

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE
LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE
HOUARI BOUMEDIENE

FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES



Mémoire

Présenté pour l'obtention du Diplôme de MAGISTER

En : Sciences de la Nature

Spécialité : Biotechnologie et Santé

Par : ALOUACHE Lamia

Sujet

Immunomodulation *in vivo* et *in vitro* de la balance inflammatoire des macrophages induits par le venin d'*Androctonus australis hector* et sa toxine Aah II, en présence et en absence d'immunothérapie.

Soutenu le : 10/ 01/ 2010, devant le jury composé de :

Mme. C. TOUIL-BOUKOFFA, Professeur, U.S.T.H.B

Président

Mme. F. LARABA-DJEBARI, Professeur, U.S.T.H.B

Directeur de thèse

Mme. F. MATI, Professeur, Univ. T.O. Z

Examinatrice

Mme. H. OUSSEDIK-OUMEHDI, Maître de conférences, U.S.T.H.B

Examinatrice

Mme. D. HAMMOUDI-TRIKI, Maître de conférences, U.S.T.H.B

Examinatrice

Mme. N. TOUABTI, Professeur, I.A.P

Invitée

Remerciements

Les travaux qui ont fait l'objet de cette thèse ont été effectués dans le laboratoire de recherches sur les venins et le laboratoire de contrôle de qualité de l'institut Pasteur d'Algérie en collaboration avec le laboratoire de biochimie et biomolécules, diagnostic et immunothérapie de la faculté des Sciences Biologiques de l'Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene.

Tout d'abord j'adresse mes plus sincères remerciements à mon directeur de recherche, le Professeur LARABA-DJEBARI Fatima, pour m'avoir ouvert les portes de son équipe et guidé durant la réalisation de cette thèse. Ce travail témoigne de sa confiance et de son soutien dans les moments les plus difficiles, malgré ses nombreuses occupations. Qu'elle trouve ici l'expression de ma reconnaissance et de ma profonde gratitude.

Un grand merci au Professeur Touabti Nadia, qui m'a accueillie dans son laboratoire de contrôle de qualité pour faire les manipulations de la culture cellulaire. Un remerciement particulier à tous les membres de laboratoire de contrôle de qualité pour leur disponibilité, leur gentillesse et leurs encouragements.

Je tiens à remercier Madame le Professeur Touil-Boukoffa Chafia pour avoir bien voulu présider le jury et pour m'avoir enseigné. Qu'elle veuille bien trouver ici l'expression de ma considération.

Je tiens également à remercier Madame le Docteur Hammoudi-Triki Djalila qui ma fait bénéficier de ses connaissances durant l'année théorique de la post-graduation, ainsi que pour ses conseils fréquents et avisés pendant le stage pratique, et qui a accepté de participer au jury de cette thèse.

Mes remerciements vont également à Madame MATI, F, Professeur à l'université Mouloud Mammeri de Tizi- ouzou, qui m'a fait l'honneur de juger ce travail.

Merci à Madame le Docteur Oussedik-Oumehdi Habiba, qui a accepter de participer au jury de cette thèse. Je suis très honorée de sa présence, et je lui adresse mes remerciements les plus sincères.

Enfin je n'oublie pas Madame Saadedine Souad, et Madame Kamel Assia pour leur disponibilité au quotidien.

Liste des abréviations

<i>Aah</i>	<i>Androctonus australis hector</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMP	Adénosine monophosphate
C3a	Fraction 3a du complément
Con A	Concanavalin A
Dex	Dexaméthasone
DL ₅₀	Dose létale 50
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
Fab	Fragment d'anticorps liant l'antigène (Fragment Antigen Binding)
Fc	Fragment cristallisable
F _{tox} G50	Fraction toxique majoritaire
GSH	Glutathion réduit
g	Gramme
h	Heure
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HRP	Horse radish peroxidase
IgG	Immunoglobuline de type G
IFN- γ	Interferon- γ
iNOS	Inductible nitric oxide synthase
i.p	Intra péritonéale
IL	Interleukine
Kd	Constante de dissociation
LPS	Lipopolysaccharide
MDA	Malondialdéhyde
ml	Millilitre
μ M	Micromole par litre
min	Minute
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NF- κ B	Nuclear factor - κ B
ng	Nanogramme
NO	Nitric oxide, monoxide d'azote
NO ₂ ⁻	Nitrites
O ₂ ⁻	Anion superoxyde
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PKC	Proteine kinase C
PLA ₂	Phospholipase A ₂
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> , espèces réactives de l'oxygène
SAV	Sérum anti venimeux
scFv	Fragment variable simple chaîne
SVF	Sérum de veau fœtal
TGF β	Tumor growth factor- β
TNF- α	Tumor necrosis factor- α
Th	Lymphocytes T helper

SOMMAIRE

Résumé	0
--------------	---

Chapitre 1: Rappels bibliographiques

Introduction.....	1
-------------------	---

I- Macrophages et Médiateurs inflammatoires

I.1- Caractéristiques générales des macrophages.....	4
I.2- Stress oxydatif et métabolites d'oxygène dépendant des phagocytes	
I.2.1- Le stress oxydatif	7
I.2.2- Métabolites oxygénés.....	7
I.2.3- Effets toxiques des espèces réactives de l'oxygène	7
I.2.4- Systèmes antioxydants	10
I.2.4.1- Systèmes antioxydants enzymatiques.....	10
I.2.4.2- Systèmes antioxydants non enzymatiques	12

II- L'envenimation scorpionique

II.1- Le scorpionisme	15
II.2- Les scorpions	15
II.3- Le venin scorpionique	17
II.4- Les toxines scorpioniques	17
II.4.1- Les toxines «longues» :	17
II.4.2- Les toxines « courtes»	18
II.4.3- Les toxines du venin d' <i>Androctonus australis hector</i>	18
II.4.4- Modes d'action des toxines scorpioniques	20
II.5- Toxicité des venins scorpioniques	22
II.6- Les aspects cliniques de l'envenimation scorpionique.....	22
II.7- Physiopathologie de l'envenimation scorpionique	23
II.7.1- Action cellulaire et perturbation de l'équilibre électrolytique.....	24
II.7.2- Action sur le système nerveux central	25
II.7.3- Action sur le système cardiovasculaire.....	25
II.7.4- Action sur le système respiratoire	26
II.7.5- Modification des paramètres biologiques.....	27
II.7.6- Conséquences hormonales	27
II.7.7- Conséquences métaboliques.....	28
II.7.8- Processus inflammatoire et réponse immunitaire induits par les venins scorpioniques et leurs toxines: implication des macrophages et des médiateurs inflammatoires	29
II.8- Traitements anti- scorpioniques	32
II.8.1- Le traitement spécifique.....	32
II.8.2- Traitements symptomatiques.....	34
II.8.3- les glucocorticoïdes.....	34

Chapitre 2. Matériel et méthodes

III.1- Matériel

III.1.1- Matériel biologique.....36

III.1.2- Matériel non biologique.....37

III.2- Méthodes.....37

III.2.1- Préparation des cellules péritonéales38

III.2.2- Contrôle de la viabilité cellulaire38

III.2.3- Mise en culture et stimulation des macrophages.....39

III.2.4- Morphologie des macrophages en présence et en absence de venin d'*Aah* ou de la toxine *Aah* II.....40

III.2.5- Effet *in vitro* du venin d'*Aah* ou de sa toxine *Aah* II sur la viabilité des macrophages en présence et en absence de la dexaméthasone.....40

III.2.6- Dosages des médiateurs pro-inflammatoires et anti-inflammatoires, produits par les macrophages en culture et induits (*in vivo* ou *in vitro*) par le venin d'*Aah* ou par sa toxine *Aah* II en présence et en absence d'immunothérapie.....41

III.2.6.1- Détection du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)41

III.2.6.1.1- Effet de la dexaméthasone sur la production de H_2O_2 par les macrophages suite à leur traitement *in vitro* par le venin d' *Aah* ou la toxine *Aah* II.....42

III.2.6.2- Mesure de la production de monoxyde d'azote (NO)42

III.2.6.2.a- Effet *in vivo* de venin d'*Aah* ou de sa toxine *Aah* II sur la production de monoxyde d'azote (NO) par les macrophages en culture en présence et en absence d'immunothérapie.....45

III.2.6.2.b- Effet *in vitro* de venin d'*Aah* ou de sa toxine *Aah* II sur la production de NO en présence et en absence de leurs anticorps spécifiques.....45

III.2.6.3- Dosage de malonaldehyde (MDA) après stimulation des macrophages *in vivo* ou *in vitro* par le venin d'*Aah* ou de la toxine *Aah* II en présence et en absence d'immunothérapie.....45

III.2.6.4- Mesure de glutathion (GSH) : analyse de système antioxydant dans les macrophages stimulés *in vivo* ou *in vitro* par le venin d'*Aah* ou de la toxine *Aah* II en présence et en absence d'immunothérapie.....46

III.2.6.5- Effet *in vivo* et *in vitro* du venin d'*Aah* ou de la toxine *Aah* II sur la production des cytokines par les macrophages péritonéaux.....46

Chapitre 3. Résultats et discussion

IV – Résultats.....50

IV.1 - Effet *in vitro* du venin d'*Aah* ou de sa toxine *Aah* II sur la morphologie des macrophages.....50

IV.2 - Effet *in vitro* du venin d'*Aah* ou de sa toxine *Aah* II sur la viabilité des macrophages en présence et en absence de la dexaméthasone.....55

IV.3 - Dosages des médiateurs pro- et anti-inflammatoires produits par les macrophages en culture induits (*in vivo* ou *in vitro*) par le venin d'*Aah* ou sa toxine *Aah* II en présence et en absence d'immunothérapie.....58

IV.3.A- Quantification du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)58

IV.3.A.1 - Étude *in vivo* des effets du venin d'*Aah* ou de la toxine *Aah* II sur la production de H_2O_2 par les macrophages en présence et en absence d'immunothérapie.....58

IV.3.A.2 - Étude <i>in vitro</i> des effets du venin d' <i>Aah</i> ou de la toxine <i>Aah</i> II sur la production de H ₂ O ₂ par les macrophages en présence et en absence d'immunothérapie.....	58
IV.3.A.3 - Effet de la dexaméthasone sur la production de H ₂ O ₂ par les macrophages suite à leur traitement <i>in vitro</i> par le venin d' <i>Aah</i> ou la toxine <i>Aah</i> II.....	60
IV.3.B- Dosage de monoxyde d'azote (NO)	63
IV.3.B.1 - Étude <i>in vivo</i> de la cinétique de production du monoxyde d'azote (NO) par les macrophages en culture après envenimation expérimentale par le venin d' <i>Aah</i> ou la toxine <i>Aah</i> II en présence et en absence d'immunothérapie.....	63
IV.3.B.2 - Étude <i>in vitro</i> de la cinétique de production de monoxyde d'azote (NO) par les macrophages en culture traités par le venin d' <i>Aah</i> ou la toxine <i>Aah</i> II en présence et en absence d'immunothérapie.....	65
IV.3.C - Mesure de Malonaldehyde.....	65
IV.3.C.1 - Étude <i>in vivo</i> de l'effet du venin d' <i>Aah</i> ou de la toxine <i>Aah</i> II sur la peroxidation lipidique au niveau des membranes des macrophages en présence et en absence d'immunothérapie.....	65
IV.3.C.2 – Étude <i>in vitro</i> de l'effet du venin d' <i>Aah</i> ou de la toxine <i>Aah</i> II sur la peroxidation lipidique au niveau des membranes des macrophages en présence et en absence d'immunothérapie.....	67
IV.3.D – Dosage du glutathion (GSH)	67
IV.3.D.1 – Évaluation du système anti-oxydant dans les macrophages par la mesure du GSH après envenimation expérimentale par le venin d' <i>Aah</i> et la toxine <i>Aah</i> II en présence et en absence d'immunothérapie.....	67
IV.3.D.2 - Effet <i>in vitro</i> du venin d' <i>Aah</i> ou de la toxine <i>Aah</i> II sur la cinétique du GSH au niveau des macrophages.....	70
IV.3.E – Dosage des cytokines.....	73
IV.3.E.1 - Effet <i>in vivo</i> du venin d' <i>Aah</i> ou de la toxine <i>Aah</i> II sur la production des cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α , l'IFN- γ , IL-12 et IL-10) par les macrophages péritonéaux.....	73
IV.3.E.2 - Effet <i>in vitro</i> du venin d' <i>Aah</i> et sa toxine <i>Aah</i> II sur la production des cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α , l'IFN- γ , IL-12 et IL-10) par les macrophages péritonéaux.....	74
IV.3.E.3 - La balance pro-et anti-inflammatoire des cytokines.....	75
V- Discussion	84
 Chapitre 4. Conclusion et perspstives.	
VI- Conclusion et perspectives.....	95
 Références bibliographiques	97
Annexes	115

Résumé :

Dans ce travail, l'effet activateur, immunomodulateur et cytotoxique *in vivo* et *in vitro* de venin d'*Androctonus Australis hector* (*Aah*) ainsi que sa toxine *Aah* II sur les macrophages péritonéaux des souris BALB/c, en présence ou en absence d'immunothérapie a été entrepris. La stimulation des macrophages *in vitro* avec une faible dose de venin d'*Aah* ou de sa toxine *Aah*-II selon une cinétique d'incubation a révélé la production accrue et prolongée de certains médiateurs inflammatoires tel que le H₂O₂ (peroxyde d'hydrogène) et le NO (monoxyde d'azote), ainsi que quelques cytokines comme l'IL-6, TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , IL-12, et IL-10. La balance inflammatoire des cytokines est retrouvée entre 24 h et 72 h. Le taux de cytotoxicité des macrophages *in vitro* le plus élevé était à 24 h et 48 h après traitement avec le venin d'*Aah* et la toxine *Aah* II, respectivement. Le prétraitement des macrophages par la dexaméthasone à une concentration de 10⁻⁷ mol/l, 24 h avant l'addition *in vitro* de venin d'*Aah* ou de toxine *Aah* II, a induit une diminution des quantités de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et une réduction de la cytotoxicité.

La stimulation des macrophages *in vivo* ou *in vitro* avec le venin d'*Aah* ou sa toxine *Aah* II a provoqué l'augmentation de la quantité de MDA (malonaldehyde) marqueur de la peroxidation lipidique. L'influence du venin d'*Aah* ou de sa toxine *Aah* II sur le système anti-oxydant des macrophage évalué par la mesure de GSH (glutathion réduit) intra cellulaire, provoque une diminution importante et prolongée en teneurs de GSH après 30 min de traitement *in vitro* par le venin d'*Aah*, et après 30 min et 24 h de l'administration *in vivo* de la toxine *Aah* II. Ces paramètres (cytotoxicité, MDA, GSH, H₂O₂ et NO) sont partiellement réduits après immunothérapie *in vivo* ou *in vitro*.

Ces résultats suggèrent que le venin d'*Aah* et sa toxine *Aah* II aux faibles doses, sont capables de perturber la balance inflammatoire des macrophages en créant un stress oxydatif dans leur microenvironnement qui s'avère toxique pour ces mêmes cellules. Ce microenvironnement semble être mal contrôlé par le système anti-oxydant et les cytokines anti- inflammatoires, mais peut être compensé partiellement par l'immunothérapie.

Mot clés : Immunomodulation, Cytotoxicité, NO, Macrophages, Cytokines, GSH, Dexaméthasone, H₂O₂, Venin d'*Aah*, Toxine *Aah* II, Immunothérapie.

CHAPITRE 1 :

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

Introduction.

L'envenimation scorpionique pose un réel problème de santé publique au Maghreb car elle constitue un accident à la fois fréquent et grave.

Les espèces de scorpions considérés comme les plus dangereuses en Algérie sont *Androctonus australis hector* (*Aah*) et *Buthus occitanus* (*Bot*). Selon le ministère de la santé, ces scorpions sont responsables d'un taux de 14 décès pour 1000 piqûres par an.

Le venin d'*Aah* contient trois principales α -toxines (*Aah* I, *Aah* II et *Aah* III). Ces toxines sont des neurotoxines de faible masse moléculaire (7 KDa), qui agissent sur les canaux sodium entraînant une dépolarisation anormale des cellules excitables et une libération accrue des neurotransmetteurs et des modulateurs (Martin-Eauclaire *et al*, 1999).

L'absorption et la distribution rapide des toxines scorpioniques font que l'envenimation scorpionique est un cas d'urgence médicale.

La toxine *Aah* II est la plus toxique et la plus abondante dans le venin d'*Aah* (Martin et Rochat 1986). Cette toxine est considérée comme une α -toxine en raison de sa grande affinité et spécificité pour le site 3 des canaux sodiques Na_v 1.4 et Na_v 1.2 des cellules musculaires et du système nerveux central des mammifères, respectivement (Alami *et al*, 2003; Legros *et al*, 2005).

Les symptômes cliniques de l'envenimation scorpionique sont très variés, leur gravité dépend de l'espèce incriminée, l'âge, le poids et l'état de santé de la victime (Krifi *et al*, 1996). Les conséquences néfastes de ces symptômes sont similaires avec ceux observés chez le modèle animal lors des envenimations expérimentales. Ces symptômes touchent les différents systèmes, nerveux, cardiovasculaires, respiratoires, et gastro-intestinaux. Les signes d'inflammation locale et systémique, tels que l'œdème pulmonaire, le taux élevé des cytokines, la leucocytose, des nécroses et une cytolysse ont été également observés (Amitay, 1998 ; De roodt *et al*, 2003; Hammoudi-Triki *et al*, 2004; Ismail, 1995; Correa *et al*, 1997; Daisley ,1999; Fatani *et al*, 2006).

Plusieurs médiateurs sont impliqués dans les processus inflammatoires et dans les réponses immunitaires lors de l'envenimation scorpionique, notamment par le biais de l'activation des macrophages. Des travaux récents ont montré que l'interaction *in vitro* de venin *Tityus serrulatus* ou de ses fractions toxiques avec les macrophages provoque la libération des cytokines, du H_2O_2 et du monoxyde d'azote (NO) (Petricevich 2002, 2007). Le déséquilibre

entre les cytokines pro- et anti-inflammatoires contribue au dysfonctionnement de plusieurs organes vitaux et peut engendrer le décès de la victime (Stein, 1996).

Cependant la description détaillée de l'induction de ces cytokines par les venins n'est pas clairement établie.

