

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)

Mémoire

Présenté pour l'obtention du diplôme de **Magister**

En : sciences de la nature

Spécialité : **Biochimie-Immunologie**

Par

**Hadjer SAIDI**

Thème

**Etude du processus inflammatoire induit par le venin  
d'*Androctonus amoreuxi* en absence et en présence de thérapie**

Soutenue le 05/01/10 devant le jury suivant :

M<sup>me</sup> F. LARABA-DJEBARI, Professeur (USTHB)

Présidente.

M<sup>me</sup> D. HAMMOUDI-TRIKI, Professeur (USTHB)

Directrice de thèse.

M<sup>me</sup> C.TOUIL-BOUKOFFA, Professeur (USTHB)

Examinatrice.

M<sup>me</sup> S.ZIANI-MAMERI, Professeur (C.H.U Béni Messous)

Examinatrice.

M<sup>me</sup> H.OUMEHDI-OUSSEDIK, Maître de conférence (USTHB) Examinatrice.

## *Remerciements*

Au terme de ce travail réalisé dans le Laboratoire de biologie Moléculaire et cellulaire de la faculté des sciences biologiques en collaboration avec le Laboratoire de Recherche et Développement sur les Venins de l'Institut Pasteur d'Algérie .Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à :

M<sup>me</sup> HAMMOUDI-TRIKI.D, Maitre de conférence à la faculté des sciences biologiques, pour le temps et l'énergie qu'elle nous a consacré lors de la réalisation de ce travail malgré ces grandes responsabilités, sa rigueur scientifique, ses orientations, sa gentillesse qu'elle trouve ici l'expression de notre profond respect et notre reconnaissance.

M<sup>me</sup> LARABA-DJEBARI.F, Professeur à la Faculté des Sciences Biologiques pour la confiance qu'elle nous a accordé en nous accueillant dans son laboratoire, sa rigueur scientifique et pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant à présider ce jury.

M<sup>me</sup> TOUIL-BOUKOUFFA.C, Professeur à la Faculté des Sciences Biologiques qui nous a bénéficié de ses connaissances dans l'Immunologie Moléculaire et Cellulaire pendant l'année théorique. Nous la remercions également pour l'honneur qu'elle nous fait en acceptant d'examiner ce travail.

M<sup>me</sup> ZIANI-MAMERI.S, Professeur en Anatomie Pathologique au CHU Béni Messous, pour les informations qu'elle nous apporté dans le domaine d'Anatomie Pathologique, sa rigueur scientifique, ses encouragements, sa gentillesse et pour l'honneur qu'elle nous fait en acceptant d'examiner ce travail.

M<sup>me</sup> OUMEHDI-OUSSEDIK.H, Maitre de conférence à la Faculté des Sciences Biologiques pour ses orientation précieuses et pour l'honneur qu'elle nous fait en acceptant d'examiné ce travail.

M<sup>me</sup> BOUHADEF.A, Professeur en Anatomie Pathologique à l'Institut Pasteur d'Algérie qui nous a honoré de sa confiance en nous facilitant l'accès à son service et qui a mis à notre disposition l'ensemble du matériel nécessaire à la réalisation de la partie histologique de ce travail et tous les membre de son équipe, D<sup>f</sup> LAMERI, M<sup>me</sup> SEFFAK.S, M<sup>me</sup> HADDOUCHE.N et M<sup>elle</sup> TIMSSILINE.K pour leur gentillesse, leur conseil, leur aide, leur patience et leur soutien.

M<sup>f</sup> TOUAHRIA, Chargé de cours à la Faculté des Sciences Biologiques pour ses conseils dans l'étude statistique.

M<sup>me</sup> SADEDDINE.O, Ingénieur de Laboratoire de Recherche et Développement sur les Venins (IPA) et M<sup>me</sup> 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.

M<sup>elle</sup> LENCHI.N, M<sup>elle</sup> BEKKARI.N, M<sup>elle</sup> CHELGHOUM.H et Mme MEROUENE.F pour leur amitié leur aide et leur encouragement.

Tous les membres de notre équipe de nous avoir soutenu et nous avoir aidé surtout M<sup>elle</sup> AMROUCHE .L, M<sup>elle</sup> MENDIL.A et M<sup>me</sup> ADI-BESSALEM.

M<sup>elle</sup> BOUSHAKI.S, M<sup>f</sup> DIAB.Y, M<sup>elle</sup> BAKHTI.F et M<sup>elle</sup> GHARBI.A pour leur contribution dans la réalisation de ce travail.

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.*

*Mes sœurs et belles sœurs, frères et beau frère,  
pour tout.*

*Toute ma famille*

*Mes amies*

## Liste des abréviations

Aah : *Androctonus australis Hector*.

Aam : *Androctonus amoreuxi*.

Ach : Acétylcholine.

AINS : Anti inflammatoire non stéroïdien.

CPK : Créatine Phospho Kinase

Cox : Cyclooxygénase

ELISA: Enzym Linked Immunosorbant Assay.

EPO : Peroxydase éosinophile.

IFN : Interféron.

kDa : Kilo Dalton.

LDH : Lactate déshydrogénase.

LT : Leucotrène.

MPO : Myeloperoxydase.

PAF : Platelet Activated Factor.

PG: Prostaglandin.

PNN: Poly Nucléaire Neutrophiles.

RIA: Radio Immuno Assay.

s.c: Sous cutanée.

TNF: Tumor necrosis factor.

## SOMMAIRE

<b>Introduction</b> .....	1
<b>Chapitre I Données bibliographiques</b>	
I-1 Les Scorpions.....	3
I-2 Le venin .....	3
I-2-1 Les Toxines .....	5
I-2-1-1 Les toxines actives sur les canaux sodium .....	5
I-2-1-2 Les Toxines actives sur les canaux Potassium.....	6
I-2-1-3 Les Toxines actives sur les canaux Chlore.....	7
I-2-1-3 Les toxines active sur les canaux Calcique.....	7
I-2-2 Toxicité du venin.....	8
I-3 Aspect clinique de l'envenimation scorpionique.....	8
I-4 Toxicocinétique du venin de scorpion.....	12
I-5 Physiopathologie de l'envenimation scorpionique.....	12
I-5-1 Perturbations hémodynamiques.....	12
I-5-2 Modifications tissulaires.....	14
I-5-3 Troubles métaboliques.....	16
I-5-4 Troubles des électrolytes.....	17
I-5-5 Déclenchement d'une réaction inflammatoire.....	17
I-6 Traitement de l'envenimation scorpionique.....	20
1-6-1 Traitements symptomatiques .....	20
1-6-2 Immunothérapie .....	20
<b>Chapitre II Matériel et méthodes</b>	
II-1 Matériel .....	24
II-2 Méthodes	
II-2-1 Préparation de fragments (Fab') <sub>2</sub> spécifiques du venin <i>d'Androctonus amoreuxi</i> .....	25

II-2-2 Contrôle de l'homogénéité des fragments F(ab') <sub>2</sub> par électrophorèse SDS-PAGE.....	27
II-2-3 Mise en évidence de la réaction croisée entre le venin d' <i>Androctonus amoreuxi</i> et le venin d' <i>Androctonus australis hector</i> .....	27
II-2-4 Etude de la toxicocinétique du venin d' <i>Androctonus amoreuxi</i> par ELISA Sandwich.....	28
II-2-5 Etude de la physiopathologie induite par le venin d'Aam.....	29
II-2-5-1 Etude du processus inflammatoire induit par le venin d'Aam.....	29
- Quantification des cytokines IL1-β, IL 6, IL10, IL 12, IFN γ.....	29
- Dosage de la myeloperoxydase .....	30
- Dosage de l'activité de la peroxydase éosinophile.....	30
II-2-5-2 Etudes des modifications métaboliques induites par le venin d' <i>Androctonus amoreuxi</i> en absence et en présence des traitements.....	31
II-2-5-3 Etude histologique .....	32
II-2-6 Expression statistique des résultats.....	32
<b>Chapitre III Résultats et Discussion</b>	
III-1 Préparation des fragments F(ab') <sub>2</sub> anti venin d' <i>Androctonus amoreuxi</i> .....	35
III-2 Croissement antigénique, venin d' <i>Androctonus amoreuxi</i> et venin d' <i>Androctonus australis hector</i> .....	35
III-4 Toxicocinétique du venin d' <i>Androctonus amoreuxi</i> .....	35
III-5 Physiopathologie d'envenimation par <i>Androctonus amoreuxi</i> .....	39
III-5-1 Analyse du processus inflammatoire induit par le venin d' <i>Androctonus amoreuxi</i> .....	40
-Dosage des cytokines dans le sérum.....	40
-Quantification de l'activité de la Myeloperoxydase.....	41
-Dosages la Peroxydase Eosinophile (EPO).....	47
III-5-2 Effets du venin d'Aam sur les activités enzymatiques de LDH et CPK.....	51
III-5-3 Effet du venin d' <i>Androctonus amoreuxi</i> sur les structures tissulaires en présence et en absence de traitements.....	54
<b>Discussion Générale</b> .....	63

<b>Conclusion et Perspectives</b> .....	72
BIBLIOGRAPHIE.....	73
ANNEXES.....	88

## Introduction

L'envenimation scorpionique est un problème de santé commun à plusieurs pays du monde particulièrement, l'Amérique centrale et Latine, L'Afrique du Nord, le Moyen Orient et l'Inde. En Algérie et surtout au niveau des hauts plateaux et le sud, les piqûres par les scorpions sont très nombreuses et parfois mortelles. Selon le Ministère de La santé 52168 cas ont été récence en 2007 avec 76 décès. Les espèces responsables de ses piqûres sont *Androctonus amoreuxi* (Aam), *Androctonus australis hector* (Aah) et *Buthus occitanus tunetanus* (Bot).

Les signes cliniques de l'envenimation par les scorpions sont divers allant d'une douleur locale jusqu'aux complications systémiques sérieuses comme le choc cardiovasculaire et l'œdème pulmonaire. Le venin de scorpion est d'extrême complexité son action sur les canaux sodique des terminaisons nerveuses peut conduire à la dépolarisation de la membrane axonale et la libération des neurotransmetteurs qui affectent de nombreux organes (Freire-Maia et *al.*, 1974 ; Freire Maia et Campos ,1989 ; Gueron et *al.*,1992). Par ailleurs, la participation d'autres médiateurs inflammatoires incluant les kinines, les ecosanoides, les cytokines et le NO (Barbouche et *al.*, 1996 ; De Matos et *al.*,2001 ; Fukuhara et *al.*,2003) a été également rapportée.

L'immunothérapie bien que controversée (Abroug et *al.*, 1999) demeure le seul traitement spécifique de l'envenimation scorpionique. Les conditions de son application ont été définies suite à plusieurs travaux qui ont permis de définir les paramètres cinétiques des venins de plusieurs espèces de scorpions (Revelo et *al.*,1996 ; Santana et *al.*,1996 ; Caldéron-Aranda et *al.*,1999 ; Krifi et *al.*,2001; Hammoudi-Triki et *al.*, 2007). En Algérie, le traitement antiscorpionique consiste en l'injection des fragments d'immunoglobulines F(ab')<sub>2</sub>, préparés à partir des sérums des animaux hyperimmunisés avec le venin d'Aah. Les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la genèse des modifications physiologiques induits par le venin d'Aam ne sont pas clairement établis. La connaissance de leur degré d'implication permettrait d'opter pour une meilleure stratégie thérapeutique.

L'étude entreprise a consisté d'une part, à préparer et à purifier des fragments F(ab')<sub>2</sub> dirigés contre le venin d'Aam. D'autre part, l'étude de la distribution du venin d'Aam dans le compartiment vasculaire a été réalisée en corrélation avec la réponse immunitaire par le dosage de quelques cytokines sériques impliquées dans la balance (pro et anti inflammatoire) et l'identification des polynucléaires infiltrés dans les poumons des souris envenimées (en présence et en absence d'immunothérapie, de diclofénac, de l'atropine et du propranolol). L'analyse des variations métaboliques et histologiques a été également réalisée par le dosage

des enzymes LDH et CPK et l'examen des coupes histologiques des organes poumons et foie, après injection de différentes doses du venin associées ou non à des molécules thérapeutiques.

## Chapitre I : Données Bibliographiques

### I-1 Les Scorpions :

Les scorpions sont des animaux nocturnes qui ont survécu depuis 425 millions d'années dans les conditions les plus extrêmes (Le Gros et Martin-Euclaire, 1997).

Ce sont des invertébrés, pourvus d'un exosquelette chitineux articulé, ils appartiennent à l'embranchement des *Arthropodes*, sous embranchement des *Chelicerates*, classe des *Arachnides* et Ordre des *scorpionidés*.

Les zoologistes tendent à distinguer deux sous ordres, les *Buthoides* (une seule famille, les *Buthidea*) et les *Chactoides* (cinq familles) (Abia et al., 1986). Tous les scorpions dangereux pour l'Homme font partie de la famille des *Buthidea*. Cette famille est divisée en trois sous familles ; Les *Buthinea* sont répandus dans l'Afrique du Nord et l'Asie et les *Centrurinea* et les *Tytinea* dans le Continent Américain (Tableau I).

Dans le territoire Algérien, les scorpions sont retrouvés surtout dans le Sud, l'incidence annuelle varie de 7 piqûres par 100000 habitants dans les wilayas du Nord et plus de 1000 piqûres/100000 habitants dans les wilayas du Sud en particulier Adrar, Ourgla, Biskra et Naama ( Bengueda et al., 2002).

L'envenimation scorpionique en Algérie est causée principalement par trois scorpions *Androctonus australis hector* (Aah), *Androctonus amoreuxi* (Aam) et *Buthus accitanus tunetanus* (Bot).

### I-2 Le venin :

La queue de scorpion porte à son extrémité le telson, un appareil venimeux constitué d'une vésicule à venin prolongé par un dard qui permet l'inoculation du venin. Lors d'une piqure de scorpion, une très petite quantité du venin est inoculée et responsable de symptômes divers pouvant aller jusqu'à la mort de la victime.

La toxicité de ce venin a été attribuée exclusivement à des peptides de faibles poids moléculaires ayant comme cible biologique les canaux sodiques dépendants de potentiel des cellules excitables dont ils perturbent les fonctions physiologiques (Catterral, 1980).

Le venin est constitué également des ligands pour d'autres canaux ioniques (canaux potassiques, calciques et chlore) et des mucopolysaccharides, phospholipase, hyaluronidase, Sérotonine et histamine.

**Tableau I :** Espèces de scorpion dangereuses pour l'Homme (Bonnet, 1997; Goyffon et Chippaux , 1990 ; Chippaux et Goyffon, 2008).

Genre	Espèce	Distribution
<b>Ancien Monde</b>		
<i>Androctonus</i>	<i>aeneas</i>	Afrique, nord du Sahara, oasis du Sahara
	<i>amoreuxi</i>	Nord Africain et moyen orient
	<i>australis</i>	de l'Algérie à l'Egypt., oasis du Sahara
	<i>Crassicauda</i>	Du nord Africain à l'Arabie Saoudite, Turquie
	<i>Maurutanicus</i>	Maroc
	<i>Buthus</i>	<i>occitanus</i>
<i>tamulus</i>		Inde
<i>Hemiscorpius</i>	<i>lepturus</i>	Iran, Irak
<i>Leiurus</i>	<i>quinquistriatus</i>	Afrique, Moyen orient
<i>Mesobuthus</i>	<i>eupeus</i>	Turquie, Caucase, Iran, Afghanistan
<b>Nouveau monde</b>		
<i>Centruroides</i>	<i>exilicauda</i>	Sud des Etats Unis
	<i>elegans</i>	Mexique
	<i>noxius</i>	Mexique
	<i>suffusus</i>	Mexique
	<i>lipidus</i>	Mexique
	<i>gracilis</i>	Colombie
<i>Tityus</i>	<i>pachyurus</i>	Colombie
	<i>trinitanis</i>	Trinité
	<i>descripans</i>	Bassin Amazonien
	<i>compridgei</i>	Bassin Amazonien
	<i>caripitensis</i>	Venezuela
	<i>brasiliae</i>	Brésil
	<i>serrulatus</i>	Brésil
<i>trivittatus</i>	Argentine	

**I-2-1 Les Toxines :**

En fonction du canal cible quatre grandes familles de toxines ont été distinguées :

**I-2-1-1 Les toxines actives sur les canaux sodium :**

Ces toxines sont les plus abondantes par rapport aux toxines qui agissent sur les autres canaux, elles représentent 3-4% du poids sec du venin (exceptionnellement de l'ordre de 10% chez *Centruroides limpidus limpidus*), elles sont composées de 60 à 70 résidus d'acide aminé réticulées par quatre ponts disulfures (Leberton et al., 1994).

La grande similitude de ces toxines n'empêche pas une spécificité d'espèces cible : les unes sont actives sur les mammifères, d'autres sur les insectes et d'autres plus rares sur les crustacés.

**-Les Toxines Anti-mammifères :**

Deux modes d'activité pharmacologique distincts ont été décrits permettant de définir deux types de toxines.

**Les Toxines  $\alpha$  :**

Ces toxines se fixent sur le site 3 du canal sodique induisant un ralentissement du potentiel d'inactivation des canaux sodium et par conséquent une prolongation du potentiel d'action. Elles sont caractéristiques des venins des *Buthidés* de l'ancien monde, mais ont été parfois trouvées dans les venins des *Buthidés* de nouveau monde (Martin-Euclaire et al., 1999).

Six toxines  $\alpha$  ont été identifiées dans le venin d'Aah, Aah I, Aah I', Aah I'', Aah II, Aah III et Aah IV (Rochat et al. 1972 ; Kopeyan et al., 1974 ; Matin et Rot, 1984 ; Kopeyan et al., 1979 ; Mansuelle et al., 1992 ; Kopeyan et al., 1993). Deux toxines au niveau du venin de *Tityus serrulatus* TsIV-5 (Possani et al., 1991), TsTx-V (Marongoni et al., 1995), une toxine au niveau du venin d'*Anroctonus amoreuxi* appelé Aam H III, de poids moléculaire 6933 Da, représente 69% d'homologie avec Aah I et 67% avec AaH II (Chen et al., 2003) (Tableau II).

Des mutations réalisées au niveau des résidus localisés dans la boucle extracellulaire IV S3-S4 du canal sodique ont montré que la toxine  $\alpha$  de *Lieurus quinquestratus* (Lq) se fixe à cette boucle par l'intermédiaire d'une interaction électrostatique avec un résidu d'Acide Glutamique en position 1613 (Roger et al., 1996).

**Les Toxines  $\beta$  :**

Cette deuxième classe de toxines anti mammifères se lie sur le site 4 de canal sodium, d'une manière indépendante du potentiel d'action (Jover et *al.*, 1980 ; Gordon, 1997).

L'activation des canaux se fait alors à des potentiels plus négatifs et il s'en suit des trains d'ondes de potentiel d'action (Couraud et *al.*, 1982).

Ces toxines ont été identifiées dans les venins des scorpions du nouveau monde sous familles de *Titynea* et *Centrurinea*. Parmi les toxines  $\beta$  retrouvées dans le venin de *Tityus serrulaus*, TSTX I, II, III et parmi celles qui composent le venin de *Centruroides suffusus suffusus*, C<sub>ss</sub> II, III, et IV.

L'analyse de chimères et des mutants des canaux Na<sup>+</sup> a montré que la toxine $\beta$ , C<sub>ss</sub>IV de *Centruroides suffusus suffusus* se lie sur un site récepteur impliquant la Glycine 845 dans le segment extracellulaire S3-S4 du domaine II de la sous unité  $\alpha$  du canal Na<sup>+</sup>.

**-Les Toxines anti-insectes :**

Selon la réponse induite sur les insectes ces toxines sont divisées en toxines dites contractulantes, AaHIT1 d'Aah (Gordon et *al.*, 1984) et des toxines dites relaxantes comme Lq<sub>q</sub> IT2 de *Lieurus quinquestratus quinquestratus* (Zlotkin et *al.*, 1993).

**- Les toxines anti-crustacées :**

Au niveau du venin d'*Androctonus australis hector*, une seule toxine active sur le canal Na<sup>+</sup> des insectes a été purifiée, Aah Ct (Dianous et *al.*, 1987).

**-Les Toxines à double spécificité :**

Il s'agit de toxines à la fois anti-mammifères et anti-insectes parmi les toxines qui ont été caractérisées, Ts VII, AaH T4, Lq<sub>q</sub>III (Delima et *al.*; 1986; Loret et *al.*, 1991 Kopeyan et *al.*, 1993). Le venin d'*Androctonus amoreuxi* contient deux toxines  $\alpha$  à double spécificité. La toxine AamH I de poids moléculaire de 7045 Da, présentant 73% d'homologie de séquence avec AaH II et 71% avec AaH III. La toxine AamH II (6995 Da) possède 96% d'homologie avec AaH II et 85% avec la neurotoxine X de *Leiurus quinquestriatus*. (Chen et *al.*, 2003; Abbas et *al.*, 2009).

**I-2-1-2 Les Toxines actives sur les canaux Potassium :**

Ces toxines sont faiblement représentées dans le venin (0,01-0,1% en poids) et faiblement toxiques. Chez la souris elles n'ont pratiquement aucun effet toxique par voie sous

cutanée, cependant elles peuvent se montrer très actives en injection intracérébroventriculaire. Elles sont composées de 29 à 39 résidus d'acide aminé avec 3 ou 4 ponts disulfure, ces toxines agissent sur les canaux  $K^+$  potentiel dépendant et calcium dépendant par un mécanisme de blocage (Le Gros et Martin-Euclaire., 1997).

Selon la structure primaire elles sont divisées en 2 grande familles, la première dite toxine très courtes (29-31 acides aminés), comporte Leurotoxine I (LTX) de *Leiurus quinquestriatus*, la toxine PO5 d'*Androctonus mauritanicus mauritanicus* et la toxine TsK de *Tityus serrulatus*. La deuxième famille (37-39 résidus d'acides aminé) a été divisée en 4 sous familles chacune d'elles est relative à une toxine : La 1<sup>ère</sup> est relative à la Charybdotoxine (CTX) de *Leiurus quinquestriatus*, la 2<sup>ème</sup> à la Kaliotoxine (KTX) d'*Androctonus mauritanicus*, la 3<sup>ème</sup> à la Noxius toxine (NTX) de *Centruroides noxius* et la dernière sous famille est relative à celle de *Tityus kappa alpha* ( $Ts\kappa\alpha$ ) de *Tityus serrularus*.

Récemment une nouvelle toxine d'Aam (Aam KTX) a été purifiée et caractérisée. La toxine Aam-KTX de poids moléculaire de 4150 Da, constitue 0.76% du poids total du venin brut et présente 89% d'homologie de séquence avec KTX. Elle est sélective aux canaux potassium voltage dépendant Kv1.3 et Kv1.2 mais pas Kv1.1 exprimé sur les oocytes (Figure 1).

L'alignement de structure de Aam-KTX, KTX et les différent Kv a montré que la mutation P12H est responsable de la diminution de l'affinité de Aam-KTX pour Kv1-1 l'Histidine en position 12 au niveau d'Aam-KTX et l'Histidine retrouvé de Kv1-1 ont créé un encombrement stérique qui empêche la fixation de cette Kaliotoxine sur le Kv1-1 (Figure 2) (Abbas et al., 2008).

### **I-2-1-3 Les Toxines actives sur les canaux Chlore :**

Il ya la chlorotoxine purifiée à partir du venin de *Leiurus quinquestriatus* (De Bin et al.,1993).

### **I-2-1-4 Les toxines active sur les canaux Calcique :**

Parmi les toxines qui modifient les propriétés du canal  $Ca^{++}$  sensible à la Ryanodine, canal du réticulum sarcoplasmique *in vitro*, on peut citer : Imperatoxin A (IpTXa) isolée à partir du venin de scorpion Chactode Africain, *Pandinus imperator*, Maurocalcin (MCa) de scorpion Tunisien *Scorpio maurus palmatus*, Hemicalcin du scorpion Iranien *Hemiscorpus lepius* (HCa) (Valdivia et al., 1992; Fajloun et al., 2000; Shahbazzadeh et al.,2007).

### **I-2-2 Toxicité du venin:**

Le pouvoir létal des venins ou des toxines purifiées est estimé par la détermination de la dose létale 50 (DL50), la dose qui tue 50% des animaux envenimés. Elle varie en fonction de plusieurs paramètres (l'espèce, le lieu géographique de collecte du venin, de la technique d'extraction et sa voie d'injection).

Le venin d'*Androctonus amoreuxi* a une DL50 de 0,75 mg/kg par voie sous cutanée et de 0,88 mg/Kg par voie intramusculaire (Watt et Simard, 1984; Ghazel et *al.*, 1975).

### **I-3 Aspect clinique de l'envenimation scorpionique :**

La gravité de la piqûre de scorpion dépend de plusieurs facteurs :

Des facteurs liés au scorpion : l'espèce, l'âge, la taille, la nutrition et la quantité du venin inoculée. Des facteurs liés à la victime : l'âge, le poids, l'état de santé de la victime ainsi que la zone de la piqûre (Broglia et Goyffon, 1980 ; Padilla et *al.*, 2003).

Les envenimations scorpioniques ont une symptomatologie polymorphe et d'intensité variable. Les cliniciens ont défini trois grades de sévérité (Tableau III)

#### **Grade I : Envenimation bénigne**

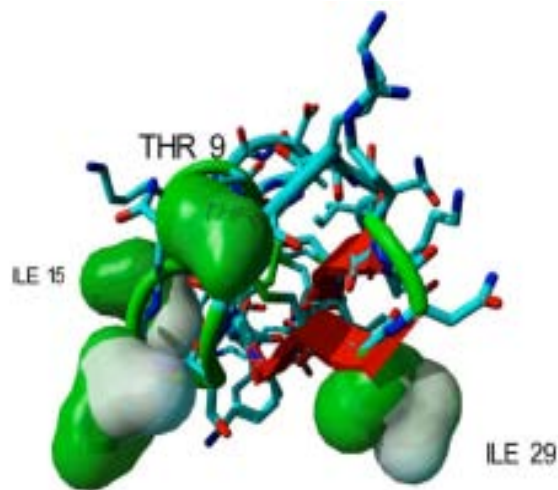
Le signe le plus important est la douleur au site de piqûre, elle est ressentie par le malade comme une sensation de broiement et de brûlure au même temps. Elle commence à s'atténuer au bout d'une heure puis s'estompe dans un délai de quelques heures à 24 h. Des signes généraux modestes, agitation motrice, sueur peuvent se rajouter.

#### **Grade II : Envenimation modérée**

Ce grade est marqué par l'apparition de signes francs de la série muscarinique comportant, des vomissements, colique abdominale, diarrhée, sueur profuses, polypnée et priapisme. Ces manifestations apparaissent 5 à 20 minutes après la piqûre.

#### **Grade III : Envenimation sévère**

Aux signes précédents s'ajoutent des troubles physiologiques considérables, Collapsus cardiovasculaire avec bradycardie, des signes électrocardiographique d'une ischémie myocardique, vomissement abondants, des difficultés respiratoires associant un œdème pulmonaire et un bronchospasme. L'évolution à ce grade est rare, elle est fatale dans près de la moitié des cas.



**Figure 1** : Superposition des structures 3D de KTX (en Blanc) et Aam KTX (en vert)(Abbas et al.,2008)

**A**

9 12 15 29

KTX	GVEINVKCSGSPQCLKPCKDAGMRFGKCMNRKCHCTPK
Aam-KTX	GVEINVKCTGSHQCI KPCCKDAGMRFGKC I NRKCHCTPK

**B**

Kv1.1 ...FAEA**EEA**ES**H**FSSIPDAFWWAVVSMTTVGYGDM**Y**PVTIGGK...

Kv1.2 ...FAE**AD**ERDS**Q**FPSIPDAFWWAVVSMTTVGYGDM**V**PVTIGGK...

Kv1.3 ...FAE**AD**DPTS**G**FSSIPDAFWWAVVTMTTVGYGDM**H**PVTIGGK...

**Figure 2** : **A**, Alignement de séquence de KTX et Aam-KTX les acides aminés mutés sont colorés en rouge. **B** Alignement des séquences des canaux Kv1.1-Kv1.3.

Les mutations entre les trois canaux sont en gras (Goldstein et *al.*, 1994; Aiyar et *al.*, 1996; Ader et *al.*, 2008)

**Tableau II** : Les toxines des différents venins scorpioniques et leurs canaux cibles

Canal cible	Toxine	Espèce
Canal Sodique	AamH I, II, III (Mammifères) Aam H III (Double spécificité)	<i>Androctonus amoreuxi</i> (Aam)
	AaHI, I', I'', II, III, IV (Mammifères)	<i>Androctonus australis hector</i> (Aah)
	Aah T1 (insectes)	
	AahCt (Crustacés)	
	AaH IT4 (Double spécificité)	
	CssII, CcssIII, CcssIV (Mammifères)	<i>Centruroides suffusus suffusus</i> (Ccs)
	Lqq IV, V (Mammifères)	<i>Leiurus quinquestriatus</i> (Lq)
	Lqq III (Double spécificité)	
	TsTx-V, Ts IV-5 (Mammifères)	<i>Tityus serrulatus</i> (Ts)
	TsTx I, II, III, IV (Mammifères)	
	TsTx VII (Double spécificité)	
Canal potassique	Aam-KTX	<i>Androctonus amoreuxi</i> (Aam)
	KTX2, PO5	<i>Androctonus australis hector</i> (Aah)
	KTX	<i>Androctonus mauritanicus mauritanicus</i> (Amm)
	CTX, LTX	<i>Leiurus quinquestriatus</i> (Lq)
	NTX	<i>Centruroides noxius</i>
	TsK, TsK	<i>Tityus serrulatus</i> (Ts)
Canal chlore	Chlorotoxine	<i>Leiurus quinquestriatus</i> (Lq)
Canal calcique	IpTXa	<i>Pandinus imperator</i>
	MCa	<i>Scorpio maurus palmatus</i>
	Hca	<i>Hemiscorpius lepius</i>

**Tableau III :** Les principaux symptômes cliniques et gradation des envenimations scorpioniques au Maghreb (ACIP, 1998)

Gradation	Principaux symptômes
<b>GRADE I</b>	<p><b>Signes locaux :</b> Douleur-Fourmillement</p> <p><b>Signes généraux :</b> Irritabilité-agitation</p>
<b>GRADE II</b>	<p><b>Signes locaux :</b> Douleur-Fourmillement</p> <p><b>Signes généraux :</b> Irritabilité-agitation-sueur-Diarrhée – Vomissent/nausées-Hypersalivation-Ballonement gastrique-Extrimité froide - fièvre/frissonnement</p> <p><b>Signes cardiovasculaires :</b> Hypertension-Hypotension-Tachycardie.</p> <p><b>Signe respiratoires :</b> Cyanose.</p> <p><b>Signes neuromusculaires :</b> Priapisme.</p>
<b>GRADE III</b>	<p><b>Signes locaux :</b> Douleur-Fourmillement</p> <p><b>Signes généraux :</b> Irritabilité-agitation-sueur-Diarrhée –vomissent/nausées-Hyper salivation-Ballonement gastrique- Extrémités froides-fièvre/frissonnement</p> <p><b>Signes cardiovasculaires :</b> Hypertension-Hypotension-Tachycardie-Bradycardie-Hypertrophie auriculaire-Fibrillation auriculaire et Ventriculaire.</p> <p><b>Signes respiratoires :</b> Cyanose-Polypnée-Dyspnée- Sécrétions bronchique- œdème pulmonaire aigue OAP.</p> <p><b>Signes neuromusculaires :</b> Priapisme-Hyperexcitabilité- Trouble de la conscience - Coma.</p>

#### **I-4 Toxicocinétique du venin de scorpion :**

L'étude toxicocinétique du venin après son injection aux animaux associée à l'étude de la pharmacocinétique de l'antivenin a un grand intérêt quand au choix de la molécule adéquate et des conditions nécessaire pour une immunothérapie efficace. En effet l'administration du venin de *Tityus serrulatus*, de *Buthus occitanus*, *Androctonus mauritanicus mauritanicus* et d'*Androctonus australis hector* aux animaux et leur quantification sérique à différents temps par le test ELISA (Enzyme Linked Immunosorbant Assay) a permis de montrer un passage rapide du venin de site d'injection vers le compartiment vasculaire (le temps nécessaire pour atteindre la concentration maximale Tmax varie entre 30 et 60 min ) et une distribution rapide vers les tissus (Revelo et *al.*,1996 ; Krifi et *al.*, 2001 ; El Hafny et *al.*, 2002 ; Hammoudi-Triki et *al.*, 2007)

Ces mêmes conclusions ont été déduites suite à l'injection du venin de *Leiurus quinquestiatus* , de *Centroides limpidus limpidus*, d'*Androctonus australis hector* radiomarqué à des animaux (Ismail et *al.*, 1992 ; Calderon-Aranda et *al.*,1999 ; Hammoudi-Triki et *al.*, 2007) (Tableau IV).

