

N°d'ordre :30/2010-M/SN

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE
LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE
HOUARI BOUMEDIENNE
FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES



MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du Diplôme de MAGISTER

En : Sciences de la Nature

Spécialité : Biochimie Immunologie

Par : BEKKARI NADJIA

Sujet :

Effets du venin d'*Androctonus australis hector* et de ses toxines purifiées

AaHI et AaHII sur le système Immunitaire :

Rôle du complément et des médiateurs inflammatoires

Soutenu publiquement le 06-01-2010 devant le jury composé de :

Mme C.TOUIL-BOUKOFFA.....Professeur, USTHB

Mme F. LARABA-DJEBARI.....Professeur, USTHB

Mme D.HAMMOUDI-TRIKI.....Maitre de conférences, USTHB

Mme Z.Hammouli.....Maitre de conférences, USTHB

Mme OUMEHDI-OUSSEDIK.....Maitre de conférences, USTHB

Mme S.ADI-BESSALEM.....Maitre de conférences, USTHB

Remerciements

Ce travail est réalisé au sein de laboratoire de biologie cellulaire et moléculaire de la faculté des sciences biologique et au laboratoire de recherche et développement sur les venins de l'institut pasteur sous la direction du professeur Laraba-Djebari.F.

La réalisation de ce travail s'est demandé le soutien la compétence de nombreuses personnes ; qui je leur tiens mes remerciements :

Madame le professeur Laraba-Djebari.F., pour la confiance qu'elle m'a accordé en m'accueillant dans son laboratoire pour développer ce travail. Veuillez agréer mes respects et mes vives reconnaissances.

Madame le professeur Touil-Boukoffa C., qui nous a fait l'honneur de juger ce travail et de présider ce jury. Veuillez trouvez ici ma sincère gratitude.

Madame le Docteur Hammoudi-Triki.D., qui nous a fait l'honneur de juger ce travail; Veuillez trouvez ici ma sincère remerciements.

Madame le Docteur Hammouli.Z, qui nous a fait l'honneur de juger ce travail. Veuillez trouvez ici ma vive reconnaissance.

Madame le Docteur Oumehdi-Oussadik.H., qui nous a fait l'honneur de juger ce travail. Veuillez trouvez ici mon sincère gratitude.

Madame le Docteur Adi-Bessalem.S., qui nous a fait l'honneur de juger ce travail. Je vous remercier vivement.

Mes remerciements s'adressent également à :

Professeur Bouhadeh.A., Dr Lammri, Dr Bennour H, Dr Bermila.S, Dr.Meloui, et Dr Djenouhate pour leur soutien.

M^{me} Kriba-Saadeddine O, pour son grand aide et patience, et pour ses orientations.

M^{elle} Amrouche Lynda, pour l'aide et pour les discussions scientifique dans tous les domaines, et qui me dit une microbiologiste de bonne catégorie.

L'ensemble des collègues de la promo de magistère, et des docteurs qui nous a aidé et orienter durant la période de pratique.

J'exprime aussi mes sincère remerciement à Mouffri.H, Bouazziz .S Guestini.F, Saidi.H, Chelghoum.H mes meilleurs amis et accompagnants.

A M^{me} Seffak.S, M^{elle} Timssiline.K, M^{me} Hadoouche N, Karim, Sidi-h'med, Mer Benmoukhtar O, Mer Bouakz.M et toute personne de l'IPA qu'ils ont bien nous aidés.

SOMMAIRE

I-INTRODUCTION.....	1
II-GENERALITES	3
II-1-Les scorpions et leurs venins.....	3
II-2-Relation structure fonction des toxines	7
II-3-Symptomatologie clinique observée dans le cas d'envenimations scorpionique...9	
II-4-Les propriétés pharmacologiques des venins de scorpion, effets sur les organes vitaux de l'organisme.....	10
II-4-1-Pharmacocinétique et bio distribution des venins de scorpion.....	10
II-4-1-Effets sur le système nerveux et endocrinien.....	13
II-4-2- Effets du venin sur le système cardiovasculaire et respiratoire	16
II-4-2-Effets des venins sur les organes et leur métabolisme.....	17
II-4-3-Effets des venins sur le système immunitaire et son rôle dans l'élimination du venin et ses toxines.....	19
II-4-3-1-Libération des médiateurs cellulaires et infiltration leucocytaire suite à une envenimation.....	19
II-4-3-2-Les médiateurs chimiques.....	19
I-4-3-3-Les médiateurs plasmatiques.....	20
II-4-3-3-1-Le Système du complément	20
II-4-3-3-1-1-Les protéines du complément	20
II-4-3-3-1-1-1-La fraction C3.....	20
II-4-3-3-1-1-2-La fraction C5	21
II-4-3-3-1-1-3-Les protéines de la voie classique.....	23
II-4-3-3-1-1-3-1--Complément C1	23
II-4-3-3-1-1-3-2--Complément C2.....	23
II-4-3-3-1-1-3-3-Complément C4.....	23
II-4-3-3-1-1-4-Les protéines de la voie alterne.....	23
II-4-3-3-1-1-4-1-Facteur B (Complément C3 pro activateur).....	23
II-4-3-3-1-1-4-2-Complément Facteur D.....	24
II-4-3-3-1-1-4-3-Propérine.....	24

II-4-3-3-1-1-5-Les protéines de la voie des lectines.....	24
II-4-3-3-1-1-5-1-La MBL	24
II-4-3-3-1-1-5-2-La Ficoline.....	24
II-4-3-3-1-1-5-3-Les MASPs (MASP-1, MASP-2, MASP-3).....	24
II-4-3-3-1-1-5-4- MA-p19.....	24
II-4-3-3-1-1-6-Les protéines de la voie terminale.....	24
II-4-3-3-1-2-Les voies d'activation de système du complément.....	24
1) la voie classique dépendante d'anticorps	24
2) la voie alterne.....	25
3) La voie des lectines (MBL)	25
4) la voie des protéases externes.....	26
5)Les protéines régulatrices du complément.....	26
II-4-3-3-1-3-Les régulateurs	26
II-4-3-3-1-3-1-Les régulateurs solubles.....	26
II-4-3-3-1-3-1-1-C1 inhibiteur	26
II-4-3-3-1-3-1-2-C4b-binding protein.....	26
II-4-3-3-1-3-1-3-Complément Facteur H.....	26
II-4-3-3-1-3-1-4-Complément Facteur I.....	26
II-4-3-3-1-3-1-5-Clustreine.....	26
II-4-3-3-1-3-1-6-Vitronectine.....	28
II-4-3-3-1-3-2-Les régulateurs membranaires.....	28
II-4-3-3-1-3-2-1-Complément récepteur 1(CR1, CD35).....	28
II-4-3-3-1-3-2-2-Membrane cofactor protein (MCP, CD46).....	28
II-4-3-3-1-3-2-3-Decay-accelerating factor (DAF, CD55).....	28
II-4-3-3-1-3-2-4-Protectine CD59.....	28
II-4-3-3-1-4-Rôle du complément.....	28
II-4-3-3-2-Les cytokines.....	32
II-4-3-3-2-1-Cytokines et régulation des réponses immunitaires.....	33
II-5-Traitement de l'envenimation.....	36

II-5-1-Le traitement symptomatique.....	36
II-5-2-Le traitement spécifique	36
II-6- Apports sur l'utilité de venins et des toxines en thérapeutique.....	37
 III-MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	39
III-1-Matériels	39
III-1-1-Matériel biologique.....	39
III-1-1-1-Le venin et les toxines.....	39
III-1-1-2-Les animaux.....	39
III-1-1-3-Le sang de mouton.....	39
III-1-2-Matériel non biologique.....	39
III-2-Méthodes.....	39
III-2-1-L'envenimation des animaux	40
III-2-2-Le traitement antivenimeux	40
III-2-3-Tests de l'activité lytique du complément	40
III-2-3-1 Préparation des Globules Rouges de Mouton (GRM).....	40
III-2-3-2-Sensibilisation des Globules Rouges de Mouton (GRMs)	41
III-2-3-3-Testes hémolytique des échantillons.....	41
III-2-4-D-Dosages des immunoglobulines.....	41
III-2-5-Dosages des cytokines	42
III-2-6-l'analyse histologique des poumons et de foie après envenimation en absence et en présence de prétraitements	42
III-2-6-1-préparation des blocks d'organes.....	42
 IV-RESULTATS ET DISCUSSION	43
IV-1-Analyse du processus inflammatoire induit par le venin d' <i>Androctonus australis</i> <i>hector</i> et de sa fraction F _{Tox} G50 et de ses toxines AaH I et AaH II.....	43
IV-1-1-Dosage de l'activité lytique du complément sérique	43
IV-1-2-D-Dosages des immunoglobulines	45

IV-1-3-Dosage de l'activité lytique du complément dans certains organes	47
IV-2-dosage de certaines cytokines dans le foie en présence d'AaH I et d'AaH II	50
IV-2-Analyse du processus inflammatoire induit par le venin <i>Androctonus australis</i> hector et ses fractions G50 et ses toxines AaH I et AaH II après prétraitement.....	56
IV-2-1-Effets de neurotransmetteurs sur l'activité du complément sérique	56
IV-2-2-Effets de neurotransmetteurs sur l'activité du complément du surnageant pulmonaire.....	56
IV-2-3-Effets de l'aprotinin sur l'activité du complément sérique.....	58
IV-2-4-Effets de l'aprotinin sur l'activité du complément dans les poumons	58
IV-2-3-Effets de neurotransmetteurs et de l'aprotinin sur les modifications histopathologique après envenimation dans les poumons	60
IV-2-4-Effets des neurotransmetteurs et de l'aprotinine sur les modifications histopathologique du parenchyme hépatique après envenimation.....	65
V-DISCUSSIONS	68
VI-CONCLUSION.....	71
VII-REFERENCES.....	72

INTRODUCTION

I-INTRODUCTION

Les scorpions appartenant à la famille des *Buthidae* sont dangereux pour l'homme, leur venins sont très toxiques, lorsqu'ils sont inoculés après une piqûre peuvent entraîner des manifestations et syndrome neuromusculaire, cardiovasculaire et pulmonaire avancés parfois mortels (Coutinho-Netto, 1980 ; Ismail, 1980 ; Almeida, 1982).

La caractérisation des venins de scorpions a montré une diversité de leur composition (enzymes, peptides, nucléotides, lipides, mucoprotéines, amines biogénique et autres substances inconnus) (Zlotkin *et al.*, 1978), leur toxicité est associée à des neurotoxines.

Des études portent sur des dosages de différents marqueurs caractérisant l'état physiopathologique après envenimation des cas cliniques ou expérimentaux montrent l'implication de plusieurs médiateurs (neurotransmetteurs, cytokines, kinines et des médiateurs de l'inflammation). Ce qui suggère l'inter-contrôle entre plusieurs systèmes en particulier le système nerveux, le système endocrinien et le système immunitaire (Nica *et al.*, 1999 ; D'Suze *et al.*, 2003 ; Fukuharaa *et al.*, 2003 ; D'Suze *et al.*, 2004 ; A.Haleem *et al.*, 2006).

L'activation systémique du complément est une réponse physiopathologique commune aux perturbations sévères tel que le choc hémorragique, la septicémie, l'attaque cérébrale. Les produits d'activation du complément participent aux dommages aigus des organes. L'usage des inhibiteurs du complément ou des anticorps anti-complément spécifique protègent les tissus et les organes de leurs effets délétères (Protor *et al.*, 2006 ; Mollnes, 2006 ; Arumugam *et al.*, 2008 ; Engberg *et al.*, 2009)

Certains venins de scorpion tel celui de scorpion *Tityus serrulatus* et sa toxine T_{STX I} activent les protéines du complément, par les deux voies, classique et alterne en deux phases (Bertazzi *et al.*, 2003 ; Bertazzi *et al.*, 2005).

Le dosage sérique de certaines cytokines chez des patients humains envenimés accidentellement par les scorpions montre l'augmentation importante de l'IL1 α , l'IFN γ , l'IL6, IL8, l'IL10, l'IL4 et le GM-CSF ; l'augmentation de ces cytokines continue même après 24h. Les cytokines pro inflammatoires (IL1, IL6, IL8) jouent un rôle important dans la pathogénèse de certain organes causé par les venins (œdème pulmonaire, défaillance cardiaque, agitations psychomoteurs, des lésions tissulaires) en stimulant la libération des facteurs pro inflammatoires tel que les prostaglandines, les leucotriènes, le PAF et la

production des protéines de la phase aigue. Ces facteurs pro inflammatoires stimulent la production massive des radicaux libres (NO, H₂O₂), ces derniers sont très toxiques pour les cellules et sont en générale la cause de lésions tissulaires ; les cytokines anti inflammatoires (IL4,IL10) semblent jouer un rôle dans la régulation de la production de cytokines pro inflammatoires (Boyle et *al* 1998 ; Magalhaes et al., 1999 ; Pericevich, 2002 ; Frkaraka et *al.*, 2003 ; D'Suze et *al.*, 2003 ; A.Raheem et *al.*, 2003 ; D'Suze et *al.*, 2004 ; Pericevich et *al.*, 2006 ; Adi-Bessalem et *al.*, 2008).

Dans le but d'élucider les effets et les modulations de système immunitaire après une envenimation par le venin de scorpion *Androctonus australis hector*, ou par ses toxines, des dosages des taux d'activités de systèmes du complément sérique et dans les organes sont effectuées .Le dosage de certains cytokines dans le foie est effectués en utilisant des kits.

Les effets des antagonistes de récepteurs de neurotransmetteurs (atropine et propranolol) et d'un inhibiteur non spécifique du complément (l'Aprotinine) sur l'inflammation induite par le venin d'Aah sont explorés par des dosages de l'activité du complément et par une étude histologique.

GÉNÉRALITÉS

II-GENERALITES

II-1-Les scorpions et leurs venins

Les scorpions (classe des Arachnide, ordre des *scorpionae*) appartiennent à un groupe d'animaux anciens et biographiquement divers. Leurs venins représentent une source riche de protéines spécifiques ayant des fonctions diverses (Broswell, 2001). Parmi les 1500 espèces de scorpions, 50 sont dangereuses pour l'homme, la plupart de ces scorpions (exception faite des *Hemiscorpius*) appartiennent à la famille des *Buthidae*, dont les plus toxiques sont *Androctonus* (Afrique de Nord, est-sud d'Asie) *Buthus* (la méditerranée) *Centruroides* (West-sud USA , mexico , l'Amérique centrale) *Leiurus* (Afrique de nord, moyen Orient), *mesobuthus* (Asie) *para-Buthus* (Sud d'Afrique) et *Tityus* (sud et centre d'Amérique) (Bosmans, 2007).

Les venins de scorpions sont des mixtures très complexes, d'enzymes, peptides, nucléotides, lipides, mucoprotéines, amines biogéniques, et d'autres substances (Bosmans, 2007).

Les neurotoxines de *Buthidae* de l'ancien et du nouveau monde présentent des séquences en acides aminés, des actions pharmacologiques et des propriétés immunologiques différentes (Broswell, 2001).

Les groupes de composants des venins de scorpions les plus étudiés sont des polypeptides neurotoxiques qui se fixent sur les canaux ioniques et les récepteurs de membranes de cellules excitables. (Karalliedde, 1995; Martin-Eauclaire *et al.*, 1999). La toxicité pour l'homme est principalement attribuée à l'activité de toxines longues constituées de 60 à 70 résidus d'acides aminés réticulés par 3 à 4 ponts disulfures. Ces neurotoxines affectent les canaux sodiques voltage dépendants (Possani, 1999 ; Gurevitz *et al.*, 2001). Ce groupe de neurotoxines se subdivise en deux classes :

- **Les α toxines** se lient au site 3 du canal sodium de manière voltage dépendant et inhibent la phase d'inactivation du potentiel d'action (Figure 1). Ces toxines se subdivisent en trois classes : les α toxines classiques, les α like et les α anti-insectes.

Les toxines α classiques sont très toxiques pour les mammifères (Aah II, Lqq V), elles se lient avec une très grande affinité sur les synaptosomes de cerveaux de rats, (Jover *et al.*, 1978, Legros *et al.*, 2005). Les toxines α like agissent sur les canaux de mammifères et des insectes (BmKM1, Lqh III) (Bosmans, 2005) .Les α toxines anti-insectes sont spécifiquement toxiques pour les insectes (Lqh α IT), (Figure 3).

Le venin de scorpion *Androctonus australis hector* contient plusieurs toxines “Aah I, Aah I’, Aah I’’, AahII, AaH III’ qui sont actives sur les mammifères et la toxine AaH IT qui est active sur les canaux ioniques des insectes (Rochat et *al.*, 1970 ; Bougis 1989, Rappuoli, 1997 ; Faybesse et *al.*, 1999) (figure 2)

La toxine AaH I est une neurotoxine de type α , c’est un peptide basique de 7000 constitué de 63 acides aminés réticulés par quatre ponts disulfures, présentant un $K_{0.5} = 4,5$ nM sur les synaptosomes de rats, sa $DL50_{(iv)}$ est égale à 10 ng/20 g de souris et $DL50_{(sc)} = 0,3$ μ g/20g de souris.

La toxine AaH II est une neurotoxine de type α , c’est un peptide basique de 7 kDal constitué de 64 acides aminés, réticulés par quatre ponts disulfures, présentant un $K_{0.5} = 0,2$ nM sur les synaptosomes de rats, sa $DL50_{(iv)} = 0,5$ ng/20g de souris et $DL50_{(sc)} = 0,2$ μ g/20 g de souris

- **Les β toxines** se lient au site quatre de manière voltage indépendant et modifient le processus d’activation du canal, ces toxines se subdivisent en plusieurs groupes selon la cible biologique (Figure 1) (Cestelle, et *al.*, 2000), Bosmans, 2007). Les toxines β_m agissent sur les mammifères (exemple : Css II, IV et VI), les toxines β_i agissent sur les insectes (exemple : AaH IT, LqqIT2) et les toxines β_{like} agissent sur les mammifères et les insectes (exemple: Ts VII, Lqh β 1), (Figure3).

D’autres classes de toxines de scorpions ont été également étudiées, ces toxines présentent une affinité pour les différents sous-types des canaux K^+ . Ce sont des toxines courtes qui bloquent les canaux potassiques constituées de 30 à 45 résidus d’acides aminés et réticulées par trois à quatre ponts disulfures.

Certains constituants agissant sur les canaux Cl^- et Ca^{2+} ont été aussi décrit dans les venins de scorpions (Laraba-Djebari et *al* 1996 ; Tricaud, 2000 ; Jouirou et *al.*, 2004 ; Oukkache et *al.*, 2008).

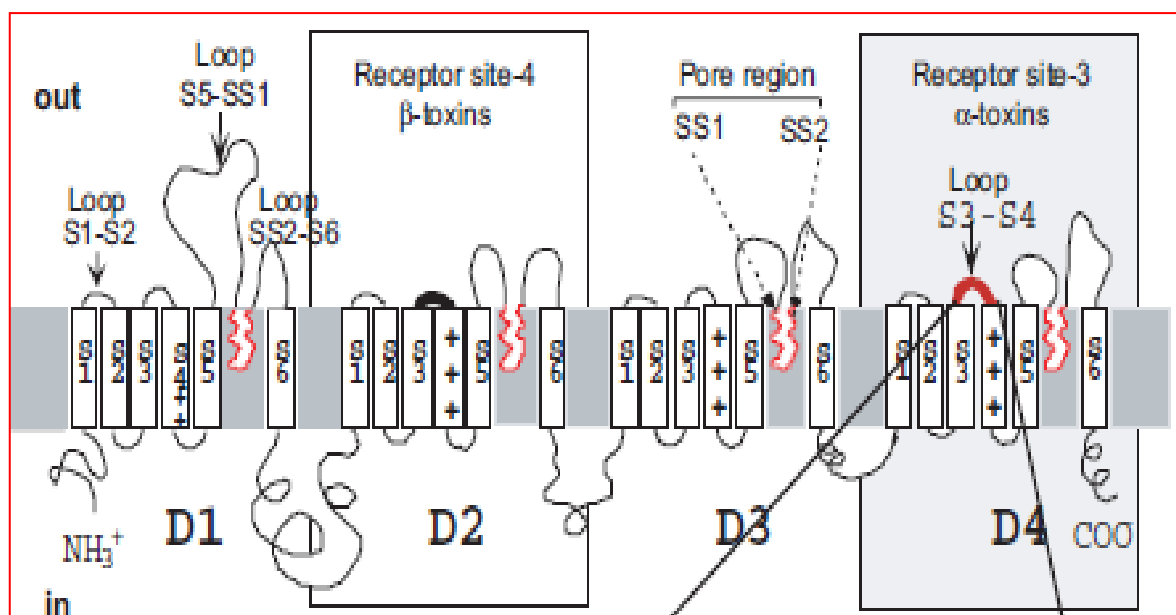


Figure 1: Structure des sites récepteurs et interaction avec les toxines de scorpions (Gordon et *al.*, 2007)

Toxin	Amino acid sequence
AaHII	KRDG YIV YPNN CVY HCVPPCDGLCKKNGGSSGSCSFLVPSGLACWCKDLPDNPVPIKDTSRKCT
AaHII'	KRDG YIV YPNN CVY HCIPPCDGLCKKNGGSSGSCSFLVPSGLACWCKDLPDNPVPIKDTSRKCT
AaHII''	KRDG YIV YPNN CVY HCVPPCDGLCKKNGGSSGSCSFLVPSGLACWCKDLPDNPVPIKDTSRKCTR
AaHIII	VKDGYIVDDVNCYFCGRNAYCNEECTKLKGESGYCQWASPYGNACYCYKLPDHVVRTKGPGRCH
AaHIII	VRDG YIV NSKNCVY HCVPPCDGLCKKNGAKSGSCGFLIPSGGLACWCVALPDNPVPIKDPYSKCHS
AaHIV	GRDG YIV DSKNCVY HCVPPCDGLCKKNGAKSGSCSFLVPSGLACWCNDLPENVPKDPSPDDCHK
AaHSTR1	ARDG YIV HDGTNCKYSCFGSEYKYCGPLCEKKKAKTG YCYLFACWCIEVPDEVVRVWGEDGFMCS
AaHIT	KKNGYAVDSSGKAPECLLSNYCENNQCTKVHYADKGYCCLLSYCFGLNDDKKVLEISDTRKSYCDTHIN
AaHIT1	KKNGYAVDSSGKAPECLLSNYCNEECTKVHYADKGYCCLLSYCFGLNDDKKVLEISDTRKSYCDTHIN
AaHIT2	KKNGYAVDSSGKAPECLLSNYCNEECTKVHYADKGYCCLLSYCFGLNDDKKVLEISDTRKSYCDTHIN
AaHIT3	KKNGYAVDSSGKAPECLLSNYCNEECTKVHYADKGYCCLLSYCFGLNDDKKVLEISDTRKSYCDTHIN
AaHIT4	EHGYLLNKYTQCKVWCVINNEECGYLCNKRGGYYGYCYFWKLACYCQARKSELWNYKTNKCDL
AaHIT5	DGYIKREDGCKVTCLINDNYCDTECKREGGSYGYCYSGFACWCEGLPDDKAWKSETHITCD

Figure 2: Séquences des toxines purifiées à partir du venin d'AaH (Possani 1999)

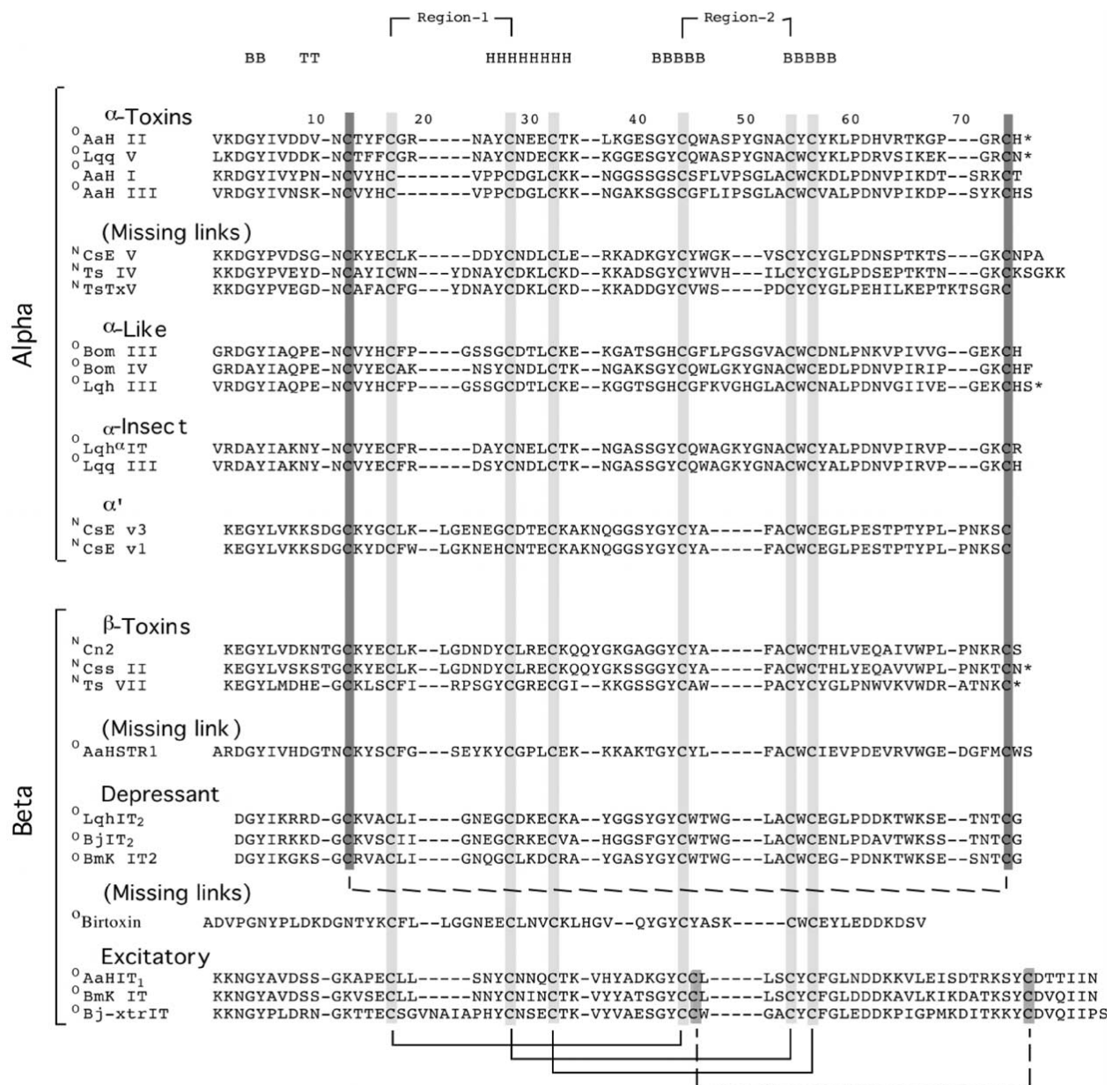


Figure 3 : Alignement de Séquences et structures secondaires de toxines représentatives des différents groupes pharmacologiques et affectant les canaux sodiques (Gordon et *al.*, 1998 ; Froy, 2003)

II-2-Relation structure fonction des toxines

Les molécules biologiquement actives ont une propriété de fonctionner selon leur structures et leur conformation tridimensionnelle. De nombreux travaux ont permis de caractériser la relation de la structure d'une toxine et sa fonction.

L'homologie structurale des α toxines de scorpions telles que Lqh α IT, Lqh3, BmK M1 et AahII a été établie, ces toxines présentent plus de 60% de séquences identiques (Figures 4 et 5). Leur spécificité de fonction semblent être attribuée à des éléments de séquences particulières tels que les résidus " 8-12 ", le fragment C-terminale et les boucles de la structure secondaire (hélice α et deux feuilles β antiparallèle), (Gordon et *al.*, 2007 ; Gazarian et *al.*, 2005 ; Rodriguez de la Vega, 2005).

Les substitutions moléculaires retrouvées sur la séquence de la toxine Lqh α IT (anti-insecte) montrent l'importance des résidus Lys8, Asn9 et Tyr10 dans l'activité de ce dernier (Lqh α IT) (Zilberberg et *al* 1997) ; alors que pour Lqh3 l'His 15 contrôle l'affinité de la toxine pour les canaux ioniques rNav1.4 des muscles squelettiques de rats mais pas pour les insectes.

La toxine AaH II est connue par sa grande affinité pour le site 3 des canaux sodiques neuronaux (rNa_{v1-2}) et musculaires (rNa_{v1-4}) ; son site récepteur consiste en une boucle dans les domaines D1 et D4 du canal. Les charges négatives des résidus (E1613, D1612 et D1428, sur rNa_{v1-2} et rNa_{v1-4}) dans les segments S3 et S4 de D4 semblent être cruciale pour la liaison de la toxine sur le récepteur (Cestelle et Catterall 2000). Les modifications chimiques sur des résidus aromatiques des toxines AaH I, AaH II et AaH III révèlent l'importance dans la formation d'une surface hydrophobique conservée (Kharrat et *al* 1989). Legros et collaborateurs (2005) ont montrés que des substitutions dans la séquence de la toxine AaH II, au niveau de la lysine 58 par une valine, de l'isoleucine par un glutamate montrant l'importance de ce dernier (isoleucine) dans la toxicité ; alors que l'addition d'une glycine en C terminale (G65) ou l'imidation de l'histidine 64 n'influe pas cette toxicité.

A.