Par ailleurs la production des radicaux libres dans le plasma et les organes au cours de l'envenimation expérimentale joue un rôle mineur dans la toxicité de venin scorpionique (Dousset *et al*, 2005). Des études antérieures ont montré la présence élevée des marqueurs de peroxidation lipidique, apoptotique, et une génération du stress oxydatif, suggérant ainsi leur implication dans les dommages cellulaires causés par l'envenimation scorpionique (Ismail, 1995 ; Meki *et al*, 2003 ; Fatani *et al*, 2006).

Si les phagocytes dont les macrophages ne sont pas suffisamment protégés par les antioxydants, la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) par ces cellules peut causer leur auto oxydation induisant ainsi des altérations dans la signalisation intracellulaire et la perturbation des fonctions de ces cellules (Hughes *et al*, 2004).

L'objectif principal de cette étude est d'examiner *in vivo* et *in vitro* l'effet d'une dose sublétales de venin d'*Aah* ou de sa toxine purifiée *Aah* II sur l'activation des macrophages péritonéaux des souris BALB/c via l'implication de différents médiateurs pro-inflammatoires et anti-inflammatoires dans la modulation de la réponse immunitaire. Ceci afin de permettre une meilleure compréhension de la physiopathologie induite par le venin ou ses toxines dans le but de développer de nouvelles approches thérapeutiques. Cette étude pourrait servir aussi de voir même à titre préliminaire si l'immunothérapie pourrait moduler au niveau cellulaire la réponse du macrophage au venin d'*Aah* ou à sa toxine *Aah* II.

Dans ce travail, nous avons entrepris plusieurs protocoles expérimentaux à travers une étude cinétique *in vivo* et *in vitro* en nous focalisant sur les points suivants :

- Quantification de la production de H_2O_2 par les macrophages péritonéaux stimulés par le venin d'*Aah* ou la toxine *Aah* II
- Mesure du taux de production de monoxyde d'azote (NO) par la détection des nitrites dans les surnageants de cultures des macrophages induits.
- Mise en évidence de l'effet cytotoxique *in vitro* de venin d'*Aah* ou de sa toxine *Aah* II sur la viabilité des macrophages.
- Évaluation *in vitro* du rôle de la dexaméthasone contre l'effet cytotoxique du venin d'*Aah* ou de sa toxine *Aah* II et son implication dans la régulation de la production d' H_2O_2 par les macrophages.

- Détermination de la production des cytokines pro et anti-inflammatoires par les macrophages stimulés par le venin d'*Aah* ou de la toxine *Aah* II.
- Mesure de la peroxidation lipidique dans les macrophages.
- Test de l'état du système antioxydant des macrophages par l'estimation de taux intracellulaire de glutathion réduit.
- Détermination de l'efficacité de l'immunothérapie sur la modulation de la réponse inflammatoire des macrophages.

I- Macrophages et Médiateurs inflammatoires :

I.1- Caractéristiques générales des macrophages :

Cellules fondamentales du tissu conjonctif et des liquides biologiques, les macrophages ont un rôle capital dans la réparation tissulaire, dans l'inflammation et la croissance tumorale. Les macrophages sont caractérisés par la capacité de phagocytose, la synthèse de plus d'une centaine de molécules physiologiquement actives, et par leur rôle immunitaire fondamental qu'est la présentation des antigènes aux lymphocytes T. Certaines fonctions du macrophages se font sans qu'une stimulation préalable soit nécessaire : la phagocytose, la sécrétion des lysozymes, des protéases (élastases, collagénases, des hydrolases acides), des peptides facilitant la perméabilité des membranes (appelés défensines) et des facteurs de complément. D'autres fonctions telles la sécrétion des cytokines, ne surviennent qu'après stimulation par des cytokines comme l'interféron ou des substances exogènes comme les endotoxines bactériennes.

Parmi les nombreuses substances secrétées par les macrophages stimulés, il y'a le TNF- α (le Tumor Necrosis Factor α), les interleukines 1 et 6, le GM-CSF (facteur de croissance des lignées granulocytaires et monocytaires), les facteurs de la coagulation (thromboplastine tissulaire, facteurs X, VII, V...), les prostaglandines, les leucotriènes, les métabolites toxiques de l'oxygène comme les radicaux libres O_2^- et OH^- (Demuth et *al*, 1995).

Les cytokines de type Th1, telles que IFN- γ , IL-1 β ou LPS, induisent un état d'activation des macrophages dit « classique » ou M1. En revanche, les cytokines Th2, telles que l'IL-4 et l'IL-13 ainsi que les glucocorticoïdes induisent une activation « alternative » ou M2 des macrophages (Gorden et *al*, 2003). Les macrophages M1 sont des cellules effectrices qui détruisent les microorganismes et qui expriment les récepteurs de type Toll et produisent principalement des cytokines pro-inflammatoires, telles que TNF- α , IL-6 et IL-12. D'autre part, les macrophages M2 présentent des propriétés anti-inflammatoires car ils produisent des facteurs tels que IL-10, TGF β et expriment des récepteurs du mannose, ainsi que d'autres récepteurs « scavenger » et des récepteurs antagonistes de IL-1 β (IL-1Ra) (Bouhlef et *al*, 2007).

La morphologie de ces cellules varie considérablement en fonction de leur état fonctionnel (résidents ou activés), un macrophage activé présente un noyau dont la condensation de chromatine est prononcée, une membrane cytoplasmique ondulée formant des pseudopodes, leurs capacité proliférative et phagocytaires sont augmentées. Les macrophages adhèrent au plastique et au verre, concentrant ainsi les organelles au centre de la cellule (North, 1978; Auger et Ross, 1992).

La modulation de la différenciation des macrophages et leurs viabilité dans les différents micro environnements est un élément clé de l'immunité innée et acquise (Mantovani et *al*, 2007; Gorden et Taylor ,2005).

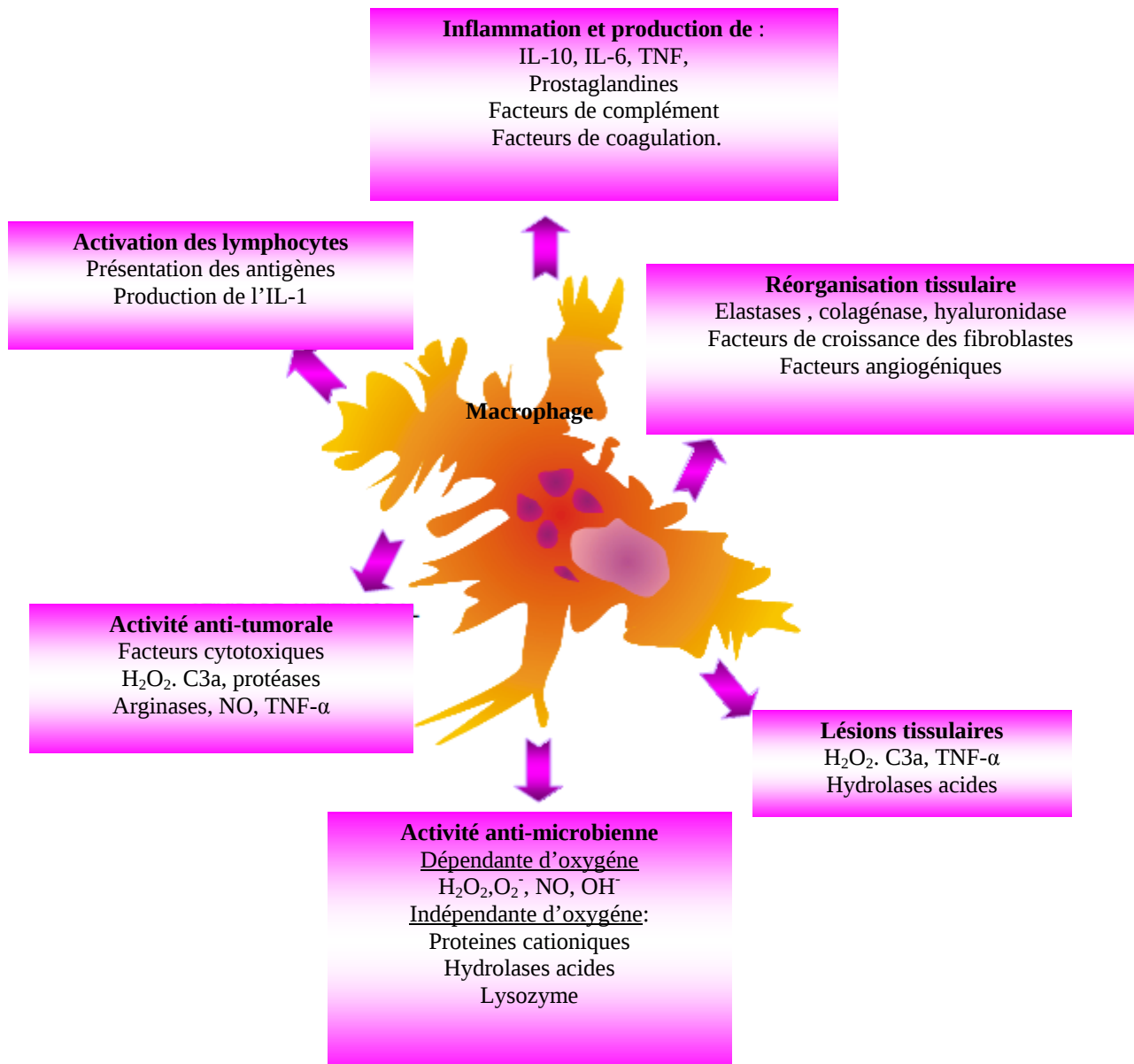


Figure 1 : Rôle de macrophage dans la réponse immunitaire et inflammatoire. Roitt (Brostoff et Mal, 1999).

I.2- Stress oxydatif et métabolites d'oxygène dépendant des phagocytes :

I.2.1- Le stress oxydatif :

Le stress oxydatif est défini comme étant un déséquilibre de la balance entre les radicaux oxydants et les antioxydants, en faveur des premiers, entraînant une perturbation de l'homéostasie redox, ce qui peut conduire à des dommages cellulaires irréversibles (Pincemail, 1999; Cuzzocrea et al, 2001).

I.2.2- Métabolites oxygénés :

On nomme métabolites de l'oxygène (ROS) les radicaux libres produits par le stress oxydatif. C'est un moyen de défense très important chez les phagocytes comme les monocytes/macrophages tout comme chez les neutrophiles. Ils sont produits par un complexe protéique membranaire appelé NADPH oxydase qui génère le superoxyde (O_2^-). Le superoxyde peut ensuite produire des oxydants très puissants tels les radicaux hydroxyl (OH^-) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) dans le phagosome ou dans l'espace extracellulaire. Chez les monocytes et les neutrophiles, le H_2O_2 peut se convertir en acide hypochlorique et en chloramines, des oxydants encore plus puissants dont la toxicité est importante. Le macrophage, lors de sa maturation, perd l'enzyme responsable de cette transformation (myéloperoxydase).

De plus, le NO et les ROS peuvent se lier pour former certains composés comme le *peroxynitrite* ($ONOO^-$). L'induction du complexe du NADPH oxydase serait due à l'activité de certaines enzymes telles la PI3K, la phospholipase C (PLC), la PKC et certaines protéines G comme Rac qui mèneraient à la phosphorylation d'une protéine cytosolique, la p47 *phox* (Clark, 1999; Hampton et al., 1998).

I.2.3- Effets toxiques des espèces réactives de l'oxygène :

Les espèces réactives de l'oxygène sont responsables, d'une manière directe ou indirecte, de nombreux dommages oxydatifs au niveau moléculaire (acides nucléiques, protéines, lipides...), pouvant affecter considérablement les mécanismes cellulaires.

Les principales cibles cellulaires à la toxicité radicalaire (Singal et al, 1988) sont :

I.2.3-A- Les effets des ROS sur l'ADN :

Les radicaux libres peuvent induire des effets mutagènes ou l'arrêt des réplifications de l'ADN. Ils agissent en provoquant des altérations de bases, des pontages ADN-protéines ou des ruptures de brins. Les cassures observées sont dues aux radicaux issus de la réaction de Fenton en présence de fer ferreux chélaté à certains acides aminés ou aux groupes phosphates de l'ADN. La prévention de ce processus par l'addition de catalase montre le rôle du peroxyde d'hydrogène dans les lésions de l'ADN.

I.2.3-B- Les effets des ROS sur les macromolécules

Les radicaux libres sont également responsables d'inactivation enzymatique en particulier des sérine-protéases, d'une fragmentation des macromolécules (collagène, protéoglycannes, acide hyaluronique), de formation de dimères ou d'agrégats protéiniques dans les membranes cytoplasmiques. Les acides aminés les plus sensibles à leur action sont le tryptophane, la tyrosine, la phénylalanine, la méthionine et la cystéine.

I.2.3-C- Les effets des ROS sur les lipides :

Les lipides sont une cible privilégiée des radicaux libres qui provoquent l'oxydation des acides gras poly insaturés (AGPI) des phospholipides membranaires. Le phénomène d'auto-oxydation ou peroxydation lipidique consiste en l'attaque par un radical libre, d'origine exogène ou endogène, de dérivés lipidiques.

La peroxydation lipidique provoque une augmentation croissante de la perméabilité des membranes cellulaires induisant une altération irréversible des propriétés fonctionnelles de la cellule, pouvant aller jusqu'à la lyse complète. La réaction en chaîne prolonge les effets intramembranaires des radicaux libres, même si l'agression radicalaire s'estompe. La peroxydation lipidique aboutit à la formation de nombreux dérivés toxiques : les hydroperoxydes et leurs dérivés. Les hydroperoxydes lipidiques sont relativement stables; en présence de fer, ils sont transformés en radicaux alkoxydes. Parmi leurs dérivés, le MDA (malondialdéhyde) a une demi-vie plus longue que celle des radicaux libres et diffuse facilement. Il peut former des liaisons avec les bases de l'ADN et est lui-même mutagène.

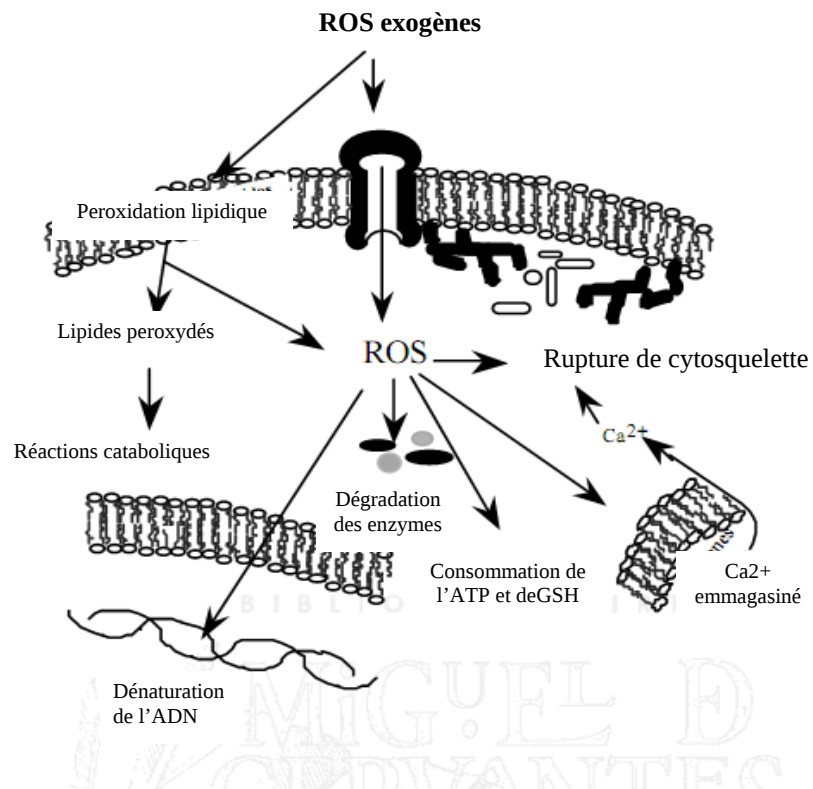


Figure 2 : Effets toxiques des ROS (César, 2001).

1.2.4- Systèmes antioxydants :

Le maintien d'un niveau cytotoxique de ROS est assuré par des systèmes antioxydants. Un antioxydant peut être défini comme toute substance qui est capable à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats. Les antioxydants cellulaires sont non-enzymatiques et enzymatiques (Comhair, 2002; Droge, 2002; Mates, 1999).

1.2.4.1- Systèmes antioxydants enzymatiques:

1.2.4.1. a- Superoxyde dismutase (SOD)

Cette enzyme catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène qui pourra être pris en charge par des enzymes à activité peroxydase ($2\text{O}_2^{\cdot-} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$). Deux isoformes se rencontrent chez les eucaryotes. La plus importante présente dans le cytoplasme de toutes les cellules, a pour cofacteurs le cuivre et le zinc (CuZn-SOD). L'autre enzyme a pour cofacteur le manganèse (Mn-SOD) et est située dans les mitochondries. (Avissar et al, 1989).

1.2.4.1. b- Glutathion peroxydase : GSH-Px

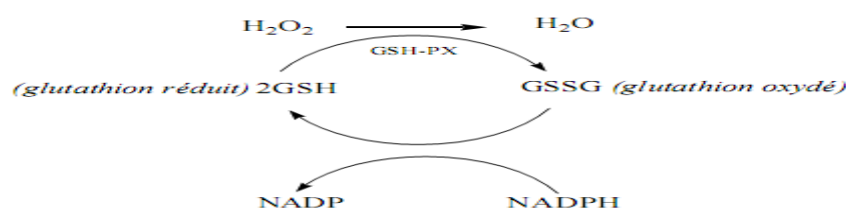
Les glutathion-peroxydases sélénio-dépendantes sont des protéines qui contiennent 4 atomes de sélénium situés aux centres actifs de l'enzyme sous forme de sélénocystéine.

Un déficit en sélénium entraîne une chute de l'activité de l'enzyme et une réplétion la restaure. Avissar et al, (1989) ont, à partir de cultures cellulaires, individualisé 2 formes de GSH-Px qui diffèrent par leur structure, leur activité et leurs sites antigéniques :

- une forme à localisation intracellulaire
- une forme glycosylée riche en ponts disulfures, à localisation extracellulaire.

