéines et des récepteurs caractéristique essentiellement des récepteurs couplés aux protéines G, composés de 7 domaines transmembranaires telle que RPAF (*Récepteur Platelet Activating Factor*), leur ligand spécifique est le PAF qui en plus de son rôle d'activateur plaquettaire indispensable à la coagulation, il agit comme un vasodilatateur puissant, susceptible d'entraîner des hypotensions artérielles importantes. Il augmente la perméabilité vasculaire et les fuites liquidiennes extravasculaires, favorisant ainsi la formation d'un œdème et également implique dans la contraction directe ou indirecte de la plupart des fibres lisses, à l'exception des fibres vasculaires. Il contracte donc les fibres bronchiques, en augmentant la réactivité des bronches provoquant ainsi une bronchoconstriction (Messadi *et al.*, 2012).

La cinétique de quantification des plaquettes sanguines montre un taux maximal de 655×10^3 plaquettes/ μ l, 4 heures après injection du venin comparativement aux témoins ($472 \pm 11,31 \times 10^3$ plaquettes/ μ l) suivie par une diminution progressive jusqu'à 24 heures d'envenimation (Figure 23).

L'ensemble des résultats de l'étude hématologique indique une augmentation significative du nombre d'érythrocytes, de plaquettes sanguines, une élévation des taux d'hémoglobine et d'hématocrite, 1 h après injection du venin. Cette variation des paramètres hématologiques serait probablement due aux troubles de l'hémoconcentration observée après envenimation scorpionique. En effet cette augmentation de l'hémoconcentration est consécutive de la perte massive du liquide sanguin périphérique principalement sous forme d'œdème mais aussi par diarrhée et lacrymation symptômes observés après envenimation scorpionique (Cusinato *et al.*, 2010 ; Khattabi *et al.*, 2011).

A



B

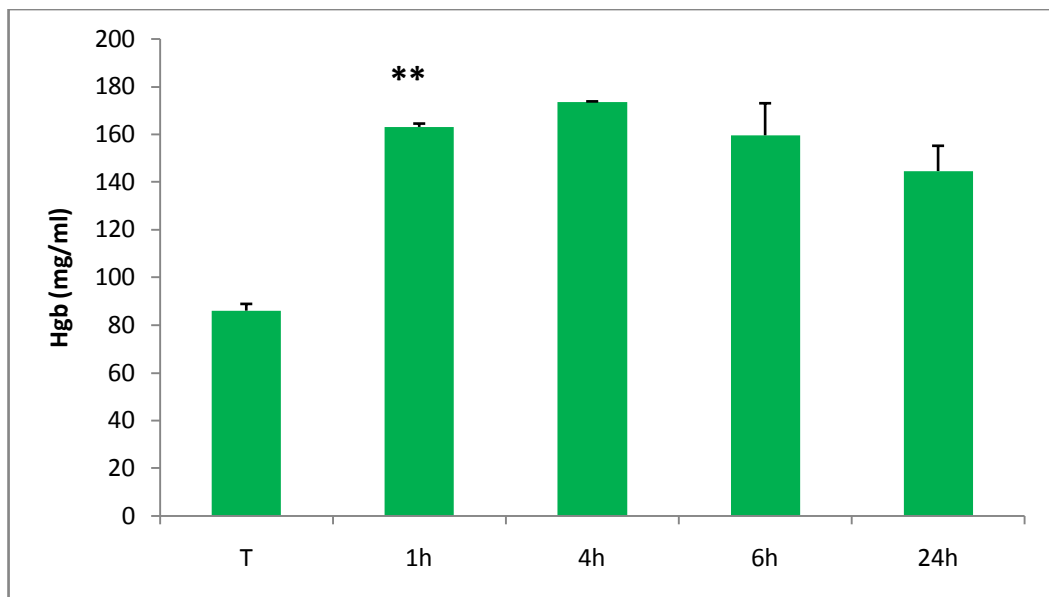
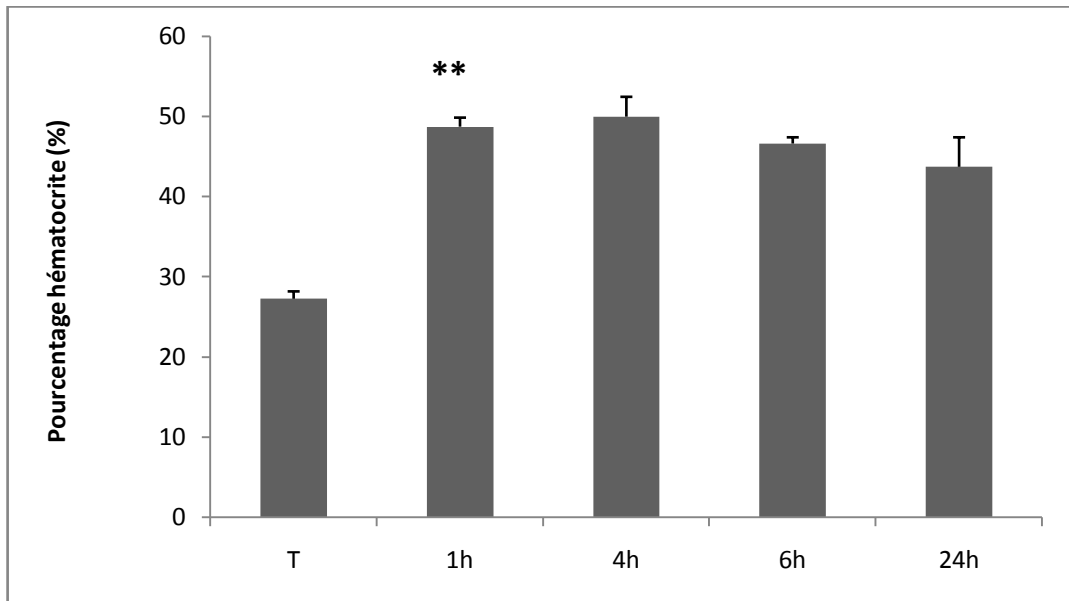


Figure 22 : Cinétique des globules rouge (A) et de l'hémoglobine (B) au niveau du sang totale après envenimation des souris avec une dose sublétales du venin d'Aah.

A



B

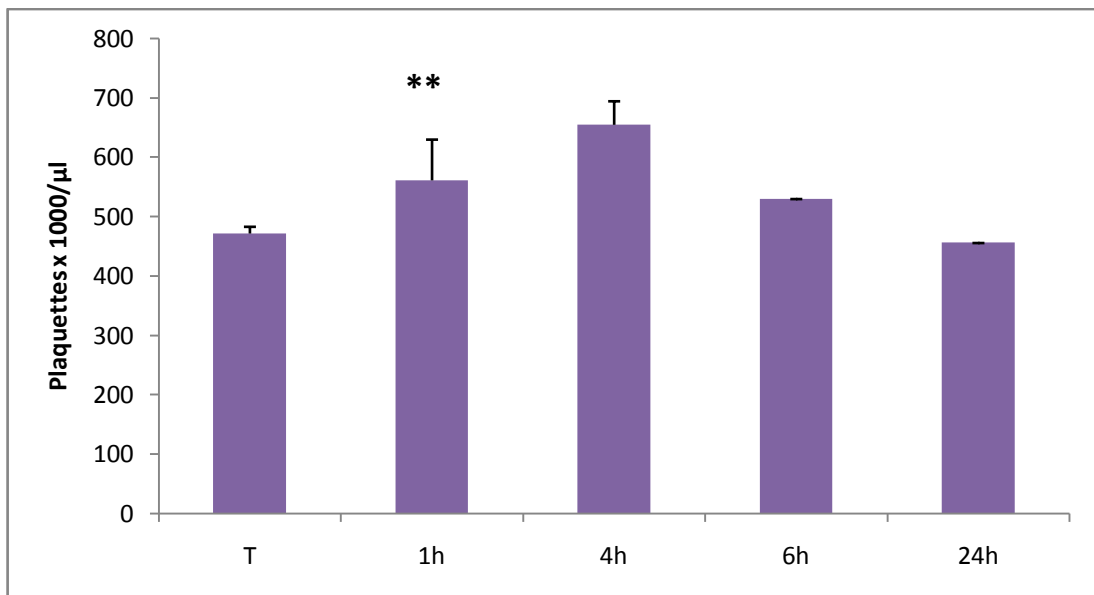


Figure 23 : Cinétique de quantification de l'hématocrite (A) et des plaquettes sanguines (B) au niveau du sang totale après envenimation des souris.

III-1-7- Etude de l'infiltrat cellulaire dans le liquide bronchoalvéolaire

L'infiltration des cellules inflammatoires a été également analysée au sein de l'arbre bronchoalvéolaire après envenimation des animaux. La pratique du LBA au cours des affections pulmonaires peut conduire à une appréciation de l'étendue des lésions au niveau du site inflammatoire. Au même titre que les investigations histopathologiques, le lavage bronchopulmonaire permet d'apprécier les différentes populations leucocytaires en cas d'affection pulmonaire (Perrin-Fayolle et al., 1982 ; Li et al., 2012).

Les résultats obtenus montrent une augmentation significative du nombre total des leucocytes au niveau du BAL, un pic est observé après 6 h d'envenimation ($2,7 \pm 0,42 \cdot 10^3$ cellules/ μ l) comparativement aux souris témoins ($0,75 \pm 0,07 \cdot 10^3$ cellules/ μ l). Le nombre total de leucocyte retrouvé au niveau de l'arbre broncho-pulmonaire diminue progressivement pour revenir au taux basal après 24 heures d'envenimation (Figure 24). Cette infiltration leucocytaire au niveau du BAL est probablement due aux constituants du venin d'*Androctonus australis Hector*. En effet la liaison des neurotoxines à leurs sites spécifiques sur les cellules excitables provoque une décharge de neurohormones qui aura comme conséquence une activation importante des leucocytes. Les globules blancs activés vont migrer vers le site inflammatoire sous l'effet de médiateurs chimioattractants. En effet l'exploration du BAL après envenimation des animaux avec le venin de *Scorpaena plumieri* a montré une importante infiltration des cellules inflammatoires (Boletini-Santos et al., 2008). Cette infiltration leucocytaires au niveau de l'arbre bronchopulmonaire est aussi une caractéristique des pathologies allergiques (Trifilieff et al., 2000).

Par ailleurs, la numération des sous populations des leucocytes montre une diminution du taux des lymphocytes pour atteindre un minimum de 53% après 1 heure d'envenimation, le taux de lymphocytes revient alors progressivement aux taux normaux 24 heures après l'injection du venin d'Aah. Le taux maximal de polynucléaire est observé 1 heure après envenimation pour atteindre 36,05% et un retour à un taux basal de 30%, 24 heures après envenimation. Cependant les variations des taux de monocytes sont représentées par deux pics, le premier de 10,9% 1 heure après envenimation, le deuxième 6 heures après injection du venin d'Aah, il est de l'ordre de 27,1%, contre un taux de 2,2% chez le témoin (Figure 25). Une variation du nombre des cellules inflammatoires au niveau de BAL après envenimation a également été rapportée par notre équipe (Adi-Bessalem et al., 2012).

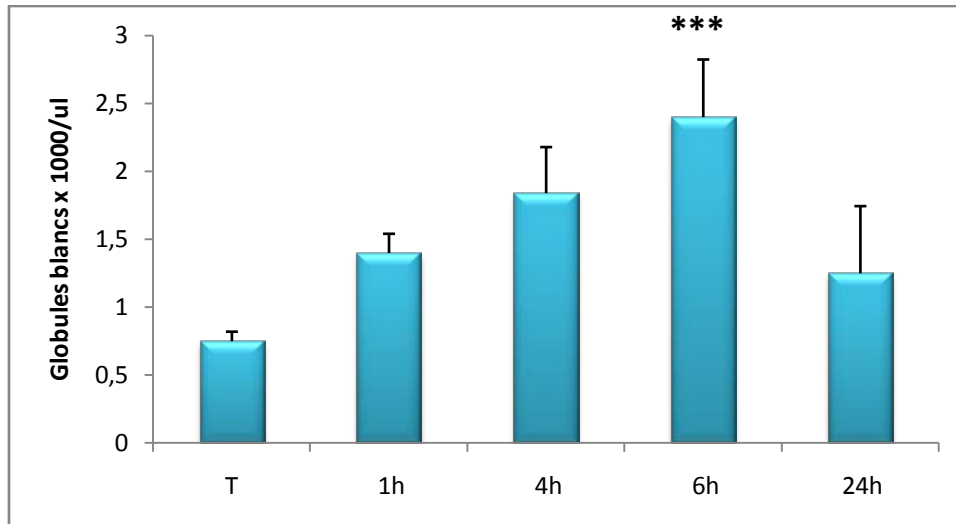


Figure 24 : Cinétique d’infiltration des globules blancs dans le liquide broncho-pulmonaire (BAL) après envenimation des souris avec une dose sub létale du venin d’Aah.

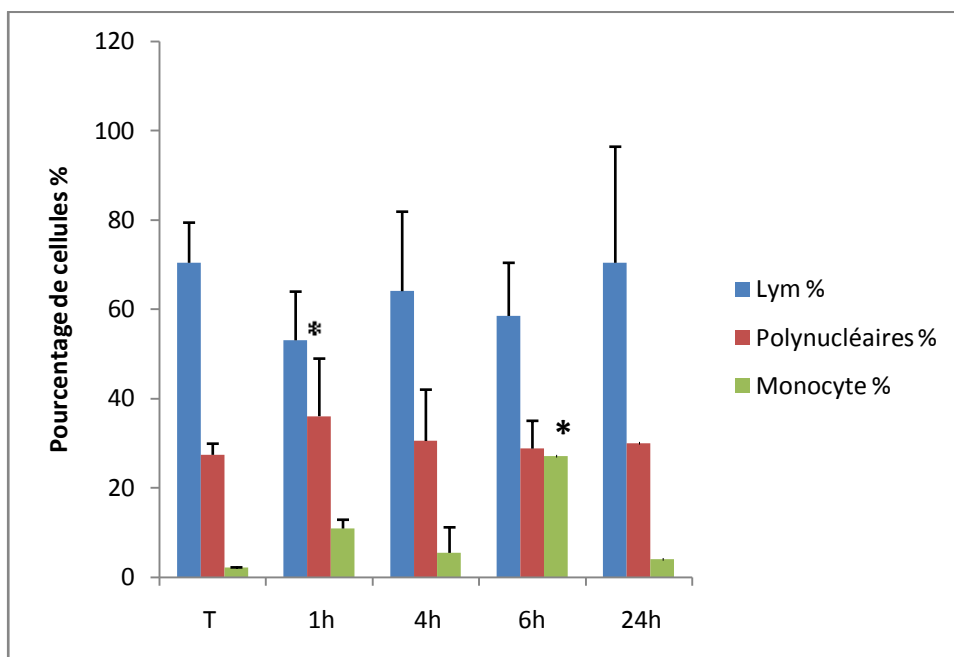


Figure 25: Cinétique d’infiltration des différentes populations des polymorphonucléaires dans le liquide broncho-pulmonaire après envenimation des souris avec une dose sub létale du venin d’Aah.

III-2- Evaluation de Balance de la réponse immunitaire par la détermination des concentrations sériques des immunoglobulines G (IgG1 et IgG2)

Dans le but de mettre en évidence le type de réponse immunitaire prédominante après envenimation scorpionique, le dosage sérique des deux isotypes d'immunoglobuline G (IgG1 et IgG2) a été effectué. La cinétique des anticorps sérique des sous classes IgG1 et IgG2 par ELISA sandwich, après administration d'une dose sub létale de venin d'*Aah* (10 µg/20g), montre une augmentation significative des concentrations des IgG1 et des IgG2 dès les premières heures qui suivent l'envenimation, pour atteindre un maximum de ($0,201 \pm 0,0084$ UDO) pour IgG1 et de ($0,164 \pm 0,001$ UDO) pour IgG2 après 24 h d'envenimation. Un retour progressive à l'état normale des taux des IgG est observé après 48 h pour les deux isotypes IgG1 ($0,1 \pm 0,056$ UDO) et IgG2 ($0,037 \pm 0,01$ UDO). Une prédominance de la réponse humorale est observée caractérisée par des concentrations en IgG1 significativement plus élevées que les IgG2 (Figure 26). Les résultats obtenus corroborent avec ceux rapportés par Boussag-Abib et Laraba-Djebari (2011) qui ont montré un taux d'IgG1 sérique plus important que celui des IgG2 après envenimation avec le venin d'*Aah*.

III-3- Analyse du rôle des mastocytes dans l'immunoréactivité de type allergène provoquée par le venin

Dans le but de mettre en évidence le rôle des mastocytes (cellule clé de la réaction immunoallergique) dans l'inflammation induite par le venin de scorpion, un lot d'animaux est traité par le composé 48/80 avant envenimation. Le composé 48/80 étant un sécrétagogue spécifique des mastocytes, les active en se liant à leur récepteur de surface couplé à une protéine G. Cette activation mastocytaire aura comme conséquence un épuisement des réserves mastocytaires en médiateurs inflammatoires par la libération des médiateurs préformés telle que l'histamine. Les résultats obtenus de dosages de la MPO, l'EPO et du NO sont comparés aux souris qui ont subi une intoxication venimeuse expérimentale.

Une augmentation significative des concentrations de la MPO sérique chez les souris envenimées par voie sous-cutanée avec le venin d'*Aah* ($0,1325 \pm 0,017$ UDO) en comparaison avec le lot des souris témoins ($0,014 \pm 0,003$ UDO). Par contre, l'injection du composé 48/80 suivie de l'envenimation des animaux réduit significativement le taux d'infiltration des neutrophiles ($0,025 \pm 0,007$ UDO) (Figure 27).