	
α - mammal	10 20 30 40 50 60
Lqh2	IKDGYIVDDVNCTYFCGRNAY-CNEECTKLKGESGYCQWASPYGNACYCYKLPDHVRTKGPG-RCH
Aah2	VKDGYIVDDVNCTYFCGRNAY-CNEECTKLKGESGYCQWASPYGNACYCYKLPDHVRTKGPG-RCH
Lqq5	LKDGYIVDDKNCTYFCGRNAY-CNDECKKKGGESGYCQWASPYGNACWCYKLPDRVSIKEKG-RCH
Bot3	VKDGYIVDDRNCTYFCGRNAY-CNEECTKLKGESGYCQWASPYGNACYCYKVPDHVRTKGPG-RCH*
BmK-M8	GRDAYIADSENCTYFCGSNPY-CNDVCTENGAKSGYCQWAGRYGNACYCIDLPASERIKEGG-RCH
Aah3	VRDGYIVNSKNCVYHCVPP---CDGLCKKNGAKSGSCGFLIPSGLACWCVALPDNVPIKDPYSYKCHS
Aah1	KRDGYIVYPNNCVYHCVPP---CDGLCKKNGSSGSCSFLVPSGLACWCCKDLPDNVPIKDTSRKCT
α - insect	
LqhaIT	VRDAYIAKNYNCVYECFRDAY-CNELCTKNGASSGYCQWAGKYGNACWCYALPDNVPIRVPG-KCH
Lqq3	VRDAYIAKNYNCVYECFRDSY-CNDLCTKNGASSGYCQWAGKYGNACWCYALPDNVPIRVPG-KCH
BotIT1	VRDAYIAQNYNCVYFCMKDDY-CNDLCTKNGASSGYCQWAGKYGNACWCYALPDNVPIRIPG-KCHS
BjaIT	GRDAYALDNLNCAYTCGSKSY-CNTECTKNGAVSGYCQWLKGYGNACWCINLPDKVPIRIPG-ACH
α - like	
Lqh3	VRDGYIAQPNVCVYHCFPGSSGCDTLCKEKGTSGHCGFKVGHGLACWCNALPDNVGIIVEGEKCHS*
Bom3	GRDGYIAQPNVCVYHCFPGSSGCDTLCKEKGATSGHCGFLPGSGVACWCDNLPNKVPIVVGGEKCH
Bom4	GRDAYIAQPNVCVYECAKNS-YCNDLCTKNGAKSGYCQWLKGYGNACWCEDLPDNVPIRIPG-KCHF
BmK-M1	VRDAYIAKPHNVCVYECARNE-YCNDLCTKNGAKSGYCQWVGKYGNACWCIELPDNVPIRVPG-KCH
BmK-M2	VRDAYIAKPHNVCVYSCARNE-WCNDLCTKNGAKSGYCQWVGKYGNACWCIELPDNVPIRVPG-KCH
BmK-M4	VRDAYIAKPNVCVYHCAGNE-GCNKLCITDNGAESGYCQWGGRYGNACWCIELPDNVPIRVPG-KCH
BmK-M7	VRDGYIALPHNCAYGCLNNE-YCNLCTKDGAKIGYCNIVGKYGNACWCIELPDNVPIRVPG-RCHPA
Lqh6	VRDGYIAQPNVCVYHCIP-D---CDTLCKDNGGTGGHCGFKLGHGIIACWCNALPDNVGIIVDGVKCHK
Lqh7	VRDGYIAKPNCAHHCFPGSSGCDTLCKENGGTGGHCGFKVGHGTACWCNALPDNVGIIVDGVKCHK

Figure 4: Alignement de séquences des α toxines de scorpions représentées dans les trois groupes pharmacologiques (Gordon et *al.*, 2007, Bosmans 2007)

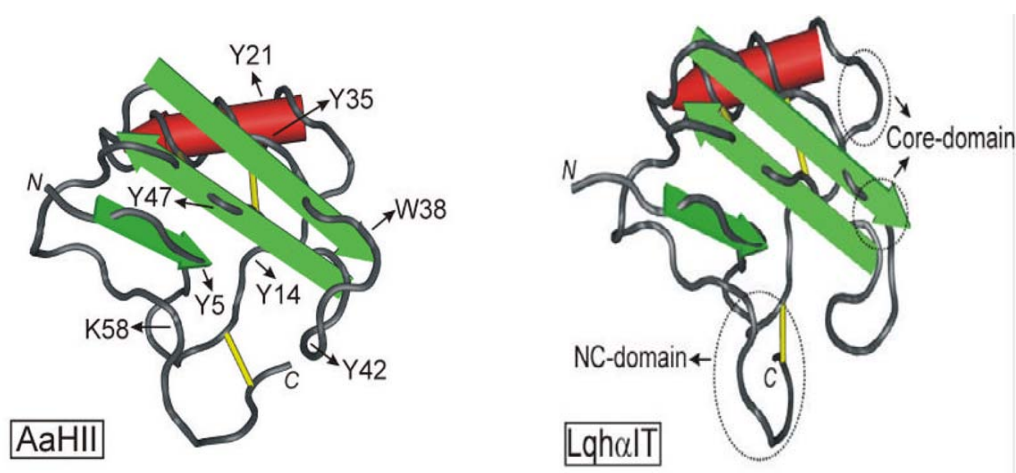


Figure 5: Repliement commun des α toxines de scorpion (Gordon et *al.*, 2007 ; Bosmans, 2007).

II-3-Symptomatologie clinique observée dans le cas d'envenimations scorpioniques

Les symptômes associés à une envenimation par le scorpion se présentent sous forme de douleurs intenses, tachycardie, hypertension, détresse respiratoire, troubles de la vision, broncho constriction, vomissements, hyper salivation, (Tableau 1)

Tableau 1 : Principaux symptômes cliniques et gradation clinique des envenimations scorpioniques au Maghreb (ACIP 1998)

GRADATION	PRINCIPAUX SYMPTOMES
GRADE I	Signes locaux : Douleurs –fourmillement Signes généraux : irritabilité – agitation – obnubilation. Signes locaux : Douleurs –fourmillement Signes généraux : irritabilité – agitation – obnubilation-sueur-rhinorrhée – diarrhée –vomissement /nausées-hyper salivation –ballonnement gastrique –
GRADE II	Extrémités froides –fièvres/frissonnement-Dysrégulation thermique. Signes cardiovasculaires : hypertension-hypotension– tachycardie. Signes respiratoires : cyanose Signes neuromusculaires : priapisme. Signes locaux : Douleur –fourmillements Signes généraux : irritabilité – agitation – obnubilation -sueur-rhinorrhée – diarrhée –vomissement /nausées-hyper salivation –ballonnement gastrique – Extrémités froides –fièvres/frissonnement-Dysrégulation thermique.
GRADE III	Signes cardiovasculaires : hypertension-hypotension– tachycardie –bradycardie –Hypertrophie-Auriculaire –fibrillation auriculaire et ventriculaire – troubles de la conductance. Signes respiratoires : cyanose, polypnée –dyspnée –mousse aux lèvres –râles crépitantes – sécrétions bronchiques – arrêt respiratoire, OAP. Signes neuromusculaires : priapisme – hyperexcitabilité nystagmus –hémiplégie –prostration – convulsion –troubles de la conscience -coma.

II-4-Les propriétés pharmacologiques des venins de scorpion, effets sur les organes vitaux de l'organisme

Des études ont montrées que les propriétés pharmacologiques des venins de scorpion sont dues à la fixation des neurotoxines aux canaux ioniques de cellules excitables (Couraud et *al.*, 1982). Ces propriétés sont influencées par des paramètres tels que l'espèce de scorpion, la nature de la piqure, la quantité de venin inoculé, l'âge et le sexe de la victime.

La quantité de venin et sa voie d'inoculation influent directement sur les paramètres pharmacocinétiques, sur les symptômes, et le traitement antivenimeux à administrer.

L'injection d'une dose de 1 mg/kg de venin *Androctonus amoreuxi* à des rats induit des dysfonctionnements cardiaques alors que la dose de 0,5mg/kg ne modifie pas l'électrocardiogramme de ces derniers (Ismail et Abd-Elsalem, 1988). Des auteurs mentionnent la corrélation entre la sévérité de l'envenimation et la quantité de venin inoculée chez les enfants (Rezende et Chavez-Olortedui, 1996). Des études de pharmacocinétique sur différents venins montrent la sévérité de symptômes selon qu'il s'agit d'une injection intraveineuse, intra-péritonéale ou sous cutané (Walter et *al.*, 1968 ; Revelo et *al.*, 1996 ; Krifi et *al.*, 2001 et 2005 ; Hammoudi-Triki et *al.*, 2004 et 2007).

La comparaison de la pharmacocinétique du venin de scorpion *Tityus serrulatus* sur des rats jeunes et adultes montre la sensibilité des jeunes rats au venin par rapport aux adultes (Numan et *al.*, 2004). La capacité des toxines de venin à franchir même très faiblement la barrière hémato-encéphalique des immatures, ce qui les rend plus sensibles (Ismail, 1994 ; Faybesse et *al.* 2000).

II-4-1-Pharmacocinétique et bio distribution des venins de scorpion

Plusieurs travaux ont été réalisés pour caractériser les paramètres pharmacocinétiques des venins de scorpions, en présence ou en absence d'immunothérapie dans le but d'optimiser les traitements antivenimeux.

La distribution du venin à partir de son site d'administration vers la circulation puis dans les tissus et organes est très rapide, étant donné la petite taille de ses constituants.

D'après Ismail (1980) la demi-vie du venin d'*Androctonus amoreuxi* radio marqué et sa distribution sont respectivement de 5.6min et 6.4heures.

Le venin de *Tityus serrulatus* injecté en sous cutanée atteint des concentrations maximales dès les premières 15 minutes dans les reins et le foie, et à 30 minutes dans les

poumons, le cœur et la rate ; sa diminution a partir de sérum est observée après 2 heures avec une demi-vie d'élimination de 173,25 minutes. Le venin n'était pas détecté dans le cerveau ce qui indique qu'il ne franchi pas la barrière hémato-encéphalique (Revelo et al., 1996; Renzende et al., 1998).

Des résultats obtenus par Devaux et collaborateurs (2004) sur la cinétique de distribution de toxines purifiées du venin d'AaH (AaH I, II et III) corroborent avec les résultats rapportés par Revelo et al., 1996, qui démontrent que la distribution rapide s'effectue dans les reins, le cœur, et les poumons. Les courbes de la cinétique de distribution sérique des différents venins (*Buthus occitanus tunetanus*, *Androctonus australis hector*, *Androctonus australis garzonii*), injectés par voie intraveineuse ou sous cutanée montrent des phases de distribution pour chaque voie d'administration (Figures 6, 7 et 8) (Hammoudi-Triki et al., 2004 et Hammoudi-Triki et al., 2007 ; Krifi et al., 2001 ; Krifi et al., 2005). Des travaux réalisés par notre équipe, montrent que La fraction FG50 du venin AaH injectée suit également une cinétique très rapide avec une demi-vie d'élimination de 13 min par voie intraveineuse et de 35 à 53 min par voie sous cutanée (Hammoudi-Triki et al., 2007) Une absorption et une distribution rapides qui dépend de la voie d'administration ont été rapportées pour les venins du *Buthus occitanus mardochei* et *Centruroides limpidus limpidus* mais pas pour le venin de *Buthus occitanus tunetanus* (Pépin-Covatta et al., 1996 ; Calderon-Aranda et al., 1999 ; Krifi et al., 2001).

Tableau 2: Quelques paramètres pharmacocinétiques de certains venins, déterminés par RIA.

	Bot_{iv}	Bot_{sc}	AaH_{iv}	AaH_{sc}	Ts_{sc}	CLL	Aag
t _{1/2} α (min)	6±2	16±4	-	-	31.5	0.14±0.4h	5±1
t _{1/2} β (min)	26±3	-	13±2	53±2	173.25	1.9±0.2h	40±5
t _{1/2} γ (min)	135±	112±16	-	-	45.47	-	154±52
Vdss ml/kg)	660 ±120	80 ± 100	61±22	2300±530	2380.95	0.5±25 ml/kg	168±3
VB (ml/kg)	1000±200	760 ± 140	-	-	6800.47		-
AUC (mg/min/ml)	13000±80 0	12000 ±600	610±100	2900±320 ng/min/ml		100±14 ng/h/ml	15820±70 ng
CIT (ml/kg/h)	520 ± 60	90 ±22	-	-	1.587	0.4±0.1	2.4±0.1ml/ kg/min
MRT(min)	110 ± 20	470 ± 45	18±2	110±15	-		71±2
référence	.Krifi et al., 2001	.Krifi et al., 2001	Hammou di-Triki et al., 2007	Hammou di-Triki et al., 2007	Rezende et al., 1998	Aranda et al., 1999	Krifi et al., 2005

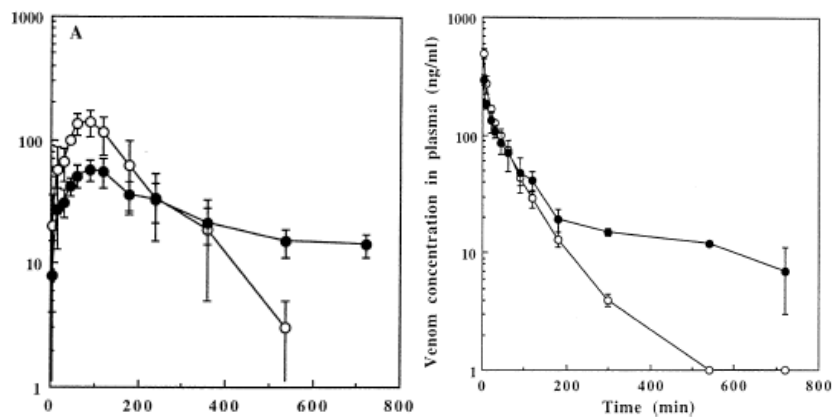


Figure 6: Pharmacocinétique de la fraction Aag FG50 après injection sous cutané (B) intraveineuse (KRIFI *et al.*, 2005)

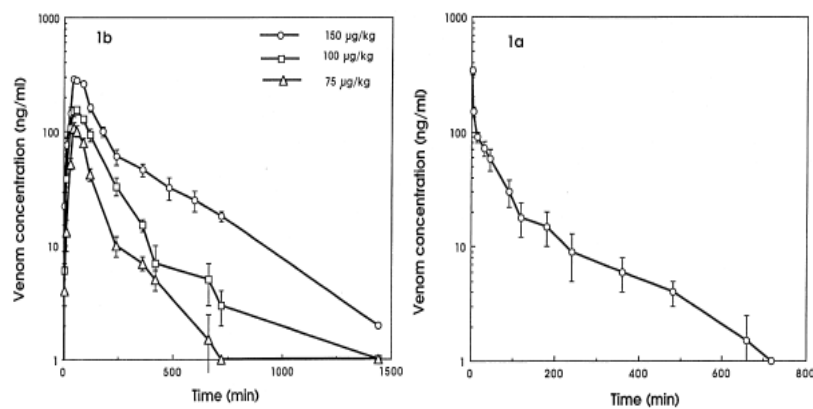


Figure 7 : Pharmacocinétique de venin Bot après injection (A) sous cutané (B) intraveineuse. (KRIFI *et al.*, 2001)

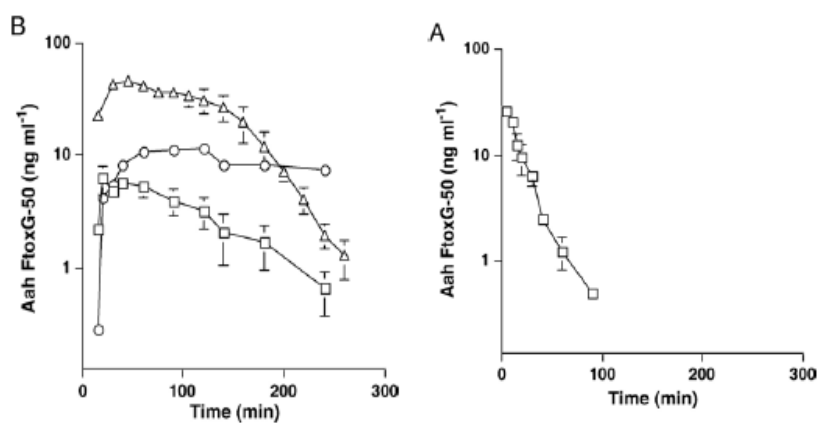


Figure 8 : Pharmacocinétique de la fraction Aag FtoxG50 de venin AaH [A sous cutané B intraveineuse] (Hammoudi-Triki *et al.*, 2007)

II-4-1-Effets sur le système nerveux et endocrinien

Les dysfonctions du système nerveux périphérique et/ou du système nerveux central, ainsi que le système nerveux autonome sont responsables de la morbidité et de la mortalité suite à une envenimation scorpionique sévère (Ismail, 1995 ; Clot-Faybesse et al., 2001). La libération massive des catécholamines après une envenimation, serait impliquée dans les altérations enzymatiques, histopathologique mais aussi dans l'augmentation initiale de la force vasculaire et par conséquent les défaillances hémodynamique (Gueron et al., 1980)(figure 9)

Dans les cas sévères d'envenimations, en plus des altérations tissulaires au système nerveux central avec des attaques cérébrales, une hémorragie diffuse, une infraction cérébrale et une thrombose cérébrovasculaire ont été observés (Ismail, 1995).

Une augmentation sérique très rapide, en catécholamines (épinephrines et norépinephrines), en substance P, neuropeptide Y et facteur natriurétique est observé 5 minutes après envenimation avec le venin d'*Androctonus australis hector* (Nouira et al., 2005 ; Vasconcelos et al., 2005). Ces augmentations affectent l'équilibre hémodynamique (MAP "mean arterial pressure" PAOP "Pulmonary artery occluded pressure" (Mazzei de Davila et al., 2002 ; Nouira et al., 2005). Ces perturbations hémodynamiques sont aussi observées sous l'action des venins *Leiurus quinquestriatus* et *Tityus serrulatus* (Gueron et al., 1980; Vasconcelos et al., 2005). Une toxine de venin de *Tityus serrulatus* (6.9PM, pHi8.25 et DL_{iv}50 :18µg/kg) Injectée sous le cortex sensori-moteur provoque une libération d'acides aminés de leurs dérivés (Glutamate, Aspartate et GABA) à partir de cortex sensoriel-moteur. Cette effet est bloqué par la tetrodotoxine qui intervient de manière très sélective sur le pore des canaux sodium voltage-dépendants, empêchant ainsi le passage de l'influx nerveux, (Coutinho-Netto et al., 1980) Les modifications de l'équilibre électrolytique est l'une des conséquences de la fixation des toxines sur les canaux ioniques, ces troubles ioniques provoqueraient le blocage ou la libération d'autres neurotransmetteurs; l'activation des phospholipases et donc la libération des métabolites de phospholipides membranaires (Corréa et al., 1997 ; Cecchini et al., 2006). Ce déséquilibre ionique pourrait être à l'origine de l'hyperthermie (Osman et al., 1973 ; Ismail, 1995).

Ismail (1995) rapporte que les changements de l'équilibre des électrolytes contribuent aux effets cardiaques provoqués par le venin de scorpion, il associe les complications cliniques à la perturbation du transport des ions Na⁺, Ca²⁺, K⁺ et Mg²⁺.

Tableau 3 : Effets de l'influx nerveux sur les organes (Bases pharmacologique Goodman 2000)

	Influx adrénérique		Influx cholinergique
Cœur			
Nœud SA	β_1, β_2	Augmentation de la fréquence cardiaque.	diminution de la fréquence cardiaque ; arrêt vagal+++
Oreillettes	β_1, β_2	Augmentation de la contractilité et de la vitesse de conduction ++	Diminution de la contractilité et raccourcissement de la durée du PA++.
Nœud AV	β_1, β_2	Augmentation de l'automatisme et de la vitesse de conduction++	Diminution de la vitesse de conduction ; bloc AV++
Système de His-Purkinje	β_1, β_2	Augmentation de l'automatisme et de la vitesse de conduction+++	Peu d'effet
Ventricules	β_1, β_2	Augmentation de la contractilité l'automatisme et de la vitesse de conduction et de la fréquence des pacemakers idioventriculaire+++	Légère baisse de la contractilité
Veines (systémiques)	$\alpha_1, \alpha_2, \beta_2$	Constriction++ ; dilatation++	-
Poumons			
Trachée et muscle bronchique	β_2	Relaxation+	Contraction++
Glandes bronchiques	α_1, β_2	Diminution de la sécrétion ; augmentation de la sécrétion	Stimulation+++
Rein (sécrétion de rénine)	α_1, β_1	Diminution+ ; augmentation++	
Foie	α_1, β_2	Glycogénolyse et gluconéogenèse+++	-
Pancréas			
Acini	α	Diminution de la sécrétion+	Sécrétion++
Ilots (cellules B)	α_2, β_2	Diminution de la sécrétion+++ augmentation de la sécrétion+	- -
Glande salivaires	α_1, β	Sécrétion de K^+ et d'eau Sécrétion d'amylase	Sécrétion de K^+ et d'eau+++
Capsule splénique	α_1, β_2	Contraction+++ ; relaxation+	-
Médulesurrénale		-	Sécrétion d'adrénaline et de la noradrénaline (principalement nicotinique et secondairement muscarinique)
Utérus	α_1, β_2	Grossesse : contraction (α_1) ; relaxation (β_2) ; en absence de grossesse relaxation (β_2)	variable
antagonistes	α_1 : Prazosine, α_2 : Yohimbine, β_1 : Métoprolol , CGP 207 12A β_2 : ICI118551, β_3 : CGP 207 12A , ICI118551		Récepteurs nicotinique : musculaire : Tubocurarine, Elapide Neuronal : Triméthaphan Récepteurs muscarinique : M1 : Atropine , pirenzépine M2 : AF-DX116' M3:Hexahydrosiladifénidol M4 : Himbacine

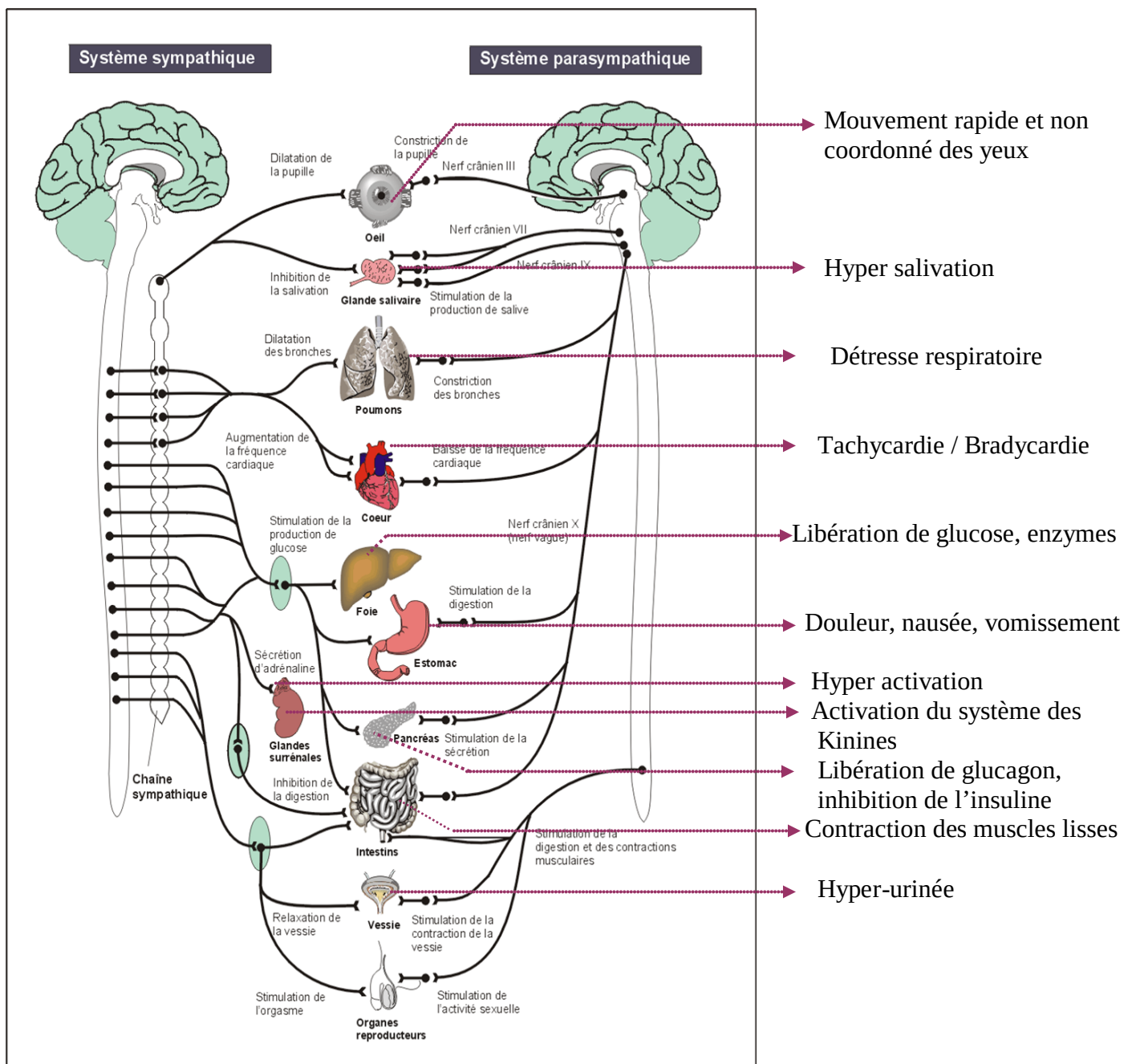


Figure 9: Effets de venin de scorpion sur le fonctionnement physiologique des organes (Ismail *et al.*, 1980 ; Ismail, 1995 ; D'Suze *et al.*, 1999 ; Clot-Faybessse *et al.*, 2000 ; Teixeira *et al.*, 2001 ; Vasconcelos *et al.*, 2004 ; Teixeira *et al.*, 2006)

Les réponses motrices et inhibitrices induites par le venin du *Tityus serrulatus* sur le muscle anococcygeus et le corpus carvenosum isolés sont contrôlés par la libération de la noradrénaline et du NO (Teixeira et al., 2001 ; Teixeira et al., 2003).

Des antagonistes de canaux ioniques tels que la lignocaine et l'atropine atténuent les effets provoqués par les venins de scorpion (en réduisant la majorité des symptômes provoqués par le venin de *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus* (Fatani et Rowan, 2000 ;). Perez-Torres, 2001).

II-4-2- Effets du venin sur le système cardiovasculaire et respiratoire

Les venins de scorpions et leurs toxines purifiées induisent des arythmies cardiaques complexes chez l'homme et plusieurs espèces animales.

L'injection du venin de scorpion *Buthus occitanus* à des lapins provoque une bradycardie initiale courte suivie par une tachycardie et une bradycardie prolongée. La première bradycardie est due aux effets cholinergiques du venin, la deuxième semble être due au changement des concentrations ioniques du sang. La tachycardie est due à la stimulation sympathique et à la libération des catécholamines tissulaires (Ismail et al., 1980 ; Gueron et al., 1980 ; Ismail, 1995 ; Corrêa et al., 1997).

Les effets sur des cœurs isolés induits par les venins des scorpions *Tityus serrulatus*, *Buthus occitanus*, et *Leiurus quinquestriatus*, sont initiés par une bradycardie suivie par un inotropisme positif et chronotropisme. Ces mêmes effets sont observés avec la tityustoxine. Ils sont bloqués par l'atropine ou le propranolol (Almeida et al., 1982). Teixeira et al., (2001) montrent que cet inotropisme résulte d'un effet direct du venin sur le cardiomyocyte et non pas par les neurotransmetteurs.

Des nécroses et myocytolyse au niveau du cœur, du poumon et du rein ont été observées lors d'envenimations par *Leiurus quinquestriatus*. Ce venin provoque l'augmentation des niveaux sériques de la LDH et de la CK-MB. Des résultats similaires ont été obtenus pour le venin d'*Androctonus australis hector* (figure 10) et *Tityus serrulatus*. (Amaral et al., 1991 Ismail, 1995, Adi-.Bessalem et al., 2008).

L'IL8 et la troponine I (cTnI) sont considérés comme étant des facteurs pathogéniques pour les lésions myocardiques (Meki et al., 2003). L'hormone cardiaque « *atrial natrium peptid* » (ANP), affecte l'homéostasie par vasodilatation. Cette hormone est libérée suite à une stimulation des nerfs cardiaques sympathiques après activation des canaux sodiques par le venin d'*Androctonus australis garzonii*. Cette libération est

considérablement diminuée après administration du propranolol ou de la tetrodotoxine (Soualmia, 2008)

L'œdème pulmonaire est un des principaux problèmes de ce type d'envenimation, des études clinique et expérimentale sur les venins de *Tityus serrulatus* (figure 11), *Androctonus australis hector*, et *Leiurus quinquestriatus*, suggèrent que les facteurs cardiogéniques (défaillance aigue du ventricule gauche) et non cardiogénique (augmentation de la perméabilité vasculaire des poumons produite par la libération des substances vasoactives tel que les leucotriènes, le PAF, et les prostaglandine) sont impliqués dans la pathogénèse de cet œdème (Santos et al 1992, Deshpande et al., 1999, Ismail, 1995, Adi-.Bessalem et al., 2008).

L'augmentation des taux de cytokines observées durant l'œdème pulmonaire après envenimation avec le venin de *Tityus serrulatus* serait responsable de l'exacerbation et de la persistance de l'inflammation dans cet organe. Des travaux récents ont montré les effets de l'injection intramusculaire du venin de *Tityus serrulatus* sur les mécanismes et l'inflammation dans les poumons montrant ainsi augmentation de l'élasticité pulmonaire, de la densité leucocytaire et la diminution de la pression résistive (Andrade et al.,s 2007 ; Peres et al., 2009).

II-4-2-Effets des venins sur les organes et leur métabolisme

Le foie, centre de métabolisme dans l'organisme, et le cite des contrôle de nombreuse fonctions, et est le premier indicateur de toutes pathologies.

Les perturbations de ses fonctions et son stress après une envenimation sont largement attribués et démontrés par des augmentations très importantes de tous les marqueurs de sa pathogénèse telle que la glycémie, la créatinine, ASAT, ALAT, CK, LDH, ces élévations sont associées à la cytolysé des hépatocytes et au déséquilibre hormonal tel l'hypo insuliniémie. (Gueron et al., 1991 ; Sofer et al., 1991 ; Amaral et al., 1991 ; Mohamed et al., 1992 ; Corrêa et al., 1997 ; D'Suze et al., 2003).

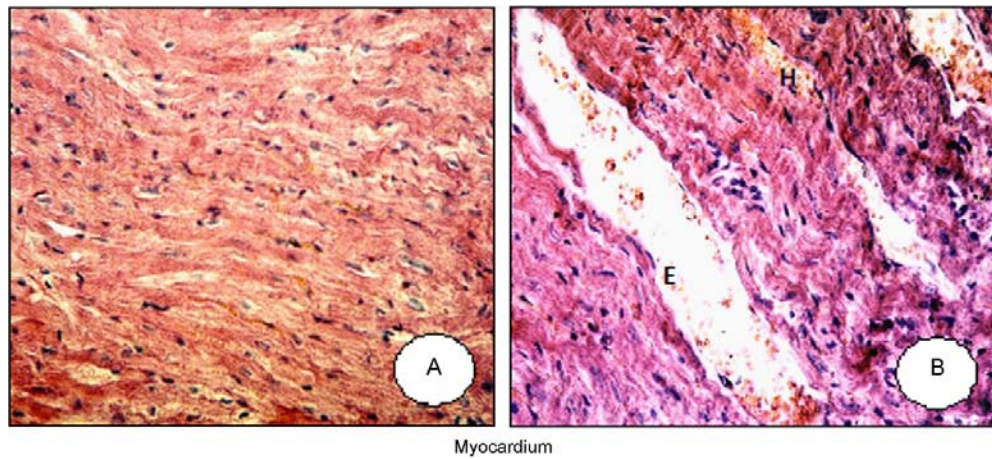


Figure 10 : Altérations histopathologiques du myocarde induites par le venin d'AaH (Adi-Bessalem et al., 2008).