Les GSH-Px ont une action détoxifiante vis-à-vis de 2 substrats :

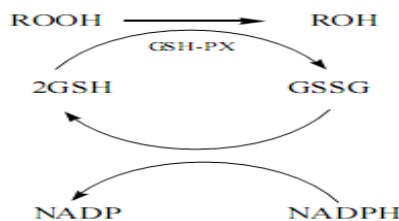
✓ Le peroxyde d'hydrogène :



Le glutathion est un tripeptide, le-glutamyl cystéinyl glycine. Il est le principal antioxydant cellulaire, en particulier dans les cellules de la lignée macrophagique:

- en étant un composé“scavenger”du monoxyde d’azote (i.e.nitrosoglutathion)(Chiueh,1999);
- en neutralisant les peroxydes en tant que substrat de la GSH-peroxydase;
- en régénérant des molécules antioxydantes, comme l’ascorbate au titre de substrat de la GSH-deshydrogénase;
- en détoxifiant les composés toxiques endogènes et exogènes entant que substrat de la GSH-S-transférase (Meister, 1995).

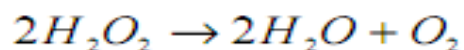
✓ les hydroperoxydes (ROOH) dérivés des lipides:



L’activité de détoxication des GSH-Px face aux hydroperoxydes nécessite une autre enzyme, la PLA₂. Cette dernière libère les peroxydes d'acides gras des membranes cellulaires en hydrolysant les fonctions esters des phospholipides membranaires. Les peroxydes libérés dans le cytosol sont alors transformés par la GSH-Px tandis que la chaîne d'acides gras manquante est resynthétisée.

1.2.4.1. c- Catalase : CAT

Elle permet de métaboliser le peroxyde d'hydrogène :



Elle est localisée principalement dans les peroxysomes des cellules et empêche le peroxyde d'hydrogène de participer à la réaction de Fenton. Mais son rôle semble mineur par rapport à celui de la GSH-Px pour prévenir la peroxydation lipidique : son affinité pour le peroxyde d'hydrogène est inférieure à celle de la GSH-Px (Avissar et *al*, 1989).

1.2.4.1. d- Peroxyredoxines (Prx) :

Les Peroxyredoxines ou thioredoxine peroxydase, ont été découvertes récemment et font l'objet de nombreux travaux concernant les fonctions anti-oxydantes (Wood, 2003). Elles sont au nombre de 6 chez les mammifères et sont localisées dans le cytosol, les mitochondries, les peroxysomes, associées au noyau et aux membranes. Ces protéines exercent leur rôle antioxydant à travers une activité peroxidase où H_2O_2 , le peroxinitrite et de nombreux hydroperoxydes sont les substrats. Malgré leur plus faible efficacité catalytique par rapport à la GPx et la CAT, ces protéines pourraient jouer un rôle significatif lors du développement du poumon et en réponse à un stress oxydant pulmonaire (Kim ,2001).

1.2.4.2-Systèmes antioxydants non enzymatiques :

Les anti-oxydants non enzymatiques réagissent directement avec les agents oxydants et les désactivent (Cillard, 1980). Les scavengers liposolubles, comme l' α -tocophérol (vitamine E), l'ubiquinol (forme réduite du coenzyme Q), sont concentrés dans les membranes cellulaires où ils sont particulièrement efficaces pour limiter la peroxydation lipidique. Leur effet protecteur est principalement lié à leur capacité à céder un de leurs électrons pour arrêter la propagation radicalaire tout en étant capable soit de céder un second électron lors d'une réaction d'oxydation conventionnelle soit de se régénérer par le remplacement de l'électron manquant. Dans les milieux hydrosolubles, de nombreuses molécules semblent avoir un pouvoir antioxydant. C'est notamment le cas de la vitamine- C, de l'acide urique, de l'albumine et de la bilirubine. Dans la pratique, leur pouvoir de scavenger n'est pas toujours évident (Buettner et *al*, 1996; Herbert et *al*, 1996).

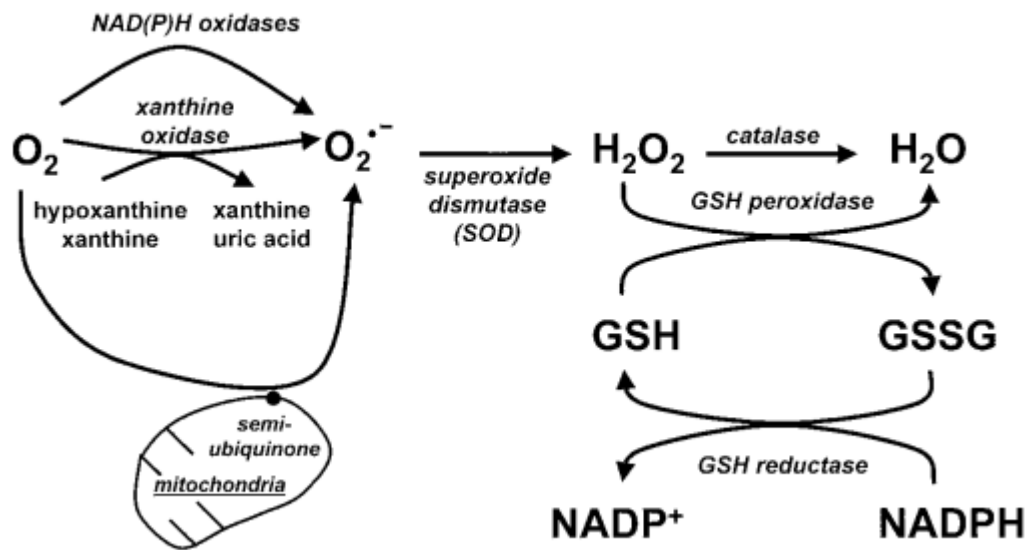


Figure 3: Voies de production et d'élimination des ROS (Wulf Dröge, 2002).

II- L'envenimation scorpionique

II.1- Le scorpionisme :

Le scorpionisme pathologie de l'envenimation scorpionique, est un problème qui sévit à travers les cinq continents. Par sa fréquence et sa gravité, il constitue un réel souci pour la santé publique d'une ampleur préoccupante dans de nombreux pays de l'Afrique du nord, Moyen Orient, Inde et l'Amérique du sud (Lourenço, 1988). Les études épidémiologiques rapportent que plus de 5000 personnes dans le monde en meurent chaque année (Polis, 1990).

II.2- Les scorpions

Les scorpions font partie du vaste embranchement des arthropodes caractérisés par l'existence d'un exosquelette chitineux articulé. Ils représentent les plus grands des arthropodes terrestres et qui ont survécu depuis 425 millions d'années. L'ordre des scorpion est numériquement peu important, environ plus de 1500 espèces. Abondants dans les régions intertropicales. Ils occupent tous les déserts chauds du globe, mais aussi les sommets et les grottes. Leur adaptabilité et leur résistance à tous les milieux et à des conditions difficiles sont légendaires. Ils sont caractérisés par une morphologie bien particulière. Le scorpion se sert souvent de son venin pour paralyser les grandes proies mais aussi pour se défendre. Ils sont d'un naturel craintif et peuvent piquer lorsqu'ils sont dérangés ou malmenés.

L'appareil venimeux des scorpions est constitué d'une vésicule à venin incluse dans le telson dernier anneau du Post-abdomen ou « queue » prolongée par un aiguillon ou dard permettant l'inoculation du venin. La vésicule contenant les glandes à venin est entourée d'une forte couche musculaire striée, permettant au scorpion d'expulser le venin mais aussi de contrôler cette expulsion de sorte que toute piqûre ne signifie pas obligatoirement injection de venin.

L'essentiel des connaissances acquises sur les venins de scorpion se rapporte aux espèces d'intérêt médical, les plus dangereux pour l'homme appartiennent toutes à la famille des Buthidae (Goyffon et Billiald, 2007) qui comprend les genres: *Androctonus*, *Buthus*, *Centruroides*, *Leiurus* et *Tityus*. (Francke 1982; González-Sponga et al, 1996).

Tableau 1 : Espèces de scorpions dangereuses pour l'homme et leur localisation (Goyffon, 2002)

Ancien Monde			
Genre	Espèce	Distribution	Remarques
<i>Androctonus</i>	<i>aeneas</i> <i>australis</i> <i>crassicauda</i> <i>mauretanus</i>	Afrique nord saharienne De l'Algérie à l'Egypte De l'Afrique du nord à l'Arabie saoudite Endémique du Maroc	Faible densité Plusieurs sous-sp. Plusieurs sous-sp.
<i>Buthotus</i>	<i>franzwerneri</i> <i>tamulus</i>	Endémique du Maroc Inde	Deux sous-sp. Parfois classé dans les genres <i>Mesobuthus</i> / <i>Buthus</i>
<i>Buthus</i>	<i>occitanus</i>	Pourtour méditerranéen et pays du Sahel	Dangerosité variable
<i>Leiurus</i>	<i>quinquestriatus</i>	Vaste répartition : Afrique, Moyen-Orient	Genre monosp.
<i>Parabuthus</i>	<i>granulatus</i> sp. ?	Afrique du sud Afrique de l'est Arabie	Dangerosité mal connue
<i>Hemiscorpius</i>	<i>lepturus</i>	Irak, Iran	Scorpionidé Dangerosité ?
Nouveau Monde			
Genre	Espèce	Distribution	Remarques
<i>Centruroides</i>	<i>exilicauda</i> <i>infamatus</i> <i>noxius</i> <i>suffusus</i>	Etats-Unis Etats-Unis, Mexique Mexique Mexique	D'autres espèces du genre sont dangereuses
<i>Tityus</i>	<i>bahiensis</i> <i>serrulatus</i> <i>trinitatis</i>	Brésil, Argentine Brésil Trinité	Parthénogénétique

II.3- Le venin scorpionique :

En plus de la fraction toxique, les venins de scorpions présentent un mélange complexe de plusieurs substances chimiques tels que des enzymes (hyaluronidases, phospholipases, phosphorylases, acétylcholinestérases...), des peptides, des nucléotides, des lipides, des mucoprotéines, des amines biogènes notamment (de la sérotonine (5 hydroxy-tryptamine), de l'histamine, de la kinine) et des substances non protéiques et autres substances non connues (Bouaziz et *al*, 1996; Loret et Hammock, 2001; Rodriguez de la Vega et Possani 2005). Des études, réalisées en particulier sur les espèces les plus venimeuses, ont montré que leur toxicité et leur mortalité était due à des petites protéines, les toxines, capables d'interférer avec le fonctionnement normal des canaux ioniques (Devaux et Rochat, 2002).

II.4- Les toxines scorpioniques :

Les venins de scorpions sont caractérisés par le grand nombre et la diversité des neurotoxines actives sur les canaux ioniques. Cette diversité s'exprime dans le polymorphisme moléculaire de chaque famille de toxines, toutes de nature protéique, mais aussi dans les récepteurs-cibles des canaux ioniques membranaires des cellules dites excitables (système neuro musculaire) (Goyffon et Al-Ayeb, 2002).

Suivant leurs caractéristiques immunologiques et chimiques, ces neurotoxines qui agissent sur toutes les membranes cellulaires des tissus excitables (cellules nerveuses et cellules musculaires) forment deux familles distinctes.

II.4.1- Les toxines «longues» :

Ces molécules sont des polypeptides basiques monocaténaires de 60 à 70 résidus d'acides aminés réticulés par quatre ponts disulfure. Les toxines longues des venins de scorpions se fixent avec une très bonne affinité ($K_d \sim 10^{-11}$ M) et induisent une prolongation du potentiel d'action en bloquant l'inactivation du canal sodique, qui se manifeste par une hyperexcitabilité du système nerveux suite à une augmentation de la perméabilité au Na^+ et une libération accrue des neuromédiateurs (Goyffon et Heurtault, 1995 ; Loret et Hammock, 2001).

Les toxines anti-canal sodium peuvent être regroupées en toxines spécifiques des mammifères, toxines spécifiques des insectes et toxines spécifiques des crustacés bien que, pour certaines d'entre elles, cette spécificité ne soit pas absolue. Parmi celles qui sont actives sur les mammifères, on trouve les toxines α et β en fonction de modes d'action différents dus à des sites différents sur le canal sodium (Rochat et *al*, 1979).

En fonction de leur séquence, ces toxines ont pu être regroupées en sous-ensembles de grande homologie. Les toxines appartenant au même groupe possèdent des propriétés immunologiques semblables et l'on a pu montrer des réactivités croisées entre elles, ce qui n'est généralement pas le cas pour des toxines appartenant à des groupes différents. (Devaux et Rochat, 2002). Il a été établi en effet que les neurotoxines actives sur les canaux sodium sont les responsables quasi exclusives de la symptomatologie de l'envenimation.

II.4.2- Les toxines « courtes » :

De même motif de base que les toxines longues, elles sont composées de 29 à 39 résidus d'acides aminés liés par 3 à 4 ponts disulfures actives sur les canaux potassium, calcium et chlore, présentent une spécificité vis à vis des vertébrés, des insectes et des crustacés et ne sont isolées que dans le venin des Buthidae. Les toxines actives sur les canaux potassium, isolés pour la première fois du venin du scorpion *Leiurus quinquestriatus hebraeus*, présentent une spécificité vis à vis des insectes et sans effets sur les mammifères. Elles agissent en bloquant la repolarisation membranaire. Les toxines actives sur les canaux calcium agissent sur les canaux calcium sensibles à la ryanodine et provoquent la libération du calcium sarcoplasmique. Les toxines agissant au niveau des canaux calcium et chlores ont été isolées du venin du scorpion *Pandinus imperator* mais ne semblent pas avoir d'effet toxique sur les mammifères (Goyffon et Heurtault, 1995). Les toxines actives sur les canaux potassium pourraient potentialiser l'effet des toxines actives sur les canaux sodium.

II.4.3- Les toxines du venin d'*Androctonus australis hector*

Dans le venin du scorpion *Androctonus australis hector*, espèce responsable de nombreux décès, trois neurotoxines majoritaires, *AahI*, *AahII*, et *AahIII* sont responsables de la quasi-totalité de la toxicité du venin chez l'Homme. Elles sont actives sur les canaux sodium dépendants du potentiel des cellules excitables vis-à-vis desquels elles présentent une affinité élevée. Elles sont qualifiées de "toxines longues". Elles ont une conformation très compacte avec une région " $\beta\alpha\beta\beta$ " comprenant trois des quatre ponts disulfure. Ces toxines induisent une prolongation caractéristique du potentiel d'action d'inhibition de la phase d'inactivation du canal sodium en se fixant sur un site défini, le site 3, de manière dépendante du potentiel membranaire. Ces propriétés caractérisent les toxines de type α . (Delori *et al*, 1981 ; El-Ayeb *et al*, 1983 et 1986 ; Martin-Eauclaire et Couraud, 1994). Des résultats préliminaires ont montré que la toxine *Aah II* disparaissait très rapidement du compartiment sanguin, contrairement aux toxines *Aah I* et *Aah III*. (Devaux et Rochat, 2002).

La toxine II d'*Androctonus australis hector*, la plus active des venins de scorpions, (DL50 dans les BALB/c est 300 ng par 20 g de souris par injection sous cutanée (Devaux et *al*, 2007), compte parmi les mieux étudiées. Sa structure tridimensionnelle a été déterminée par cristallographie aux rayons X avec une très haute résolution (0,8 Å). Cette protéine globulaire possède une structure composée d'une courte hélice α de dix to us et d'ni et de tro is feuillets β antiparallèles, de laquelle émergent des boucles qui relient ces différentes structures secondaires. Deux ponts disulfure relient l'hélice α aux fragments en feuillet β . Un troisième pont se situe dans une boucle du deuxième feuillet. Le quatrième pont rapproche le N - terminal du C-terminal. La région CHS (conseved hydrophobic surface) comportant Tyr5, Tyr35, et Trp/Tyr47 a été suggérée d'être responsable des effets pharmacologiques de cette toxine (Fontecilla-Camps et *al*, 1982; 1988).

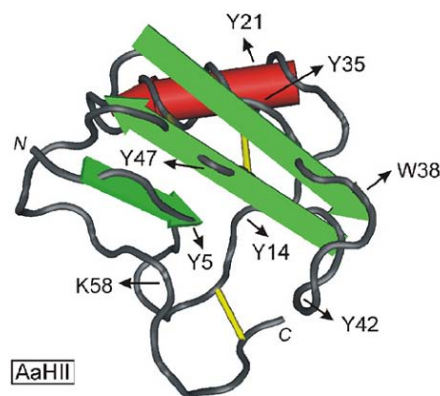


Figure 4 : Structure d'*Aah* II, représentative des α toxines scorpioniques (Liu et *al*, 2005).

II.4.4- Modes d'action des toxines scorpioniques :

Les neurotoxines actives sur les mammifères agissent sur les neurones périphériques selon deux modes différents:

- **Toxines α** potentiel dépendantes, ne modifient pas le potentiel d'ouverture du canal sodium, mais induisent un ralentissement du potentiel de fermeture. Elles sont caractéristiques des venins des scorpions de l'ancien monde. Il a été mis en évidence que les boucles extracellulaires du canal Na^+ reliant les segments S5 et S6 des domaines I et IV, participent au site d'attachement des toxines α . (Tejedor et al, 1988; Thomsen et al, 1989).

- **Toxines β** agissent sur le potentiel d'ouverture du canal sodium. Leur liaison au récepteur est indépendante du potentiel de membrane. Elles ne sont présentes que dans les venins des scorpions du nouveau monde. Par analyse de chimères et mutants de canaux Na^+ , il a été montré que la toxine β C_{ss} IV de *Centruroides suffusus suffusus* se liait sur un site récepteur impliquant la Gly 845 dans le segment extracellulaire S3-S4 du domaine II de la sous-unité α du canal Na^+ . (Cestele et al, 1998).

Le site de fixation de ces deux types de toxines sur le canal sodium est différent, le site 3 pour les toxines α , le site 4 pour les toxines β , entraînant les deux types de réponses pharmacologiques. (Goyffon, 2002).