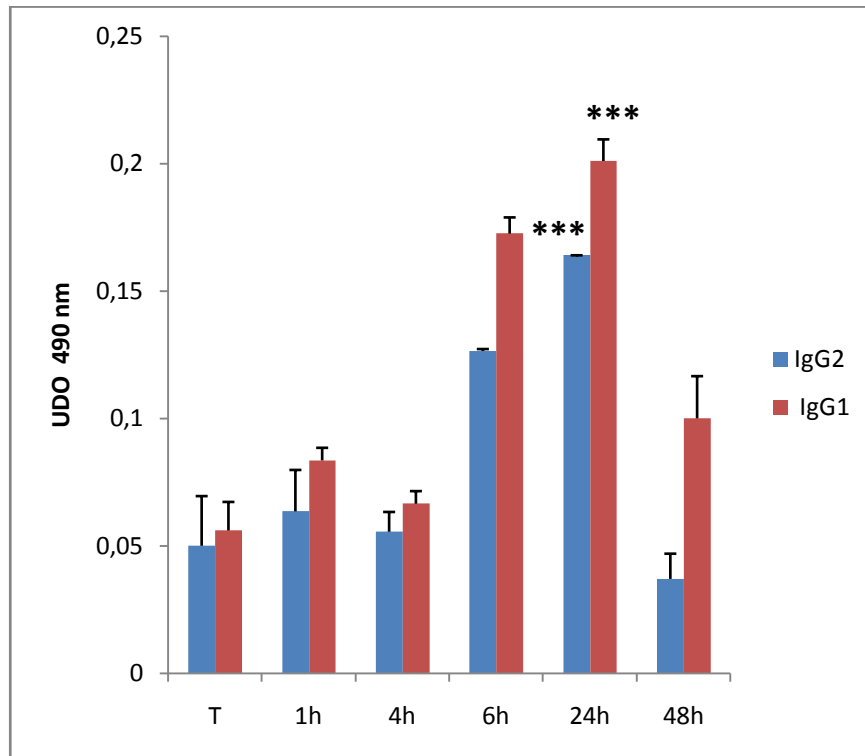


Figure 26 : Cinétique des concentrations sériques des immunoglobulines IgG1 et IgG2 après envenimation des souris avec une dose sub létale de venin d’Aah déterminée par ELISA sandwich

Parallèlement à l'élévation des taux sériques de la MPO, le venin d'Aah induit la production de l'éosinophile peroxydase (EPO) ($0,8 \pm 0,246$ UDO) comparativement aux témoins ($0,12 \pm 0,022$ UDO). Le prétraitement par le composé 48/80 induit une diminution significative des taux enzymatiques ($0,14 \pm 0,028$ UDO) (Figure 28). Le venin d'Aah induit également une augmentation significative des concentrations du monoxyde d'azote sérique chez les souris envenimées ($444,83 \pm 148,25$ $\mu\text{M/l}$) comparativement aux témoins ($162,9 \pm 2,001$ $\mu\text{M/l}$), par contre le prétraitement avec le composé 48/80 réduit de façon significatif sa production ($320,16 \pm 34$ $\mu\text{M/l}$) (Figure 29). De plus, l'évaluation de l'infiltration des cellules inflammatoires au sein de l'arbre bronchoalvéolaire après envenimation en présence et en absence du prétraitement, montre clairement que le venin d'Aah induit une augmentation significative des leucocytes au niveau du BAL ($1,84 \pm 0,34 \times 10^3/\mu\text{l}$) en comparaison au lot des souris témoins tandis que le composé 48/80 réduit significativement (de 32,6%) cette migration cellulaire (Figure 30). Cette diminution d'infiltration leucocytaire est probablement due au composé 48/80 qui via une activation excessive des mastocytes va induire une réduction significative de l'inflammation pulmonaire. Des résultats similaires ont été rapportés par De Matos et collaborateurs (2001) après injection du venin de *Tityus serrulatus*. Des variations dans l'élévation de l'index pulmonaire chez la souris envenimées ($1,145 \pm 0,11$) sont nettement supérieures aux IP des lots témoins ($0,65 \pm 0,03$). Parallèlement une réduction significative de l'IP est observée chez les souris prétraitées par le composé 48/80 (Figure 31). Le prétraitement de souris avec le composé 48/80 avant l'injection du venin de scorpion de *Mesobuthus tamulus* réduit significativement la formation de l'œdème pulmonaire (Dutta et Deshpande, 2011). L'ensemble des résultats mettent en exergue l'importance des mastocytes dans le processus inflammatoire déclenché après une envenimation scorpionique. En effet, les neurotoxines des venins de scorpion provoquent une dépolarisation de membranes des cellules nerveuses, modification du potentiel d'action et une production accrue de neuropeptides, dont la conséquence est l'activation des mastocytes, qui deviennent des cellules sécrétrices de bioamines (tels que l'histamine), des médiateurs lipidiques (les prostaglandines et les leucotriènes) et des cytokines proinflammatoires (Costa et al., 2000 ; Fukuhara et al., 2003). Par ailleurs, le prétraitement de souris avec le composé 48/80 combiné à un inhibiteur de la COX-2 plus un antihistaminique (anti-H1) avant envenimation induit une réduction quasi-totale de l'œdème (Chen et Lariviere, 2010).

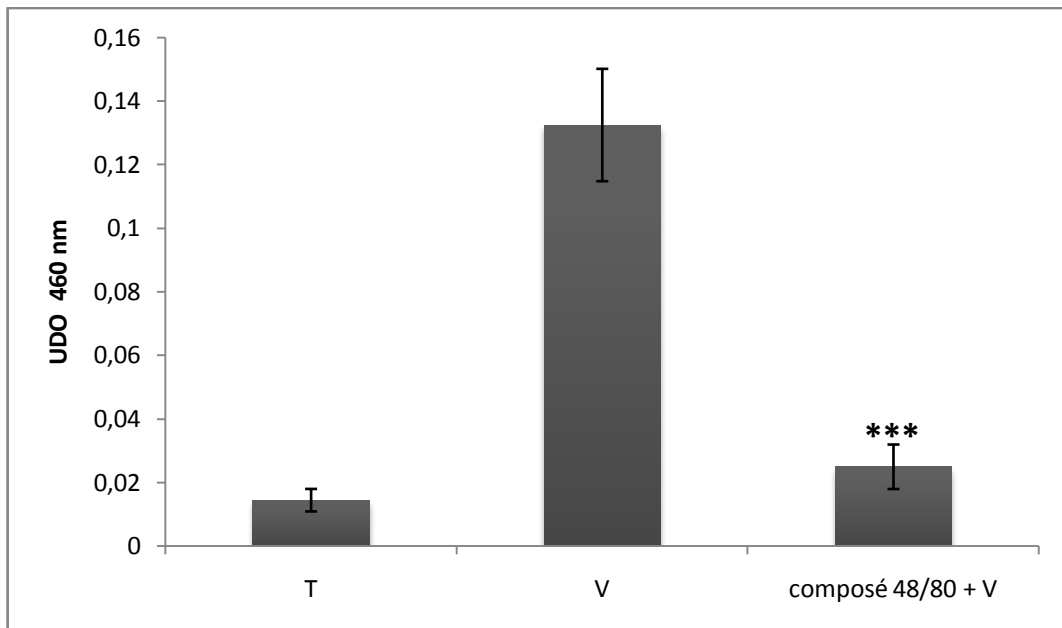


Figure 27 : Détermination de l'activité de la myéloperoxydase sérique en présence et en absence de prétraitement.

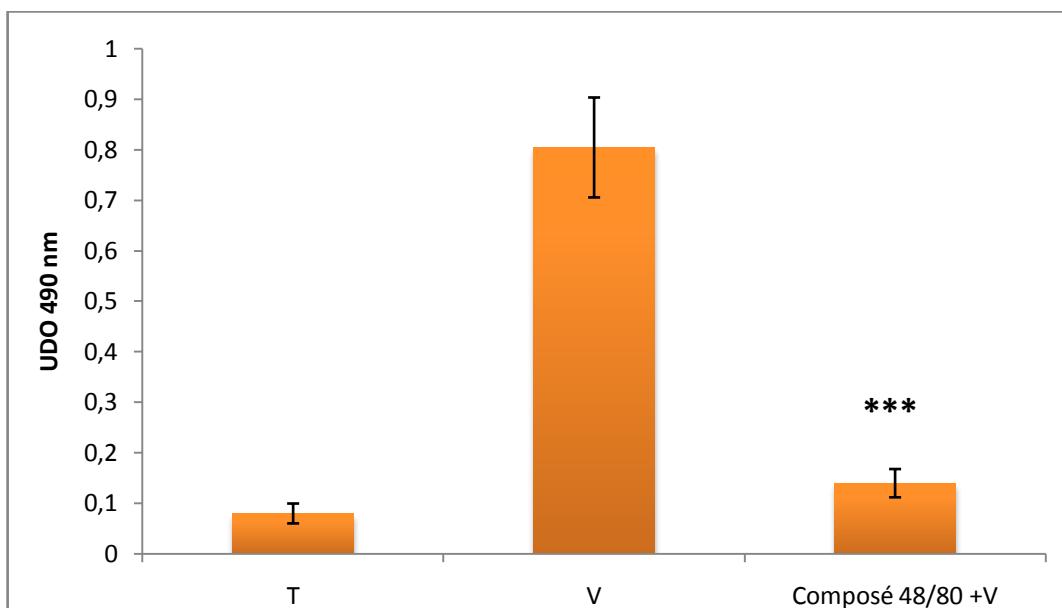


Figure 28 : Détermination de l'activité de l'éosine peroxydase sérique en présence et en absence de prétraitement.

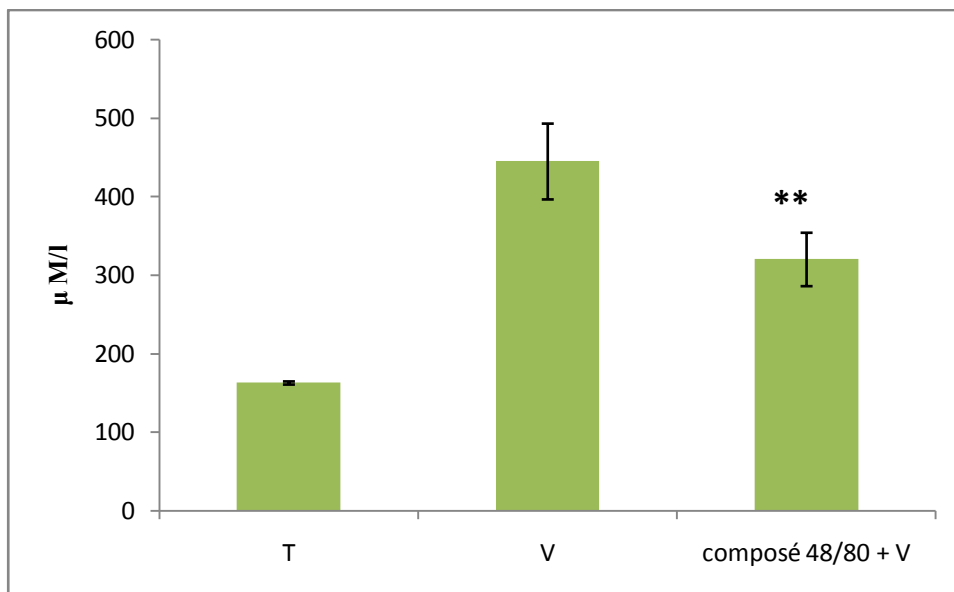


Figure 29: Détermination du monoxyde d'azote sérique avant et après traitement des animaux envenimés par le venin d'Aah.

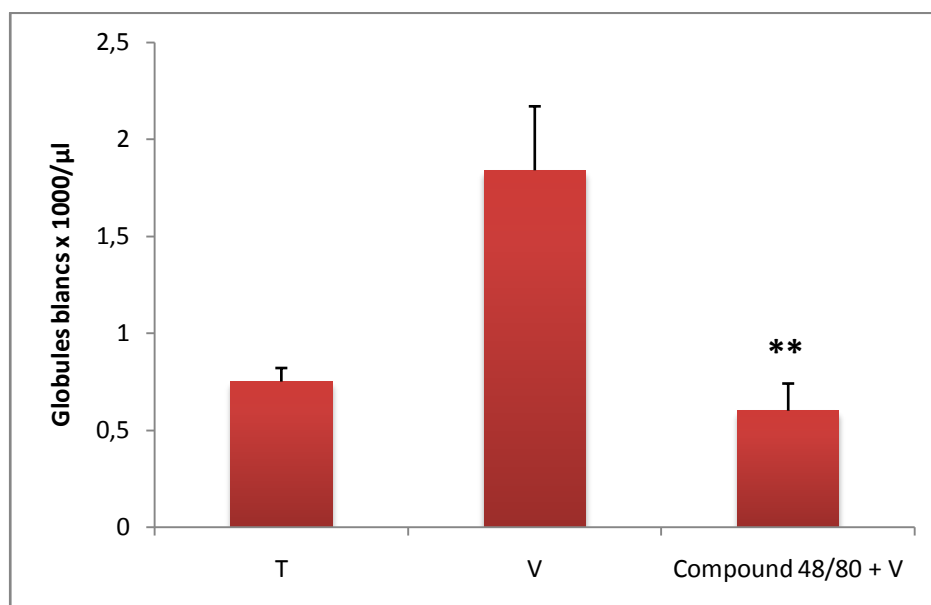


Figure 30 : Dénombrement des leucocytes au niveau du liquide bronchopulmonaire en présence et en absence de prétraitement.

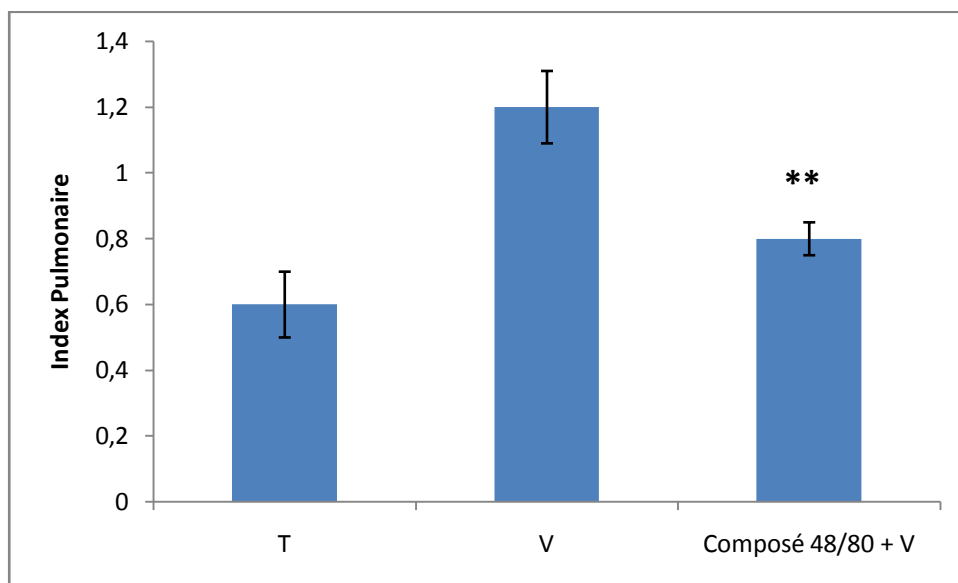


Figure 31 : Evaluation de l'Index pulmonaire des souris envenimées par la dose létale du venin d'*Androctonus australis hector* en présence et en absence de prétraitement.

III-4- Etudes comparative de l'immunoréactivité provoquée par le venin avec un modèle allergique

Afin de mettre en exergue l'immunoréactivité de type allergène provoquée par le venin, le profil inflammatoire des animaux envenimés a été comparée à un modèle animal allergique par le dosage sérique de la MPO, de l'EPO et par l'estimation de l'index pulmonaires. Les résultats obtenus montrent une augmentation significative des concentrations de la myéloperoxydase sérique chez les souris allergique ($0,10 \pm 0,01$ UDO) de même que chez les souris envenimés par voie sous-cutanée avec le venin d'Aah ($0,133 \pm 0,017$ UDO) en comparaison avec le lot de souris témoins ($0,014 \pm 0,03$ UDO) (Figure 32). Cette élévation des concentrations sériques de la myéloperoxydase, reflète une augmentation des polynucléaires neutrophiles au niveau du modèle allergique. Le neutrophile pourrait augmenter l'obstruction bronchique (bronchoconstriction et inflammation de la muqueuse) par les nombreux médiateurs libérés lors de son activation (Tillié-Leblond et Thorette, 2005). D'autre part, une étude de l'activité de l'éosine peroxydase est effectuée après envenimation scorpionique et un modèle allergique. Les résultats obtenus indiquent une augmentation des concentrations sériques de l'EPO pour le modèle allergique ($1,32 \pm 0,077$ UDO). Ainsi qu'une élévation des taux d'éosinophile peroxydase après envenimation ($0,805 \pm 0,09$ UDO), comparativement aux témoins ($0,121 \pm 0,02$ UDO) (Figure 33). De nombreuses études ont mis en évidence l'implication des éosinophiles dans les réactions allergiques (Capron et *al.*, 2002). Le polynucléaire éosinophile est aussi un marqueur de la réponse immunitaire dans le poumon, par le biais d'interactions avec le lymphocyte T, le mastocyte, le polynucléaire basophile, la cellule endothéliale, le macrophage, le fibroblaste et les plaquettes. Les éosinophiles matures subissent rapidement dans les tissus une mort cellulaire par apoptose, sauf si des facteurs de survie cellulaire sont présents (IL-5) (Cottin, 2008). Il semble que les conséquences pathologiques de l'inflammation bronchique éosinophilique se traduisent par la libération in situ des protéines cationiques (les MPB ont une toxicité directe sur l'épithélium bronchique) et des métalloprotéinases et l'entretien de la réaction inflammatoire et immunitaire locale, impliquée dans le remodelage bronchique. De plus, l'estimation de l'index pulmonaire après envenimation ($1,145 \pm 0,11$) ainsi que chez le modèle allergique ($1 \pm 0,20$) indique une augmentation significative de l'œdème pulmonaire comparativement aux souris témoins ($0,65 \pm 0,10$) (Figure 34).

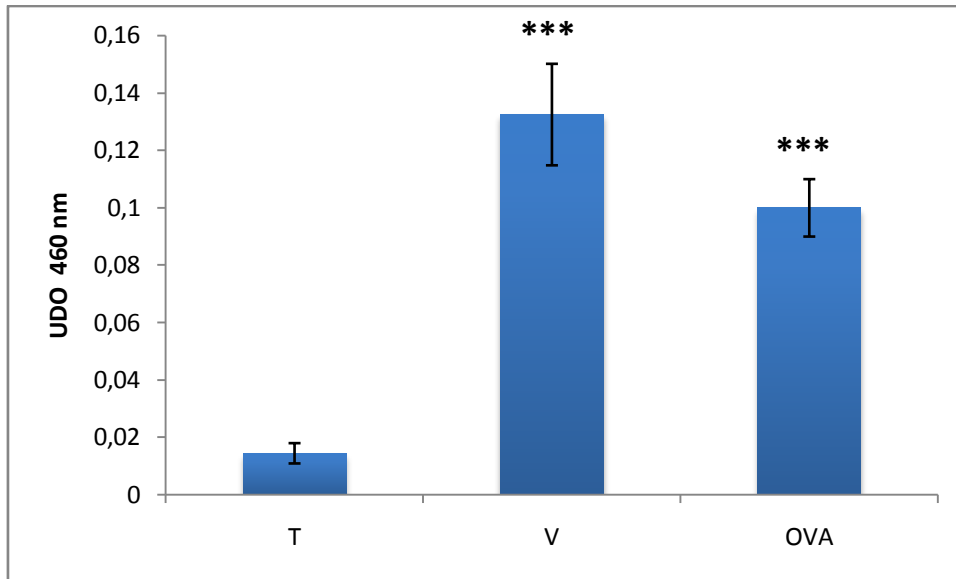


Figure 32 : Comparaison de l'activité de la myéloperoxydase sérique entre un modèle murin allergique et après envenimation avec le venin d'Aah.