La différence qui existe entre le test ELISA et la RIA (Radio Immuno Assay) est expliquée par le fait que cette dernière ne peut pas distinguer entre la radioactivité spécifique (liée aux toxine du venin) et non spécifique (libre, liée aux protéines de plasma, liée aux toxines dégradées) contrairement au test ELISA qui détermine la concentration du venin libre circulant (Hammoudi-Triki et *al.*, 2007).

#### **I-5 Physiopathologie de l'envenimation scorpionique :**

L'envenimation par les scorpions est une extrême urgence médicale se traduisant par l'apparition rapide des désordres hémodynamiques, métaboliques et une réaction inflammatoire.

##### **I-5-1 Perturbations hémodynamiques :**

L'envenimation scorpionique provoque une perturbation tentionnelle et une arythmie cardiaque chez des personnes piquées par les scorpions (Gueron et *al.*, 1967; Amaral et *al.*, 1991; Nouira et *al.*, 1996) et chez des modèles expérimentaux (Ghazal et *al.*, 1975 ; Ismail et *al.*, 1980 b ;Gueron et *al.*, 1980 ; Fatani et *al.*, 1997 ; Tarasiuk et *al.*, 1998 ; Murthy et Zare, 2002 ; Hammoudi-Triki et *al.*, 2007). En effet l'injection du venin de *Buthus accitanus* à des lapins induit une bradycardie initiale transitoire suivie par une tachycardie puis une bradycardie finale prolongée.

**Tableau IV** : Quelques paramètres pharmacocinétiques de différents venins de scorpion

<b>ELISA (Enzym Linked Immuno Sorbant Assay)</b>						
<b>Espèce</b>	<b>Voie d'administration</b>	<b>Animal</b>	<b>T max (min)</b>	<b>1/2 vie Distribution (min)</b>	<b>1/2 vie d'élimination (min)</b>	<b>Références</b>
<i>Tityus serrulatus</i>	S.C	Souris	30	ND	ND	<b>1</b>
<i>Buthus occitanus tenuanus</i>	S.C	Lapin	entre 30 et 60	16+/-4 min	112+/-16	<b>2</b>
	I.V	Lapin		ND	135+/-10	
<i>Androctonus mauritanucus mauritanucus</i>	S.C	Lapin	30	ND	168	<b>3</b>
	I.V	Lapin		ND	192	
<i>Androctonus australis hector</i>	S.C	Rat	20 +/- 8	ND	53+/-2	<b>4</b>
	I.V	Rat	5	ND	13	
<b>RIA (Radio Immuno Assay)</b>						
<i>Androctonus amoreuxi</i>	I.V	Lapin		5,6	104	<b>5</b>
<i>Lieurus quinquistriatus</i>	S.C	Lapin	101+/-8	ND	ND	<b>6</b>
	I.V	Lapin		5.47+/-0.59	969+/-133	
<i>Buthus accitanus mardoichei</i>	I.V	Lapin		24+/-4.8	297+/-114	<b>7</b>
<i>Centroides limpidus limpidus</i>	S.C	Lapin	60	21+/-4.2	108+/-12	<b>8</b>
	I.V	Lapin		8.4+/-2.4	114+/-12	
<i>Androctonus australis hector</i>	S.C	Rat	110+/-5	ND	>300	4

ND : Non Déterminé

(1) Revelo et al.,1996 ; (2) Krifi et al., 2001 ; (3) El Hafny et al., 2002 ; (4) Hammoudi-Triki., et al., 2007 ; (5) Ismail et al.,1980 ; (6) Ismail et al., 1992 ; (7) Pepin-covata et al., 1996 ; (8)Calderon-Aranda et al., 1999.

L'utilisation de l'atropine (un antagoniste des récepteurs muscariniques de l'acétylcholine) et de propranolol (un antagoniste non sélectif des récepteurs adrénergiques) a permis de suggérer que la bradycardie initiale est due à l'effet cholinergique du venin, la tachycardie à la stimulation sympathique, la bradycardie terminale aux changements de la composition ionique du sang (Ismail *et al.*, 1980). Dans le cas des envenimations scorpioniques graves, les patients présentent une cyanose, une arythmie respiratoire (tachypné et bradypné). L'œdème pulmonaire est la complication la plus fréquente dans les accidents scorpioniques (Campos *et al.*, 1979; Goyffon *et al.*, 1982 ; Hering *et al.*, 1999), sa pathogénie est très complexe, le dysfonctionnement du ventricule gauche chez les patients piqués par les scorpions a orienté le pronostic des lésions pulmonaires vers une origine cardiogénique (Gueron *et al.*, 1990, 1992; Bacuretschi *et al.*, 1995; Gueron *et al.*, 1996; Mazzei *et al.*, 2002).

Bien que plusieurs auteurs ont rapportés l'origine non cardiogénique de l'œdème pulmonaire. En clinique, Amaral et collaborateurs (1993) ont observé un œdème pulmonaire chez un patient sans aucune modification dans les fonctions cardiaques. Dans les conditions expérimentales, le prétraitement des rats par l'héparine, les inhibiteurs de la cyclo et Lipo oxygénase et les antagonistes du PAF ont permis une réduction de l'œdème pulmonaire provoqué par le venin de *Tityus serrulatus* (De Matos *et al.*, 1997).

### **I-5-2 Modifications tissulaires :**

L'examen microscopique de différents organes (cœur, poumons, foie, pancréas et rein) suite à une envenimation scorpionique, a montré des lésions considérables dans l'architecture de ces organes. Une nécrose des myocardiocytes, des œdèmes interstitiels, une infiltration des cellules inflammatoires ont été retrouvés dans les coupes du cœur des animaux envenimés par les venins de *Tityus serrulatus* ou de sa toxine (Corrêa *et al.*, 1997), d'Aah ou de sa toxine Aah II (Adi-Bessalem *et al.*, 2008; Sami-Merah *et al.*, 2008) et de *Tityus confluens* (De Roodt *et al.*, 2009). Des œdèmes interstitiels et intra alvéolaires associés ou non à des hémorragies, une infiltration des cellules inflammatoires et un dépôt ou non de fibrine ont été révélés dans les poumons des animaux envenimés par *Tityus serrulatus*, *Androctonus australis hector*, *Tityus confluens* (D'suze *et al.*, 2004, 2007, Andrade *et al.*, 2007 ; Adi-Bessalem *et al.*, 2008 ; De Roodt *et al.*, 2009) et chez les patients envenimés accidentellement par les scorpions *Tityus serrulatus* et *Tityus trinitanis* (Amaral *et al.*, 1993 ; Daisly *et al.*, 1999).

Le foie est un organe richement vascularisé et cela le rend une cible du venin scorpionique. L'injection du venin de *Tityus serrulatus* ou le venin d'Aah aux animaux a provoqué une désorganisation du parenchyme hépatique caractérisée par une turgescence des

cellules, une dilatation des espaces sinusoïdales et une nécrose (Corrêa et *al.*, 1997; Bessalem et *al.*, 2003). En plus de ces altérations, une hémorragie extensive autour des principaux vaisseaux sanguins est observée après envenimation des animaux avec le venin de *Buthus quinquestriatus* (Mohamed et *al.*, 1978).

Des modifications histopathologiques dans le tissu pancréatique ont été également rapportées dans le cas des envenimations scorpioniques. En effet, le venin de *Tityus serrulatus* a provoqué un dommage des vaisseaux sanguins, une nécrose de quelques acini et quelques îlot de Langerhans et une infiltration leucocytaire après son injection à des bédouins (D'suze et *al.*, 2004). Des altérations similaires ont été montrées sur des coupes histologiques du pancréas des souris mortes au cours de la détermination de la DL50 de *Tityus confluens* (De Roodt et *al.*, 2009). Les lésions pancréatiques causées par le venin de scorpion peuvent être expliquées au moins en partie par l'activation des récepteurs muscariniques (Possani et *al.*, 1991; Fletcher et *al.*, 1994, 1996 ; D'suze et *al.*, 1995).

L'élimination du venin et ces métabolites est assurée essentiellement par le rein, le rendant ainsi une cible privilégiée à plusieurs toxines et par conséquent, à des modifications physiologiques et histopathologiques. L'injection d'une dose subléthale de venin d'*Hemiscorpius lepturus* à des rats provoque une néphrotoxicité démontrée par une protéinurie élevée et la présence de globules rouges au niveau des urines. L'analyse microscopique de cet organe a permis de montrer une congestion des structures glomérulaires et un dommage de la membrane basale des capsules glomérulaire et de Bowman (Pipelzadeh et *al.*, 2006).

Une congestion et quelques petites zones hémorragiques ont été retrouvées dans le cortex rénal des rats envenimés par le venin de *Tityus serrulatus* ou sa neurotoxine (TsTX I) (Corrêa et *al.*, 1997).

La piqûre par les scorpions peut conduire dans certains cas à des vomissements chez les patients et leur abondance augmente avec la sévérité de l'envenimation (Goyffon et *al.*, 1982 ; Neal, 1990 ; Radmanesh et *al.*, 1990 ; Abroug et *al.*, 1999; Gajre et Dammas, 1999 ; Osnaya-Romero et *al.*, 2001 ; D'suze et *al.*, 2003 ; Fukuhara et *al.*, 2003). Chez l'animal, le venin de scorpion induit une augmentation de l'acidité et de la sécrétion de la pepsine. L'administration de la toxine scorpionique induit l'apparition d'un ulcère gastrique aiguë chez des rats. L'observation microscopique de l'estomac une heure après l'administration de la fraction T1 de *Tityus serrulatus* et de la toxine  $\gamma$  révèle la présence d'une nécrose locale dans la partie la plus superficielle de la muqueuse glandulaire gastrique, une congestion, une hémorragie et un exsudat inflammatoire marginale (les polynucléaires neutrophiles sont les

cellules les plus abondantes) (Cunha-Melo et al., 1991; Melo et al., 2006). La pique de scorpion peut provoquer dans certains cas une exacerbation des symptômes ou le réveil d'un ulcère en rémission.

### I-5-3 Troubles métaboliques :

Les altérations tissulaires observées dans après envenimation scorpionique peuvent libérer le contenu cellulaire y compris les enzymes dans le compartiment vasculaire. Certains enzymes sont des marqueurs de lésions tissulaires (leur dosage peut être un indicateur de l'état fonctionnel d'un organe), d'autres par contre ont une distribution ubiquitaire.

Le dosage des transaminases, Transaminase Glutamo-Oxaloacétique (TGO) et Transaminase Glutamo-Pyruvique (TGP) est utilisé dans le diagnostic des atteintes hépatiques. Une élévation de l'activité de ces enzymes a été observée dans le sérum des patients et des animaux envenimés (Sofer et Gueron, 1988, Amaral et al., 1991 ; Hering et al., 1993; Corrêa et al.,1997; Bessalem et al., 2003; Pipelzadeh et al., 2006). De même le dosage de la Créatine phosphokinase (CPK), marqueur métabolique du muscle squelettique et du muscle cardiaque et sa fraction CPK-MB, présente essentiellement dans le muscle cardiaque a permis de montrer une augmentation de leur activité suite à une envenimation accidentelle par *Tityus serrulatus* (Hering et al., 1993. Cupo et Hering, 2002), *Tityus trinitanis* (Daisly et al., 1999), *Buthus occitanus tenentanus* et *Leiurus quinquestriatus* (Meki et al., 2003) et à une envenimation expérimentale par le venin de *Tityus serrulatus* ou sa fraction toxique majoritaire (TSTX I) et le venin d'*Androctonus australis hector* (Bessalem et al., 2003).

Par ailleurs, une hyperamylasémie a été retrouvée dans les cas de pancréatite aiguë (Sankaran et al., 1987 ; Sofer et al., 1991 ; Yugandhar et al., 1999). Selon Ghallager et collaborateurs (1981), la sécrétion de l'amylase (*in vitro*) induite par le venin de *Tityus serrulatus* est due à la libération de l'Acétylcholine à partir du nerf pancréatique.

En plus des modifications enzymatiques, le venin de scorpion provoque d'autres perturbations dans l'équilibre métabolique. Une augmentation de taux des acides gras circulants et une hyperglycémie ont été également rapportées (Mohamed et al., 1972; El Asmar et al., 1979 ; Ismail et al.,1980 ; Murthy et Medh ,1986 ; Ismail et Abd El Salem, 1988 ; Abroug et al., 1994; Murthy et Hase, 1994; Correâ et al., 1997)

Plusieurs suggestions sont données pour expliquer l'hyperglycémie transitoire rapportée dans certains cas d'envenimation scorpionique. La libération des catécholamines (Freire Maia et Freira; Corrado et al., 1968), la suppression de l'insuline (Murthy et Hase, 1994), la résistance à l'insuline (Abroug et al., 1994)

#### **I-5-4 Trouble 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. En effet une hyponatrémie a été révélée chez les patients envenimés, accompagnée d'une concentration normale ou élevée de potassium et une diminution dans le taux sérique de calcium (Ismail, 1995). Une diminution du taux de sodium et calcium et une hyperkaliémie a été rapportée après envenimation des lapins avec le venin d'*Androctonus amoreuxi* (Ismail et Abd El Salem, 1988). 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 Déclenchement d'une réaction inflammatoire :**

L'inflammation est un processus physiologique de défense de l'organisme contre une agression qui entraîne une perturbation importante de l'homéostasie tissulaire.

Quelque soit la nature du stimulus, les manifestations de la réponse inflammatoire sont la conséquence de la libération de plusieurs médiateurs chimiques; des cytokines (Pro et anti inflammatoires), des chimiokines, des PAF, des Prostaglandines, des leucotriènes et une infiltration leucocytaire vers les tissus. C'est l'intensité de ces manifestations et leur durée qui changent et conditionnent les effets bénéfiques ou délétères de la réaction inflammatoire.

En effet la sévérité de la septicémie, du Syndrome de Réponse Inflammatoire Systémique sont associés aux cytokines pro- inflammatoires (TNF $\alpha$ , IL1 et IL6) (Hoch et al., 1993 ; Dinarello et al., 1997)

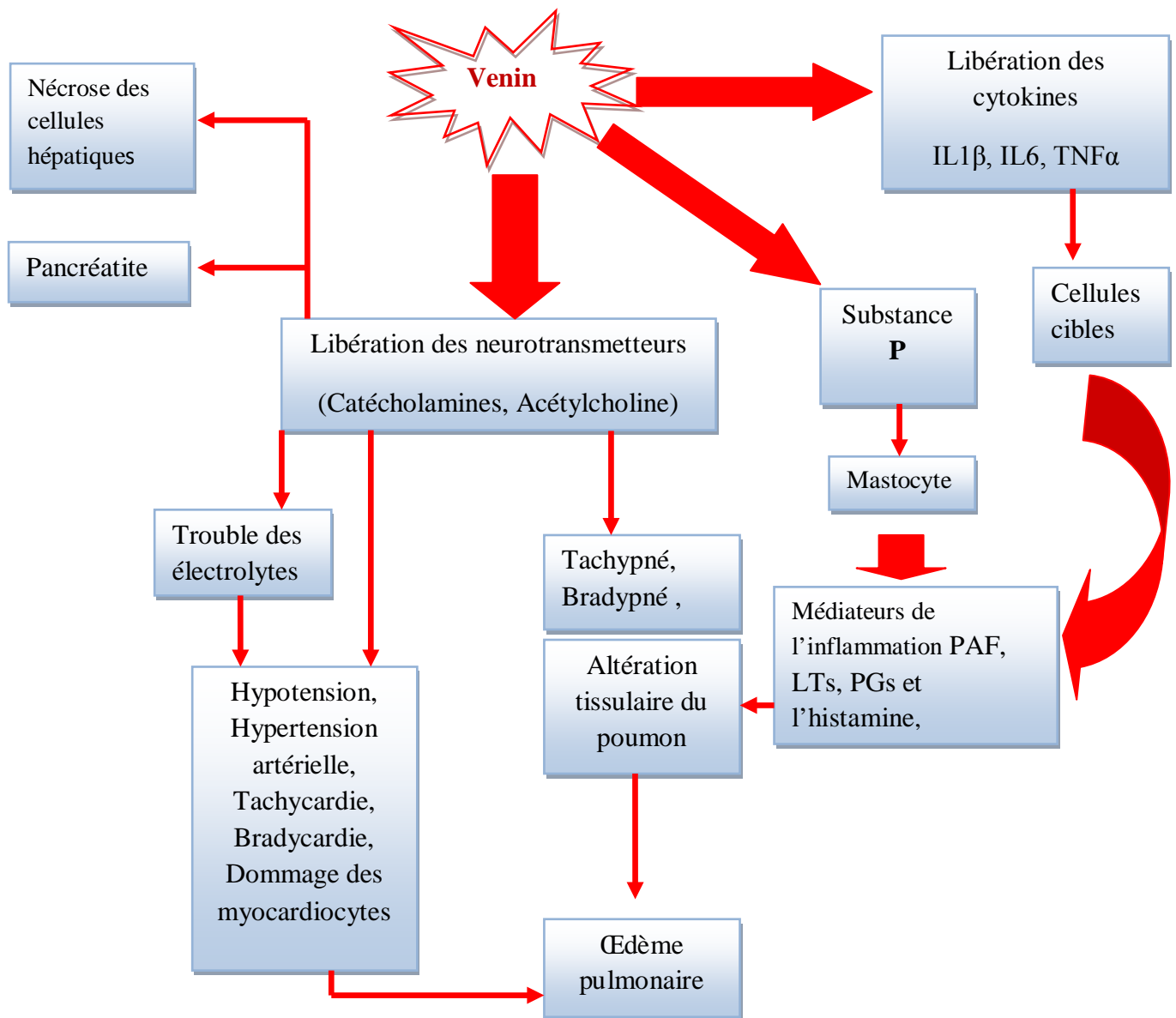
Lors d'une envenimation scorpionique plusieurs travaux ont montré une élévation dans le taux sérique des cytokines, TNF $\alpha$ , IL6, IL1, TGF $\beta$  chez les patients envenimés par les scorpions *Leiurus quinquistriatus hebreus* et *Bothotus judaicus* (Sofer et al., 1996), *Leiurus quinquestriatus* et *Buthus occitanus* (Meki et Mohey El Dean, 1998), *Tityus serrulatus* (Fukuhara et al., 2003) et *Tityus discipans* (D'suze et al., 2003), *Androctonus australis hector* (Hammoudi-Triki, 2004); et chez les animaux envenimés par la toxine  $\gamma$  de *Tityus serrulatus* (Andrade et al., 2007) et *Androctonus australis hector* (Adi-Bessalem et al., 2008).

La présence d'une corrélation positive, entre la libération des cytokines pro-inflammatoires (IL1, IL6 et TNF  $\alpha$ ) et la sévérité de l'envenimation et entre le taux sérique de l'IL8 (une chimiokine) et la concentration sérique de la troponine (cTn1) (un marqueur de lésion de myocarde) a été observée chez les patients envenimés. De plus, une augmentation importante de l'expression des ARNm de l'IL1 $\alpha$ ,  $\beta$ , et d'IL6 dans les poumons des rats

présentant un œdème pulmonaire suite à l'injection de la toxine  $\gamma$  de *Tityus serrulatus* ont permis de suggérer que les manifestations physiopathologiques de l'envenimation scorpionique peuvent être médiées au moins en une partie par la libération des cytokines (Meki et Mohey el Dean, 1998 ; D'suze et *al.*, 2003 ; Fukuhara et *al.*, 2003 ; Meki et *al.*, 2003 ; Abd El Haleem et *al.*, 2006 ; Andrade et *al.*, 2007).

L'implication de la substance P libérée par les terminaisons nerveuses dans la genèse de l'œdème pulmonaire a été également rapportée. Ce neuropeptide serait à l'origine de l'activation des mastocytes qui libèrent des médiateurs inflammatoires comme le PAF, Leucotriènes, les prostaglandines et de l'histamine responsables de l'augmentation de la perméabilité vasculaire (De Matos et *al.*, 1999, 2001).

En plus de l'élévation sérique des cytokines, le venin peut induire une activation du système de complément (Bertazzi et *al.*, 2003 ; Adi-Bessalem et *al.*, 2008). En effet l'étude de l'activité hémolytique de sérum des souris envenimées par le venin d'Aah a montré un effet biphasique (un maximum d'activité à 45 min et à 48 h). L'augmentation initiale est due probablement à la présence d'une concentration élevée des composants du complément en conséquence du dommage de tissu ou de l'action directe du venin. Le deuxième pic serait la conséquence d'une augmentation de la synthèse du complément induite par l'exacerbation de la réaction inflammatoire (Adi-Bessalem et *al.*, 2008)



➔ Libération

➔ Induction

**Figure 3 :** Quelques Effets physiopathologiques provoqués par le venin de scorpion (Campos et al., 1975 ; Ghazal et al., 1980 ; Ismail et al., 1980 ; Ismail et Abd el Salam, 1988 ; D'suze et al., 1995 ; Hering et al., 1999 ; De Matos et al., 1997, 1999, 2001 ; Bessalem et al., 2003 ; Andrade et al., 2007).

## 1-6 Traitement de l'envenimation scorpionique :

Le traitement de l'envenimation scorpionique repose sur l'administration de l'immunothérapie associée à des traitements symptomatiques dans plusieurs pays du monde.

### 1-6-1 Traitements symptomatiques :

Le traitement symptomatique varie selon l'état de gravité de la victime, il vise à atténuer les manifestations cliniques induites par les composants du venin tels que, la douleur (antalgique), l'hyperthermie (Dipyron, Acétoaminophène) l'hypertension artérielle (Prazocine, Hydralazine et Nifédipine) (Gueron et Sofer, 1990., Ismail,1990., Bawaskar et Bawaskar,1994 ), la bradycardie (Atropine), la tachycardie (Lidocaine) (Freire Maia et *al.*, 1994 ; Ismail, 1995).et les vomissements (Metoclopramide) (Freire Maia et *al.*, 1994 ; Ismail et *al.*, 1992).

L'acétoaminophène inhibe la libération des prostaglandines qui sont connu par leur activité pyrogène. Ismail et ses collaborateurs ont rapporté l'efficacité de ce médicament dans la réduction de fièvre induite par le venin de *Leiurus quinquestriatus* chez des enfants.

La prazocine antagonise d'une manière sélective l'effet des catécholamines sur les récepteurs  $\alpha_1$  adrénergiques post synaptiques et laisse intacte les récepteurs  $\alpha_2$  présynaptique et qui, stimulés par la noradrénaline, freinent la libération de cette amine à partir des terminaisons nerveuses. Elle a un effet hypotensive sans accélérer la fréquence cardiaque (Schorderet et *al.*, 1992). L'étude clinique de Bawaskar et Bawaskar en 1994 a montré son efficacité dans le traitement des patients piqués par *Buthus tamulus*, souffrant de manifestations cardiovasculaires et œdème pulmonaire.

L'hydralazine agit directement sur la musculature lisse des vaisseaux, elle induit leur relaxation en interférant avec l'entrée du calcium dans les cellules et/ou avec la fixation de second messagé IP<sub>3</sub>, limitant la libération du calcium de réticulum sarcoplasmique (Schorderet et *al.*, 1992 ; Rog et *al.*, 2007). La Nifédipine diminue la pression artérielle en bloquant les canaux calcium des muscles lisses des vaisseaux sanguins (Schorderet et *al.*, 1992). La vasodilatation induite par ces deux médicaments provoque une tachycardie reflex qui peut potentialiser l'effet du venin sur le cœur malgré cet inconvénient Sofer et Gueron (1990) ont combiné ces deux molécules pour soigné un enfant piqué par le scorpion *leiurus quinquestriatus* ayant une encéphalopathie hypertensive.

L'atropine est un médicament parasympholytique pouvant provoquer le blocage réversible des effets de l'acétylcholine au niveau des récepteurs muscariniques (Hellali, 1994). Elle n'est pas recommandée pour le traitement du syndrome muscarinique (Sudation, vomissement,

sialorrhée) à cause de l'effet potentialisant de l'hypertension artérielle et de la sévérité de l'œdème pulmonaire aiguë (OAP) induite par le venin de scorpion. L'atropine n'est indiquée qu'en cas de bradycardie cardiaque sévère avec ou sans hypotension (Ismail, 1995).

La lidocaïne réduit la durée de potentiel d'action en facilitant le courant potassique sortant et peut réduire la période réfractaire ventriculaire (Schorderet et al., 1992)

Le Métachlopramide est un antiémétisant de la famille des benzamides (antagoniste de la dopamine) ayant un effet anti reflux gastro oesophagien par stimulation de la motricité oeso-gastro-duodénale (Dorosz, 1994).

### **1-6-2 Immunothérapie :**

L'immunothérapie est le seul traitement spécifique de l'envenimation scorpionique (Compos et al., 1980, Kankokar et al., 1992; Murthy et al., 1992; Krifi et al., 1999 ; 2001). Elle consiste à administrer des fragments F(ab')<sub>2</sub> obtenu par hydrolyse enzymatique des IgG récupérés à partir d'animaux hyperimmunisés (chevaux, mulets, moutons).

Ces fragments possèdent plusieurs avantages par rapport aux IgG à cause de l'absence du fragment Fc. D'une part ils sont plus tolérés et réduisent les réactions de type allergique après leur administration à des patients. D'autre part leur volume de distribution plus large que celui des IgG leur permet une meilleure répartition dans les tissus (Freire Maia et al., 1994 ; Ghalim et al., 2000).

Pour avoir une meilleure efficacité thérapeutique, ces fragments doivent être administrés dans le délai le plus court avant que les signes d'une envenimation sévère n'apparaissent, par voie intraveineuse et en quantité suffisante (Chavez-Olortegui et al., 1994, Revelo et al., 1996).

En effet l'injection des fragments F (ab')<sub>2</sub> par voie intraveineuse, 105 min après injection du venin de *Buthus accitanus mardochei* à des lapins (Pepin- Covata et al., 1996), 60 min après administration du venin de *Tityus serrulatus* à des souris (Revelo et al., 1996) et 30 min après envenimation des lapins par *Buthus accitanus tunetanus* (Krifi et al., 2001) ont montré une grande efficacité à neutraliser l'antigène circulant et le déplacement du venin fixé, contrairement aux fragments administrés par voie intramusculaire. Cette voie d'inoculation, retarde le passage des fragments d'anticorps dans la circulation sanguine, et par conséquent réduit l'efficacité de ces fragments à neutraliser les toxines circulantes (Pepin-Covata et al., 1996).

Ces résultats expérimentaux corroborent avec ceux retrouvés en clinique qui ont montré une réversibilité des symptômes et une réduction dans le temps de guérison des

patients envenimés suite à l'injection intraveineuse des fragments  $F(ab')_2$  (De Rezende et al., 1995 ; Krifi et al., 1999).

La capacité des  $F(ab')_2$  à bloquer la toxicocinétique du venin, dépend également de la dose administrée. L'injection de 10 ml de fragment  $F(ab')_2$  produit une diminution significative dans le taux sérique du venin et une amélioration dans les conditions cliniques des patients envenimés par *Androctonus mauritanicus mauritanicus* et *Buthus occitanus* contrairement aux patients qui ont reçu 2-5 ml de ce même antivenin (Ghalim et al., 2000).

La production des immunosérums se fait par injection de doses croissantes et répétées de venin aux animaux. L'extrême toxicité du venin de scorpion limite l'administration de grande quantité de ce venin au cours de l'immunisation. Pour résoudre ce problème, des travaux ont rapporté l'utilisation des toxines encapsulées dans des liposomes (Freitas et al., 1989; Chavez-Olortegui et al., 1991) d'autres ont utilisé des molécules non toxiques retrouvées dans le venin pour produire des anticorps capables de reconnaître les composants toxiques (Srairi-Abid et al., 2008). Les travaux de Abib et Laraba-Djebari (2003) ont montré que l'application des rayons  $\gamma$  (2K Gy) sur le venin d'*Androctonus australis Hector* permet d'obtenir un venin détoxifié capable d'induire chez les lapins la production d'anticorps ayant la capacité de neutraliser les effets physiopathologiques du venin natif.

Par ailleurs, le développement de la biologie moléculaire a permis la production de petits fragments d'anticorps contenant que les deux domaines variables VH et VL, appelés scFv (Single chain Fragment Variable), capable de reconnaître les toxines Aah I et Aah II et cela en introduisant l'ADNc récupérée des hybridomes producteurs de chacune de ces toxines dans le génome de *E.coli*. Ces scFv ont une demi-vie très courte lorsque ils sont administrés à l'animale, leur élimination rénale limite leur efficacité dans la neutralisation des toxines. Ils ont servi de module de base pour le développement de structures plus complexes, des formes dimérique (Diabody) et Trimérique (Triabody) avec des propriétés pharmacocinétiques améliorées (Mousli et al., 1998 ; Aubrey et al., 2003 )

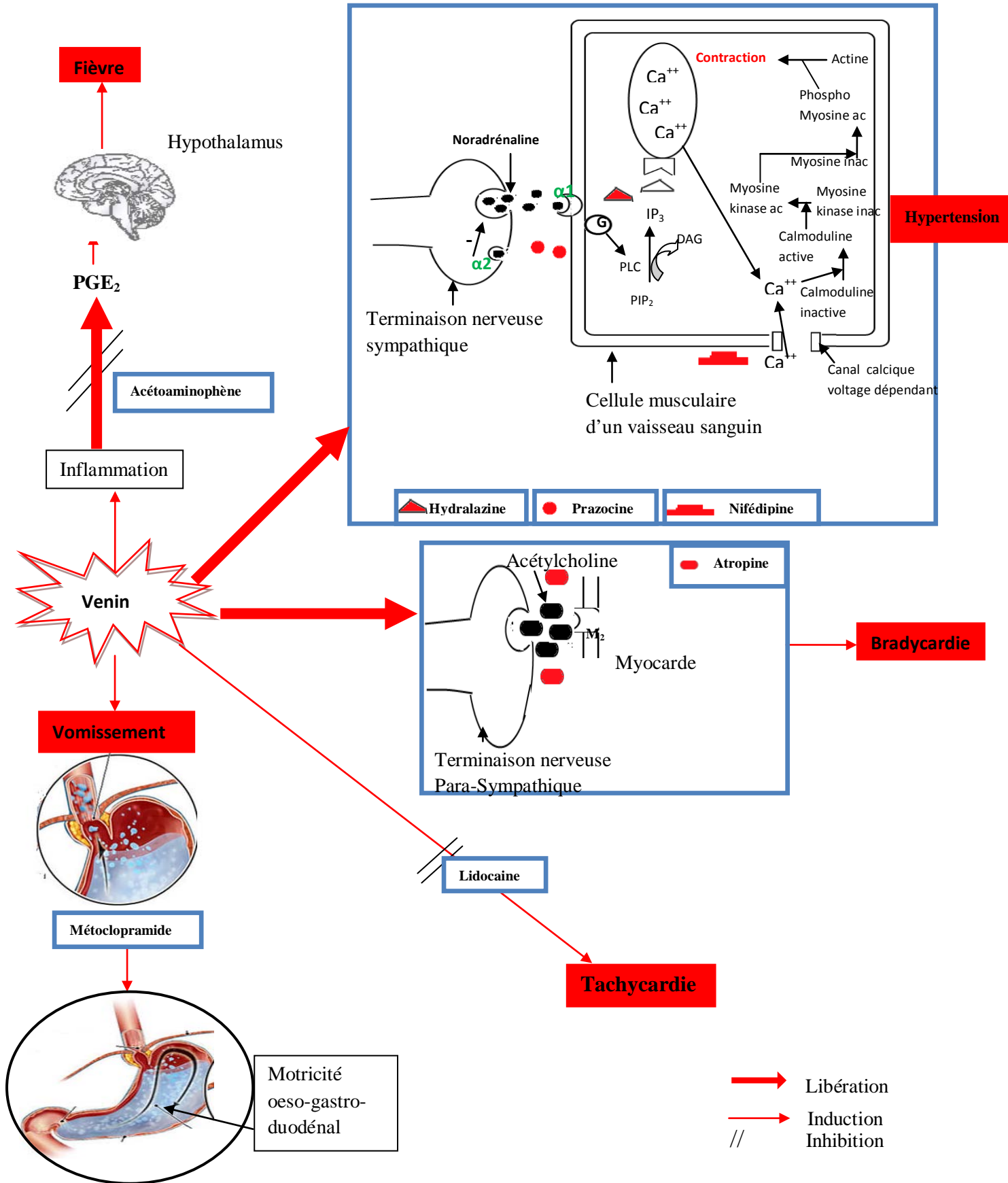


Figure 4 : Mode d'action de quelques traitements symptomatiques administrés aux personnes envenimés par le scorpion (Schorderet et *al.*, 1992 ; Wilsson et *al.*, 1992 ; Dorosz, 1994., Rog et *al.*, 2007).