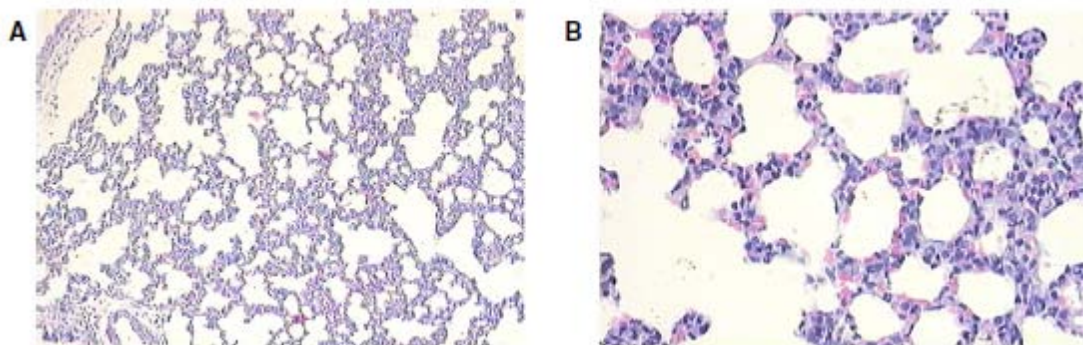


Figure 11 : Oedème pulmonaire induit par le venin de *Tityus serrulatus* (A.contrôle- B. envenimé) (Andrade et al., 2007).

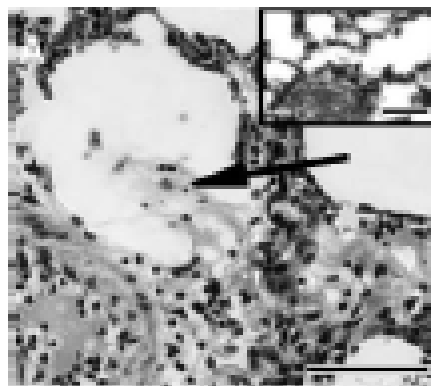


Figure12: Dépôt de la fibrine au niveau des alvéoles après envenimation par le venin de *Tityus discrepans* (D'Suze et al., 2004)

Les travaux de Fukuhara et *collaborateurs* en 2004 suggèrent la corrélation entre la concentration de venin *Tityus serrulatus* et le kininogène de faible poids moléculaire et associent la participation de système de kinines dans la pathogénèse de l'envenimation. Le rôle des récepteurs de tachykinine NK1 dans la médiation de lésion pulmonaire est démontré par Matos et *al.*, 1999.

II-4-3-Effets des venins sur le système immunitaire et son rôle dans l'élimination du venin et ses toxines :

Plusieurs médiateurs inflammatoires participent dans la réponse immunitaire induite par le venin de scorpion, dont le but est le maintien de l'homéostasie de l'organisme et l'élimination de l'antigène. Le système immunitaire répond aux constituants du venin en tant qu'antigènes et en s'adaptant aux perturbations physiopathologiques de tous les systèmes (nerveux, cardiovasculaire, respiratoire et endocrinien) induites par le venin.

II-4-3-1-Libération des médiateurs cellulaires et infiltration leucocytaire suite à une envenimation:

La distribution des toxines de faible masse moléculaire dans les organes est rapide. Cette présence dans les organes attire les leucocytes dans les tissus. Des coupes histologiques des différents organes d'animaux envenimés avec des doses sub-létales montrent l'infiltration des leucocytes dans ces organes.

Le venin de scorpion *Tityus serrulatus* produit un syndrome inflammatoire sévère, les coupes histologiques du poumon, de la peau, du pancréas, du foie, de l'intestin grêle montrent une infiltration par les macrophages et les neutrophiles (D'Suze et *al.*, 2004)

II-4-3-2-Les médiateurs chimiques

Lors de l'envenimation par le scorpion, une libération importante de médiateurs inflammatoires, tel que les prostaglandines et les leucotriènes, les cytokines, N le complément (Gueron 1992a ; Ismail et *al.*, 1992) ; ces médiateurs semble être des facteurs favorisant la sévérité de syndrome de l'envenimation.

Nascimento et *al.*, associent l'augmentation de ces médiateurs (PGs et LT, histamines) aux douleurs intenses observés après envenimation par *Tityus serrulatus*. Le PAF libéré après cette envenimation contrôle à son tour l'infiltration des PMN dans les poumons et active les récepteurs de CXC chemokines (Coelho et *al.*, 2007).

Une corrélation entre la pression sanguine, le taux élevé de l'IL8 et TNF α et de NO peut expliquer la vasodilatation et l'hypotension terminale après injection de venin de *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus* (Abdoon et Fatani, 2009)

I-4-3-3-Les médiateurs plasmatiques

II-4-3-3-1-Le Système du complément

Le Système du complément est le système de la défense antimicrobienne majeur dans le corps humain, durant l'inflammation, ses produits d'activation attirent les leucocytes et les activent en stimulant de produire et de libérer d'autres médiateurs inflammatoires (Meri et Jarva 2001 ; Rautemaa 2001 ; Wagner 2006 ; Walport 2001). Bertazzi (2003) a montré la consommation rapide du complément après des envenimations par le venin de scorpion *Tityus serrulatus*, in vivo et in vitro (2005).

II-4-3-3-1-1-Les protéines du complément

Il est connu actuellement que le complément est un système de plus de 30 protéines dans le plasma sanguin et les surfaces cellulaires, fonctionnent comme des enzymes, inhibiteurs d'enzymes ou des cofacteurs d'enzymes (Barnum, 1995). La quantité de protéines du complément dans le plasma humain est plus de 3g/l et constitue approximativement 15% de la fraction de globuline (WALPORT, 2001), sa synthèse constitutive est essentiellement hépatique, et est faiblement assurée par les macrophages, fibroblastes, les cellules épithéliales, endothéliales et adipocytes (tableau 4) ; Barnum, 1995 montre sa synthèse dans le système nerveux centrale par les astrocytes et les cellules gliales et démontre son rôle dans des pathologies de système nerveux. La demi-vie de C3, C4, B est de l'ordre de 24heurs, le complément a une synthèse rapide qui reflète une consommation permanente.

II-4-3-3-1-1-1-La fraction C3

Le C3 est le constituant majeur du système du complément (0,9 à 1,8g/l), C'est une β globuline formée de deux chaînes α (100 kDa) et β (75 kDa). Elle est exprimée par le gène 19p3. Son clivage par le C3 convertase (C4b2a de la voie classique et C3bBb de la alterne) libère deux fragments (figure13):

- C3a (anaphylatoxine de 10 kDa) qui sert à la médiation de la migration des éosinophiles et mastocytes et leur dé-granulation sans les neutrophiles (Pamela et al., 1996). Il présente des actions biologiques moins importantes que celle du C5a (Arumugan et al., 2008). Il provoque la libération de l'histamine, l'augmentation de

la perméabilité vasculaire , la vasodilatation et une contraction des muscles lisses. Le C3a est rapidement désactivée dans la circulation par l'action des l'endopeptidases.

- Le C3b active à son tour la voie lytique commune terminale de C5, 9 et sert via ses fragments de dégradation (C3bi, C3c, C3dg) à l'opsonisation des antigènes.

Le C3a jouerait un rôle majeur dans la broncho constriction et favorise la voie Th2 dans les poumons (Hawlish *et al.*, 2004). Les anaphylatoxines (C3a, C5a et C4a) participent dans la modulation et la polarisation des voies Th1/Th2 et régulent les mécanismes effecteurs allergiques (contraction des muscles lisses, l'inflammation des branches et la sécrétion du mucus) dans les poumons.

II-4-3-3-1-1-2-La fraction C5

Il s'agit d'une glycoprotéine de 200 kDa, exprimée par le gène 9q3, sa teneur est de 90 à 172 mg/l chez l'homme et de 100 à 169 mg/l chez a femme. Son activation par la C5 convertase (C4b2a de la voie classique et C3bBb de la voie alterne) libère deux fragments :

- Le composant C5b, premier maillon de l'étape finale de la formation du complexe d'attaque membranaire.
- Le composant Ca5 (anaphylatoxine de 9 kDa) à travers son récepteur (de la famille 7TMS couplé à une protéine (Gai) sur les PMN(figure 14), les macrophages et les monocytes, il augmente leur adhésivité (par augmentation de l'expression de P-selectines et β_2 integrine). Il stimule le métabolisme arachidonique (thromboxane A2, leucotriènes) et le métabolisme oxydatif et par conséquent la production des espèces oxygénée (ROS) dans les neutrophiles, la sécrétion des enzymes lysosomes dans les macrophages et la sécrétion des cytokines pro inflammatoires (TNF α , IL1, l'IL6 et l'IL8) de monocytes et de macrophages. (Walport-2001 ; Gangloff, 2003 ; Arumugan *et al.*, 2004b ; Hawlish *et al.*, 2004 ; Hawlish, 2006 ; Wagner – 2006 ; Arumugan *et al.*,2008).

Tableau 4: sites tissulaires de synthèse du complément (BARNUM, 1995)

Types cellulaires	Composants du complément
Hépatocytes	C1-C9, Facteurs B, H et I, C1-INH, C4BP, DAF, MCP, CD59, C5aR
Monocytes/macrophages	C1-C5, Facteurs B, H et I, DAF, MCP, CD59, C5aR, CR1, CR3, CR4, C3aR
Fibroblaste	C1-C3, Facteurs B et H, C1-INH, DAF, MCP, CD59
Cellule endothéliale/épithéliale	C1-C3, Facteurs B et H, C5aR, DAF, MCP, CD59
Cellules B	CR1, CR2, DAF, MCP, CD59
Cellules T	CR1, CR2, DAF, MCP, CD59, C3
Neutrophiles	CR1, CR3, CR4, DAF, MCP, CD59, C3, C5aR
Erythrocytes	CR1, DAF, CD59
Testicule et vésicule séminale	DAF, MCP, CD59(SP-40,40)
Oocyte	CR1, CR3, MCP, CD59
Adipocytes	C3, Facteurs B et D
Mastocytes	CR5aR, C3aR ?
Basophiles	C5aR
Plaquettes	DAF, CD59, C3aR
Muscles lisses	C5aR
Astrocytes	C1, 2, 3,4, 5, 6, 7,8 et 9, les facteurs B, D, H, I, C1INH, DAF, MCP, CD59, clusterin, CR2, C3aR, C5aR.
Cellule micro glial	C1, C3, CR1, CR3, CR4, C5aR, clusterin,

II-4-3-3-1-1-3-Les protéines de la voie classique

Elles sont désignées par C1 jusqu'à C9 ; les fragments de clivage sont désignés par des lettres minuscules (exemple C3a –C3b.....). Les fragments inactivés après clivage sont nommés C3bi-iC3b.... Il s'agit de bêta globuline, constituée d'une ou de deux chaînes polypeptidiques reliées par un pont disulfure exempt du composant C4 (3 chaînes) et le C1 avec une structure unique.

II-4-3-3-1-1-3-1-Complément C1 : est constitué de 3 chaînes polypeptidiques C1q ; C1r ; C1s (figure 15). C1INH, il inhibe spécifiquement C1r et C1s et intervient au cours de la régulation de C1 (Lambris et Morikis 2005)

- **C1q** : est l'unité de reconnaissance du C1, de 410 kDa exprimée par le gène 1p1, elle présente une structure particulière formée par l'assemblage de six fois trois chaînes différentes (A, B et C). Le fragment N terminale présente une homologie avec le collagène, il est impliqué dans la liaison au dimère C1r-C1s, alors que la partie C terminale globulinique intervient dans la liaison avec le fragment Fc ($\gamma 1$, $\gamma 3$ et μ) des immunoglobulines IgG et IgM, le C1q avec une concentration sérique de 75 mg/l.
- **C1r et C1s** : deux chaînes homologues, ce sont des protéases à sérine de 85 kDa, exprimée par le gène 12p1 présentant une concentration sérique de 50 mg/l.

II-4-3-3-1-1-3-2-Complément C2 : c'est une protéine de 115 kDa codée par un seul locus situé au niveau du bras court du chromosome 6 du gène 6p23.1. Il entre dans la constitution de la C3/C5 convertase de la voie classique, son taux usuel est de 14 à 25 mg/l.

II-4-3-3-1-1-3-3-Complément C4 : c'est une protéine de 200 kDa codée par un locus situé au niveau du bras court du chromosome 6, du gène 6p23.1. Il entre dans la constitution de la C3/C5 convertase de la voie classique, son taux usuel est de 0,1 à 0,4 g/l.

II-4-3-3-1-1-4-Les protéines de la voie alterne

Les protéines de la voie alterne sont des bêta globulines de poids moléculaire 100-200KDa sauf le facteur D est de 25 KDa. Ce sont des facteurs suivis par une lettre exemple le facteur B ; la properdine P, le facteur D. Il existe deux protéines inhibitrices pour cette voie le B - 1 H et C3inh.

II-4-3-3-1-1-4-1-Facteur B (Complément C3 pro activateur) : c'est une protéine de 95 kDa codée par un locus situé au niveau du bras court du chromosome 6, le gène 6p23.1, son taux usuel est de 0,19 à 0,3 g/l.

II-4-3-3-1-1-4-2-Complément Facteur D : c'est une glycoprotéine de 24 kDa, son gène porté sur le chromosome 1, son taux sérique usuel est de 1 mg/l (Attwood et Cammack 2006)

II-4-3-3-1-1-4-3-Propérine : est une glycoprotéine de 220 kDa sérique qui stabilise le complexe C3bBb de la voie alterne (Goundis et Reid 1988), avec une dose de 5 mg/l, il

existe sous un mélange de polymères cycliques, dimères, trimères et tétramères (Pangburn 1989, Nolan et *al.*, 1992).

II-4-3-3-1-1-5-Les protéines de la voie des lectines : sont essentiellement des homologues des composants de la voie classique. Cette voie est initiée par la liaison de la lectine MBL aux carbohydrates (Pathak, Palan, 2005 ; Lambris, Morikis – 2005).

II-4-3-3-1-1-5-1-La MBL (*mannan-binding-lectin*) : est une glycoprotéine sérique de type collectine, multimérique (3 sous unités de 25 kDa) de 228 résidus d'acides aminés, elle est composée de fuseaux de collagène semblables à ceux de C1q et de domaines lectine, son gène est porté sur le chromosome 10 de l'homme (figure16). Sa dose usuelle dans le sérum humain est de 5µg/ml (Attwood et Cammack, 2006).

II-4-3-3-1-1-5-2-La Ficoline : est une lectine qui contient une structure collagène –like, mais elle reconnaît les carbohydrates de type N-acétyl-glucosamine via une structure fibrinogène-like, le complexe Ficoline –MASPs peut aussi activer la voie MBL. (Pathak et Palan, 2005)

II-4-3-3-1-1-5-3-Les MASPs (MASP-1, MASP-2, MASP-3) : sont des serines protéases de 100 kDa, présentant une homologie de 40% avec C1r et C1s. la dose sérique de chaque MASP est de 5 µg/ml (Pathak et Palan, 2005 ; Krishan et *al.*, 2002 ; Presais, Kojima et Sim 2003).

II-4-3-3-1-1-5-4-MA-p19 (*small MBL associated protein*) : est une protéine non protéase, associe à la voie des MBL, son rôle reste à élucider (Pathak et Palan, 2005).

II-4-3-3-1-1-6-Les protéines de la voie terminale

Les composantes C6, C7, C9 sont des mono chaines de PM respectives de 128, 100 et 70 kDa, et des doses entre 43 et 60 µg/ml, alors que le C8 est un ~~tripeptide~~ ^{pentapeptide} de 151 kDa (Cammack, et Kojima 1998).

II-4-3-3-1-2-Les voies d'activation de système du complément

Le complément peut être activé par une des quatre voies (Wagner, 2006 ; Rautemaa, 2001 ; Walport-2001 ; Sim et Tsiftoglou 2004 ; Arumugan et *al* 2004b ; Arumugan et *al.*, 2008), (Figure 9) :

1) **la voie classique dépendante d'anticorps** (Essentiellement activée par le complexe Ag-AC) où l'AC est une IgM ou 2 molécules d'IgG : IgG1 et IgG3 ou IgG2 ; plus rarement par des substances telles que : la CRP, la thrombine ou certains virus.

L'interaction entre la portion globulaire de C1q et Cµ3 ou Cγ2 entraîne l'assemblage de deux molécules de C1r et deux molécules C1s autour de domaine

collagène de C1q, c'est le complexe C1, qui via la serine protéase de C1s va cliver le C4 et le C2 en C4a, C4b et C2a et C2b ; le complexe C4bC2a se forme et constitue la C3 convertase (Wagner, 2006).

2) **la voie alterne** : La voie alterne peut être activée en l'absence d'anticorps par un grand nombre de particules biologiques incluant de nombreux microorganismes (bactéries, parasites, levures, LPS, Zymosan des cellules infectées par des virus, des substances comme l'agarose), bien qu'il soit admis que les immunoglobulines d'iso type A (IgA) possèdent la capacité d'initier l'activation du complément par la voie alterne.

Quatre protéines sont impliqués dans la formation de la C3 convertase alterne, le composant C3b, les facteurs B, D et la properdine P. Comme la voie classique, une phase initiale non spécifique et une phase d'amplification strictement contrôlée par des protéines régulatrices. La molécule C3 contient un groupement thiolester en son centre qui maintient sa conformation. Ce groupement n'est pas complètement stable et son hydrolyse survient lentement en circulation. Le C3 hydrolysé, appelé iC3 ou C3(H₂O), se lie au facteur B pour former le complexe iC3B en circulation. Le facteur B est ensuite clivé par le facteur D, une sérine protéase, qui adopte une conformation active en reconnaissant son substrat et qui revient à sa conformation inactive une fois la protéolyse du facteur B terminée. Un petit fragment nommé Ba est libéré pour mener au complexe iC3Bb. Ce complexe représente la convertase C3 d'initiation de la voie alterne et a la capacité d'engendrer la protéolyse de C3 en C3a et C3b. Le C3b ainsi formé peut se lier à la surface d'un agent étranger et interagir avec le facteur B qui est alors clivé par le facteur D. Le complexe C3bBb est stabilisé par la properdine (P), pour augmenter l'efficacité de l'activation, et est appelé convertase C3 d'amplification. Il s'en suit une protéolyse de plusieurs autres molécules de C3 et l'attachement de plusieurs molécules de C3b à la surface de l'agent étranger. Cette amplification de la déposition de C3b mène à la formation de la convertase C5 de la voie alterne composée de (C3b)₂BbP (Wagner, 2006).

3) **La voie des lectines (MBL)** : initiée par la liaison du MBL au mannose et au résidu glucosamine de la paroi bactérienne, cette voie est découverte récemment (Presani, 2003).

la MBL circule en association avec les MASPs, après sa liaison à la surface de microorganismes, la MBL change sa conformation, ce qui induit l'activation des MASPs, la serine protéase 2 clive donc C4 tout comme C1s, de même la protéolyse de C2 mène à la formation de C4b2a (C3convertase).

4) **la voie des protéases externes** : en absence de C3 la C5a peut être activé par la thrombine (Hube-Lang et al., 2006).

II-4-3-3-1-3-Les protéines régulatrices du complément (Meri et Jarva, 2001 ; Lambris et Morikis 2005 ; Attwood et Cammack, 2006 ; Rautemaa, 2001)

Pour que le complément soit efficace dans l'élimination de l'agent pathogène et ne comporte pas des dommages pour l'organisme, il existe plusieurs molécules tant solubles et membranaires (tableau 5), qui visent à bloquer les effets indésirables de son activation :

II-4-3-3-1-3-1-Les régulateurs solubles

II-4-3-3-1-3-1-1-C1 inhibiteur : est une mono chaîne sérique de 478 résidus d'acides aminés, glycosylés, de 105 kDa, synthétisés dans le foie, par les monocytes et par les fibroblastes de la peau. Sa synthèse est stimulée par l'IFN γ , l'IL1 β et l'IL6 ; son gène est porté sur le chromosome 11 de 8 exons et 7 introns. Il appartient à la famille de serine protéases inhibiteurs, inhibe spécifiquement le C1r et C1s, comme il est démontré sa capacité d'inhiber les MASP1 et 2 de la voie des MBL.

II-4-3-3-1-3-1-2-C4b-binding protein: Une protéine multi chaîne (7 chaînes α et une chaîne β liées par des ponts disulfures), de 550 kDa capable de se fixer, sur C4b, dissocie la C3 convertase et autorise l'action d'un autre inhibiteur le facteur I. C4b-binding protein est spécifié par des structures basic appelé SCR « *Short Consensus repeat* » (Lambris et Morikis 2005, Attwood et Cammack, 2006).

II-4-3-3-1-3-1-3-Complément Facteur H : glycoprotéine de 155 kDa, son gène porté sur le chromosome 1, son taux sérique usuel est de 350 à 350 mg/l, dissocie la C3 convertase C3bBb de la voie alterne; permettant le facteur I d'inactiver C3 b en iC3 b par coupure de la chaîne α puis clivage ultérieur en C3dg qui reste fixé aux accepteurs et C3c qui passe en phase fluide (Lambris et Morikis 2005, Attwood et Cammack, 2006)

II-4-3-3-1-3-1-4-Complément Facteur I : : glycoprotéine de 88 kDa, son gène porté sur le chromosome 4, son taux sérique usuel est de 35 mg/l, inactive C4 et C3 en les hydrolysant avec l'aide de cofacteurs C4 bp, H, CR1 ou MCP (Lambris et Morikis 2005)

II-4-3-3-1-3-1-5-Clustreine : protéine sérique multi fonctionnelle, de 70 à 80 kDa, consiste de deux chaînes liées par des ponts disulfures (α et β), il se lie au MAC et prévient sa liaison à la membrane (Lambris et Morikis 2005, Attwood et Cammack, 2006).

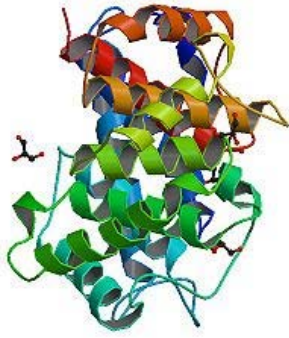


Figure 13: la fraction C3 du complément (Arumugan et *al.*,2008)

C5aR signaling pathways

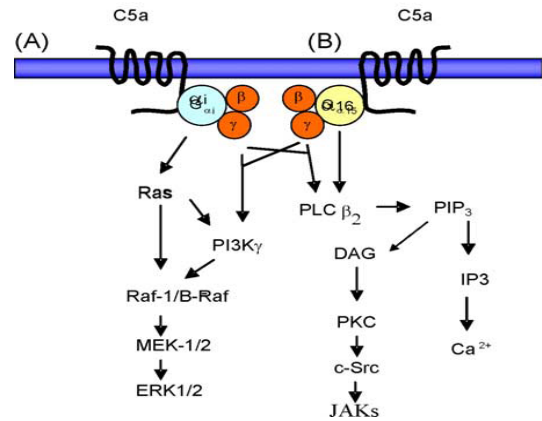


Figure 14: les voies de signalisation du récepteur C5a (Arumugan et *al.*,2008)

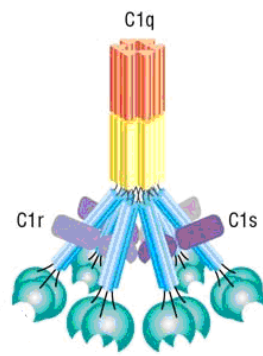


Figure15 : le complément C1 (Parham, 2005)

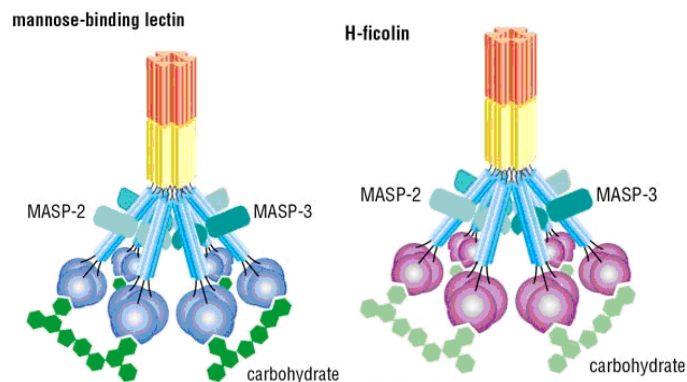


Figure 16 : illustration de la MBL et la Ficoline (Parham, 2005)

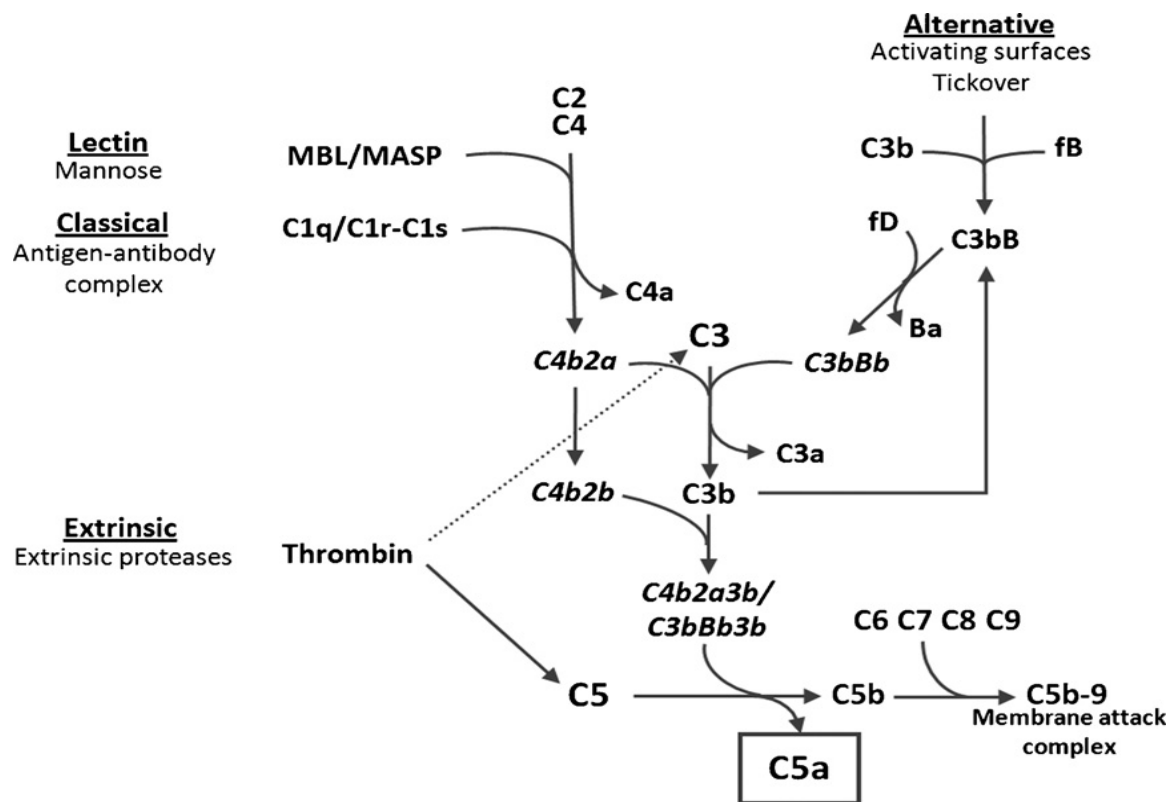


Figure 17: Voies d'activation du complément (Walport, 2001 ; Wagner, 2006 ; Mollnes, 2006 ; Manthey, 2009)

II-4-3-3-1-3-1-6-Vitronectine : appelé aussi la **protéine S** 83kDa, se fixe sur le complexe C5 b-7 C5 b-8 et C5 b-9 et l'empêche de s'insérer dans la membrane (Lambris et Morikis 2005 ; Attwood et Cammack, 2006)

II-4-3-3-1-3-2-Les régulateurs membranaires

II-4-3-3-1-3-2-1-Complément récepteur 1(CR1, CD35) : glycoprotéine membranaire existe sous deux formes de 190 et 220 kDa, lie les fragments C3b et C4b. Outre sa fonction de récepteur, il a la capacité de dissocier les convertases et joue un rôle de cofacteur de I pour le clivage de C3b et C4b. Il est exprimé par les hématies, les monocytes, les polynucléaires neutrophiles et éosinophiles, les lymphocytes T et B, les podocytes glomérulaires, les fibres nerveux périphériques et les cellules dendritiques folliculaires. Le CR1 participe également à la phagocytose des particules opsonisées et permet aux globules rouges d'assurer le transport des complexes Ag-Ac vers les macrophages de la rate et du foie.

II-4-3-3-1-3-2-2-Membrane cofactor protein (MCP, CD46):glycoprotéine membranaire de 51 à 68 kDa, présente sur les membranes des cellules autres que les hématies, et sur les cellules hématopoïétiques , le cellules épithéliales et endothéliale, elle fixe le C3b et le C4b et favorise leurs inactivation .ce sont des cofacteurs de I dont le rôle s'ajoute à celle de DAF

II-4-3-3-1-3-2-3-Decay-accelerating factor (DAF, CD55): glycoprotéines de 70kDa liées aux lipides membranaires par un pont GPI (*glycophosphatidylinositol*) qui permet des mouvements rapide sur les surfaces cellulaires .Le DAF est présent sur toutes les cellules sanguines, les cellules endothéliales, placenta et quelque types épithélial, il dissocie le C3 convertase de manière efficace et constitue un système de protection intrinsèque contre l'activation du complément , des études montrent l'augmentation de son expression dans certains types de tumeurs malignes, il prévient l'opsonisation et la libération d'anaphylatoxines.

II-4-3-3-1-3-2-4-Protectine CD59 : glycoprotéine de 18-25kDa, présent sur les cellules circulantes, les cellules endothéliales, plusieurs types épithéliaux et les spermatozoïdes. Comme le DAF il besoin un groupe GPI.il inhibe la dernière étape d'assemblage de MAC sur la membrane en se liant au complexe C5b-8, il empêche donc la liaison puis la polymérisation de C9 (Lambris et Morikis 2005 ; Attwood et Cammack, 2006).

II-4-3-3-1-4-Rôle du complément :

Les principales fonctions biologiques du complément comprennent la lyse des pathogènes, l'opsonisation par le C3b et l'activation de la cascade inflammatoire en réponse à la génération des anaphylatoxines (C3a, C4a et C5a) (Tableau 6).

Ces dernières sont des initiateurs de la réponse inflammatoire, elles induisent la vasodilatation, augmentent la perméabilité vasculaire et présentent aussi la propriété d'induire la libération de plusieurs médiateurs de mastocytes et phagocytes tels que l'histamine, la sérotonine, les produits du métabolisme arachidonique et certaines cytokines (Hawlish et *al.*, 2004 ; Arumugan et *al* 2004b ; Hawlish, 2006 ; Arumugan et *al* 2008).