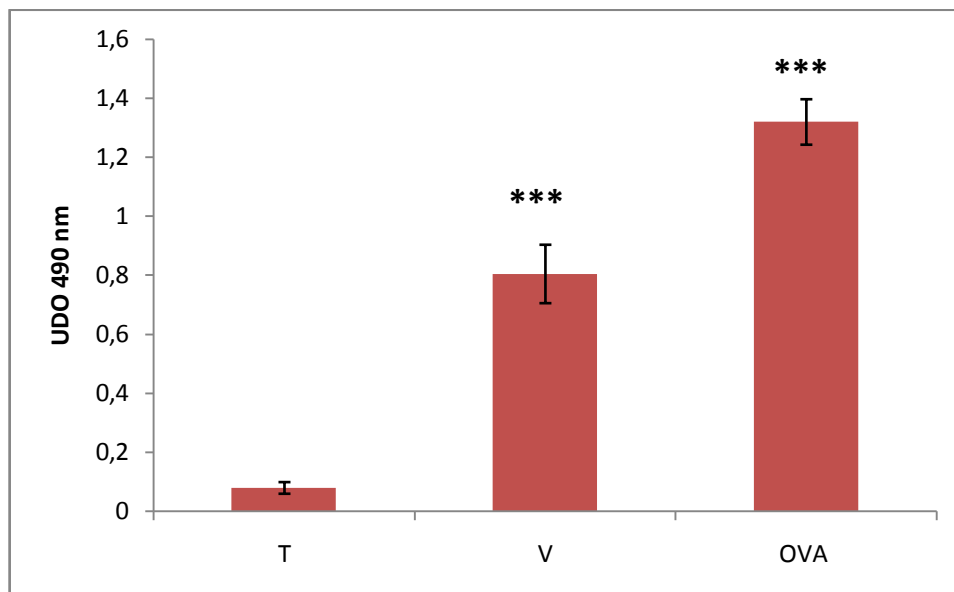


Figure 33 : Comparaison de l'activité de l'éosinophile peroxydase sérique entre un modèle murin allergique et après envenimation avec le venin d'Aah.

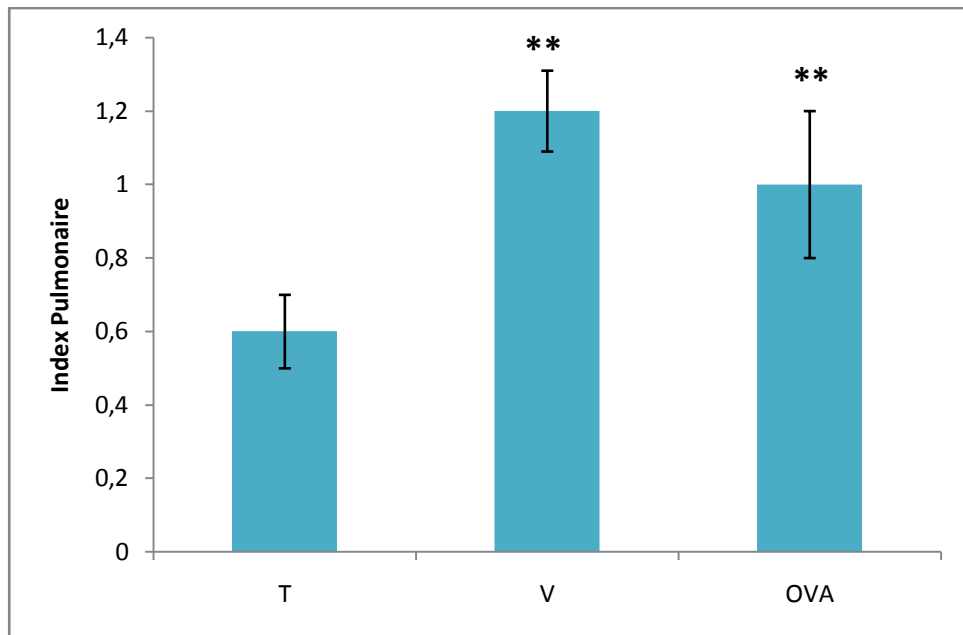


Figure 34 : Comparaison de l'index pulmonaire entre un modèle murin allergique et après envenimation avec le venin d'Aah.

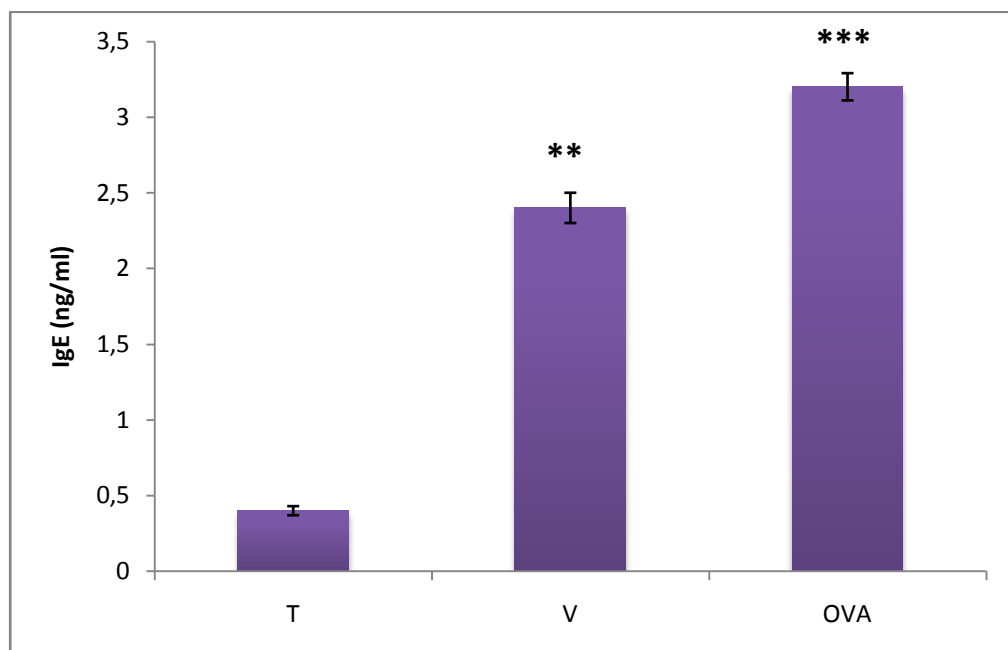


Figure 35 : Comparaison des taux d'IgE entre un modèle murin allergique et après envenimation avec le venin d'Aah.

Par ailleurs, le dosage des immunoglobulines E (IgE) après envenimation des souris avec une dose sublétales a permis de montrer l'implication du venin de scorpion dans l'augmentation significative des taux sériques d'IgE (2,4 ng/ml). Une réaction inflammatoire de type allergique induite par l'ovalbumine (OVA) provoque également une augmentation significative des concentrations sériques des IgE (3,2 ng/ml) par rapport aux témoins (0,4 ng/ml) (Figure 35). Cette augmentation des immunoglobulines E (IgE) a été déjà rapportée avec les venins de scorpions (De Medeiros et *al.*, 2008 ; Adi-Bessalem et *al.*, 2011) ainsi que le venin de guêpe *Hymenoptera* (Seismann et *al.*, 2010).

Comparativement avec un modèle allergique, les résultats obtenus suggèrent que la réponse inflammatoire provoquée par le venin de scorpion comme la réponse immunoallergique présente une importante infiltration de polynucléaires (neutrophiles et éosinophiles) et une élévation des taux d'IgE ou le mastocyte serait probablement le principal précurseur.

III-5- Effet du venin d'Aah sur la structure du poumon en présence et en absence de traitement : Comparaison avec un modèle allergique

Le poumon est l'un des tissus parenchymateux le plus sensible à l'action des venins de scorpion. Sa structure est caractérisée par une surface alvéolaire importante, un débit sanguin élevé et une facilité dans les échanges entre l'air alvéolaire et le compartiment vasculaire, permettant ainsi une absorption et une excrétion rapide des agents toxiques. Ces caractéristiques pourraient donc expliquer la gravité de l'atteinte pulmonaire au cours d'une envenimation scorpionique sévère (Hammoudi-Triki et *al.*, 2004). Une étude histologique a été entreprise sur les poumons de souris envenimées avec une dose sublétales du venin en absence et en présence de traitement avec le composé 48/80 afin d'apprécier les modifications tissulaires du tissu pulmonaire. L'observation microscopique des poumons a permis de montrer en comparaison avec les tissus pulmonaires témoins des lésions se traduisant par un épaississement des cloisons inter-alvéolaires, une infiltration des cellules inflammatoires et des œdèmes hémorragiques (Figure 36). Ces lésions sont similaires à celles observées après injection sous-cutanée d'une dose sublétales du venin d'Aah à des souris (Adi-Bessalem et *al.*, 2008), ainsi que pour le venin de *Scorpaena plumieri* (Boletini-Santos et *al.*, 2008). La mobilisation des polynucléaires activés au niveau du parenchyme pulmonaire est probablement la conséquence des constituants du venin d'Aah. Le prétraitement des animaux avec le composé 48/80 avant l'envenimation, réduit significativement le recrutement des

cellules inflammatoires aux niveaux des voies respiratoires. Cette réduction serait probablement due à l'effet du composé 48/80. Le prétraitement des animaux avec le composé 48/80 avant injection du venin de *Mesobuthus tamulus* (MBT), induit également une réduction du volume de l'œdème pulmonaire (Dutta et Deshpande, 2011).

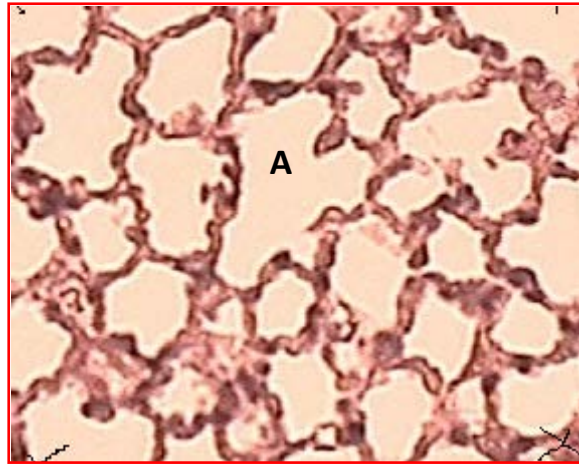
La comparaison des coupes histologiques des animaux envenimés avec le modèle allergique montre dans les deux cas, une désorganisation du parenchyme pulmonaire, se manifestant principalement par des zones œdémateuses et une infiltration des cellules inflammatoires (Figure 37). Ces résultats mettent en évidence d'une part l'impact souvent irréversible que pourrait avoir les venins et d'autre part, les réactions immunoallergiques sur la structure des voies aériennes.

III-6- Effet du venin d'Aah sur l'activité enzymatique de la LDH

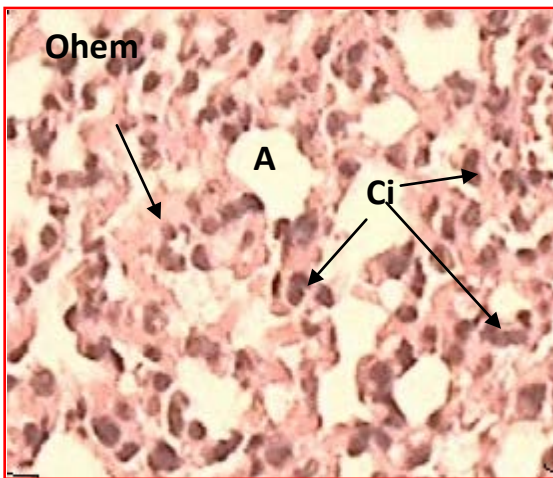
La lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme à distribution ubiquitaire. Son activité est dosée dans le sérum afin de montrer l'implication des venins dans les lésions tissulaires des organes. Des variations dans les activités enzymatiques, marqueurs de certaines lésions tissulaires ont été rapportées suite à des envenimations accidentelles ou expérimentales (Sofer et *al.*, 1990 ; Corrêa et *al.*, 1997).

La cinétique de variation de l'activité de la LDH dans le milieu vasculaire montre une augmentation graduelle avec un taux maximal après 4 h d'envenimation ($7338,25 \pm 418$ UI/L) comparativement aux témoins ($1723,75 \pm 1253,7$ UI/L), suivie d'une restauration quasi-totale de son taux 48 h après injection du venin. Parallèlement, une diminution significative des concentrations de cet enzyme est observée dans le poumon. (Figure 38).

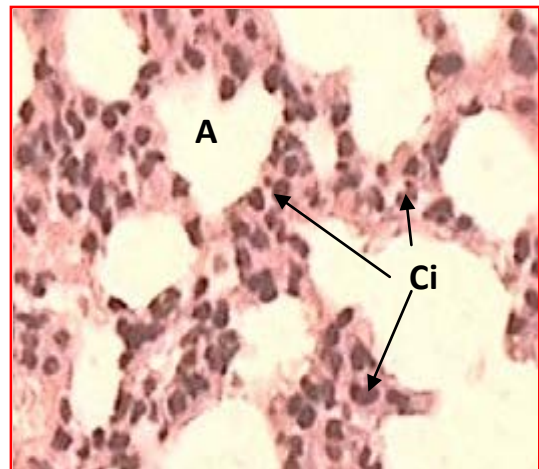
Une augmentation de l'activité de cette enzyme dans le sérum et sa diminution dans le surnageant de broyat du poumon été également observée après injection sous cutanée du venin d'*Androctonus australis hector* à des souris (Bessalem et *al.*, 2003 ; Adi- Bessalem et *al.* 2008). L'augmentation de taux sérique des enzymes et leur diminution dans les organes serait probablement due à leur diffusion anormale à partir des organes lésés et le degré de leur variation semble être proportionnel à l'intensité des perturbations tissulaires provoquées par les venins (Mohamed et *al.*, 1981 ; Corrêa et *al.*, 1997).



T (Nacl)



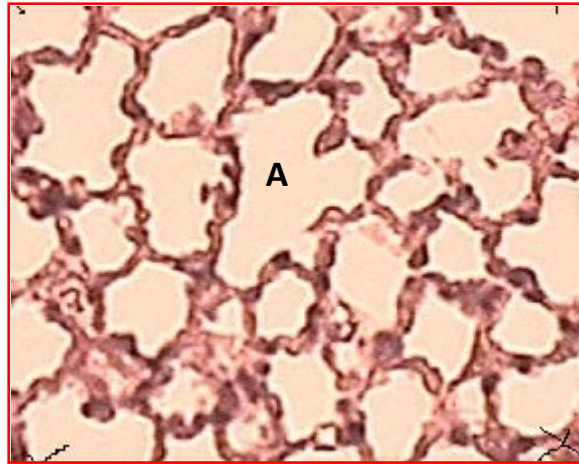
V



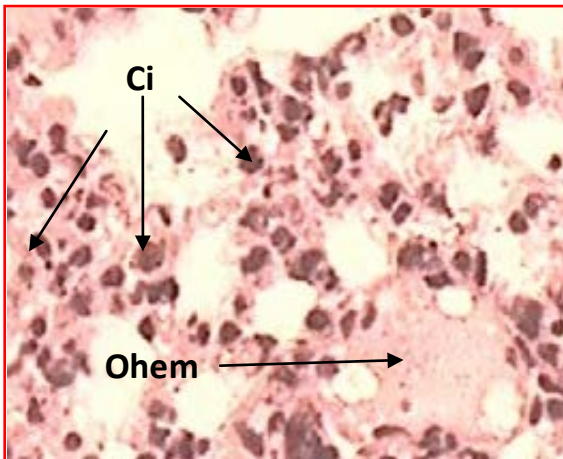
Composé 48/80 + V

Figure 36 : Effets du venin d'Aah sur le parenchyme pulmonaire en présence et en absence de traitement (Coloration HE, G X 40).

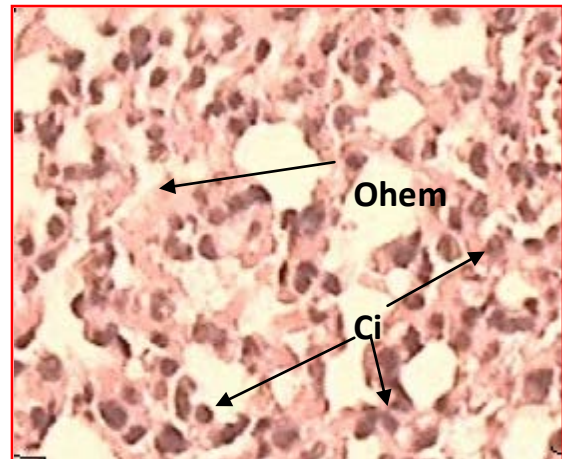
A : Alvéole, Ci : Cellule inflammatoire, Ohem : Œdème hémorragique.



T (Nacl)



OVA



V

Figure 37 : Etude comparative du parenchyme pulmonaire d'un modèle allergique avec le avec celui des animaux envenimés (Coloration HE, GX40).

A : Alvéole, Ci : Cellule inflammatoire, Ohem : Œdème hémorragique.

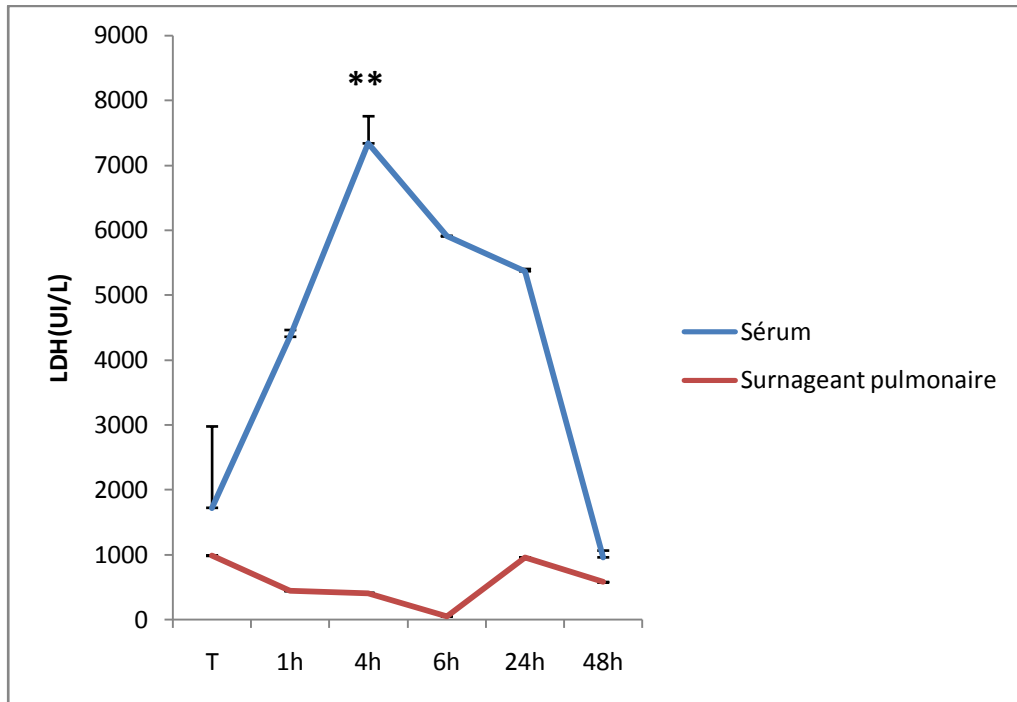


Figure 38 : Effet d'une dose sub létale du venin d'Aah sur l'activité enzymatique sérique de la LDH.

IV-Discussion Générale

L'envenimation scorpionique est une extrême urgence médicale se traduisant par l'apparition rapide des désordres hémodynamiques, métaboliques et une réaction inflammatoire aiguë. La compréhension des mécanismes d'actions par les quels les venins agissent *in vivo* serait utile pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques (Paula et *al.*, 2006).