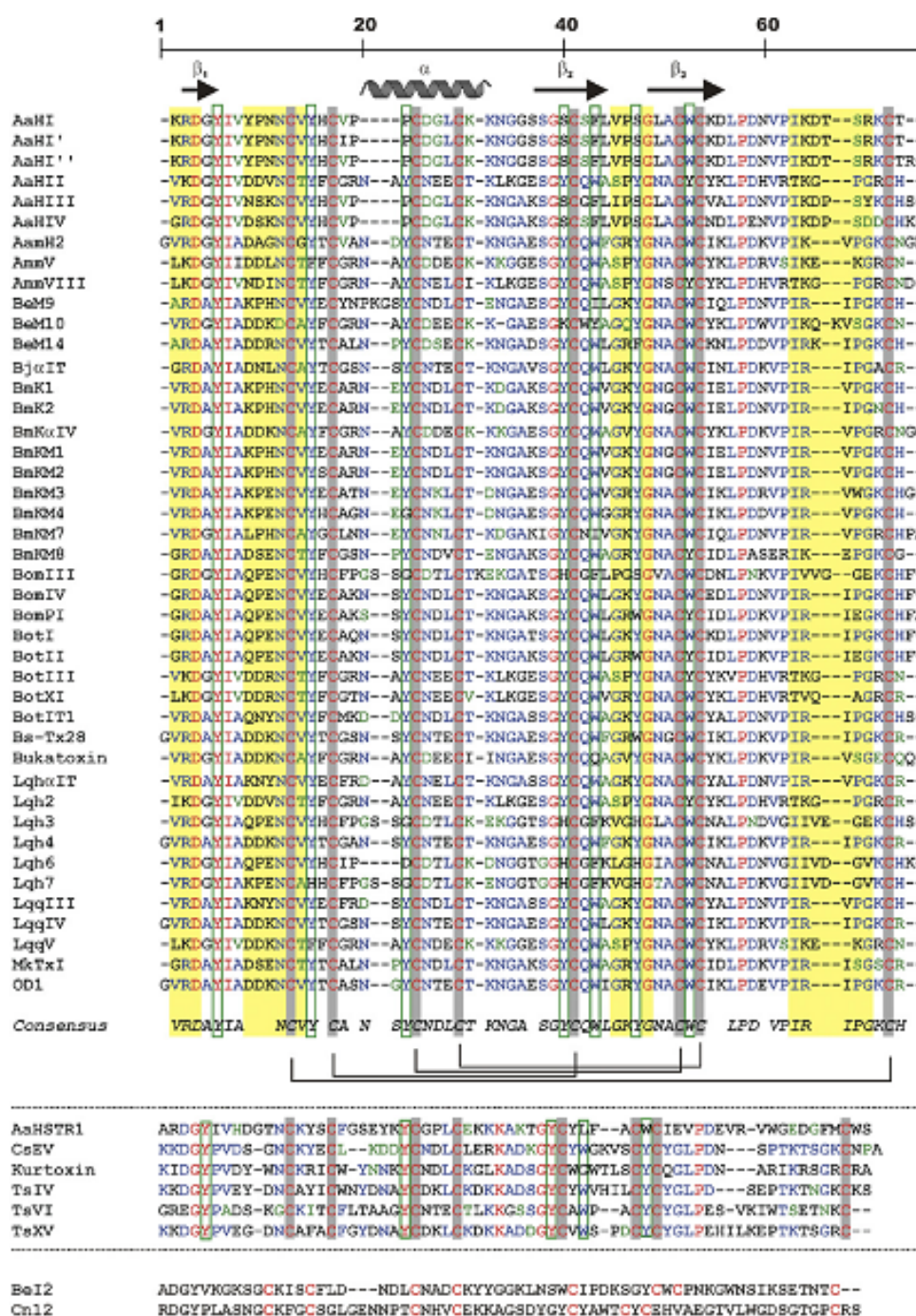


Figure 5 : Comparaison des Séquence des toxines scorpiques (possani et *al*, 1999; 2000; Alami et *al*, 2003; Arnon et *al*, 2005; Ali et *al*, 2006).

II.5- Toxicité des venins scorpioniques :

La grande toxicité des venins, telle que l'on peut l'apprécier chez la souris ou le rat, est due presque exclusivement à la présence des toxines actives sur les canaux sodium potentiel dépendant impliqués dans la transmission de l'influx nerveux (Miranda et *al*, 1970).

La toxicité du venin varie selon l'espèce et parfois, pour une espèce donnée, selon la sous-espèce ou une population particulière de l'espèce. Cette toxicité est généralement évaluée en DL 50 chez la souris, en conditions standardisées. Les venins les plus toxiques sont ceux de *Leiurus quinquestriatus*, *Androctonus australis*, *A. aenas* : leur toxicité est de l'ordre de 0,25 à 0,30 mg/kg. Pour *Buthus occitanus*, la DL₅₀ s'élève à 0,9 mg/kg. L'envenimation expérimentale chez la souris provoque rapidement un syndrome de type muscarinique : sialorrhée, larmoiement, hypersécrétion nasale, diarrhée, émission d'urine, dyspnée, contractions musculaires, paralysie spastique, et décès rapide. On sait maintenant que les toxines du venin de scorpion ne franchissent pas la barrière hémato-méningée, sauf chez l'animal nouveau-né. L'accumulation préférentielle de ces toxines au niveau du poumon pose la question de leur effet direct sur cet organe, et donc de la nature lésionnelle, au moins pour une part, de l'œdème pulmonaire fréquemment observé dans le scorpionisme grave (Goyffon et Al-Ayeb, 2002).

II-6-Les aspects cliniques de l'envenimation scorpionique :

L'intensité de la symptomatologie serait corrélée à la quantité circulante du venin (Hammoudi-Triki et *al*, 2004). L'évolution de l'envenimation est rapide, après une phase de latence d'une à deux heures pendant lesquelles le seul signe clinique est la vive douleur manifestée par le patient. La symptomatologie est due aux neurotoxines dépourvues d'activité enzymatique. Les venins de Buthidés sont en réalité pauvres en enzymes (Catterall et *al*, 1980).

Les facteurs de gravité de la piqûre chez l'homme sont fonction de l'espèce en cause, de la taille du scorpion (faible risque si inférieure à 3 cm) mais aussi de son âge, de sa nutrition, des conditions climatiques de son habitat, de la quantité de venin injecté (en pratique toujours ignorée), de sa voie d'introduction (en principe sous-cutanée ou intradermique, une exceptionnelle inoculation intravasculaire étant plus dangereuse). Une inoculation au niveau du tronc, de la tête ou du cou, zones richement vascularisées, est un facteur de gravité de même que l'âge du sujet (plus importante chez les enfants de moins de 15 ans et la mortalité est particulièrement importante chez les enfants de moins de 6 ans), le délai de prise en charge

(gravité plus significative pour un délai supérieur à 2 h 30 mn (Broglia et *al*,1980; Bouaziz et *al*,1996; Nouira et *al*,1993 et 1999; Abroug,1999, Possani ,2000).

On peut distinguer trois stades de gravité croissante (Goyffon, 2002 ; Goyffon et *al*, 1982).

Stade 1 : Envenimation bénigne. La douleur, immédiate, intense persistante, elle est à type de sensation de gêne, de fourmillements, de paresthésies ou de brûlure avec des sensations d'accalmie relative et de reprises, va durer dix à quinze heures parfois d'avantage jusqu'à vingt quatre heures cette douleur caractéristique signe d'inoculation du venin. L'évolution est spontanément et rapidement favorable en quelques heures (Gaudrault et *al*, 2000; Goyffon et Billiald, 2007)

Stade 2 : Envenimation modérée. Ce stade est marqué, dans un délai de deux à plusieurs heures après la piqûre, par l'apparition de signes systémiques de la série muscarinique principalement : sueurs profuses, troubles digestifs, vomissements, coliques, diarrhée, hypotension artérielle, parfois bradycardie, signes d'encombrement pulmonaire, dyspnée, élévation de la température corporelle. Ces symptômes réclament une surveillance particulière. L'évolution à ce stade est elle-même favorable dans plus de 90 % des cas après une prise en charge médicale hospitalière (Goyffon et Billiald, 2007)

Stade 3 : Envenimation sévère. C'est le stade de collapsus cardiovasculaire, accompagné de difficultés respiratoire majeures : oedème pulmonaire, bronchospasme, cyanose. On peut noter en outre une hyperthermie, des troubles de rythme cardiaque, des signes d'ischémie myocardique. À ce stade l'évolution est fatale en quelques heures parfois en quelques minutes, dans près de la moitié des cas. Il peut arriver chez le jeune enfant, que l'envenimation évolue directement du stade 1 au stade 3 (Broglia et Goyffon, 1980; Goyffon et Billiald, 2007).

II.7- Physiopathologie de l'envenimation scorpionique :

La diffusion et la distribution du venin dans un large compartiment extravasculaire de l'organisme sont rapides, expliquant la rapidité des symptômes. Après injection sous cutanée chez le lapin, 70 % du venin se retrouvent dans la circulation sanguine en moins de 15 min, et la concentration sérique maximale est atteinte en moins de deux heures (Clot-Faybesse, 1999). Les toxines disparaissent rapidement du courant circulatoire, plus rapidement que les

autres composants du venin (Devaux et *al*, 2004). Elles se concentrent préférentiellement dans les viscères : poumon , rein , foie et cette accumulation des toxines radio- marquée dans les viscères est plus accentuée chez l'animal immature que chez l'adulte (Clot-Faybesse,1999). L'accumulation des toxines dans certains viscères s'accompagne d'effets tissulaires directs du venin de scorpion.

Malgré d'importantes différences entomologiques entre les nombreuses espèces de scorpion, il existe une grande homologie des effets toxiques de leur venin et de leurs structures antigéniques :

I.7-1- Action cellulaire et perturbation de l'équilibre électrolytique:

Les toxines du venin ont une action directe sur les cellules membranaires induisant un changement de potentiel d'action transmembranaire en agissant sur la perméabilité des canaux ioniques (Possani et *al*, 1999) ce qui engendre une dépolarisation durable du système nerveux. Les expériences de Chaymol (1973) avec trois scorpions de la famille des *Buthidaes* ont montré que les venins leurs avaient une triple action au niveau neuromusculaire:

- Une augmentation d'amplitude de la contraction des fibres musculaires.
- Une contracture suivie par une ou plusieurs autres, spontanées si la dose de venin est suffisante.
- Une paralysie secondaire après chaque contracture, d'abord réversible puis de moins en moins.

Ces venins n'agissent pas au niveau des terminaisons nerveuses ou des plaques motrices. Ils agissent sur la fibre musculaire et sur les fibres nerveuses au niveau des zones démyélinisées.

L'augmentation d'amplitude initiale est due en partie à la décharge de catécholamines induites par le venin mais également à une accumulation de calcium à la suite des modifications de la perméabilité membranaire. Quant à la paralysie secondaire, elle serait due à une fuite de potassium, conséquence de la dépolarisation prolongée correspondant à la contracture. L'augmentation de la concentration du potassium extracellulaire, par une dépolarisation excessive, à une diminution des protéines d'actions et à un allongement de la période réfractaire.

II.7.2- Action sur le système nerveux central :

L'injection expérimentale de venin purifié dans les ventricules cérébraux chez le chat, le lapin et le rat entraîne des manifestations très variées d'excitation du système nerveux: état d'agitation, tremblement, mouvement anormaux, convulsion, hyperthermie et troubles respiratoires (Osman et *al*, 1973). Le système nerveux autonome semble particulièrement mis en jeu.

La stimulation du système nerveux autonome avec une prédominance de la stimulation du système sympathique engendre la libération massive dans le tissu des catécholamines (Ismail, 1999), corticoïdes et prostaglandines induisant la libération des médiateurs de l'inflammation comme IL6 (Krifi et *al*, 1998; Hammoudi-Triki et *al*, 2004) et IL-10, TNF- α (Ismail et *al*, 1994).

Le système parasympathique est aussi mis en jeu par le biais de la libération de l'acétylcholine (Amitai, 1998).

Les expériences de Clot-Faybess (2001) sur les rats par injection du venin d'*Androctonus australis hector* suggère la non implication du système supra-thoracique dans les manifestations neurotoxiques du venin.

Les toxines se fixent sur les centres supérieurs et principalement sur les centres bulbaires pouvant entraîner une agitation intense, délire, et dérèglement thermique (particulièrement fréquent et grave chez l'enfant), vomissements et diarrhées.

Des résultats récents montrant que les neurotoxines ne diffusent pas jusqu'aux centres nerveux, mais qu'au contraire leur action est avant tout périphérique, méritent une attention toute particulière (Clot-Faybess et *al*, 2001).

II.7.3- Action sur le système cardiovasculaire :

L'atteinte myocardique directe, réversible sans séquelles ultérieures apparentes répond à un mécanisme qui n'est pas complètement éclairci (Peytel et Goyffon, 1999). Les désordres hémodynamiques et la libération des médiateurs inflammatoires sont fortement impliqués dans la genèse des perturbations cardiorespiratoires (Sofer et *al*, 1999; Meki et Mohey-El-Dean, 1998; Fukuhara et *al*, 2003).

Une augmentation de la pression sanguine est observée quelques minutes après injection s.c. du venin d'Aah, avec une hypertension maximale 40 min après envenimation suivi d'une phase hypotensive et d'une diminution continue du rythme cardiaque (Hammoudi-Triki et *al*, 2005).

II.7.4- Action sur le système respiratoire :

II.7.4.1- L'oedème pulmonaire:

La physiopathologie de l'oedème du poumon secondaire à l'envenimation scorpionique est complexe du fait de l'interaction de nombreux facteurs dus aux effets cholinergiques des toxines mais aussi à une action indirecte de type inflammatoire au niveau du poumon (Peytel et Goyffon, 1999). Rossi et *al*, (1974) sont les premiers à proposé un mécanisme de l'oedème pulmonaire induit par le venin de *Tityus serrulatus*. Ils ont trouvé un sévère endommagement dans la structure des capillaires alvéolaires, suggérant une destruction des cellules de l'endothéliale pulmonaire.

Nouira et *al*, (1995) démontrent l'origine hémodynamique de l'oedème pulmonaire en observant une élévation significative de la pression artérielle d'occlusion et une diminution du volume d'éjection systolique et un échec du ventricule gauche dans huit cas successifs d'oedème pulmonaire.

Suite à des expériences fait sur le poumon du lapin *in vivo* et sur un coeur isolé, D'Suze et *al*, (2003), ont pu montré que l'oedème pulmonaire est induit suite à un mécanisme indirecte comprenant une cascade de coagulation par action du venin de *tityus discrepans*.

Le rôle des mastocytes, la cascade de réactions inflammatoires cellulaires, histopathologiques et la présence d'un syndrome humoral de réponse inflammatoire systémique non infectieux sont aussi impliqués dans la pathogenèse de l'oedème pulmonaire induit par le venin de scorpion (De Matos et *al*, 2001; D'suze et *al*, 2004; Abdel-Halim et *al*, 2006).

II.7.4.2- Les troubles respiratoires:

Chez l'animal, l'envenimation entraîne des troubles respiratoires à type de tachypnée, irrégularité respiratoire et insuffisance respiratoire aiguë. Chez l'homme la dyspnée est le caractère commun chez tous les cas de l'envenimation scorpionique (Bouaziz et *al*, 1996).

L'envenimation expérimentale induit des variations dans le rythme respiratoire et une réponse inflammatoire rapide, 45 min après injection du venin d'Aah, se traduisant par une bronchoconstriction et une infiltration importante des polynucléaires et des monocytes dans le sang et le liquide broncho-pulmonaire. L'augmentation de l'activité de la peroxydase éosinophilique (EPO) confirme la présence des polynucléaires éosinophiles (PE) au niveau des poumons (Adi-Bessalem et *al*, 2003; 2008).

II.7.5- Modification des paramètres biologiques:

Il existe une élévation fréquente de la glycémie (2 à 2,5g/l). Selon Murthy (1994), la libération massive des catécholamines suite à la stimulation du système nerveux autonome, fais augmenter le taux d'angiotensine II et inhibe la sécrétion de l'insuline.

L'hyperamylasémie est noté chez des enfants piqués par *Tityus serrulatus* (Bucharetschi et *al*, 1995). Les troubles électrolytiques sont généralement modérés. Hyponatrémie, hyperkaliémie et hypocalcémie; des perturbations des transaminases sont également notés.

Bahloul (2002) a observé une augmentation de l'hémoglobine et des protéines plasmatiques chez les patients atteints d'oedème pulmonaire, une protidémie >72 g/l représente un signe prédictif de survenue d'oedème pulmonaire chez les patients piqués par scorpion. Les métabolites des catécholamines au niveau des urines sont aussi augmentés (Bouaziz, 1996).

II.7.6 - Conséquences hormonales :

Au plan hormonal, l'envenimation scorpionique est caractérisée par une décharge très intense de catécholamines expliquant la vasoconstriction intense, l'élévation tensionnelle et très probablement la dysfonction ventriculaire gauche initiale. Aussi bien l'adrénaline que la noradrénaline s'élèvent de façon substantielle après injection d'une dose sublétales du venin de *Buthus occitanus tunetanus* (15 et 25 fois le niveau de base respectivement) (Zaghal et *al*, 2000). D'autre part il a été mis en évidence dans autre modèle animal une élévation d'un autre peptide vasoconstricteur, le neuropeptide Y. Celui-ci subit une élévation précoce dès la 5^{ème} minute avec un maximum de sécrétion atteint à la 30^{ème} minute. Parallèlement à l'augmentation des cathécolamines, celle du NPY participe à l'élévation des résistances vasculaires systémiques caractéristiques de l'envenimation scorpionique (Abroug et *al*, 2003). Sur le même modèle, il a été également mis en évidence une sécrétion de facteur atrial natriurétique (FAN). Cette sécrétion est détectée dès la 5^{ème} minute pour culminer à la 30^{ème}

minute et baisser par la suite progressivement pour atteindre des niveaux normaux vers la 180^{ème} minute. Cette évolution est tout à fait parallèle à celle de la pression artérielle pulmonaire d'occlusion. Et, comme suggéré par les données physiopathologiques récentes, il existe une bonne corrélation entre l'élévation du FAN (facteur natriurétique atrial) sécrété et l'élévation des pressions artérielles pulmonaires d'occlusion témoignant de l'activation de cette sécrétion par le biais d'une distension auriculaire (Nouira et *al*, 2005).

I1.7.7- Conséquences métaboliques :

Des modifications métaboliques ont été observées lors des envenimations accidentelles et expérimentales. Des variations dans les activités enzymatiques, marqueurs de certaines lésions tissulaires, ont été rapportées (Corréa et *al*, 1997; Amaral et *al*, 1991; Gueron et Sofer, 1991; Sofer et *al*, 1991).-

L'analyse des activités métaboliques a montré une augmentation des taux enzymatiques sériques (transaminases, créatine kinase et lactate déshydrogénase) marqueurs de lésions des organes cœur et poumons, avec un maximum de concentration, 60 min après envenimation par le venin d'Aah (Bessalem et *al*, 2003; Adi- Bessalem et *al*, 2008). Une activité phospholipase résultante d'une augmentation de flux de calcium Ca^{2+} au niveau des hépatocytes a été observée avec le venin de *Leiurus quinquestriatus* (Berteki et *al*, 1961). Ce même venin a induit également chez les rats une augmentation de l'activité de glutathion peroxydase (GPx) et de glucose 6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) au niveau du cœur. En revanche cette activité est diminuée dans les poumons (Fatani et *al*, 2006). L'élévation de G6PDH indique une stimulation de la voie des pentoses phosphates qui favorise la production de NADPH impliquée dans la régénération de GSH réduit et ses formes oxydées (GSSG) (Al-Achmawy et *al*, 1999; Kletzien et *al*, 1994). Les auteurs attribuent l'élévation de l'activité de glutathion peroxydase dans le cœur et diminution de son efflux vers la circulation sanguine, pour neutraliser les anions superoxydes et contrecarrer au stress oxydatif (Al-Omar et *al*, 2004).