Le "complexe d'attaque membranaire" MAC- peut stimuler le métabolisme arachidonique et la libération de PGE2 à partir des macrophages, du LTB4 à partir des neutrophiles et du thromboxane B2 à partir des plaquettes, libération des prostanoides et de l'IL1, ROS à partir des monocytes humaines. (Hansch et *al* 1984 ; Hansch et *al.*, 1985).

En échappant à ce contrôle l'activation du complément est associée à plusieurs pathologies, particulièrement rénale (Néphrite lupique, Néphrite membraneuse et membrano-proliférative, Néphropathie à IgA), pathologie neurologique (maladie d'Alzheimer, sclérose en plaque), biocompatibilité (rejet de greffe) (Wagner – 2006).

Tableau 5: Les protéines régulatrices du complément (Rautemaa, 2001)

protéines	cibles	fonctions
Régulateurs solubles		
C1 inhibiteur	C1r, C1s	Dissociation de C1s et C1r à partir de complexe C1 après liaison covalente.
Facteur I	C3b, C4b	Dégradation de C3b et C4b
Facteur H	C3b	Diminue l'activité de C3/C5 convertase de la voie alterne, cofacteur pour le facteur I
C4b-binding protein	C4b	Diminue l'activité de C3/C5 convertase de la voie classique, cofacteur pour le facteur
Clustreine	C5b-7	Prévention de l'insertion membranaire de C5b-7
Vitronectine	C5b-7	Prévention de l'insertion membranaire de C5b-7
Régulateurs membranaire		
CR1(CD35)	C3b, iC3b, C4b	Diminue l'activité de C3/C5 convertase, cofacteur pour le facteur I, transport de complexe immun
MCP(CD46)	C3b, C4b	cofacteur pour le facteur I
DAF(CD55)	C3b, C4b	Diminue l'activité de C3/C5 convertase
Protectine (CD59)	C8, C9	Inhibition de MAC

Sous les conditions physiologiques, l'activation du complément est également contrôlée par l'action coordinatrice des protéines régulatrices solubles et membranaires, les régulateurs solubles tel que le C1-inh, C4bBp, facteurs H et I. La Clustreine et la vitronectine limitent l'action du complément dans les liquides de l'organisme et les sites de cascade d'activation (figure 18). Les cellules sont protégées contre l'attaque des homologues du complément par les protéines de surface tel que CR1, MCP, DAF et CD59. Lorsque le complément est improprement activé ces mécanismes régulateurs peuvent être détruits, il en résulte une destruction de tissus et la maladie.

L'utilisation des inhibiteurs solubles (C1-inh, C4bBp, facteur H, CR1 soluble, DAF soluble, Cd59 soluble..), des anticorps (anti-C5, anti-MBL, anti-facteur D anti-C5a, anti-C5-9), des antagonistes de leurs récepteurs (SB 290157 antagoniste de C3aR, peptide cyclique AcF[OPdChaWR] antagoniste de C5aR) et des inhibiteurs non spécifiques (aprotinine, K-76 acide mono carboxylique –MX-1-) est souvent employée pour limiter toutes perturbations, pour neutraliser les cascades du complément ou pour réduire les effets des anaphylatoxines.

(Tamara et *al.*, 2002 ; Morgan et Harris 2003 ; Mollnes et Kirschfink 2006 ; Arumugam et *al.*, 2008).

Tableau 6 : Rôle du complément. (Wagner, 2006 ; Walport, 2001)

Composante	Mécanisme d'action	rôle
fragment		
C3a, C5a	Promotion de l'inflammation	
C1q , C4b, C3b, iC3b, C3d, MBL, C5b-9	Opsonisation / phagocytose	Contrôle de l'agent infectieux
C4b, C3b, C3d	Lyse microbienne	
	Développement d'anticorps spécifique augmenté.	Lien avec l'immunité adaptative
	Augmentation de la mémoire immune.	
C1q, C4b, C3b	Elimination de complexes immuns et de corps apoptotique	Elimination des déchets

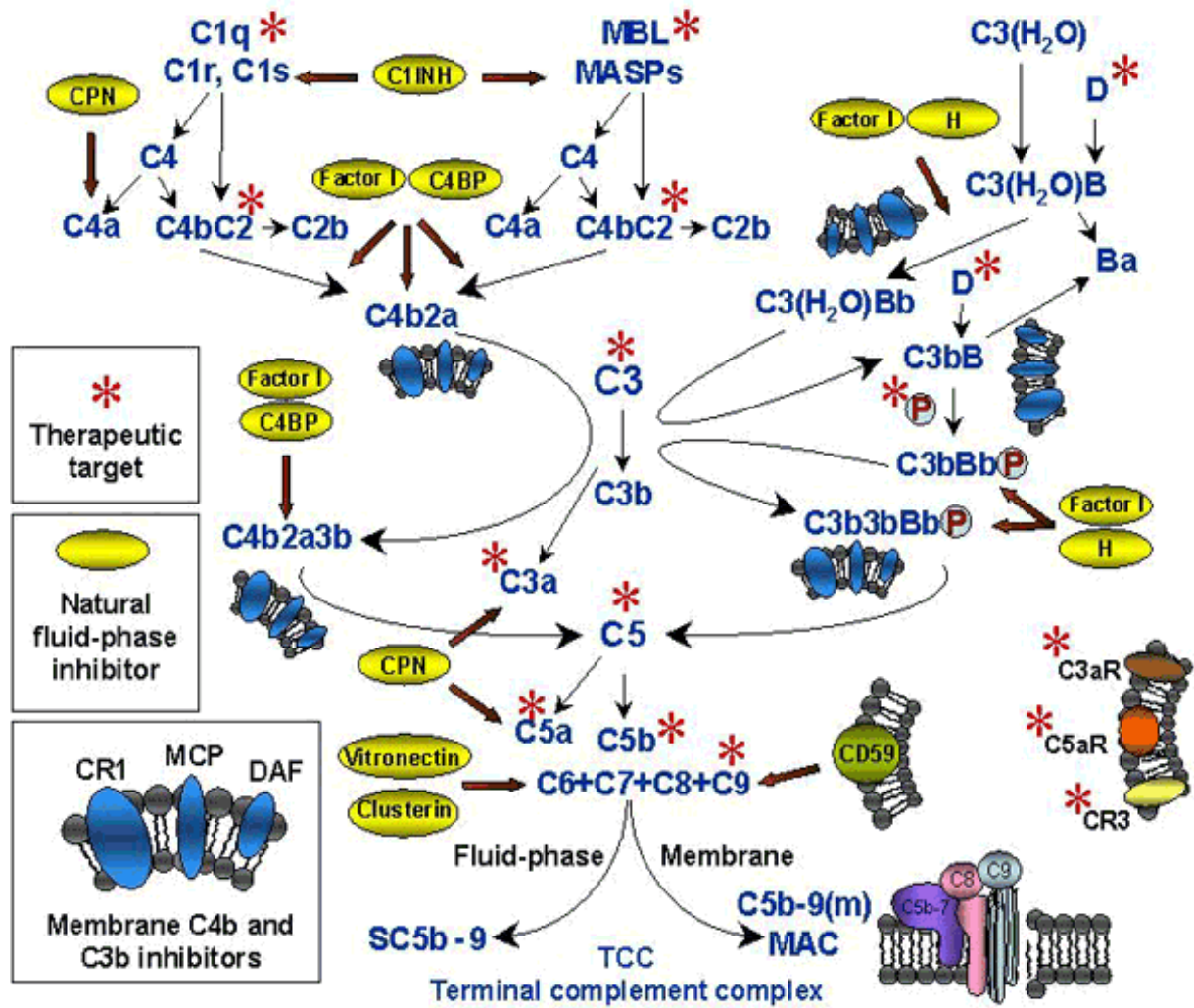


Figure 18 : Régulations physiologique des voies d'activation du complément (Mollnes et Kirschfink 2006; Tom, 2006; Wagner, 2006; Walport, 2001)

II-4-3-3-2-Les cytokines :

Les cytokines sont une famille de protéines de signalisation de masse moléculaire de 8 à 30 kDa et qui agissent en très faible quantité (pictogrammes). Elles sont produites non seulement par les lymphocytes et les monocytes mais aussi par les thymocytes et par d'autres variétés de cellules telles que les astrocytes, les cellules endothéliales, les kératinocytes, les fibroblastes et les cellules mesangiales (Tableau 7). Leur induction s'effectue par différent stimulus tels que les antigènes microbiens ou viraux, les lectines végétales, les mitogènes, les lésions tissulaires, l'hémorragie, et même les facteurs du complément et les cellules tumorales (Beile, 1997).

Les cytokines jouent un rôle important dans plusieurs pathologies en se liant sur leurs récepteurs spécifiques, ils produisent des cascades de signaux qui peuvent activer ou inhiber : des gènes, des facteurs transcriptionnelles, et autre cytokines et récepteurs de cytokines (Tableau 7).

II-4-3-3-2-1-Cytokines et régulation des réponses immunitaires

L'initiation du signal au niveau du système immunitaire implique la reconnaissance de l'antigène par les cellules T avec la participation des CPA. Le compartiment des cellules T est accompagné à la libération de cytokines telles que l'IL2, IL3, IL4, IL7, IL10, TNF α , et TNF β , IFN γ et GM-CSF (McCarthy 1994).

L'IL1, le TNF α , le TNF β , l'IL6 et l'IL8 sont des médiateurs important dans l'amplification de l'inflammation. L'IL1 et le TNF α peuvent induire physiologiquement la sécrétion de l'IL6 et de l'IL8 par les monocytes. Un taux élevé induire une hypotension fatale.

L'IL6 induit la prolifération des lymphocytes B et induit la libération des protéines de la phase aigue (McCarthy 1994). D'autres fonctions physiologiques sont assurées aussi par l'IL6, telles que la prolifération des lymphocytes B, T, Tc, des kératinocytes, des cellules mésangiales, la différenciation de cellules nerveuses la stimulation de l'hématopoïèse et une activité pyrogène en stimulant la production de l'AcTH (Gaillar, 2002).

L'inhibition des réponses inflammatoires est contrôlée par le TGF β , l'IL4 et l'IL10. L'IL4 peut inhiber la production de l'IFN γ par les monocytes et stimuler la libération de l'IL10 par les cellules T (CD4+). L'IL10 inhibe certaines fonctions de macrophages telle que la présentation de l'antigène aux cellules TH1, elle stimule l'expression le l'IL1a (inhibiteur de l'IL1) (McCarthy 1994).

Tableau 7 : caractéristique de certains cytokines (Genet 1993 ; Delves, 2000)

	PM gène codant	Cellules sources	Cellules sensibles	Activités majeurs	Pertinence clinique
IL-1	17kDa 2q	Mo/MO, CD, Cep, B, fibroblasts	T, B, Mo/MO, Cen, NK, PN...	Activation des C T et MO ; promotion de l'inflammation	Impliqué dans la pathogénèse de choc septique athérosclérose
IL-2	15kDa 4q	T(Th1)	T, B, NK	Activation des C T , NK et MO	Utilisé dans le traitement de certaines tumeurs
IL-4	15kDa 5	T(Th2), PB /Ma	B, T, Ma, PB, Mo/MO	Activation des C Tet Mo et le Switch des IgE	Défense contre les nématodes
IL-6	20-26kDa 7p	Mo/MO, T, Cep, B, Ma fibroblasts	B, T, hépatocytes, C souches	Activation des C T et différenciation des C B ; stimulation de la production des protéines de la phase aigue	Hyper-produit dans la maladie de Castleman's, agit comme hormone de croissance dans la myélome et prolifération de mésangliocyte glomeronephritis
IL-8	8kDa 17q	Mo/MO, T, Cep, PN, NK, fibroblasts	PN, PB, T et B	Chimiotactisme des PN, CB, T	Niveau dans les pathologies accompagné au neutrophilié
IL-10	19-21kDa 1	T(Th2), Mo	T, B	Immunosuppresseur	Utilisé dans des pathologies cardio-vasculaires
IL-12	35-40kDa 3q	Mo/MO, B	T(Th1, Tc) NK, Mo/MO, Ma	stimulation de la production $\text{IFN}\gamma$ par les Th, NK et induction CTh de la voie Th1	Peut être utilisé comme adjuvant dans les vaccins
IL-13	10kDa 5q	T(Th2)	B, Mo/MO, PN,	Immunosuppresseur	Dés activatrice des macrophages
$\text{IFN}\gamma$	20-25kDa 12q	T(Th1), NK	B, Mo/MO, Tc, NK, Cen	Activation MO, inhibition des CTh de la voie Th2	Utilisé dans la maladie granulomateuse chronique
$\text{TNF}\alpha$	17*3kDa 6p	Mo/MO, PN, T, NK; Ma	Très diverses	Promotion de l'inflammation	Associé aux anticorps, il est bénéfique dans l'arthrite rhumatoïde
$\text{TNF}\beta$	17*3kDa 6p	T, NK	Très diverses	Promotion de l'inflammation	Impliqué dans la pathogénèse de multiple sclérose

B : lymphocytes B ; **Ce** : cellules épithéliales ; **CD** : cellules dendritiques ; **Cen** : cellules endothéliales, **Eo** : Eosinophiles ; **Ma** : mastocytes ; **Mo/Mo** : monocytes/macrophages ; **NK** ; natual killer ; **PB** : basophiles ; **PN** : polynucléaires ; **T** : lymphocytes T (Tc : cytotoxique, Th : helper, Ts : supresseur)

Au niveau moléculaire ces régulations font appel aux superfamilles des STAT, Jak et SOCS qui sont des facteurs de transcription et selon le signal transmis par les récepteurs des cytokines orientent les voies Th (figure 19 et 20). (O'Shea et Murray 2008).

Le taux sérique élevé de certaines cytokines chez des patients empoisonnés par le scorpion *Tityus serrulatus* permet de montrer l'augmentation importante de l'IL1 α , l'IFN γ , l'IL6 et le GM-CSF (Fukuharaa2003) ; cette élévation persiste après 24 h. Une corrélation étroite entre l'augmentation sérique des cytokines et les concentrations sériques du venin de *Tityus discrepans* a été montrée chez les patients envenimés. Cette corrélation est aussi rapportée après envenimation avec le venin de *Leirus quinquestriatus* Lq (D'Suze, 2003 ; Abdoon et Fatani 2009).

L'IL8 semble être un facteur important dans la pathogénèse des lésions de myocarde après envenimation scorpionique (Abdel-Raheem et al 2003). ils reposent leur hypothèse sur l'étude qui montrent L'IL8, cytokine inflammatoire peut être produite localement au niveau cardiaque, elle active les leucocytes et stimule leur accumulation dans le myocarde (Wan et Yi, 1999). L'administration des anticorps anti IL8 chez des lapins les protège contre les lésions cardio-pulmonaires (Boyle et al 1998).

L'inter-contrôle des cytokines et des différents marqueurs de défaillance du stress tissulaire peut expliquer leurs niveaux sériques très élevés après une envenimation. Les auteurs interprètent les taux élevés de l'IL6 par l'incapacité de l'inhibition de sa production ou l'augmentation de son métabolisme (Sofer et al., 1996).

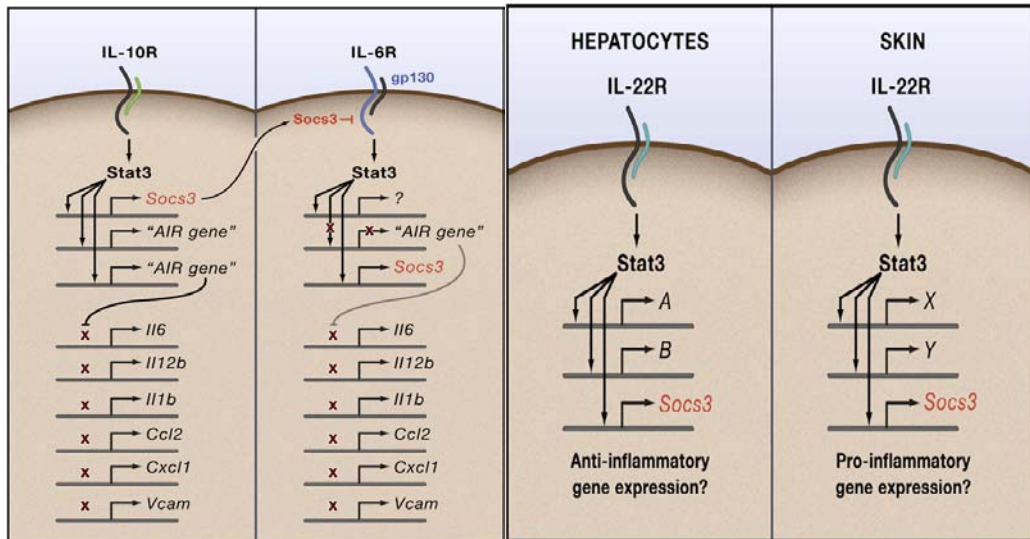


Figure19 : signal transmis par l'IL6 IL10 et l'IL22 (O'Shea et Murray 2008)

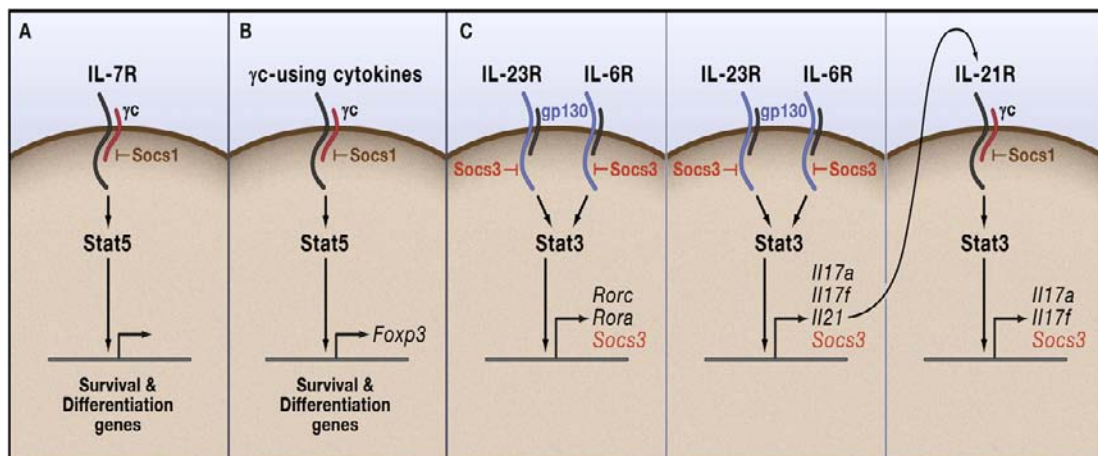


Figure 20: Développement et fonction de signal des cytokines dans les cellules T (O'Shea et Murray 2008)

II-5-Traitement de l'envenimation :

Les diverses complications engendrées par les venins de scorpions telles que l'hypertension, l'œdème pulmonaire, altération neurologique, font que l'utilisation des l'anti venins est incapable d'abolir tous les effets systémiques déclenchés par les venins (Bawaskar1991, Sofer et al 1994, Tarasiuck et al 1998). Tous ces effet pourraient cependant être neutralisés par l'association de l'immunothérapie avec un traitement symptomatique.

II-5-1-Le traitement symptomatique :

Le traitement symptomatique est indiqué pour corriger l'hypertension et l'hypotension artérielles. Il peut être à base de captopril, nifedipine, prazosine, hydralazine, (Sofer et Guero 1988, Bawaskar, 1994). Les perturbations cardio-vasculaires par le metropolole et la dobutamine, les réactions allergiques pourraient être atténuées par l'épinephrine et les corticoïdes) et les vomissements par l'utilisation de métoclopramide (Elatrous et al 1999).

II-5-2-Le traitement spécifique :

Des travaux ont portés sur la recherche d'autres traitements qui peuvent atténuer les symptômes de l'envenimation. L'Utilisation des flavones et le flavonone possèdent des propriétés inhibitrices sur les hyaluronidases contenues dans le venin de *Tityus serrulatus* (Pessinin et *al.*, 2001). La lignocaine, le benzylamine, les carbamazepines sont souvent proposés dans les traitement des envenimés (Fatani et *al.*, 2000 ; El-Alfy et *al.*, 2008 ; Alves et *al.*, 2008).

Bien que controversée, l'immunothérapie reste le seul traitement spécifique préconisé lors des envenimations (Rivière et Bon 1999)

L'efficacité de l'immunothérapie est conditionnée par les propriétés pharmacologiques et pharmacocinétiques des venins et de leurs toxines mais aussi celles des sérums antivenimeux. L'administration d'anti-venin à des rats 30 min après envenimation avec le venin d'Aah semble prévenir les altérations observés au niveau cardiaque et hépatique, ces altérations restent cependant partiellement neutralisées au niveau pulmonaire et rénal. La voie intraveineuse est une des voie préconisée dans les cas d'envenimations sévères (Hammoudi-Triki et *al.*, 2003 ; Hammoudi-Triki et *al.*, 2004). Krifi et *al.*, L'injection de l'anti-venin dans un délai court et par voie appropriée est nécessaire pour une neutralisation complète et permanente du venin circulant. Les recommandations de la voie intraveineuse pour l'injection du sérum antivenimeux, portent

sur L'amélioration de l'immunothérapie reste dans l'utilisation de fragments F(ab) ou F(ab')₂ dans des délais rapides et par voie intra-veineuse dans des structures adaptées. (Hammoudi-Triki et *al.*, 2007 ; Sami-Merah et *al.*, 2008).

II-6- Apports sur l'utilité de venins et des toxines en thérapeutique :

Le venin de scorpion contient un grand nombre de substances biologiquement active tels que les peptides toxiques (avec une variété de spécificité aux canaux ioniques), les enzymes, les nucléotides, les lipides les mucoprotéines, les amines biogéniques, les glycosaminoglycanes et l'histamine (Zlotkin et *al.*, 1978). Il été démontré que l'injection du venin de scorpion peut induire la sécrétion de médiateurs inflammatoires (bradykinine, PAF, PGs, LT, et les cytokines...) (Pelletier et *al.*, 1993 ; Murray, 1998 ; Gueron 1992a ; Ismail et *al.*, 1992).

En se référant aux propriétés des venins, de leurs toxines purifiées qui sont capable d'induire des nécroses et une réponse inflammatoire spécifique, certains travaux explorent les venins ou leurs toxines purifiées en thérapeutique. La douleur peut être induite par certaines toxines, certaines toxines purifiées du même venin ont montré des effets antalgiques. La toxine BmK IT-AP, une toxine anti-insecte, isolée du venin de *Buthus martensi Karsch* (BmK) présente un effet analgésique sur les souris. BmKIT-AP3 et BmK IT-AS1, sont des toxines purifiées du même venin qui possèdent un effet anti-dépressif sur les insectes et un effet analgésique sur les mammifères. D'autre peptides analgésiques purifiés du venin de BmK (AGAP) montrent un effet inhibiteur de la douleur des viscères et aussi une activité anti-tumorale sur les cellules E., ascites et fibrosarcomes S-180 (Rajendra et *al.*, 2004)

Plusieurs bactéries deviennent résistantes aux antibiotiques conventionnelles, de nouveaux médicaments et leurs sources sont nécessaires pour combattre contre la résistance bactérienne. Des peptides isolés des venins de scorpions montrent leurs propriétés antibactériennes telles qu'*imcroporin* (purifiée à partir du venin de *Isometrus maculatus*) (Zhao et *al.*, 2009). Six peptides appelés bactridines ont été purifiés à partir du venin de *Tityus discrepans* (Díaz et *al.*, 2009).

Un peptide, appelé scorpine a été isolé à partir du venin du scorpion *Pandinus imperator*, ce peptide présente une activité antibactérienne et un effet inhibiteur puissant sur les stades ookinete et gamète de *Plasmodium berghei* (Conde et *al.*, 2000).

Carballar-Lejarazffl et collaborateurs, en 2008, développent un recombinant de ce peptide RScp et montrent son pouvoir antibactérien contre *Bacillus subtilis* et *Klebsiella pneumoniae*, (dose de 5 et 10 mM, respectivement). Il produit aussi 98% de mortalité dans les stades sexuel de *Plasmodium berghei* avec une dose de 15 mM et une réduction de 100% pour *Plasmodium falciparum parasitemia* avec une dose 5 mM. RScp inhibe aussi la réplication du virus de la dengue 2 dans les cellules mosquito C6/36.

MATERIELS
ET
METHODES

III-MATÉRIELS ET MÉTHODES

III-1-Matériel

III-1-1-Matériel biologique

III-1-1-1-Le venin et les toxines

Le venin d'*Androctonus australis hector* (Aah), sa fraction F_{Tox}G50 sont fournis par le Laboratoire de Recherche et de Développement sur les Venins de l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA). Les toxines Aah I et Aah II sont gracieusement fournies par le Docteur Marie-France Martin-Eauclaire (*UMR3132 CRN2M, IFR Jean-Roche, Université de la Méditerranée, Faculté de Médecine*).

III-1-1-2-Les animaux

Les souris mâles de race *NMRI* (20 ± 2 g) sont fournies par l'animalerie de l'annexe de l'IPA.

III-1-1-3-Le sang de mouton

Le sang de mouton est prélevé par ponction jugulaire dans une solution Alsever's (pH 6,01 à raison de deux fois le volume du sang), il est conservé à 4°C.

III-1-2-Matériel non biologique

Les produits chimiques sont fournis par la firme Sigma Aldrich, Les Kits de dosage des cytokines sont fournis par Amersham Biosciences-Biotrak TM system.

III-2-Méthodes

Le venin AaH, sa fraction F_{Tox}G50 et ses toxines Aah I et Aah II, induisent des perturbations physiologique importantes. Ces toxines affectent tous les tissus et systèmes de l'organisme (cardiovasculaire, nerveux, endocrinien, respiratoire), provoquant ainsi un désordre métabolique dans le foie et les reins ainsi qu'une réponse inflammatoire.

Cette étude porte sur l'induction de la réponse inflammatoire par les molécules d'AaH selon les aspects suivants :

1 - la consommation de protéines du complément sous l'action de venin, la libération des cytokines suite à l'envenimation par les toxines AaH I et AaH II,

2-Dosages des immunoglobulines

3-La libération de cytokine au niveau de foie sous l'action des toxines d'AaH

4-l'effet des traitements sur l'inflammation induite par le venin d'AaH.

III-2-1-L'envenimation des animaux

Les animaux sont envenimés par voie sous cutanée avec une dose sublétales de venin AaH (10 µg/20 gde souris), de sa fraction toxique F_{Tox}G50 (0,8 µg/20 g de souris) ou de ses toxines purifiées, AaH I (0,2 µg/20 g de souris) et AaHII (0,16 µg/20 gde souris). Les animaux sont sacrifiés selon une cinétique : 30 min, 1, 3, 4, 6, 48 heures et 7 jours.

Le sang récupéré est centrifugé pendant 15 min à 849.6g, les sérums sont conservés à -20°C jusqu'à leur usage dans les tests hémolytiques et le dosage des immunoglobulines.

Les organes (foie et poumons) sont récupérés et broyés dans de l'eau physiologique. Les broyats sont utilisés pour le dosage des cytokines mais aussi dans des tests hémolytiques pour quantifier le taux d'activation du complément dans les organes.

III-2-2-Le traitement antivenimeux

Les animaux sont injectés par voie intra péritonéale avec une dose thérapeutique d'Atropine (0,025 mg/kg) ou de propranolol (0,1 mg/kg) après 45 min d'administration d'une dose sublétales de venin AaH (10 µg/20 g de souris). Les animaux sont sacrifiés selon une cinétique : 1, 3 et 24 heures.

Le sang récupéré est centrifugé pendant 15 min à 70.8g, les sérums sont conservés à -20°C jusqu'à leur usage dans les tests hémolytiques.

Les organes (foie et poumons) sont récupérés et broyés dans de l'eau physiologique. Les broyats sont utilisés dans des tests hémolytiques pour quantifier le taux d'activation du complément dans les organes.

III-2-3-Tests de l'activité lytique du complément

Ce test est réalisé afin d'explorer la voie classique de l'activation du complément, en utilisant des globules rouges de mouton qui sont sensibilisés (GRMs).

III-2-3-1 Préparation des Globules Rouges de Mouton (GRM)

Le sang de mouton fourni par l'IPA et obtenu par prélèvement jugulaire dans la solution d'Alsever's (pH 6,01 à raison de deux fois le volume du sang, il est conservé à 4°C. Après une centrifugation de 70.8g pendant 5 min, le surnageant et le *buffy coat* sont éliminés,

les Globules Rouges de Mouton (GRM) sont récupérés et relavés avec du tampon (*gélatine tampon veronal buffer* –EDTA) GVB-EDTA.

III-2-3-2-Sensibilisation des Globules Rouges de Mouton (GRMs)

Après ajustement de nombre de GRM à l'aide d'un tampon GVB-EDTA à (10^9 GRM), un volume de la suspension de GRM ajustée est suspendu dans le même volume de GVB-EDTA, le sérum hémolytique est ajouté, bien mélangé et incubé à 37°C pendant 30 min. Après un lavage avec du GVB-EDTA et deux lavages avec du GVB⁺⁺ cette préparation peut être conservé pendant 5 jours à 4°C.

II-2-3-3-Dosage de l'activité hémolytique des échantillons sériques après envenimation

Les sérums à tester sont dilués au un trentième ($1/_{30}$), 9 volumes de chaque dilution sont mélangés avec un volume de la suspension de GRMs, incubée entre 30 et 40 min, puis centrifuger à 212.4g pendant 5 min. La lecture de la DO est effectuée à 541 nm. Le témoin présentant 100% d'hémolyse est préparé avec un volume de la suspension des GRMs et 9 volumes d'H₂O, le témoin ne présentant que 0% d'hémolyse (absence totale d'hémolyse) est préparé avec 9 volumes de GVB⁺⁺.

Les surnageants d'organes broyés sont dilués au un quinzième ($1/_{15}$), puis mélangés avec les GRMs selon les mêmes étapes, la lecture de l'absorbance est effectuée cette fois ci à 412 nm.

III-2-4-D-Dosages des immunoglobulines

Le dosage des immunoglobulines sériques est réalisé à l'aide d'un test ELISA simple. Des microplaques sont sensibilisées avec une solution de venin d'AaH (5 µg/ml dans le tampon carbonate –bicarbonate de sodium 0,1M, pH 9,6) à raison de 100 µl par puits pendant une nuit à 4°C. Après 5 lavages avec le tampon PBS 0,1M, pH 7,4, 0,1% Tween20, la saturation est réalisée avec une solution de « PBS-Tween 20, 5% de lait écrémé », à raison de 200 µl par puits, pendant 1 heure à 37°C.

Une série de lavages au PBS-Tween 20 est suivie d'une répartition des sérums à étudier (100 l par puits), après une heure d'incubation à 37°C, la plaque est relavée 5 fois avec du PBS-Tween 20. Le conjugué constitué des anticorps de cheval anti-IgG de souris couplés à la peroxydase, est déposé à raison de 100 l préalablement dilué au $1/_{1000}$. Cette réaction dure une heure à 37°C.