## Chapitre II : Matériel et Méthodes

### II-1 Matériel :

#### II-1-1 Matériel biologique :

##### II-1-1-1 Le venin :

Le venin d'*Androctonus australis hector* obtenu par stimulation électrique est fourni sous forme lyophilisée par le Laboratoire de Recherche et de Développement sur les Venins de l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA).

##### II-1-1-2 Anticorps couplé à la peroxydase

- Anticorps anti IgG de lapin couplé à la peroxydase (Sigma)
- Fragments F(ab')<sub>2</sub> de moyenne et de haute affinité, spécifiques du venin d'*Androctonus australis hector* couplés à la peroxydase fournis par le Laboratoire de Recherche et de Développement sur les Venins de l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA).

##### II-1-1-3 Les animaux :

Les lapins albinos (2 à 2,5 kg) et les souris NMRI (20 ± 2 g) sont fournis par l'animalerie de l'Institut Pasteur d'Algérie (Annexe de Kouba).

### II-1-2 Matériel non biologique :

Les produits chimiques sont fournis par les firmes suivantes :

Acétate de sodium (Merck), Acide chloridrique (Panreac), Acide sulfurique (Merck), Acrylamide (Panreac), Adjuvant de Freund complet incomplet (Sigma), Alcool (Panreac), Bicarbonate de sodium, Bisacrylamide (Merck), Bleu de promophénol (Sigma), Bleu de Coomassie (Fluka), Carbonate de sodium, Chlorure de sodium, Dihydrogénophosphate de potassium, Dipotassium hydrogénophosphate, Eau oxygénée (Merck), Eukit (Fluka), Eosine B (Sigma), Glycine (Merck), Hématoxyline (Sigma), Hydroxyde de sodium (Prolabo), O Diazinidine (Sigma) O-Phénylène Diamine OPD (Sigma), Paraffine (Panreac), Pepsine (Sigma), Sepharose 4B, Sulfate d'ammonium (Merck), TEMED, Tris HCl (Sigma), Tween-20 (Pharmacia).

Les produits pharmaceutiques :

Atropine sulfate (Renaudin), Diclofénac de sodium (Clofinal<sup>R</sup>) (Saidal), Propranolol (ALVOCARDYL<sup>R</sup>) (Astra Zeneca) ,

**II- 2 Méthodes :****II-2-1 Production de fragment F(ab')<sub>2</sub> spécifiques du venin d'*Androctonus amoreuxi* :****II-2-1-1 Immunisation :**

Un lot de 5 lapins est immunisé dans le but de produire des anticorps spécifiques au venin d'Aam. Chaque lapin a reçu par voie sous cutané 2 ml de solution de venin selon un calendrier préétabli (Tableau).

<b>Jours (J)</b>	<b>Quantité du venin (µg/lapin)</b>
<b>J<sub>0</sub></b>	<b>375</b>
<b>J4</b>	<b>625</b>
<b>J8</b>	<b>938</b>
<b>J15</b>	<b>1250</b>
<b>J21</b>	<b>1250</b>
<b>J29</b>	<b>1250</b>
<b>J36</b>	<b>1250</b>

La solution du venin est mélangée avec l'adjuvant de Freund complet (V/V) lors de la première injection, et avec l'adjuvant de Freund incomplet (V/V) lors de la seconde injection, et sans adjuvant pour le reste des injections.

Des tests ELISA simples ont été effectués afin de déterminer le titre en anticorps des immuns sérums.

Le test ELISA (Enzyme Linked Immunosorbant Assay) simple permet la détection ou le dosage des anticorps (Ac). La révélation de la réaction Antigène-Anticorps est réalisée grâce à la fixation d'un Ac anti-isotype conjugué à une enzyme, et à l'utilisation d'un substrat chromogène de l'enzyme. L'apparition d'une réaction colorée dont l'intensité est proportionnelle à la dégradation du substrat permet de quantifier les Ac.

Les puits d'une microplaque (96 puits) sont sensibilisés par 100 µl/puits d'une solution de venin d'Aam à 5 µg/ml dans du tampon carbonate-bicarbonate (0,1M ; pH 9,5) puis incubés une nuit à 4°C. L'excès de venin est éliminé par une série de 4 lavages avec le tampon PBS-Tween 20(pH 7,4 ; 0,1%) et les sites de fixation restants sont saturés avec une solution de PBS-Tween 20-Lait écrémé (5%) à raison de 200 µl/puits. Après une incubation

d'une heure à 37°C et une série de lavages, une gamme de dilutions successives des échantillons sériques est effectuée dans le tampon PBS-Tween 20-Lait écrémé puis laissé incubé à 37°C pendant une heure. Après 4 lavages successifs, le conjugué (anticorps anti IgG de lapin couplé à la peroxydase) dilué à 1/2000 est déposé à raison de 100 µl/puits et laissé incubé pendant une heure à 37°C.

La réaction Ag-Ac est visualisée après une dernière série de lavage, par addition de 100 µl/puits du substrat chromogène (20 mg d'OPD dissout dans 20 ml du tampon phosphate 0,01M ; pH 7,4 et 20 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), suivi d'une incubation de 30 min à température ambiante à l'abri de la lumière. La mesure de l'absorbance à 490 nm est réalisée après ajout d'une solution d'arrêt, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N à raison de 50 µl/puits.

Le titre en Ac correspond à l'inverse de la dernière dilution pour laquelle la réaction enzymatique est encore détectée.

### **II-2-1-2 Précipitation des immunoglobulines par le sulfate d'ammonium :**

La précipitation différentielle au sulfate d'ammonium est une des étapes initiales des procédures de purification, elle permet la récupération des protéines d'intérêt en changeant la concentration en sel.

Après sacrifice des lapins, le sang total récupéré est mis à décanter pendant 48 h à température ambiante et à l'issue de cette décantation l'exsudat séparé du coagulum est centrifugé à 3000 rpm (rotation par minute) pendant 20 min pour récupérer le sérum. Ce dernier est dilué à ½ dans du NaCl 0,9% puis soumis à une première précipitation par le sulfate d'ammonium à 40% à 4°C. Le culot obtenu après centrifugation est repris dans un volume minimal de sulfate d'ammonium à 33% de saturation puis centrifugé à 3000 rpm pendant 20 min. Le culot final est repris dans du NaCl 0,9% puis soumis à une dialyse contre de l'eau distillée à 4°C, sous agitation douce pendant 48 heures.

### **II-2-1-3 Hydrolyse enzymatique des IgG par la pepsine :**

La pepsine (E.C 3.4.23.1) est une enzyme protéolytique produite à partir de la muqueuse gastrique du porc, elle a un poids moléculaire de 35 kDa et son activité enzymatique est maximale à un pH acide (Brewer, 1984).

L'hydrolyse des IgG par la pepsine donne des fragments F(ab')<sub>2</sub> bivalent de 100 kDa et des fragments Fc dégradés (Ternynck et Avrameas, 1991).

Le pH de l'immun sérum précipité et dialysé est ajusté à un pH de 4,5 avec de l'acide acétique 1N. Une solution de pepsine (2 mg/ml d'acétate de sodium 0,1M) est ensuite ajoutée

à raison de 2 mg de pepsine pour 100 mg d'IgG. Le mélange est incubé pendant une nuit dans un bain marie à 37°C.

La réaction enzymatique est arrêtée en ajustant le pH du mélange à 8 avec du NaOH (1N) suivi d'une dialyse contre le tampon PBS (0,1M ; pH 7,4) à 4°C sous agitation douce pendant 48 h.

### **II-2-2 Contrôle de l'homogénéité des fragments F(ab')<sub>2</sub> par électrophorèse SDS-PAGE**

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide, SDS-PAGE est une méthode d'analyse et de fractionnement basée sur la migration différentielle de particules chargées électriquement sous l'influence d'un champ électrique ; Le SDS provoque la dénaturation des protéines et leurs confère une charge négative qui sous l'effet de champ électrique migrent vers l'anode selon seulement leur poids moléculaire.

La réalisation de cette méthode consiste en la préparation de deux gels (gel de séparation 12% et gel de concentration 5%) après polymérisation, les échantillons mélangés au tampon d'essai et chauffés à 100°C pendant 5 min sont déposés dans les puits, ensuite la plaque est placée dans une cuve contenant le tampon de migration. Le gel est ensuite mis pendant une nuit sous agitation douce dans une solution de coloration (bleu de Coomassie 0,05%, Isopropanol 25% et Acide acétique 10%) puis dans deux bains de décoloration, le premier est constitué de méthanol 25% et de l'Acide acétique 10%, le deuxième contient l'isopropanol 12,5%, et l'acide acétique 10%.

La migration des marqueurs de poids moléculaire (phosphorylase b 94 kDa ; albumine 67 kDa ; ovalbumine 43 kDa ; anhydrase carbonique 30 kDa ; inhibiteur de la trypsine 20,1 kDa ; lactalbumine 14,4 kDa) permet d'obtenir une courbe d'étalonnage, logarithme de PM en fonction du rapport frontale (Rf).

### **II-2-3 Mise en évidence de la réaction croisée entre le venin d'*Androctonus amoreuxi* et le venin d'*Androctonus australis hector* :**

Le croisement antigéniques entre le venin de scorpion *Androctonus amoreuxi* et celui d'*Androctonus australis hector* est vérifié par deux techniques :

#### **II-2-3-1 ELISA Simple :**

Une gamme de dilutions des fragments F(ab')<sub>2</sub> dirigés contre le venin d'Aam est réalisée sur une microplaque sensibilisée par 5 µg/ml du venin d'Aah (Le protocole de cette technique est détaillé sur la page 25).

### II -2-3-2 Chromatographie d'affinité :

La chromatographie d'affinité est une technique basée sur la séparation des molécules en fonction de leur affinité au ligand fixé à un support inerte.

Les fragments F(ab')<sub>2</sub> spécifiques du venin d'*Androctonus amoreuxi* récupérés sont déposés à raison de 100 UDO sur le gel de Sepharose 4B, activé au Bromure de Cyanogène (BrCN) et couplé à la fraction toxique du venin d'*Androctonus australis hector* (FtoxG-50).

Une première élution est effectuée avec le tampon PBS (0,1M ; pH7,5) pour éluer les F(ab')<sub>2</sub> non spécifiques suivi par une élution avec le tampon glycine (0,1M ; pH3) pour déplacer les F(ab')<sub>2</sub> de moyenne affinité et afin d'éluer les F(ab')<sub>2</sub> de haute affinité le tampon glycine (0,1M ; pH 2) est utilisé.

Les fractions sont collectées à raison de 3 ml par tube avec un débit constant de 18 ml/h. La lecture de la densité optique est réalisée à 280 nm.

### II-2-4 Etude de la toxicocinétique du venin d'*Androctonus amoreuxi* par ELISA Sandwich :

Le test ELISA sandwich permet de quantifier un antigène en utilisant deux anticorps spécifiques de cet antigène dont un est fixé à une surface solide et l'autre est couplé à une enzyme qui transforme le substrat en un produit coloré.

Après le sacrifice des souris envenimées par injection sous cutanée de la dose sublétales du venin d'Aam (400 µg/kg) et des souris témoins (injectés avec du NaCl 0,9%), le sang et le tissu entourant le site d'injection, sont récupérés.

Le tissu entourant le site d'injection est homogénéisé dans le NaCl (0.9%) puis centrifugé pour récupérer le surnageant. Le sérum est obtenu après centrifugation du sang total.

Les puits de microplaque sont sensibilisées avec 5 µg/ml d'une solution de fragments F(ab')<sub>2</sub> anti-Aam dilués dans du tampon carbonate-bicarbonate (0,1M ; pH 9,5) à raison de 100 µl/puits pendant une nuit à 4°C. Après 4 lavages avec le tampon PBS-Tween 20 (0,1%), la saturation est réalisée avec le tampon PBS-Tween 20-lait écrémé 5% à raison de 200 µl/puits pendant une heure à 37°C. Une série de lavages est réalisée de nouveau suivie de la répartition de la gamme de venin d'Aam (0,5 à 20 ng/ml) ainsi que les différents échantillons. Après une incubation de 1 h 30 à 37°C et 4 lavages successives, les fragments F(ab')<sub>2</sub> anti-Ftox G-50 du venin d'Aah couplés à la peroxydase, dilués à 1/1000 dans du tampon PBS sont répartis à raison de 100 µl/puits.

La microplaque est ensuite mise à incuber 1 h à 37°C. La révélation se fait par addition de 100 µl/puits du substrat chromogène (20 mg OPD dans 10 ml de tampon phosphate 0,01M ; pH 7,3 et 10 µl d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%)), après 30 minutes d'incubation à l'obscurité, la réaction est arrêtée par ajout de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2N) à raison de 50 µl/puits.

L'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 490 nm grâce à un lecteur de plaque.

### II-2-5 Etude de la physiopathologie induite par le venin d'*Androctonus amoreuxi* :

Les poumons prélevés des souris envenimées par la dose létale en présence et en absence du diclofénac (40 mg/kg par voie intramusculaire) ou l'atropine (1 mg/kg) ou le propranolol (0,1mg/kg) injectés par voie intra péritonéale, sont pesés. L'index pulmonaire est calculé selon la formule suivante : Poids de poumon (g) X 100 /poids de la souris (g)

#### II-2-5-1 Etude du processus inflammatoire

##### - Quantification des cytokines IL1-β, IL 6, IL10, IL 12, IFN γ.

La cinétique de production de l'IL1-β, IL6, IL10, IL12 et IFNγ au niveau du sérum 45, 180, 360 et 1440 min après injection du venin d'Aam (400 µg/kg) est déterminée par ELISA sandwich.

Les échantillons à doser ainsi que les standards sont incubés pendant 1 h, ensuite 50 µl/puits d'anticorps biotinylés sont déposés et incubés 1 h à température ambiante. Le dépôt du conjugué Streptavidine-HRP (horse radish peroxydase) est effectué suivi d'une incubation de 30 min à température ambiante. La solution de 3-3',5-5' Tétraméthyl benzidine (TMB) est additionnée à raison de 100 µl/puits et après 30 min d'incubation à l'abri de la lumière et à température ambiante, la solution d'arrêt, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,18 mM est ajoutée (100 µl/puits) et l'absorbance est mesurée à 450 nm. Les concentrations des cytokines en pg/ml sont déduites des courbes standards. Les gammes des étalons standards des interleukines et les seuils de détections de chaque test ELISA sont illustrés dans le tableau suivant.

**Tableau V** : Gamme des étalons standard des cytokines et seuil de détection du test ELISA Sandwich.

Cytokines	Concentration des cytokines de la gamme étalon (pg/ml)	Seuil de détection
<b>IL-1β</b>	0-15- 6 - 62,5 – 250- 1000	< 3 pg/ml
<b>IL-6</b>	0-51- 128- 320- 800- 2000	< 7 pg/ml
<b>IFNγ</b>	0-37 - 111 - 3000	< 10 pg/ml
<b>IL-12</b>	0-188- 375- 750- 1500- 3000	< 12 pg/ml
<b>IL-10</b>	0-37,6 – 111 – 333 - 1000	< 12 pg/ml

### - Dosage de la myeloperoxydase

La myeloperoxydase (MPO) (EC.1.11.1.7) est une enzyme hémolinique qui exerce dans les phagolysosomes une forte activité anti-microbienne (Tolber et Koeffler, 1991 ; Taurog et Dorris, 1992), elle est considérée comme un marqueur d'infiltration des polynucléaires neutrophiles.

L'activité enzymatique de la myéloperoxydase est quantifiée selon la méthode suivante Les poumons prélevés des souris envenimées par la dose sublétales du venin d'Aam (400 µg/kg) en absence et en présence des fragment F(ab')<sub>2</sub> ( injecté par voie intra péritonéale, 30 min après l'administration du venin) et des souris envenimés par la dose sublétales (900µg/kg) ou létale du venin d'Aam seul ou après traitement avec le diclofénac ,l'atropine ou le propranolol sont repris dans le tampon Tris-HCl 0,05M pH 6,6 à 4°C et broyés à l'aide d'un homogénéisateur, puis centrifugés à 6000 rpm pendant 30 minutes à 4°C. Les premiers surnageants (S1) sont récupérés et stockés à 4°C. Les culots subissent une série de congélations (- 20°C) décongélations, puis repris dans 1 ml de tampon Tris-HCl 0,05M pH 6,6 suivis d'une deuxième centrifugation à 6000 rpm pendant 30 minutes à 4°C. 100 µl du second surnageant (S2) et 100 µl du premier (S1) sont additionnés à 300 µl du 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

L'activité est évaluée par mesure de l'absorbance à 460 nm après une minute. Les résultats sont exprimés en unité de densité optique (UDO).

### - Dosage de l'activité de la peroxydase éosinophile:

Le dosage de l'activité de la peroxydase éosinophile (EPO) dans les poumons permet de mettre en évidence la séquestration des éosinophiles au niveau de l'arbre respiratoire.

Les poumons prélevés après les mêmes temps choisis pour le dosage de la MPO, sont homogénéisés dans du tampon Tris HCl (0,05M ; pH 8) –Triton X100 0,1% puis centrifugé et les surnageant récupérés sont repartis à raison de 50 µl/puits suivi du dépôt de 100 µl /puits de substrat chromogène (20 mg d'OPD dans 10 ml de tampon Tris HCl-Triton X100 et 20 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). La lecture est réalisée avant et après une heure d'incubation à 37°C à 490 nm (La différence entre les deux DO représente l'activité de l'EPO).

### II-2-5-2 Etudes des modifications métaboliques induites par le venin d'*Androctonus amoreuxi* en absence et en présence des traitements :

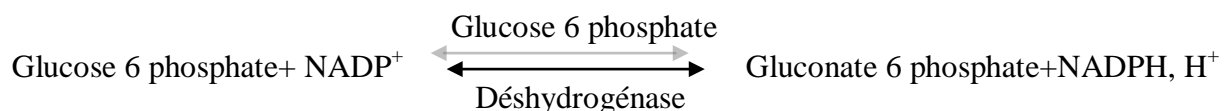
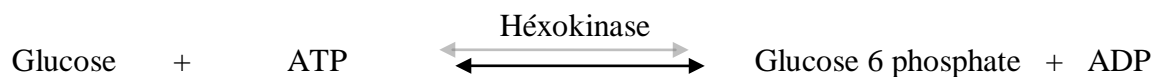
Le dosage du lactate Deshydrogénase (LDH) est réalisé au niveau du sérum et de l'homogénat du foie récupéré après envenimation des souris par 400 µg/kg du venin d'Aam en présence et en absence d'immunothérapie.

La LDH catalyse la réaction suivante :



L'échantillon (20 µl) est additionné à 500 µl du réactif (Substrat de LDH) et laissé incubé 0,5 min à 25°C. La lecture de la densité optique est faite à 0,5 ; 1,5 ; 2,5 ; 3,5 min à une longueur d'onde de 340 nm. L'activité enzymatique de la LDH/ min est déterminé par le calcul de la différence entre deux DO successives.

L'activité enzymatique de la CPK dans le sérum des souris envenimée avec deux doses de venin (400 et 900µg/kg) est déterminée en présence et en absence de différents traitements (fragments F(ab)'<sub>2</sub>, le Diclofénac, Atropine, Propranolol) par mesure de l'absorbance à 340 nm qui correspond à l'absorbance maximale de NADPH, H<sup>+</sup> qui se forme suite à une cascade de réactions enzymatiques :



Les échantillons (20  $\mu$ l) sont mélangés à 500  $\mu$ l du réactif (Enzymes, Coenzymes, substrat). L'absorbance est lue à 1, 2, 3 et 4 min. L'activité enzymatique de la CPK est déterminée selon le même calcul réalisé pour la LDH.

### **II-2-5-3 Etude histologique :**

Les organes poumons et foie récupérés des souris injectées par les différentes doses du venin d'*Androctonus amoreuxi* en présence et en absence des fragments F(ab')<sub>2</sub>, le Diclofénac, Atropine, Propranolol sont fixés par le formol 4%, pendant 48 h puis préparées selon le protocole classique des techniques d'histologie (Annexe1).

Après la solidification de la paraffine, des coupes de 3  $\mu$ m sont effectuées en utilisant un microtome. Les rubans obtenus sont étalés sur des lames, séchés une nuit à 64°C, déparaffinés avec le xylène, réhydratés par des bains d'alcool (100° à 70°), colorés avec de l'Hématoxyline-Eosine.

Les observations des tissus ainsi que la prise des photos sont réalisés par un microscope photonique au grossissement X 40.

### **II-2-6 Expression statistique des résultats**

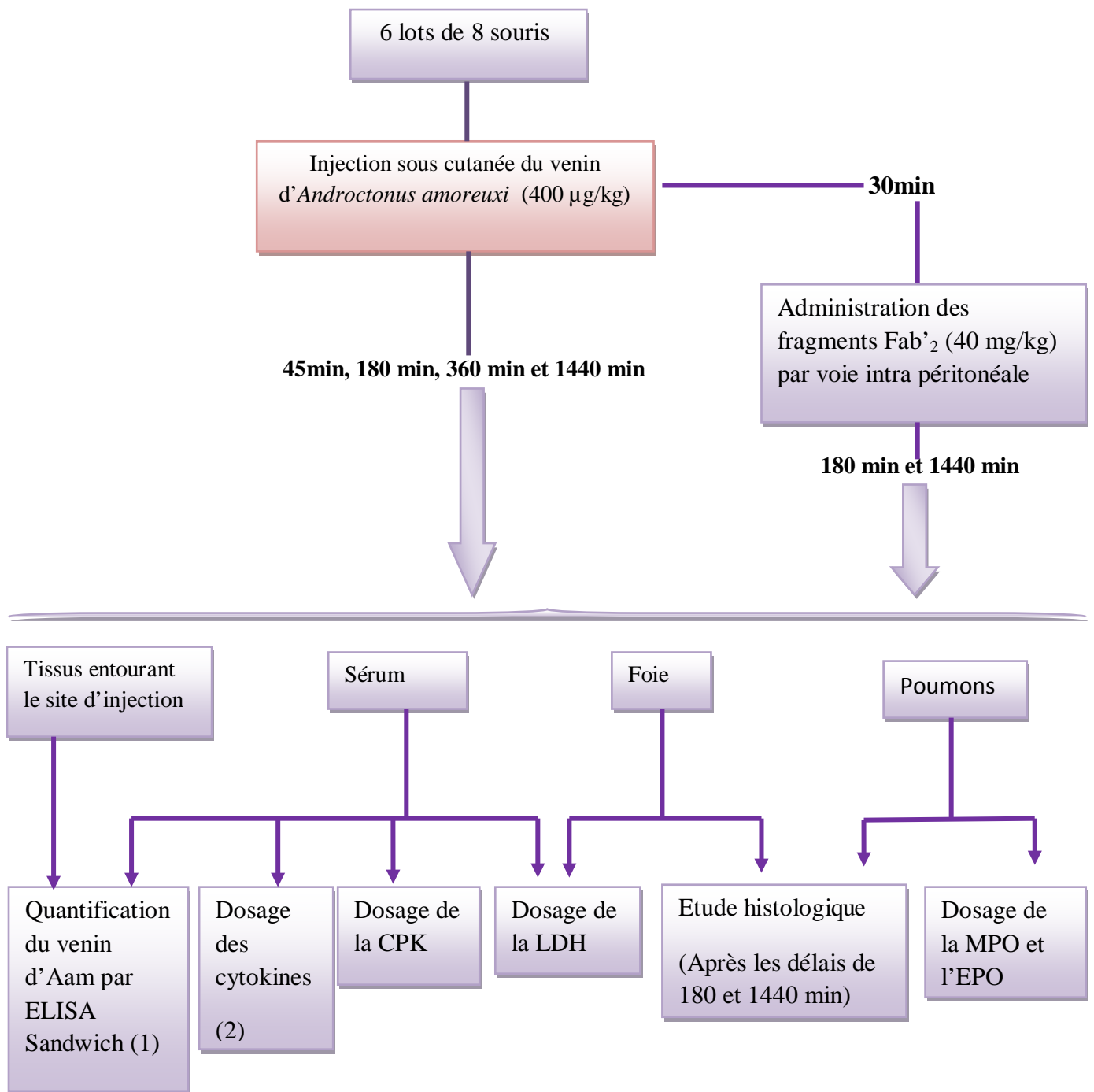
Tous les résultats ont été exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type. Une analyse de comparaison de moyenne selon le test de différence significative honnête de Tukey a été effectuée.

Degré de signification :

\* P < 0,05 significatif

\*\* P < 0,01 très significatif

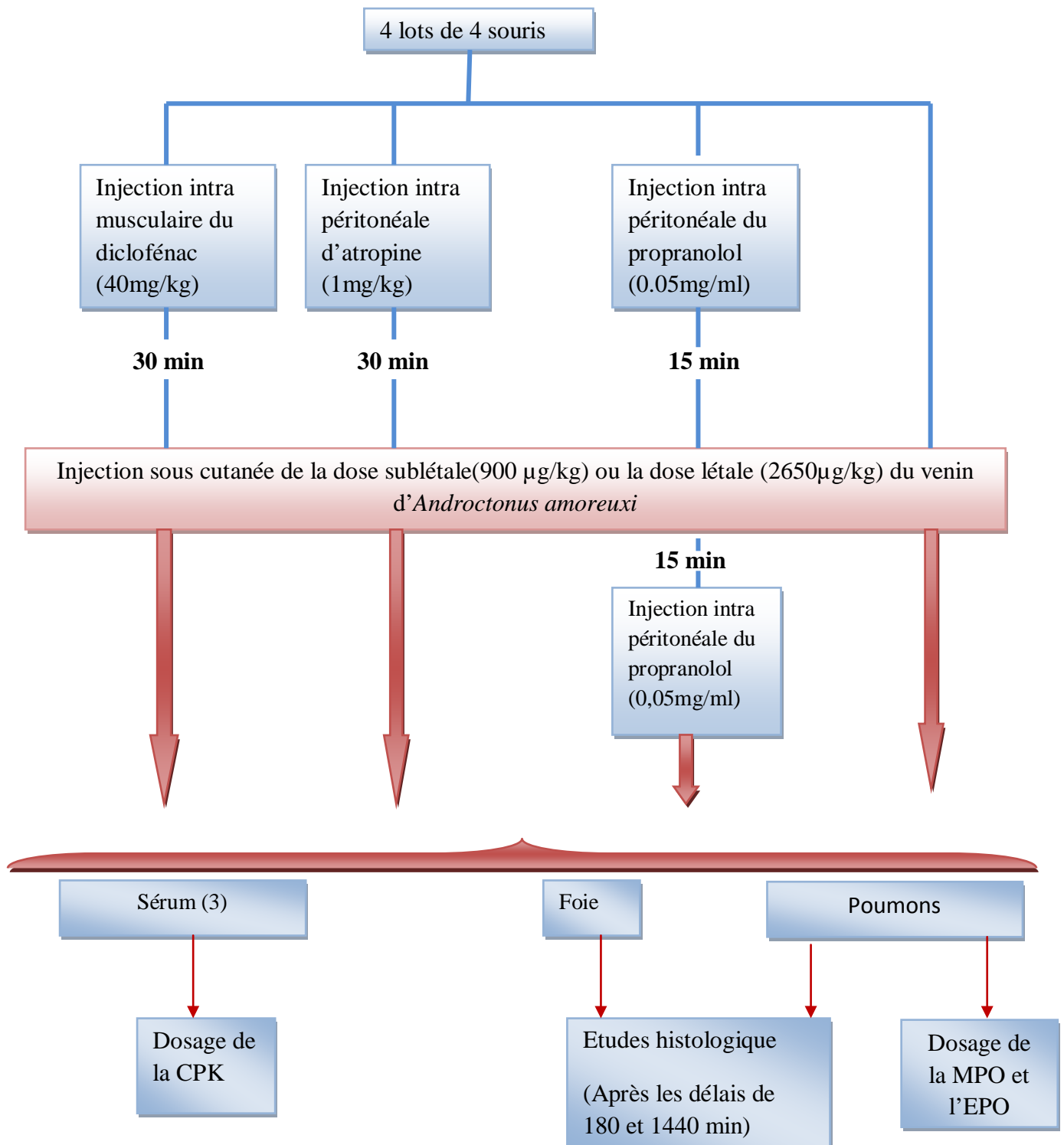
\*\*\* P < 0.001 hautement significatif



(1)-Le dosage est réalisé après 15, 30, 60, 180, 1440 min après injection du venin seul

(2)-Les cytokines sont quantifiées en présence du venin seul.

**Figure 5** : Schéma récapitulatif du Protocole expérimental de l'envenimation des souris par la dose sublétales du venin d'*Androctonus amoreuxi* (400 µg/kg) en absence et en présence d'immunothérapie.



(3) le dosage est effectué 180 min après injection de la dose sublétales

**Figure 6** : Schéma récapitulatif du Protocole expérimentale de l'envenimation des souris par deux doses de venin d'*Androctonus amoreuxi* en absence et en présence traitement.

### Chapitre III : Résultats et discussion

#### III-1 Préparation des fragments F(ab')<sub>2</sub> antivenin d'*Androctonus amoreuxi* :

Les fragments F(ab')<sub>2</sub> antivenin d'Aam ont été obtenus après immunisation des lapins, précipitation au sulfate d'ammonium des anticorps et une hydrolyse enzymatique à la pepsine. L'injection de doses croissantes du venin d'Aam à des lapins selon un calendrier étalé sur 36 jours a permis d'obtenir un plateau de production d'anticorps de 12800 au bout de 29 jours (Figure 7).

La précipitation du sérum issu de cette immunisation par le sulfate d'ammonium suivi par une hydrolyse à la pepsine a donné des fragments F(ab')<sub>2</sub> d'environ 100 kDa (Figure 8).

Le test ELISA réalisé pour déterminer le titre des IgG précipités et des fragments F(ab')<sub>2</sub> a montré que ces deux molécules ont un titre (12800) quasi semblable à celui de l'immunsérum (Figure 9).

#### III-2 Croissement antigénique, venin d'*Androctonus amoreuxi* et venin d'*Androctonus australis hector* :

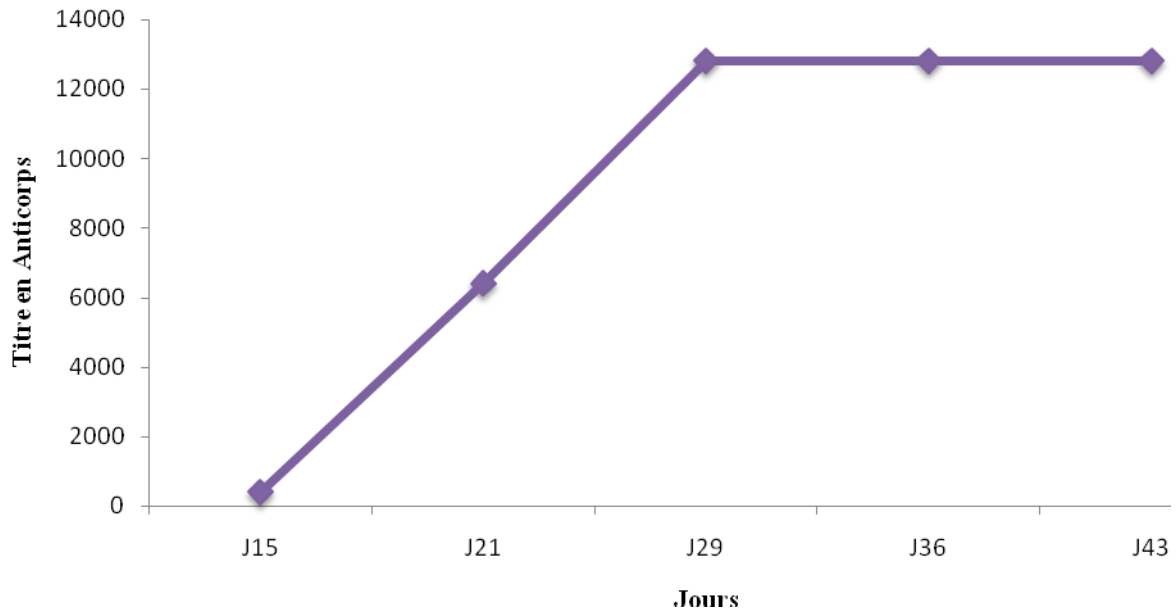
Le dosage par ELISA des fragments F(ab')<sub>2</sub> anti-Aam sur une microplaque sensibilisée par le venin d'Aah et l'élution de ces mêmes fragments sur une colonne de chromatographie d'affinité couplée à la Ftox G-50 du venin d'Aah, ont donné respectivement, un titre de 6400 et un profil chromatographique avec trois pics (anticorps non spécifique, anticorps de moyenne et de haute affinité) (Figure 10 et 11).

Ce résultat chromatographique est similaire à celui de Laraba-Djebari et Hammoudi-Triki (1999) obtenu après purification des fragments F(ab')<sub>2</sub> anti FtoxG-50 du venin d'Aah. Cela laisse suggérer l'existence d'épitopes communs entre les venins de ces deux scorpions appartenant à la même espèce, *Androctonus*.