La réponse inflammatoire est un processus physiologique de défense de l'organisme contre une agression extérieure. Elle fait intervenir différents acteurs du système immunitaire, cellulaires et moléculaires. L'ensemble des mécanismes inflammatoires sont soigneusement orchestrés par les cytokines quelles soit proinflammatoire telle que l'IL-1, le TNF- α et l'IL-6 ou bien anti-inflammatoires comme (IL-10) et parfois du TGF- β , deux cytokines connues par leur puissantes activités anti-inflammatoires et immunosuppressives (Bachoual et Boczkowski, 2005). La réponse inflammatoire est normalement bénéfique pour l'organisme mais le contraire peut se passer si l'inflammation est aiguë et chronique.

Il est maintenant bien établi que les venins de scorpion induisent un état inflammatoire aigu dont les conséquences sont la formation d'un œdème pulmonaire, des troubles cardio-respiratoires et des lésions tissulaires (De Matos et *al.*, 1997, 1999, 2001 ; Coelho et *al.*, 2007 ; Adi-Bessalem et *al.*, 2008). Une infiltration des leucocytes au niveau de la cavité péritonéale et du myocarde après injection du venin d'Aah ou de sa toxine Aah II a été rapportée par notre équipe (Sami-Merah et *al.*, 2007).

L'analyse de l'hyperréactivité pulmonaire induit par le venin d'Aah a été mise en évidence par le dosage de paramètres inflammatoires. La participation des éosinophiles dans les complications pulmonaires telles que la bronchoconstriction a été mise en évidence chez le modèle animale (Cottin, 2008 ; Adi-Bessalem et *al.*, 2012). Chez les patients atteints de pathologie pulmonaire, le rôle délétère des protéines cationiques telles que l'EPO et MBP-1 synthétisées par les polynucléaires éosinophiles a été rapporté (Aceves et Ackerman, 2010). Des études ont montré qu'un modèle animale déficient en éosinophiles présente une réduction significative du recrutement des granulocytes éosinophiles, une diminution de l'hyperplasie des cellules musculaires des poumons ainsi qu'une diminution des concentrations sérique de TGF- β (Cho et *al.*, 2004 ; Humbles et *al.*, 2004 ; Ochkuv et *al.*, 2007). Les résultats obtenus ont montré que l'envenimation des souris avec une dose sublétales du venin d'Aah induit une augmentation maximale des taux de l'EPO au niveau systémique et pulmonaire après 4 heures d'envenimation.

Des concentrations importantes de l'EPO a été également observées après l'injection des venins de *Centruroides vittatus* et *Androctonus australis hector* à des souris (Shah et al., 1989 ; Paula et al., 2006 ; Adi-Bessalem et al., 2008, 2011). les mêmes résultats ont été observé chez des patients piqués accidentellement par le venin de *Centruroides vittatus* (More et al., 2004). L'infiltration des éosinophiles dans l'arbre pulmonaire est souvent observée dans les inflammations de type allergique mais aussi dans les infections parasitaires (Finkelman et al., 2009). Dans certains cas, l'hyperréactivité bronchique (AHR) et la dégranulation des éosinophiles sont strictement dépendantes des lymphocytes T CD4, l'IL-5 semblant réguler l'éosinophilie sanguine et pulmonaire, tout en amplifiant les propriétés chimiotactiques de l'éotaxine. Dans un protocole de transfert de lymphocyte T suivi par une stimulation antigénique, à la fois les lymphocytes Th1 et Th2 sont nécessaires pour l'induction d'une réponse immunitaire et pour le recrutement d'éosinophiles, tandis que le transfert de lymphocyte Th2 seuls ne conduit qu'à une inflammation minimale. Une étude a déterminé que l'IL-5 et les éosinophiles étaient nécessaires pour la phase retardée mais pas pour la phase précoce de la réaction immunoallergique. Grâce à l'emploi de souris déficientes en IL-10, il a pu être montré que cette cytokine, l'IL- 10, d'une part contrôlait l'AHR, mais affectait marginalement l'inflammation pulmonaire, incluant l'éosinophilie et, d'autre part, régulait la production d'IL-5, et l'éosinophilie, sans affecter la production d'IL-4 et d'IgE (Capron et al., 2002). L'infiltration des polynucléaires neutrophiles au niveau de l'arbre pulmonaire est signe de syndrome de détresse respiratoire aigue (SDRA) (Park et al., 2001 ; Goodman et al., 2003). Les neutrophiles sont les premières cellules à migrer vers le site inflammatoire. Elles jouent un rôle primordiale dans l'élimination des pathogènes par phagocytose (Smith., 1994). Parallèlement à l'infiltration des polynucléaires éosinophiles dans les poumons, la cinétique de variation de l'activité de la myéloperoxydase des neutrophiles après injection de venin d'Aah a montré un profil monophasique avec apparition d'un pic 6 heures après envenimation. En effet, les venins de *Polybia paulista*, d'Aah et de *Polistes lanio lanio* induisent une élévation des taux de la MPO sérique et tissulaire (Paula et al., 2006 ; Adi-Bessalem et al., 2008 ; Yshii et al., 2009). L'activation des éosinophiles et des neutrophiles pourrait être la conséquence des constituants des venins de scorpions (De Matos et al., 1999). En effet, les venins de scorpions activent les cellules inflammatoires par un mécanisme indirect. Les toxines en se liant aux canaux ioniques des fibres sensorielles C, génèrent ainsi une dépolarisation membranaire qui aurait comme conséquence la libération du neuropeptide ou substance P.

Cette substance active les mastocytes ainsi que les cellules inflammatoires (éosinophiles, neutrophiles et lymphocytes) qui vont à leur tour via des médiateurs inflammatoires tels que l'histamine induire une réaction inflammatoire (Kalil-Gaspar., 2003 ; De Matos et al., 1999b,2001 ; Neide Galvao *et al.*, 2010), d'autres auteurs incriminent en plus de l'action indirecte, une action directe des neurotoxines. Les neurotoxines se fixent directement aux canaux membranaires des cellules immunitaires provoquent ainsi leur activation et la libération des médiateurs inflammatoires de nature lipidiques tels que les prostaglandines (PGs) et leucotriènes (LTs) (Cahalan et Chandy., 1997; Cahalan *et al.*, 2001 ; André Gustavo et al., 2006). Le rôle du neutrophile dans la survenue de la bronchoconstriction, l'influx cellulaire et le remodelage des voies aériennes à été décrit dans les mécanismes de la réponse inflammatoire immunoallergique (Bruhns, 2012).

Dans l'asthme aigu grave, de nombreux médiateurs sécrétés par les neutrophiles sont susceptibles de majorer l'inflammation bronchique, l'hyperréactivité et le trouble de perméabilité bronchique. La contribution des la métalloprotéinases dans l'inflammation bronchique a été récemment démontrée dans l'asthme aigu sévère et dans l'état de mal asthmatique. En effet Le neutrophile augmente le degré d'hyperréactivité bronchique, la déplétion en neutrophiles chez le chien et le lapin prévient la survenue de l'hyperréactivité bronchique induite par l'exposition à l'ozone (O'Byrne et al., 1984). Le neutrophile secrète aussi des médiateurs comme la métalloprotéinase 9 (MMP-9), des dérivés de l'acide arachidonique ou des médiateurs oxydatifs qui sont impliqués dans la lésion tissulaire et l'augmentation de la perméabilité épithéliale et endothéliale. Dans l'état de mal asthmatique (EMA), les taux d'albumine comme ceux de MMP-9 dans les lavages bronchiques sont très élevés, L'œdème pulmonaire résultant de ce trouble de perméabilité peut contribuer à l'élévation des résistances et à la réduction du calibre bronchique. De plus, l'extravasation intra-alvéolaire et intrabronchiolaire du liquide modifie la qualité et la quantité du mucus. Ces facteurs sont responsables en partie des résistances élevées des voies aériennes dans l'EMA, observées sous ventilation assistée (Tillie-Leblond et Thorette, 2005). L'implication des LTs dans les réactions inflammatoires induites par les venins a été mise en évidence par Paula et collaborateurs en 2006, après prétraitement des animaux avant envenimation par le MK886 (3-(1-(4-chlorobenzyl)-3-*t*-butylthio-5-isopropylindol-2-yl)-2,2-dimethylpropanoic acid), qui est un inhibiteur de la synthèse des LTs.

Le MK886 induit cette inhibition après liaison aux récepteur nucléaires activé par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR) (Biserni et *al.*, 2008). L'administration de cette substance réduit totalement l'inflammation et le recrutement des éosinophiles et des neutrophiles. Les autres constituants du venin qui représente la fraction majoritaire tels que les hyaluronidases, les bioamines (histamines et sérotonines), les protéases et les phospholipases pourraient également jouent un rôle dans l'induction de l'inflammation. En effet comparativement aux venins de serpents et d'araignées, la composition du venin de scorpion est moins riche en enzymes. Toutefois, leurs implication n'est pas à exclure. En effet l'injection hyaluronidase purifié à partir du venin de *Tityus serrulatus* à des souris induit des altérations systémiques et tissulaires (Barbaro et *al.*, 2005).

L'ensemble des médiateurs inflammatoires induit par les venins de scorpions auront comme conséquence en plus des lésions tissulaires observées aux niveaux des différents organes, une augmentation de la perméabilité vasculaire, produisant ainsi un œdème. L'œdème pulmonaire demeure un symptôme grave de l'envenimation scorpionique. Les venins de *Buthus martensi Karch*, *Tityus serrulatus* et sa toxines TsTX1 et celui de *Polistes lanio lanio* induisent une réponse inflammatoire caractérisée par la présence d'œdème associée à une augmentation de la perméabilité vasculaire et une infiltration des cellules inflammatoires (Liu et *al.*, 2008; Pessini et *al.*, 2008 ; Yshii et *al.*, 2009). La plu part des patients décédés après envenimation scorpionique présentent un œdème pulmonaire important et des complications cardiovasculaires. L'index pulmonaire (IP) et la teneur en eau pulmonaire permettent d'apprécier l'œdème pulmonaire après envenimation. Les résultats obtenus ont clairement montré que les valeurs de l'index pulmonaire et de la teneur en eau pulmonaire des lots de souris envenimés sont nettement supérieure à celles des lots de souris témoins. En plus de l'activation des polynucléaires et de médiateurs inflammatoires, l'œdème pulmonaire est une conséquence de l'activation du système *kallibréine-kinine* (lopes-Ferreira et *al.*, 2004).

Une étude a montré que le traitement des cobayes allergiques par des antagonistes des récepteurs B1 et B2 (récepteurs des kinines) réduit considérablement l'infiltration des granulocytes , de la perméabilité vasculaire et de l'œdème pulmonaire (Peron et *al.*, 1999).

En effet, l'activation des récepteurs B2 et B1 par leurs ligands respectifs aboutit à la production du monoxyde d'azote (NO), la formation de prostacycline, l'augmentation du taux de calcium Ca²⁺ intracellulaire et la formation du facteur hyperpolarisant, avec par conséquent la vasodilatation et l'augmentation de la perméabilité vasculaire.

L'activation du récepteur B2 est également à l'origine des symptômes de l'inflammation, avec l'œdème, la douleur et la libération de médiateurs proinflammatoires, comme les prostaglandines. Ce type de récepteur étant constitutif dans la plupart des cellules et des tissus, la réponse qui résulte de sa stimulation est très puissante, mais de courte durée puisqu'il subit une désensibilisation via une séquestration et une internalisation. En effet, la bradykinine (BK) active une voie Janus kinase/STAT associée à un mécanisme d'internalisation via des radicaux lipidiques (Defendi et *al.*, 2012).

Après envenimation, l'infiltration des leucocytes au niveau du site inflammatoire est caractérisée par une production accrue de radicaux libres tels que le monoxyde d'azote (NO) et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). L'or de la réponse inflammatoire, il existe un phénomène classiquement appelé *oxygen burst* qui correspond à la libération massive de radicaux libres de l'oxygène par les polynucléaires. En plus de leucocytes, les cellules endothéliales peuvent elles aussi libèrent des radicaux libres.

Le NO est un médiateur endogène important qui contrôle le système vasculaire (Moncada et *al.*, 1991). Il joue plusieurs rôles tels que la relaxation du muscle pulmonaire, la prévention des agrégations plaquettaires, la formation des thrombus et la modulation de l'inflammation par la réduction de l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales (Carden et Granger, 2000). Les résultats obtenus ont montré une augmentation des concentrations sériques et pulmonaires du NO après envenimation expérimentale par le venin d'Aah. Ces résultats corroborent avec ceux obtenus par les travaux de Petricevich et Pena en 2000, qui ont montré une élévation biphasique des taux de NO avec un pic à 2h et un pic à 6h suite à l'envenimation des souris par le venin *Tityus serrulatus*. les venins de scorpions peuvent induire l'augmentation de la NO synthétase inductible via la production de l'acétylcholine et des cytokines (Meki et *al.*, 1995; Fatani et *al.*, 1998; Meki and Mohey El-Deen, 1998; Fukuhara et *al.*, 2004; Petricevich, 2004). Le mécanisme par lequel le venin d'Aah induit l'élévation sérique du NO n'est pas connu. Cependant, l'activation des granulocytes par les constituants du venin d'Aah soit de façon directe ou indirecte pourraient être impliqués dans ce processus. Les cellules inflammatoires (neutrophiles et éosinophiles), une fois activées vont libérer des quantités massives de NO suite à l'augmentation de l'expression de la iNOS (NO synthase inductible) (Sun et *al.*, 2012), dont les conséquence sont les lésions des différents tissus de l'organisme notamment le poumon (Gutiérrez et Lomonte, 1989, 1997 ; Abdoon et Fatani., 2009).

En plus du monoxyde d'azote, le dosage du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) sérique et pulmonaire a été réalisé après envenimation des souris avec le venin d'Aah. Le H_2O_2 est un radical libre très réactif qui participe au processus d'oxydoréduction indispensable à l'homéostasie cellulaire. Dans des conditions physiologiques, le peroxyde d'hydrogène est largement produit à des concentrations bien définies par différentes cellules de l'organisme. En cas d'inflammation, les concentrations d' H_2O_2 sont en augmentation et cela est dû à l'activation des cellules inflammatoires et leur production massive de radicaux libres aux niveaux du site inflammatoire. Les résultats obtenus ont montré que les constituants du venin d'Aah induisent une élévation des taux d' H_2O_2 sérique et pulmonaire. Le venin de *Bothrops jararaca* induit également une production du peroxyde d'hydrogène (Vorraro et al., 2002). Cette élévation des taux de peroxyde d'hydrogène pourrait probablement être la conséquence à l'activation des cellules inflammatoires activées par le venin. La culture cellulaire des cardiomyocytes en présence d' H_2O_2 induit une augmentation intracellulaire de Ca^{++} , suivi par une apoptose des cellules du muscle cardiaques (Wang et al., 2008). Le dysfonctionnement du ventricule gauche observé après envenimation scorpionique pourrait être la conséquence de l'augmentation accrue du peroxyde d'hydrogène..

Le système immunitaire fait appel non seulement à de nombreuses molécules solubles actives telles que les médiateurs inflammatoires lipidiques PGs, LTs et les cytokines, mais également à des cellules effectrices (éosinophiles et neutrophiles) pour la mise en place d'une réponse appropriée. Le venin de plusieurs espèces provoque le recrutement des cellules inflammatoires et la production de plusieurs médiateurs inflammatoires chimiques (Farsky et al., 1997 ; Zanuner et al., 2002). Le dénombrement cellulaire au niveau du sang périphérique prélevé après sacrifice des souris témoins et envenimées a montré une augmentation du nombre totale de leucocytes pour atteindre un maximum 4h après injection du venin d'Aah. L'analyse des taux des différentes lignées leucocytaires a montré une variation part rapport aux souris témoins. En effet les résultats ont montré une augmentation maximale du taux des granulocytes et des monocytes 6h et 4h après envenimation respectivement.

Des résultats similaires ont été mis en évidence par Abdon et Fatani en 2009, après injection du venin de *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus* (LQQ) et après administration du venin d'Aah (Adi-Bessalem et al., 2012). Par contre une réduction des taux de lymphocytes est observée après 4h d'envenimation ; cette diminution du nombre de lymphocytes circulants est probablement due a leur migration vers les sites inflammatoires par diapédèse sous l'effets des médiateurs chimioattractants (Kaminsky et al., 2001).

L'analyse des variations hématologiques après envenimation des animaux par voie sous cutanée du venin de scorpion d'*Androctonus australis hector* ont montré une augmentation maximale du taux des globules rouges, d'hémoglobine et de l'hématocrite, 1 heure après administration du venin. Des résultats similaires ont été observés avec le venin de *Tityus serrulatus* (Cusinato et al., 2010).

Un taux élevé d'Hb pourrait être du à une hémolyse intravasculaire induite par les constituants du venin (Cronkite, 1973 ; Kankonkar et al., 1992). En effet, des travaux ont rapporté que le venin de *Buthus tamulus* est riche en hyaluronidases, phospholipases A₂, acétylcholinestérase et phosphatases alcalines. Ces enzymes seraient probablement à l'origine de l'effet hémolytique (Achyuthan et al., 1982). Les venins de serpents et de certains insectes provoquent la lyse des érythrocytes après action des phospholipases A₂ (PLA₂) qui agissent aux niveaux de la membrane des globules rouges (Krishna, 2000).

Pour les venins de scorpions dont la composition ne représente pas ou peu de phospholipases comme c'est le cas d'*Androctonus australis hector*, les taux élevés des érythrocytes, de l'hématocrite et de l'hémoglobine seraient probablement dus d'une part, à l'augmentation de l'hémoconcentration, due aux constituants du venin d'Aah qui vont activer les cellules inflammatoires et la sécrétion massive de médiateurs inflammatoires lipidiques tels que les prostaglandines et les leucotriènes qui vont engendrer une augmentation de la perméabilité vasculaire pulmonaire consécutive à la formation d'un œdème pulmonaire, (Amaral et al., 1994; Andrade et al., 2007), D'autre part, la perte du liquide sanguin pourrait être due à une hypersalivation, une lacrymation, une urination et des diarrhées observés après envenimation scorpionique (Cusinato et al., 2010). Ces phénomènes réduisent la quantité d'eau du sang périphérique et une augmentation des taux des paramètres hématologiques.

L'analyse du nombre de plaquettes sanguines après envenimation montre une augmentation du nombre des plaquettes sanguines, Le PAF (Platelet-activating factor) est un médiateur inflammatoire impliqué dans plusieurs pathologies notamment dans les réactions immunoallergiques (Ishii et al., 2000).

Le PAF peut être produit par une variété de cellules telles que les plaquettes sanguines, les granulocytes, les monocytes, les mastocytes, les cellules endothéliales et les cellules neuronales (Chao et al., 1993 ; Ishii et al., 2000 ; Tokutomi et al., 2001).

Une fois sécrété, le PAF interagit avec les récepteurs (PAFR) couplé avec une protéine G, l'activation du PAFR peut initier et moduler différentes voies de signalisation au niveau des cellules cibles par la stimulation des protéines Kinases (MAPK, PKC et Tyrosine Kinase) et les phospholipides (PLA₂ et PLC_β), dont les conséquences sont l'augmentation cytosolique du diacylglycérol (DAG), de l'inositoltriphosphate (IP3) ainsi que l'élévation intracellulaire des concentrations du calcium (Ca⁺⁺). Le PAF induit également l'activation des plaquettes sanguines déclenchant ainsi l'agrégation et la différenciation plaquettaire. Les résultats obtenus indiquent que le venin d'*Androctonus australis* hector induit une augmentation du nombre des plaquettes sanguines. Les venins de *Tityus serrulatus*, de *Crotalus durissus* *caxavella* et celui de *Bothrops jararaca* induisent la production du PAF qui pourrait être responsable de la genèse de l'œdème et des lésions pulmonaires (De Matos et al., 1997, 1999 ; Martins, 1998 ; Monteiro et Fonteles, 1999 ; Borges et al., 2000 ; Coelho., et al 2007). L'utilisation d'un antagoniste du récepteur des PAF réduit l'état inflammatoire provoqué par le venin de *Bothrops jararaca* (Teixeira et al., 1994).