II.7.8- Processus inflammatoire et réponse immunitaire induits par les venins scorpioniques et leurs toxines: implication des macrophages et des médiateurs inflammatoires

L'envenimation scorpionique est l'un des processus non infectieux qui peut conduire à une réponse inflammatoire systémique (Alejandro et *al*, 2004). L'envenimation expérimentale provoque une réponse inflammatoire et des changements tissulaires importants. Elle se manifeste par une augmentation du taux des cytokines tels que (IL-1, IL-6, TNF- α et IL-10) et des altérations des structures tissulaires avec apparition de foyers hémorragiques, de zones nécrotiques et des œdèmes interstitiels dans plusieurs organes (Corréa et *al*, 1997; Daisely et *al*, 1999; D'Suze et *al*, 2004; Adi- Bessalem et *al*, 2008).

Des travaux antérieurs ont montré que le venin scorpionique peut provoquer de la leucocytose, des dommages dans de nombreux organes simultanément, ce qui devrait stimuler la réponse inflammatoire et la libération de cytokines (Devi et *al*, 1970; D'Suze et *al*, 1999; D'Suze et *al*, 1995 ; Hammoudi-Triki et *al*, 2004). Certains auteurs ont soutenu l'hypothèse que les dommages tissulaires, la pancréatite, le syndrome de détresse respiratoire et de multiples défaillances organiques sont liés à la production incontrôlée de cytokines et d'autres produits de l'activation des macrophages et les lymphocytes (Bone et *al*, 1996; Kingsnorth, 1997). D'autres études ont montré l'implication possible des marqueurs de l'apoptose dans les dommages cellulaires induits par le venin scorpionique (Meki et *al*, 2003).

Des envenimations expérimentales réalisées sur les rats par les fractions toxiques de venin d'*Androctonus australis Hector*, ont montré que les toxines scorpioniques sont responsables d'une peroxidation lipidique considérable au niveau de la plupart des organes vitaux. L'utilisation des antioxydants a bien montré un effet protecteur chez les souris après injection des doses sublétales des toxines de venin d'Aah, suggérant l'implication mineure des radicaux libres dans la toxicité du venin scorpionique (Dousset et *al*, 2007). D'autre part un stress oxydatif et une implication des protéases dans les dommages tissulaires ont été observés lors de l'envenimation expérimentale par le venin de *Leiurus quinquestriatus* montrant une élévation des taux de MDA. En effet les mécanismes qui provoquent la génération des radicaux libres et la peroxidation lipidique dans les envenimations scorpioniques, sont complexes. Selon les hypothèses de plusieurs auteurs, ils font intervenir l'interaction de plusieurs facteurs :

- les neurotoxines des venins scorpioniques agissant au niveau des canaux ioniques des cellules, provoquent une altération de transport ionique et une augmentation du calcium cytosolique (Harvey et *al*, 1992). Ceci permet l'élévation de la concentration d'AMP, et

favorise son catabolisme et par conséquent une production de radicaux libres. Ces derniers attaquent les phospholipides membranaires causant leur peroxydation. L'occurrence de la peroxydation lipidique dans les membranes biologiques entraîne un dysfonctionnement membranaire, en diminuant de leur fluidité et une inactivation des récepteurs liés aux membranes. Tous ces facteurs contribuent au dysfonctionnements de plusieurs organes (Al-Omar et al, 2004; Bhaumik et al, 1995; Love et al, 1999), souvent rencontrés dans les envenimations scorpioniques (Meki et al, 2003). Alternativement l'action des venins scorpioniques sur les canaux sodiques augmente la libération des cathécolamines qui induisent la génération des radicaux libres menant au stress oxydatif et à l'apoptose (Khorchid et al, 2002).

Par ailleurs il a été rapporté que les venins scorpioniques contiennent la superoxyde desmutase (SOD), dont l'action est inhibée par les antivenins spécifiques suggérant que cette enzyme contribue à la toxicité du venin (Ramanaiah et Vankaiah, 1992). Ce ci corrobore avec les résultats de Dousset et ses collaborateurs montrant une aggravation des symptômes de l'envenimation scorpionique et diminution de temps de survie des souris par SOD, cependant le mécanisme de cette cytotoxicité augmentée n'est pas clair. Pourtant il est bien documenté que le SOD possède des propriétés de piégeage ou *scavaging* des ROS (Shimizu et al, 1984). La qualité de la réponse immunitaire est reflétée par la production des isotypes d'immunoglobulines, les sous populations cellulaires activées, et les cytokines synthétisées (Petricevich et Lebrun 2004).

La stimulation des macrophages conduit à la libération de plusieurs médiateurs inflammatoires dont les dérivés réactifs de l'oxygène par la membrane liée au NADPH oxydase durant l'explosion oxydative (Michael et al, 1985). En effet les macrophages sont impliqués dans les différents mécanismes homéostatiques et pathologiques et pouvant intervenir dans des interactions cellulaires complexes de l'organisme (Stein et Gordon, 1991; Mosser, 2003).

La stimulation *in vitro* des macrophages péritonéaux des souris BALB/c par le venin de *Tityus serrulatus* a permis leur activation manifestée par une libération importante des médiateurs inflammatoires tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le monoxyde d'azote (NO) et plusieurs cytokines pro-inflammatoires (TNF, IL-1, IL-6, IL-8, IFN- γ) et anti-inflammatoires (IL-10), et qui peuvent moduler la réponse macrophagique. Les cytokines jouent un rôle important dans l'orchestration de la réponse inflammatoire (Petricevich, 2002; Petricevich et Lebrun, 2004; Petricevich et al, 2007) et tout dérèglement de la production de ces molécules peut avoir des conséquences graves sur le fonctionnement de l'organisme, d'où l'intérêt

d'évaluer la balance entre les cytokines pro et anti-inflammatoires dans les processus physiopathologiques tels que l'envenimation scorpionique (Coffman et al, 1991; Terada et al, 1995; Sofer et al, 1995; Magalhaes et al, 1999). En effet la sévérité de l'envenimation a été associée à une altération de la balance des cytokines inflammatoires induites par l'activation des cellules Th1 et Th2. Une élévation significative des rapports de TNF- α / IL-10 et d'IL-6 / IL-10 au niveau des sérums des souris envenimées par le venin de *Centruroides noxius* comparée avec ceux de groupes de souris non envenimées (Petricevich, 2006). Les effets exercés par les cytokines peuvent être pleiotropiques, synergiques ou antagonistes (Petricevich et Lebrun, 2004).

Le TNF- α agit en synergie avec l'IL-1 en partageant les mêmes effets biologiques dans l'inflammation septique (Herbertson et al, 1995). La production d'IL-6 est atténuée par l'IL-1 ou le TNF- α (Dube et al, 2004).

L'IFN- γ est une cytokine dans les défenses immunitaires contre les organismes pathogènes intracellulaires comme *Escherichia coli* en stimulant la phagocytose des macrophages péritonéaux et les cellules de kupffer (Cross et al, 1995).

L'IL-10 limite la réponse inflammatoire en inhibant les cytokines dérivées de Th1. Une concentration inadéquate de cette cytokine peut engendrer un excès de l'inflammation (Petricevich et Lebrun, 2004). La réponse inflammatoire aigue induite par la toxine Ts1 du venin *Tityus serrulatus* déclenche tardivement une réponse anti-inflammatoire via les cytokines antagonistes comme l'IL-10 (Petricevich et al, 2007).

Les cytokines sont des puissants modulateurs des macrophages péritonéaux, des espèces réactives de l'oxygène comme l' H_2O_2 et l' O_2^- , et des espèces réactives de l'azote comme le NO et le NO_2^- (Petricevich, 2002).

Des études antérieures ont montré que d'autres médiateurs inflammatoires tels que les facteurs de complément synthétisés par les macrophages, le facteur activateur des plaquettes (PAF), les prostaglandines (PGE2) et prostacyclines peuvent moduler l'activation des macrophages (Michael et al, 1985). En outre l'intensité de la réponse inflammatoire est amplifiée par l'activation de la protéine C réactive (CRP) et les protéines du complément. Ces facteurs contribuent à des réactions systémiques et locales (Bertazzi et al, 2003; 2005). L'activation du système du complément peut être impliquée dans les dommages tissulaires et l'oedème pulmonaire observés dans les envenimations scorpioniques entraînant une augmentation de la perméabilité vasculaire, la migration chimiotactique des leucocytes (Neutrophiles, monocytes sanguins) vers le site inflammatoire, dégranulation des cellules phagocytaires et induction d'une broncho constriction (Bertazzi et al, 2005; Adi-Bessalem et al, 2008).

II.8- Traitements anti- scorpioniques :

II.8.1- Le traitement spécifique :

L'immunothérapie est largement discutée dans la littérature entre adeptes acharnés et sceptiques quant à l'efficacité clinique de cette approche. Sur le plan expérimental, il est clairement établi que le sérum développé contre les venins de scorpions sévissant dans différentes contrées du globe a une capacité de neutralisation adéquate *in vitro*.

Aujourd'hui encore, la sérothérapie reste le seul traitement spécifique des envenimations scorpioniques. Bien que très utilisée, elle est souvent contestée du fait du manque d'investigations bien contrôlées prouvant son efficacité et établissant rigoureusement ses conditions d'utilisation.

Ce traitement est basé sur l'utilisation d'anticorps polyclonaux hétérologues dirigés, soit contre le venin d'une espèce unique (sérum monovalents), soit contre les venins de plusieurs espèces (sérum polyvalents). Il n'existe pas d'antivenin universel en raison de l'endémicité des scorpions, les espèces dangereuses ne représentant en outre qu'une faible proportion de la totalité des espèces. Chaque pays concerné produit son propre antivenin neutralisant les venins des scorpions locaux les plus communs et/ou dangereux. Ainsi, les antivenins sont largement utilisés en Tunisie, en Algérie, en Egypte, en Arabie saoudite, au Brésil et au Mexique (Abroug *et al*, 1999 .; Ismail, 2003)

Les antivenins ont pendant très longtemps été constitués par des immunosérums ou des IgG purifiées, obtenus après immunisation d'animaux avec un venin complet d'une ou plusieurs espèces de scorpions. Cependant ces préparations étaient à l'origine d'effets secondaires importants. La qualité et l'efficacité des antivenins ont été améliorées par l'utilisation de fragments F (ab')₂ ou Fab et par l'introduction d'étapes de purification pour éliminer les protéines exogènes, l'albumine et le complément (Chippaux et Goyffon, 1998 ; Theakston *et al*, 2003). IgG et F (ab')₂ possèdent des caractéristiques fonctionnelles et pharmacocinétiques voisines, mais les fragments F (ab')₂, dépourvus de fragments Fc, sont sensiblement mieux tolérés. Les caractéristiques de ce type d'anti-corps sont sensiblement différentes : en particulier, leur faible masse molaire, de l'ordre de 50 kDA, leur permet de franchir le filtre rénal et d'être éliminés dans les urines (Goyffon et Al-Ayeb, 2002).

La sérothérapie, traitement spécifique, est à mettre en œuvre impérativement devant toute piqûre potentiellement grave. L'administration d'un sérum anti venimeux répond à une stratégie de la cible : il s'agit d'intercepter les toxines circulantes avant qu'elles atteignent les

récepteurs membranaires des cellules des tissus excitables auxquels elles se lient avec une haute affinité. Dans le cas d'une envenimation scorpionique, la précocité de la sérothérapie est importante puisqu'on sait maintenant que la symptomatologie est liée pour une part essentielle à une action viscérale de type inflammatoire sur la quelle les anticorps auront peu d'effet une fois qu'elle s'est amorcée (Goyffon et Billiald, 2007). Les cliniciens avaient noté une perte d'efficacité du SAV en fonction du délai de deux heures après la piqure était dépassée. (Goyffon et *al*, 1982; Jeddi et *al*, 1988).

La quantité de SAV à administrer est théoriquement définie par la nécessité de neutraliser la quantité maximale de venin que peut injecter un scorpion. La voie intraveineuse est très généralement recommandée en raison d'une distribution plus rapide des anticorps neutralisants (Peytel et Goyffon, 1999; Krifi et *al*, 2001; El- Hafny et *al*, 2002 ; Hammoudi – Triki et *al*, 2007). Les données de la littérature montrent qu'après une sérothérapie bien conduite on observe rarement une évolution vers des critères de gravité (Ismail, 1996). Les effets indésirables se résument en urticaire, et/ou hypersécrétions bronchiques. Toutefois, certains sérums spécifiques comme celui de *Centroïdes sculpturatus* préparés à partir de sérum de cheval ou de chèvre peuvent induire de rares réactions anaphylactiques ou anaphylactoïdes facilement contrôlées par les corticoïdes et antihistaminiques (Gaudrault et *al*, 2000; Auerbach et *al*, 1992; Lo Vecchio et *al*, 1999). En effet, l'antivenin (mono ou polyvalent) n'est efficace que s'il est utilisé avant que les signes généraux sévères d'envenimation (stade III) n'apparaissent, les toxines ne pouvant être déplacées de leur site de fixation cellulaire (De Haro ,2000; De Haro ,1999).

Les toxines identifiées, purifiées, séquencées et caractérisées à partir des deux espèces *Androctonus australis* et *Buthus occitanus tunetanus* appartiennent à trois groupes structuraux et d'homologie antigéniques. Des anticorps préparés contre une toxine d'un groupe structural sont capables de neutraliser les toxines appartenant à ce groupe. De même, il a été démontré qu'un mélange d'anticorps dirigé contre une toxine représentative de chacun des trois groupes neutralise les venins d'*Androctonus australis* et *Buthus occitanus tunetanus* (Srairi et *al*, 2002). Aujourd'hui, l'ingénierie moléculaire permet de créer de nouveaux fragments d'anticorps recombinants de meilleure qualité que les sérums antivenimeux polyclonaux en termes d'homogénéité, d'activité spécifique et probablement de sécurité d'emploi. Plusieurs fragments d'anticorps simple-chaîne (scFv) neutralisant des toxines de scorpion ont été produits et caractérisés. Ces molécules constituent des modules de base pour concevoir des structures d'anticorps plus complexes: fragments d'anticorps monospécifiques multivalents (diabody, triabody) ou fragments d'anticorps bispécifiques (scFv en tandem) (Aubrey et *al*, 2006).

II.8.2- Traitements symptomatiques :

Un certain nombre de drogues sont utilisés pour contrecarrer les effets des symptômes souvent observés au cours des envenimations scorpioniques. Le traitement symptomatique banal à base d'antalgiques et d'antihistaminiques est généralement suffisant. La douleur peut être soulagée efficacement en refroidissant la zone d'inoculation (Gaudreault, 2000; Broglio et *al*, 1980; Bush et *al*, 1999; Abroug et *al*, 1999). Une hyperthermie sera traitée par des antipyrétiques telles que paracétamol, dantrolène, ou l'acétylsalicylate (Ismail et *al*, 1996). Les vasodilatateurs à base de (prazosine, hydralazine, nifédipine, captopril) ont un effet bénéfique dans le traitement de l'hypertension artérielle (Elatrous et *al*, 1999; Bawaskar et *al*, 1998). La dobutamine est utilisée en cas d'insuffisance cardiaque aiguë (Elatrous et *al*, 1996; Elatrous et *al*, 1999). Les vomissements, fréquents lors des envenimations scorpioniques, peuvent être traités par métoclopramide ou la chlorpromazine. Les réactions allergiques sont atténuées par administration d'épinephrine et de corticoïdes (Ismail et *al*, 2003).

II.8.3- Les glucocorticoïdes :

Les glucocorticoïdes tels que l'hydrocortisone sont parfois utilisés à fin de prévenir une réaction anaphylactique possible lors de l'administration de l'immunothérapie anti-scorpionique (Osnaya-Romero et *al*, 2000; Rhalem et *al*, 1995), bien que les corticoïdes à dose élevée (3 g) administrés par voie générale associés au sérum antiscorpionique ne semblent pas modifier l'évolution (Nouira et *al*, 1993; Possani et *al*, 2000).

Les glucocorticoïdes sont des anti-inflammatoires puissants, leur effet thérapeutique contre l'inflammation chronique est médiée par une action hormonale directe sur les macrophages. Bien que le site d'action des glucocorticoïdes sur les macrophages n'a pas été établie, il a été démontré que, dans de nombreux autres systèmes cibles des glucocorticoïdes, les effets des glucocorticoïdes sont médiés par des protéines de liaison macromoléculaire, dénommées récepteurs (Claman et *al*, 1972; Munck et *al*, 1977). Les corticoïdes comme la dexaméthasone interagissent avec les macrophages à des concentrations physiologiques en se liant à des récepteurs nucléaires et cytosoliques (Werb et *al*, 1978).

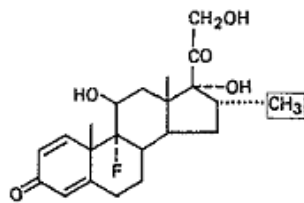
Les canaux sodiques des macrophages sont régulés positivement après traitement de ces cellules avec des glucocorticoïdes (Gamper et *al*, 2000).

Parmi les impacts des glucocorticoïdes sur la réponse immunitaire :

- Une altération de la phagocytose à savoir une inhibition de la migration des polynucléaires neutrophiles et des monocytes vers le foyer inflammatoire, une inhibition de l'adhérence entre le phagocyte et le microbe, une inhibition de la phase d'ingestion et de digestion.

- Une altération de l'immunité à médiation cellulaire (inhibition de la production des cytokines pro-inflammatoires, diminution de la présentation des antigènes aux lymphocytes T).
- Une altération de l'immunité à médiation humorale (Cohn et *al*, 1997).

Malgré l'efficacité des glucocorticoïdes dans les traitements des symptômes (douleur) et l'étiologie (réponse leucocytaire), leurs effets secondaires sont trop importants.



Dexaméthasone (CH₃ en α) ou bétaméthasone (CH₃ en β).

Figure 6 : structure chimique de Dexaméthasone.