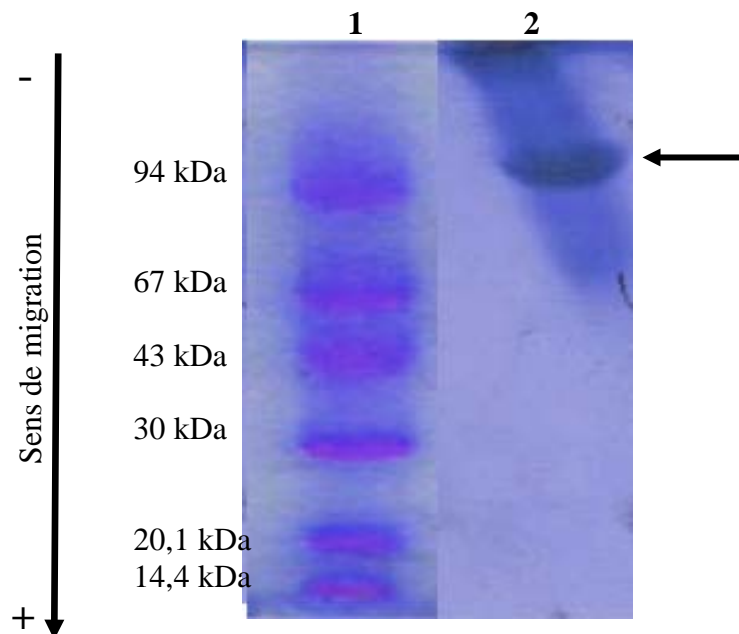
#### III-4 Toxicocinétique du venin d'*Androctonus amoreuxi* :

Le venin d'Aam est quantifié par ELISA sandwich dans le sérum et le tissu entourant le site d'injection des souris envenimées par une dose sub létale (400 µg/kg). Les prélèvements de sang et ce tissu sont effectués entre 15 et 1440 min et les concentrations sont déduites d'une courbe standard de concentration connues de venin d'Aam.

Les résultats obtenus montrent que le venin d'*Androctonus amoreuxi* est rapidement absorbé du site d'injection, sa concentration diminue dans le site d'injection et augmente dans le sérum avec un taux sérique maximal à 30 min (Figure 12). Ce résultat corrobore avec celui obtenu par Hammoudi-Triki et ces collaborateurs en 2007 dans l'étude de la toxicocinétique menée sur le venin d'*Androctonus australis hector* après envenimation des rats.



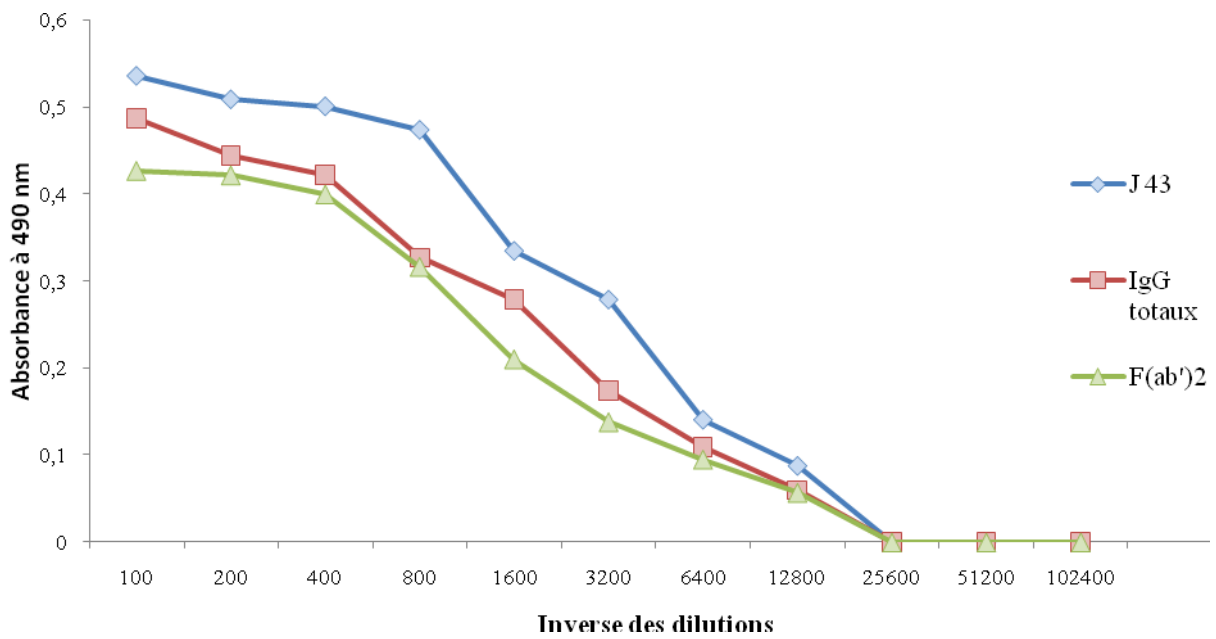
**Figure 7 :** Production des anticorps spécifiques du venin d'*Androctonus amoreuxi*.



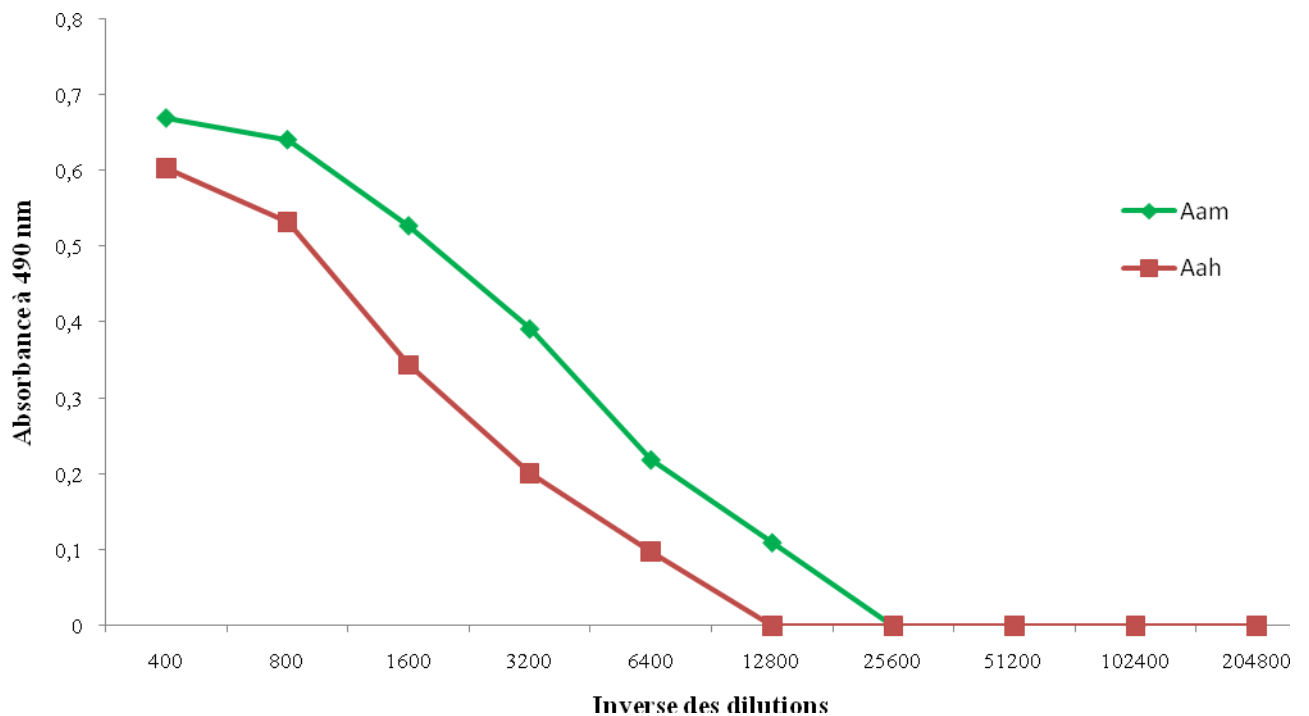
**Figure 8 :** Electrophorèse sur SDS-PAGE des anticorps effectuée dans les conditions non réductrices sur un gel de polyacrylamide à 12,5% et colorée au bleu de coomassie R 250.

La Piste 1 correspond à la migration des marqueurs de poids moléculaires (phosphorylase b 94 kDa ; albumine 67 kDa ; ovalbumine 43 kDa ; anhydrase carbonique 30 kDa ; inhibiteur de la trypsine 20,1 kDa ; lactalbumine 14,4 kDa).

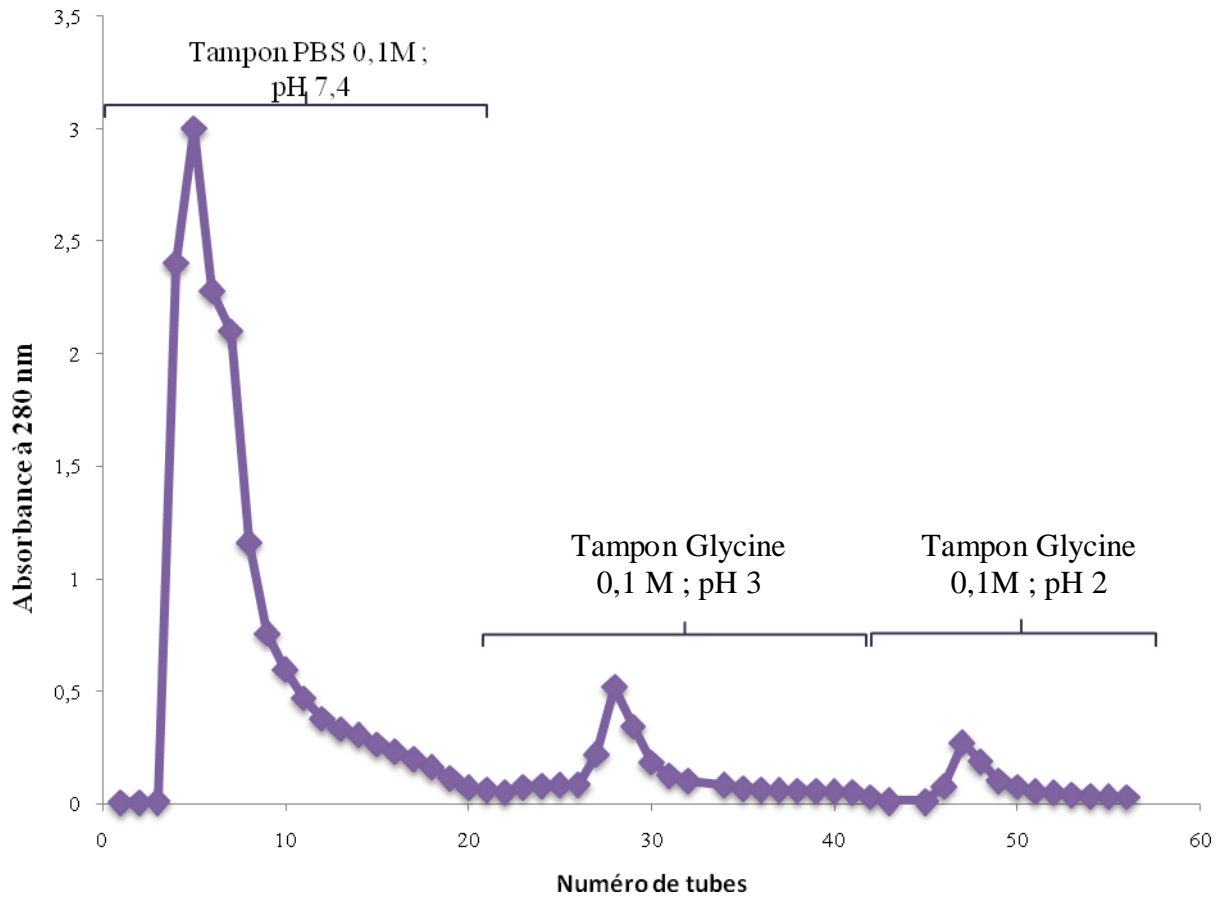
La piste 2 correspond au fragment  $F(ab')_2$  anti le venin d'Aam.



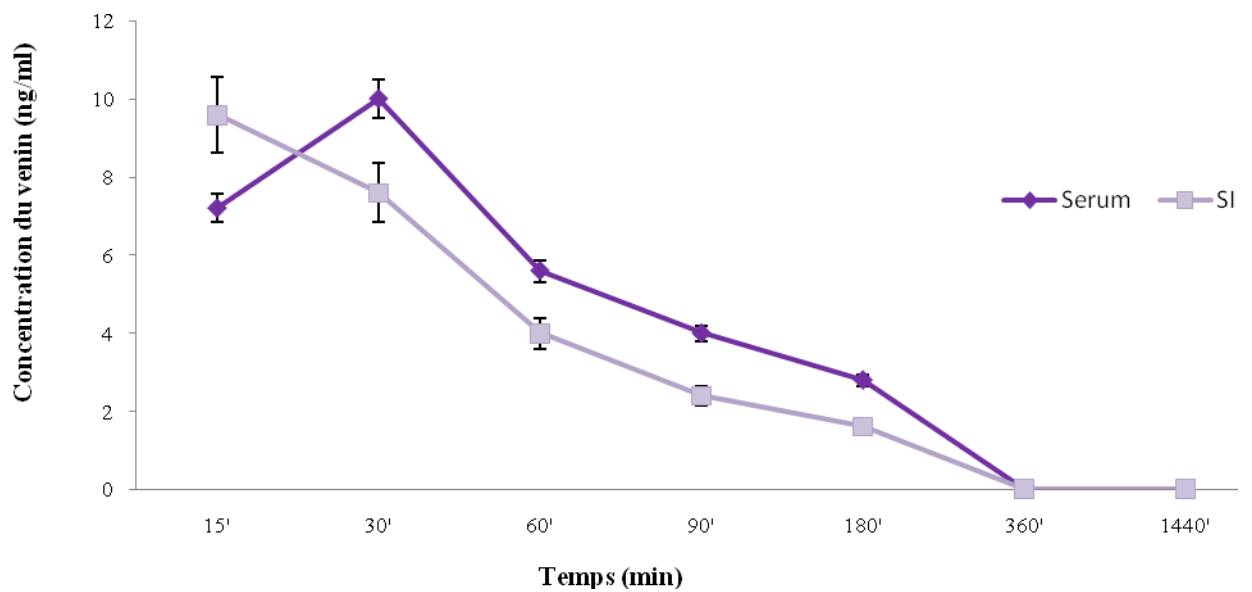
**Figure 9 :** Détermination des titres en anticorps des différentes préparations sériques par ELISA simple.



**Figure 10 :** Détermination du titre des F(ab')<sub>2</sub> sur microplaque sensibilisée par le venin d'Aah



**Figure 11 :** Purification des fragments F(ab')<sub>2</sub> (100 UDO) par chromatographie d'affinité sur colonne (1 x 5 cm) de Sepharose CL-4B activée par le BrCN et couplée au venin.



**Figure 12:** Biodistribution du venin d'Aam du site d'injection vers le milieu vasculaire.

### III-5 Physiopathologie d'envenimation par *Androctonus amoreuxi* :

L'injection de trois doses du venin d'Aam induit une symptomatologie dose dépendante, seules les fortes doses de venin ont provoqué des symptômes clinique d'une envenimation sévère, une paralysie des membres postérieurs est observée chez les souris envenimées par la dose sublétales (900 µg/kg), l'administration de la dose létale a induit en plus de ce symptôme, une hyper salivation, une diarrhée et les souris sont morte après 20 minutes. Les mêmes symptômes ont été observés suite à l'injection de la fraction FII de venin de *Tityus descripanus* à des souris (D'suze et *al.*, 1995).

Le prétraitement des souris par le diclofénac (40 mg/kg injecté par voie intramusculaire, 30 min avant le venin) ou le propranolol (0,1 mg /kg administrés par voie intrapéritonéale) n'a pas pu inhiber ces symptômes et les souris sont mortes après 70 et 35 min respectivement. Le prétraitement des souris par l'atropine (1 mg/kg injecté 30 min avant le venin par voie intra peritonéale) a permis une augmentation légère de la mobilité des souris et inhiber les troubles digestifs. Les souris ont survécu pendant 90 min.

La détermination de l'index pulmonaire des souris envenimées par la dose létale du venin d'Aam seul ou en présence du diclofénac ou l'atropine ou du propranolol a permis de montré qu'il n'y a aucune différence ( $p > 0.05$ ) entre l'index pulmonaire des souris témoins injectées par (le NaCl 0.9%, le diclofénac, l'atropine, le propranolol) et les souris envenimées par le venin seul ou prétraitées avec le diclofénac ou le propranolol. Par contre, l'injection de l'atropine suivie de l'envenimation des animaux induit une augmentation significative ( $p < 0.05$ ) de l'index pulmonaire (Figure 13).

Le Diclofénac est un anti-inflammatoire non stéroïdien inhibiteur de la voie des cyclo oxygénase. Une étude pharmacologique réalisée par Capone et ses collaborateurs (2007) a classé cet anti-inflammatoire classique avec les inhibiteurs de la voie Cox 2 contrairement à l'ibuprofén classé avec les anti-inflammatoires classiques capables d'inhiber les voies des deux iso enzymes de la Cox.

L'atropine est un antagoniste compétitif des récepteurs muscariniques de l'acétylcholine, de ce fait elle s'oppose aux effets de la bradycardie induite par ce neurotransmetteur, a une action anti spasmodique au niveau des fibres musculaire lisse du tube digestif et des voies biliaires, ralenti la vidange gastrique et diminue les sécrétions gastriques, salivaires et lacrymales. Sur le système respiratoire, l'atropine provoque une broncho-dilatation et diminue les sécrétions du pharynx et des bronches. Elle est éliminée rapidement de l'organisme (100% en 12 h) (Schorderet et *al.*, 1992 ; Dorosz, 1994).

Le propranolol est un antagoniste non sélectif des récepteurs adrénergiques, il a une demi-vie de 4 à 6 h, il diminue la fréquence cardiaque par dépression de l'automatisme du nœud sinusal, ralentissement de la conduction dans le nœud auriculo ventriculaire et réduit la contractilité myocardique entraînant ainsi une diminution du travail du ventricule gauche et une réduction du débit cardiaque (Dorosz, 1994 ; Hellali, 1994 ; Meunier et Schvaloff, 1999).

### III-5-1 Analyse du processus inflammatoire induit par le venin d'*Androctonus amoreuxi*

Les cytokines pro-inflammatoires (IL1- $\beta$  et IL6) et les cytokines de la voie Th1 (IFN $\gamma$  et l'IL12) ainsi que l'IL10 une cytokine de la voie T régulatrice (T reg) sont dosées dans le sérum après 45, 180, 360 et 1440 min de l'envenimation des souris avec une dose sub létale (400  $\mu$ g/kg). Les résultats obtenus montrent une augmentation précoce et hautement significative du taux sérique d'IL1- $\beta$  et d'IL6 dans un délai de 45 min, avec une ré augmentation très significative ( $p < 0.01$ ) d'IL6 après 1440 min d'envenimation (Figure 14 et 15).

Les travaux réalisés par notre équipe ont montré une élévation sérique monophasique d'IL1 avec un pic à 60 min et d'IL6 à 90 min suite à l'envenimation des souris avec une dose sub létale du venin d'Aah (Adi-Bessalem et al., 2008).

Parallèlement à la production des cytokines pro-inflammatoires, le venin d'Aam a induit la synthèse des cytokines de la voie Th1 (L'IL12 et l'IFN $\gamma$ ). Deux pics symétriques après 45 et 360 min pour l'IL12 et une élévation après un délai de 45 min et 1440 min d'envenimation pour l'IFN $\gamma$  (Figure 16 et 17).

La cinétique de l'IFN $\gamma$  suite à l'envenimation des rats par une dose sub létale du venin d'Aah, a montré un taux maximal à 120 min et des taux indétectables après 45 et 1440 min (Mouhoub, 2007).

L'IL12 et l'IFN $\gamma$  sont deux cytokines dimériques. L'IL12 est principalement secrétée par les cellules phagocytaires, sa principale fonction apparaît d'être l'induction de la production d'IFN $\gamma$  par les lymphocytes T et NK (Natural killer). L'IFN $\gamma$  augmente la prolifération des cellules B, l'activité bactéricide et anti-tumorale des monocytes/macrophages, l'expression des récepteurs Fc sur les monocycles et les molécules HLA de classe II sur de nombreux types cellulaires et l'augmentation l'activité des NK (O'Garra et al., 1988 ; Trinchieri, 1995).

Par ailleurs la quantification d'IL10 dans le sérum des souris envenimées par le venin d'Aam a montré une concentration maximale et hautement significative ( $P < 0.001$ ) après 45 et 360 min (Figure 18). Une augmentation maximale de cette cytokine a été retrouvée dans le sérum des souris 60 min après l'injection d'une dose sub létale du venin d'Aah (Adi-Bessalem

et *al.*, 2008). L'IL 10 est une cytokine anti-inflammatoire, elle inhibe la libération des cytokines pro-inflammatoires et l'expression des enzymes comme la COX 2 (Cyclooxygénase 2) et la NOS (NO synthase) impliquées dans la sécrétion des médiateurs inflammatoires (Noward et O'Garra, 1992).

### **-Quantification de l'activité de la Myéloperoxydase**

Les Polynucléaires Neutrophiles (PNN) sont des cellules phagocytaires, leur recrutement est considéré comme un mécanisme important de l'immunité innée.

Quatre catégories de granules ont été identifiées dans les PNN, les granules primaires (ou azurophiles) caractérisées par la présence de la MPO et du CD63, les granules secondaires (connues aussi sous le nom de granules spécifiques) dont le contenu inclut la lactoferine et du CD66b, les granules tertiaires qui contiennent la gélatinase et les vésicules de sécrétion qui renferment de l'albumine, la phosphatase alcaline et le CD35 (Faushou et Blegaard, 2003).

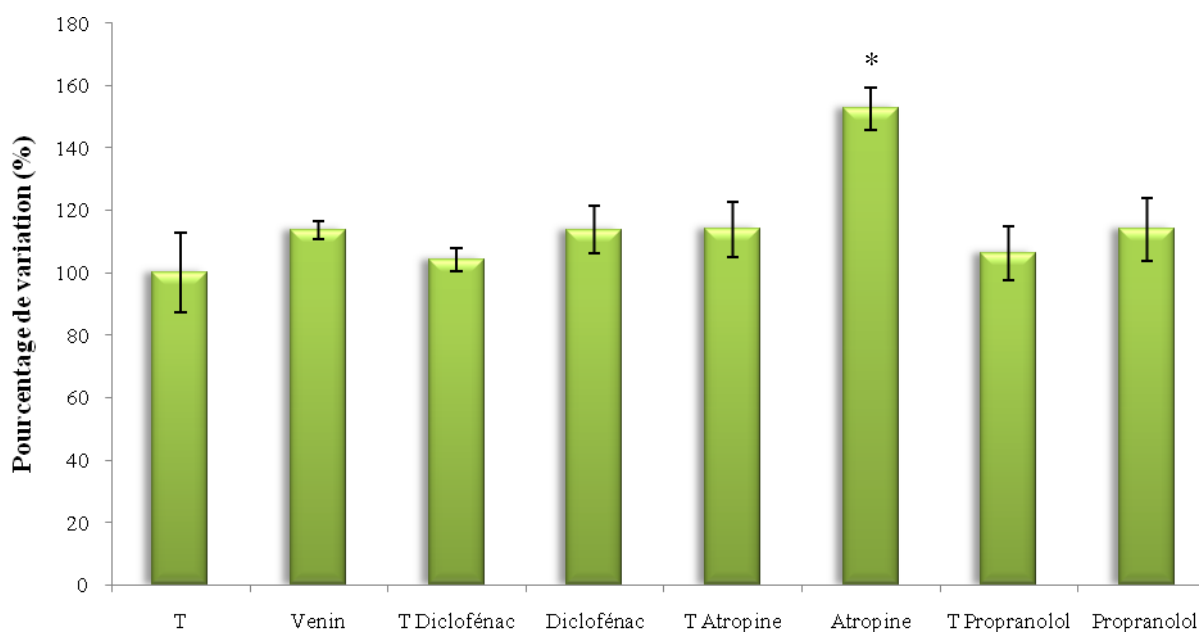
La MPO est retrouvée également dans les monocytes en concentration plus faible et elle devient indétectable dans les macrophages (Mathy-Hartert et *al.*, 1996). Son activité permet d'estimer l'infiltration des polynucléaires neutrophiles dans les sites inflammatoires.

Les variations de l'activité peroxydique de la myéloperoxydase dans les poumons sont dosées dans les surnageant de poumons des souris ayant reçues une dose sublétales (400 µg/Kg) avant et après de traitement spécifique avec les fragments F(ab')<sub>2</sub> et des souris envenimées avec une dose sublétales (900 µg/kg) et une dose létale en absence et en présence du diclofénac, d'atropine ou du propranolol.

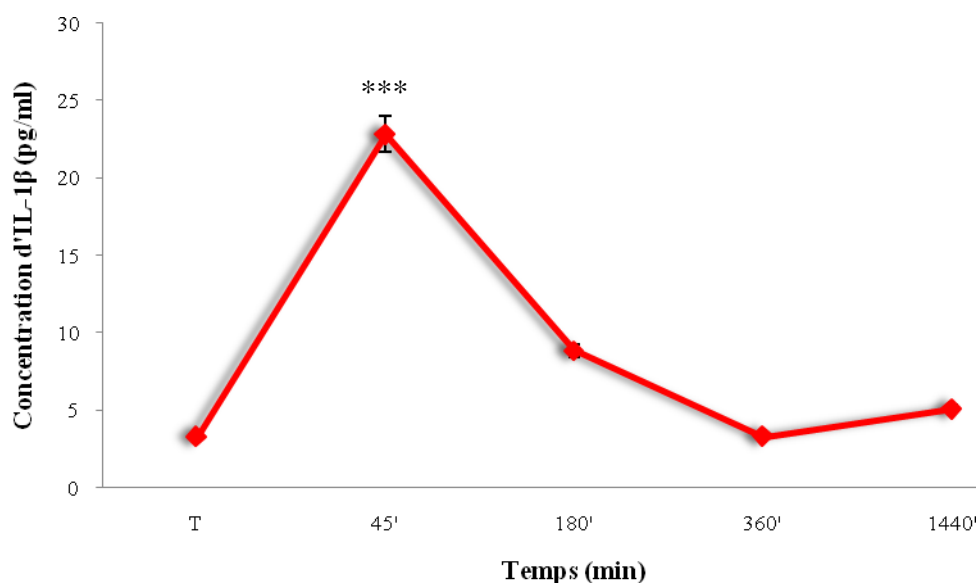
Les résultats obtenus ont permis de montrer une infiltration des polynucléaires neutrophiles maximale à 180 min après envenimation des animaux avec une dose de venin de 400µg/ml (9 fois plus que les souris injectées par la NaCl 0.9%) ( $p < 0.001$ ) (Figure 19).

Ce résultat est similaire a celui rapporté par Coelho et collaborateurs (2007), qui ont montré une élévation progressive de la MPO dans les poumons des souris suite à l'injection sous cutanée du venin de *Tityus serrulatus*.

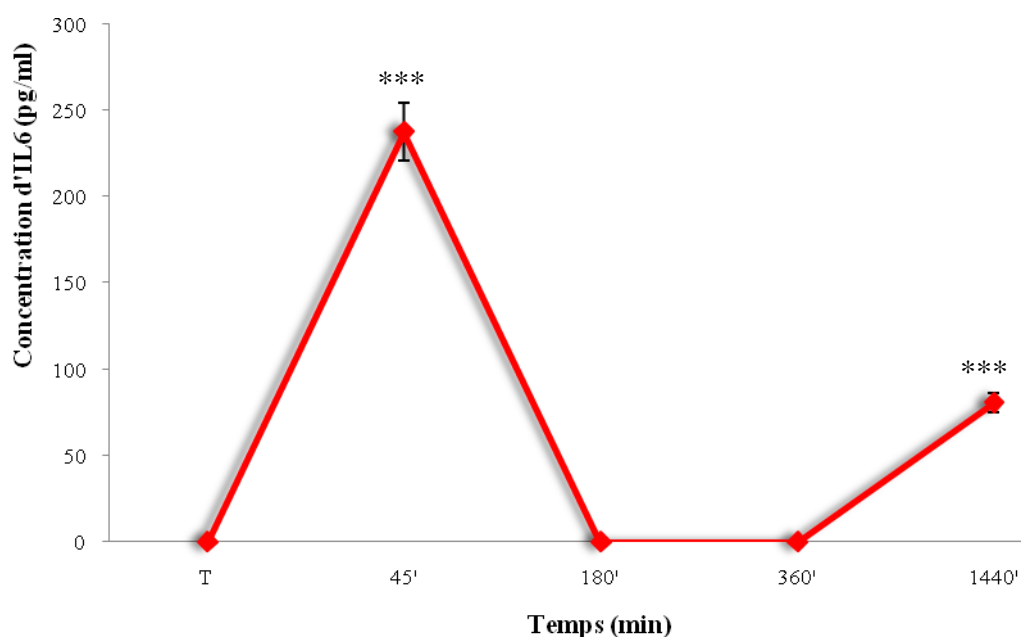
L'injection des fragments F(ab')<sub>2</sub> après envenimation des souris par (400 µg/kg) du venin d'Aam et le prétraitement par l'atropine ou le diclofénac avant l'injection de 900 µg/kg ont réduit significativement l'infiltration des PNN dans les poumons. L'atropine semble être la molécule la plus efficace dans cette inhibition. Le propranolol par contre a réduit mais d'une manière non significative l'infiltration de ce type de polynucleaire. (Figure 19, 20).