Afin de connaître les différentes populations leucocytaires résidentes aux niveaux de l'arbre bronchopulmonaire après envenimation scorpionique, l'analyse du liquide bronchoalvéolaire qui demeure un outil incontournable pour apprécier la variation des différentes populations cellulaires mobilisées en cas de l'inflammation pulmonaire a été effectué. Les polynucléaires sont les acteurs « clé » d'une réponse inflammatoire et cela est due a leur pouvoir phagocytaire et leur capacité à sécréter des médiateurs inflammatoires (Ulbrich et al., 2003). Une augmentation du nombre totale des leucocytes dans le liquide broncho-pulmonaire a été observée après injection du venin d'Aah. L'analyse des différentes populations des cellules inflammatoires a montré d'une part, un taux maximal de polynucléaires granulocytes 1 heure après envenimation et d'autre part un pic des monocytes après 6 h d'envenimation. Le recrutement cellulaire au niveau de l'appareil respiratoire est dû aux constituants du venin d'Aah. Ces résultats corroborent avec ceux obtenus par Adi-Bessalem et ses collaborateurs (2011).

En effet le recrutement des cellules inflammatoires au sien de l'arbre bronchopulmonaire et l'augmentation du taux de leucocytes au niveau du liquide bronchoalvéolaire est une caractéristique des pathologies allergiques. Une étude effectuée sur 91 enfants allergiques a indiqué une augmentation significative du nombre des polynucléaires éosinophiles, l'élévation des taux d'EPC, IL-8 et de TNF α dans le liquide bronchopulmonaire. Ces résultats

confirment le rôle important joué par l'inflammation éosinophilique dans les bronches des personnes allergique.

Les IgG sont des biomolécules actifs lors d'une réaction immunitaire. Les venins induisent l'augmentation des IgG sériques dès les premières heures d'envenimation (Kopp et *al.*, 1993; Alonso et *al.*, 1995 ; Wadee et *al.*, 1997 ; Boussag-Abib et Laraba-Djebari., 2011). L'analyse de la balance des IgG (IgG1 et IgG2) après injection du venin d'Aah a permis de remarquer une prévalence des concentrations sériques des IgG1. L'élévation des taux sériques des IgG serait probablement due aux constituants de venin d'Aah qui sont très immunogènes. Il semblerait que la réponse immunitaire induite par le venin d'Aah est de dominance humorale (Th₂). Ce sous-type de lymphocyte T est considéré comme le précurseur de la réaction allergique. Des résultats similaires ont été rapportés par Boussag-Abib et Laraba-Djebari (2011), montrant ainsi un taux d'IgG1 sérique plus important que celui des IgG2 après une envenimation avec le venin d'Aah détoxifié.

L'administration de doses croissantes du composé 48/80 à un lot de souris avant envenimation a montré une réduction dans les concentrations sériques de la MPO, de l'EPO, du NO et une diminution considérable de l'index pulmonaire. Par ailleurs, une étude expérimentale est réalisée sur les effets histopathologiques causés par le venin d'Aah sur la tissu pulmonaire en présence et en absence du composé 48/80. Les observations des coupes histologiques ont montré une diminution du recrutement des cellules inflammatoires et de l'œdème pulmonaire chez les souris prétraitées par le composé 48/80. Cette inhibition de la réaction inflammatoire serait probablement due à l'épuisement des mastocytes après activation excessives par le composé 48/80. Nos résultats corroborent avec ceux obtenus avec d'autres travaux, qui ont montré d'une part que le prétraitement avec le même composé réduit le recrutement des leucocytes et la diminution de l'œdème pulmonaire (De Matos et *al.*, 1999 ; Dutta et Deshpande, 2011). D'autre part, l'utilisation d'animaux Knock-out en mastocyte a montré le rôle important des ces cellules dans la sécrétion des médiateurs inflammatoires et leur implication majeur au sien de la réaction inflammatoire induite par les venins (Mohey El-Dean, 1998). En plus des mastocytes, l'immunoglobuline E est l'un des acteurs clé d'une réaction inflammatoire de type allergique. Les mastocytes vont réguler positivement la production d'IgE par les lymphocytes B via la production d'IL-4 (Van Haltern et *al.*, 1997).

L'élévation des taux d'IgE est souvent associée aux pathologies atopiques. L'augmentation sérique des IgE est aussi observée dans d'autres pathologies telles que les infections parasitaires, virales et bactériennes (*Echinococcus*, HIV et *Mycobacterium tuberculosis*), les pathologies inflammatoires (maladie de Kimura), le dysfonctionnement hématologique (IgE myélome), la pathologie cutanée, la fibrose kystique, les néphropathies et la maladie due à une immunodéficience (Pien et Orange, 2008 ; Smith et al., 2009). En plus de ces pathologies, les venins provoquent aussi une élévation sérique des IgE (Leynadies et al., 1997 ; Nugent et al., 2004 ; De Medeiros et al., 2008 ; Seismann et al., 2010 ; Adi-Bessalem et al., 2011). Cette augmentation pourrait être la conséquence des constituants de la fraction non toxique des venins (phospholipases, les protéases et les hyaluronidases) qui joueraient probablement le rôle d'allergène. Une fois les d'IgE synthétisés, ils vont constituer une liaison croisée avec les récepteurs Fc des mastocytes, qui aura comme conséquence la dégranulation des mastocytes et une libération des médiateurs inflammatoires néoformés tels que l'histamine (Nusslein et al., 1986 ; Dutta, et Deshpande, 2011) provoquant ainsi une réaction inflammatoire de type allergique. En effet, des travaux ont montré que les hyaluronidases du venin de *Centruroides vittatus* présentaient une haute capacité immunogène de type allergique (More et al., 2004), un autre argument confortant l'implication du venin dans le mécanisme inflammatoire et le mécanisme inflammatoire de type allergique.

Par ailleurs, une comparaison des coupes histologiques du tissu pulmonaire des souris envenimées avec celles des poumons du modèle animale allergique a été effectuée. Les résultats ont montré clairement que le venin d'Aah ainsi que la sensibilisation des animaux avec l'ovalbumine (OVA) provoque une importante infiltration des polynucléaires neutrophiles, des hémorragies et un œdème pulmonaire. Des observations similaires ont été rapportées pour le venin d'*Androctonus australis hector*, *Tityus discrepans*, *Tityus serrulatus*, *Leiurus quinquestriatus*, *Buthus occitanus* et celui de *Hemiscorpius lepturus* (Hammoudi-Triki et al., 2003 ; Adi-Bessalem et al., 2008 ; D'suze et al., 2004 , 2007 ; Paneque Peres et al., 2009 ; Heidarpour et al., 2012). D'autres études expérimentales ont montré une désorganisation de la structure pulmonaire marquée par une infiltration leucocytaire et des œdèmes hémorragiques après envenimation ophidiennes : *Bothrops jararaca* (Cury et al., 1994 ; Gallagher et al., 2005), *Crotalus durissus terrificus* (Nonaka et al., 2008) et après injection du venin d'araignées, *Phoneutria nigriventer* (Leite et al., 2012).

De plus, le venin d'*Aah* une augmentation du taux sérique de la lactate déshydrogénase (LDH) avec un maximum atteint 4 h après envenimation et sa diminution au niveau de tissu pulmonaire. Cette variation du taux enzymatique pourrait être due à des lésions tissulaires des poumons. Ces lésions sont probablement dues d'une part à une action indirecte des constituants du venin, induisant une réaction inflammatoire impliquant une cascade de mécanisme mécanismes cellulaires et moléculaires. Leur action combinée aura comme conséquence une cytotoxicité cellulaire. D'autre part à une action directe via le déclenchement des processus apoptotiques (Zargan et al., 2011).

En effet le venin de *Conus lorioisii* (Saminathan et al., 2006), d'*Androctonus australis hector* (Adi-Bessalem et al., 2008) et celui de *Hemiscorpius lepturus* (Heidarpour et al., 2012) induisent une élévation des taux sériques de LDH, marqueur de lésions cellulaires et perte d'intégrité membranaire.

Conclusion

Afin d'élucider les mécanismes cellulaires et moléculaires responsables de la réaction de type immunoallergique induite lors d'une envenimation scorpionique, nous avons étudié les effets d'une dose sublétalement du venin d'*Androctonus australis Hector* sur les variations physiopathologiques (inflammatoire, métabolique et histopathologique) en présence et en absence du composé 48/80 puissant activateur des mastocytes, cellule clé dans une réaction inflammatoire de type allergique en comparaison avec modèle murin allergique induit.

Les résultats obtenus ont clairement montré, une augmentation des activités de la MPO, de l'EPO. Une élévation des taux sériques et pulmonaire du monoxyde d'azote et du peroxyde d'hydrogène. L'étude de la balance immunitaire a montré clairement une prédominance des concentrations sériques des IgG1 confirmant ainsi la capacité du venin d'*Aah* d'orienter plus la réponse immunitaire vers la voie Th2, de type humorale.

Par ailleurs, l'infiltration des cellules effectrices observée au niveau du sang périphérique et au sein de l'arbre bronchopulmonaire pourrait être probablement due à l'activation des mastocytes, cellules marqueurs d'une réaction immunitaire de type allergique. Le prétraitement des souris avec le composé 48/80 ont permis de montrer une réduction de certaines perturbations physiologiques y compris l'inflammation pulmonaire, le venin induit l'élévation des concentrations sérique des IgE d'une part et l'augmentation de l'infiltration des polynucléaires éosinophiles qui corrobore avec les variations observées déjà chez un modèle allergique. Ces résultats pourraient conforter l'hypothèse que les constituants des venins se comportent comme des allergènes en induisant une réaction d'hypersensibilité de type I.

En perspective, il serait intéressant de:

- Utiliser de souris Knockout en mastocytes « cellules clé » de la réaction inflammatoire de type allergique.
- Réaliser une étude in vitro montrant l'implication des mastocytes dans la réaction allergique en présence du venin et de ses constituants.

BIBLIOGRAPHIE

A

Abdon, N.A., Fatani, A.J., 2009. Correlation between blood pressure, cytokines and nitric oxide in conscious rabbits injected with *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus* scorpion venom. *Toxicon* 54, 471–480.

Abroug, F., Boujdaria, R., Belghith, M., Noura, S., Bouchoucha, S., 1991. Cardiac dysfunction and pulmonary oedema following scorpion envenomation. *Chest* 100, 1057-1059.

Abroug, F., Ayari, M., Novira, S., Gamra, N., Boudaria, R., Elatrous, S., Ben Farhat, M., Bouchoucha, S., 1995. Assessment of left ventricular function in severe scorpion envenomation: Combined hemodynamic and echo-Doppler study. *Intensive Care Med* 21, 629-635.

Abroug, F., El Atrous, S., Noura, D., Touzi, N., Boucoucha, S., 1999. Serotherapy in scorpion envenoming controlled trial. *Lancet* 354, 906-909.

Abroug, F., 2002. Le scorpionisme. *Infotox Bulletin de la Société de Toxicologie Clinique* 15, 1-5.

Adi-Bessalem, S., Hammoudi-Triki, D., Laraba-Djebari, F., 2008. Pathophysiological effects of *Androctonus australis hector* scorpion venom: Tissue damages and inflammatory response. *Experimental and Toxicologic Pathology* .374.

Adi-Bessalem, S., Mendil, A., Hammoudi-Triki, D., Laraba-Djebari, F., 2011. Lung Immunoreactivity and Airway Inflammation: Their Assessment after Scorpion Envenomation. *Inflammation*, 2-8.

Adi-Bessalem, S., Mendil, A., Hammoudi-Triki, D., Laraba-Djebari, F., 2012. Immuno-Inflammatory Response after Scorpion Envenomation: Potential Role of Eicosanoids and Histamine H1-Receptor. *Toxicon* 60, 172.

Adkis, CA., Blaser, K., 2003. Histamine in the immune regulation of allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 112, 15–22.

Afonso, V., Champy, R., Mitrovic, D., Collin, P., Lomri, A., 2007. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Revue du Rhumatisme* 74, 636–643.

Allakhverdi, Z., Comeau, MR., Smith, DE., Toy, D., Endam, LM., Desrosiers, M., 2009. CD341 hemopoietic progenitor cells are potent effectors of allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 123, 472-478.

Alonso, A., Scavini, L.M., Marino, G.A., Rodriguez, S.M., 1995. IgE antibodies against snake venoms. *J. Invest. Allerg. Clin. Immunol.* 5, 31–34.

Amaral, C.S.F., Barbosa, A.J.A., Leite, V.H.R., Tafuri, W.L., Resende, A.A., 1994. Scorpion sting-induced pulmonary oedema, evidence of alveolo capillary membrane permeability. *Toxicon* 32, 999-1003.

Amin, K., Ludviksdottir, D., Janson, C., Nettelblatt, O., Bjornsson, E., Roomans, G.M., Boman, G., Seveus, L., Venge, P., 2000. Inflammation and structural changes in the airways of patients with atopic and nonatopic asthma. BHR group. *Am J Respir Crit Care Med* 162, 2295-301.

Amin, K., 2011. The role of mast cells in allergic inflammation. *Respiratory Medicine* 106, 9-14.

André Gustavo, C., Bonavita, A.S., da Costa, A.L.A., Pires, A.G.C., Neves-Ferreira, J.P., Renato, S.B., Cordeiro, M.A., Martins, P.M.R., 2006. Contribution of mast cells and snake venom metalloproteinases to the hyperalgesia induced by *Bothrops jararaca* venom in rats. *Toxicon* 47, 885-893.

Anderson, S.D. et Kippellen, P., 2008. Airway injury as a mechanism for exercise-induced bronchoconstriction in elite athletes. *J ALLERGY CLIN IMMUNOL* 122, 225-229.

Andrade, M.V., Lisboa, F.A., Portugal, A.L., Arantes, R.M.E., Cunha-Melo, J.R., 2007. Scorpion venom increase mRNA expression cytokines. *Comparative biochemistry and Physiology* 46, 581-587.

Arantes, E.C., Prado, W.A., Sampaio, S.V., Giglio, J.R., 1989. A simplified procedure for the fractionation of *Tityus serrulatus* venom: isolation and partial characterization of TsTX-IV, a new neurotoxin, *Toxicon* 27, 907-916.

Ashcroft, F. M., Gribble, F. M., 2000. Tissue-specific effects of sulfonylureas. Lessons from studies of cloned K(ATP) channels. *Journal of Diabetes and Its Complications* 14, 192-196.

B

Bahloul, M., Bouaziz, M., Dammak, H., Ben Hamida, C., Ksibi, H., Rekik, N., 2002. Value of the plasma protein and hemoglobin concentration in the diagnosis of pulmonary edema in scorpion sting patients. *Intensive Care Med* 28: 1600-5.

Bahloul, M., Ben Hamida, C., Chtourou, K., Ksibi, H., Dammak, H., Kallel, H., 2004. Evidence of myocardial ischemia in severe scorpion envenomation: "Myocardial perfusion Scintigraphy study". *Intensive Care Med* 30, 461-7.

Bahloul, M., Kallel, H., Rekik, N., Ben Haminda, C., Chelly, H., Bouaziz, M., 2005. Atteinte cardiovasculaire lors d'envenimation scorpionique grave mécanisme et physiopathologie. *Réanimations* 34, 115-118.

Bachoual, R et Boczkowski, J., 2005. Role of cytokines in bronchopulmonary inflammation. *EMC-Pneumologie* 2, 74-85.

Bahna, S.L., 2012. Should exhaled nitric oxide measurement be part of routine asthma management. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 109, 289-291.

- Barbaro, K.C., Knysak, I., Martins, R., Hogan, C., Winkel, K., 2005. Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *Loxosceles spider* venoms of medical importance in the Americas. *Toxicon* 45, 489-499.
- Barhanin, J., Giglio, J.R., Leopold, P., Schmid, A., Sampaio, S.V., Lazdunski, M., 1982. Tityus serrulatus venom contains two classes of toxins. *J. Biol. Chem.* 257, 12553-12558.
- Barnes, P.J., 2004. New drugs for asthma. *Nature Reviews Drug* 3, 831-844.
- Bechis, G., Sampieri, F., Yuan, P.M., Brando, T., Martin, M.-F., Diniz, C.R., Rochat, H., 1984. Amino acid sequence of toxin VII, a b-toxin from the venom of the scorpion Tityus serrulatus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122, 1146-1153.
- Belleguic, C., Corbel, M., Germain, N., Lena, H., Boichot, E., Delaval, P.H., 2002. Increased release of matrix metalloproteinase-9 in the plasma of acute severe asthmatic patients. *Clin Exp Allergy* 32, 217-23.
- Benguedda, A.C., Laraba-Djebari, F., Ouahdi, M., Hellal, H., Griene, L., Guerenik, M, Laid, Y., C.N.L.E.S., 2002. Expérience de quinze années de lutte contre l'envenimation scorpionique en Algérie. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 95, 205-208
- Ben Khalifa, R., Stankiewicz, M., Lapied, B., Turkov, M., Zilberberg, N., Gurevitz, M., Pelhate, M., 1997. Refined electrophysiological analysis suggests that a depressant toxin is a sodium channel opener rather than a blocker. *Life Sci* 61, 819-830.
- Ben Othmen, A., Said, K., Mahamdallie, S.S., Testa, J.M., Haouas, Z., Chatti, N., Ready, P.D., 2009. Phylogeography of Androctonus species (Scorpions' Buthidae) in Tunisia: Diagnostic characters for linking species to scorpionism. *Acta Trop.* 112, 77-85.
- Bessalem, S., Hammoudi-Triki, D., Laraba-Djebari, F., 2003. Effet de l'immunothérapie sur les modifications métaboliques et hiso-pathologiques après envenimations scorpioniques expérimentales. *Bul .Soc.Pathol .Exot.*96, 110-114.
- Biserni, A., Giannessi, F., Sciarroni, A.F., Milazzo, F.M., Maggi, A., Ciana, P., 2008. In Vivo Imaging Reveals Selective Peroxisome Proliferator Activated Receptor Modulator Activity of the Synthetic Ligand 3-(1-(4-Chlorobenzyl)-3-*t*-butylthio-5-isopropylindol-2-yl)-2,2-dimethylpropanoic acid (MK-886). *Mol Pharmacol* 73, 1434-1443.
- Boletini-Santosa, D., Komegaea, E.N., Figueiredob, S.G., Haddad, V., Lopes-Ferreiraa, M., Lima, C., 2008. Systemic response induced by Scorpaena plumieri fish venom initiates acute lung injury in mice. *Toxicon* 51, 585-596.
- Bond, G.R., 1992. Antivenom administration of Centruroides scorpion stings: risk and benefits. *Ann. Emerg. Med* 21, 788-791.
- Bosmans, F., Martin-Eauclaire, M.F. and J. Tytgat., 2007. Differential effects of five 'classical' scorpion β -toxins on rNav1.2a and DmNav1 provide clues on species-selectivity," *Toxicology and Applied Pharmacology*, 218, 45-51.