Une préparation SOPD du substrat (20 mg d'une pastille d'O-Phénylène Diamine dihydrochloride dissoute dans une solution phosphate 0,01M, pH 7,3, puis 10 l d'H₂O₂ est additionné), est rajoutée à raison de 1% et incubée pendant 10 à 15 min à l'abri de la lumière et à température ambiante.

L'arrêt de la réaction est effectué par l'addition d'H₂SO₄ 2N à raison de 25 l/puits puis la lecture est effectuée à 490nm.

III-2-5-Dosages des cytokines

Le dosage de cytokines est réalisé en utilisant des kits spécifiques pour chaque cytokine. Ces dosages sont effectués dans les surnageants du foie des animaux envenimés avec les toxines Aah I et Aah II selon la cinétique de 3 heures, 6 heures et 24 heures.

Dans une première étape, les échantillons standards de chaque cytokine (IL1 β , ICAM, IL5, IL10, IL6, et TNF α) et les échantillons à tester, sont incubés en «duplicate» une heure à température ambiante, à raison de 50 μ l/puits, dans des puits préalablement sensibilisés avec un anticorps monoclonal spécifique à chaque cytokine.

L'anticorps biotinylé, déposé à raison de 50 μ l/puits, est incubé pendant une heure à température ambiante. Le dépôt du conjugué Streptavidine –HRP (100 μ l/puits) est effectué après une série de lavages pour une incubation de 30 minutes à température ambiante.

L'activité enzymatique est révélée par l'addition du substrat spécifique à l'enzyme, le 3-3'-5-5' tétraméthyl benzidine (TMB)-100 μ l/puits, après 30 minutes d'incubation à température ambiante et à l'obscurité. Après addition de la solution d'arrêt HCl 2N (50 μ l/puits), l'absorbance à 450 nm est effectuée à l'aide d'un lecteur de microplaque.

III-2-6-l'analyse histologique des poumons et de foie après envenimation en absence et en présence de prétraitements

II-2-6-1-préparation des blocks d'organes

Les organes obtenus après dissection sont lavés dans le tampon PBS dans le froid ensuite imprégnés dans le fixateur (PBS 0,1M pH 7,4 - para formaldéhyde 10%) pendant 24 heures. Après fixation, les organes sont déshydratés dans des bains d'alcool de concentrations croissantes (70%-90%-100%) puis deux autres bains de xylène 15 minutes pour chaque bain.

Ces organes sont ensuite imprégnés dans la paraffine fondue à 60°C pendant 1 heure puis 24 heures (deux bains de paraffine) ; les blocs de paraffine sont effectués en utilisant des cassettes.

III-2-6-1- Préparation des coupes

Les blocs d'organes préparés sont coupées à l'aide d'un microtome, ces coupes sont étalées sur des lames et incubées au minimum 2 heures à 60°C. Ces dernières sont déparaffinées dans deux bains de xylène puis deux bains d'alcool (10 minutes chacun). Les colorations sont effectuées dans l'hématoxyline (3 minutes) puis dans l'éosine pendant 15 minutes.

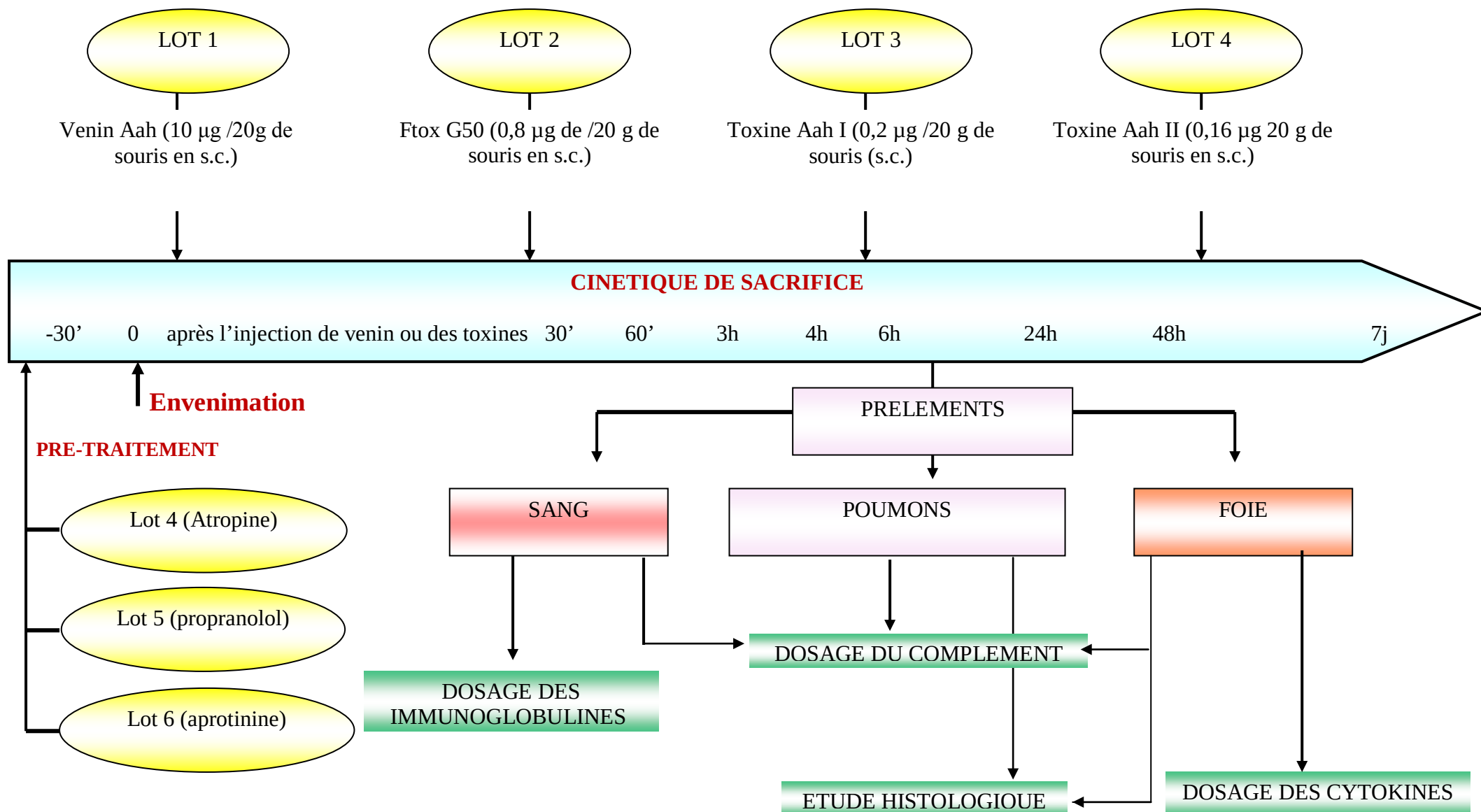


Figure 20: Démarche expérimentale

RÉSULTATS
ET
DISCUSSION

IV-RESULTATS ET DISCUSSION :

IV-1-Analyse du processus inflammatoire induit par le venin d'*Androctonus australis hector* et de sa fraction F_{Tox} G50 et de ses toxines AaH I et AaH II :

IV-1-1-Dosage de l'activité lytique du complément sérique :

Le système du complément est un ensemble de protéines dont la plupart sont des estérases et complètent de façon non spécifique les effets immunologiques spécifiques des anticorps.

Toutes les voies d'activation du complément (classique, alterne et MBL) mènent à la formation de nombreux produits doués d'activités biologiques diverses, en première ligne le fragment C3a et le fragment C5a puis le complexe d'attaque membranaire.

Chez les sujets sains le complément est faiblement actif selon les besoin de l'organisme (élimination des cellules apoptotique, des complexes immun), le taux de son activité sérique est presque nulle.

Le taux d'activité de système du complément (taux de formation du C3a de manière générale) est exploré par la mesure du pourcentage d'hémolyse des GRMs en présence de sérums des animaux injectés par les molécules en question.

Les résultats de la cinétique de mesure de l'activité lytique du complément sérique en présence du venin total d'AaH montrent une augmentation significative du taux de lyse des GRMs (40% après 30 minutes) [figure 21]. Cette activité continue à augmenter pour atteindre un premier pic avec un pourcentage d'hémolyse de 56% à 3 heures et un deuxième pic à 24 heures (presque 70%). Cette activité décroît ensuite en fonction de temps pour atteindre son stabilité après le 7^{ème} jour d'envenimation (20% d'hémolyse).

La même allure de courbe est obtenue avec la fraction F_{Tox} G50 du venin d'AaH [figure 21]. Une moindre intensité est cependant observée comparée à celle du venin (30% après 30 minutes, un premier pic à 3 heures avec un pourcentage d'hémolyse de 47% et un deuxième pic à 24 heures avec un pourcentage d'hémolyse de 60%).

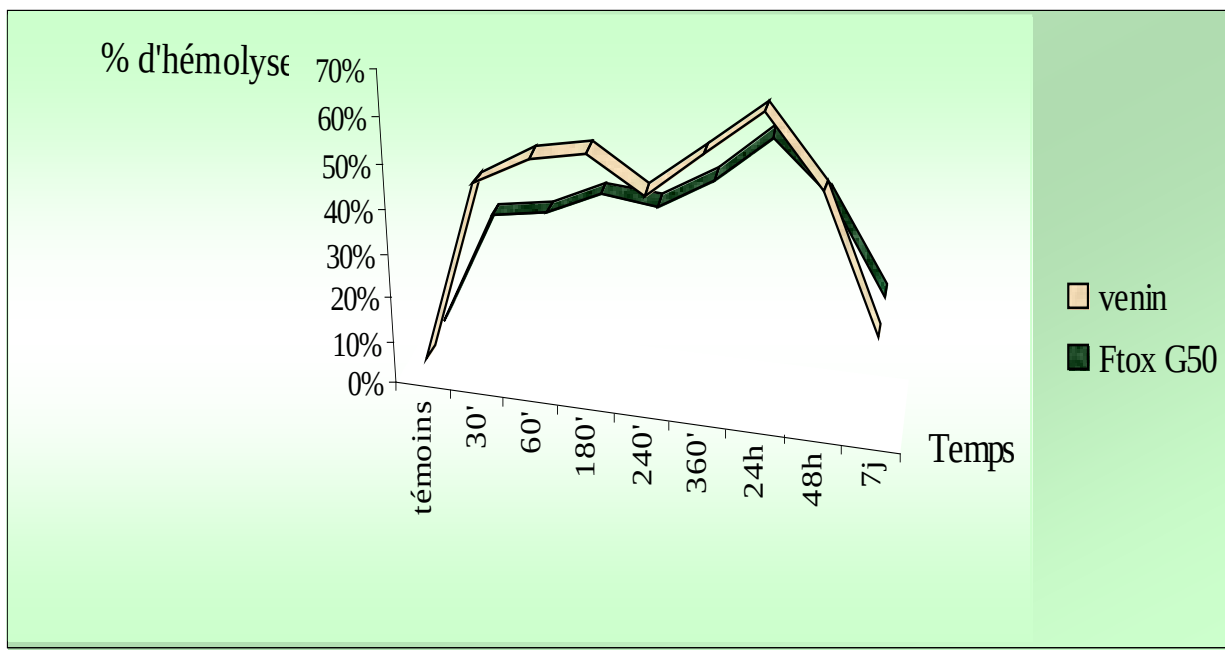


Figure 21 : Variation de l'activité lytique sérique du complément après envenimation avec une dose sublétales de venin AaH ou de sa fraction FtoxG50.

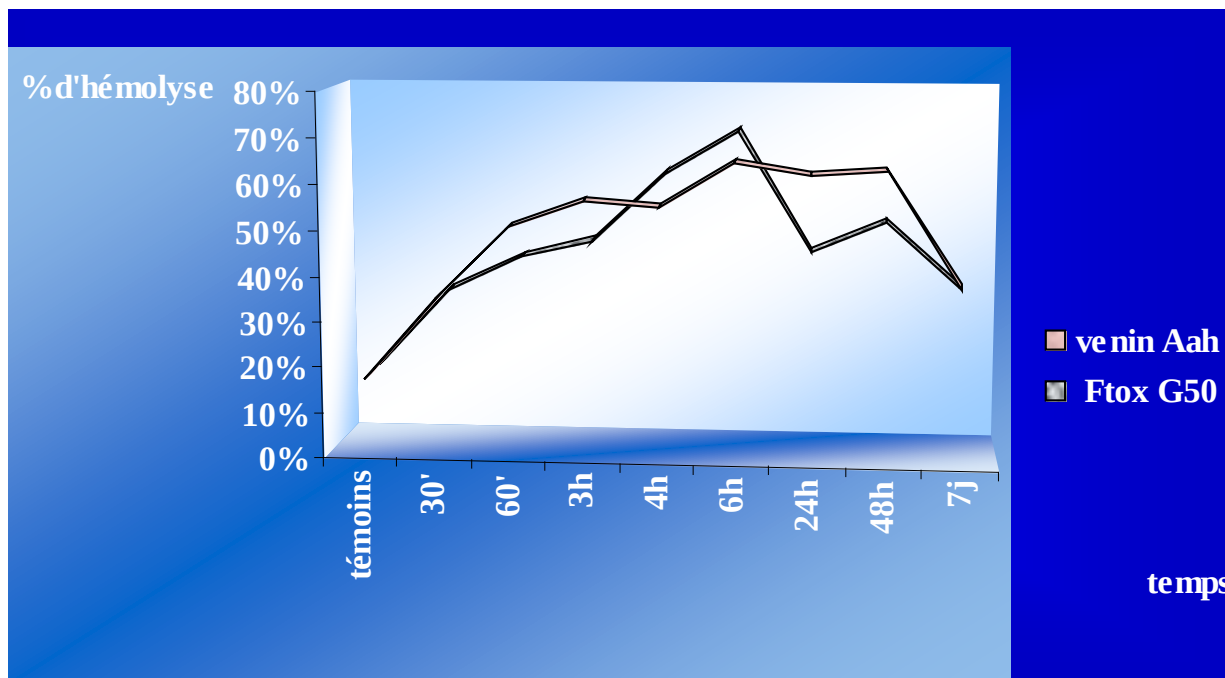


Figure 22 : Variations de l'activité lytique sérique du complément après l'envenimation avec une dose sublétales des toxines AaH I et AaH II.

Les toxines Aah I et AaH II agissent de la même façon que le venin total [figures 22]. La stabilité de cette activité est aussi retardée au 7^{ème} jour (20%).

L'hémolyse des GRMs en présence de sérums d'animaux envenimés est due à la présence du complément activé par le venin et par ses fractions toxique G50 et par ses toxines Aah I et Aah II.

La première phase d'activation indique la participation du complément dans la réponse innée induite par les antigènes utilisés. La régression faible de cette activité peut être expliquée par une étape de régénération des protéines du complément afin de participer dans une deuxième phase d'activation et d'atteindre un maximum d'activité à 24 heures (70%).

L'activation du complément conduit à la production de fragments biologiquement actifs (C3a et C5a), qui sont responsables de la libération de l'histamine, de l'augmentation de la perméabilité vasculaire et de l'infiltration leucocytaires dans les sites lésés.

Le venin de scorpion *Tityus serrulatus* active *in vivo* (rats Wistar) par les deux voies : classique et alterne le système du complément, avec un premier pic à une heure et un deuxième plus important à 24 heures, (Bertazzi 2003); *in vitro* sur un sérum humain l'activation des trois voies d'activation de système du complément, commence dans 20 minutes (Bertazzi 2005).

III-1-2-D-Dosages des immunoglobulines :

L'injection d'antigène venimeux diffuse rapide dans les compartiments vasculaire et tissulaire en déclenchant une réponse immunitaire à médiation humorale avec production d'anticorps après activation et prolifération des lymphocytes B en plasmocytes par l'intermédiaire des cytokines (IL4, IL6).

L'injection d'une dose sublétales de venin d'AaH induit une augmentation significative des IgG anti-AaH qu'après 24 heures. La reconnaissance des constituants du venin chez le témoin indique que les constituants de venin sont détectés par les anticorps circulants, et activent à leur tour le système du complément. [Figures 23 et 24]

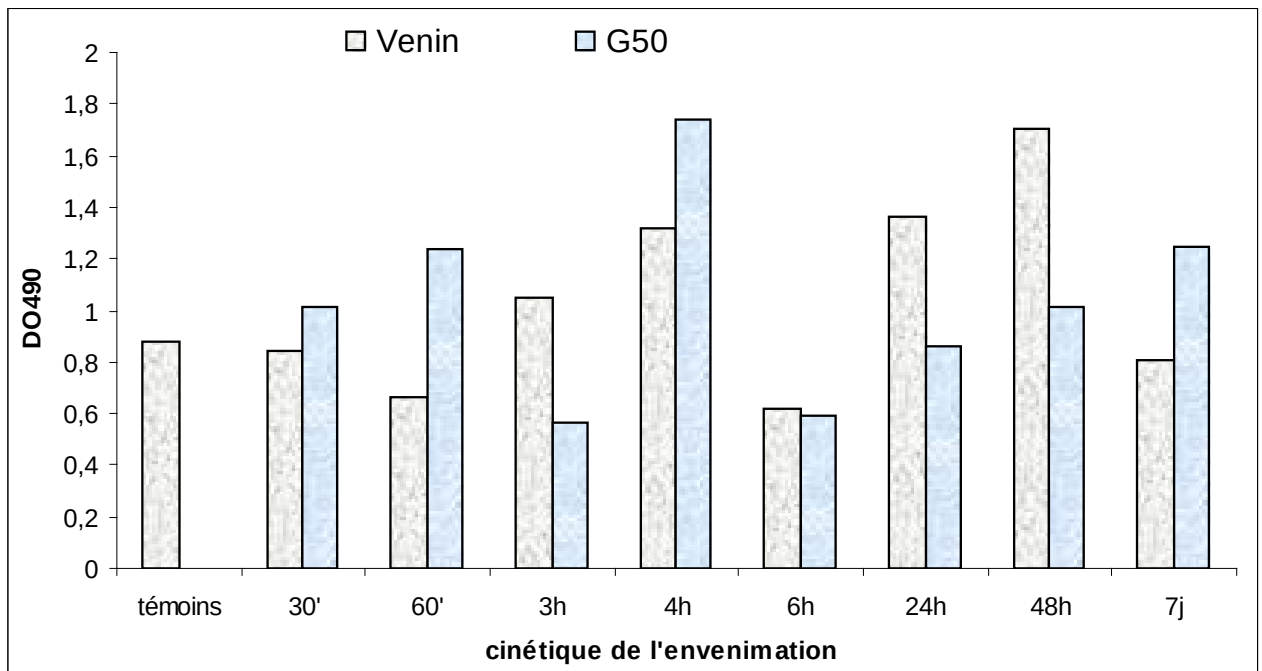


Figure 23 : Variations des taux sérique en IgG anti Aah après l'envenimation avec une dose sub létale du venin AaH, sa fraction FtoxG50.

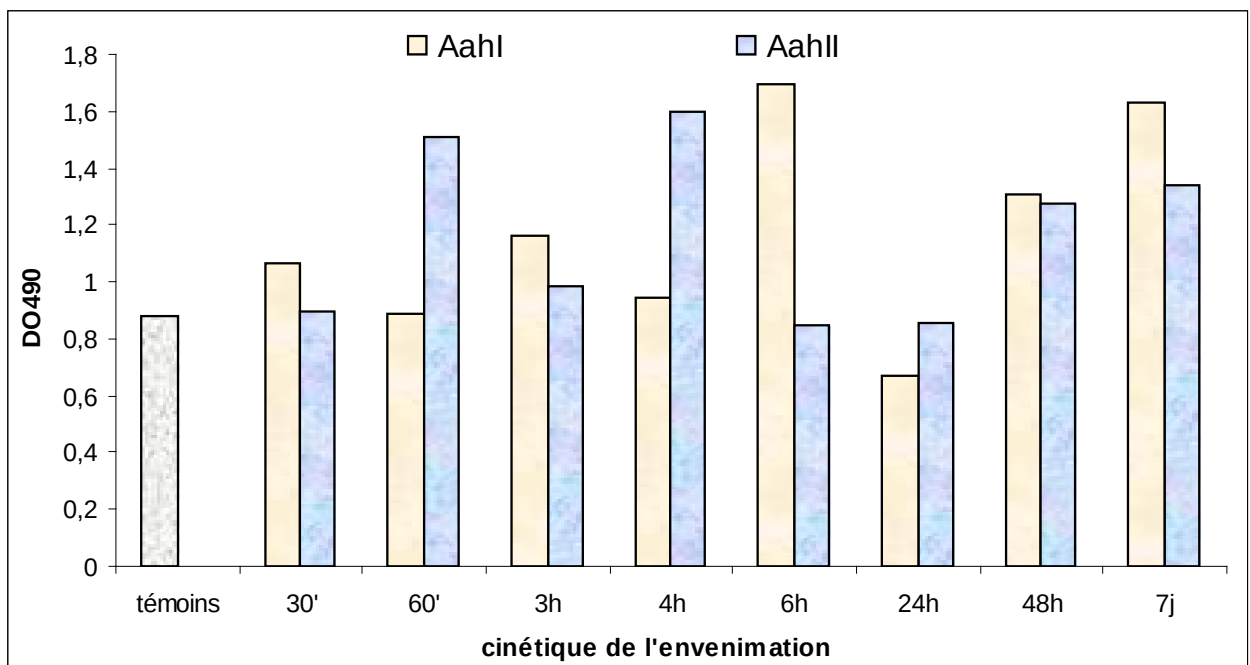


Figure 24 : Variations des taux sérique en IgG anti Aah après l'envenimation avec une dose sub létale des toxines AaHI et AaHII.

IV-1-3-Dosage de l'activité lytique du complément dans certains organes :

Les surnageant des poumons des différents animaux envenimés présentent une activité hémolytique significative [figure 25, 26]. Elle est précoce et commence à 30 min (30 % d'hémolyse). Cette activation est plus rapide que celle observée au niveau du tissu hépatique, elle atteint son maximum à 1 heure (58% d'hémolyse), diminue avec le temps et ré augmente à 48 h (probablement à cause de la production d'anticorps), une deuxième diminution est observée au 7ème jour (30%). Au 7ème jour l'activité persiste même faiblement probablement à cause des phénomènes d'élimination des débris tissulaires après leurs réparations.

Les surnageants du foie des différents animaux envenimés possèdent une activité hémolytique significative, atteint son maximum à 6h (65% d'hémolyse), elle est aussi précoce et commence à 30 minute (30 % d'hémolyse), persiste mais avec moins degré au 7ème jour. [Figure 27 et 28].

L'hémolyse des GRMs par le surnageant hépatique montre la présence du système du complément sous sa forme actif. Dans la première phase (de 30 min à 4 heures, cette activité peut être due à la présence du complément dans le foie car il est la principale source des protéines du complément. La deuxième phase (de 6 heures à 48 heures) présente une activité plus importante, due probablement à la présence du complément dans le foie et à la déposition du complément actif sérique dans cet organe.

Au 7ème jour l'activité persiste même faiblement peut être à cause du phénomène d'élimination des déchets tissulaires après leurs réparations.

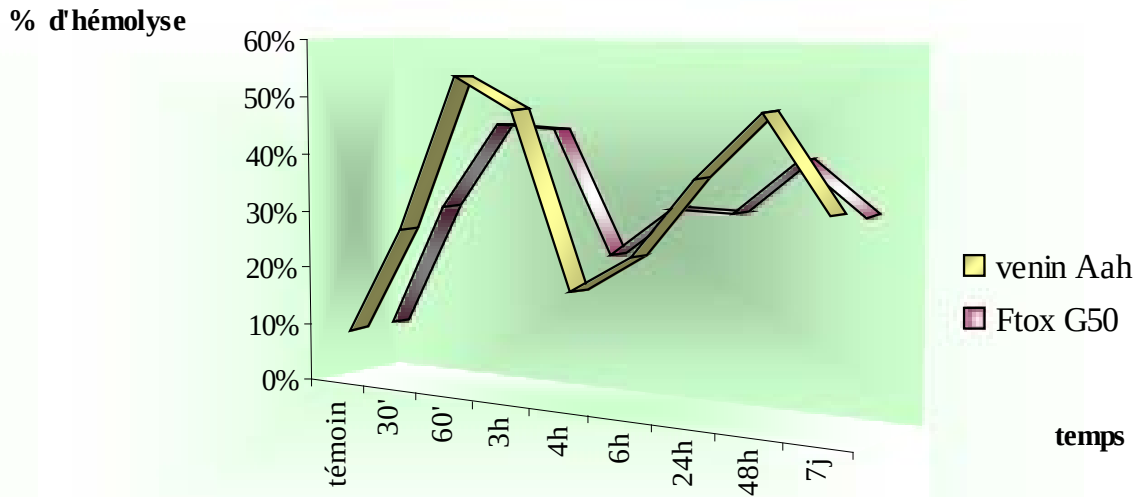


Figure 25 : Variations des pourcentages d'hémolyse du surnageant pulmonaire en présence du venin AaH sa fraction FtoxG50.

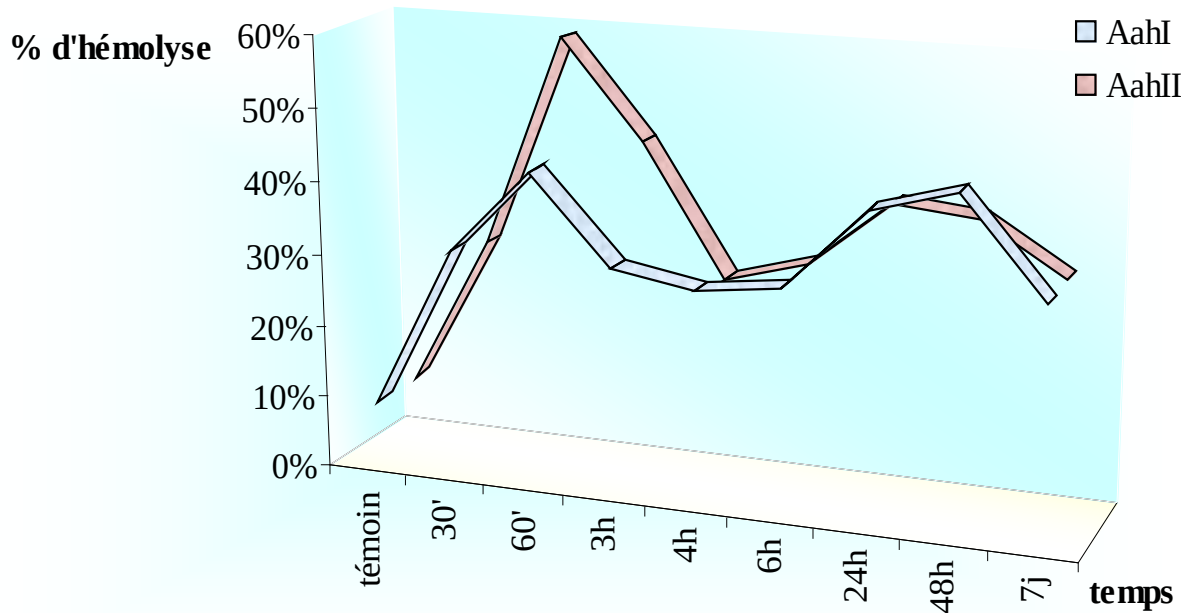


Figure 26 : Variations des pourcentages d'hémolyse du surnageant pulmonaire des toxines AaH I et AaH II.

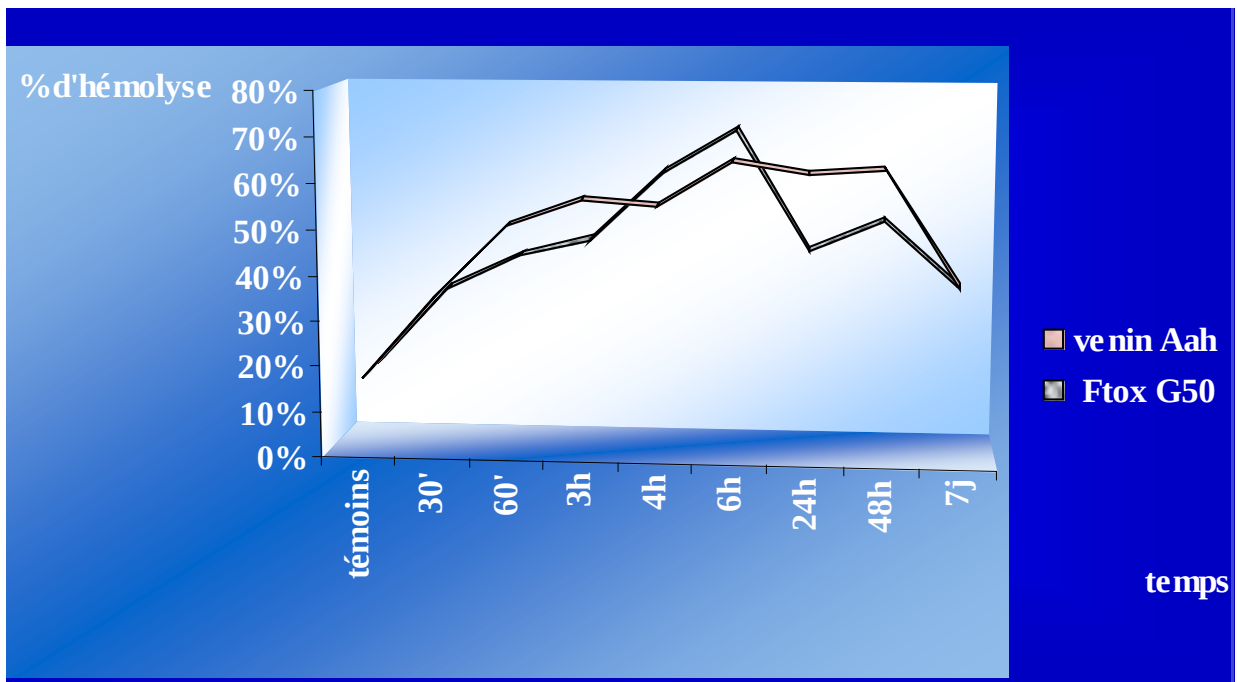


Figure 27 : Variations des taux d'hémolyse des surnageants hépatique en présence du venin AaH sa fraction G50

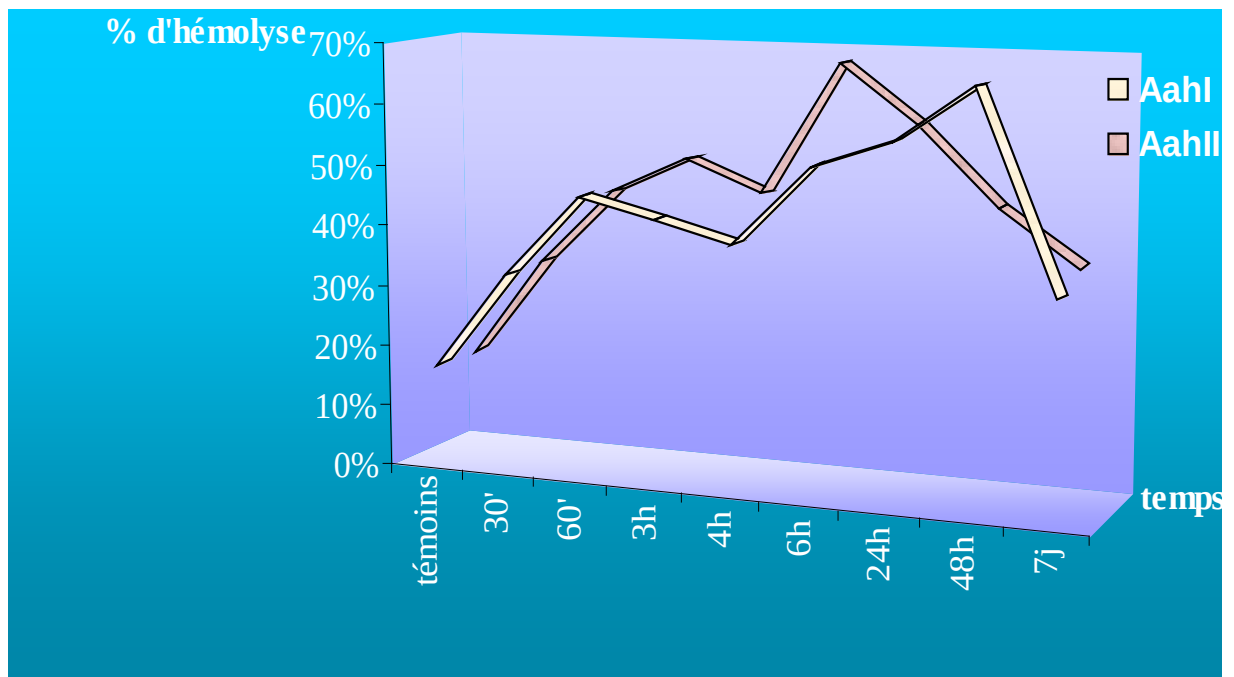


Figure 28 : Variations des taux d'hémolyse des surnageants hépatique en présence des toxines AaH I et AaH II

IV-2-dosage de certaines cytokines dans le foie en présence d'AaH I et d'AaH II :

Les auteurs associent la participation de cytokines et d'autres médiateurs inflammatoire dans les perturbations physiopathologiques induites par les venins de scorpion, l'augmentation sérique de cytokines pro et anti-inflammatoires a été déterminé chez l'homme et expérimentalement (Fukuhar et *al.*, 2003 ; D'Suze et *al.*, 2003 ; D'Suze et *al.*, 2004 ; Adi-Bessalem et *al.*, 2008).