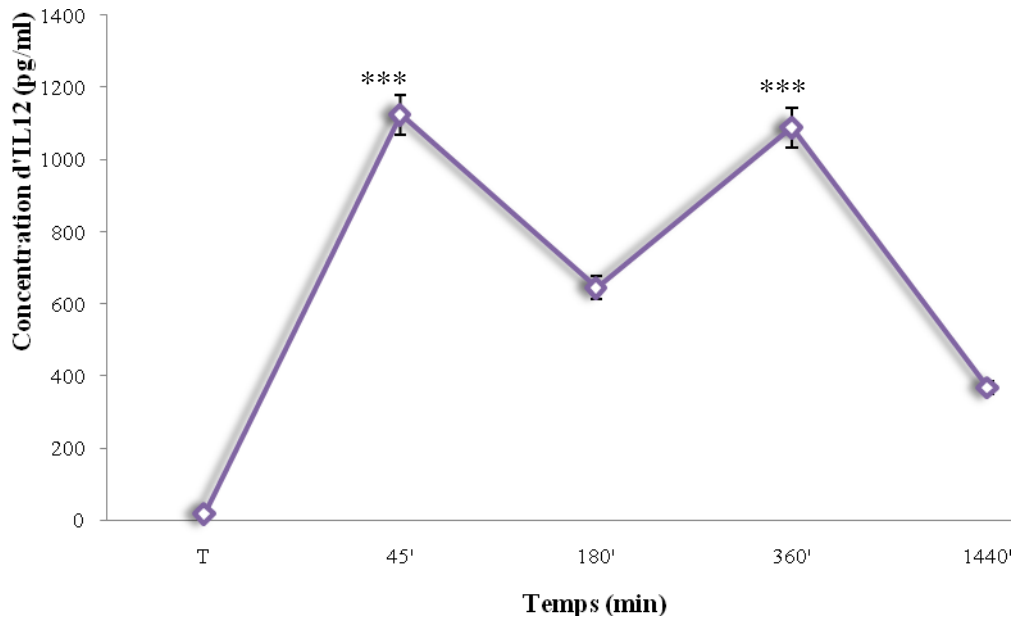
**Figure 13 :** Index pulmonaire des souris envenimées par la dose létale du venin *d'Androctonus amoreuxi* en présence et en absence de prétraitement



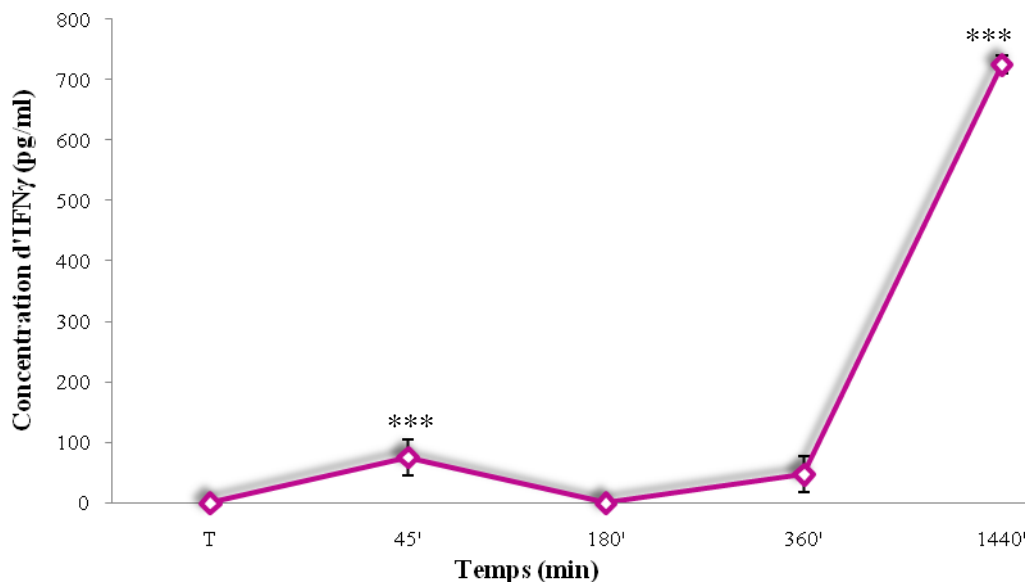
**Figure 14 :** Cinétique du dosage d'IL1-β dans le sérum des souris envenimées par une dose subletale du venin d'Aam (400 μg/kg)



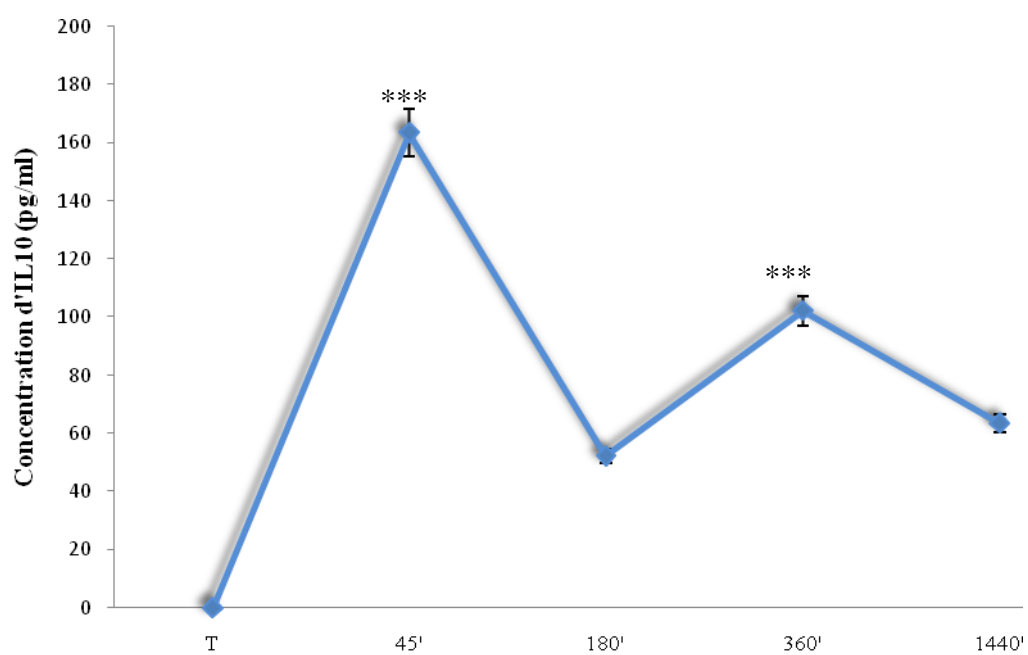
**Figure 15 :** Cinétique du dosage sérique d'IL6 après une envenimation des souris par 400 μg/kg du venin d'Aam.



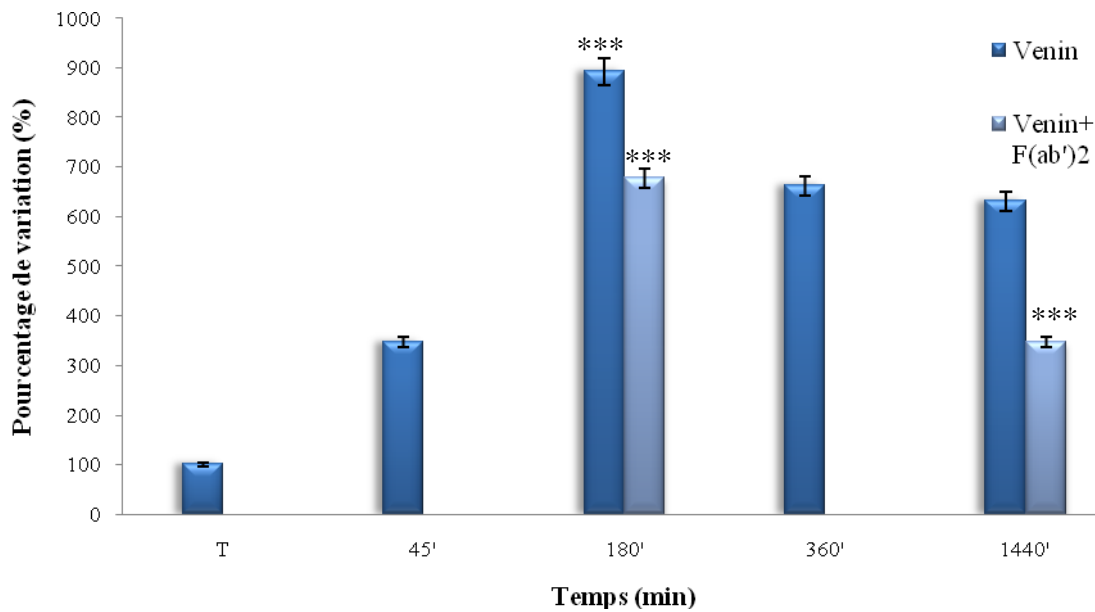
**Figure 16 :** Cinétique du dosage sérique d'IL12 après une envenimation des souris par le venin d'Aam (400 µg/kg).



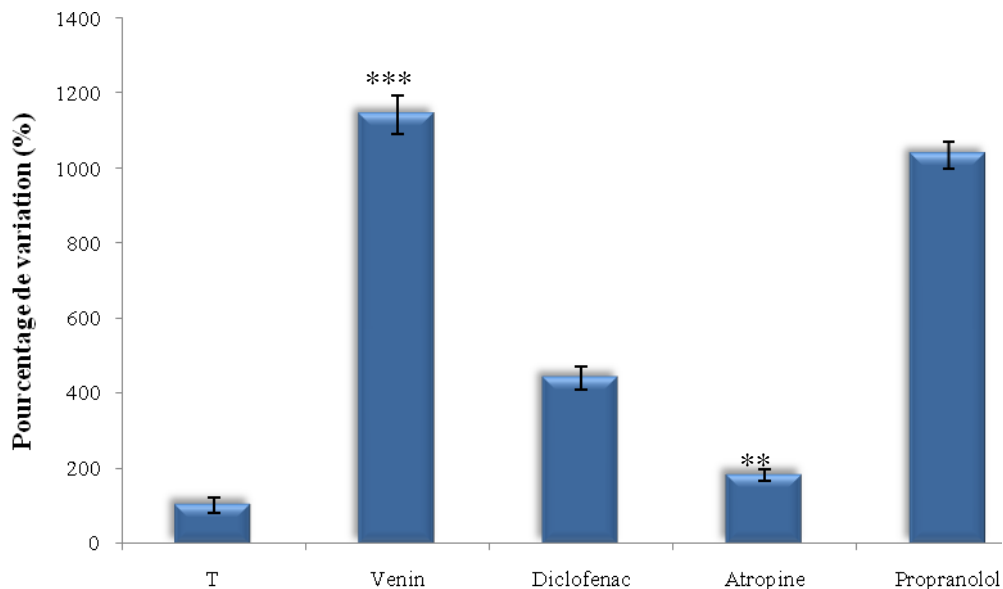
**Figure 17 :** Cinétique du dosage sérique d'IFNγ après une envenimation des souris par la dose sublétalement du venin d'Aam (400 µg/kg).



**Figure 18 :** Cinétique du dosage sérique d'IL10 après une envenimation des souris par le venin d'Aam (400  $\mu$ g/kg).



**Figure 19 :** Cinétique de dosage de l'activité de la myeloperoxydase (MPO) dans les poumons des souris envenimées par la dose sub létale du venin d'Aam (400 $\mu$ g/kg) en présence et en absence d'immunothérapie.



**Figure 20 :** Dosage de l'activité de la myeloperoxydase (MPO) dans les poumons des souris 180 min, après injection de la dose sub létale du venin d'Aam (900 $\mu$ g/kg) seul ou après prétraitement

Par contre la séquestration des PNN dans les poumons a augmenté chez les souris prétraitées par le diclofénac, l'atropine ou le propranolol après injection de la dose létale du venin comparé au venin seul. Cette infiltration inflammatoire peut être expliquée par la prolongation de temps de survie des souris par l'atropine et le diclofénac (Figure 21)

#### **-Dosage de la Peroxydase Eosinophile (EPO) :**

Les éosinophiles sont des granulocytes impliqués dans la protection de l'organisme contre les infections parasitaires et jouent un rôle important dans la pathogénie de l'Asthme et l'Allergie (Gleich et *al.*, 1990).

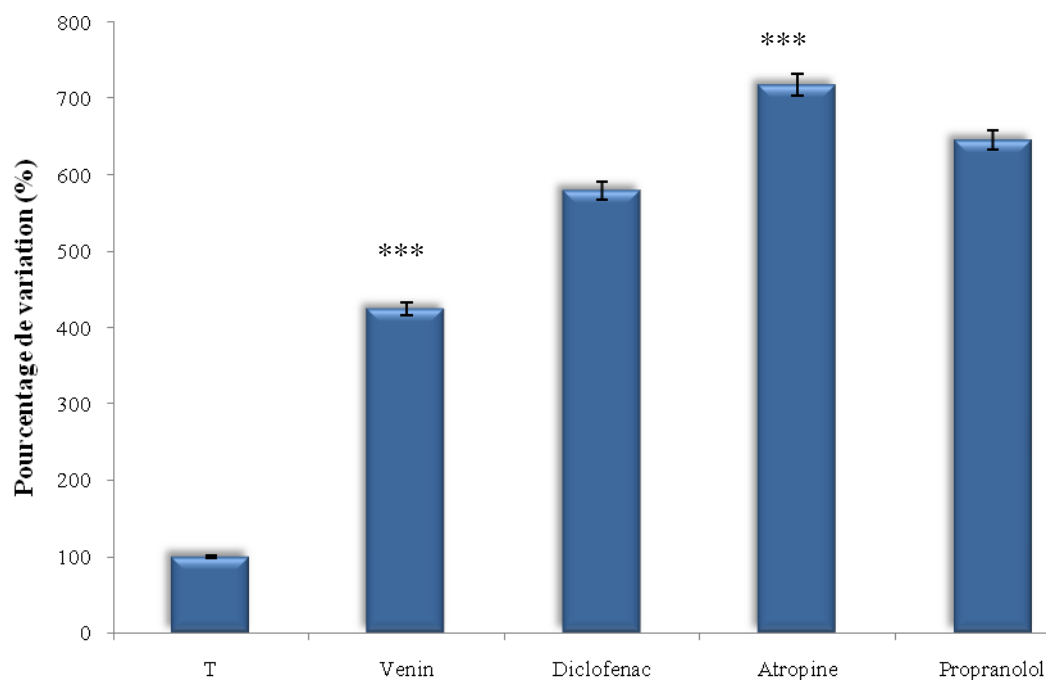
Ces cellules sont capables de produire et de libérer un grand nombre de molécules comme, MBP (Protéine Basique Majeur de l'éosinophile), ECP (Protéine cationique de l'éosinophiles), EPO (Peroxydase de l'éosinophile), les PGs, le PAF, et les cytokines l'IL1 $\alpha$ , l'IL6, l'IL4, l'IL5.... (Dubucquoi et Capron,1998; Weller et *al.*, 1994; Lamkhioed et *al.*, 1996).

L'EPO est une enzyme composée de deux polypeptides de 15 et 55 kDa, possédant un rôle dans la formation des dérivés halogénés (toxiques pour les microorganismes) et dans l'activation des mastocytes, polynucléaires neutrophiles et des macrophages. Cette enzyme constitue un marqueur pour suivre l'infiltration et la séquestration des éosinophiles.

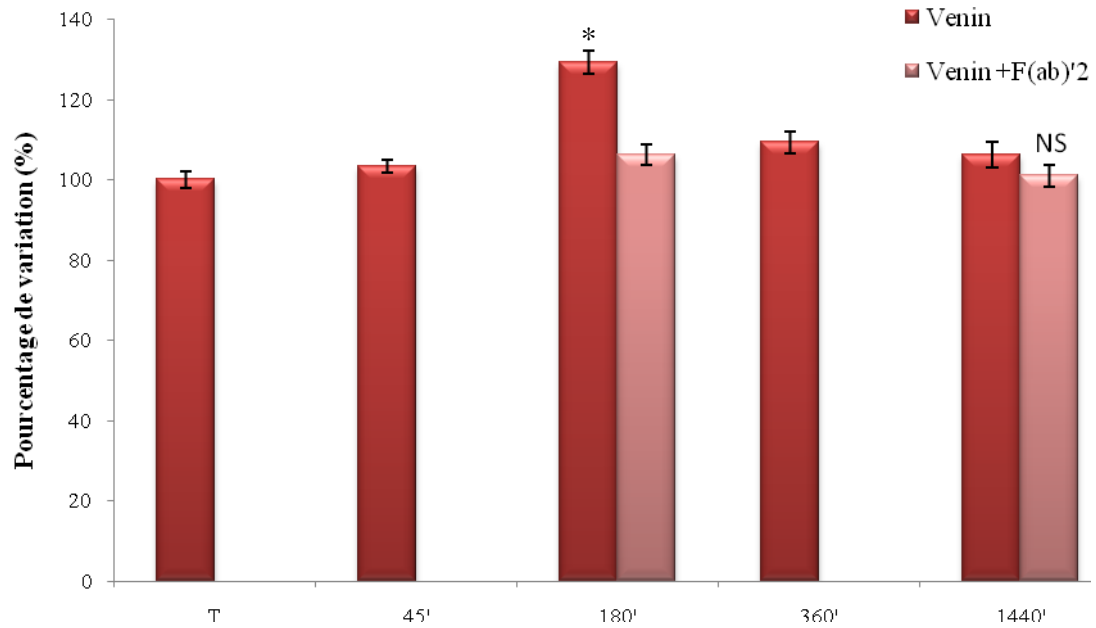
La peroxydase des éosinophiles est estimée selon la même cinétique et les mêmes traitements choisis pour le dosage de la MPO. Les résultats obtenus ont montré un passage progressive des éosinophiles dans le tissu pulmonaire pour atteindre un taux maximal après 180 min d'envenimation ( $p < 0.01$ ) (Figure 22).

Le venin d'*Androctonus australis hector* a induit également une infiltration des éosinophiles dans les poumons des rats mais selon un profil biphasique, un pic à 45 min (1,7 fois plus que le témoin) et un autre pic après 1440 min (2,38 fois plus que le témoin) (Mouhoub 2007).

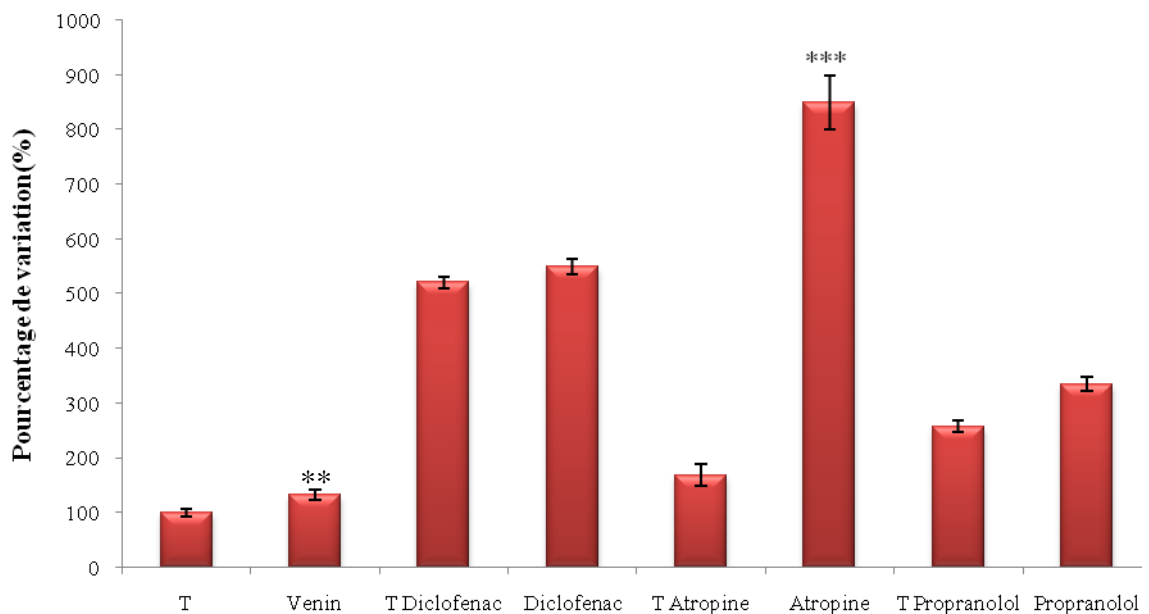
L'administration des F(ab')<sub>2</sub> a réduit cette séquestration jusqu'à devenir indétectable à 1440 min ( $p > 0.05$ ) (Figure 22), par contre le diclofénac, l'atropine ou le propranolol augmentent d'une manière significative l'infiltration de ce type de granulocytes par rapport au venin seul (Figure 23, 24).



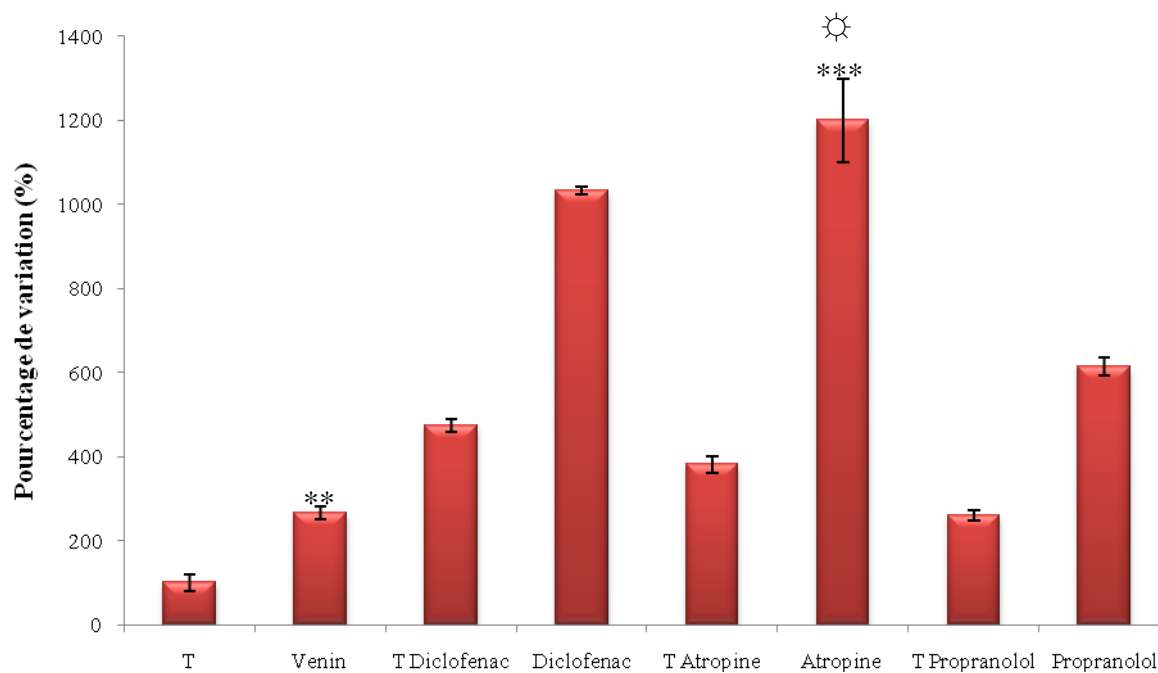
**Figure 21 :** Dosage de l'activité de la myeloperoxydase (MPO) dans les poumons des souris envenimées par la dose létale du venin d'Aam seul ou après traitement



**Figure 22 :** Cinétique de dosage de l'activité peroxydase éosinophile (EPO) dans les poumons des souris envenimées par la dose sublétales du venin d'Aam ( $400\mu\text{g}/\text{kg}$ ) en présence et en absence d'immunothérapie



**Figure 23 :** Dosage de l'activité peroxydase éosinophile (EPO) dans les poumons des souris 180 min, après injection de la dose sublétales du venin d'Aam ( $900\mu\text{g}/\text{kg}$ ) seul ou après prétraitement



☀ Cette valeur représente le 1/5 de la valeur réelle

**Figure 24 :** Dosage de l'activité peroxydase éosinophilique (EPO) dans les poumons des souris envenimées par la dose létale du venin d'Aam en présence et en absence de thérapie

### III-5-2 Effets du venin d'Aam sur les activités enzymatiques de LDH et CPK :

La lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme à distribution ubiquitaire, son activité est dosée dans le sérum et le broyat du foie suite à l'envenimation des souris avec 400 µg/kg du venin d'Aam. Une augmentation graduelle avec un taux maximal à 180 min dans le sérum ( $p < 0,001$ ) parallèle à une diminution dans le foie ont été observés ( $p < 0,05$ ).

L'administration des fragments  $F(ab)'_2$  (40 mg/kg), 30 min après envenimation des souris a permis de réduire partiellement le taux sérique de cette enzyme et de prévenir une partie des cellules hépatiques des lésions induites par le venin (Figure 25 et 26).

Une augmentation de l'activité de cette enzyme dans le sérum et sa diminution dans le surnageant de broyat du tissu hépatique été également observée après injection sous cutanée du venin d'*Androctonus australis hector* à des souris (Bessalem et al., 2003).

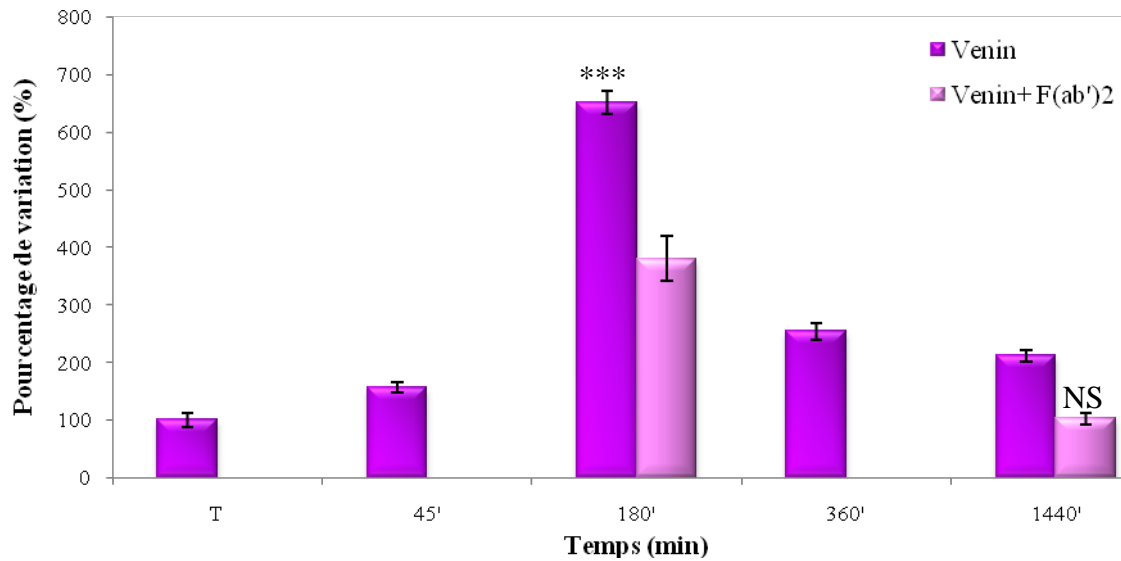
La créatine phosphokinase (CPK) est une enzyme à distribution plus restreinte que la LDH. Elle est composée de trois isotypes, CPK-MM dans le muscle squelettique, la CPK-MB dans le muscle cardiaque et la CPK-BB dans le cerveau.

La quantification de la CPK totale est réalisée dans le sérum des souris après envenimation par 400 et 900 µg/kg du venin d'Aam en présence et en absence d'immunothérapie et de prétraitement par le diclofénac, l'atropine et le propranolol. Les souris injectées par les doses 400 et 900 mg/kg ont donné respectivement un pourcentage de variation de 107% et 200%, comparativement aux animaux témoins.

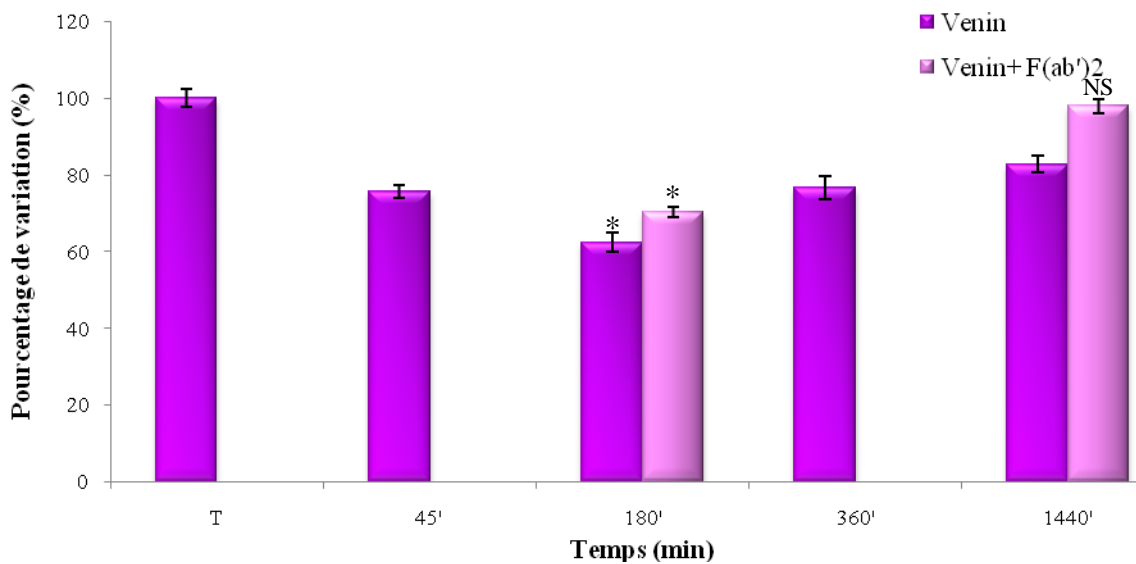
Le traitement des souris envenimées par les fragments  $F(ab)'_2$  a réduit le taux de la CPK mais d'une manière non significative ( $p > 0,05$ ) tandis que le prétraitement des souris par le propranolol avant injection de 900 µg/kg de venin a réduit significativement l'augmentation de cette enzyme (Figure 27 et 28).

Par ailleurs le traitement des souris par le diclofénac et l'atropine sans le venin augmente significativement l'activité de cette enzyme et l'injection du venin semble la potentialiser.

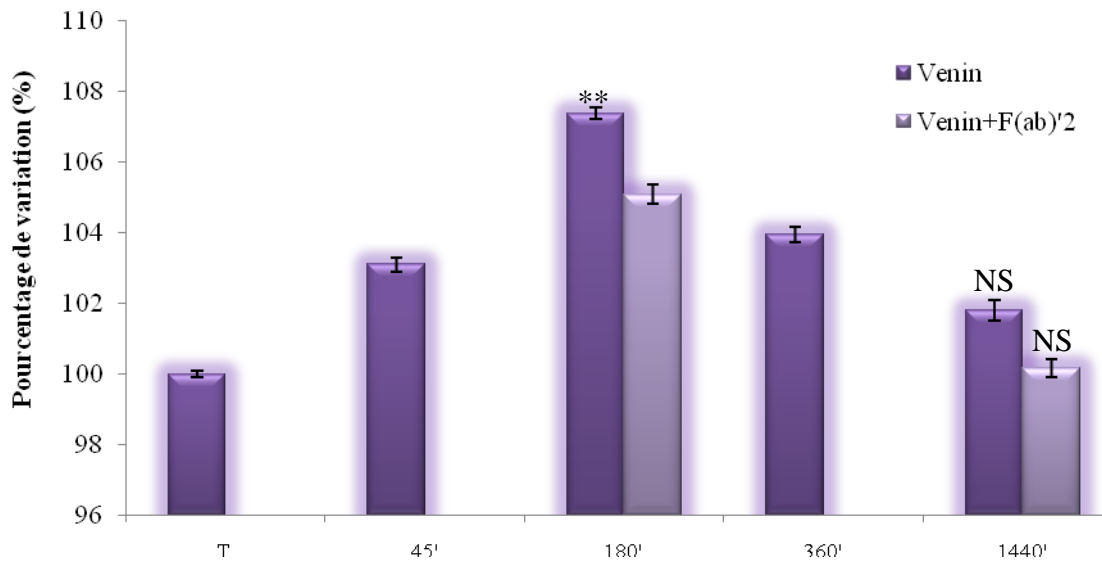
L'augmentation de taux sérique des enzymes et leur diminution dans les organes serait probablement due à leurs diffusion anormale à partir des organes lésés et le degré de leurs variation semble être proportionnel à l'intensité des perturbations tissulaires provoquées par les venins (Mohamed et al., 1981 ; Corrêa et al., 1997).



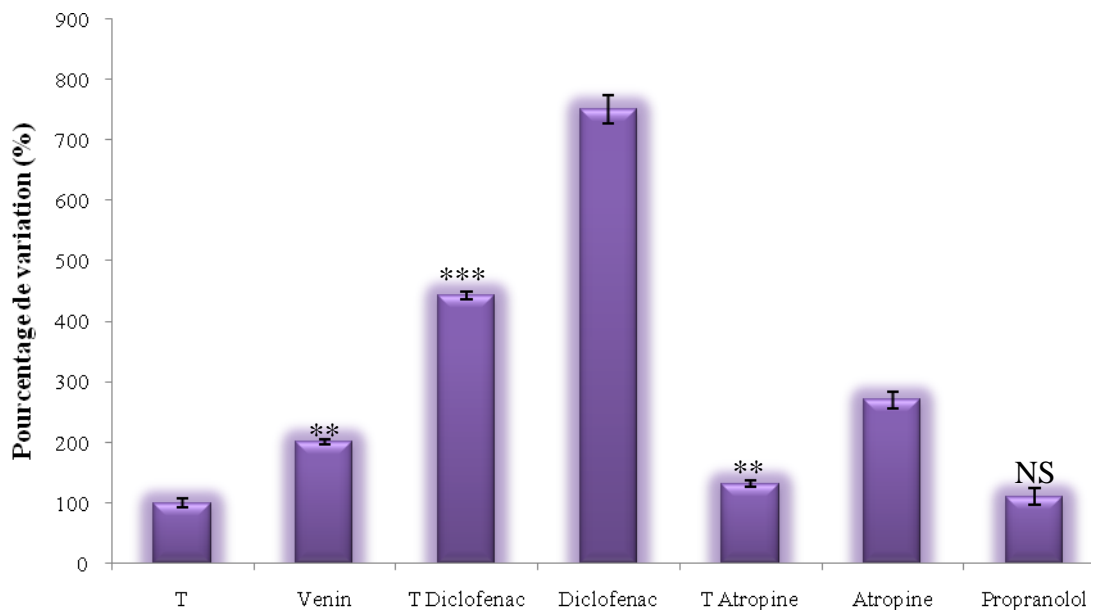
**Figure 25 :** Variation de l'activité enzymatique de LDH dans le sérum de souris envenimées par la dose sublétales (400µg/kg) du venin d'Aam avant et après immunothérapie



**Figure 26 :** Variation de l'activité enzymatique de LDH dans le foie de souris envenimées par la dose sublétales (400µg/kg) du venin d'Aam avant et après immunothérapie



**Figure 27:** Variation de l'activité enzymatique de la CPK dans le sérum de souris envenimées par la dose sublétales (400µg/kg) du venin d'Aam avant et après immunothérapie



**Figure 28 :** Variation de l'activité enzymatique de la CPK dans le sérum de souris envenimées par la dose sublétales (900µg/kg) du venin d'Aam seul ou après prétraitement

### III-5-3 Effet du venin d'*Androctonus amoreuxi* sur les structures tissulaires en présence et en absence de traitements :

Une étude histologique est entreprise sur les organes poumon et foie des souris envenimées avec différentes doses du venin en absence et en présence de traitement spécifique et non spécifique pour rendre compte des modifications tissulaires et comprendre le mécanisme de leurs apparition.