Bousquet, J., Chanez, P., Lacoste, JY., Barneon, G., Ghavanian, N, Enander, I., 1990. Eosinophilic inflammation in asthma. *N Engl J Med* 323, 9.

Boussag-Abib, L., Laraba-Djebari, F., 2011. Enhanced immune sera and vaccine: Safe approach to treat scorpion envenoming. *Vaccine in press*.

Brownell, P.H and Polis, G.A, 2001. Introduction to the Scorpion Biology and Research. *Oxford Univ. Press, Oxford/NY*, 3-12.

Bruhns, P., 2012. IgG, their receptors and neutrophils: Actors of the anaphylactic reaction? *Revue française d'allergologie* 52, 333–339.

Busse, R., Mulsch, A., 1990. Induction of nitric oxide synthase by cytokines in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 275, 87–90.

Byrne, R.D., Rosivatz, E., Parsons, M., Larijani, B., Parker, P.J., Ng, T., Woscholski, R., 2007. Differential activation of the PI 3-kinase effectors AKT/PKB and p70 S6 kinase by compound 48/80 is mediated by PKC α . *Cellular Signalling* 19, 321–329.

C

Cahalan, M.D., Chandy, K.G., 1997. Ion channels in the immune system as targets for immunosuppression. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8, 749-756

Cahalan, M.D., Wulff, H., Chandy, K.G., 2001. Molecular properties and physiological roles of ion channels in the immune system. *J. Clin. Immunol* 21, 235–252.

Cain, BS., Meldrum, DR., Dinarello, CA., Meng, X., Joo, KS., Banerjee, A., 1999. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta synergistically depress human myocardial function. *Crit Care Med* 27, 18.

Capron, M., Capron, A., Dombrowicz, D., 2002. L'éosinophile, une cellule aux multiples facettes. *Rev Fr Allergol Immunol Clin* 42, 214-116.

Carneiro, A.S., Ribeiro, O.G., De Franco, M., Cabrera, W.H.K., Vorraro, F., Siqueira, M., Ibanez, O.M., Starobinas, N., 2002. Local inflammatory reaction induced by Bothrops jararaca venom differs in mice selected for acute inflammatory response. *Toxicon* 40, 1571-1579.

Catterall, W.A., 1992. Cellular and molecular biology of voltagegated sodium channels. *Physiological Reviews* 72, 15-48.

Cestele, S., Catterall, W.A., 2000. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie* 82, 883-892.

Chaubey, M.K., 2010. Changes in different blood parameters during *Mesobuthus tamulus gangeticus* Pocock. *Asian Journal of Applied Sciences* 3, 411-416.

- Chen, J et Lariviere, W.R., 2010. The nociceptive and anti-nociceptive effects of bee venom injection and therapy: A double-edged sword. *Progress in Neurobiology* 92, 151–183.
- Chippaux, J.P and Goyffon, M., 2008. Review Epidemiology of scorpionism: A global appraisal. *Acta Tropica* 107, 71–79.
- Chippaux, J.P., Diouf, A., Stock, R.P., Parra, H.J., 2011. Report of the 4th international conference on envenomations by snakebites and scorpion stings in Africa, Dakar, April 25–29, 2011. *Toxicon* 58, 426-429.
- Clot-Faybesse, O., Guieu, R., Rochat, H., Devaux, C., 2000. Toxicity during early development of the mouse nervous system of a scorpion neurotoxin active on sodium channels. *Life Sci* 66, 185-92.
- Coelho, F.M., Pessini, A.C., Coelho, A.M., Pinho, V.S., Souza, D.G., Arantes, E.C., Teixeira, M.M., Teixeira, A.L., 2007. Platelet activating factor receptors drive CXC chemokine production, neutrophil influx and edema formation in the lungs of mice injected with *Tityus serrulatus* venom. *Toxicon* 50, 420-427.
- Cohen, L., Karbat, I., Gilles, N., 2005. Common features in the functional surface of scorpion β -toxins and elements that confer specificity for insect and mammalian voltage-gated sodium channels. *Journal of Biological Chemistry* 280, 504-505.
- Cohen, L., Gilles, N., Karbat, I., Ilan, N., Gordon, D., Gurevitz, M., 2006. Direct evidence that receptor site-4 of sodium channel gating modifiers is not dipped in the phospholipid bilayer of neuronal membranes. *J. Biol. Chem.* 281, 20673-20679.
- Conroy, D.M., Humbles, A.A., Rankin, S.M., Palframan, R.T., Collins, P.D., Griffiths-Johnson, D.A., Jose, P.J., Williams, T.J., 1997. The Role of the Eosinophil-selective Chemokine, Eotaxin, in Allergic and Non-allergic Airways Inflammation. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 92, 183-191.
- Corona, M; Gurrola, G.B. and Merino, et al., 2002. A large number of novel Ergtoxin-like genes and ERG K⁺-channels blocking peptides from scorpions of the genus *Centruroides*. *FEBS Letters* 532, 121-126.
- Corrêa, M.M., Sampaio, S.V., Lopez, R.A., Mancuso, L.C., Cunha, O.A.B., Franco, J.J., Giglio, J.R., 1997. Biochemical and histopathological alteration induced in rats by *Tityus serrulatus* scorpion venom and its major neurotoxin Tityustoxin I. *Toxicon* 35, 1035-1067.
- Costa, S.K.P., De Nucci, G., Antunes, E., Brain, S.D., 2000. Involvement of vanilloid receptors and purinoceptors in the *Phoneutria nigriventris* spider venom-induced plasma extravasation in rat skin. *European Journal of Pharmacology* 391, 305–315.
- Cottin, V., 2008. Eosinophilic bronchitis. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique* 48, 196–200.
- Couraoud, F., Jover, E., Dubois, J.M., Rochat, H., 1982. Two types of scorpion toxin receptor sites, one related to the activation, the other to the inactivation of the action potential sodium channel. *Toxicon* 20, 9-16.

Couraud, F., Jover, E., 1984. Mechanism of action of scorpion toxin. *Insect Poisons, Allergens, and Other Invertebrate Handbook of Natural Toxins 2*, 659-678.

Cunha-Melo, J.R., Almeida, A.P., Gonzaga, H.M.S., Gomez, M.V., Freire-Maia, L., 1987. Effects of scorpion toxin on gastric histamine and acetylcholine content in the rat. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 20, 393-401.

Curzen, N.P., Griffiths, M.J.D., Evans, T.W., 1994. Role of the endothelium in modulating the vascular response to sepsis. *Clin Sci* 86, 359-74.

Cusinato, D.A.C., Souza, A.M., Vasconcelos, F., Guimarães, L.F.L., Leite, F.P., Gregório, Z.M.O., Giglio, J.R., Arantes, E.C., 2010. Assessment of biochemical and hematological parameters in rats injected with *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon* 56, 1477-1486.

D

Daisley, H., Alexander, D., Pitt-Miller, P., 1999. Acute myocarditis following *Tityus trinitatis* envenoming: morphological and pathophysiological characteristics. *Toxicon* 37, 65-159.

Darbon, H., Zlotkin, E., Kopeyan, C., Van Rietschoten, J., Rochat, H., 1982. Covalent structure of the insect toxin of the North African scorpion *Androctonus australis* Hector. *Int. J. Pept. Protein Res* 20, 320-330.

Darbon, H., Weber, C., Braun, W., 1991. Two-dimensional ¹H nuclear magnetic resonance study of AaHIT, an anti-insect toxin from the scorpion *Androctonus australis* Hector. Sequential resonance assignments and folding of the polypeptide chain. *Biochemistry* 30, 1836-1845.

De Blic, J., Tillié-Leblond, I., Tonnel, AB., Jaubert, F., Scheinmann, P., Gosset, P., 2004. Difficult asthma in children: an analysis of airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 113, 94-100.

Decot, V et Capron, M., 2006. Le polynucléaire éosinophile structure fonction. *Presse Med.* 35, 24-113.

Delori, P., Van Rietschoten, J. Rochat, H., 1981. Scorpion venoms and neurotoxins: An immunological study. *Toxicon* 19, 393-407.

Del Pozo, E.C., 1956. Mechanism and pharmacological actions of scorpion venoms. In: Buckley, E.E., Porges, E.N. (Eds.), *Venoms. American Association for the Advancement of Science, Washington*, 123-129.

De Matos, I.M., Rocha, O.A., Rand Freire-Maia, L., 1997. Lung oedema induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom in the rat. *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 118, 143-148.

De Matos, I.M., Souza, D.G., Seabra, D.G., Freire-Maia, L., Teixeira, M.M., 1999a. Effects of tachykinin NK1 or PAF receptor blockade on the lung injury induced by scorpion venom in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 376, 293-300.

De Matos, I.M., Teixeira, M.M., Leite, R., Freire-Maia, L., 1999b. Pharmacological evidence that neuropeptides mediate part of the actions of scorpion venom on the guinea pig ileum. *Eur. J. Pharmacol.* 368, 231-236.

De-Matos, I. M., Talvani., Freire-Maia, L., Tixiera, M., 2001. Evidence for the role of mast cells in the lung edema induced by *Tityus srrulatus* venom in rats. *Toxicon* 39, 866.

Devillier, P., 2003. Histamine, histamine receptors and antihistamines: recent data. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique* 44, 45-50.

De-Roodt, A.R., Lago, N.R., Salomon, O.D., Laskowicz, R.D., De Roman, L.E.N., Lopez, R.A., Montero, T.E., Vega., V.V., 2009. A new venomous scorpion responsible for severe envenomation in Argentina : *Tityus confluence*. *Toxicon* 53, 1-8.

Dianous, S., Hoarau, F., Rochat, H., 1987. Re-examination of the specificity of the scorpion *Androctonus australis* Hector insect toxin towards arthropods. *Toxicon* 25, 411-417.

Dinarelo, C.A., 1997. Proinflammatory and anti inflammatory cytokines as mediators of septic shock. *Chest* 112, 321-329.

Di Rosa, M., Giraud, J.P., Willoughby, D.A., 1971. Studies of the mediators of acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenin and terpendine. *J. Pathol.* 104, 15-29.

D'Suze, G., Salazar, V., Diaza, P., Sevcika, C., Azpuruac, H., Bracho, N., 2004. Histopathological changes and inflammatory response induced by *Tityus discrepans* scorpion venom in rats. *Toxicon* 44, 851-860.

D'Suze, G., Diaz, P., Salazar, V., Sevcik, C., Brazon, J., 2007. Effect of leukocyte inhibitors benzydamine and cyclophosphamide, on lung injury caused by *Tityus discrepans* scorpion venom. *Toxicon* 50, 1116-1125.

Dutta, A et Deshpande, S.B., 2011. Indian red scorpion venom-induced augmentation of cardio-respiratory reflexes and pulmonary edema involve the release of histamine. *Toxicon* 57, 193-198.

E

El Ayeb, M., Martin, M.F., Delori, P., Bechis, G., Rochat, H., 1983. Immunochemistry of scorpion α -toxins: Purification and characterization of two functionally independent IgG populations raised against toxin II of *Androctonus australis* Hector. *Molecular Immunology*, 21, 223-232.

El-Hafny, B., Chgoury, F., Adil, N., Cohen, N., Hassar, M., 2002. Intraspecific variability and pharmacokinetic characteristic of *Androctonus mauritanicus mauritanicus* scorpion venom. *Toxicon* 40, 1609-1616.

Enerback, L., Lundin, P.M., 1974. Ultrastructure of mucosal mast cells in normal and C48/80-treated rats. *Cell Tissue Res.* 150, 95-105.

Essakalli, M., Brick, C., Bennani, N., Benseffaj, N., Ouadghiri, S., Atouf, O., 2009. The latest TH17 lymphocyte in the family of T CD4+ lymphocytes. *Pathologie Biologie* 58, 437-443.

Essex, H.E., 1945. Certain animal venoms and their physiologic action. *Physiol. Rev.* 25, 148-170.

F

Farley, R., Brownell, P.H., Polis, G.A., 2001. Structure, reproduction and development. In «Scorpion biology and Research» *Oxford Univ. Press, Oxford/NY*, 13-78.

Fayet, G., Couraud, F., Miranda, F., Lissitzky, S., 1974. Electro-optical system for monitoring activity of heart cells in cultures: application to the study of several drugs and scorpion toxins. *Eur J Pharmacol* 27, 165-74.

Fialho, E.M.S., Maciel, M.C.G., Silva, C.B., Reis, A.S., Assuncano, A.K.M., Fortes, T.S., Silva, L.A., Guerra, M.N., Kwasniewski, F.H., Naximento, F.R.F., 2011. Immune cells recruitment and activation by *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon* 58, 480-485.

Finkelman, F.D., Boyce, J.A., Vercelli, D., Rothenberg, M.E., 2010. Key advances in mechanisms of asthma, allergy, and immunology in 2009. *J ALLERGY CLIN IMMUNOL* 125, 313-317.

Fitzpatrick, F.A., Wheeler, R., 2003. The immunopharmacology of paclitaxel (Taxol®), docetaxel (Taxotere®), and related agents. *International Immunopharmacology* 3, 1699-1714.

Freire-Maia, L., Azevedo, A.D., Costa Val, V.P., 1973. Respiratory arrhythmias produced by purified scorpion toxin. *Toxicon* 11, 255-257.

Freire-Maia, L., Pinto, G. I. and Franco, I., 1974. Mechanism of the cardiovascular effects produced by purified scorpion toxin in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 188, 207-213.

Freire-Maia, L., Compos, J.A., 1989. Pathophysiology and treatment of scorpion poisoning. *Natural Toxins Pergamon press Oxford*, 139-159.

Froy, O., Sagiv, T., Poreh, M., Urbach, D., Zilberberg, N., Gurevitz, M., 1999a. Dynamic diversification from a putative common progenitor of scorpion toxins affecting sodium, potassium and chloride channels. *J. Mol. Evol.* 48, 187-196.

Froy, O., Zilberberg, N., Gordon, D., Turkov, M., Gilles, N., Stankiewicz, M., Pelhate, M., Loret, E., Oren, D.A., Shaanan, B., Gurevitz, M., 1999b. The putative bioactive surface of insect-selective scorpion excitatory neurotoxins. *J. Biol. Chem.* 274, 5769-5776.

Froy, O., Gurevitz, M., 2003. New insight on scorpion divergence inferred from comparative analysis of toxin structure, pharmacology and distribution. *Toxicon* 42, 549-555.

Fukuhara, Y.D.M., Reis, M.L., Dellalibera-Joviliano R., Cunha F.Q., Donadi E.A., 2003. Increased plasma levels of IL1beta, IL6, IL8, IL10 and TNFalpha in patients moderately or severely envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. *Toxicon* 41, 49-55.

Fukuhara, Y.D.M., Dellalibera-Joviliano, R., Cunha, F.Q.C., Reis, M.L., Donadi, E.A., 2004. The kinin system in the envenomation caused by the *Tityus serrulatus* scorpion sting. *Toxicology and Applied Pharmacology* 196, 390– 395.

G

Gajalakshmi, C., 1978. Role of lytic cocktail and atropine in neutralizing scorpion venom effects. *Indian J. Med. Res.* 67, 44-1038.

Gajalakshmi, C., Ramaswami, N., Thiagarajan, C., 1978. Certain observations in electrocardiogram and enzyme variations in dogs following scorpion venom injection. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 22, 397-400.

Garden, J.W., 1965. Mast cell disruption and other changes in the pericorneal tissue morphology after intraperitoneal injections of a potent histamine liberator (C48/80). *Invest. Ophthalmol.* 4, 835-843.

Gordon, D., Jover, D., Couraud, F., Zlotkin, E., 1984. The binding of the insect selective neurotoxin AaIT from scorpion venom to locust synaptosomal membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 778, 349-358.

Gordon, D., Savarin, P., Gurevitz, M., Zinn-Justin, S., 1998. Functional anatomy of scorpion toxins affecting sodium channels. *J. Toxicol. Toxin Rev.* 17, 131-159.

Gordon, D., Ilan, N., Zilberberg, N., Gilles, N., Urbach, D., Cohen, L., Karbat, I., Froy, O., Gaathon, A., Kallen, R.G., Benveniste, M., Gurevitz, M., 2003. An 'Old World' scorpion β -toxin that recognizes both insect and mammalian sodium channels: a possible link towards diversification of β -toxins. *Eur. J. Biochem.* 270, 2663–2670.

Goudet, C., Chi, C.W., Tytgat, J., 2002. An overview of toxins and genes from the venom of the Asian scorpion *Buthus martensi Karsch*," *Toxicon* 40, 1239–1258.

Gougerot-Pocidalo, M.A., El Benna, J., Elbim, C., Chollet-Martin, S., Dang, M.C., 2002. Regulation of human neutrophil oxidative burst by pro- and anti-inflammatory cytokines. *J. Soc. Biol* 196, 37-46.

Goyffon, M., 2002. Le scorpionisme. *Revue Française des Laboratoires* 342, 41-48.

Gross, A., MacKinnon, R., 1996. Agitoxin footprinting the Shaker potassium channel pore. *Neuron* 16, 399-406.

Gueron, M., Stan, J., Cohan, W., 1967. Severe myocardial damage and heart failure in severe scorpion sting. *Am Heart J* 19, 26-719.

Gueron, M., Weizmann, S., 1969. Catecholamine excretion in scorpion sting. *Isr J Med Sci* 5, 847-855.

Gueron, M., Yarom, R., 1970. Cardiovascular manifestations of severe scorpion sting. *Chest* 57, 156-162.

Gueron, M., Adolph, R.J., Grupp, I.L., Gabel, M., Grupp, G., Fowler, N.O., 1980. Hemodynamic and myocardial consequences of scorpion venom. *Am. J. Cardiol.* 45, 979-986.

Gueron, M., Ovsyshcher, I., 1987. What is the treatment for the cardiovascular manifestations of scorpion envenomation?. *Toxicon* 25, 121-124.

Gueron, M., Margolis, S., Sofer, S., 1990a. Echocardiographic and radionuclide angiographic observations following scorpion envenomation by *Leiurus quinquestriatus*. *Toxicon* 28, 1005-1009.

Gueron M, Sofer, S., 1990b. Vasodilators and calcium blocking agents as treatment of cardiovascular manifestations of human scorpion envenomation. *Toxicon* 28,127-128.

Gurevitz, M., Karbat, I., Cohen, L., Ilan, N., Kahn, R., Turkov, M., Stankiewicz, M., Stuhmer, W., Dong, K., Gordon, D., 2007. The insecticidal potential of scorpion β -toxins. *Toxicon*, 475.

Gutiérrez, J.M. et León, G., 2009. Snake antivenoms: technological, clinical and public health issues. In: de Lima, M.E., Pimenta, A.M.C., Martin- Euclaire, M.F., Zingali, R.B., Rochat, H. (Eds.), *Animal Toxins: State of the Art. Perspectives in Health and Biotechnology. Editora UFMG, Belo Horizonte Brasil*, 393–421.

Gwee, M.C.E., Nirthanan, S., Khoo, H.E., Gopalakrishnakone, P., Kini, R.M., Cheah, L.S., 2002. Autonomic effects of some scorpion venoms and toxin. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 29, 795-801.