Adi-Bessalem et *al.*, 2008 ont montré que le venin d'Aah provoque une augmentation rapide de cytokines pro inflammatoires sérique IL1 β , IL6 et TNF α avec un taux maximal à 60 minutes.

La présence de cytokines dans le foie est préalablement démontré (Derek et *al.*, 1999). Les résultats des dosages obtenus dans cette étude montrent une augmentation significatives des cytokines pro inflammatoires (IL1 β ; IL6) et anti-inflammatoire (l'IL10) ainsi que les molécules d'adhésion tel l'ICAM.

La toxine AahI après son injection, induit une augmentation du taux de cytokines dans le foie. L'IL1 β , l'IL6 et le TNF α sont des cytokines pro-inflammatoires, leurs taux reste significatif jusqu'à 24 h [figures 29, 33 et 30]. Ces niveaux très importants peut être expliqué par l'hyper activation de cet organe. La toxine Aah II agit de la même façon que Aah I, des taux élevés de TNF α (> à 2500 pg est détecté à 3 h) et d'IL6 (> à 450pg à 24 h), reflète le degré d'inflammation dans cet organe [figures 35 et 37]. Les effets de ces cytokines pro inflammatoires peuvent être contrôlés par les effets de cytokines anti inflammatoires telle que l'IL10 qui présente aussi des taux élevés (> à 500 pg à 6 h et plus de 400 pg à 24 h) [figure 36].

L'IL5 joue un rôle dans la libération des IgE essentiellement dans les poumons, son augmentation est aussi observée dans le surnageant hépatique, mais pas aussi important que les cytokines pro inflammatoires. La participation des molécules d'adhésion dans la sévérité de l'inflammation est aussi observée, le dosage de l'ICAM soluble est effectué, des taux important et précoce (> à 200 pg à 3 h) de ces molécules est évalué dans les surnageants hépatiques.

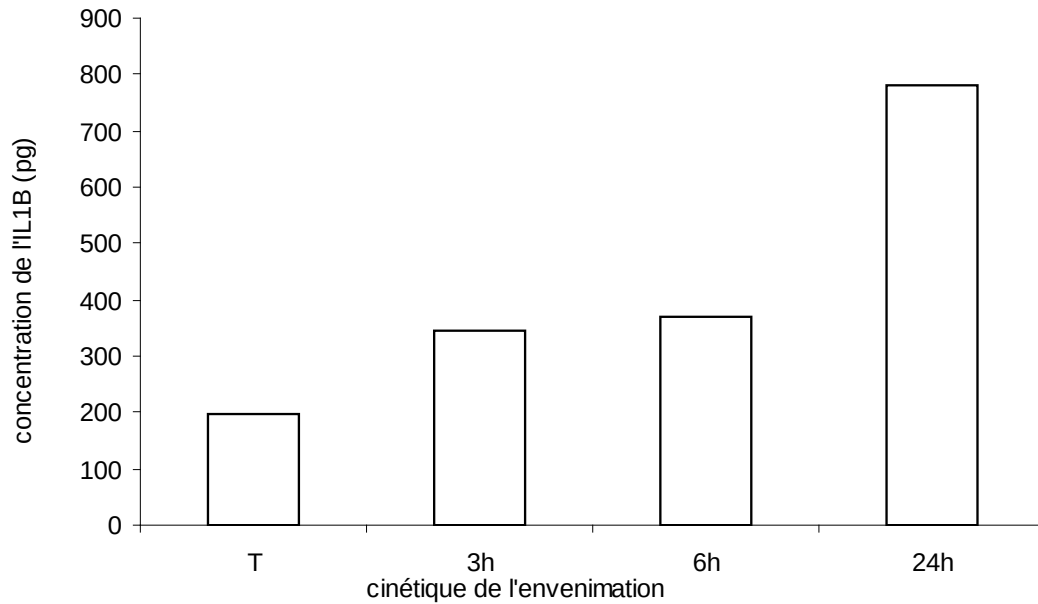


Figure 29 : variation des concentrations de l'IL1 β dans le foie en présence d'AahI.

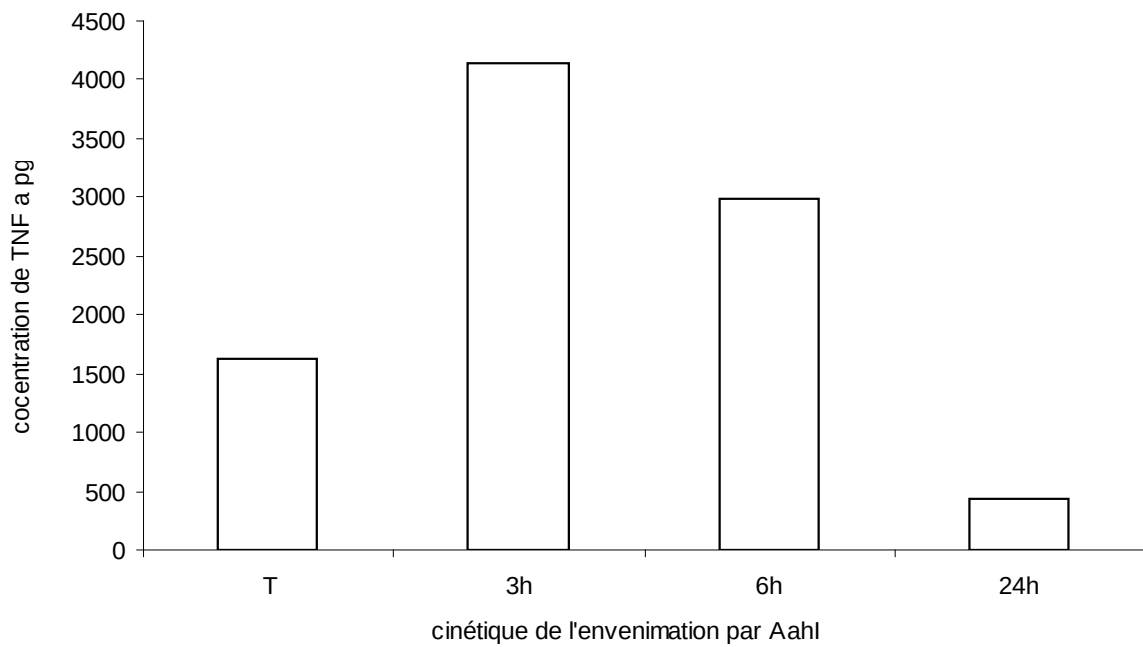


Figure 30: variation des concentrations de TNF α dans le foie en présence d'Aah I.

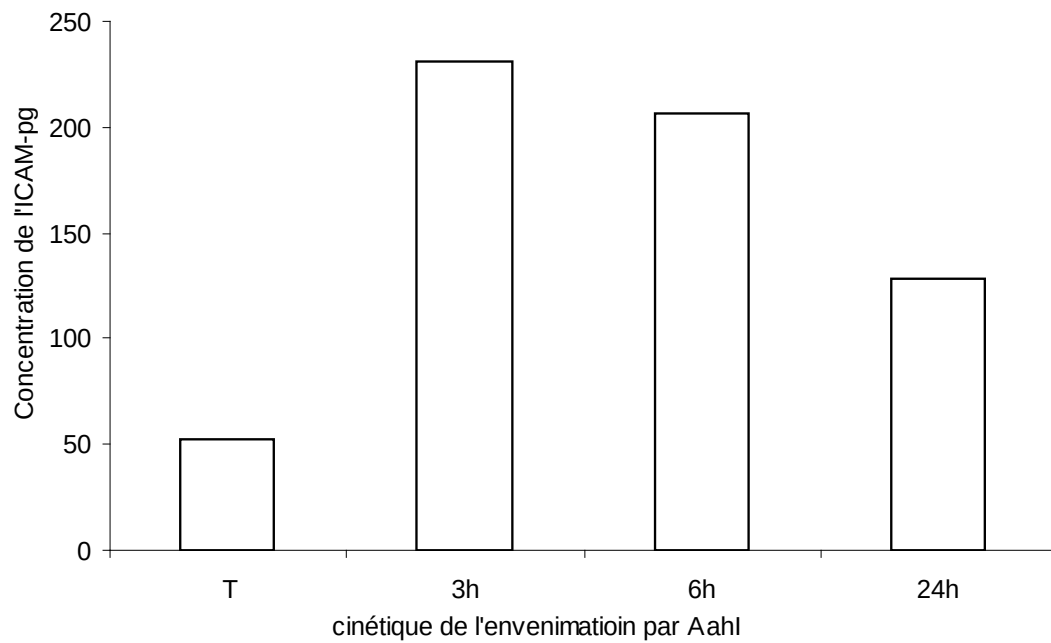


Figure 31: variation des concentrations de l'ICAMs dans le foie en présence d'AahI

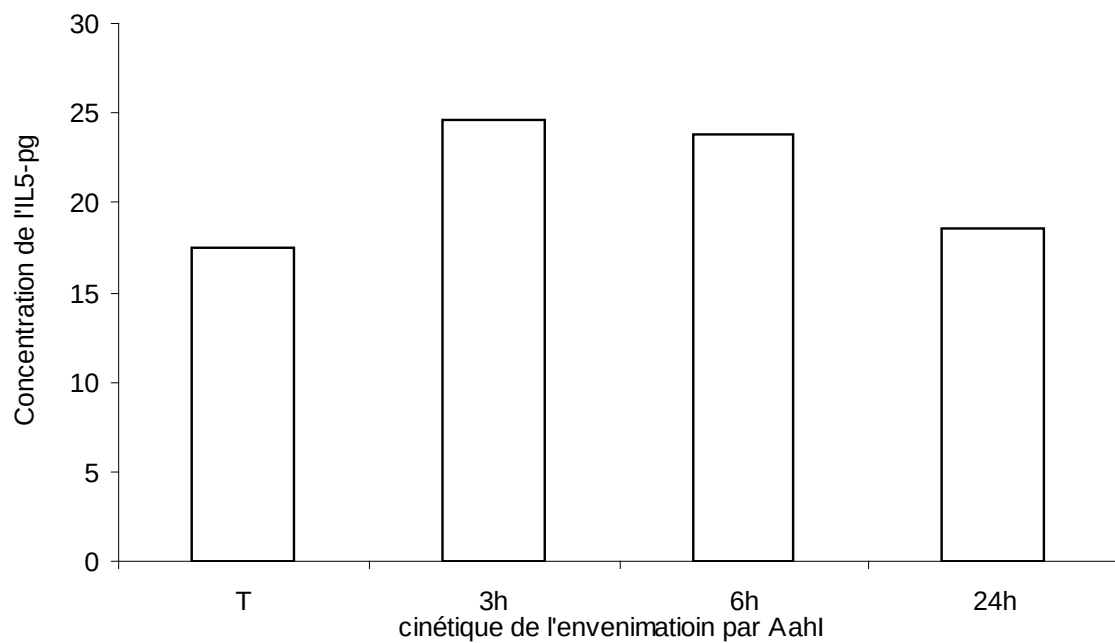


Figure 32: variation des concentrations de l'IL5 dans le foie en présence d'AahI.

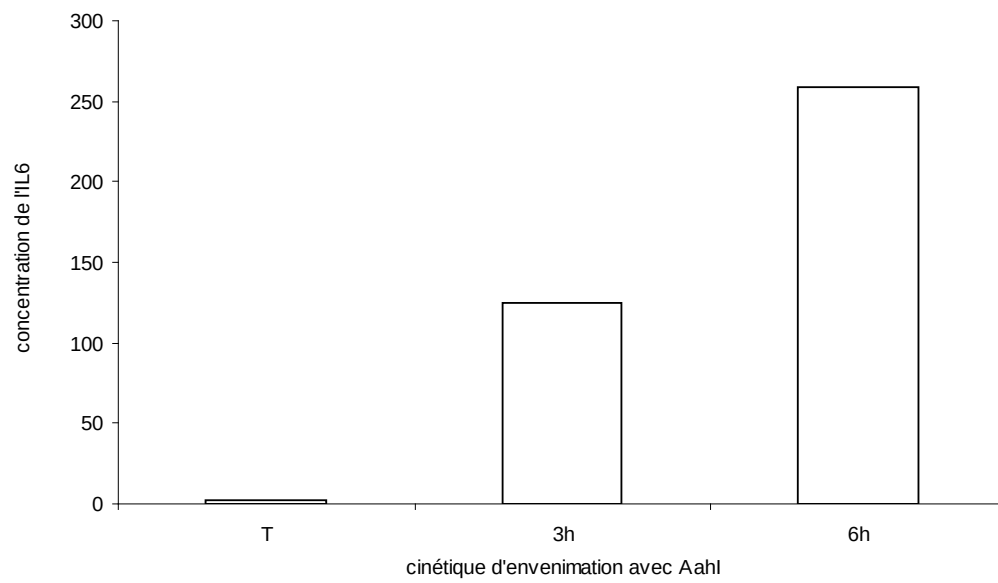


Figure 33: variation des concentrations de l'IL6 dans le foie en présence d'AaI.

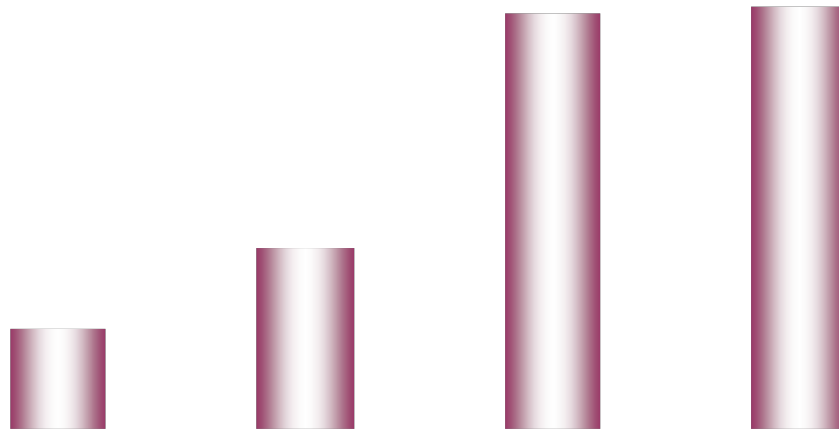


Figure 34: variation des concentrations de l'ICAMs dans le foie en présence d'AahII.

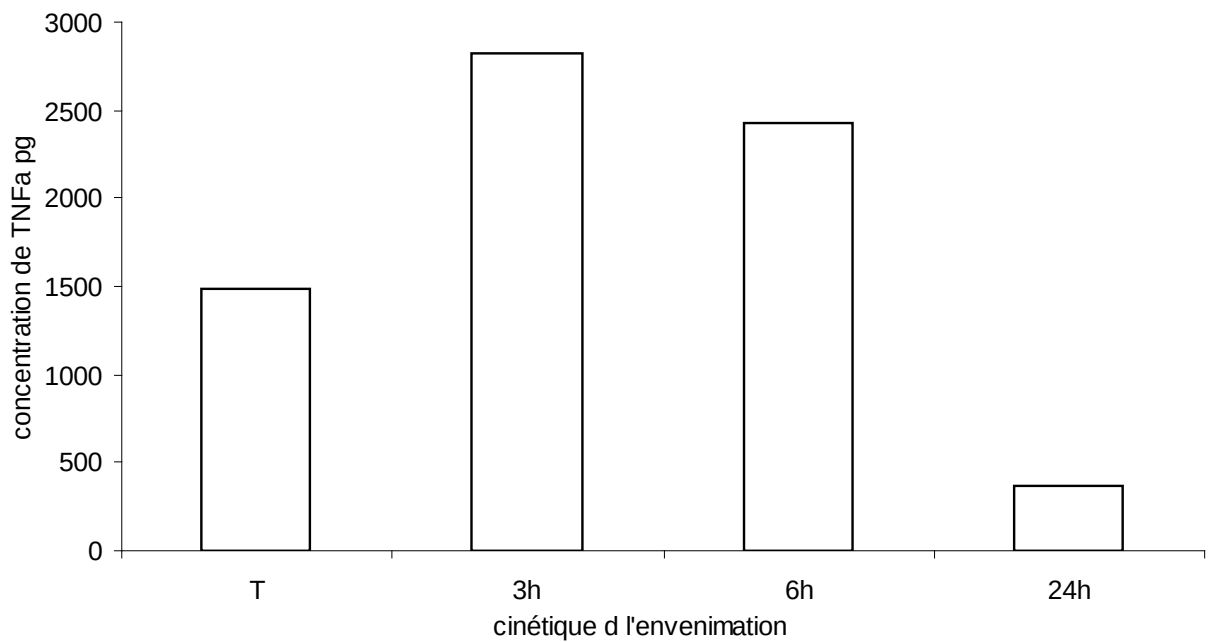


Figure 35 Variations des concentrations de TNFα dans le foie en présence d'AahII.

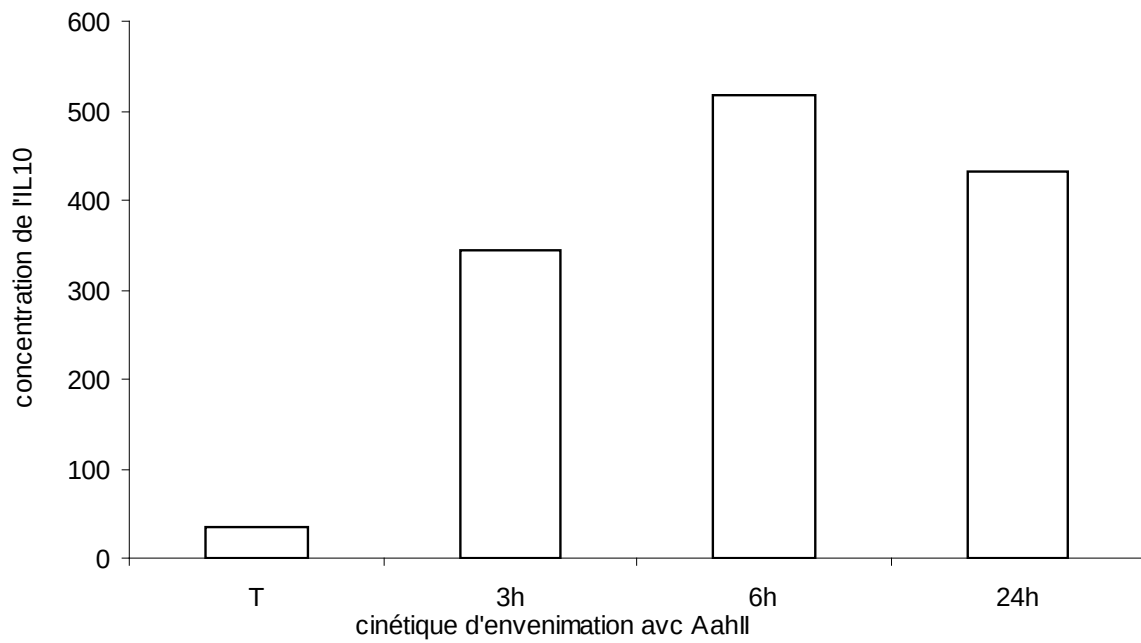


Figure 36: variation des concentrations de l'IL 10 dans le foie en présence d'AahII.

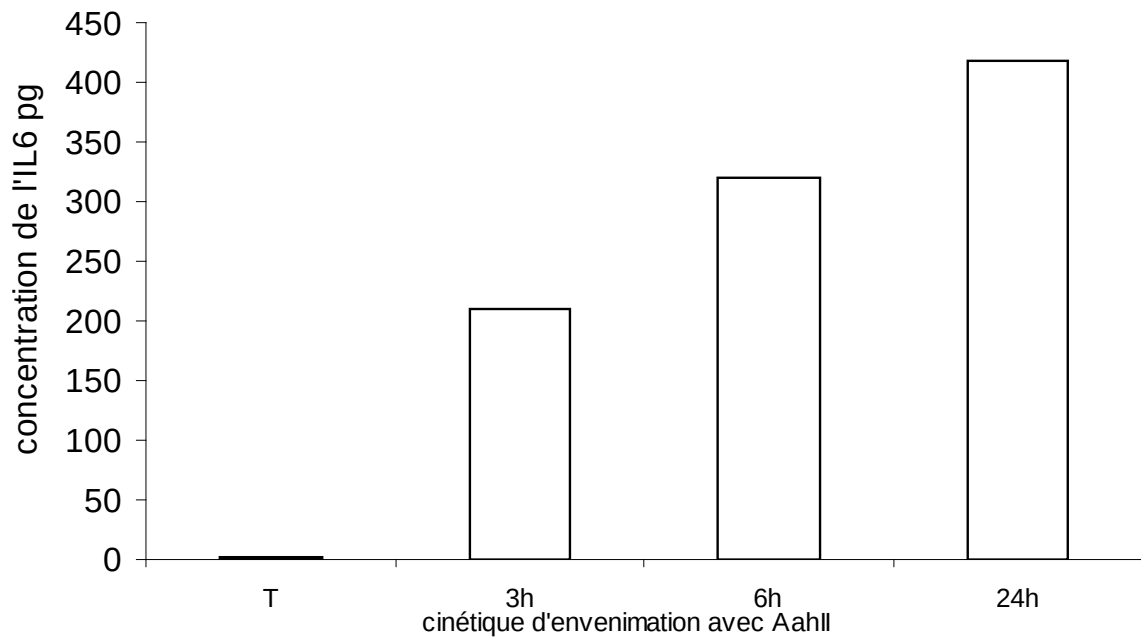


Figure 37 : variation des concentrations de l'IL6 dans le foie en présence d'AahII

IV-2-Analyse du processus inflammatoire induit par le venin *Androctonus australis* hector et ses fractions G50 et ses toxines AaH I et AaH II après prétraitement

IV-2-1-Effets de neurotransmetteurs sur l'activité du complément sérique :

L'atropine est un médicament utilisé dans les cas d'hypertension grave. C'est un antagoniste des récepteurs muscariniques de l'acétyle choline. Le propranolol est un antagoniste des récepteurs β_1 et β_2 adrénergiques, il est utilisé en thérapeutique dans les cas d'hypotension grave

Le prétraitement par l'atropine et par le propranolol devrait nous renseigner sur les effets des systèmes cholinergique et adrénergique sur l'inflammation induite par le venin d'Aah.

Une inhibition de l'activité du complément sérique quelque peu retardé est observée après 24 heures après prétraitement avec l'atropine, alors que le propranolol ne réduit pas cette activité mais il l'augmente.

IV-2-2-Effets de neurotransmetteurs sur l'activité du complément du surnageant pulmonaire :

Les neurotransmetteurs ont des fonctions physiologiques dans tous les organes de l'organisme, dans les poumons l'acétyle choline stimule la contraction de trachée et des muscles bronchique, l'adrénaline les relaxe, et stimule la sécrétion des glandes bronchiques.

Le prétraitement avec les deux drogues augmente légèrement l'activité du complément dans le surnageant pulmonaire dans une première phase (1 h et 3 h) et garde une même activité à 24 h. Ces résultats indiquent le contrôle de système immunitaire par les deux systèmes cholinergique et adrénergique.

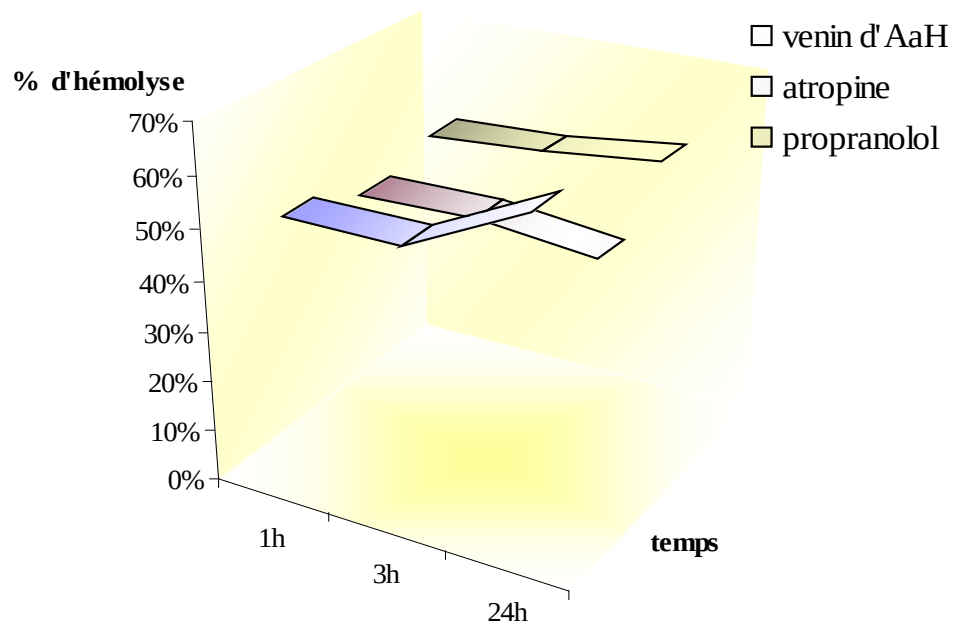


Figure 38 : variation de l'activité lytique du complément sérique des envenimés après prétraitement avec l'atropine et le propranolol

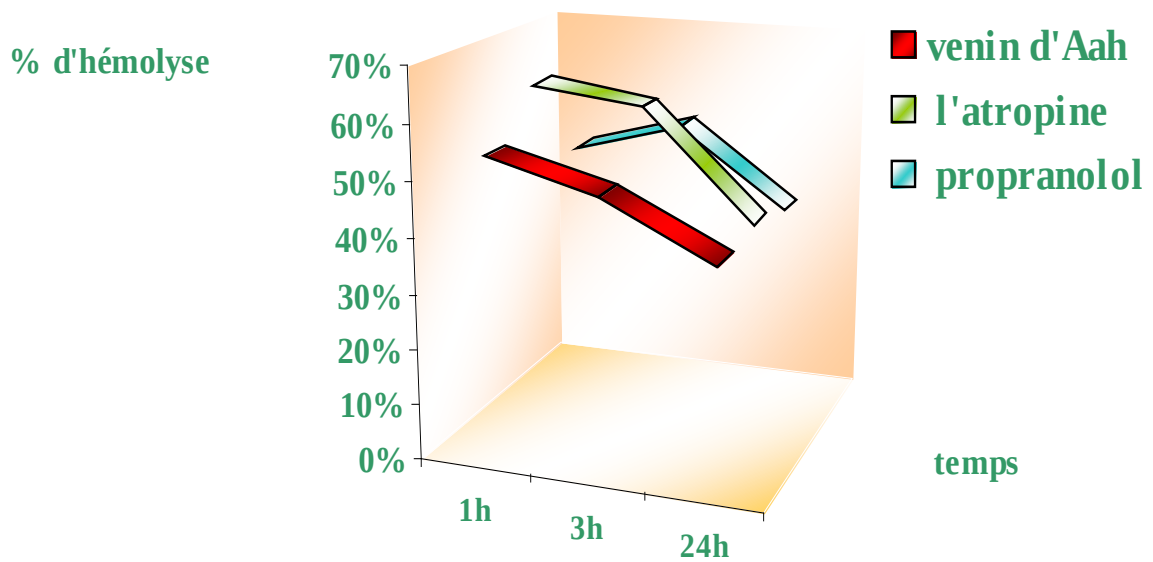


Figure 39 : Variations des pourcentages d'hémolyse du surnageant pulmonaire en présence du venin AaH après prétraitement avec l'atropine et le propranolol

IV-2-3-Effets de l'aprotinin sur l'activité du complément sérique:

L'aprotinin est un polypeptide, inhibiteur des serine protéases, c'est un anti-fibrinolytique et inhibiteur non spécifique de complément. Il est utilisé en thérapeutique au cours des chirurgies cardiaques. Des recherches montrent l'effet anti-chimio attractant de l'aprotinine (Koksal et *al.*, 2004, H. Altan et *al.*, 2009)

Pandey et Deshpande (2004) montrent que cette molécule protège contre les effets respiratoire et cardiaque anormaux induits par le venin de *Mesobuthus tamulus*.

Une inhibition de l'activité du complément sérique quelque peu retardé est observée après 24 heures. Cette inhibition est plus importante en présence qu'en présence de l'atropine.