L'observation microscopique des poumons a permis de montrer en comparaison aux alvéoles témoins qui sont délimités par des cloisons fines, les poumons provenant des animaux envenimés présentent un envahissement par les cellules inflammatoires de la paroi alvéolaire d'une manière dose et temps dépendant (Figure 29, 30).

Ces lésions sont similaires à celles observées après injection sous cutanée d'une dose sub létale (500 µg/kg) du venin d'Aah à des souris (Adi-Bessalem et *al.*, 2008)

L'administration des fragments F(ab')<sub>2</sub>, 30 min après le venin a permis de réduire l'infiltration inflammatoire après 180 et 1440 min. Le prétraitement des souris par l'atropine, le diclofénac et le propranolol n'ont pu réduire l'inflammation observée dans le parenchyme pulmonaire qu'après un délai de 180 min. Le traitement qui semble être le plus efficace à prévenir cette infiltration leucocytaire est l'atropine (Figure 29 et 30).

Cependant, après un délai de 1440 min, une infiltration leucocytaire plus importante que le venin seul est observée en présence du diclofénac et l'Atropine. Ces résultats nous laissent suggérer que ces traitements ont retardé seulement l'effet du venin sur les poumons (Figure 31).

L'injection de la dose létale du venin d'Aam aux animaux entraîne une infiltration inflammatoire, érythrocytaire. Le prétraitement des souris par le diclofénac, l'atropine ou le propranolol a provoqué une infiltration inflammatoire plus importante que le venin seul et une accumulation des globules rouge dans les septums interalvéolaire avec une intensité plus grande en présence de l'atropine (Figure 32).

L'examen microscopique du foie des souris injectées par le NaCl 0,9% a montré des hépatocytes arrangés d'une manière radiaire entourant la veine centrale, avec un ou deux noyaux au centre. L'injection de la dose sub létale de venin d'Aam (400µg/kg) a provoqué une congestion des vaisseaux, aspect ballonné des hépatocytes avec la formation de plusieurs vacuoles perinucleaires (phénomène de dégénérescence hydropique) après un délai de 180 min et une nécrose de certains hépatocytes (les noyaux de ces cellules sont soit absent, Caryolyse ; soit de petite taille, picnose) après 1440 min d'envenimation (Figure 33).

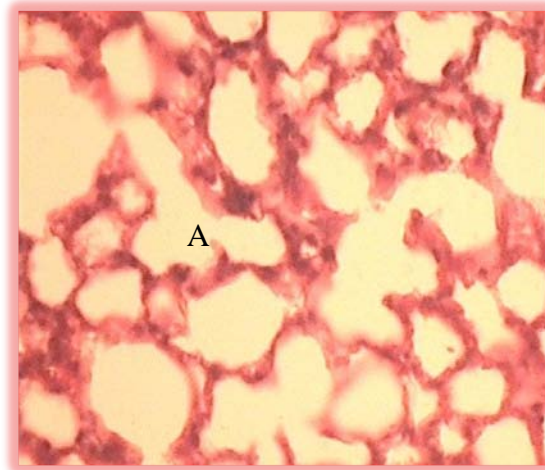
Ces modifications dans les hépatocytes ont été également rapportées après une envenimation des souris avec le venin d'*Androctonus australis Hector* (Bessalem et al., 2003)

L'immunothérapie ne semble réduire que partiellement les lésions provoquées par le venin (Figure 33).

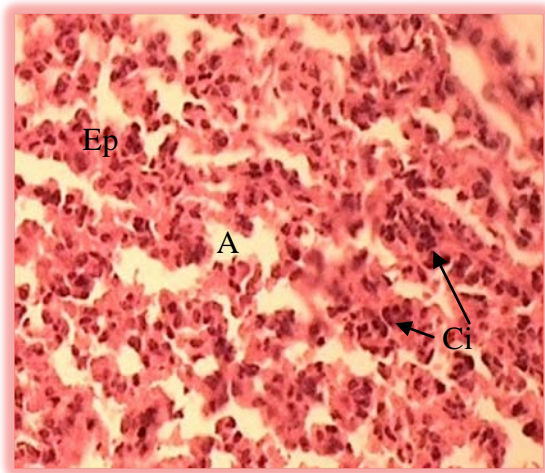
L'injection des souris par 900 µg/kg du venin d'Aam induit une nécrose plus prononcée que la dose 400 µg/kg. L'administration de l'atropine retarde ces effets car l'observation microscopique du foie après un délai de 1440 min montre des hépatocytes turgescents avec plusieurs vacuoles, des altérations tissulaires observées 180 min après l'injection du venin seul. Le diclofénac diminue partiellement les modifications provoquées par le venin et le propranolol administré avant le venin semble induire plus de lésions que le venin seul (Figure 34).

D'autre part l'étude anatomopathologique du foie des souris injectées par la dose létale montre, une congestion des espaces sinusoidaux, une nécrose de quelques cellules hépatocytaires, présence des érythrocytes et des cellules inflammatoires entre les cellules du foie (Figure 35).

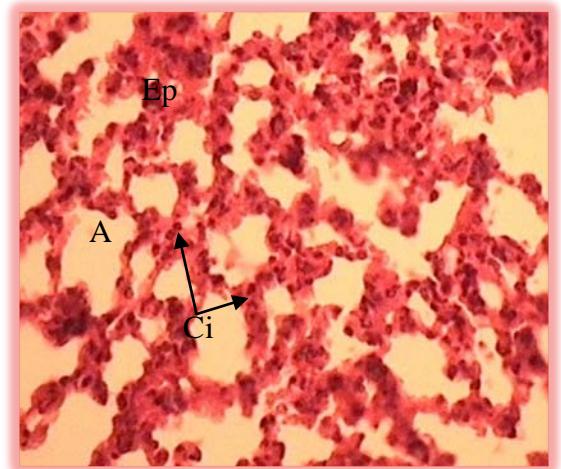
La nécrose est moindre dans le parenchyme hépatique des souris envenimées et prétraitées par l'atropine, le diclofénac et elle est plus importante dans le foie des souris prétraitées par le propranolol (Figure 35).



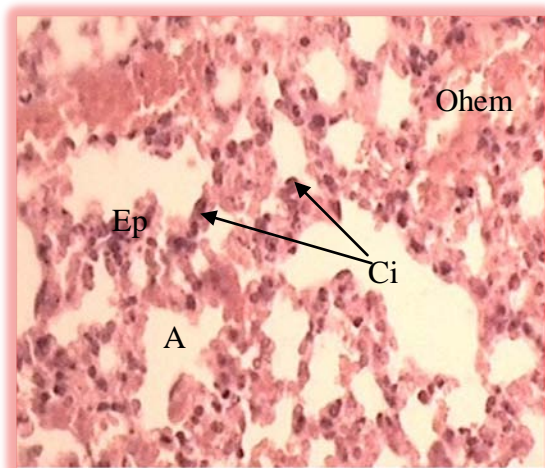
Parenchyme pulmonaire témoin



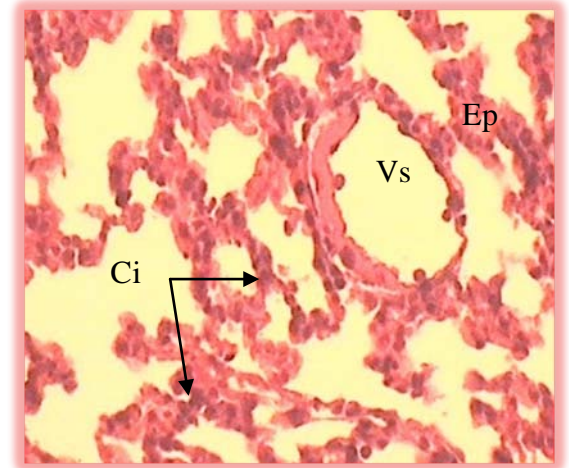
Souris envenimée pendant 180 min



Souris envenimée + F(ab')<sub>2</sub> pendant 180 min



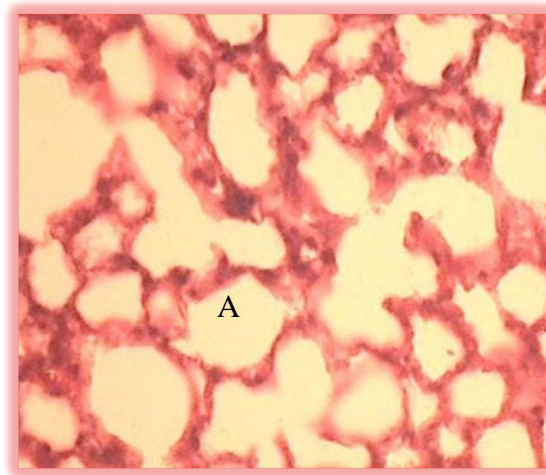
Souris envenimée pendant 1440 min



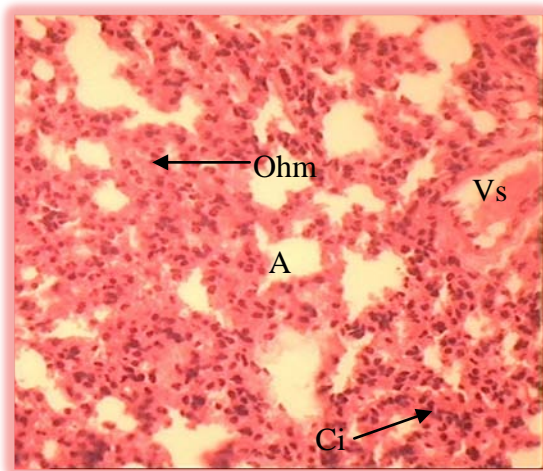
Souris envenimée + F(ab')<sub>2</sub> pendant 1440 min.

**Figure 29** : Effet du venin d'Aam (400 µg/kg) sur le parenchyme pulmonaire en présence et en absence d'immunothérapie (HE, GX40)

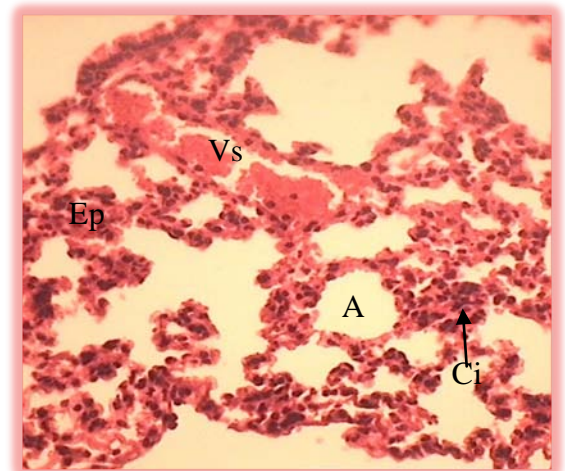
A : Alvéole, Ci : Cellule inflammatoire, Ep : Epaissement des cloisons inter alvéolaires, Ohem : Œdème hémorragique. Vs : vaisseau sanguin.



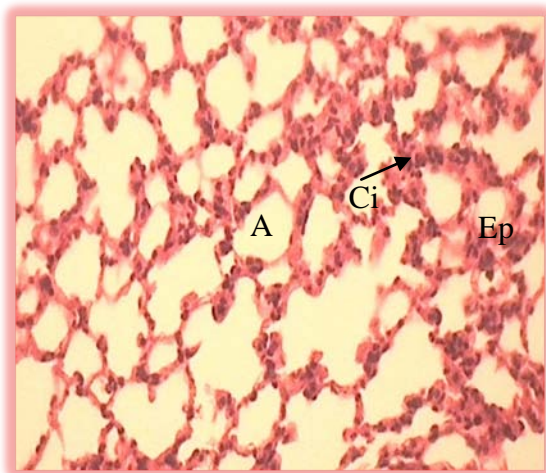
Parenchyme pulmonaire témoin



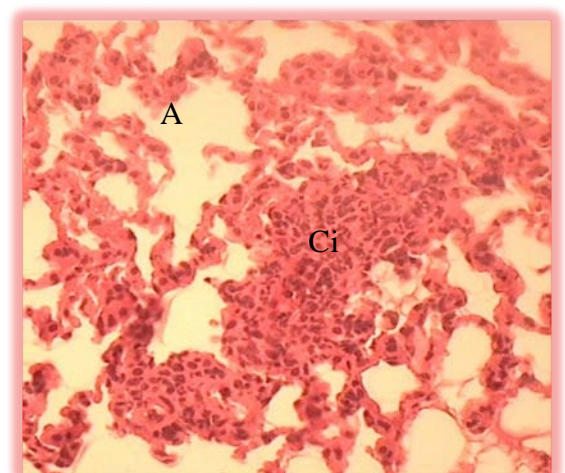
Venin seul



Diclofénac + Venin



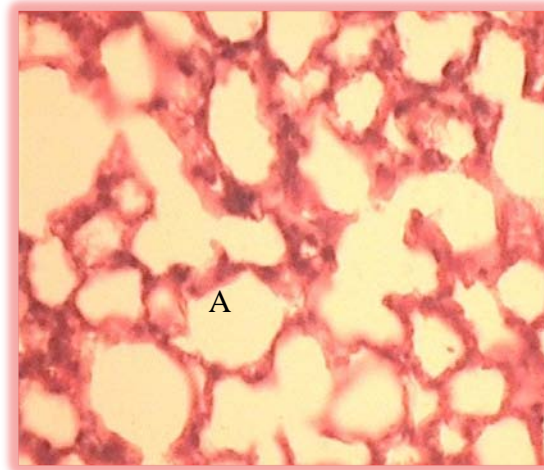
Atropine+ Venin.



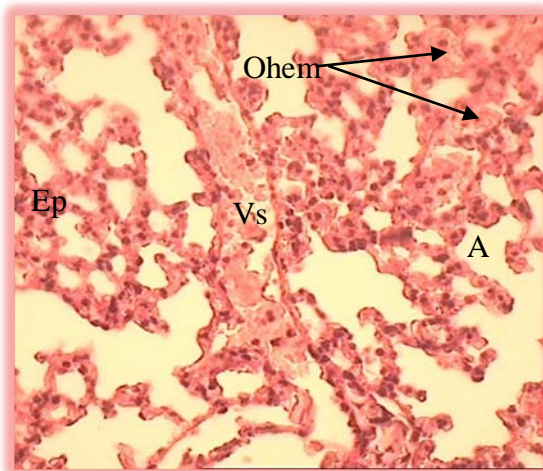
Propranolol+ Venin.

**Figure 30** : Effet du venin d'Aam (900  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) sur le parenchyme pulmonaire pendant 180 min en présence et en absence de traitement (HE, G X40)

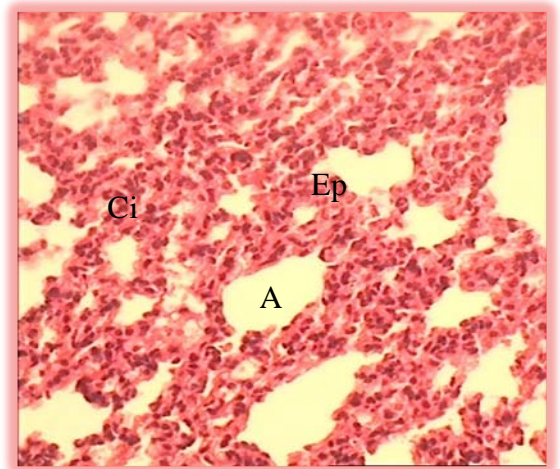
A : Alvéole, Ci : Cellule inflammatoire, Ep : Epaissement des cloisons inter alvéolaires, Ohem : Œdème hémorragique, Vs : vaisseau sanguin.



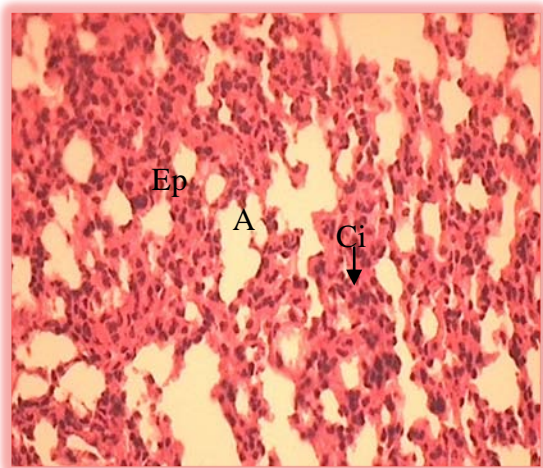
Parenchyme pulmonaire témoin



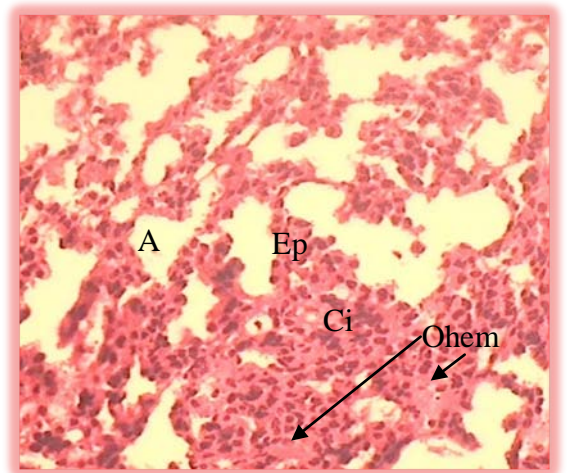
Venin seul..



Diclofénaç+Venin.



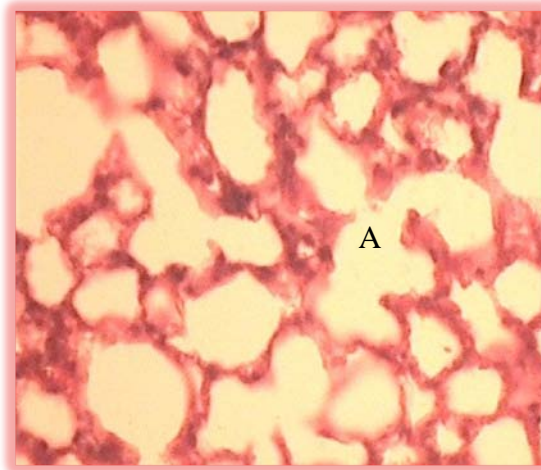
Atropine+ Venin.



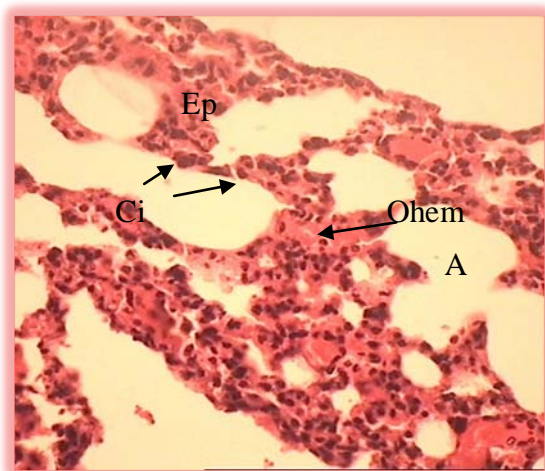
Propranolol+ Venin.

**Figure 31** : Effet du venin d'Aam (900 µg/kg) sur le parenchyme pulmonaire pendant 1440 min en présence et en absence de traitement (HE, GX40).

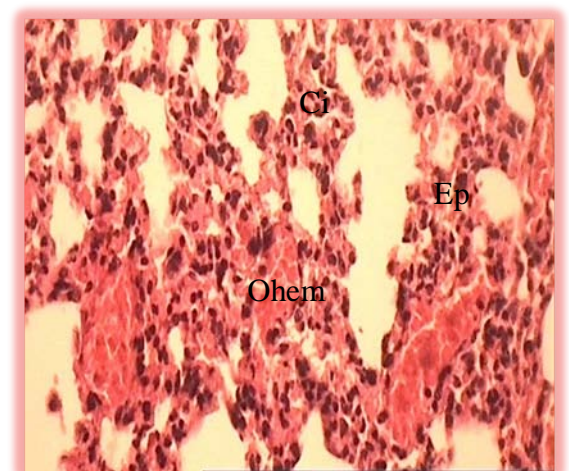
A : Alvéole, Ci : Cellule inflammatoire, Ep : Epaissement des cloisons inter alvéolaires, Ohem : Œdème hémorragique, Vs : vaisseau sanguin.



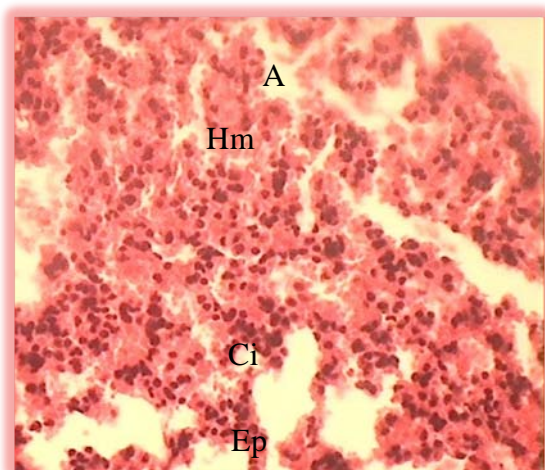
Parenchyme pulmonaire témoin



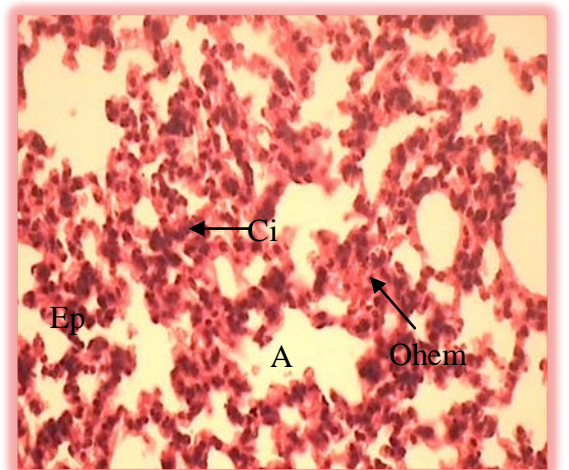
Venin seul



Diclofénac + Venin.



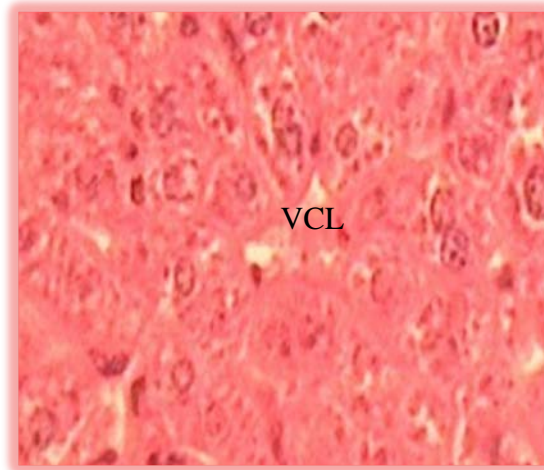
Atropine+ Venin



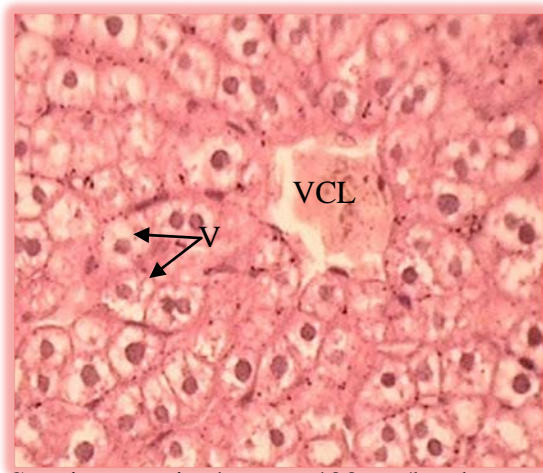
Propranolol+Venin

**Figure 32** : Effet du venin d'Aam (dose létale) sur le parenchyme pulmonaire en présence et en absence de traitement (HE, GX40)

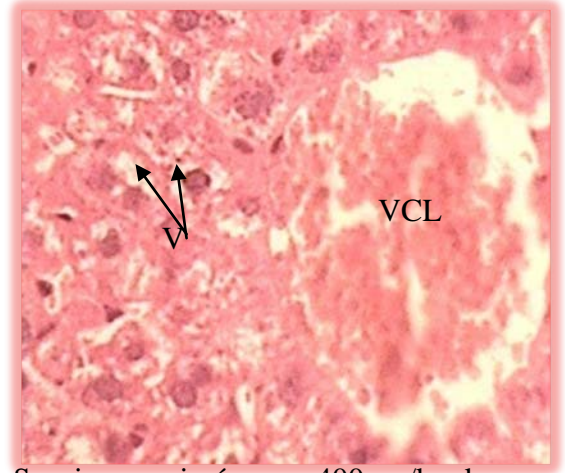
A : Alvéole, Ci : Cellule inflammatoire, Ep : Epaissement des cloisons inter alvéolaires, Hm : hémorragie, Ohem : Œdème hémorragique, Vs : vaisseau sanguin.



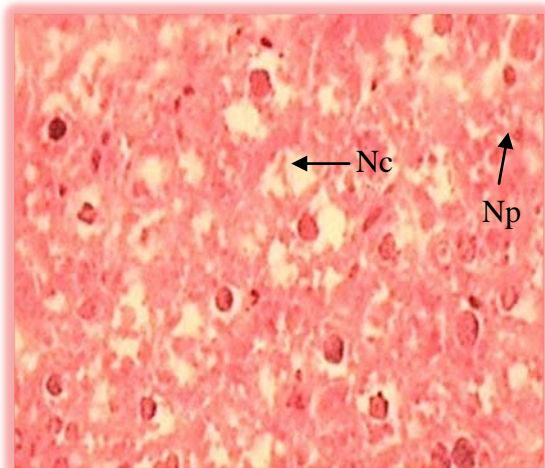
Parenchyme hépatique témoin



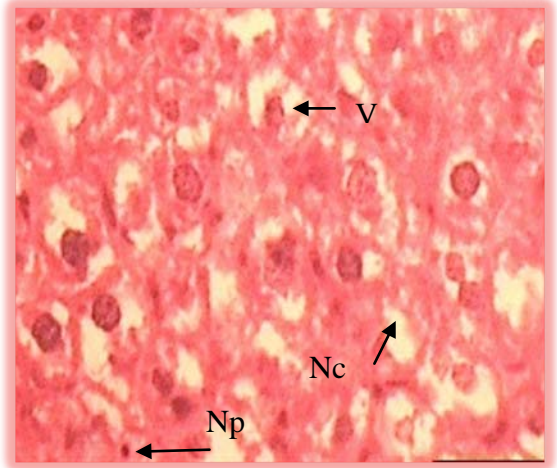
Souris envenimée avec 400 µg/kg du venin d'Aam pendant 180'



Souris envenimée avec 400 µg/kg du venin d'Aam + F(ab')<sub>2</sub> pendant 180'



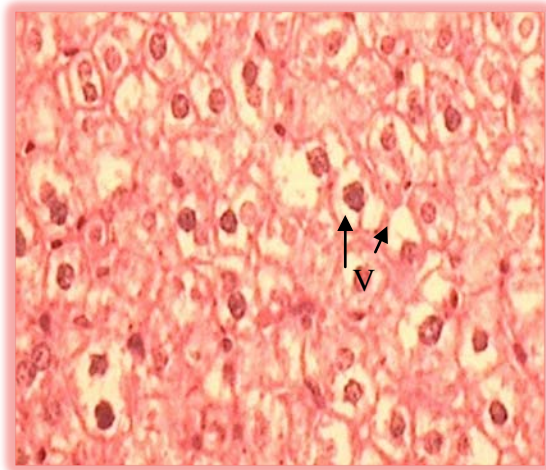
Souris envenimée avec 400 µg/kg du venin d'Aam pendant 1440'



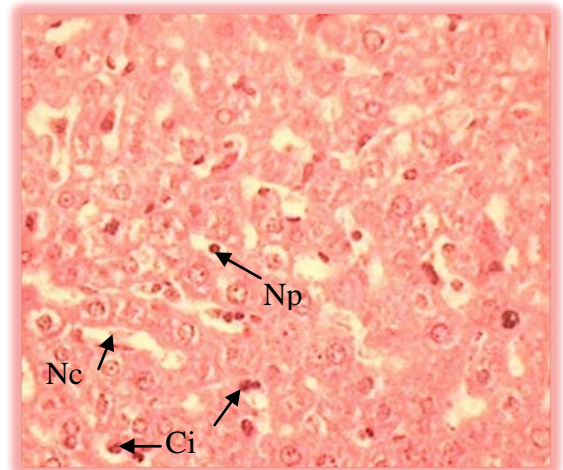
Souris envenimée avec 400 µg/kg du venin d'Aam + F(ab')<sub>2</sub> pendant 1440'

**Figure 33 :** Effets du venin d'Aam (400 µg/kg) sur le parenchyme hépatique en présence et en absence d'immunothérapie (HE, GX40)

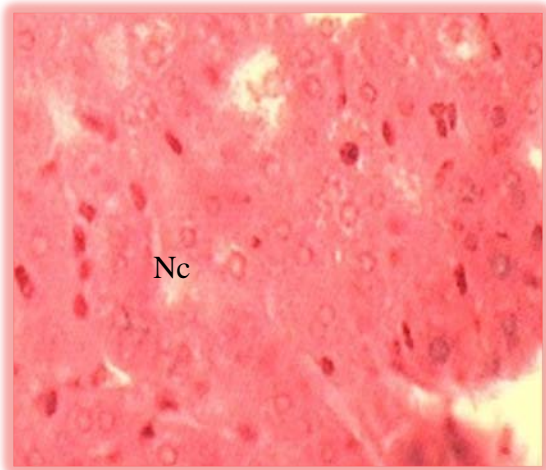
Nc :Nécrose, Np :Noyau picnotique, V :Vacuole, VCL : Veine Centro-Lobulaire



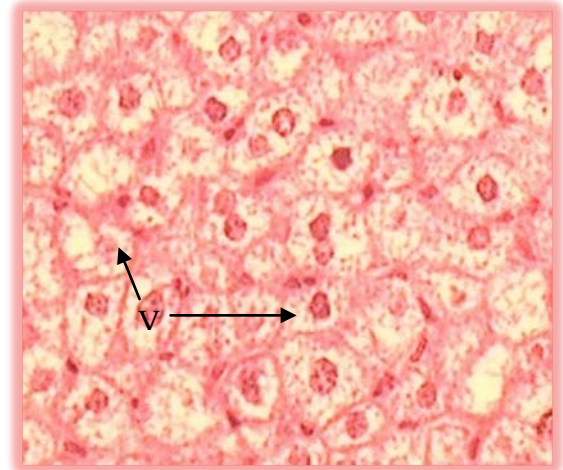
Souris envenimée pendant 180'



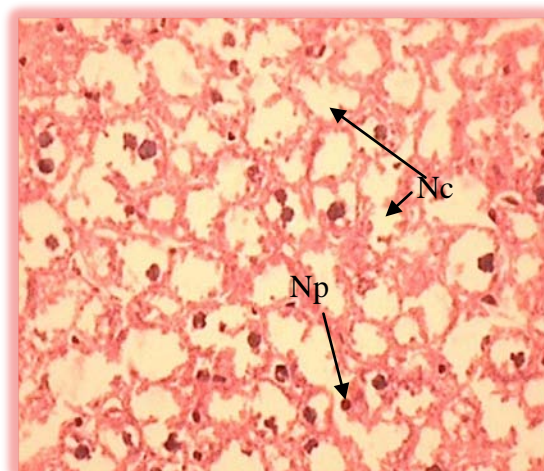
Souris envenimée pendant 1440'



Souris prétraitée par le diclofénac et envenimée pendant 1440'



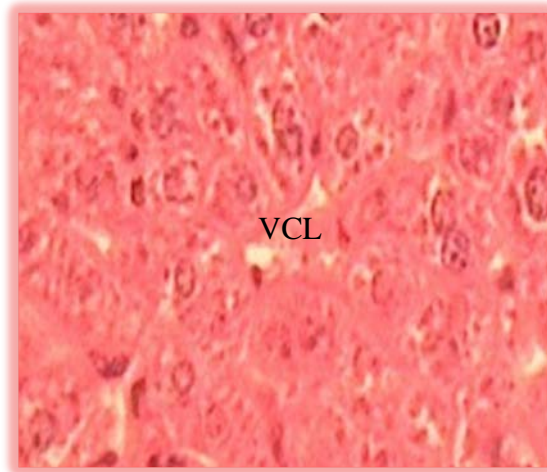
Souris prétraitée par l'atropine et envenimée pendant 1440'



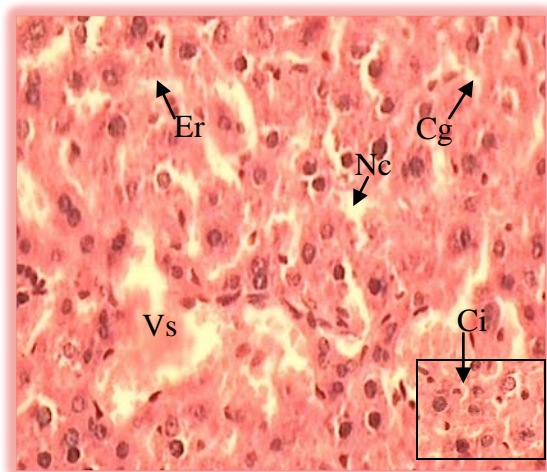
Souris prétraitée par le propranolol et envenimée pendant 1440'

**Figure 34 :** Effets du venin d'Aam (900 µg/kg) sur le parenchyme hépatique en présence et en absence de traitements (HE, GX40)

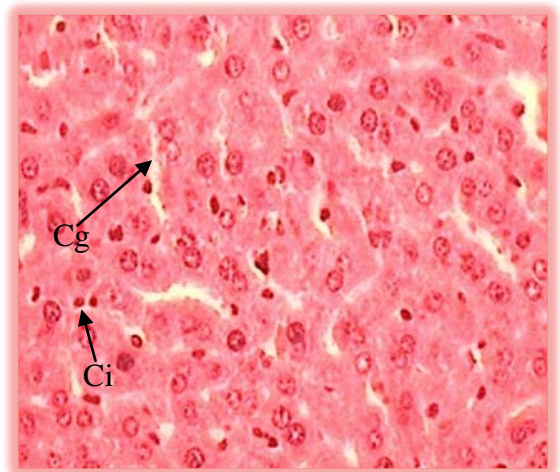
Ci : Cellule inflammatoire, Nc :Nécrose, Np :Noyau picnotique, V :Vacuole.