H

Hammoudi-Triki, D., Ferquiel, E., Robbe-Vincent, A., Bon, C., Choumet, V., Laraba-Djebari, F., 2004. Epidemiological data, clinical admission gradation and biological quantification by ELISA of scorpion envenomations in Algeria : effect of immunotherapy. *JR Soc Trop Med Hyg.* 98, 240-250.

Hammoudi-Triki, D., Lefort, J., Rougeot, C., Robbe-Vincent, A., Bon, C., Laraba-Djebari, F., Choumet, V., 2007. Toxicokinetic and toxicodynamic analyses of *Androctonus australis hector* venom in rats: optimization of antivenom therapy. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 218, 205–214.

Hawgood, B.J., 1999. Doctor Albert Calmette 1863-1933: founder of antivenomous serotherapy and of antituberculous BCG vaccination. *Toxicon* 37, 1241-1258.

Heidarpour, M., Ennaifer, E., Ahari, H., Srairi-Abid, N., Borchani, L., Khalili., G., Amini, H., Anvar, A.A., Boubaker, S., El-Ayeb, M., Shahbazzadeh, D., 2012. Histopathological changes induced by Hemiscorpius lepturus scorpion venom in mice. *Toxicon* 59, 373–378.

Hiemstra, P.S, Van Wetering, S, Stolk, J., 1998. Neutrophil serine proteinases and defensins in chronic obstructive pulmonary disease: effects on pulmonary epithelium. *Eur Respir J* 12, 8.

Hmila, I., Ben Abderrazek-Ben Abdallah, R., Saerensb, D., Benlasfard, Z., Conrathb, K., El Ayeb, M., Muvldermansb, S., Bouhaouala-Zahir, B., 2008. VHH, bivalent domains and chimeric heavy chain-only antibodies with high neutralizing efficacy for scorpion toxin Aahl. *Molecular Immunology* 45, 3847-3856.

Hogan, S.P., Rosenberg, H.F., Moqbel, R., Phipps, S, Foster, P.S, Lacy, P., 2008. Eosinophils: biological properties and role in health and disease. *Clin Exp Allergy* 38, 50-709.

Holaday , S.K ., Martin, B.M., Fletcher, P.L., Krishna, N.R., 2000. NMR solution structure of butantoxin. *Archives of Biochemistry and Biophysic.* 18-27.

I

Ipaktchi, K., Mattar, A., Niederbichler, A.D., Hoesel, L.M., Vollmannshauer, S., Hemmila, M.R., Su, G.L., Remick, D.G., Wang, S.C., 2006. Attenuating burn wound inflammatory signaling reduces systemic inflammation and acute lung injury. *J Immunol* 177, 8065-8071

Ishii, S., Shimizu, T., 2000. Platelet-activating factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice. *Prog Lipid Res* 39, 41–82.

Ismail, M., Abdoulah, M.E., Morad, A.M., Ageel, A.M., 1980. Pharmacokinetics of I25I-labelled venom from the scorpion *Androctonus amoreuxi* (Aud. and Sav.). *Toxicon*.18, 301-308.

Ismail, M., Abd-Elsalam, M.A., 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., 1995. The scorpion envenoming syndrome. *Toxicon* 33, 58-825.

J

Jain, S.R., Chhabra, M.L., Shah P., Sepaha, G.C., 1970. Myocardial injury after scorpion stings. *Indian J. Med. Sci.* 24, 6-645.

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. Res. Commun.* 95, 1607-1614.

K

Kahn, J.E., Grandpeix-Guyodo, C., Ackermann, F., Charles, P., Legrand, F., Blétry, O., 2010. Syndromes hyperéosinophiliques : actualités physiopathologiques et thérapeutiques. *La Revue de médecine interne* 31, 268-276.

Kalil-Gaspar, P., 2003. Neuropeptides napele. *Bras Dermatol.* 78, 483-498.

Kaminsky, P., Deibener, J., Lesesve, J.F., Humbert, J.C., 2001. Variations des paramètres de l'hémogramme au cours des infections. *Rev Méd Interne* 23, 133-136.

Kanda, A., Driss, V., Hornez, N., Abdallah, M., Roumier, T., Abboud, G., 2009. Eosinophil-derived IFN-gamma induces airway hyperresponsiveness and lung inflammation in the absence of lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol* 124, 1-9.

Kankonkar, R.C., Radha-krishna-murthy, K., Zare, A.M., Malathi, A., Balasubramaniani, P., Yeoleca, M.E., 1992. Reversal of cardiovascular and hemodynamic disturbances by scorpion antivenin administration in myocarditis due to envenomation by Indian red scorpion (*Buthidae* family) venom. *Rec. Adv. Toxinol. Res* 2, 61-9.

Karbat, I., Cohen, L., Gilles, N., Gordon, D., Gurevitz, M., 2004a. Conversion of a scorpion toxin agonist into an antagonist highlights an acidic residue involved in voltage sensor trapping during activation of neuronal Na⁺ channels. *FASEB J.* 18, 683-689.

Karbat, I., Turkov, M., Cohen, L., Kahn, R., Gordon, D, Gurevitz, M., Frolov, F., 2006. X-ray structure and mutagenesis of the scorpion depressant toxin LqhIT2 reveals key determinants crucial for activity and anti-insect selectivity. *J. Mol. Biol.*,

Khattabi, A., Soulaymani-Bencheikh, R., Achour, S., Salmi, L.R., 2011., Classification of clinical consequences of scorpion stings: consensus development. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 105, 364– 369.

Krifi , M.N ., Amri, F., Kharrat, H., El Ayeb, M., 1999. Evaluation of antivenom therapy on children severely envenomed by *Androctonus australis garzonii* (Aag) and *Buthus occinatus tunetanus* (Bot) scorpion venom. *Toxicon* 39, 1317-1326.

Krifi, M.N., Miled, M., Abderrezak, M., El Ayeb, M., 2001. Effect of antivenom on *Buthus accitanus tenuatanus* (Bot) scorpion venom pharmacokinetics: Toward an optimisation of antivenom immunotherapy in rabbit model. *Toxicon* 39, 1317-1326.

Krishina-Murthy, D., Billimorina, F.R., Khopkar, M., Dave, K.N., 1986. Acute hyperglycemia and hyperkalemia in acute myocarditis produced by scorpion (*Buthus tamulus*) venom injection in dogs. *Indian Heart J* 38, 4-71.

Krishina-Murthy, K.R., 2000. The scorpion envenoming syndrome: a different perspective. The physiological basis of the role of insulin in scorpion envenoming. *J.Venom.Anim.Tox* 6,

Kopeyan, C., Mansuelle, P., Sampieri, F., Brando, T., Bahraoui, E.M., Rochat, H., Granier, C., 1990. Primary structure of scorpion anti-insect toxins isolated from the venom of *Leiurus quinquestriatus*. *FEBS Lett* 261, 423-426.

Kopp, P., Dahinden, C.A., Mullner, G., 1993. Allergic reaction to snake venom after repeated bites of *Vipera aspis*. *Clin. Exp. Allergy* 23, 231-232.

L

Lagente, V., Boichot, E., Devillier, P., Advenier, C., 2003. Tachykinines et hyperréactivité des voies respiratoires. In: Vervloet D, Magnan A, editors. *Traité d'allergologie.: Médecine-Sciences Flammarion*, 313-22.

Laloo, D.G., Theakston, R.D.G., 2003. Snake antivenoms. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 41, 277-290.

Laraba-Djebari, F., Legros, C., Crest, M., Céard, B., Romi, R., Mansuelle, P., jacquet, M., Van Rietschoten, J., Gola M., Rochat, H., Bougis, P.E., Martin-Eauclaire, M.F., 1994. The Kaliotoxine family enlarged: Purification, Characterisation, and precursor nucleotide sequence of KTX2 from *Androctonus australis hector*. *J.Biol.Chem.* 269, 32815-32843.

Laraba-Djebari., 1996. Etude des polypeptides pharmacologiquement actifs isolés à partir de la vipère *Cerastes cerastes* et du scorpion *Androctonus australis hector* purification, caractérisation biochimique et pharmacologiques. *Thèse de doctorat présentée à l'USTHB*, Alger : p 12-23-24-26-41-42.

Laraba-Djebari F et Hammoudi-Triki, D., 1998. Utilisation de la fraction toxique majoritaire isolée à partir du venin de scorpion Aah d'Algérie dans la valorisation du sérum antiscorpionique. *Archives de l'institut Pasteur d'Algérie* 64, 254-265.

Lee, Y.C., Lee, J.C., Seo, Y.B., Kook, Y.B., 2005. Liriopsis tuber inhibit OVA-induced airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness in murine model of asthma. *Journal of Ethnopharmacology* 101, 144-152.

Legros, C et Martin-Eauclaire, M.F., 1997. Influence of a NH₂-terminal extension on the activity of KTX2, a K⁺ channel blocker purified from *Androctonus australis* scorpion venom. *FEBS Letters*, Volume 417, 123-129.

Leite, K.R.M., Andrade, E., Ramos, A.T., Magnoli, F.C., Srougi, M., Troncone, L.R.P., 2012. Phoneutria nigriventer spider toxin Tx2-6 causes priapism and death: Ahistopathological investigation in mice. *Toxicon* 60, 797-801.

Lester, D., Lazarovici, P., Pelhate, M., Zlotkin, E., 1982. Two insect toxins from the scorpion *Buthotus judaicus*. Purification, characterization and action. *Biochim. Biophys. Acta* 701, 370-387.

Li, H., Yang, L., Zheng, C.Y., Wang, J., Abdullah, A.S., 2012. Use of bronchoalveolar lavage enzyme-linked immunospot for diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 16, 68-73.

Lima, M.E., Martin, M.-F., Diniz, C.R., Rochat, H., 1986. Tityus serrulatus toxin VII bears pharmacological properties of both b-toxin and insect toxin from scorpion venoms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 139, 296-302.

Lourenço, W.R., 1996. A propos de deux espèces nouvelles appartenant au genre *Butheoloides* Hirst (Scorpiones, Buthidae). *Rev. Arachnol.* 11, 87-94.

M

Macklem, P.T., 1996. A theoretical analysis of the effect of airway smooth muscle load on airway narrowing. *Am J Respir Crit Care Med* 153, 9-83.

Magalhaes, M.M., Pereira, M.E, Amaral, C.F., Rezende, N.A., Campolina, D., Bucarechi, F., 1999. Serum levels of cytokines in patients envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. *Toxicon* 37, 55-64.

Martin, M.F et Rochat, H., 1986. Large scale purification of toxins from the venom of the scorpion *Androctonus australis* Hector. *Toxicon* 24, 1131-1139.

Martin, M.F., Garcia, Y., Perez, L.G., El Ayeb, M., Kopeyan, C., Bechis, G., Jover, E., Rochat, H., 1987. Purification and chemical and biological characterizations of seven toxins from the Mexican scorpion, *Centruroides suffusus suffusus*. *J. Biol. Chem.* 262, 4452-4459.

Martin-Eauclaire, M.F., Couraud, F., 1995. Scorpion neurotoxins: effects and mechanisms. In: Chang, L.W., Dyer, R.S. (Eds.), *Handbook of Neurotoxicology*. Marcel Dekker, New York, 683-716.

Martin-Eauclaire, M.F., Legros, C., Bougis B.E., Rochat, H., 1999. Les toxines des venins de scorpion. *Annales de l'Institut Pasteur/Actualités* 10, 207-222.

Mazzei de Davila, C.A., Davila, D.F., Donis, J.H., De Bellabarba, G.A., Villarreal, V., Barboza, J.S., 2002. Sympathetic nervous system activation, antivenin administration and cardiovascular manifestations of scorpion envenomation. *Toxicon* 40, 39-46.

Menezes, T.N., Carnielli, J.B.T., Gomes, H.L., Pereira, F.E.L., Lemos, E.M., Bissoli, N.S., Lopes-Ferreira, M., Andrich, F., Figueiredo, S.G., 2012. Local inflammatory response induced by scorpionfish *Scorpaena plumieri* venom in mice. *Toxicon* 60, 4-11.

Messadi, A., Fekih-Mrissa, N., Zaouali, J., Layouni, S., Nsiri, B., Yedeas, M., Raies, A., Mrissa, R., Gritli, N., 2012. Implication de la mutation A224D du récepteur de facteur activateur des plaquettes dans la susceptibilité a la forme rémittente de la sclérose en plaques : étude d'une population tunisienne. *Pathologie Biologie* 60, 185-189.

Metz, M., Maurer, M., 2007. Mast cells-key effector cells in immune responses. *Trends. Immunol.* 28, 234-241.

Mion, G., Larréché, S., Goyffon, M., 2007. Envenimations ophidiennes. *Mise au point : envenimations ophidiennes*, 6.

Moncada, S., Palmer, R.M.J., Higgs, E.A., 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43, 42-109.

Morais, J.F., De Freitas, M.C.W., Yamaguchi, I.K., Dos Santos, M.C., Dias Da Silva, W., 1994. Snake antivenoms from hyperimmunized horses: comparison of the antivenom activity and biological properties of their whole IgG and F (ab')₂ fragments. *Toxicon* 32, 725-734.

More, D.J., Nugent, L., Hagan, J., Demain, H., Schwertner, B., Whisman., Freeman, T., 2004. Identification of allergens in the venom of the common striped scorpion. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology* 93, 493-498.

Moskowitz, H., Herrmann, R., Zlotkin, E., Gordon, D., 1994. Variability among insect sodium channels revealed by binding of selective neurotoxins. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 24, 13-19.

Mousli, M., Bronner, C., Landry, Y., Bockaert, J., Rouot, B., 1990. Direct activation of GTP-binding regulatory proteins (G-proteins) by substance P and compound 48/80, *FEBS Lett.* 259, 260-262.

Muller, G.J., 1993. Scorpionism in South Africa. A report of 42 serious scorpion envenomations. *South African Medical Journal* 83, 405-411.

Murugesan, S., Murthy, K.R.K., Noronha, P.D., Samuel, A.M., 1999. Tc 99m scorpion venom: labeling, biodistribution and seintiimaging. *Jour Venom Animal and Toxi* 5.

N

Nawa, Y., Horri, Y., Okada., M., Arizono, N., 1994. Histochemical and cytological characterizations of mucosal and connective tissue mast cells of Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Int. Arch. Allergy Imm.* 104, 249-254.

Neide Galvao, N., Marlos Cortez, S., Renata Amaral, O., Catarina, T., 2010. Contribution of mast cells to the oedema induced by Bothrops moojeni snake venom and a pharmacological assessment of the inflammatory mediators involved. *Toxicon* 55, 350.

Nonaka, P.N., Amorim, C.F., Paneque Peres, A.C., e Silva, C.A.M., Zamuner, S.R., Ribeiro, W., Cogo, J.C., Vieira, R.P., Dolhnikoff, M., de Oliveira, L.V.F., 2008. Pulmonary mechanic and lung histology injury induced by *Crotalus durissus terrificus* snake venom. *Toxicon* 51, 1158-1166.

Nouira, S., Abroug, F., Haguiga, H., Jaafoura., Boujdaria, R and Bouchoucha, S., 1995. Right ventricular dysfunction following severs scorpion envenimation. *Chest* 108, 682-687.

Nouira, S., Elatrous, S., Besbes, L., Boukef, R., Deveaux, C., Aubrey, N., El Ayab, M., Abroug, F., 2005. Neurohormonal activation in severe scorpion envenomation: correlation with hemodynamics and circulating toxin. *Toxicology and Applied Pharmacology* 208, 111-116.

Nouira, S., Elatrous, S., Besbes, L., Boukef, R., Devaux, C., Aubrey, N., El Ayeb, M, Abroug F., 2005. Neurohormonal activation in severe scorpion envenomation: correlation with hemodynamics and circulating toxin. *Toxicol Appl Pharmacol.*208, 6-11.

Norrby, K., Enestrom, S., 1984. Cellular and extracellular changes following mast-cell secretion in avascular rat mesentery. *Cell Tissue Res.* 235, 339-345.

Noxon, J.O., 1991. Urticaria and Angioedema. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (SmallAnimal)*, 265-272.

Nusslein, H.G., Kleinlein, M., Hemmerlein, B., Kalden, J.R., 1986. Different patterns of antigen-induced histamine release during immunotherapy in insect venom and pollen allergy. *Agents and Actions* 18, 248-250.

O

O'Byrne, P.M., Walters, E.H., Gold, B.D., Aizawa, H.A., Fabbri, L.M., Alpert, S.E., 1984. Neutrophil depletion inhibits airway hyperresponsiveness induced by ozone exposure. *Am Rev Respir Dis* 130, 9.

Ohnishi, H., Takeda, K., Domenico, J., Lucas, J.J., Miyahara, N., Swasey, C.H., 2009. Mitogen activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase 1/2-dependent pathways are essential for CD81 T cell-mediated airway hyperresponsiveness and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 123, 57.

Ohtsu, H., Watanabe, T., 2003. New functions of histamine found in histidine decarboxylase gene knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* 305, 443-7.

Olsen, F., 1972. Inflammatory cellular reaction in hypertensive vascular disease in man. *Acta Pathol Microbiol Scand* .80, 253-256.

Oren, D.A., Froy, O., Amit, E., Kleinberger-Doron, N., Gurevitz, M., Shaanan, B., 1998. An excitatory scorpion toxin with a distinctive feature: an additional α -helix at the C-terminus and its implications for interaction with insect sodium channels. *Structure* 6, 1095-1103.

Osnaya-Romero, N., De Jesus Medina-Hernandez, T., Flores-Hernandez, S.S., Leon-Rojas, G., 2001. Clinical symptoms observed in children envenomed by scorpion stings, at the children's hospital from the State of Morelos, Mexico. *Toxicon* 39, 781-785.

P

Paludo, K.S., Biscaia, S.M., Chaim, O.M., Otuki, M.F., Naliwaiko, K., Dombrowski, P.A., Franco, C.R., Veiga, S.S., 2009. Biotechnological applications of brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins. *Biotechnology Advances* 26, 210-218.

Paneque Peres, A.C., Nonaka, P.N., de Carvalho, P.D.C., Toyama, M.H., e Silva, C.A.M., de Paula Vieira, R., Dolhnikoff, M., Zamuner, S.R., de Oliveira, L.V.F., 2009. Effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom on lung mechanics and inflammation in mice. *Toxicon* 53, 779-785.