CHAPITRE 2 :

MATERIELS ET MÉTHODES

III. Matériel et méthodes

III.1- Matériel

III.1.1- Matériel biologique

III.1.1.1- Venin d' *Androctonus australis hector* (Aah)

Le venin d'Aah, est fourni sous forme lyophilisée par le Laboratoire de Recherche et de Développement sur les Venins de l'Institut Pasteur d'Algérie.

III.1.1.2- Toxine Aah II

La toxine Aah II purifiée, sous forme lyophilisée, nous a été gracieusement fournie par le Docteur Marie-France Martin-Eauclaire (CNRS FRE 2738, Biologie des Interactions Moléculaire et Cellulaire, IFR Jean-Roche, Université de la Méditerranée, Faculté de Médecine Nord, Bd Pierre Dramard, 13916, MARSEILLE, Cedex 20, France).

III.1.1.3- Le sérum anti scorpionique

L'immun-sérum anti F_{tox} G50 nous a été fourni par le Laboratoire de Recherche et de Développement sur les venins de l'IPA. Il est obtenu après hyperimmunisation d'un cheval, avec la fraction toxique majoritaire de venin d'Aah (F_{tox} G-50).

III.1.1.4- Les anticorps spécifiques de la toxine Aah II :

Les anticorps anti toxine Aah II, purifiés et lyophilisés, nous ont été gracieusement fournis par le Docteur Marie-France Martin-Eauclaire (CNRS FRE 2738, Biologie des Interactions Moléculaire et Cellulaire, IFR Jean-Roche, Université de la Méditerranée, Faculté de Médecine Nord, Bd Pierre Dramard, 13916, MARSEILLE, Cedex 20, France).

III.1.1.5- Les animaux

Cette étude a été réalisée sur des souris BALB/c femelles (20 ± 2g), gracieusement fournies par l'animalerie du Laboratoire de Contrôle de Qualité de l'I.P.A.

III.1.2- Matériel non biologique

III.1.2.1- Réactifs et produits chimiques :

Tous les réactifs et produits chimiques utilisés dans cette étude sont de grade analytique :

Bleu de trypan (Sigma–Aldrich), Anticorps de lapin anti IgG de cheval couplé à la peroxidase : HRP (1080 U/mg) (Sigma –Aldrich), milieu de culture RPMI 1640 (Sigma –Aldrich), eau oxygénée (Sigma –Aldrich), Ampicilline (Sigma–Aldrich), streptomycine sulfate (Sigma–Aldrich), crystal violet (Sigma cell culture), sérum de veau fœtal (Eurobio) , L-glutamin (Eurobio), dexaméthasone phosphate (MERCK), rouge de phénol (MERCK), sodium dodésyl sulfate (MERCK), acide acétique (PANREAC), acide thiobarbiturique (MERCK), acide sulfosalicylique (PROLABO), DTNB : 5,5'-Dithio-bis(2- acide nitrobenzoïque) (MERCK), Concavalin A (Amersham Biosciences), nitrite de sodium (MERCK), acide orthophosphorique (MERCK), sulfanilamide, naphthylethylenodiamine (MERCK), méthanol (MERCK), D-glucose (MERCK), kits de dosage des cytokines (Amersham Biosciences-Biotrak Elisa system-GE Healthcare).

III.1.2.2- Appareillage et équipement :

- Etuve à CO₂ (Jouan).
- Hotte à flux laminaire (Flufrance)
- Microscope optique à phase inversée (*Leitz DM IL*).
- Spectrophotomètre (Sanofi diagnostique Pasteur).
- Lecteur de microplaques (Pharmacia Ultrospec)
- Microplaques de culture à 96 puits à fond plat (NUNCLON, Corning)
- Microplaques de culture à 24 puits à fond plat (NUNCLON, Corning)

III.2- Méthodes

L'étude réalisée a porté sur l'induction de la réponse inflammatoire par le venin d'*Aah* ainsi que par sa toxine *Aah* II et ce afin de doser certains médiateurs inflammatoires produits par les macrophages péritonéaux. Pour cela nous avons divisé les lots de souris en 05 groupes à raison de 02 souris par lot.

Le premier groupe servant de témoins a reçu par voie intra péritonéale (i.p) un volume de 250 µl d'eau physiologique stérile. Les souris du deuxième et troisième groupe ont reçu par la même voie une dose sublétales (10 µg/20g de souris) de venin d'*Aah*, une dose sublétales de

(0,1 µg/20g de souris) de la toxine *Aah* II, respectivement. Les animaux du groupe 4 ont reçu chacun une injection (par voie i.p) de 250 µl de fragments F (ab')₂ anti Ft_{ox} G50 *Aah* à raison de 0,8 mg/20g de souris, 30 min après l'injection du venin d'*Aah*. Une dose de 0,8 mg/20 g de souris d'anticorps anti-*Aah* II est injectée par voie intrapéritonéale aux souris du groupe 5, 30 min après l'injection de la dose sublétales de la toxine *Aah* II. Les souris du groupe 1 ont servi non seulement de témoins mais aussi à l'étude *in vitro*. Les souris des groupes 2, 3, 4 et 5 ont servi pour l'étude *in vivo*. Les animaux de l'étude *in vivo* ont été sacrifiés à différents intervalles de temps après envenimation.

Dans tous les cas, les surnageants des cultures des macrophages ont été prélevés et conservés à -20 °C pour des dosages ultérieurs.

III.2.1- Préparation des cellules péritonéales :

Après sacrifice des souris BALB/c, leur dissection a été réalisée dans des conditions stériles, les cellules péritonéales ont été obtenues après injection dans la cavité péritonéale de 5 ml de milieu RPMI 1640 frais. Un massage de 30 secondes a été effectué afin de récupérer le maximum de cellules de la cavité péritonéale. Le liquide de lavage péritonéal a été aspiré dans des tubes stériles, puis centrifugé deux fois à 1200 r.p.m à 4°C durant 5 minutes. Les cellules du dernier culot ont été reprises dans un volume minimal de milieu de culture RPMI-1640 additionné de 10 % de sérum de veau fœtal (SVF), de 200 mM de glutamine et d'antibiotiques (100 UI/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine).

III.2.2- Contrôle de la viabilité cellulaire :

Après remise du culot cellulaire récupéré dans un volume à déterminer de milieu de culture, une numération de la viabilité cellulaire a été réalisée par le test d'exclusion au bleu de Trypan. Une suspension cellulaire de 50µl (cellules péritonéales) est diluée dans 450 µl d'une solution de bleu de Trypan de 0,4 %. Un volume de ce mélange est déposé sur une cellule de Malassez, et observé au microscope optique à un grossissement (G X 40) pour un dénombrement de cellules vivantes.

La densité cellulaire en nombre de cellules par millilitre de milieu de culture a été calculée en utilisant la formule ci-dessous :

$\text{Nombre de cellules/ml} = M \times \text{facteur de dilution} \times 10^5$
--

Où M représente la moyenne des cellules vivantes observées au microscope.

III.2.3- Mise en culture et stimulation des macrophages :

Après dénombrement cellulaire, les cellules péritonéales sont déposées en « duplicate » dans les puits des microplaques de culture à 96 puits ou à 24 puits, à raison de 10^6 cellules par ml et mises en culture dans de milieu RPMI 1640 supplémenté de 10% de SVF décomplémenté, 200 mM de glutamine additionné d'antibiotiques (100 UI/ml de pénicilline et de 100 µg/ml de streptomycine). Toutes les cellules sont incubées à 37°C, dans une atmosphère humidifiée à 5 % de CO₂ pendant 2 heures. Les microplaques sont ensuite lavées deux fois avec le RPMI 1640 pour éliminer les cellules non adhérentes. Les cellules qui adhèrent à la microplaque sont considérées comme étant des macrophages. Ces derniers sont mis en culture à 37°C, dans une atmosphère humidifiée à 5 % de CO₂, pendant 24 heures.

Les macrophages destinés à la culture *in vitro* (issus des cellules du groupes 1) seront stimulés par 10 µg/10⁶ cellules/ml de venin d'*Aah* en présence et en absence de fragments F(ab')₂ anti-F_{tox} G50 *Aah* (0,8 mg/10⁶ cellules/ml) ou par (0,1 µg/10⁶ cellules/ml) de toxine *Aah* II en présence et en absence de ses anticorps spécifiques anti-*Aah* II (0,8 mg/10⁶ cellules/ml), les autres cellules du groupe 1 ne seront pas stimulés et serviront de témoins.

Tous les macrophages témoins et ceux destinés à l'étude *in vitro* sont incubées à 37°C dans une atmosphère humidifiée à 5 % de CO₂ à différents intervalles de temps (30 min, 2 h, 4 h, 24 h, 48 h et 72 h). Les macrophages du groupe 2 ont été ré induits *in vitro* par (50 ng/10⁶ cellules/ml) de venin d'*Aah*. Les macrophages du groupe 3 ont été re-stimulés par (1 ng/10⁶ cellules/ml) de toxine *Aah* II. Les macrophages des groupes 4 et 5 sont mis en cultures sans re-stimulation.

Les macrophages en culture destinés pour l'étude *in vivo* ont été incubés à 37°C dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO₂ pendant 48 heures.

Après toutes ces incubations, les surnageants de cultures sont prélevés et conservés à -20 °C pour des dosages ultérieures.

III.2.4- Morphologie des macrophages en présence et en absence de venin d'*Aah* ou de la toxine *Aah* II

III.2.4.a – Sans coloration :

Les macrophages péritonéaux obtenus après les différents temps d'incubation et d'induction avec le venin d'*Aah* (10 µg/ml) ou de la toxine *Aah* II (0,1 µg/ml) ont été directement observés à l'aide d'un microscope optique à phase inversée pour apercevoir l'évolution de ces cellules au point de vue prolifération.

III.2.4.a – Avec coloration de Giemsa:

Après mise en culture des macrophages aux différents temps d'incubation et d'induction avec le venin d'*Aah* (10 µg/ml) ou de la toxine *Aah* II (0,1 µg/ml), une goutte de suspension cellulaire est déposée à l'extrémité d'une lame dégraissée avec une pipette Pasteur. La goutte est étalée par capillarité au contact de l'arête d'une deuxième lame rodée tenue à 45 degrés. Le frottis sèche rapidement à l'air libre. La lame ainsi préparée est trempée pendant une seconde dans l'éthanol à fin de fixer les cellules. Ensuite la lame est plongée pendant 10 minutes dans le colorant de Giemsa dilué au 1/30^{ème}, puis égouttée sur papier filtre. L'excès de colorant est enlevé en laissant couler doucement l'eau distillée sur le frottis. Enfin les lames sont séchées dans l'étuve.

Les lames sont examinées au microscope muni d'un objectif à immersion d'un grossissement x 100 pour identifier les macrophages.

III.2.5- Effet *in vitro* du venin d'*Aah* ou de sa toxine *Aah* II sur la viabilité des macrophages en présence et en absence de la dexaméthasone

Les macrophages maintenus en culture dans les microplaques à 96 puits avec le milieu RPMI-1640 supplémenté de 10% de SVF décomplémenté, 200 mM de glutamine et un mélange d'antibiotiques (100 IU/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine), sont prétraités par la dexaméthasone phosphate (10^{-7} mol/l), 24 h avant leur stimulation par ($10 \mu\text{g}/10^6$ cellules/ml) de venin d'*Aah* ou de ($0,1 \mu\text{g}/10^6$ cellules/ml) de toxine *Aah* II, à différents temps d'incubation : 30 min, 2 h, 4 h, 24 h, 48 h et 72 h. Après incubation, le milieu de culture des macrophages est remplacé par un autre milieu de culture frais pour une incubation de 48 h. Les macrophages non traités par la dexaméthasone et stimulés par le venin d'*Aah* ($10 \mu\text{g}/10^6$ cellules/ml) ou de toxine *Aah* II ($0,1 \mu\text{g}/10^6$ cellules/ml), à différents temps d'incubations, sont considérés comme des témoins. Les cellules des macrophages adhérentes et vivantes sont fixées et colorées par le crystal violet (0,2% dans 20% méthanol). La lecture des absorbances dans chaque puits est effectuée à 620 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque. Le pourcentage de cytotoxicité est calculé selon la formule de Petrecevich (2002): $(A_{\text{témoin}} - A_{\text{échantillon}} / A_{\text{témoin}}) \times 100$.

A : absorbance.

III.2.6- Dosages des médiateurs pro-inflammatoires et anti-inflammatoires, produits par les macrophages en culture et induits (*in vivo* ou *in vitro*) par le venin d'*Aah* ou par sa toxine *Aah* II en présence et en absence d'immunothérapie

III.2.6.1- Détection du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) :

La production de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) a été mesurée selon la méthode décrite par Pick et Mizel (1981). Le principe de cette méthode est basé sur l'oxydation du rouge de phénol par la peroxydase (HRP) en présence de H₂O₂.

Les macrophages en culture issus du groupe 1 ont été stimulés *in vitro* par le venin d'*Aah* (10 µg/ml) ou par la toxine *Aah* II (0,1 µg/ml) en présence et en absence de fragments d'anticorps F(ab')₂ anti-F_{tox} G50_{Aah} et des anticorps anti-*Aah* II, respectivement. Les macrophages du groupe 1 sont stimulés ou non par la concanavalin A (10 µg/ml). Les macrophages stimulés *in vivo* sont issus des groupes 2, 3, 4 et 5.

Après une mise en culture des macrophages *in vivo* ou *in vitro* sous l'effet de différents *stimulus*, à différents temps d'incubation, les surnageants des cultures sont prélevés et conservés, puis 100 µl de la solution de rouge de phénol à 0,56 mM qui contient 140 mM de NaCl, 10 mM de K₂HPO₄, 5,5 mM de dextrose et 19 U/ml de la peroxidase (HRP) sont ajoutés aux cellules adhérentes (macrophages) dans les puits de la microplaque.

Après incubation pendant 1 heure à l'obscurité et à 37°C, la réaction est stoppée par addition de 10 µl de NaOH (1N). L'oxydation du rouge de phénol est mesurée dans chaque puits par la lecture de l'absorbance à 620 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque.

Les concentrations de H₂O₂ ont été déduites à partir de la courbe d'étalonnage établie par une gamme de concentrations connues du réactif H₂O₂ dilué.

III.2.6.1.1 - Effet de la dexaméthasone sur la production de H₂O₂ par les macrophages suite à leur traitement *in vitro* par le venin d'*Aah* ou la toxine *Aah* II :

Les cellules des macrophages destinées à l'étude *in vitro* ont été pré traitées par la dexaméthasone phosphate à une concentration de 10⁻⁷ mol/l, 24 h avant l'addition dans leur milieu du venin d'*Aah* ou de la toxine *Aah* II (10 µg/10⁶ et 0,1µg/10⁶ cellule /ml, respectivement) à différents temps d'incubation : 30 min ,2 h, 4 h, 24 h, 48 h et 72 h. Le milieu de culture des macrophages après les différents temps d'incubation est remplacé par un autre milieu de culture frais (ne contenant ni venin, ni toxine, ni dexaméthasone) pour une

autre culture de 48 h. La production de H_2O_2 par ces cellules est mesurée par la méthode de Pick et Mizel (1981).

III.2.6.2 - Mesure de la production de monoxyde d'azote (NO) :

La production de NO est estimée par la mesure des nitrites selon la méthode de Ding et *al* (1988) basée sur la réaction colorimétrique de Griess. Il s'agit d'une réaction de diazotation en deux étapes: les nitrites forment un sel de diazonium avec l'acide sulfanilique qui est ensuite couplé avec une amine (N-naphtyléthylène diamine) pour donner un colorant azoïque qui absorbe à 540 nm. Les nitrites sont des marqueurs du catabolisme du NO. Ce radical est impliqué en tant qu'intermédiaire dans l'oxydation de L-Arg en nitrites et nitrates dans les macrophages (Marletta et *al*, 1989).

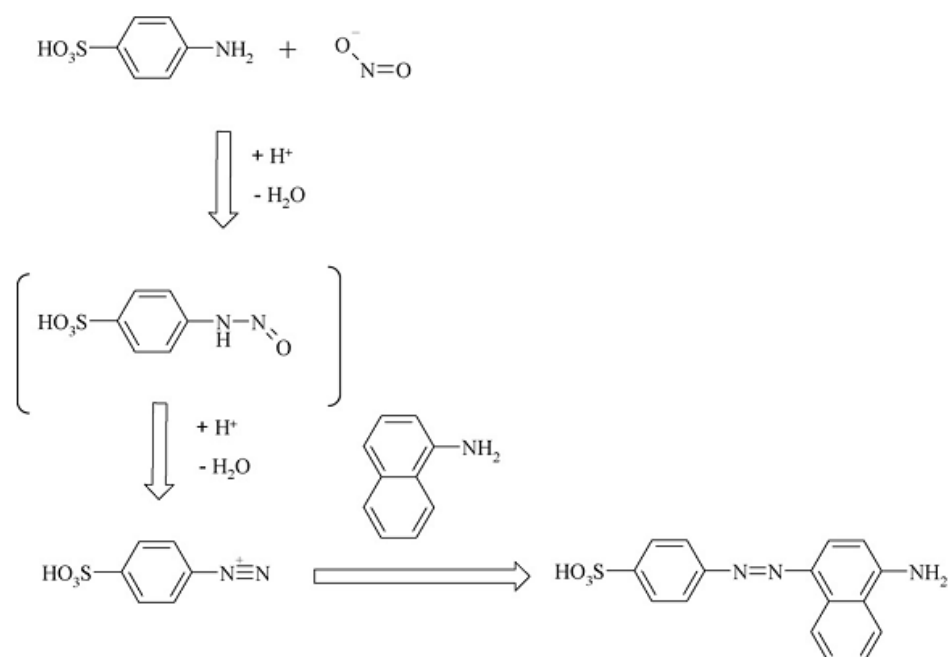


Figure 9: Réaction de Griess originale rapportée par Griess en 1879. Sous les conditions acides, les nitrites réagissent avec le groupement amine de l'acide sulfanilique pour former le cation diazonium, qui se couple à l'1-naphtylamine en position para, en donnant un colorant azoïque.