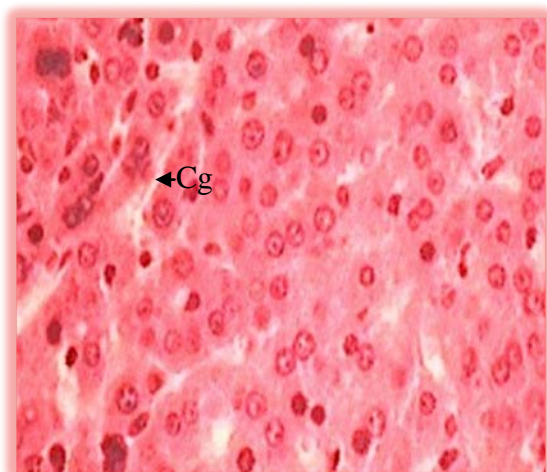
Parenchyme hépatique témoin



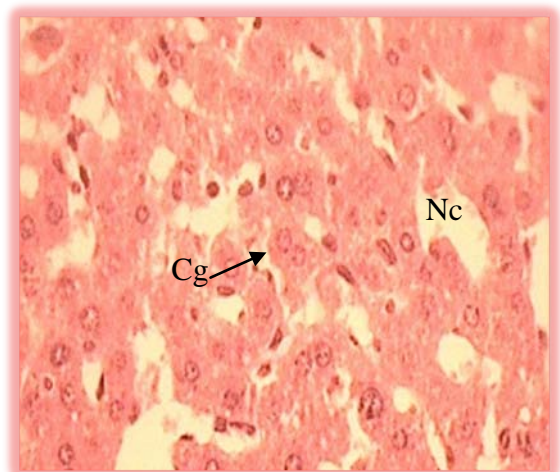
Venin seul.



Diclofénac+ Venin.



Aropine+ Venin.



Propranolol+ Venin.

**Figure 35 :** Effets du venin d'Aam (900 µg/kg) sur le parenchyme hépatique en présence et en absence de traitements (HE, GX40)

Cg : congestion des espaces sinusoidaux, Ci : Cellule inflammatoire, Er : Erythrocyte, Nc :Nécrose, Np :Noyau picnotique.

**Discussion générale :**

L'envenimation par les scorpions est une extrême urgence médicale se traduisant par l'apparition rapide des désordres hémodynamiques, métaboliques et une réaction inflammatoire. Cette rapidité est expliquée par le faible poids moléculaire des neurotoxines qui rejoignent rapidement leur cible cellulaire.

L'analyse des concentrations de venin par ELISA Sandwich a permis de quantifier le venin d'*Androctonus amoreuxi* dans le sérum et le tissu qui entoure le site d'injection. Les résultats obtenus montre que le venin est absorbé du site d'injection 180 min après son administration par voie s.c. et sa concentration dans le compartiment vasculaire atteint son maximum (Tmax) à 30 min et décroît progressivement jusqu'à devenir indétectable après 360 min d'envenimation. Ce résultat est en accord avec le temps de concentration maximale (Tmax) court de 30 min retrouvé pour les venins de *Tityus serrulatus* et *Androctonus mauritanicus mauritanicus* (Revelo et al., 1996, El Hafny et al., 2002), de 30-60 min pour *Buthus occitanus tenutanus* (Krifi et al., 2001) et 20 min pour *Androctonus australis hector* (Hammoudi-Triki et al., 2007).

La réponse inflammatoire est un processus physiologique de défense de l'organisme contre une agression extérieure. Certaines cytokines jouent un rôle essentiel dans l'orchestration des mécanismes qui contribuent à la mise en place d'une réaction inflammatoire. Ces cytokines peuvent agir soit directement, soit être à l'origine d'une production en cascade d'autres médiateurs essentiels à l'enclenchement et à l'entretien d'un état inflammatoire. D'autres acteurs sont produits pour limiter la production des cytokines pro-inflammatoires ou en contrecarrer les effets délétères. Ces agents anti-inflammatoires sont constitués par des cytokines, des agonistes de récepteurs, des formes solubles de récepteurs pour les cytokines pro-inflammatoires. Une réponse harmonieuse sous-entend un équilibre réussi entre les cytokines pro-inflammatoires et les facteurs chargés d'en limiter l'action (Cavaillon, 1995).

L'IL1- $\beta$  a des actions sur le système nerveux central (induction de fièvre, somnolence, anorexie), les hépatocytes (synthèse des protéines de la phase aiguë de l'inflammation), les cellules endothéliales et musculaires lisses (sécrétion d'IL6 et des chimiokines), (Descamps – Latscha et Witko – Sarsat, 1996 ; Fradelizi et Thèze, 1998).

L'IL6 comme d'autres cytokines produites localement (TNF  $\alpha$  et IL1) peut regagner la circulation générale et déclencher des effets régionaux (sécrétion hépatocytaire des protéines de la phase aiguë) et généraux (induction de la fièvre) (Fradelizi et Thèze, 1998).

La production excessive des cytokines pro-inflammatoires peut contribuer significativement à l'exacerbation de plusieurs pathologies. En effet l'IL1 $\beta$  et le TNF  $\alpha$  ont été mis en évidence dans les lavages bronchoalvéolaires des malades ayant le syndrome de détresse respiratoire aigue (SDRA) (Park et *al.*, 2001 ; Goodman et *al.*, 2003). Des taux élevés d'IL6 ont été retrouvés dans le sérum des patients souffrant de lupus érythémateux (Elsasser et Von Kleist, 1993).

L'envenimation des souris avec une dose sublétales du venin d'Aam a induit une augmentation dans le taux sérique des cytokines pro-inflammatoire IL1- $\beta$  et l'IL6. Des concentrations importantes de ces cytokines ont été également retrouvées suite à l'injection des venins de *Tityus discrepans*, *Centruroides noxius* et *Androctonus australis hector* à des animaux (D'suze et *al.*, 1999; Petrecevich, 2006 ; Adi-Bessalem et *al.*, 2008) et chez les patients piqués accidentellement par les scorpions (Barbouche et *al.*, 1996 ; Sofer et *al.*, 1996 ; Meki et Mohey El Dean, 1998 ; D'suze et *al.*, 2003 ; Fukuhara et *al.*, 2003 ; Hammoudi-Triki, 2004 ; Abd El Haleem et *al.*, 2006 )

Les travaux de Meki et Mohey El Dean (1998) ainsi que ceux de Fukuhara et collaborateurs (2003) ont montré une corrélation positive entre la sévérité de l'envenimation et le taux plasmatique de ces cytokines pro-inflammatoires.

En plus des cytokines pro-inflammatoires le venin d'Aam a provoqué chez les souris une élévation dans le taux sérique des cytokines de la voie Th1 (IL12 et IFN $\gamma$ ) et de la cytokine anti-inflammatoire l'IL10.

Des taux élevés d'IFN $\gamma$  ont été également retrouvés dans le sérum des animaux envenimés par *Centruroides noxius* et *Androctonus australis hector* (Petrceevich, 2006 ; Mohoub, 2007).

La concentration élevée d'IL10 dans le liquide broncho pulmonaire est associée à une augmentation du taux de survie des malades présentant un SDRA (Chevrolet et *al.*, 2004). L'élévation de cette cytokine suite à l'envenimation pourrait se révéler être une alternative pour contrecarrer l'inflammation et rétablir l'homéostasie.

L'inflammation pulmonaire peut-être observée dans plusieurs conditions pathologiques parmi ses caractéristiques, le passage excessif des cellules inflammatoires. Les proportions respectives de ces cellules peuvent varier énormément selon la nature de l'agent causal de l'inflammation. En effet l'intensité du syndrome obstructif dans l'asthme est corrélé avec une infiltration des éosinophiles alors que les lésions pulmonaires observées dans le syndrome de détresse respiratoire aigue sont dues principalement aux polynucléaires neutrophiles (Wilson et *al.*, 1992 ; Dubucquoi et Capron, 1998 ). Dans l'envenimation

scorpionique, l'examen microscopique des poumons des animaux envenimés par le venin de *Tityus discipans* et d'*Androctonus australis hector* a relevé une infiltration sévère des polynucléaires neutrophiles, un dépôt de fibrine abondant, un œdème diffus, une rupture occasionnelle des septa alvéolaires (D'suze et *al.*, 2004, 2007 ; Adi-Bessalem et *al.*, 2008). Le dépôt de fibrine est relié à l'endroit de séquestration des neutrophiles et le prétraitement des souris par le Benzydamine, qui affecte les voies d'activation des leucocytes impliqués dans la production des cytokines pro-inflammatoire et des agents chimiotactiques a pu minimiser la condensation de la fibrine (D'suze et *al.*, 2007).

Notre étude anatomopathologique réalisée sur l'organe du poumon a montré une infiltration leucocytaire, maximale et proportionnelle à la dose du venin injecté à 180 min. Le prétraitement des souris avec l'atropine, le diclofénac, le propranol avant l'injection du venin a induit une diminution de cette infiltration. Le traitement qui semble être le plus efficace à réduire l'infiltration inflammatoire est l'atropine.

En parallèle à l'étude histologique, le processus de séquestration des polynucléaires neutrophiles dans les poumons révélé par le dosage de la MPO, a montré un pic à 180 min. Le pré-traitement des animaux par l'atropine et le diclofénac a permis l'inhibition de l'infiltration de cette population cellulaire.

Il est bien établi que les antimuscariniques sont capables de produire une broncho dilatation et une diminution des sécrétions du système respiratoire. D'après les résultats obtenus, l'atropine en plus de ces effets, elle inhibe partiellement l'infiltration des polynucléaires neutrophiles. Le passage des PNN dans les poumons semble être dû au moins en partie, à la libération de l'acétylcholine et sa fixation sur ses récepteurs muscariniques.

L'observation microscopique du poumon et le dosage de la MPO ont montré également que l'administration du diclofénac qui est un anti inflammatoire non stéroïdien a réduit partiellement l'infiltration des PNN.

Selon Abramson et Weissman (1989), l'inhibition de la migration, l'adhésion et la fonction des neutrophiles par les anti-inflammatoires se fait probablement par l'inhibition d'un processus indépendant de leur capacité à inhiber la synthèse des prostaglandines. L'effet des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sur l'infiltration des leucocytes est due probablement à l'inhibition de libération du TNF $\alpha$  (Bednarek et *al.*, 1999). En effet cette cytokine avec l'IL-1 provoque la libération de l'IL6 et des chimokines par les cellules endothéliales et musculaires lisses des capillaires, et induisent l'expression de molécules d'adhésion comme ICAM-1 (Intercellulaire Adhesion Molecul) et VCAM-1 (Vascular Intercellular Adhesion Molecul) sur les cellules endothéliales qui se lient avec une grande

affinité à leurs récepteurs retrouvés sur les leucocytes, Leucocyte Fonction Antigen-1 (LFA-1) et Very Late Antigen-4 (VLA-4) respectivement l'interaction de ces molécules d'adhésion arrête le rolling des leucocytes et induit une liaison serrée des leucocytes permettant leur glissement entre les cellules endothéliales pour rejoindre ainsi le tissu enflammé (Voronov et al., 1996 ; Fradelizi et Theze, 1998).

Pareillement à l'infiltration des polynucléaire neutrophiles dans les poumons, la cinétique de variation de l'activité peroxydique des éosinophiles après injections de 400 µg/kg de venin d'Aam aux souris a montré un profile monophasique avec un pic à 180 min d'envenimation.

Les résultats de Mouhoub (2007) ont montré que l'envenimation des rats avec *Androctonus australis hector* induit une infiltration éosinophilique de type biphasique, un pic après 120 et l'autre après 1440 min.

Le prétraitement des souris avec l'atropine ou le propranolol avant injection de 900 µg/kg du venin d'Aam induit une augmentation (sur tout avec l'atropine) de l'infiltration des éosinophiles dans les poumons. Ces résultats laissent suggérer que le venin d'Aam a induit la libération de l'acétylcholine qui via ces récepteurs muscariniques a provoqué une voie d'inhibition de l'infiltration des éosinophiles.

Parallèlement au déclenchement d'une réaction inflammatoire, l'envenimation expérimentale que nous avons réalisée chez les souris avec les deux doses de venin d'Aam (400 et 900 µg/kg) a montré d'une part une augmentation graduelle de l'activité de la CPK avec un pic à 180 min et d'autre part une proportionnalité entre la dose du venin et le taux de l'enzyme sérique. Une élévation de l'activité sérique de cette enzyme a été également rapportée suite à l'envenimation des animaux par le venin de *Tityus serrulatus* ou de sa toxine majoritaire TsTXI (Correâ et al., 1997), d'*Androctonus australis hector* (Bessalem et al., 2003) et chez les patients envenimés accidentellement par *Tityus serrulatus* (Hering et al., 1993), *Tityus trinitatis* (Daisley et al., 1999), *Androctonus crassicauda* (Ismail et al., 1997), *Buthus occitinus* et *Leiurus quinquestriatus* (Meki et al., 2003).

L'administration de l'atropine ou le diclofénac, aux souris, 30 min avant le venin (900 µg/kg) n'a pas réduit le taux de la CPK mais au contraire elle a potentialisé l'effet du venin. Le seul traitement qui semble être efficace à inhiber l'augmentation de la CPK est la propranolol, antagoniste non sélectif des récepteurs β adrénergiques.

L'augmentation de la CPK dans le sérum peut être expliqué par des lésions du myocarde et sa prévention par le propranolol laisse suggérer que cette élévation n'est pas due à l'action direct du venin sur les cellules mais via la libération des catécholamines. Ce résultat

corrobore avec d'autres travaux qui ont montré que les manifestations cardiovasculaires du venin scorpionique et les lésions tissulaires sont liées aux taux élevés des catécholamines libérés suite à une stimulation du système nerveux sympathique par les constituants du venin (Choudury et Granguly, 1978 ; Gueron et *al.*, 1980 ; Bawaskar, 1982; Murthy et Vakil, 1988; Bawaskar et Bawaskar, 1989, Zegal et *al.*, 2000 ; Nouira et *al.*, 2005).

L'élévation de la CPK dans le sérum des souris envenimées et prétraitées par l'atropine peut être expliquée par l'augmentation de la fréquence cardiaque par l'antagonisme des récepteurs muscariniques retrouvé dans le myocarde. En effet la sollicitation des récepteurs muscariniques M2 cardiaques par l'acétylcholine entraîne plusieurs effets parmi lesquelles, une diminution du rythme cardiaque, une diminution dans la contraction cardiaque, une vasodilatation ... (Meunier et Schvaloff, 1999)

L'effet du diclofénac sur le taux de la CPK est probablement du au moins en partie par l'action de cet AINS sur le système cardiovasculaire. Deux hypothèses ont été émises pour expliquer l'augmentation de la fréquence des infarctus de myocarde chez les patients traités avec le diclofénac et celecoxib (AINS sélectif de Cox2) ; la première hypothèse est l'élévation de la pression artérielle suite à un déséquilibre de synthèse entre les prostaglandines vasodilatatrices issues de la voie COX2 et les prostaglandines vasoconstrictrices issues de la COX 1 et la deuxième hypothèse est la thrombose (MC Adam et *al.*, 1999 ; Anderson et *al.*, 2006; Rodriguez et *al.*, 2005).

En plus de la diffusion de la CPK dans le sérum, Le venin d'Aam provoque également une augmentation du taux sérique de lactate déshydrogénase (LDH) et une diminution de sa concentration dans le foie. La LDH étant une enzyme ubiquitaire, une partie de cet enzyme retrouvée dans le compartiment vasculaire provient des altérations du foie. En effet, l'observation microscopique de cet organe après injection des doses du venin (400 et 900 µg/kg) a montré une dégénérescence hydropique et une nécrose des cellules hépatiques proportionnelles à la dose du venin injecté. Ces modifications ont été également décrites par plusieurs auteurs après envenimation expérimentale par le venin de *Leiurus quinquestriatus*, *Buthus occitanus*, *Tityus serrulatus* et *Androctonus australis hector* (Berte et Atkis, 1961 ; Mohamed et *al.*, 1978 ; Correâ et *al.*, 1997, Bessalem et *al.*, 2003).

En générale l'aspect hydropique ou vacuolaire des cellules est due à des modifications profondes de la pression osmotique intracellulaire dont le mécanisme est complexe (pH, teneur en sels, dégradation de la membrane cytoplasmique) (Diebold et *al.*, 1991).

L'hypothèse qui a été donnée pour expliquer la dégénérescence hydropique dans l'envenimation est que le venin cause l'influx du Calcium qui active les phospholipases

responsable de l'hydrolyse des phospholipides membranaires conduisant ainsi à l'influx de l'eau et/ou à la présence des phospholipase au niveau du venin (Bertk et Atkins, 1961 ; Mohamed et *al.*, 1978).

Les coupes histologiques du foie 1440 min après envenimation des souris en présence du propranolol ont montré une aggravation des lésions produites par le venin. Toutefois le prétraitement par l'atropine a montré une image semblable à celle observée avec le venin, 180 min après son administration. Ces résultats nous laissent suggérer que le venin d'Aam a induit la libération de l'Ach qui une fois fixé sur ses récepteurs muscariniques a provoqué une dégénérescence hydropique suivie par une nécrose des cellules hépatiques.

L'immunothérapie est le seul traitement spécifique de l'envenimation scorpionique. Elle consiste à administrer des fragments F(ab')<sub>2</sub> obtenu par hydrolyse à la pepsine des IgG récupérés à partir des chevaux hyperimmunisés avec le venin.

Dans notre étude, les fragments F(ab')<sub>2</sub> spécifiques du venin d'Aam administrés par voie intrapéritonéale, 30 min après envenimation des souris par le venin d'Aam ont montré une neutralisation partielle de toutes les modifications physiologiques. La concentration des anticorps injectés aux animaux semble incapable de produire une neutralisation totale des altérations. Les travaux rapportés par Ismail en 1995 ont montré que de fortes doses d'antivenin (5-20 ml comparé à 0,5-1ml) réduisent la mortalité causée par le venin d'*Androctonus crassicauda* de 4-6,8% à moins de 0.05%.

Contrairement à la dose sublétales du venin d'Aam (400 µg/kg) qui n'a induit aucun symptôme, L'injection d'une dose létale a provoqué dans un délai rapide (environ 20 min), une paralysie des membres postérieurs, une hypersalivation et une diarrhée. Ces symptômes ont été déjà décrits dans les cas d'envenimation accidentelles graves (Ramanesh, 1990, Goyffon, 1982 ; Neale, 1990 ; El Amin, 1992 ; Hering et *al.*, 1993).

La diminution de la mobilité a été également observée chez les souris injectées par la fraction TFII de *Tityus discrepans*. Cette fraction a provoqué indirectement une dépolarisation des fibres du muscle squelettique de grenouille. D'autre part l'utilisation des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase induit des fasciculations (Contractions isolées involontaires et anarchiques n'aboutissant jamais à un mouvement) (D'suze et *al.*, 1995 ; Meunier et Schvaloff, 1999). Ces observations nous laissent suggérer que le venin d'Aam a réduit la mobilité des souris via une dépolarisation des muscles squelettiques par la libération accrue de l'acétylcholine.

Le prétraitement par l'atropine a permis d'inhiber la diarrhée et d'augmenter légèrement la mobilité des animaux. L'administration du diclofénac et le propranolol n'a inhibé

aucun des symptômes observés en présence du venin seul. L'inhibition de la diarrhée par l'atropine corrèle avec les données pharmacologiques qui ont montré que l'augmentation du tonus et du péristaltisme intestinale est bien contrôlée par l'atropine et que de nombreuses préparations antidiarrhéiques et antispasmodiques contiennent des antimuscariniques seuls ou en association (Schorderet *et al.*, 1992).

L'incapacité de l'atropine à inhiber l'hypersalivation corrobore avec les résultats d'Andrade et ces collaborateurs (1981) qui ont montré que ce symptôme observé dans l'envenimation scorpionique est secondaire à la stimulation des récepteurs cholinergiques et adrénergiques des glandes salivaires.

L'injection de la dose létale du venin a induit la mort des souris 20 min après son administration et leur prétraitement par l'atropine ou le diclofénac a prolongé le temps de survie. Ces résultats sont similaires à ceux retrouvés par Ismail et ces collaborateurs (1992). En effet, le prétraitement des rats par administration de l'atropine ou l'indométacine, un anti-inflammatoire non stéroïdien avant injection du venin de *Leiurus quinquestriatus* prolonge le temps de survie de ces rats.

La détermination de l'index pulmonaire des souris envenimées par la dose létale du venin d'Aam seul ou après administration de l'atropine, le diclofénac ou le propranolol a permis de montrer que la dose du venin injectée ne modifie cet index que chez les souris prétraités par l'atropine.

L'observation microscopique de ces poumons (venin + atropine) ainsi que les poumons des souris envenimés et prétraités par le diclofénac et le propranolol a montré une infiltration leucocytaire et érythrocytaire plus importante en présence de l'atropine. L'injection du venin seul provoque seulement un infiltrat inflammatoire et quelques zones hémorragiques. L'élévation de l'index pulmonaire chez les souris envenimés et prétraités par l'atropine peut être expliquée au moins en partie par l'augmentation accrue des érythrocytes, et de la pression sanguine dans les artères pulmonaires, secondaire à une élévation de la fréquence cardiaque. En effet une augmentation de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque a été déjà observée après administration de l'atropine à des chiens envenimés par *Leiurus quinquestriatus* (Gueron *et al.*, 1980)

L'infiltration érythrocytaire observée au niveau du parenchyme pulmonaire de souris prétraitée par le diclofénac est probablement due à une augmentation de la tension artérielle suite à l'inhibition de la libération des Prostaglandines. Ismail et ses collaborateurs (1990) ont suggéré que l'hypotension terminale résistante aux agents hypertenseurs observé chez les

enfants piqués par le scorpion est la résultante de la libération des prostaglandines et/ou des kinines.

Parallèlement à l'étude histologique des poumons, le dosage de l'activité de la myéloperoxidase (MPO), un marqueur de l'infiltration des polynucléaires neutrophiles, a montré des taux très élevés de ces polynucléaires dans les poumons des souris prétraitées par l'atropine et le diclofénac comparés aux souris injectées par le venin seul. Cela peut être expliqué par le temps de survie qui est plus long chez les souris prétraitées par l'atropine.

Par ailleurs le taux des polynucléaires neutrophiles retrouvé dans les poumons des souris prétraité par le propranolol est plus important que celui retrouvé dans les poumons de celles prétraitées par le diclofénac malgré que ce dernier ait prolongé le temps de survie des souris, plus que le premier. Ceci pourrait être expliqué par une inhibition de l'infiltration des polynucléaires neutrophiles par le diclofénac.

L'estimation de l'infiltration des polynucléaires éosinophiles par le dosage de l'activité de leur peroxydase a montré une infiltration accrue de ces cellules dans les poumons prélevés de souris prétraitée par l'atropine par rapport aux souris injectés par le venin seul. Ce résultat est probablement due au le temps de survie et à l'existence d'une inhibition de l'infiltration de ce type de polynucléaires via les récepteurs muscariniques de l'acétyl choline.

L'observation microscopique du foie des souris envenimées par la dose létale du venin d'Aam a montré une nécrose hépatocytaire, une infiltration inflammatoire et érythrocytaire. Ces effets ont diminué dans le foie des souris prétraitées par l'atropine et le diclofénac. Cela nous pousse à suggérer que les lésions induites par le venin d'Aam au niveau du parenchyme hépatique sont dues à la libération de l'acétylcholine et/ou des médiateurs inflammatoires dont la libération est inhibée par le diclofénac, un anti inflammatoire non stéroïdiens.

L'ensemble des résultats nous pousse à donner plusieurs suggestions parmi lesquelles:

- Le venin d'*Androctonus amoreuxi* via la fixation des ses neurotoxines sur les canaux ioniques a provoqué une libération mixte des neurotransmetteurs (acétylcholine et les catécholamines), l'acétylcholine a induit une diarrhée, une augmentation de la sécrétion salivaire, une paralysie des membres postérieurs, une élévation de la séquestration des polynucléaires neutrophiles, une diminution de l'infiltration des polynucléaires éosinophiles dans les poumons, une nécrose des cellules hépatiques. Les catécholamines ont provoqué une augmentation de la CPK sérique et une inhibition de la séquestration des polynucléaires éosinophiles.
- Les médiateurs de l'inflammation participes partiellement à la nécrose des hépatocytes provoquée par le venin.
- L'augmentation des PNN dans les poumons est expliquée au moins en partie à la libération de TNF $\alpha$ .
- Une partie de LDH retrouvée dans le sérum suite à une envenimation scorpionique est due aux lésions du tissu hépatique.

## **Conclusion et perspectives**

Notre contribution dans ce travail a consisté à montrer les effets des différentes doses du venin d'*Androctonus amoreuxi* (deux doses sublétales et une dose létale) sur les variations physiopathologiques (inflammatoire, métabolique et histopathologique) après sa distribution du site d'injection vers le milieu vasculaire en présence et en absence d'un traitement antivenimeux spécifique et des traitements non spécifiques (diclofénac, atropine et propranolol).

Les résultats obtenus ont clairement montré une résorption rapide du venin d'Aam du site d'injection vers le compartiment vasculaire et le déclenchement rapide d'une réponse inflammatoire. En effet la détermination de la concentration sérique des cytokines,  $IL1\beta$ , IL6, IL10, IL12 et  $IFN\gamma$  et de l'activité de la MPO et de l'EPO dans les poumons ont permis de montrer une augmentation des taux sériques des cytokines 45 min après envenimation des animaux, et une infiltration des polynucléaires neutrophiles et éosinophiles temps et dose dépendantes. Par ailleurs, le dosage des activités de la LDH et la CK sériques a montré une élévation anormale de leurs concentrations après leur libération dans le milieu vasculaire. L'observation des coupes histologiques après administration de venin d'Aam a révélé des lésions tissulaires se traduisant au niveau du parenchyme pulmonaire par une infiltration des cellules inflammatoires, des œdèmes hémorragiques et au niveau du parenchyme hépatique par une dégénérescence hydropique et une nécrose cellulaire.

Le prétraitement des souris par le diclofénac ou l'atropine ou le propranolol et l'administration des fragments  $F(ab')_2$  (injectés 30 min après le venin) ont permis de montrer une réduction de certaines perturbations physiologiques y compris l'inflammation pulmonaire.

### **En perspective, il serait intéressant :**

- D'utiliser d'autres antagonistes des récepteurs de neurotransmetteurs et leur implication dans l'inflammation provoquée par le venin de scorpion afin d'expliquer le Cross-Talk, Système nerveux- Système immunitaire existant dans la pathogénie scorpionique.
- De réaliser une étude histopathologique sur d'autres organes, associée à une étude immunohistochimique pour montrer les sites de fixation du venin sur les organes.

## BIBLIOGRAPHIE

### A

**Abbas,N., Belghazi,M., Abdel-Mottaleb Y., Jan Tytgat,J., Pierre E. Bougis, P.E and Martin-Eauclaire, M.F** (2008) A new Kaliotoxin selective towards Kv1.3 and Kv1.2 but not Kv1.1 channels expressed in oocytes. *Toxicon* **51**:321–333

**Abbas, N., Le Gros, C., Ceard, B., Belghazi, M., Hamon, A., Bougis, P.E and Martin-Eauclaire,M.F** (2009) Full characterization of three toxins from *Androctonus amoreuxi* scorpion venom *Toxicon* **54**:460-470

**Abdel Haleem, A.A., Meki, A.R.MA, Noaman, H.A and Mohamed,Z.T** (2006) Serum levels of IL6 and its soluble receptor, TNF- $\alpha$  and chemokine RANTES in scorpion envenomation outcome. *Toxicon* **47**:437-444.

**Abia, A., Lobaton C.D., Moreno A and Garcia-Calvo J** (1986) *Leiurus quinquestriatus* venom inhibits different kinds of Ca<sup>++</sup>-dependant K<sup>+</sup> Channel. *Biochim. Biophys. Acta* **856**:403-407.

**Abib.L** (2003) Effets biologiques du venin d'*Androctonus australis hector* et de ses constituants biochimiques après modification par irradiation gamma : Interaction avec leur cible tissulaire et leur utilisation dans une nouvelle stratégie de préparation d'anticorps neutralisants. **Thèse de Magister.**

**Abroug F and Ayari M** (1995) Assessment of left ventricular function in severe scorpion envenomation: combined hemodynamic and echo-doppler study. *Intensive care Med* **21**: 629–35.

**Abroug, F ; El Atrous, S; Nouira,D; Touzi,N and Boucoucha,S** (1999) Serotherapy in scorpion envenoming controlled trial. *Lancet* **354**:906-909.

**Ader, C., Schneider, R., Hornig,S., Vallistty,P., Wilson,E.M., Lanje, A., Giller,K., Ohmert, I., Martin-Euclaire, M.F., Trauner,D., Becker,S and Baldus A** (2008) Structural link between inactivation and block K<sup>+</sup> channel. *Nat Struct Mol Biol* **15**:605-612.

**Adi-Bessalem, S; Hammoudi-Triki,D and Laraba-Djebari, F**(2008) Pathophysiological effects of *Androctonus australis hector* scorpion venom: tissue damages and inflammatory response. *Experimental and Toxicologic Pathology* **60**:373-381.

**Aiyar, J., Withka, J.M., Rizz, J.P., Singleton, D.H., Andraw, G.C., Lin, W., Boyd,J., Hason,D.C., Simon, M and Dethlefs, B** (1995) Topology of the pore region of K<sup>+</sup> channel revealed by NMR drives structure of scorpion toxins, *Neuron* **15**: 1169-1181.

**Amaral,C.F.S., Lopez, J.A., Magalhaes, R.A. and Rezende, N.A.** (1991). Electrocardiographic, enzymatic and echocardiographic evidence of myocardial

damage after *tityus serrulatus* scorpion sting poisoning in children. *Am.J.Cardiol* **67** : 655-657.

**Amaral, C.F.S., Rezende, N.A and Freire-Maia, L.**(1993).Acute pulmonary edema after *Tityus serrulatus* scorpion sting in children. *Am .J.Cardiol.***71** : 242-245 .

**Andrad, M.V., Caramez, M.PR., Abreu, E.M.N.N., Dolnikoff, M., Omar, E.D., Velasco, I.T and Cunha-Melo, J.R** (2004) Lung compliance, plasma electrolyte levels and acide-Base nalance are affected by scorpion envenomation in anesthized rats under mechanical ventilation. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* **138**: 97-104.

**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 part A***146**:581-587.

**Aubrey N., Muzard,J., Peter, J.C., Rochat, H., Goyffon,M and Billiald, P.**(2004). Engineering of a recombinant Fab from a neutralizing IgG directed against scorpion neurotoxin Aah I, and functional evaluation versus other antibody fragment. *Toxicon* **43**: 233-24.

**Avrameas S and Ternynck Th.** (1991) Méthodes et techniques immuno-enzymatiques. Edition INSERM : 39-42.

## B

**Bahloul, M., Kallel, H., Rekik, N., Ben Hamida, C., Chelly, H and Bouaziz, M.,** 2005. Cardiovascular dysfunction following severe scorpion envenomation. Mechanisms and physiopathology. *Presse Med.* **34** :115–120.