- Park, W.Y., Goodman, R.B., Ruzinski, J.T., Radella, F., Park, D.P., 2001. Cytokine balance in the lung of patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respr Crit Care Med* 164, 1896-1903.
- Park, J.W., Min H.J., Sohn, J.H., Kim, J.Y., Hong, J.H., Sigrist, K.S., 2009. Restoration of T-box-containing protein expressed in T cells protects against allergen-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol* 123, 85.
- Pelhate, M., Zlotkin, E., 1982. Actions of insect toxin and other toxins derived from the venom of the scorpion *Androctonus australis* on the isolated giant axons of the cockroach (*Periplaneta americana*). *J. Exp. Biol.* 97, 67-71.
- Perrin-Foyolle, M., Pacheco, Y., Harf, R., Biot, N., Gindre, D., Vergnon, J.M., 1982. Apport du lavage broncho-alvéolaire au diagnostic de la sarcoïdose broncho-pulmonaire. *Acta Endoscopica* 12, 3986-410.
- Petricевич, V.L., Pena, C.F., 2002. The dynamics of cytokine and nitric oxide secretion in mice injected with *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Mediators of Inflammation* 11, 173-180.
- Petricевич, V.L., 2006. Balance between pro- and anti-inflammatory cytokines in mice treated with *Centruroides noxius* scorpion venom. *Mediators of Inflammation* Article ID 54273: 1-11
- Petricевич, V.L., 2010. Scorpion Venom and the Inflammatory Response. *Hindawi Publishing Corporation Mediators of Inflammation* 16, 1-5.
- Pessini, A.C., Souza, A.M., Faccioli, L.H., Gregorio, Z.M., Arantes, E.C., 2003. Time course of acute-phase response induced by *Tityus serrulatus* venom and TsTX-I in mice. *Int. Immunopharmacol.* 3, 65-74.
- Pimenta, A.M.C., Legros, C., De Marco Almeida, F., 2003. "Novel structural class of four disulfide-bridged peptides from *Tityus serrulatus* venom," *Biochemical and Biophysical Research Communications* 301, 1086-1092.
- Pinheiro, C.B., Marangoni, S., Toyama, M.H., Polikarpov, I., 2003. Structural analysis of *Tityus serrulatus* Ts1 neurotoxin at atomic resolution: insights into interactions with Na⁺ channels. *Acta Cryst. D* 59, 405-415.
- Pintar, A., Possani, L.D., Delepierre, M., 1999. Solution structure of toxin 2 from *Centruroides noxius* Hoffmann, a β -scorpion neurotoxin acting on sodium channels. *J. Mol. Biol.* 287, 359-367.
- Polis, G.A., 1990. The biology of scorpions. *Stanford University Press*, 1-8.
- Possani, L.D., Martin, B.M., Svendsen, I., Rode, G.S., Erickson, B.W., 1985. Scorpion toxins from *Centruroides noxius* and *Tityus serrulatus*. Primary structures and sequence comparison by metric analysis. *Biochem. J.* 229, 739-750.
- Possani, L.D., Becerril, B., Delepierre, M., Tytgat, J., 1999. Scorpion toxins specific for Na⁺ channels. *Eur. J. Biochem.* 264, 287-300.

Possani, L.D., Becerril, B., Tytgat, J., Delepierre, M., 2000. High affinity scorpion toxins for studying potassium and sodium channels. In: Lopatin, A., Nichols, C.G (Eds), Ion channel Localisation Methods and Protocol, *Humana Press Inc*, 145-165.

R

Radmanes, M., 1990. Clinical study of *Hemiscorpion lepturus* in Iran. *J. Trop. Med. Hyg* 93,327-32.

Rattmann, Y.D., Pereira, C.R., Cury, Y., Gremski, W., Marques, M.C.A., da Silva-Santos, J.E., 2008. Vascular permeability and vasodilation induced by the *Loxosceles intermedia* venom in rats: Involvement of mast cell degranulation, histamine and 5-HT receptors. *Toxicon* 51, 363–372.

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.

Revelo, M.P., Bambirra, E.A., Ferreira, A.P., Diniz, C.R., Chavez-Olortegni., 1996. Body distribution of *Tityus serrulatus* scorpion venom in mice and effects of scorpion antivenom. *Toxicon* 34, 1119-1125.

Ribeiro, R.A., Souza-Filho, M.V., Souza, M.H., Oliveira, S.H., Costa, C.H., Cunha, F.Q., Ferreira, H.S., 1997. Role of resident mast cells and macrophages in the neutrophil migration induced by LTB₄, fMLP and C5a. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 112, 27-35.

Rivière, G et Bon, C., 1999. Immunothérapie antivenimeuse des envenimations ophidiennes: vers une approche rationnelle d'un traitement empirique. *Annales de l'Institut Pasteur* 10, 173-182.

Rodriguez de la Vega, R., C., Possani, L.D., 2004: Current views on scorpion toxins specific for K⁺ channels. *Toxicon* 43, 865-875.

Romagnani, S., 2002. Cytokines and chemoattractants in allergic inflammation. *Molecular Immunology* 38, 881–885.

Roos, D., Van-Bruggen, R., Meischl, C., 2003. Oxidative killing of microbes by neutrophils. *Microbes Infect.*, 5, 1307-1315.

Rothenberg, M.E and Hogan S.P., 2006. The eosinophil. *Annu Rev Immunol* 24, 47–74.

S

Sami-Merah S., Hammoudi-Triki D., Martin-Eauclaire M.F., Laraba-Djebari F., 2007. La toxine Aah II d'*Androctonus australis Hector*: effets inflammatoire et histopathologique. I *Toxines émergentes: nouveaux risques*. Coll. Rencontres en Toxinologie, Lavoisier, 203-204.

Sami-Merah, S., Hammoudi-Triki, D., Martin-Eauclaire, M.F., Laraba-Djebari, F., 2008. Combination of two antibody fragments F(ab')₂/Fab : An alternative for scorpion envenoming treatment. *Intern Immuno Pharmacol* 8, 1386-1394.

Sami-Merah S., Hammoudi-Triki D., Adi-Bessalem, S., Mendil, A., Laraba-Djebari F., 2009. L'augmentation de la perméabilité vasculaire serait-elle un facteur déclenchant de l'œdème pulmonaire induit par le venin du scorpion *Androctonus australis hector*? *Toxines et signalisation. Rencontres en Toxicologie Ed de la SFET*, 161-162.

Schottler, W.H.A., 1954. On the toxicity of scorpion venom. *Am. J. Trop.Hyg.* 3, 172–178.

Shah, P.K., Lakhota, M., Chittora, M., Mehta,S., Purohit, A., 1989. Pulmonary infiltration with blood eosinophilia after scorpion sting. *Chest* 95: 691–692.

Shefler et Sagi-Eisenberg., 2001. Gi mediated activation of the Syk kinase by the receptor mimetic basic secretagogues of mast cells : role in mediating arachidonic acid metabolites release. *J.Immunol.*, 167,475-481

Shieh, C.C., Coghlan, M., Sullivan, J.P and Gopalakrishnan, M., 2000. Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities,” *Pharmacological Reviews* 52, 557–594.

Sigurs, N., Hattevig, G., Kjellman, B., Kjellman, N.I., Nilsson, L., Bjorksten, B., 1994. Appearance of atopic disease in relation to serum IgE antibodies in children followed up from birth for 4 to 15 years. *J Allergy Clin Immunol* 94, 757–63.

Singleton, E.M ., Clark, SL. 1965. The response of mast cells to C48/80 studied with the electron microscope. *Lab. Invest.* 14, 1763-1744.

Siraganian, R.B., 2003. Mast cell signal transduction from the high-affinity IgE receptor. *Current Opinion in Immunology* 15, 639-646.

Sjöström, L., Abdulla, A.L., Rawat, I.H., Smith, D.C., Landon, J.A., 1994. Comparison of ovine and equine antivenom. *Toxicon* 32, 433-247.

Sofer, S., Shahak, E., Slonim, A. and Gueron, M., 1991. Myocardial injury without heart failure following envenomation by scorpion *Leiurus quinquestriatus* in children. *Toxicon* 29, 382-385.

Sofer, S., 1995. Scorpion envenomation. *Intensive Care. Med.* 21, 626-628.

Strugatsky, D., Zilberberg, N., Stankiewicz, M., Ilan, N., Turkov, M., Cohen, L., Pelhate, M., Gilles, N., Gordon, D., Gurevitz, M., 2005. Genetic polymorphism and expression of a highly potent scorpion depressant toxin enables refinement of the effects on insect Na-channels and illuminates the key role of Asn-58. *Biochemistry* 44, 9179–9187.

Stampfli, M.R., Scott Neigh, G., Wiley, R.E., Cwiartka, M., Ritz, S.A., Hitt, M.M., 1999. Regulation of allergic mucosal sensitization by interleukin-12 gene transfer to the airway. *Am J Respir Cell Mol Biol* 21, 17–26.

Szeberényi, J.B., Pállinger, E., Zsinkó, M., Pós, Z., Rothe, G., Orsó, E., Szeberényi, S., Schmitz, G., Falus, A., László, V., 2001. Inhibition of effects of endogenously synthesized histamine disturbs in vitro human dendritic cell differentiation. *Immunology Letters* 76, 175–182.

T

Tenenholz, T. C., Klenk, K. C., Matteson, D. R., Blaustein, M. P. and D. J. Weber. 2000. Structural determinants of scorpion toxin affinity: the charybdotoxin (α -KTX) family of K⁺- channel blocking peptides. *Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology*, 140, 135–185.

Teixeira, A.L, Fontoura, B.F., Freira-Maia, L., Machado, C.R.S., Camargo, E.R.S., Teixeira, M.M., 2001. Evidence for a direct action of *Tityus serralutus* on the cardiac muscle. *Toxicol* 39, 703–709.

Têtu, L., Prévot, G., Didier, A., 2007. Measuring exhaled nitric oxide and monitoring asthma. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique* 47, 150–152.

Thottingal, T.B., Stefura, P., Estelle, F., Simons, R., Bannon, G.A., Burks, W., HayGlass, K.T., 2006. Human subjects without peanut allergy demonstrate T cell-dependent, TH2-biased, peanut-specific cytokine and chemokine responses independent of TH1 expression. *J ALLERGY CLIN IMMUNOL* 118, 905-914.

Tillié-Leblond, I et Thorette, C., 2005. Neutrophils and severe asthma attacks. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique* 45, 63–67.

Towes., G.B., 1997. Macrophages. In: *Asthma*. Ed(s) BARNES, P.J., GRUNSTEIN, M.M., LEFF, A.R., WOOLCOCK, A.J., *Lippencourt-Raven*, 381-398.

Trifilieff, A., El-hashim, A., Bertrand, C., 2000. Time course of inflammatory and remodeling events in a murine model of asthma: effect of steroid treatment. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279, 1120–1128.

Turkov, M., Rashi, S., Zilberberg, N., Gordon, D., Ben Khalifa, R., Stankiewicz, M., Pelhate, M., Gurevitz, M., 1997. In vitro folding and functional analysis of an anti-insect selective scorpion depressant neurotoxin produced in E coli. *Prot. Express. Purific.* 9, 123–131.

Tytgat,J., Chandy, K. G., Garcia, M. L., 1999. A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: α -KTx molecular subfamilies,” *Trends in Pharmacological Sciences*20, 444–447.

Tytgat, J., Chandy, K. G., Garcia, M.L., 1999. A unified nomenclature for short-chain peptides isolated fromscorpion venoms: α -KTx molecular subfamilies. *Trends in Pharmacological Sciences.* 444-447.

V

Vazquez, A., Tapia, J.V., Eliason, W.K., Martin, B.M., Lebreton, F., Delepierre, M., Possani, L.D., Becerril, B., 1995. Cloning and characterization of the cDNAs encoding Na⁺ channel specific toxins 1 and 2 of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Toxicon* 33, 1161–1170.

Villalonga, N., Ferreres, J. C., Argiles, J. M., Condom, M., Felipe, A., 2007. Potassium channels are a new target field in anticancer drug design. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery* 2, 212–223.

Von Bubnoff, D., Geiger, E., Bieber, T.B., 2001. Antigen-presenting cells in allergy. *J ALLERGY CLIN IMMUNOL* 108, 330-336.

W

Wadee, A.A., Rabson, A.R., Path, M.C.R., 1987. Development of specific IgE antibodies after repeated exposure to snake venom. *J. Allergy Clin. Immunol.* 80, 695–698.

Wang R, Moreau P, Deschamps A, de Champlain J, Sauve R, Foucart S., 1994. Cardiovascular effects of *Buthus martensii* (Karsch) scorpion venom. *Toxicon* 32, 191-200.

Wegner, CD., Torcellini, C.A, Clarke, C.C., Letts, L.G., Gundel, R.H., 1991. Effects of single and multiple inhalations of antigen on airway responsiveness in monkeys. *J Allergy Clin Immunol* 87, 35–41.

Wolber, C., 2005. Caractérisation du mécanisme impliqué dans la bronchoconstriction à l'adénosine potentialisée par une provocation allergique chez le rat «Brown Norway » activement sensibilisé. Thèse de Doctorat de l'université LOUIS PASTEUR DE STRASBOURG.

Y

Yarom, R., Braun, K., 1970. Cardiovascular effects of scorpion venom, morphological changes in the myocardium. *Toxicon* 8, 4-6.

Yshii, L.M., Souza, G.H.M.F., Camargo, E.A., Eberlin, M.N., Ribela, M.T.C.P., Muscara, M.N., Hyslop, S., Costa, S.K.P., 2009. Characterization of the mechanisms underlying the inflammatory response to *Polistes lanio lanio* (paper wasp) venom in mouse dorsal skin. *Toxicon* 53, 42–52.

Z

Zargan, J., Sajad, M., Umar, S., Naime, M., Ali, S., Khan, H.A., 2011. Scorpion (*Androctonus crassicauda*) venom limits growth of transformed cells (SH-SY5Y and MCF-7) by cytotoxicity and cell cycle arrest. *Experimental and Molecular Pathology* 91, 447–454.

Zhuang, X., Silverman, A.J., Silver, R. 1996. Brain mast cell degranulation regulates blood-brain barrier. *J. Neurobiol.* 31, 393-403.

Zlotkin, E., Miranda, F., Rochat, H., 1978. Chemistry and pharmacology of Buthinae scorpion venoms. *Arthropods Venoms. Springer, New York*, 317–369.

Zlotkin, E., Kadouri, D., Gordon, D., Pelhate, M., Martin, M-F., Rochat, H., 1985. An excitatory and a depressant insect toxin from scorpion venom both affect sodium conductance and possess a common binding site. *Arch. Biochem. Biophys* 240, 877–887.

Zlotkin, E., Eitan, M., Bindokas, V.P., Adams, M.E., Moyer, M., Burkhart, W., Fowler, E., 1991. Functional duality and structural uniqueness of depressant insect-selective neurotoxins. *Biochemistry* 30, 4814–4821.

Zlotkin, E., 1997. Insect selective neurotoxins from scorpion venoms affecting sodium conductance. *Toxins and Signal Transduction. Harwood Press, Amsterdam*, 95–117.

Résumé

L'envenimation scorpionique constitue un problème de santé publique dans de nombreuses régions tropicale et subtropicale. En Algérie l'incidence annuel est de 170 piqures de scorpion par 100.000 habitants avec un taux de mortalité de 0,38 par 100.000 habitants (Benguedda *et al.*, 2002). La plupart des envenimations scorpionique sont dues à *Androctonus australis hector* (Aah). Aah est l'espèce la plus dangereuse parmi les scorpions de la famille des Buthidae et responsable d'environ 80% des cas sévères d'envenimations (Hmila *et al.*, 2008). Les constituants du venin d'Aah pourraient être responsables d'une réaction de type immunoallergique étant donné l'observation d'une infiltration des éosinophiles et l'augmentation dans la production des IgE, de cytokines et de l'histamine lors d'une envenimation expérimentale. (Adi-Bessalem *et al.*, 2011). Une connaissance plus approfondie du mécanisme d'action des constituants du venin d'Aah, serait utiles pour une meilleure prise en charge des victimes piquées par les scorpions. Le travail entrepris a consisté dans un premier temps à l'étude de l'état inflammatoire induit par le venin d'Aah après envenimation d'un modèle expérimentale et dans un second temps, la mise en exergue de l'implication des mastocytes dans le processus inflammatoire après envenimation a été analysée comparativement avec un modèle murin allergique. Les résultats obtenus ont clairement montré, une augmentation des activités de la MPO, de l'EPO. Une élévation des taux sériques et pulmonaire du monoxyde d'azote (NO) et du peroxyde d'hydrogène. L'étude de la balance immunitaire montre une prédominance des concentrations sériques des IgG1 confirmant ainsi la capacité du venin d'Aah à orienter la réponse immunitaire vers la voie Th2, de type humorale. Par ailleurs, l'infiltration des cellules effectrices observée au niveau du sang périphérique et au sein de l'arbre bronchopulmonaire pourrait être probablement due à l'activation des mastocytes, cellules marqueurs d'une réaction immunitaire de type allergique. Le prétraitement des souris par le compound 48/80 ont permis de montrer une réduction de certains perturbations physiologiques y compris l'inflammation pulmonaire. L'élévation des concentrations sérique d'IgE et la séquestration des polynucléaires neutrophiles et des éosinophiles au niveau des voie aériennes après injection du venin conforter l'hypothèse que les constituants de venins se comportent comme des allergènes en induisant une réaction d'hypersensibilité de type I.

Summary

The scorpionique poisoning constitutes a major problem of public health in numerous tropical and subtropical regions. In Algeria, the annual incidence is 170 bites of scorpion per 100.000 inhabitants with a mortality rate of 0.38 per 100.000 inhabitants (Benguemma and *al.*, on 2002). Most of the scorpionique poisonings are due to *Androctonus australis hector* (Aah). The component of the Aah venom could lead to hyper-sensibility and this shown by the infiltration of eosinophile cells in the bronchoalvelory fluid and the synthesis of IgE after experimental envenoming. (Adi-Bessalem and *al.*, 2011). Firstly, we studied the inflammatory response induced by Aah venom after an experimental envenomation with a sublétales dose. Secondly, we studied the implication of mast cells in this immune process and then compared inflammatory mediators after envenomation with an allergic murin model. The obtained results clearly demonstrate an increase of the activities of the MPO, the EPO and a rise of vascular and lung tissue rates of the nitric oxide (NO) and the peroxide of hydrogen. The study of the immune balance shows a dominance of the IgG1 which confirm the ability of the venom of Aah to conduct the immune answer to the Th2 pathway, that of humoral type. Therefore, the pretreatment of mice with the compound 48/80 showed a decline of the inflammatory state. We could found also in this study that the concentration of sera IgE after envenoming is similar to that of the allergic model. These results would support the hypothesis that the different compounds of scorpion venoms led to hyper-sensibility type I.

Keywords : *Androctonus australis hector*, Venom, Inflammation, Hypersensibilité.

المخلص

يعتبر التسمم العقربي مشكل لصحة العمومية في كثير من المناطق المدارية و الشبه المدارية, في الجزائر المعدل السنوي للدغات هو 170 لى نسمة مئة ألف التسمم. معظم حالات التسمم راجعة إلى عقرب *Androctonus australis hector* يعتبر هذا العقرب من اخطر العقارب في العالم. من المحتمل أن هذا السم يؤدي إلى حساسية مفرطة و هذا يعود لارتفاع تركيز في IgE عملنا هذا بدأنا أولاً بدراسة الالتهاب الناتج عن لدغة العقرب في حالة وجود و غياب المكون 80/48 ثم مقارنة النتائج مع حيوانات اصيية بحساسية. أظهرت نتائج هذه الدراسة أن سم العقرب يؤدي إلى التهاب حاد و نلاحظ أيضاً أن المناعة الخلطية هي المناعة السائدة بعد التسمم العقربي. أن معالجة الفئران قبل التسمم يؤدي إلى انخفاض شدة الالتهاب و من جهة أخرى فإن التسمم يزيد من نسبة IgE و هذا يؤكد افتراضية أن مكونات سم العقارب تؤدي إلى حالة التهاب تشبه حالة التهاب الحساسية المفرطة.

كلمات المفتاح: السم , التهاب الحساسية, *Androctonus australis hector*