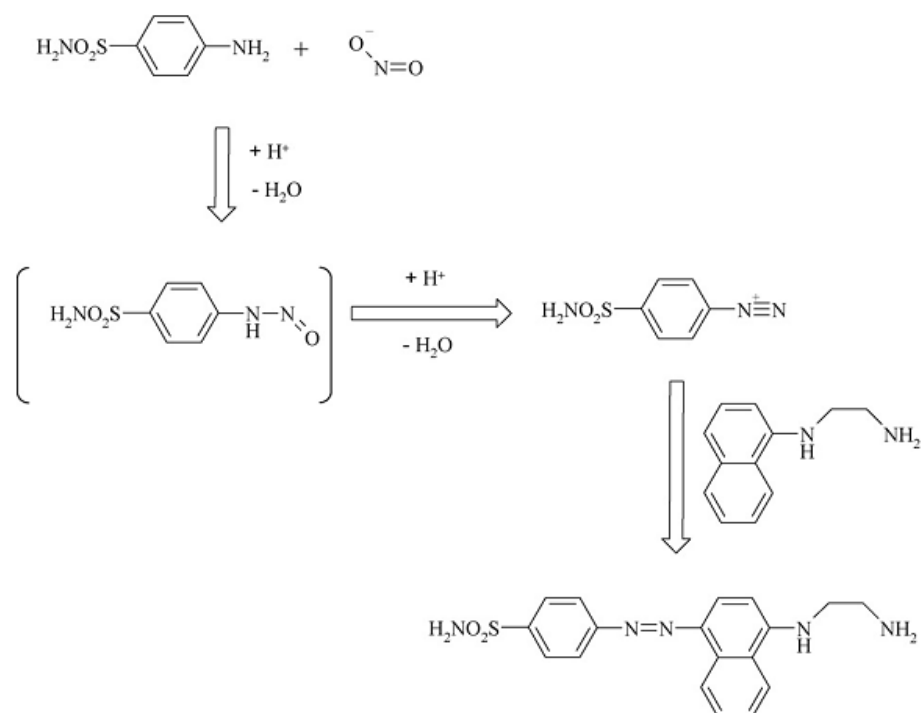


Figure 10: la réaction de Griess modifiée couramment utilisée (Tsikas, 2006). Sous des conditions acides, les nitrites réagissent avec le groupement amine de sulfanilamide pour former le cation diazonium, qui se couple à N-(1-naphthyl) ethylenediamine en position para, en donnant un colorant azoïque.

III.2.6.2.a - Effet *in vivo* de venin d'*Aah* ou de sa toxine *Aah* II sur la production de monoxyde d'azote (NO) par les macrophages en culture en présence et en absence d'immunothérapie :

Les macrophages issus des cellules péritonéales des animaux des groupes 2, 3, 4 et 5 sont mis en cultures pendant 24 h d'incubation à 37°C dans une atmosphère humidifiée à 5 % de CO₂. Un volume de surnageants de culture de chaque groupe de macrophages est incubé avec un volume équivalent de réactif de Griess (1 % de sulfanilamide et 0,1 % de naphthylethylenodiamine dans 5 % d'acide phosphorique). Après 10 minutes de réaction à température ambiante, la lecture des absorbances à 550 nm, permet une mesure directe des concentrations des nitrites. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en nitrites dans les échantillons et les standards. Les valeurs des échantillons sont obtenues après extrapolation à partir de courbe étalon de nitrites de sodium.

III.2.6.2.b - Effet *in vitro* de venin d'*Aah* ou de sa toxine *Aah* II sur la production de NO en présence et en absence de leurs anticorps spécifiques :

Le venin d'*Aah* ou la toxine *Aah* II, sont ajoutés dans le milieu de culture des macrophages issus des cellules péritonéales des animaux des groupes 1 en absence et en présence de fragments F(ab')₂ anti Ft_{ox} G50 *Aah* ou d'anticorps anti-*Aah* II, respectivement. Après les différents temps d'incubation, à 37°C dans une atmosphère humidifiée à 5 % de CO₂, un volume équivalent du réactif de Griess est ajouté au volume de surnageant de culture des macrophages pour chaque temps. La mesure des nitrites est effectuée selon le protocole de Ding et *al* (1988).

III.2.6.3 - Dosage de malonaldehyde (MDA) après stimulation des macrophages *in vivo* ou *in vitro* par le venin d'*Aah* ou de la toxine *Aah* II en présence et en absence d'immunothérapie :

Le dialdéhyde malonique (MDA) est l'une des substances de type aldéhyde issues de l'oxydation des lipides sous l'effet d'un stress oxydatif et réagissant avec l'acide thiobarbiturique (TBA). Son dosage est effectué selon la méthode de Ohkawa et *al* (1979).

Pour cela, 100 µl de surnageant de cultures de macrophages stimulés *in vivo* (issus des groupes 2, 3, 4 et 5) ou *in vitro* (issus du groupe 1 incubés avec le venin d'*Aah* ou la toxine *Aah* II en présence et en absence des fragments F(ab')₂ anti-Ft_{ox} G50 *Aah* ou d'anticorps anti-*Aah* II, respectivement) sont additionnés à un mélange réactionnel constitué de SDS (sodium dodésyl sulfate) à 8,1%, d'acide acétique (20%) à pH 3,5 et d'acide thiobarbiturique (TBA) à

0,8%. Le mélange réactionnel est chauffé à 100°C pendant 1 heure puis refroidi dans un bain glacé. Après centrifugation à 11000 r.p.m à 4°C pendant 10 min, la densité optique dans chaque échantillon est lue à 532 nm. La quantification des concentrations de MDA est calculée sur la base du coefficient d'extinction molaire $\zeta = 156 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

III.2.6.4 - Mesure de glutathion (GSH) : analyse de système antioxydant dans les macrophages stimulés *in vivo* ou *in vitro* par le venin d'*Aah* ou de la toxine *Aah* II en présence et en absence d'immunothérapie :

Le dosage du GSH est effectué selon le protocole de Boyne et Elman (1972) avec quelques modifications. Les macrophages en culture (0,1 ml) sont lysées par addition de 400 μl de l'acide sulfosalicylique frais (5%) et incubés pendant 1 h dans la glace puis centrifugés à 3000 g pendant 10 min à 4°C. Les groupements thiols libres sont révélés après addition de 0,2 ml de 5,5'-Dithio-bis (2- acide nitrobenzoïque (DTNB) à 0,6 mM, 0,9 ml de tampon phosphate (0,2M ; pH 8,0), et 0,1 ml de surnageant de culture des macrophages .Après 9 min, l'absorbance de la coloration jaune formée est mesurée à 412 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. La quantité de GSH est calculée sur la base de coefficient d'extinction molaire $\zeta = 13,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

III.2.6.5 - Effet *in vivo* et *in vitro* du venin d'*Aah* ou de la toxine *Aah* II sur la production des cytokines par les macrophages péritonéaux :

Dans cette étude les cytokines dosées par ELISA-sandwich sont : IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α , IFN- γ et IL-10 produites par les macrophages stimulés *in vivo* ou *in vitro* par le venin d'*Aah* (10 μg) ou de la toxine *Aah* II (0,1 μg).

Les cytokines induites *in vivo* par le venin d'*Aah* ou la toxine *Aah* II sont dosées dans les surnageants de culture des macrophages issus des groupes 2 et 3. Le dosage de cytokines *in vitro*, s'effectue dans les surnageants des macrophages du groupe 1 stimulés ou non par le venin d'*Aah* (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ou la toxine *Aah* II (0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), aux différents temps d'incubation.

Les réactifs et standards fournis dans les kits des cytokines sont reconstitués selon les indications du fournisseur.

Les gammes des étalons standards des cytokines et les seuils de détection de chaque test ELISA sont illustrés dans le tableau I.

La première étape consiste à répartir les standards de chaque cytokine (IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α , IFN- γ et IL-10) et les surnageants des culture à raison de 50 μl /puits et en « duplicate » dans les puits des microplaques préalablement sensibilisés avec un anticorps

monoclonal anti cytokine (IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α , IFN- δ et IL-10) , et laisser incubé pendant 2 h pour (IL-1, IL-6, TNF- α , IFN- δ) et pendant 1 h et 3 h pour IL-12 et IL-10, respectivement à la température ambiante. L'anticorps biotinylé, déposé à raison de 50 μ l/puits, est incubé pendant une heure à température ambiante. Le dépôt du conjugué Straptavidine- HRP (100 μ l/puits) est effectué après une série de lavages, pour une incubation de 30 min à température ambiante. L'activité enzymatique est révélée par l'addition du substrat, le 3-3,5-5' tetraméthyl benzidine (TMB) à raison de 100 μ l/puits, après une incubation de 30 min à température ambiante et à l'obscurité. Après addition de la solution d'arrêt (100 μ l/puits), la lecture de l'absorbances est effectuée à 450 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque. Les concentrations des différentes cytokines sont obtenues à partir de la différente courbe standard réalisée avec des concentrations connues des cytokines recombinantes appropriées.

Tableau II : Gamme des étalons standards des cytokines et seuil de détection du test ELISA-sandwich.

Cytokines	Concentration des cytokines de gamme étalon	Seuil de détection
IL-1β	0- 15,6- 62,5-250-1000 pg/ml.	< 2 pg/ml.
IL-6	0- 51 – 128 – 320 – 800 – 2000 pg/ml.	< 7 pg/ml.
IL-12	0- 47 – 94 – 188 – 375 – 750 pg/ml.	< 12 pg/ml.
TNF-α	0- 50 -350 – 2450 pg/ml.	< pg/ml.
IFN-γ	0- 37 -111 – 333- 1000 et 3000 pg/ml.	< 10 pg/ml.
IL-10	0- 37,6 -111 – 333- 1000 et 3000 pg/ml.	< 12 pg/ml.

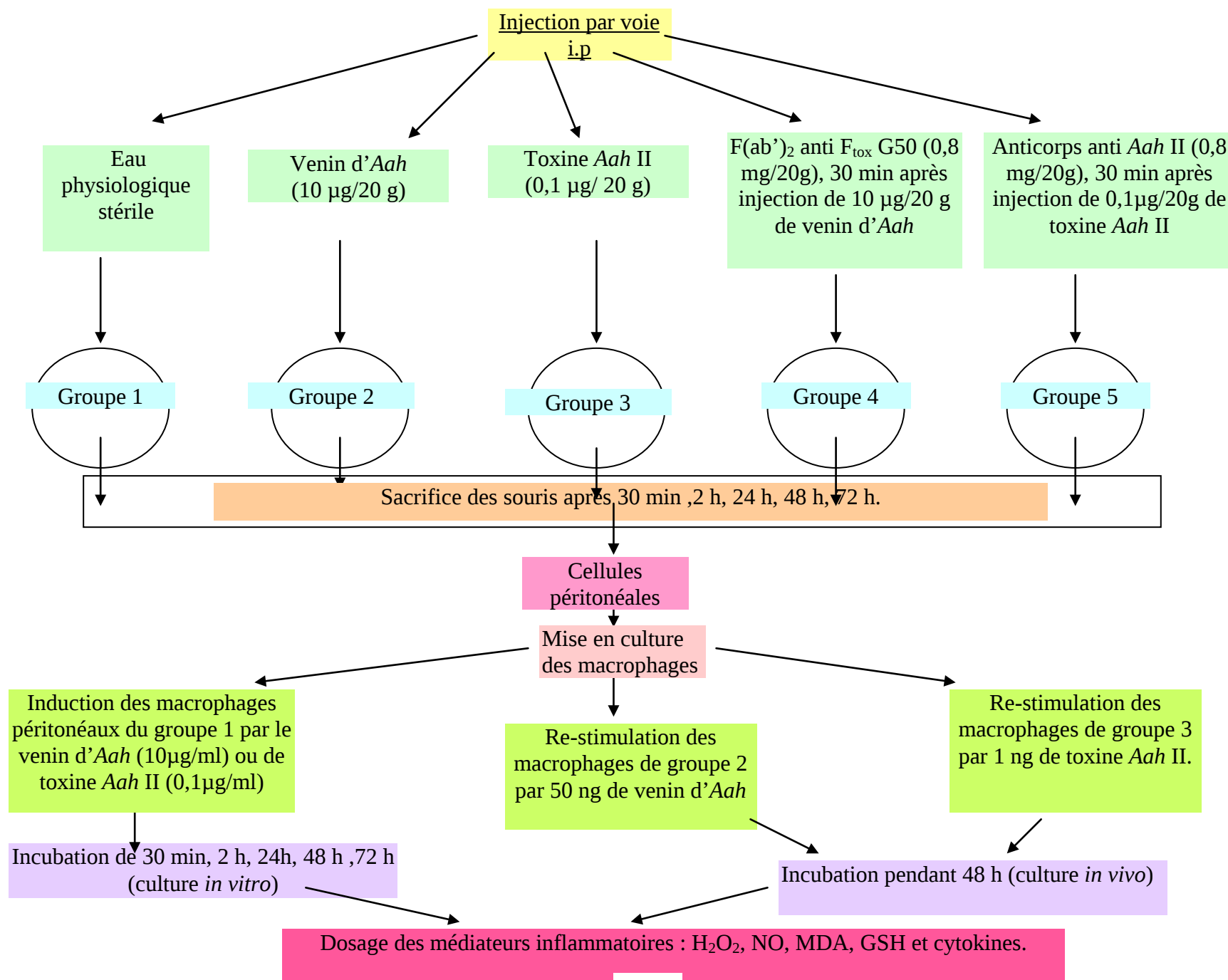


Figure 11: Plan expérimentale

CHAPITRE 3 :

RÉSULTATS ET DISCUSSION

IV – Résultats :

IV.1 - Effet *in vitro* du venin d'*Aah* ou de sa toxine *Aah* II sur la morphologie des macrophages :

L'observation des macrophages péritonéaux en microscopie optique permet de voir les différences de morphologie induites ou non par le venin d'*Aah* ou la toxine *Aah* II. L'induction des macrophages est réalisée 48 h après isolation des macrophages et mise en culture.

Les macrophages traitées avec le venin d'*Aah* (10 µg/ml) ou sa toxine *Aah* II (0,1 µg/ml) pendant 48 h, montrent une augmentation de la taille des cellules, la condensation du cytoplasme et l'apparition de filaments cytoplasmiques entre les cellules en leur conférant une forme irrégulière ramifiée, par rapport aux cellules contrôles (Figures 11 et 12). Cependant, le traitement des macrophages avec le venin d'*Aah* ou la toxine *Aah* II pendant 2 h n'induit aucune modification morphologique comparé aux cellules contrôles, qui présentent une forme plus ou moins arrondie (Figures 10, 13, 14 et 15 A).

Les cellules macrophagiques adhérentes et stimulées se transforment *in vitro* après 48 h de culture en cellules géantes, multinucléées et vacuolées (Figures 15 B, 15 C et 15 D). En effet la capacité de phagocytose des macrophages est proportionnelle à la durée de leur mise en culture *in vitro* (Cohen et Cline, 1970). D'autre part, les cellules sujettes à un gradient chimioattractant dans leur environnement émettent des lamellipodes en plusieurs directions, de telles sortes que des attachements stables au niveau de la matrice extracellulaire sont formés en direction des concentrations élevées en stimulus. Les changements morphologiques cellulaires comme la contraction des lamellipodes ou la formation de contact, nécessite un changement continu de l'assemblage de cytosquelette (Okigaki et *al*, 2003).

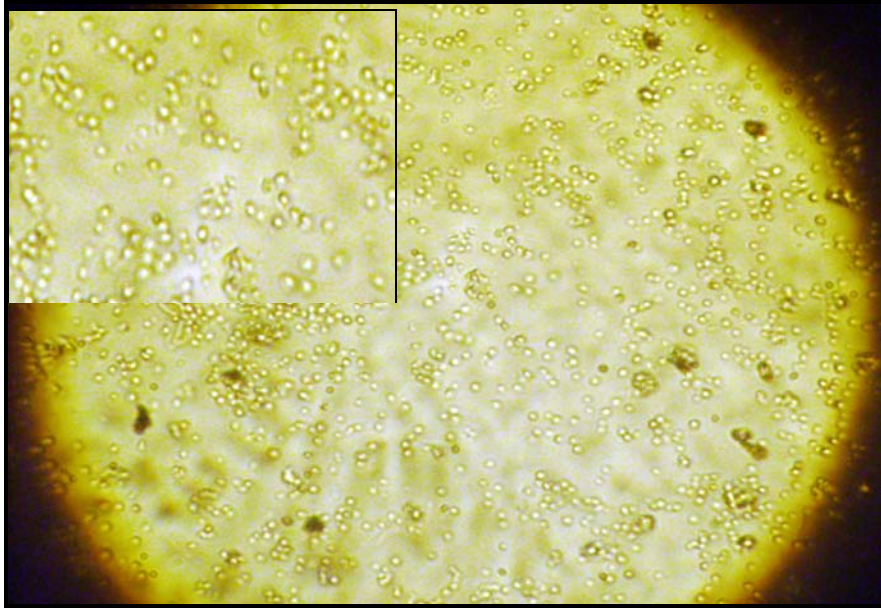


Figure 10 : Photographie en microscopie optique des macrophages péritonéaux adhérents non traités (contrôles). (Grossissement $\times 10$).

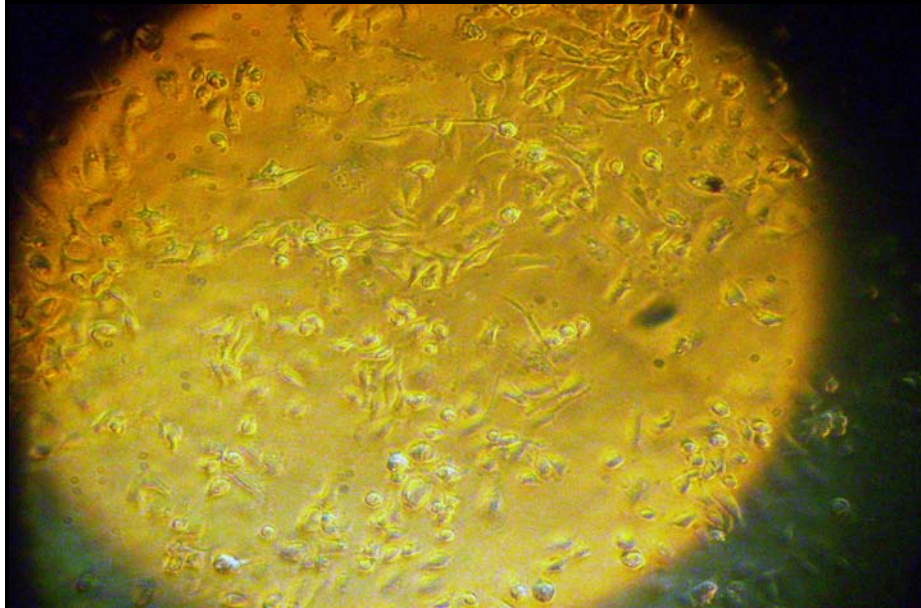


Figure 11 : Photographie en microscopie optique des macrophages péritonéaux traités par le venin d'*Aah* à $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ pendant 48 h. (Grossissement $\times 10$).