**Barbouche., M,R, Heguiga, H., Noura, S ;Krifi, M,N; Abroug,F and Boucoucha,S** (1996) Inflammatory cytokines and scorpionic envenomation analysis of serological level in 46 Tunisian patients. *Toxicon* **34**:156

**Bawaskar, H.S** (1982) Diagnostic cardiac premonitory signs and symptoms of red scorpion sting. *Lancet*: 552-554.

**Bawaskar, H.S., Bawaskar, P.H** (1989) Stings by red scorpion (*Buthus tumulus*) in Maharashtra state, India: a clinical study. *Trans R soc Trop Med Hyg* **83**:858-860.

**Bawaskar , H.S., Bawaskar, P.H.** (1994) Vasodilators : scorpion envenoming and thenheart (An Indian experience). *Toxicon* **32** : 1031-1040

**Benguedda, A.-C., Laraba-Djébari, F., Ouahdi, M., Hellal, H., Griene, L., Guerenik M. Laid, Y et membres du Comité national de lutte contre l'envenimation scorpionique (CNLES)** (2002) Expérience de quinze années de lutte contre l'envenimation scorpionique en Algérie. *Bull Soc Pathol Exot*, , **95**, 3, 205-208

**Berdnarek, D., Szuster-Ciesielska, A., Zlzisinska, B., Kondracki, M., Paduch, R and Kandefer-Szerszen, M** (1999) The effect of steroidal anti-inflammatory drugs on the cellular immunity of calves with experimentally induced local lung inflammation. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **71**:1-15.

**Berkt,E M and Atkins, J, H** (1964) Effect of *Centroides sculpturatus* venom upon rat tissues :A histological study.*Toxicon* 2:205-209.

**Bertazzi DT, Assis-Pandochi AI, Azzolini AE, Talhaferro VL, Lazzarini M, Arantes EC**(2003) Effect of *Tityus serrulatus* scorpion venom and its major toxin, TsTX-I, on the complement system in vivo. *Toxicon*;**41**:501-508.

**Bessalem, S., Hammoudi-Triki, D and 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

**Bonnet, M. S** (1997) Toxicology of *Androctonus* scorpion. *British Homeopathic journal* **86**:142-151

**Brewer P, Helbig N et Haard N.D.** (1984) Atlantic cod pepsin characterization and use rennet substitute. *Canadian institute of food science and technology journal.***17**:38-43.

**Broglia, N.and Goyffon, M.** (1980) Les accidents d'envenimation scorpionique. - *Conc Méd,* **38** : 5615-522.

**Bucaretschi, F., Baracat, E.C., Nogueira, R.J., Chaves, A., Zambrone, F.A., Fonseca, M.R and Tourinho, F.S** (1995) A comparative study of severe scorpion envenomation in children caused by *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao. Paulo* **37** (4):331–336.

## C

**Calderon-Aranda, E,S; Rivière,G; Choumet,V; Possani,CD and Bon,C** (1999) Pharmacokinetics of the toxic fraction of *Centroides limpidus limpidus* venom in experimentally envenomed rabbits and effects of immunotherapy with specific Fab'2.*Toxicon* **37**:771-782.

**Campos,J. A., Silva, O.A., Lopes, M and Freire-Maia, L** (1979) signs symptoms and treatment of severe scorpion sting in children. *Toxicon* 17, 19.

**Capone, M. L., Tacconelli S, Francesco, L. D., A, Sacchetti., Sciulli M. G and Patrignani P.** (2007) Pharmacodynamic of cyclooxygenase inhibitors in humans. *Prostaglandins and other Lipid Mediators* **82**:85–94

**Cavaillon, J.M** (1995). L'inflammation: un équilibre précaire entre cytokines pro et anti-inflammatoires. *Revue française des laboratoires*, n°276

**Chavez-Olortegui, C., Ait Amara, D., Rochat, H., Diniz C and Claude Granier** (1991) *In vivo* protection against scorpiontoxins by liposomal immunization *Vaccine*, 9

**Chen C, Folan R, Kwok H, O’Kane Ed.J, Bjourson A.B and Shaw C. (2003)** Isolation of scorpion (*Androctonus amoreuxi*) putative alpha neurotoxine and parallel cloning of their respective c DNAs from a single sample of venom. *Regulatory peptides* **115**:115-121

**Cheverolet, J.C., Tossaux, D., Jolliet, Pet Pugin, J(2004)** Syndrome de détresse respiratoire aigue. EMC Pneumologie 1

**Chippaux, J.-P and Goyffon M. (2008)** Review Epidemiology of scorpionism: A global appraisal. *Acta Tropica* **107**:71–79

**Choudhry, L and Ganguly, D.K (1978)** Some cardiovascular effects of crude scorpion venom. *Ind J medRes* 68:515-518.

**Coelho,F,M;Pessini,A,C;Coelho,A,M;Pinho,V,S;Souza,D,G;Arantes,E,C, Texiera ,A, Land Texiera, A.L (2007)** Platelet activating factor receptors drive CXC chemokine production, Neutrophil influx and oedem formation in the lung of mice injected with *Tityus serrulatus* venom. *Toxicon* **50**:420-427.

**Corrado, A.P., Antonio, A and Diniz.L. R (1968)** Brazilian scorpion venom (*Tityus serrulatus*) and sympathetic post ganglionic stimulant *J Pharmac Exp Ther* **164**:253-258.

**Corrêa,M,M; Sampaio,SV; Lopez.R.A, Mancuso,L,C; Cunha,OAB., Franco,JJ and 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.

**Couraud, F., Jover, E., Dobois, J.M and 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.

**Cunha-Melo, J.R., Toppa, N.H., Martins, P., Colares, C.N., Castro, Y.S and Freire-Maia, I., (1991).** Acute gastric mucosal injury induced by toxins from *Tityus serrulatus* scorpion venom: a novel experimental model in the rat. *Toxicon* **29** (11):1395–1401.

**Cupo, P and Hering, S.E., (2002).** Cardiac troponin I release after scorpion envenoming by *Tityus serrulatus*. *Toxicon* **40**:823–830.

## D

**Daisley, H., Alexander, D and Pitt-Miller, P** (1999) Acute myocarditis following *Tityus trinitatis* envenoming: morphological and pathophysiological characteristics. *Toxicon* **37**, 165.

**De Bin, J.A., Maggio, J.E and Strichartz, G.R., L.** (1993). Purification and characterization of chlorotoxin, a chloride channel ligand from the venom of the scorpion. *Am. J. Physiol.* **264**:361–369

**De Dianous E., Hoarau, F and Rochat,H** (1987) Re examination of the specificity of the scorpion *Androctonus australis hector* toward arthropods. *Toxicon* **25** (4):411-417.

**De Lima M.E., Martin M.F., Diniz C.R. and Rochat H** (1986) *Tityus serrulatus* toxin VII bears pharmacological properties of both  $\beta$ -toxin and insect toxin from scorpion venoms. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **139**(1):296-302

**De Matos, I.M., Rocha, O.A., Leite, Rand Freire-Maia, L.,** (1997) Lung oedema induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom in the rat. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* **118** (2), 143–148.

**DeMatos, I.M., Souza, D.G., Freire-Maia, L andTeixiera, M, M** (1999) Effects of tachykinin NK1 or PAF receptor blockad on the lung injury induced by scorpion venom in rats. *European Journal of Pharmacology* **376**:293-300.

**De-Matos, I. M; Talvani., Freire-Maia, L and Tixiera, M, M** (2001) Evidence for the role of mast cells in the lung edema induced by *Tityus srrulatus* venom in rats. *Toxicon* **39**:861.

**De-Rezende, N.A., Borges Dias, M., Campolino, D., Chavez-Olortegui, C., Diniz, C.R and Amaral, C. F. S.** (1995) Efficacy Of antivenom therapy for neutralising circulating venom antigens in patients stung by *Tityus serrulatus* scorpions. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **52** : 277-280

**Descamps-Latscha, B and Witko-Sarsat, V** (1996) Cytokines pro-inflammatoires et cellules phagocytaires. *Revu Française d'Allergologie et d'Immunologie Expansion Scientifique Française*

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

**Diaz, P., Gonzalez, M.C., Galleguillos, F.R., Ancic, P., Cromwell, O., Shepherd, D., Durham, S.R., Gleich, G.J., Kay, A.B.**(1989) Leukocytes and mediators in bronchoalveolar lavage during allergen-induced late-phase asthmatic reactions. *Am. Rev. Respir. Dis.* **139** :1383– 1389.

**Diebold, J.P., Cmilleri-Reynes, P and Calard** (1991) Anatomie pathologie générale. *Edition Médicales Internationales*. Pp 35.

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

**Dorosz, P** (1994) Guide pratique des médicaments. *Maloine*. Pp 290, 344, 395, 587.

**D'suze, G., C. Secik and Ramos, M** (1995) Presence of curarizing polypeptides and a pancreatitis-inducing fraction without muscarinic effects in the venom of Venezuelan scorpion *Tityus discepanis* (KARASCH) *Toxicon*. **33**:333-345.

**D'Suze, G., Salazar, V.,. Diaz, P., Sevcik, C., Azpurua, H and Bracho, N.** (2004) Histopathological changes and inflammatory response induced by *Tityus discrepans* scorpion venom in rams *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

**Dubucquoi S et Capron M** (1998) L'éosinophile, une cellule à deux visages dans la réponse inflammatoire. Dans L'inflammation. *London, Libbey* :55-68.

**Durham, S.R., Kay, A.B**(1985) Eosinophils, bronchial hyper reactivity and late-phase asthmatic reactions. *Clin. Allergy* **15**, 411– 418.

## E

**El-Asmar, M.F., Farag,R.M., Shokry, S and El-Shimi, I, R** (1979) Effects of scorpion (*Leiurus quinquestriatus*) venom in lipid metabolism. *Toxicon* **17**:279.

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

**Elsasser-Beil, U and Von Kleiste, S** (1993) Cytokines as therapeutic and diagnostic agent. *Tumor biol***14**:69-94.

## F

**Fajloun, Z., Kharrat, R., Chen, L., Locomte, E., Dilccio, D., El Ayeb, M. Rochat, Pessah,I.N., Dewaard and Sabatier,J.M** (2000) Chemical synthesis and characterization of maurocalcine, a scorpion toxin that activates Ca<sup>2+</sup> release channel ryanodine receptors. *FEBS Lett* **469**:179-185.

**Fatani, A. J ., Furman, B., L and Zeitlin, I.J.** (1998) the involvement of plasma Kinins in the cardiovascular effects of *Leiurus quinquestriatus* scorpion venom in anaesthetised rabbits. *Toxicon* **36**: 523-536

**Fletcher, M.D., Passani, L and Fletcher, P.L** (1994) Morphological studies by light and electron microscopy of pancreatic acinary cells under the effect of *Tityus serrulatus* venom. *Cell Tissu Research* **278**, 255-264.

**Fletcher, P.L., Fletcher, M., Fainter L.F., Terrian, D.T** (1996) Actions of new world scorpion venom and its neurotoxins in secretion. *Toxicon* **34**:1399-1411.

**Fradelizi, D et Theze, J** (1998) Cytokines: médiateurs de la réponse immunitaire et de la réaction inflammatoire. *Annales de l'Institut Pasteurs* **2**: 295-106.

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

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

**Freire-Maia L, Campos JA, Amaral CFS** (1994). Approaches to the treatment of scorpion envenoming. *Toxicon*; **32**:109-114.

**Fukuhara; Ries, M,L Delallibera-joviliani,R ; Cunha,F,Q,C and Donadi, E.A** (2003) Increased plasma levels of  $IL1\beta$ ,  $IL6$ ,  $IL8$ ,  $IL10$  and  $TNF\ \alpha$  in patients moderately or severately envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion stings. *Toxicon* **41**:49-55.

## G

**Gajre, G and Dammas, A. S.** (1999) Scorpion envenomation in children: Should all stings be given antivenom? *Annal of Saudi Medicine* **19**:444-446.

**Gallager, S., Sankaran, H and Williams, J.A** (1981) Mechanism of scorpion *Tityus serrulatus* toxin induced enzyme secretion in rat pancreas. *Gastroenterology* **80**:970-973.

**Ghalim, N., El Hafny, B., Sebti, F., Haikel, J., Lazar, N., Moustamir, R and Benslimane, A** (2000) scorpion envenomation and serotherapy in Morocco. *Am.J.Trop .Med .Hyg* **62**:277-283

**Ghazal, A., Ismail M, Abdel-Rahman A and E1-Asmar, M.F** (1975). Pharmacological studies of scorpion (*Androctonus amoreuxi* Aud. &Sav.) venom. *Toxicon* **13**: 253-9.

**Gleich, G.J** (1990). The eosinophil and bronchial asthma: current understanding. *J. Allergy Clin. Immunol.* **85**:422-436.

**Goldsteine,S.A., Pheasant, D.J and Miller, C** (1994) the Charybdotoxin receptor of a shaker  $K^+$  channel: peptide and channel residus mediating molecular recognition. *Neuron* **12**:1377-1388.

**Goodman,R.B., Pugin, J., Lee, J.S and Mathy, M.A** (2003) Cytokine mediated inflammation in acute lung injury. *Cytokine Growth Factor Rev* **14**:523-535.

**Gordon, D., Jover, E., Couraud, F and Zoltkin, E** (1984) The binding site of the insect selective neurotoxin (Aa IT) from the scorpion venom locust synaptosomal membrane. *Biochim, Biophys Acta* **778**:349-358.

**Gordon, D** (1997) Sodium channels as targets for neurotoxins mode action and interaction of neurotoxins with receptor sites on sodium channels in: Gutman, Y., Lazaworci, toxins and signal transduction, *Harwood Acad Publ* :119-149

**Goyffon M, Vachon M and Broglio N** (1982) Epidemiological and clinical characteristics of the scorpion envenomation in Tunisia. *Toxicon*; **20**: 1,337-44.

**Gueron, M., Stern, J and Cohen W** (1967) Severe myocardial damage and heart failure in scorpion sting. *Am J Cardiol*; **19**:719-26.

**Gueron ,M., Ilia,R and Sofer, S** (1992) The cardiovascular system after scorpion envenomation a review *J Toxicol* **30**(2):245-258.

**Gueron M, Sofer S** (1990). Vasodilators and calcium blocking agents as treatment of cardiovascular manifestations of human scorpion envenomation. *Toxicon* **28**:127-8.

## H

**Hammoudi-Triki, D** (2004) Effets physiopathologiques et pharmacodistribution du venin d'*Androctonus australis hector* avant et après immunothérapie **Thèse de Doctorat**

**Hammoudi-Triki, D., Lefort,J, Rougeot, C; Robbe-Vincent, A; Bon, C; Laraba-Djebari,F and Choumet,V** (2007) Toxicokinetic and toxicodynamic analyses of *Androctonus australis hector* venom in rats: Optimisation of antivenom. *Toxicol Appl pharmacol* **218**(3):205-214.

**Helali, A** (1994) Pharmacologie Fondamental et clinique à l'usage des étudiants en médecine Ed ENAG pp 122, 123

**Hoch, R.C., Roriguez, R., Mannug, T., Bishop, M., Shoemaker, W.C and Abraham. E** (1993) Effect of trauma on cytokine and endotoxin production. *Critical Care Med* **21**:839-845.

**Howard, M., O'Garra, A.** (1992). Biological properties of interleukine 10. *Immunol.Today* **13**: 198-200

## I

**Ismail M<sup>a</sup>, Abdullah ME, Morad AM and Ageel AM.** (1980) Pharmacokinetics of I (125)-labelled venom from the scorpion *Androctonus amoreuxi*. *Aud & Sav Toxicon* **18**:301-308.

**Ismail, M<sup>b</sup>, Ghazal, A and El Fakahany,E.E** (1980) Cardiovascular effects of venom from the scorpion venom *Buthus accitanus*, *Amoreux Toxicon* **18**: 327-337

**Ismail M, Shibl A.M, Morad A.M, Abdullah, M.E**(1983). Pharmacokinetics of I-labelled antivenom to the venom from the scorpion *Androctonus amoreuxi*. *Toxicon*; 21: 1:47-56.

**Ismail, M and Abd El Salem, M.A** (1988) Are the toxilological effects of scorpion envenomation related to tissue venom concentration?. *Toxicon* 26:233-256.

**Ismail, M., Abd-Elsalem, M.A., Morad, A.M** (1990) Do changes in body temperature following envenomation by the scorpion *Leiurus quinquestriatus* influence the cours of toxicity? *Toxicon* **28**, 1265-1279.

**Ismail, M., Fatani, A.J.Y and Dabees, T.T** (1992). Experimental treatment protocols for scorpion envenomation: a review of common therapies and an effect of kallikrein- kinin inhibitors. *Toxicon*; **30**:1257-1279.

**Ismail, M., Abd-Elsalam, M.A and Al-Ahaidib, M.S.** (1994) *Androctonus crassicauda* (Olivier) , a dangerous and unduly neglected scorpion-I. Pharmacological and clinical studies. *Toxicon* **32**: 1599-1618

**Ismail M** (1995). The scorpion envenoming syndrome. *Toxicon*; 33:825- 58.

## J

**Jover, E., Couraud,F and Rochat, H** (1980) Tow types of scorpion neurotoxins characterized by their binding to two separate receptor sites on rat brain synaptosomes *Biochem.Biophys. Res Comun* 95:1607-1614.

## K

**Kankokar, R.C., Murthy, K.R., Zare, A., Malathi, A., Balasubramanian, P and Yeolekar, M.E** (1992) Reversal of cardiovascular and haemodynamic disturbances by scorpion antivenom administration in myocarditis due to envenomation by Indian red scorpion (*Buthidea* family) venom. Abstact of the 10<sup>th</sup> world Congress *Animal.plant and Microbial Toxins Toxicon* **30**, 523.

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

**Krifi, M. N; Miled, M; Abderrezak, M and 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.

**Kroegel, C., Yukawa, T., Dent, G., Venge, P., Chung, K.F and Barnes, P.J** (1989). Stimulation of degranulation from human eosinophils by platelet-activating factor. *J. Immunol.* **142**:3518-3526.

**Kopeyan, C., Martinez, G., Lissitzky, S., Miranda, F and Rochat H** (1974) Disulfide bonds of toxin 2 of the scorpion *Androctonus australis hector* *Eur.J.Biochem.* **47**:483-189.

**Kopeyan, C., Mansuelle, P., Martin-Euclaire, M.F Rochat, H and Miranda, F** (1993) Characterization of toxin III of the scorpion *Leiurus quinquestriatus* a new type of alpha toxin highly toxic both to mammal and insect, *Nat toxins* **1**:308-312

## L

**Lamkhioued, B., Soussi-Gounni, A., Aldebert, D., Delaport, E., and Capron, M** (1996) Synthesis of type 1 (IFN $\gamma$ ) and type 2 (IL4, IL5 and IL10) cytokines by human eosinophiles. *Am Acad Sci*; **796**:203-208.

**Laraba-Djebari F et Hammoudi-Triki, D** (1999). Purification et caractérisation des fragments F(ab')<sub>2</sub> a partir d'un sérum anti-scorpionique *Archives de l'institut Pasteur d'Algerie* T 63 : 3-20

**Leberton, F., Deleperre, M Ramirez, A., Balderas, C and Passani, L.D** (1994) Primary and NMR-three dimensional structure determination of a novel crustacean toxin from the venom of scorpion *Cetreroides limpidus limpidus* *Biochemistry* **33**:11135-11149.

**Legros, C and Martin-Eauclaire, M.-F** (1997) Les toxines de scorpion. *C R Soc Biol* **191** : 345-380.

**Loret, E., Martin-Euclaire, M.F., Mansuelle, P., Sampieri, F., Granier, C and Rochat H** (1991) An anti insect toxin purified from the scorpion *Androctonus australis hector* also acts on the alpha and beta sites of the mammalian sodium channel: Sequence and circular dichroism study. *Biochemistry* **30**: 633-640.

## M

**Magalhaes, M.M., Pereira, M.E.S., Amaral, C.F.S., Rezende, N.A., Campolina, D., Bacurechi, F; Gazzilnelli, R, T and Cunha-Melo, J, R** (1999) Serum levels of cytokines in patients envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting *Toxicon* **37**:1155-1164

**Martin, M.F and Rochat, H** (1984) Purification and amino acid sequence of toxin I'' from the venom of North African scorpion *Androctonus australis hector*. *Toxicon* **22**(5):695-703.

**Martin-Eauclaire M-F, Legros C, Bougis B E and Rochat H** (1999) Les toxines des venins de scorpion. *Annales de l'Institut Pasteur/Actualités* **10** (2) :207-222

**Mathy-Hartert, M., Deby-Dupont, G., Melim, P., Lamy, M and Deby C** (1996) Cultured macrophages acquire a bactericidal activity against *Pseudomonas aerogenosa* after incorporation of myeloperoxidase. *Experientia* 52:1-8.

**Mc Adam, B.F., Catella-Lawson. F., Mardini.I.A., Kapoor, S., Lawson, J.A and Fitz –Gerald, G.A** (1999) Systemic biosynthesis of prostacyclin by Cyclooxygenase (Cox2): The Human Pharmacology of selective inhibitor of Cox2. *Proc Natl Aca Sci USA* 96:272-277.

**Meki,A.R.M.A and Mohey El Dean** (1998) Serum interleukin 1 $\beta$ , Interleukin 6, Nitric oxide and  $\alpha$ 1 Anti-trypsin in scorpion envenomed children. *Toxicon* 36:1851-1859

**Meki, A.R.M.A ., Mohamed, Z.M.M and Mohey El-Dean, H. M.**(2003) Significance of assessment of serum cardiac troponin I and interleukin-8 envenomed children. *Toxicon* 41: 129-137

**Meki, A. R. M. A, Mansuelle P., Laraba-Djebari,F., Oughideni, R., Rochat and Martin-Eauclaire M.F.** (2000) KTX3. the Kaliotoxin from *Buthus occitanus* scorpion venom: one of an extensive family of peptidyl ligands of potassium channels . *Toxicon* 38 : 105-111

**Meunier,J.M et Schvaloff, A** (1999) Neurotransmetteurs. *Masson*.

**Mohamed, A.H., Hani-Ayobe, M., Beskharoun, M.A and Damarawy, A** (1972) Glycemic responses to scorpion venom. *Toxicon* 10:139-149

**Mohamed, A.H., Saleh, A.M., Ahmed, S and Beshir, S** (1978) Histopathological effects of *Naja naja* snake venom and a venom gland extract of the scorpion *Buthus quinquestriatus* on the liver, suprarenal gland and pancreas. *Toxicon* 16:253-261.

**Mouhoub,S.**(2007). Etude de la réponse immunitaire chez le modèle expérimental après envenimation avec le venin de scorpion *Androctonus australis hector*. **Thèse de magister**.

**Mousli, M., Devaux, C., Rochat, H., Goyffon, M., Billiald, P.,** 1999. A recombinant single-chain antibody fragment that neutralizes toxin II from the venom of the scorpion *Androctonus australis hector*. *FEBS Lett.* 442:973–980.

**Murthy, K. R. K and Medh, J. D** (1986) Increase in serum free fatty acids, phospholipids and reduction in total cholesterol in acute myocarditis produced by scorpion (*Buthus tamulus*) venom injection in dogs. *Ind Heart J* 38: 369-372.

**Murthy, K. .R. K and Hase, N. K** (1994) Scorpion envenoming and the role of insulin *Toxicon* 32:1041-1044.

**Murthy, K. .R. K and Zare, M.** (2002) Scorpion antivenom reverses metabolic, electrocardiographic and hormonal disturbances caused by the Indian red scorpion *Mesobuthus indicus* envenomation *Journal of Venomous animals and Toxins*

## N

**Nouira, S., Abroug, F., Boudjaria., Ayari, M., Jaafoura, M., Haguiga, H., Farhat, et Bouchoucha, S** (1996) Mécanisme de l'œdème pulmonaire et de la dysfonction cardiaque au cours de l'envenimation scorpionique grave. *Ran. Urg* **5**(1) : 17-24.

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

## O

**O'Garra, A** (1998) Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity* **8**(3): 275-283.

**Osnaya-Romero, N., Medina-Hernandez, J., Flores-Hernandez, S.S and Leon-Rohas, G** (2001) Clinical symptoms observed in children envenomed by scorpion stings at the children hospital from the state of Morelos, Mexico. *Toxicon* **39**:781-785.

## P

**Padilla, A., Govezensky, T., Possani, L and Larralde, C.** (2003) Experimental envenoming of mice with venom from the scorpion *Centruroides limpidus limpidus* : differences in mortality and symptoms with and without antibody therapy relating differences in age, sex and strain of mouse. *Toxicon* **41**:959-965.

**Park, W.Y., Goodman, R.B., Ruzinski, J.T., Radella, F. and 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.

**Pepin-Covata, S., Lutsch, C., Grandgeorge, M., Lang, J and Scherman, J.M** (1996) Immunoreactivity and pharmacokinetics of horse anti scorpion venom F(ab')<sub>2</sub> scorpion venom interactions. *Toxicology and Applied Pharmacology* **141**: 272-277.

**Petricevich Vera 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

**Pipelzadeah, M. H., Dezfulianb, A-R., Jalalic M. T., Mansouria A-K** (2006) *In vitro* and *in vivo* studies on some toxic effects of the venom from *Hemiscorpius lepturus* scorpion *Toxicon* **48**: 93–103

**Possani, L.D., Martin, B.M., Fletcher, M.D and Fletcher, P.L** (1991) Discharge effect on pancreatic exocrine secretion produced by toxins purified from *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Journal of Biological chemistry* **266**:3178-3185.

## R

**Radmanesh, M** (1990) *Androctonus crassicauda* sting and its clinical study in Iran. *J Trop Med Hygien*, **93**: 323-326.

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

**Rochat, H., Rochat, C., Sampieri, F., Miranda, F., Lissistky, S** (1972) The amino-acid sequence of neurotoxin II of *Androctonus australis hector*. *Eur J Biochem.* **28**:381-388.

**Rogers, J.C., Tanada,T.N., Scheur, T. and Caterral, W.A** (1996) Molecular determinants of heigt affinity binding of a scorpion toxin and sea anemone toxin in S3-S4 extracellular loop in domain IV of the Na<sup>+</sup> channel a subunit. *J Biol Chem*, **271**: 15950-15962

## S

**Sami-Merah, S., Hammoudi-Triki, D., Martin\_Euclaire, M.F and Laraba-Djebari, F** (2008) Combination of two antibody fragments F(ab')<sub>2</sub>/Fab: An alternative for scorpion envenoming treatment. *International Immunopharmacology* **8**: 1386-1394.

**Sankaran, H., Meggeny, K.F., Bartholomerv, C and Raghupathy, E** (1987) Mechanism of scorpion toxin induced panceatitis in dogs. *Biochem Arch* **7**: 41-46.

**Santana, G. C., A. Freire, C. T., Ferreira, A. P. L., Chavez-Olortegui, C., Diniz, Z C. R and Freire-Maia, L.** (2003) Pharmacokinetics of *Tityus serrulatus* scorpion venom determined by Enzyme linked Immunosorbant Assay. *Toxicon* **41**:417-427

**Schorderet, M., Acar,J.F., Bertz,A., Calanca,A., Dayer, J.M., Lambert, M., Savoy,J.,Vatier, J and Wolf, J.F** (1992) Pharmacologie des concepts fondamentaux aux application thérapeutiques Ed *Office des Publication Universitaire* pp 136,140, 144.

**Shabazadeh, D., Srairi-abid, Freng, W., Bochani, M., Ronjat,A., Akbari, N., Pestah M. Dewaard and EL Ayab, M** (2007) Hemicalcine, a new toxin from the Iranian scorpion *Hemiscopiopus lepturus* wich is active on ryanodin sensitive ca<sup>++</sup> channels. *Biochem. J.* **404**:89-96.

**Srairi-Abid.N, Kaabi H, Mlayah-Bellalouna S,Mejri T, Sampieri F,2, El Ayeb M** (2008) Immunological characterization of a non-toxic peptide conferring protection against the toxic fraction (AahG50) of the *Androctonus australis hector* venom *Toxicon* **51**:353-362.

**Sofer, S and Gueron, M** (1990) Vasodilators and hypertensive encephalopathy following scorpion envenomation in children. *Chest* **97**:118-120

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

## T

**Tarasiuk, A., Khvatskin S., Sofer, S.** (1998) Effects of antivenom serotherapy on hemodynamic pathophysiology in dogs injected with *Leiurus quinquestriatus* scorpion venom. *Toxicon* **36**: 963-971.

**Taurog, A and Dorris, M.L** (1992) Myeloperoxidase-catalyzed iodination and coupling. *Arch Biochem Biophys*, **296**:239-246.

**Trinchieri, G** (1995) Interleukin 12 a proinflammatory cytokine with immunoregulator functions that bridge innate resistance and antigen specific adaptive immunity. *Ann Rev Immunol* **13**:251-276.

## V

**Vader Maied, P.H., Scellekens, H** (1996) Cytokines and the immune response. *Biotherapy* **8**: 243-249.

**Valvidia, H. H., Kirby, M. S., Lederer, W .J and Corondo R.**(1992) scorpion toxins targeted against the sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  release channel of skeletal and cardiac muscle. *Proc.Natl .Acad .Sci.USA* **89**:12185-12189

**Voronov, E., Apte, R.N and Sofer, S** (1999). The systemic inflammatory response syndrome related to the release of cytokines following severe envenomation. *J. Venom. Anim. Toxins* **5** (1), 19–23.

## W

**Wardlaw, A.J., Dunnette, S., Gleich, G.J., Collins, J.V and Kay, A.B** (1988). Eosinophils and mast cells in bronchoalveolar lavage in subjects with mild asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* **137**:62– 69.

**Warrell, A.D** (1993). Venomous bites and stings in the tropical world. *Med. J. Aust.* **159**, 773–779.

**Watt, D.D and Simard, J.M.** (1984) Neurotoxic proteins in scorpion venom. *J Toxicol Toxin Reviews*; 3:2 & 3, 181-221.

**Weller, P.F and Bublely, G.J** (1994) The idiopathic hypereosinophilic syndrome. *Blood*, 2759-2779.

**Wilson,J.D., Braunwalf,E., Isselbacher,K.J., Petersdorf,R.G., Martin, J.B., Fauci, A.S., Root, R.K** (1992) Principe de medicine interne. *Flammarion*. Pp 1122.

## X

**Xing, Z., Gauldie, J., Cox, G., Baumann, H., Jordana, M., Lei, S.-F., Achong, K.,** (1998). IL-6 is an anti-inflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J. Clin. Invest.* **101**, 311–320.

## Z

**Zlotkin, E., Miranda, F., Kopeyan, C and Lissitzky, S.** (1971) A new toxic protein in venom of the scorpion *Androctonus australis hector*. *Toxicon* **9**: 9-13

**Zlotkin, E., Gurevitz, M., Fowler, E and Adams, M.E** (1993) Depressant insect selective neurotoxins from scorpion venom :Chemistry action and gene cloning. *Arch Insect Biochem Physiol* **22**:55-75.

## Annexe 1

### **Etude histologique :**

L'étude histologique a été réalisée en plusieurs étapes :

#### **Fixation des organes:**

L'intérêt de cette étape est de conserver les structures tissulaires, et garder les cellules aussi proches que possible à l'état vivant.

Les organes poumons et foie sont mis dans le fixateur, formol 4%, pendant 48h.

#### **Déshydratation :**

La déshydratation des pièces se fait par immersion des organes dans des bains d'alcool de degré croissant (70°,90°,100°), elle est suivie par trois bains de xylène (10 à 15 min pour chaque bain).

#### **Imprégnation et confection des blocs de paraffine :**

Les organes sont imprégnés à 64°C dans un bain de paraffine pendant 24h.

Après ils sont mis dans une paraffine contenu dans une moule et une fois la paraffine est durci les blocs sont placés à -20°C.

#### **Réalisation, Déparaffinage et hydratation des coupes :**

Des coupes de 3µm d'épaisseur sont étalées sur des lames en verre puis mises dans l'étuve à 64°C. Après 24h, les lames sont plongées dans le Xylène, puis dans et les bains d'alcool afin de réhydrater les coupes.

#### **Coloration et redéshydratation :**

Les coupes sont colorées par la méthode Hématoxyline-Eosine.

*L'hématoxyline* est un colorant basique, colore toute structure acide en bleu violacé ; les noyaux, les ribosomes et RER ont une forte affinité pour ce colorant.

*L'éosine* colore les structures basiques en rouge ou en rose.

Un lavage à l'eau courante succède chaque étape de coloration et une fois la coloration est achevée les coupes sont redéshydratées par des bains d'alcool de degré croissant 70° à 100°.

#### **Montage des coupes :**

La fixation des lamelles sur les lames est réalisée avec quelques gouttes d'Eukite chauffé.