IV-2-4-Effets de l'aprotinin sur l'activité du complément dans les poumons :

En se basant sur les propriétés pharmacologiques de l'aprotinin, les dosages de l'activité du complément dans le surnageant pulmonaire semble effectué. Cette activité diminue à 3h, mais ré augmente après 24 h. En plus de ses propriétés inhibitrices des protéases, l'aprotinine peut aussi présenter des propriétés antigéniques.

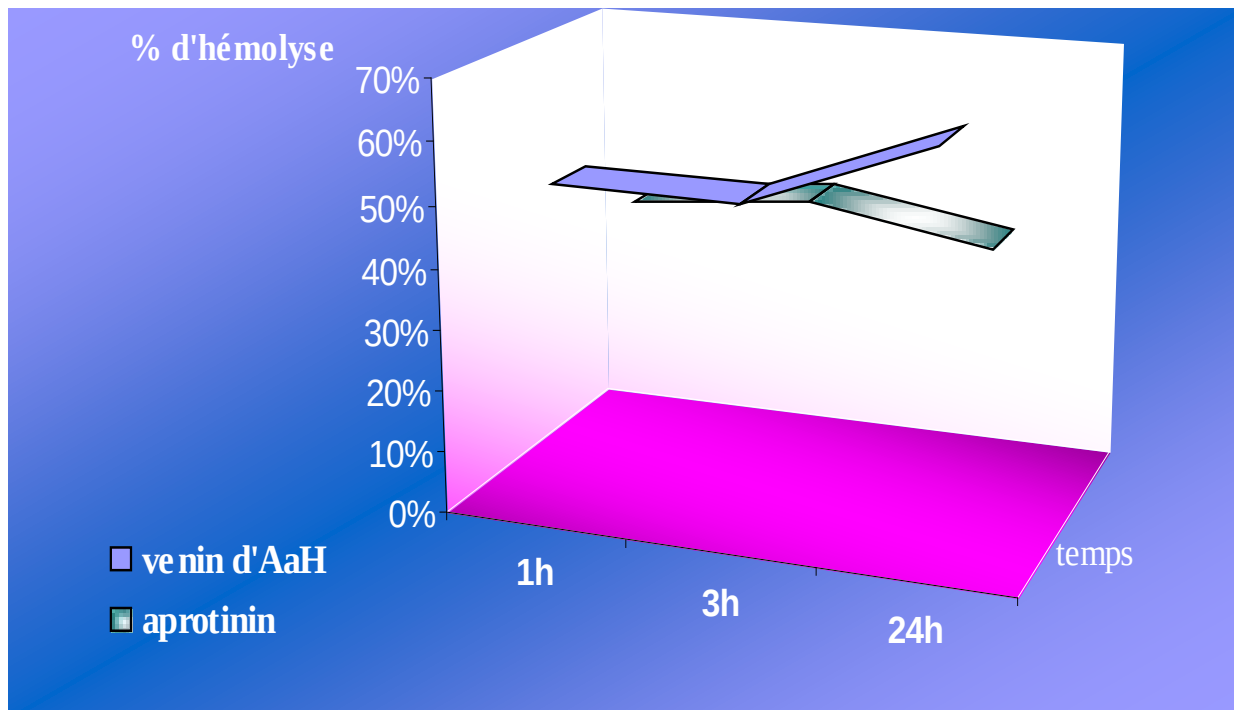


Figure 40 : Variation de l'activité lytique du complément sérique des envenimés après prétraitement avec l'atropine et le propranolol

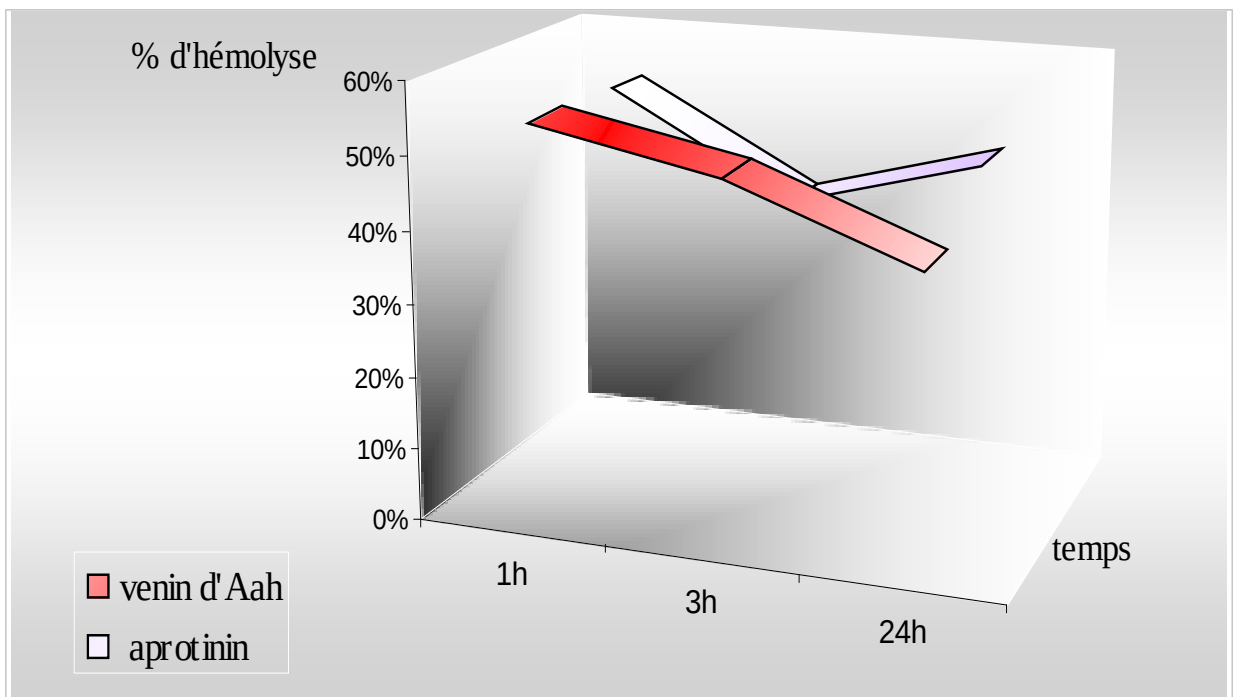


Figure 41 : Variations des pourcentages d'hémolyse du surnageant pulmonaire en présence du venin AaH après prétraitement avec l'aprotinine.

IV-2-3-Effets de neurotransmetteurs et de l'aprotinin sur les modifications histopathologique après envenimation dans les poumons :

Le tissu pulmonaire présente une architecture qui convient à sa fonction de respiration, les bronchioles possèdent un épithélium cylindrique cilié avec quelques cellules caliciformes. Les alvéoles sont des polyèdres hexagonaux bordées par un épithélium pavimenteux très aminci mais complet. Les cellules alvéolaires sont des pneumocytes, granuleuses, qui peuvent reposer dans la profondeur de l'épithélium de surface, les macrophages résident aussi le parenchyme pulmonaire.[figure 42 et 44].(Lesson et Lesson 1980)

Le venin d'Aah perturbe cette architecture, les coupes histologiques montrent une turgescence de vaisseaux avec dépôt de scléroyaline, rétrécissement des alvéoles associé à accentuation de l'infiltrat inflammatoire et hypertrophie cellulaires [figures 42 et 44 et 45]. Des résultats similaires ont été retrouvés après envenimation expérimentales de modèle murin

avec une dose sublétales de venin d'Aah (Sami-Merah et Laraba-Djebari, 2001; Abib et Laraba-Djebari, 2002; Bessalem et *al.*, 2003; Hammoudi-Triki et Laraba-Djebari, 2004).

Le propranolol, l'atropine et l'aprotinin corrigent faiblement ces aspects en diminuant le rétrécissement alvéolaire et le degré d'hypertrophie cellulaire et en particulier l'abaissement de l'infiltrat inflammatoire [Figures 42, 43, 44, et 45].

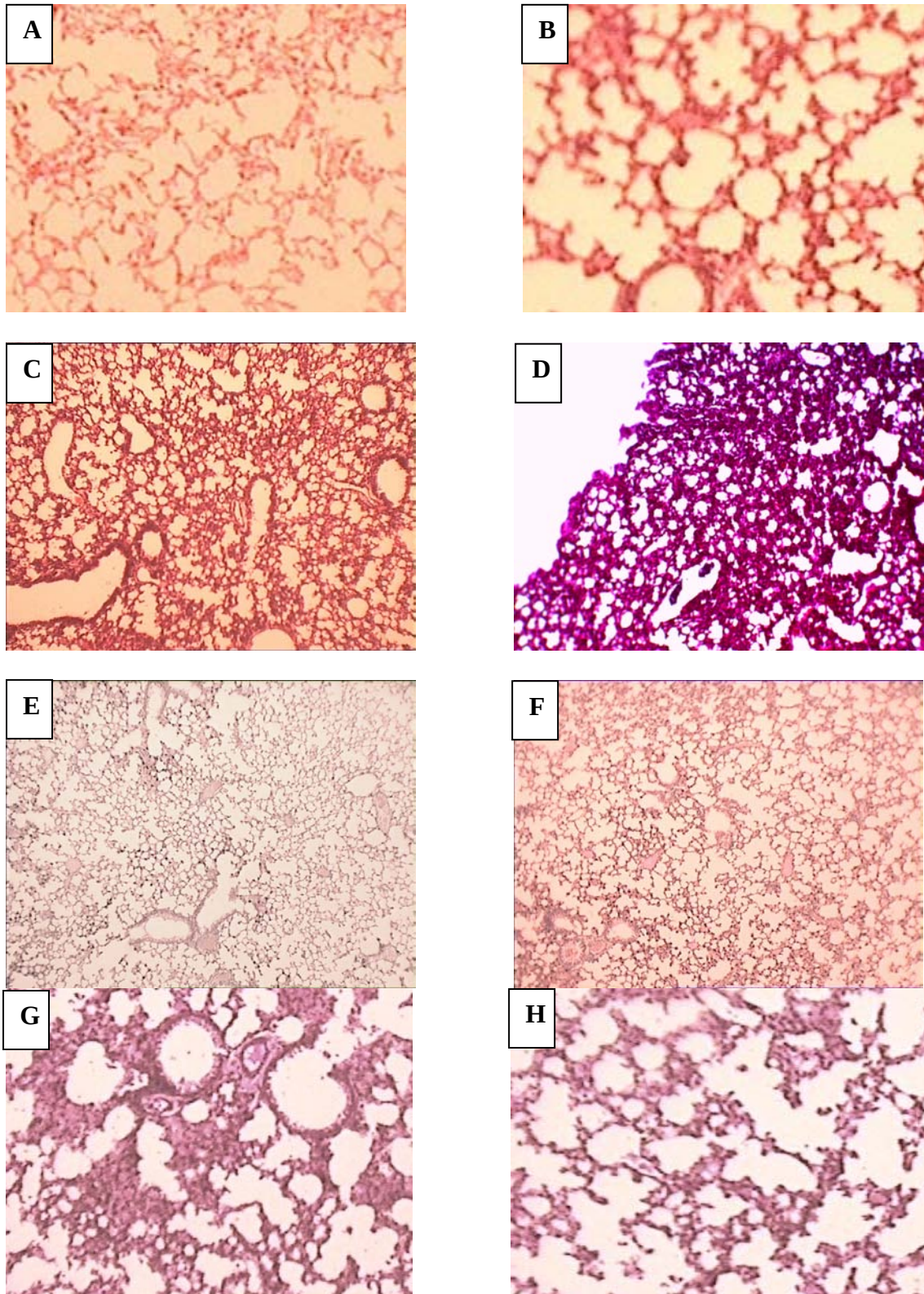


Figure 42 : effets des neurotransmetteurs sur les modifications histopathologique sur le du parachyme pulmonaire induites par le venin d'Aah (10 μ g/20 g de souris) 24 h [coloration hématoxyline - éosine.Obj10] (A et B) : témoin, (Cet D) : venin seul, (E et F) : prétraitement avec l'atropine, (G et H) : prétraitement avec le propranolol.

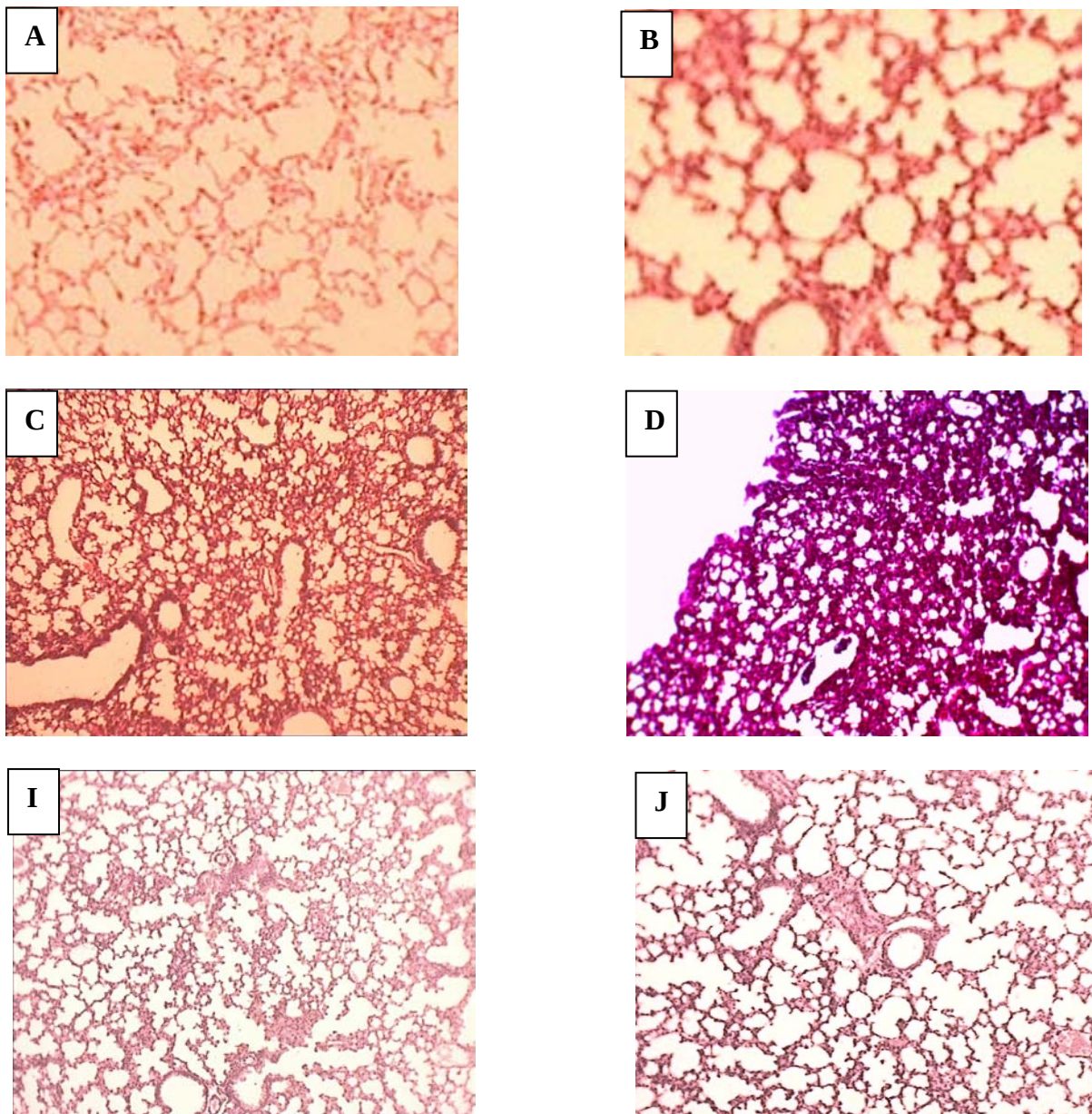


Figure 43 : effets de l'aprotinin sur les modifications histopathologiques du parenchyme pulmonaire induites par le venin d'Aah (10 µg/20 g de souris) 24h [coloration hématoxyline-éosine.Obj10]
(A et B) : témoin, (C et D) : venin seul, (I et J) : prétraitement avec l'aprotinin.

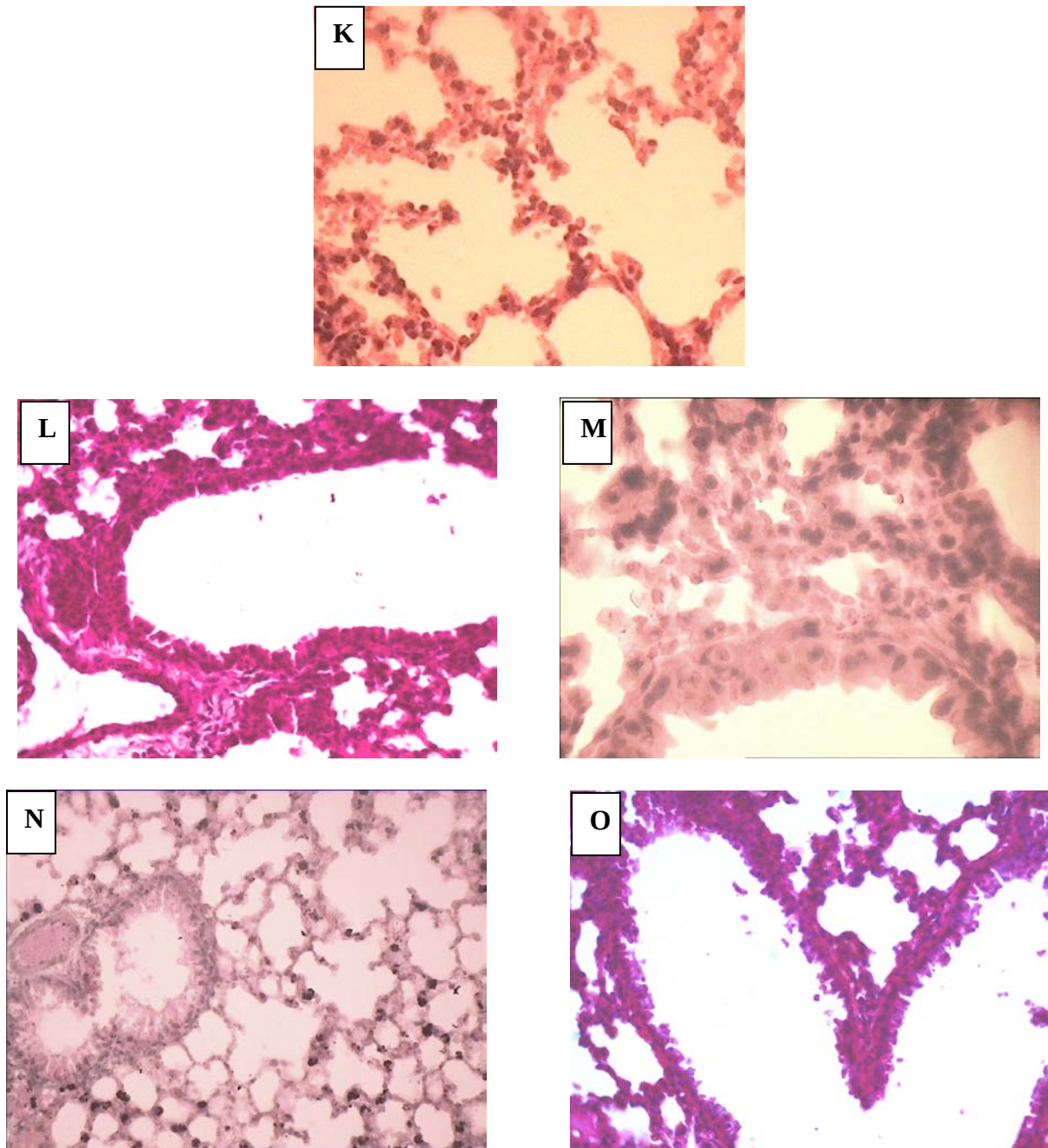


Figure 44 : Effets des neurotransmetteurs sur les modifications histopathologiques du parenchyme pulmonaire induites par le venin d'Aah (10 μ g/20g de souris) après 24 h [coloration hématoxyline-éosine. Ob jx 40) sauf M Obj 100]
Témoin : (K) ; Venin seul : L et M; : Prétraitement avec l'atropine : N, : prétraitement avec le propranolol : O

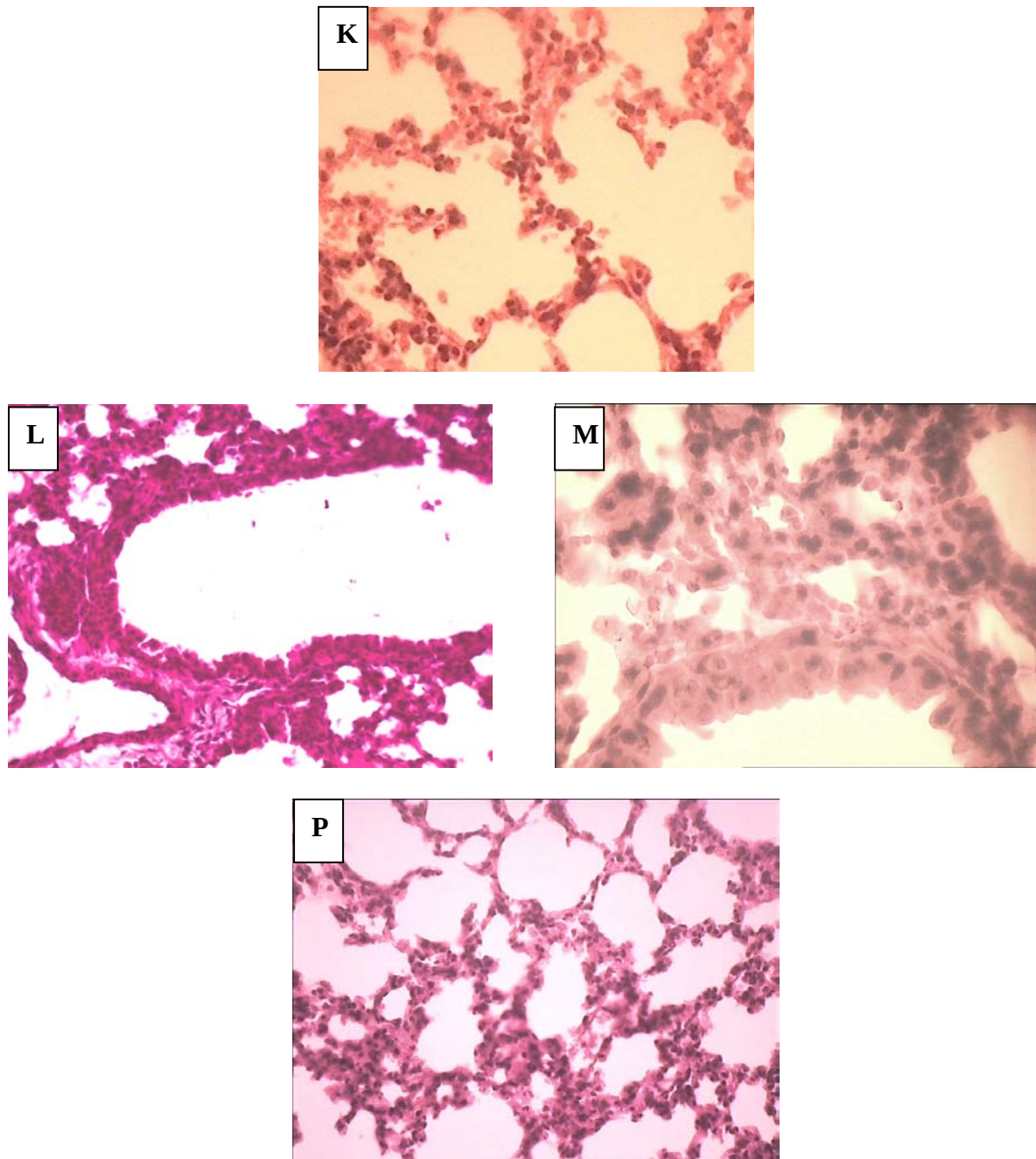


Figure 45: effets des neurotransmetteurs sur les modifications histopathologique du parenchyme pulmonaire induites par le venin d'Aah sur les poumons (1 0 μ g/20 g de souris) après 24 h [coloration hématoxyline-éosine.Obj x 40 sauf M Obj x 100] : Témoin : K, venin seul : L et M, Prétraitement avec l'aprotinine : P.

IV-2-4-Effets des neurotransmetteurs et de l'aprotinine sur les modifications histopathologique du parenchyme hépatique après envenimation

Le foie est composé d'un amas de cellules épithéliales parenchymateuses arrangées en travées anastomosées et ramifiées, qui forment un treillis tridimensionnels. Entre les travées se trouvent les sinusoides sanguines, ses cellules sont polygonales avec membranes plasmiques bien visibles (Lesson et Lesson 1980).

Le venin d'AaH perturbe l'organisation des travées et induit une vacuolisation. L'augmentation de l'activité hépatocyte est traduit par une augmentation du volume cellulaire. Des résultats similaires ont été retrouvés après envenimation expérimentale de modèle murin avec une dose sublétales de venin d'Aah (Sami-Merah et Laraba-Djebari, 2001; Abib et Laraba-Djebari, 2003; Bessalem et *al.*, 2003; Hammoudi-Triki et Laraba-Djebari, 2004

Les traitements utilisés sont capables de restaurer l'architecture des travées et réduire l'intensité de stress appliqué sur les hépatocytes par le venin d'Aah, avec une diminution de nombre de cellules vacuolisées.

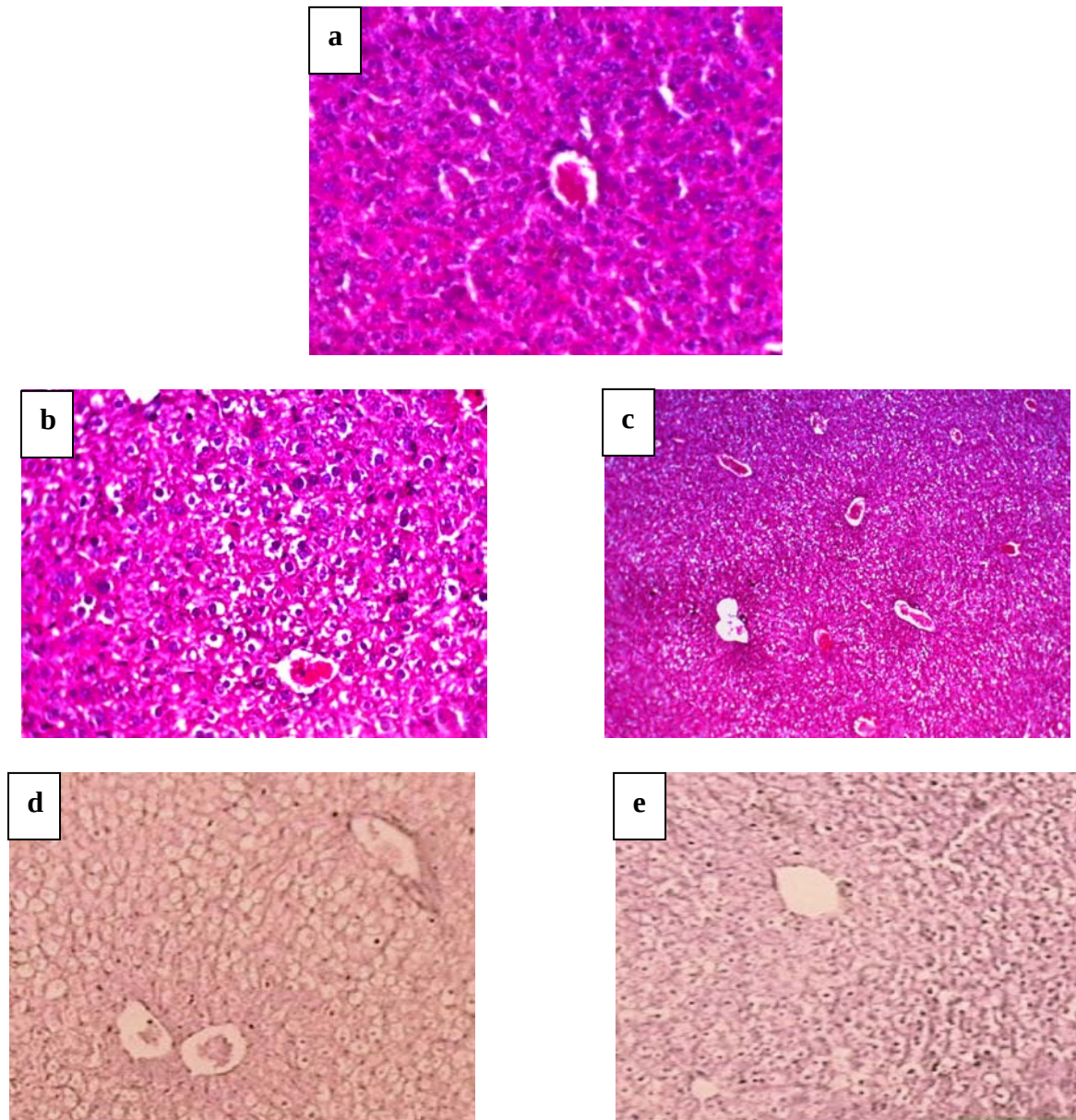


Figure 46: Effets de l'aprotinin et des neurotransmetteurs sur les modifications histopathologiques du parenchyme hépatique induites par le venin d'Aah sur le foie (10 μ g/20 g de souris) après 24 h [coloration hématoxyline-éosine.Obj x 10]

(a) : témoin, (b) : venin seul, (c) : prétraitement avec l'aprotinin, (d) : prétraitement avec l'atropine, (e) : prétraitement avec le propranolol

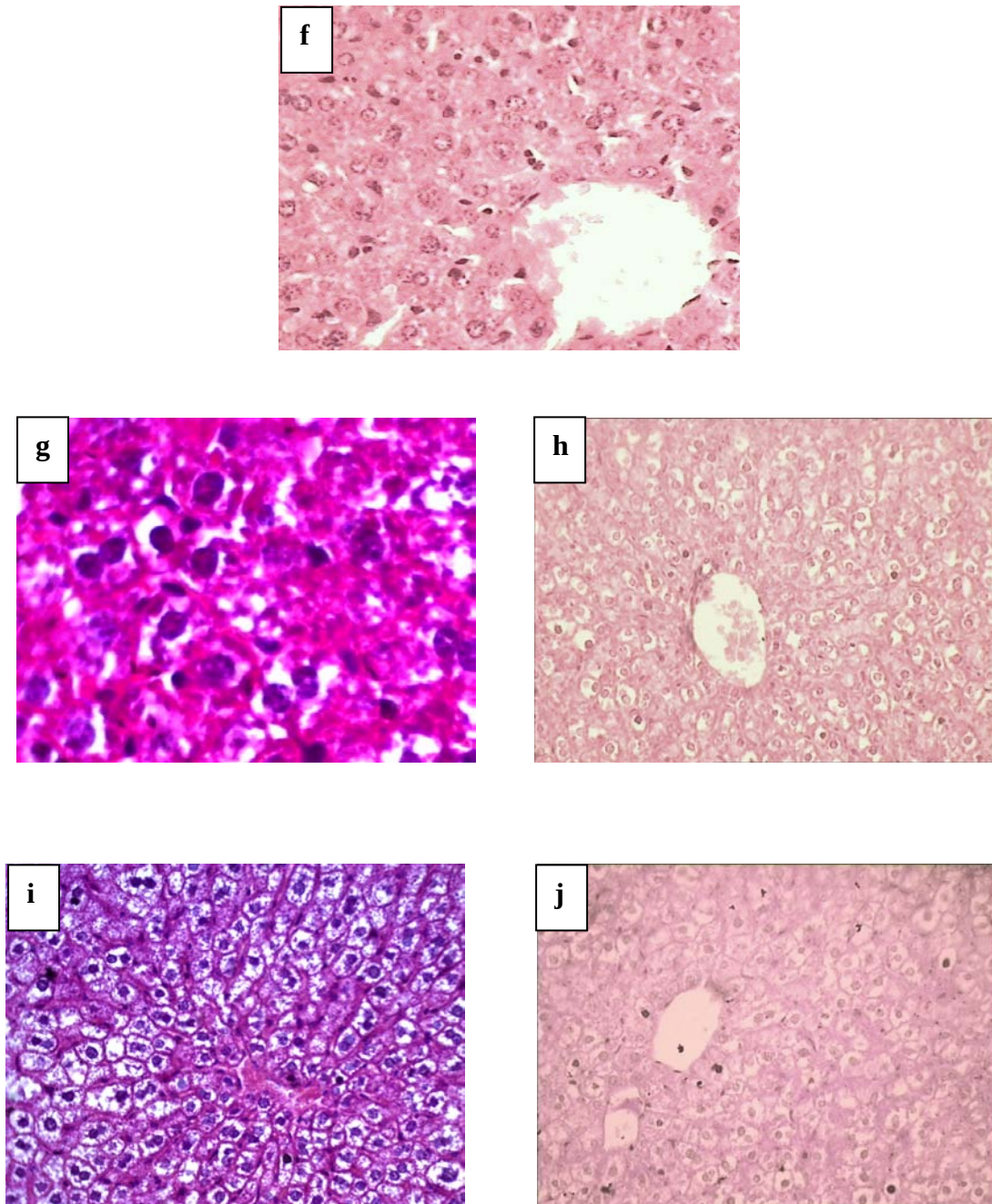


Figure 47: Effets de l'aprotinin et des neurotransmetteurs sur les modifications histopathologiques sur le parenchyme hépatique induites par le venin d'Aah sur le foie (10 μ g/20g de souris) après 24h [coloration hématoxyline-éosine.Obj40]
 (f): témoin, (g): venin seul, (h): prétraitement avec l'aprotinin, (i): prétraitement avec l'atropine, (j): prétraitement avec le propranolol

V-DISCUSSIONS :

Dans le but d'étudier le rôle du système immunitaire et de certains de ses composants moléculaires lors d'une envenimation scorpionique, nous avons testés le pouvoir lytique du complément sérique et tissulaires (foie, poumon) compléter par le dosage de quelques cytokines.

Les résultats des tests hémolytiques du complément sérique, pulmonaire ou hépatique montrent, des augmentations qui durent jusqu'à 24 h et persistent de manière considérable au 7^{ème} jour.

Après administration de venin d'AaH, de sa fraction Ftox G50, ou de ses toxines AaH I et AaH II, une réponse immunitaire se déclenche et fait l'appel à tous ses acteurs cellulaires et moléculaires. Le système du complément représente un mécanisme de défense plutôt non spécifique et se classe ainsi parmi les éléments de l'immunité innée.

Bertazzi (2003) à montré la consommation rapide du complément après l'envenimation avec le venin de scorpion *Tityus serrulatus*, il a observé un premier pic à 1 h qui serait due à l'effet direct de venin, et un deuxième à 24 h et probablement une conséquence de la synthèse des composants du complément induit par la réaction inflammatoire de l'envenimé. En 2005, ce même auteur, a montré que ce venin actif le système du complément in vitro et recrute le leucocyte dans le "boyden chamber".

Les composants de venin d'*Androctonus australis hector* activent le système du complément dès la 30^{ème} minute de leur administration, ce qui indique leur degré d'immunogénéicité. Ceci est confirmé par leur capacité d'induire la production précoce d'anticorps. La constance des niveaux élevés (70% d'hémolyse à 24 h,) du pouvoir lytique au niveau sérique ou dans les surnageants du poumon ou du foie, peut être due à la synthèse des composants du complément ou à la libération de son stock protéiques après lyse tissulaire. Cette lyse est corrélée avec la l'augmentation sérique des marqueurs d'hépatotoxicité GOT, GPT, LDH et PAL (MERAH, 2001)

Le taux élevé de l'activité lytique observé à 1 h dans le poumon renforce l'idée de l'intervention du complément dans l'accentuation de l'infiltrat inflammatoire et dans l'œdème pulmonaire observé après envenimation. Le complément activé joue un rôle dans l'amplification de l'inflammation, le chimiotactisme de leucocytes, l'augmentation de la perméabilité vasculaire et la contraction des muscles lisses (Michael Kirschfink, 1997).

Le complément hyperactif peut entraîner des dommages au niveau des tissus. Les cellules sont protégées contre l'effet délétère du complément via des récepteurs tel que CR1, MCP, GPI, CD55. Son contrôle est strictement suivi dans les conditions physiologiques, (Devine., 1991). Le complément joue un rôle dans la première phase d'activation, avec apparition les d'altérations tissulaires observés après une envenimation et en deuxième phase comme modulateur de la réponse inflammatoire induite par le venin (Mastellos et al, 2001).

Les cytokines fonctionnent en synergie avec le complément dans l'amplification de l'inflammation. Les récepteurs de C3a et de C5 sur les monocytes transmettent des signaux de production de cytokines pro inflammatoires, tel que l'IL1, l'IL8, l'IL6 et le TNF α . A des taux élevés, ce dernier peut induire la mort des hépatocytes (Shagdarsuren et al., 2008 ; Antoniadès et al., 2008).

L'étude d'inhibition du complément pour réduire ses effets néfastes est abordée par des antagonistes des récepteurs des fragments actifs du complément. L'inhibition même faible de l'activité de complément par l'atropine et non pas par le propranolol indique qu'il y a un contrôle de système immunitaire par les neurotransmetteurs.

L'effet inhibiteur de l'aprotinine indique l'interaction entre le système du complément, le système des kinines, le système de coagulation et l'implication de ces deux derniers dans la pathophysiologie induite par le venin d'AaH.

Les cytokines jouent un rôle important durant les processus inflammatoires, leurs dosages après les envenimations sont largement attribués.

Une augmentation importante de l'IL1 α ; IL1 β , IL6, IFN γ ,et GM-CSF,IL10 et l'IL8 est observée chez les patients envenimés par *Tityus serrulatus*, l'augmentation de l'IL6 est souvent corrélée avec la sévérité de l'envenimation (Magalhaes et al.,1999 ; D'Suze et al., 2003 ; Fukuharaa et al.,2003 ; Abdel-Haleem et al., 2006))

L'IL8 semble être un facteur important dans la pathogénèse des lésions de myocarde après envenimation scorpionique. L'étude de Wan et Yi (1999) qui montre que l'IL8 produite localement au niveau cardiaque, active les leucocytes et leur accumulation dans le myocarde. L'administration des anticorps anti IL8 chez des lapins les protège contre les lésions cardio-pulmonaires (Boyle et al 1998).

Les résultats obtenus dans cette étude, montrent des taux élevés de cytokines pro inflammatoire (IL1B, et IL6) et anti-inflammatoire l'IL10, et l'ICAM après envenimation.

L'augmentation de l'ICAM sérique indique son rôle dans l'adhésion et la diapédèse des leucocytes. Les lésions observées au niveau du tissu hépatique seraient probablement dues à l'effet des cellules T cytotoxiques et au pouvoir lytique du complément au niveau du foie. La libération des facteurs de l'hépatocytotoxicité (GOT et LDH...), La forte libération de cytokines dans cet organe, peut être inter-contrôlée et modulées par les hépatocytes eux-mêmes et les cellules T du foie.

La compréhension des mécanismes moléculaires, le rôle de chaque cytokine dans le contrôle et la modulation des processus inflammatoires induits par le venin et ses toxines restent à élucider.

CONCLUSION

V-CONCLUSION :

Le venin d'*Androctonus australis hector*, sa fraction F_{Tox} G50 et ses toxines AaH I et AaH II activent le système du complément en deux phases d'une manière significative, la première est observée avec un pic à 3 heures et la seconde à 24 heures.

Le complément actif en synergie avec les cytokines participerait dans les altérations tissulaires observées après une envenimation scorpionique.

L'inhibition même faible de l'activité de complément par l'atropine et non pas par le propranolol indique qu'il y a un contrôle du système immunitaire par les neurotransmetteurs. Celle induite par l'aprotinine indique l'interaction du système du complément avec le système des kinines, le système de coagulation et l'implication de ces deux derniers dans la pathophysiologie induite par le venin d'AaH.

Les taux massives de cytokines pro- et anti-inflammatoires libérées dans le tissu hépatique, reflètent la sévérité du syndrome inflammatoire au niveau des lésions observées au après une envenimation avec le venin de scorpion.

BIBLIOGRAPHIE

Abdel-Haleem AH., Meki AR., Noaman HA., Mohamed ZT. (2006): Serum levels of IL-6 and its soluble receptor, TNF-alpha and chemokine RANTES in scorpion envenomed children: Their relation to scorpion envenomation outcome. *Toxicon* **47**(4): 437–444.

Abdel-Haleem AH, Abdel-Raheim, M.A Meki , Hanan A. Noaman C, Zaghloul T. Mohamed. (2003) Significance of assessment of serum cardiac troponin I and interleukin-8 in scorpion envenomed children. *Toxicon* **41**, 129–137.

Abdoon N.A., Fatani A.J(2009): Correlation between blood pressor, cutokines and nitric oxide in conscious rabbits injected with *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus* scorpion venom. *Toxicon* **54**: 471-480.

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

Adi-Bessalema S, Hammoudi-Triki D., Laraba-Djebari F, (2008) Pathophysiological effects of *Androctonus australis hector* scorpion venom: Tissue damages and inflammatory response. *Experimental and Toxicologic Pathology* **60**, 373–380.

Almeida A.P., Alpoim N C., Freire-Maia L (1982): effects of purified scorpion toxin (TYTYUSTOXIN) on the isolated guinea pig heart. *Toxicon* **20**(5): 855, 865.

Alves P, GuidineM, Moraes-Santos T., Massensini A.R, Dutra Moraes M.F (2008): Carbamazepine is effective in the treatment of 21-day-old Wistar rats injected *with Tityus serrulatus* crude venom .*Brain Research*, **1239**:256-260.

Amaral C.F.S, Alves de Rezende N, Freire-Maia L, (1992): Acute Pulmonary Oedema After *Tityus Serrulatus* Scorpion Sting in Children.*The American journal of cardiology* **71**:242-245

Amara, S.G. (1996): Neurotransmitter transporters: new insights into structure, function and pharmacology. *Rev. Bras. Biol* **56**, 5–19.

Arumugam T.V, Woodruff T.M, Lathia J.D, Selvaraj P.K, Mattson M.P, Taylor S.M (2009)Neuroprotection in stroke by complement inhibition and immunoglobulin therapy *Neuroscience*, **158**:1074-1089.

Arumugam T.V, Magnus T, Woodruff T.M, Proctor L.M, Shiels I.A, Taylor S.M (2006): Complement mediators in ischemia–reperfusion injury. *Clinica Chimica Acta*, **374**, 33-45.

Bawaskar H.S, Bawaskar P.H. (1994): Vasodilators: Scorpion envenoming and the heart (an Indian experience). *Toxicon* 32:1031-1040.

Bawaskar H.S, Bawaskar P.H (1992): Treatment of envenoming by *Mesobuthus tamulus* (Indian red scorpion) *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 86:459

Bertazzi DT., de Assis-Pandochi AI., Talhaferro VL., Caleiro Seixas Azzolini AE., Pereira Crott LS., Arantes EC, (2005): Activation of the complement system and leukocyte recruitment by *Tityus serrulatus* scorpion venom. *International Immunopharmacology* 5(6): 1077-1084.

Bertazzi DT., de Assis-Pandochi AI., Talhaferro VL., Caleiro Seixas Azzolini AE., Pereira Crott LS., Arantes EC, (2003) : Effect of *Tityus serrulatus* scorpion venom and its major toxin "TsTX-I" on the complement system in vivo. *Toxicon* 41(4):501-508.

Ben Nasr H., Serria. H (2008): Some biological effects of scorpion envenomation in late pregnant rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*.

Bonifati D.M, Kishore U (2007): Role of complement in neurodegeneration and neuroinflammation *Molecular Immunology* 44: 999-1010.

Bosmans. F, Martin-Eauclaire. M.F, Tytgat J (2005): The depressant scorpion neurotoxin LqqIT2 selectively modulates the insect voltage-gated sodium channel. *Toxicon* 45 : 501–507.

Bosmans. F ET Jan Tytgat (2007): Voltage-gated sodium channel modulation by scorpion α -toxins. *Toxicon* 49:142-158.

Bosmans. F, Martin-Eauclaire. M.F, Tytgat J (2007): Differential effects of five 'classical' scorpion β -toxins on rNav1.2a and DmNav1 provide clues on species-selectivity *Toxicology and Applied Pharmacology* 218: 45–51.

Broswell. P ET Gary Polis (2001): Scorpion biology and research, Oxford university press.

Bougis. P. E, Rochat. H, Smith. L. A (1989): Precursors of *Androctonus australis hector* Scorpion Neurotoxins. *The Journal of Biological Chemistry* 264:19259-19265.

Bouahaouala-Zahra.B.,Benkhalifa.R., Srairi N.,Zenouaki I., Lingny-Lemaire C., Drevet P., Sampieri F., Pelhate m., el Ayeb M., Ménez A., Karoui H., et Ducancel F(2002)

A chimeric scorpion α toxin displays de novo electrophysiological properties similar to those of α like toxins. *Eur. J. Biochem* **269**: 2831-2841.

Boyle E.M, Kovacich J.C, Hèbert C.A, Canty T.G., Chi E, Morgan E.N, Pohlman T.H, Verrier E.D (1998) Inhibition Of Interleukin-8 Blocks Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 116:114-121.

Carballar-Lejarazffla R, Rodr_gueza M. H, de la Cruz Hern_nde-Hern_nde F, Ramos-CastaÇedaa J, Possanic L. D, Zurita-Ortegac M, Reynaud-Garzac E, Hern_nde-Rivasd R, Loukerise T, Lycette G, H. Lanz-Mendoza (2008): Recombinant scorpine: a multifunctional antimicrobial peptide with activity against different pathogens. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 65: 3081 – 3092

Clot-Faybesse. O, Juin. M, Rochat. H, Devaux. C (1999): Monoclonal antibodies against the *Androctonus australis hector* scorpion neurotoxin I: characterisation and use for venom neutralisation. *FEBS Letters*, 458, Pages 313-31.

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

Coutinho-Netto J., Abdul-Ghani AS., Norris PJ., Thomas AJ., Bradford HF, (1980): The Effects of Scorpion Venom Toxin on the Release of Amino Acid Neurotransmitters from Cerebral Cortex *In Vivo* and *In Vitro*. *Journal of Neurochemistry* **35** (3):558-565.

Conde R, Z. Zamudio F, Rodríguez M H et . Possani L.D (2000) Scorpine, an anti-malaria and anti-bacterial agent purified from scorpion venom *FEBS Letters* 471:165-168

Condea R., Zamudioa F Z., Rodreguez M.H., Possania L.D (2000) Scorpine, an anti-malaria and anti-bacterial agent purified from scorpion Venom *FEBS Letters* **471**:165-168.

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

Correa M.M., Sampaio S.V., Lopes R.A., Mancuso L.C., Cunha O.A., Franco J.J., Giglio J.R, (1997): Biochemical and histopathological alterations induced by *Tityus serrulatus* venom and its major neurotoxin *Tityus* toxin-I. *Toxicon* 35(7):1053-1067.

Costa V.M, Silva R, Tavares L C, Vitorino R, Amado F, Carvalho F, Bastos M-L, Carvalho M, Carvalho R.A, Remião F (2009): Adrenaline and reactive oxygen species elicit proteome and energetic metabolism modifications in freshly isolated rat cardiomyocytes Toxicology, 260 84-96.

Couraud F., Jover E., Dubois J.M., Rochat H (1982): Two type of scorpion toxins receptor sites on related to the activation, the other to the inactivation of the action potential sodium channel. Toxicon 20: 176-180.

Delves P.J et Roitt I.M (2000): The Immune System , first of two part The new England journal of medicine 343: 37-49.

Devaux. C, Clot-Faybesse. O, Juin. M, Mabrouk. K, Sabatier. J, Rochat. H (1997): Monoclonal antibodies neutralizing the toxin II from *Androctonus australis hector* scorpion venom: usefulness of a synthetic, non-toxic analog. *FEBS Letters*, 412, 456-460.

Deshpande S.B., Bagchi S., Rai O.P., Aryya N.C, (1999): Pulmonary oedema produced by scorpion venom augments a phenyldiguanide-induced reflex response in anaesthetized rats. Journal of physiology, 521(2):537-544.

D'Suze G., Moncada S., Gonzalez C., Sevcika C., Aguilera V., Alagon A. (2003): Relationship between plasmatic levels of various cytokines, tumour necrosis factor, enzymes, glucose and venom concentration following *Tityus* scorpion sting. Toxicon 41(3): 367-375.

D'Suze G., Salazar V., Diaz P., Sevcika C., Azpuruac H., Brachoc N. (2004): Histopathological changes and inflammatory response induced by *Tityus discrepans* scorpion venom in rats. Toxicon 44(8): 851-860.

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

Díaz P, D'Suze G, Salazar V, Sevcik C, Shannon J.D, Sherman N.E, Fox J.W (2009): Antibacterial activity of six novel peptides from *Tityus discrepans* scorpion venom. A fluorescent probe study of microbial membrane Na⁺ permeability changes Toxicon, 54:802-817

El-Alfya A.T., Ahmed A.A.E., Fatani A.J., Kader F (2008): Amelioration of the cardiovascular manifestations of the yellow scorpion *Leiurus quinquestriatus* envenomation in rats by red grape seeds proanthocyanidins. *Toxicon* **51**, 321–333.

Elsasser-Beile U et Kmeist's V (1993): cytokines as therapeutic and diagnostic agents. *Tumor Biol*, 14: 69-94.

Farkas I, Baranyi L, Liposits Zs, Yamamoto T, Okada H (1998): Complement C5a anaphylatoxin fragment causes apoptosis in TGW neuroblastoma cells *Neuroscience* 86: 903-911.

Fatani A.J., Harvey A.L., Furman B.L., Rowan E.G. (2000): The effects of lignocaine on actions of the venom from the yellow scorpion "*Leiurus quinquestriatus*" in vivo and in vitro. *Toxicon* **38**, 1787-180.

Froy O., Gurevitz M. (2003): New insight on scorpion divergence inferred from comparative analysis of toxin structure. *Pharmacology and distribution. Toxicon* **42**, 49–555.

Fukuhara YD., Reis ML., Dellalibera-Joviliano R., Cunha FQ., E.A. Donadi EA. (2003): Increased plasma levels of IL-1beta, IL-6, IL-8, IL-10 and TNF-alpha in patients moderately or severely envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. *Toxicon* **41(1)**: 49–55.

Fukuhara YD., Reis ML., Dellalibera-Joviliano R., Cunha FQ., E.A. Donadi EA. (2004): The kinin system in the envenomation caused by the *Tityus serrulatus* scorpion sting. *Toxicology and applied pharmacology*. **196** (3):390-395.

Gallowitsch-Puerta M, Pavlov V.A (2007): Neuro-immune interactions via the cholinergic anti-inflammatory pathway. *Life Sciences*, 80: 2325-2329.

Gazarian K.G., Gazarian T, Hernández R., Possani L.D (2005): Immunology of scorpion toxins and perspectives for generation of anti-venom vaccines *Vaccine* **23**: 3357-3368.

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

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

Gordon D., Karbat I., Ilan N., Cohen L., Kahn R., Gilles N., Dong K, Stühmer W., Tytgat J., Gurevitz M., Jouirou B., Mouhat S., Andreotti N., De Waard (2007): The differential preference of scorpion α -toxins for insect or mammalian sodium channels: Implications for improved insect control. *Toxicon* **49**: 452-472

Gueron M., Adolph RJ, Grupp IL, Gabel M., Grupp G, Fowler NO. (1980): Hemodynamic and myocardial consequences of scorpion venom. *The American Journal of Cardiology*, Volume 45, Issue 5, May 1980, Pages 979-986

Gueron M, Ilia R, Shahak E, Sofer S (1992): Renin and aldosterone levels and hypertension following envenomation in humans by the yellow scorpion *Leiurus quinquestriatus* *Toxicon* **30**: 765-767.

Guidine P.A.M., Moraes-Santos T., Massensini A.R., Dutra Moraes M.F (2008): Carbamazepine protects the CNS of Wistar rats against the central effects of scorpion envenomation *NeuroToxicology* **29**:136-142.

Gurevitz.M, Gordon.D, Ben-Natan S, Turkov.M, Froy.O (2001) Diversification of neurotoxins by C-tail ‘wiggling’: a scorpion recipe for survival. *FASEB J.* 15, 1201–1205.

Hammoudi-Triki Djélila et Laraba-Djebari Fatima (2003) : Quantification du venin d’*Androctonus australis hector* par ELISA dans les sérums de personnes et de rats envenimés *Bulletin de Société de pathologie exotique*, T. **96**, n° 4

Hammoudi-Triki D, Ferquel E, Robbe-Vincent A, Bon C, Choumet V, Laraba-Djebari F(2004) : Epidemiological data, clinical admission gradation and biological quantification by ELISA of scorpion envenomations in Algeria: effect of immunotherapy. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **98**:240-25.

Hammoudi-Triki D., Lefort J, Rougeot C., Robbe-Vincent A., Bon C., Laraba-Djebari F., Choumet V (2007): Toxicokinetic and toxicodynamic analyses of *Androctonus australis hector* venom in rats: Optimization of antivenom therapy. *Toxicology and Applied Pharmacology***218**:205-214.

Ismail M, Ghazal A, EL-Fakahani E.E (1980): Cardiovascular effects of venom from the scorpion *Buthus occitanus amoreux*. *Toxicon* .**18** 327-337.

Ismail M., Abd-Elsalam M. A (1988): Are the toxicological effects of scorpion envenomation related to tissue venom concentration? *Toxicon* 26: 233-25.

Ismail, M., Fatani, A.J.Y., 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) review article: The scorpion envenoming syndrome. *Toxicon* **33**: 825-858.

Jover E., Martin-Moutot N., Couraud F., Rochat H. (1978) Scorpion toxin: specific binding to rat synaptosomes. *Biochem Biophys Res Commun* **85**, 377–382.

Karalliedde L, (1995): Animal toxins. *British Journal of Anaesthesia* **74**: 319-327.

Kirschfink M (1997): Controlling the complement system in inflammation *Immunopharmacology* **38**: 51-62.

Kharrat R., Darbon H., Rochat H., et Granier C (1989) : structur/activity relationships of scorpion α -toxins. *Eur. J. Biochem.* **181**, 381-390.

Krifi M.N, Miled K., Abderrazek M., El Ayeb M (2001): Effects of antivenom on *Buthus occitanus tunetanus* (Bot) scorpion venom pharmacokinetics: towards an optimization of antivenom immunotherapy in a rabbit model. *Toxicon* **39** 1317-1326.

Krifi M.N, Savin S., Debray M., Bon C., El Ayeb M., Choumet (2005): Pharmacokinetic studies of scorpion venom before and after antivenom immunotherapy. *Toxicon* **45**:187-198.

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

Legros.C, Céard B., Vacher H, Marchot P, Bougis P E, Martin-Eauclaire. M.F (2005): Expression of standard scorpion alpha-toxin AaH II and AaH II mutants leading to the identification of some Key bioactive elements. *Biochimica et Biophysica acta* **1723**:91-99.

Martin-Eauclaire. M.F, Chistian Legros, Pierre E.Bougis et Hervé Rochat (1999) : les toxines des venins de scorpion. *Annales de l'institut Pasteur* **10** :207-222.

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

Moerman, L., S. Bosteels, W. Noppe, J. Willems, E. Clynen, L. Schoofs, K. Thevissen, J. Tytgat, J. Van Eldere, J. Van Der Walt, and F. Verdonck. 2002. Antibacterial and antifungal properties of alpha-helical, cationic peptides in the venom of scorpions from southern Africa. *Eur. J. Biochem.* **269**:4799–4810.

Mollnes T.E, Kirschfink M (2006): Strategies of therapeutic complement inhibition *Molecular Immunology*, **43**:107-121.

Mollnes T.E, Jokiranta T.S, Truedsson L, Bo Nilsson, Rodriguez de Cordoba S, Kirschfink M (2007): Complement analysis in the 21st century *Molecular Immunology* **44** 3838-3849.

Morgan B.P, Harris C.L (2003): Complement therapeutics; history and current progress *Molecular Immunology*, **40**, 159-170

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'Shea J.J et Murray P.J (2008) : cytokine signaling modules in inflammatory responses. *Immunity* **28**:477-487.

Oukkache N., Rosso J, Alami M, Ghalim N, Saile R, Hassar M., Bougis P.E, Martin-Eauclaire. M.F (2008): New analysis of toxic compounds from the *Androctonus mauretnicus mauretnicus* scorpion venom. *Toxicon* **51**: 835-852.

Patricia Díaz, Gina D'Suze, Víctor Salazar, Carlos Sevcik, John D. Shannon, Nicholas E. Sherman (2009): Antibacterial activity of six novel peptides from *Tityus discrepans* scorpion venom. A fluorescent probe study of microbial membrane Na⁺ permeability changes. *Toxicon*, **54**: 802-817.

Philip L et Carthy Mc (1994): Down-regulation of cytokine action. *Baillière's Clinical Haematology* **7**:153-177.

Rajendra W, Armugam A, Jeyaseelan_K (2004): Toxins in anti-nociception and anti-inflammation *Toxicon* 44: 1-17

Revelo M P., Bambirra E.A., Ferreira A P., Diniz C.R., et Chavez-Oregui C (1996): Body bio distribution of *Tityus serrulatus* scorpion and effects of scorpion anti-venom. *Toxicon* 34: 1119-1125.

Rezende N.A, Olortegui C.C., Amaral C.F.S (1996): Is the severity of *Tityus serrulatus* scorpion envenoming related to plasma venom concentrations? *Toxicon* 34 : 820-823.

Pessini AC, De Saouza AM, Faccioli LH, Gregorio ZM, Arantes EC,(2003): Time course of acute-phase response induced by *Tityus serrulatus* venom and TsTX-I in mice. *Int Immunopharmacol*,3(5):765-774

Petricevich VL, (2006): Balance between pro- and anti-inflammatory cytokines in mice treated with *Centruroides noxius* scorpion venom. *Mediators of inflammation* 6: 1-11

Possani L.D., Becerril B, Delepierre M., Tytgat J, (1999): Scorpion toxins specific for Na⁺ channels. *Eur. J. Biochem.* 264: 287-300.

Regale J.F. (1989): The role of C5a in hypersensitivity reactions in the Lung, *Pulmonary Pharmacology* N° 2 pp-3-12.

Rodríguez de la Vega R.C. Possani LD (2005): Overview of scorpion toxins specific for Na⁺ channels and related peptides: biodiversity, structure–function relationships and evolution. *Toxicon* 46: 831-844.

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

Rochat. H, Rochat. C, Miranda.F, Lissitzky. S, et Pr. Edman (1970): The Amino-Acid Sequence of Neurotoxin I of *Androctonus australis* Hector *Eur. J. Biochem.* 28, 381-388.

Rochat. H, Rochat. C, Sampieri. F, Miranda.F, (1972): The Amino-Acid Sequence of Neurotoxin I of *Androctonus australis* Hector *Eur. J. Biochem.* 28, 381-388.

Sabatier M.J (2004): Toxin determinants required for interaction with voltage-gated K⁺ channels. *Toxicon* 43: 909-914.

Sami-Merah S, Hammoudi-Triki D, Martin-Eauclaire M-F, Laraba-Djebari F (2008): Combination of two antibody fragments F(ab')₂/Fab: An alternative for Scorpion envenoming treatment International Immunopharmacology, Volume 8 1386-1394

Sofer S, Gueron M (1988) Respiratory failure in children following envenomation by the scorpion *Leiurus quinquestriatus*: Hemodynamic and neurological aspects Toxicon 26 931-939

Sofer, S., Gueron, M., White, R., Lifshitz, M., Apte, R (1996). Interleukin-6 release following scorpion sting in children. *Toxicon* **34**, 389–392.

Soualmia H, (2008): Effect and mechanisms underlying scorpion toxin action from *Androctonus australis garzonii* on atrial natriuretic peptide in rat atria: An in vitro study peptides 29, 364–368.

Tricaud N., Marchot P., Martin-Eauclaire M. F (2000): On the kalitoxin and dendrotoxin binding sites on rat brain synaptosomes Toxicon **38**: Pages 1749-1758.

Wagner E (2006): le système du complément: Rôle et importance de sa mesure. Ann Biol Clin, 43(2) :11-20.

Walport M.J (2001): Complement, First of two parts. The new England journal of medicine 344: 1058-1065.

Wan S, Yim A.P.C (1999): Cytokines in myocardial injury: impact on cardiac surgical approach. European Journal of Cardio-Thoracic Surgery, **16**: S107-S111.

Zhao Z, Ma.Y, Dai C, Zhao R, Li S.R, Wu Y, Cao Z, Li W (2009): Imcporin, a New Cationic Antimicrobial Peptide from the Venom of the Scorpion *Isometrus maculatus*. Antimicrobial agents and chemotherapy 53: 3472-3477

Zilberberg N., froy O., Loret E., Cestele S., Arad D., Gordon D.; Gurevitz M (1997): identification of structural elements of scorpion α -neurotoxin important for receptor site recognition. The journal of Biol.Chem.272: 14810-14816.

Zlotkin E., Miranda F., Rochat H. (1978): Chemistry and pharmacology of Buthinae scorpion venoms. In Handbook of Experimental Physiology: Vol. **48**, pp. 317-369.

LIVRES:

Genetet N(1997): Immunologie. Edition medical international 4ème ed. page 251

Lambris J.D., Morikis D (2005): Structural biology of the complement system page 370.

Pathak S, Palan U ()Immunology: essential and fundamental, page

Peter Parham (2005): The immune system. Édition: 2, page 18

Rappuoli.R ET Montecucco.C (1997): Guidebook to protein toxins and their use in cell biology. A sambrook and tooze publication at oxford university press. Page 256