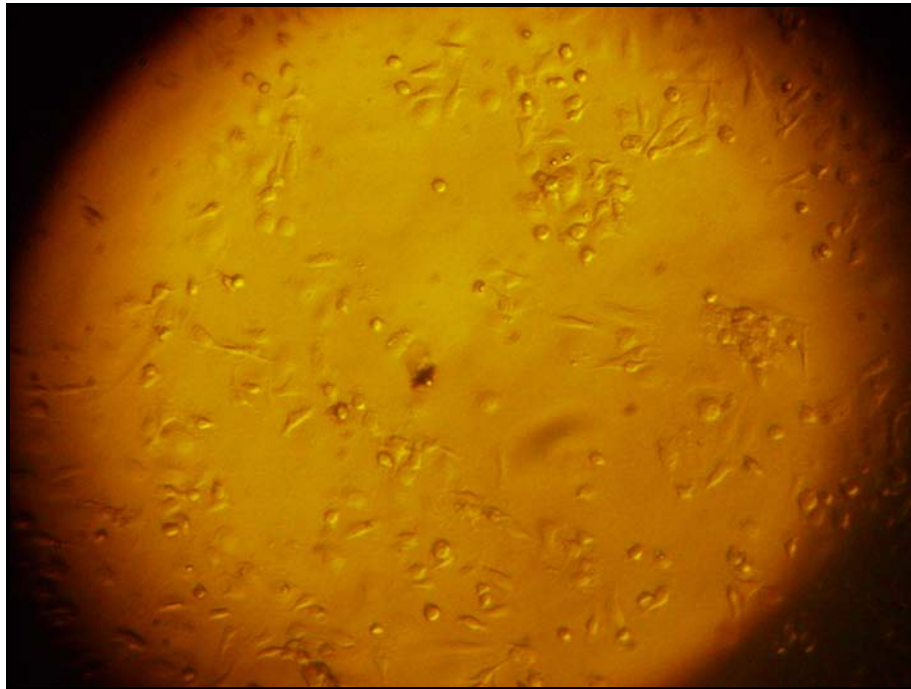


Figure 12: Observation en microscopie optique des macrophages péritonéaux traités par la toxine *Aah* II à 0,1 µg/ml pendant 48 h. (Grossissement × 10).

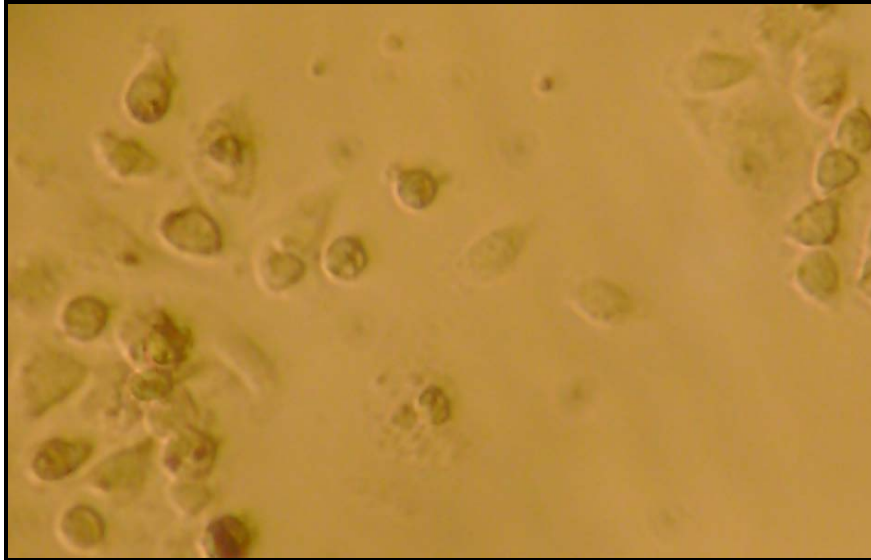


Figure 13: Observation en microscopie optique à phase inverse des macrophages péritonéaux traités par le venin d'*Aah* à 10 µg/ml pendant 2 h. (Grossissement × 40).

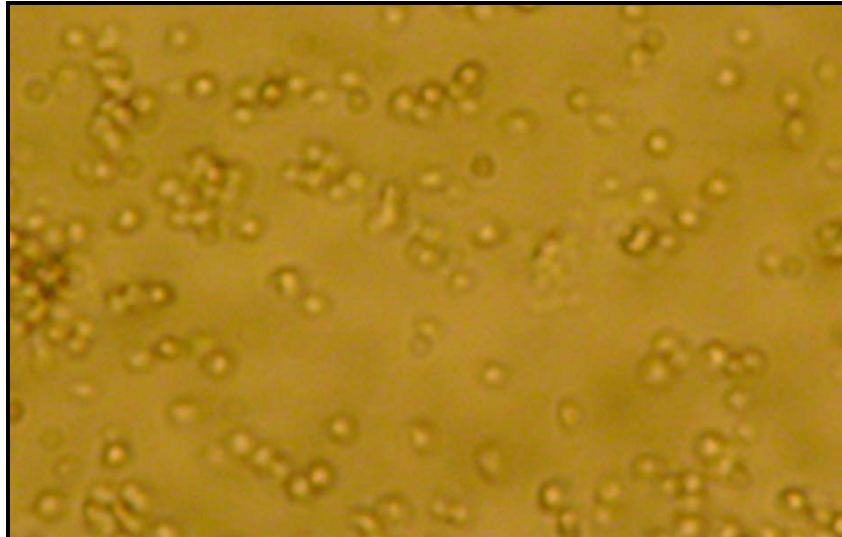


Figure 14 : Observation en microscopie optique à phase inverse des macrophages péritonéaux traités par la toxine *Aah* II à 0,1 µg/ml pendant 2 h. (Grossissement × 10).

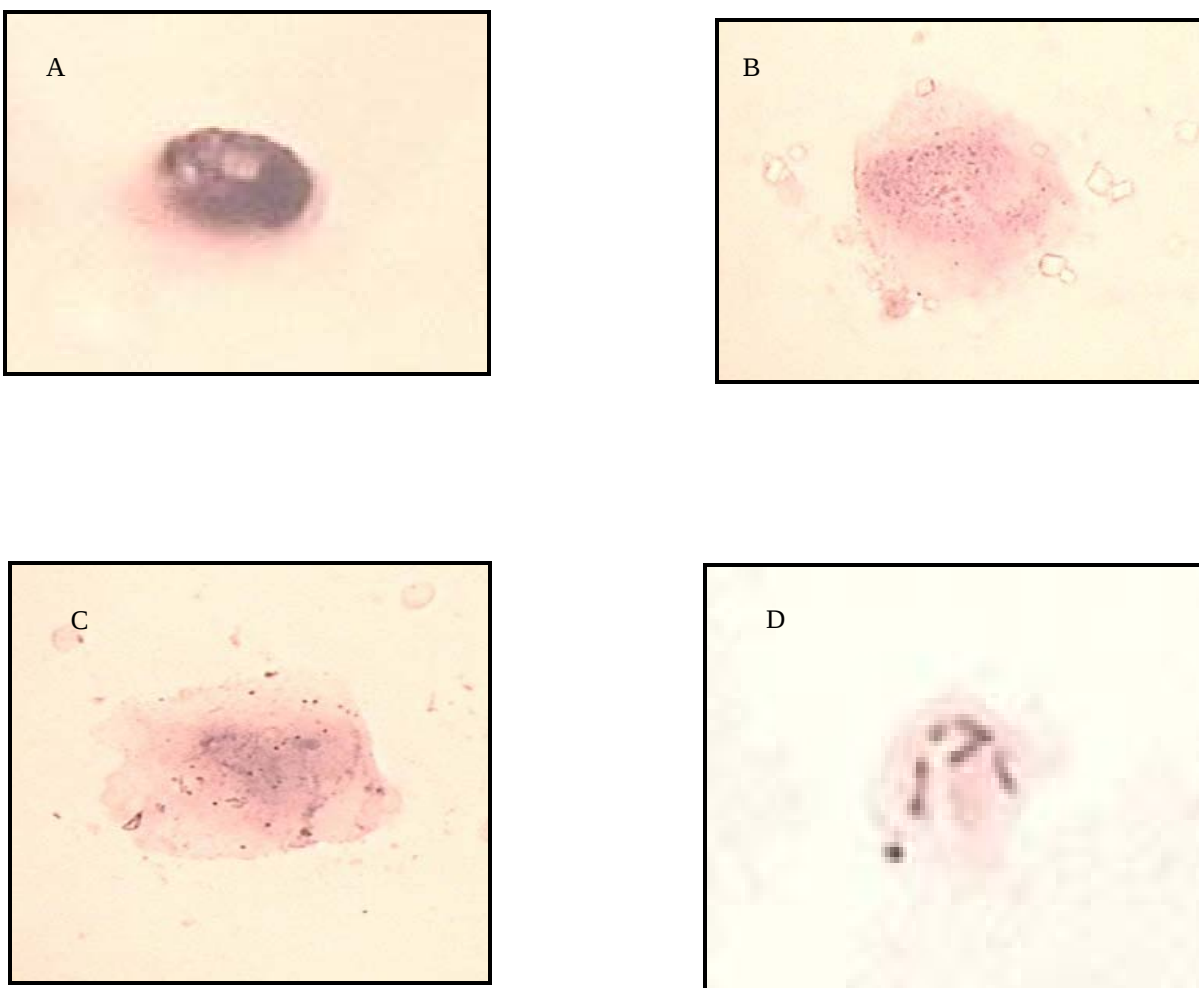


Figure 15: Photographie en microscopie optique des macrophages péritonéaux après coloration de Giemsa. (A) macrophage non stimulé (témoins). (B) macrophages traités *in vitro* par la toxine *Aah* II à 0,1 $\mu\text{g/ml}$ pendant 24 h. (C) type de macrophages traités *in vitro* par la toxine *Aah* II à 0,1 $\mu\text{g/ml}$ pendant 48 h. (D) type de macrophages multinuclés traités par la toxine *Aah* II à 0,1 $\mu\text{g/ml}$ pendant 48 h. (Grossissement $\times 100$).

IV.2 - Effet *in vitro* du venin d'*Aah* ou de sa toxine *Aah* II sur la viabilité des macrophages en présence et en absence de la dexaméthasone

Les pourcentages de lyse cellulaire ont été calculés pour les macrophages péritonéaux exposés dans leur milieu de culture au venin d'*Aah* à une concentration de 10 µg/ml ou à la toxine *Aah* II (0,1 µg/ml) après différents temps d'incubations. Les résultats cinétiques montrent des pourcentages de lyse qui varient entre $3 \pm 0,21$ % à $6,05 \pm 0,35$ % pour les macrophages exposés au venin d'*Aah*. L'augmentation de la cytotoxicité des macrophages exposés à la toxine *Aah* II, est temps dépendante et vari entre $3,20 \pm 0,26$ % et $5,42 \pm 0,2$ % à partir de 30 min jusqu'à 48 h d'exposition mais diminue après 72 h d'incubation. Les pourcentages de lyse les plus élevés ont été enregistrés à 24 h et à 48 h d'incubation avec le venin d'*Aah* ou la toxine *Aah* II, respectivement. Ce décalage de réponse entre le venin d'*Aah* et la toxine *Aah* II demande à être élucidé.

En effet les pourcentages de lyse cellulaire obtenues ont été calculée selon la méthode utilisée par Petrecevich (2002) qui a étudié *in vitro* la cinétique de cytotoxicité des macrophages péritonéaux sous l'effet du venin *Tityus serrulatus* (0,2 µg/ml) montrant ainsi une augmentation de cytotoxicité temps dépendant jusqu'à 48 heures d'incubation et qui varie approximativement entre 0,1 % et 0,45 %.

Cependant le prétraitement *in vitro* des macrophages par la dexaméthasone (10^{-7} M), 24 h avant l'addition du venin d'*Aah* ou la toxine *Aah* II, a montré une réduction partielle des pourcentages de lyse cellulaire en comparaison aux témoins positifs (macrophages traités par le venin d'*Aah* ou la toxine *Aah* II en absence de dexaméthasone). Les variations des différents pourcentages de lyse des macrophages calculés en fonction de temps d'incubation sont représentés par le tableau III et la figure 16.

Tableau III: Variation des pourcentages de lyse des macrophages en fonction de leur temps d'incubation avec le venin d'*Aah* ou la toxine *Aah* II.

Traitement Temps	Venin d'<i>Aah</i> (10 µg/ml)	Venin d'<i>Aah</i> (10 µg/ ml) + Dexaméthasone (10⁻⁷ mol/L)	Toxine <i>Aah</i> II (0,1 µg / ml)	Toxine <i>Aah</i> II (0,1 µg / ml) + Dexaméthasone (10⁻⁷ mol/L)
0,5 h	3,00 ± 0,21 (%)	2,40 ± 0,15 (%)	3,20 ± 0,26 (%)	3,07 ± 0,46 (%)
2 h	4,58 ± 0,47 (%)	2,89 ± 0,23 (%)	3,76 ± 0,19 (%)	3,22 ± 0,25 (%)
24 h	6,05 ± 0,35 (%)	3,12 ± 0,26 (%)	4,66 ± 0,37 (%)	3,71 ± 0,22 (%)
48 h	5 ± 0, 86 (%)	2,84 ± 0,31 (%)	5,42 ± 0,2 (%)	3,82 ± 0,14 (%)
72 h	3,95 ± 0,24 (%)	3,70 ± 0,17 (%)	3,92 ± 0,34 (%)	3,35 ± 0,53 (%)

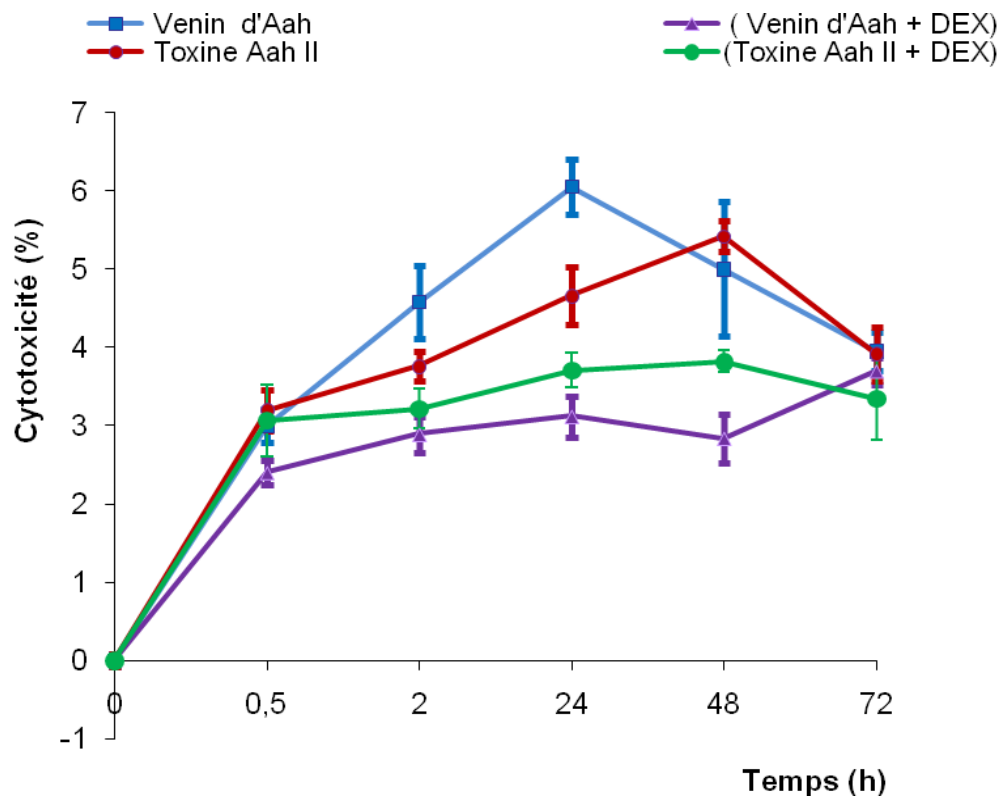


Figure 16 : Cinétique de cytotoxicité *in vitro* exprimée en pourcentage de lyse, après exposition des macrophages péritonéaux au venin d'Aah (10 µg/ml) ou à la toxine Aah II (0,1 µg/ml) en présence et en absence de dexaméthasone (10^{-7} M). (Moyenne $\pm$ écart-type, n=3).

IV.3 - Dosages des médiateurs pro- et anti-inflammatoires produits par les macrophages en culture induits (*in vivo* ou *in vitro*) par le venin d'*Aah* ou sa toxine *Aah* II en présence et en absence d'immunothérapie :

IV.3.A- Quantification du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

Le peroxyde d'hydrogène est un composant majeur des espèces réactives d'oxygène (ROS) intracellulaires, produit au cours des processus physiologiques et pathologiques d'où l'intérêt de son dosage dans cette étude.

IV.3.A.1 - Étude *in vivo* des effets du venin d'*Aah* ou de la toxine *Aah* II sur la production de H_2O_2 par les macrophages en présence et en absence d'immunothérapie

Les résultats obtenus dans cette étude sont illustrés par la figure (17), ils indiquent l'augmentation de la production de H_2O_2 de manière temps dépendant après l'injection intrapéritonéale du venin d'*Aah* (10 μ g/souris). Le maximum de cette production est observé à 72 h d'envenimation. La toxine *Aah* II semble provoquer après 24 h de son administration, la libération de H_2O_2 avec un taux maximal (3233,95 μ M). Ce taux est presque équivalent à celui provoqué par le venin d'*Aah* administré dans les mêmes conditions.

L'administration des fragments $F(ab')_2$ anti- F_{tox} G50 par voie (i.p), 30 min après l'injection du venin d'*Aah* a permis une réduction significative des taux de H_2O_2 par rapport à ceux obtenus après envenimation seule. Les taux de réduction de cette production ont été obtenus respectivement à 48 h et à 72 h d'envenimation avec un facteur de réduction de 1,27 et de 1,25.

D'autre part l'injection des anticorps spécifiques anti-*Aah* II, 30 min après l'administration *in vivo* de la toxine *Aah* II ne semble avoir aucun effet sur les niveaux de production de H_2O_2 à 30 min, 2 h et 48 h. La neutralisation des effets de cette toxine par son anticorps spécifique sur la production de H_2O_2 a été cependant observée seulement à 24 h et 72 h (Figure 17).

IV.3.A.2 - Étude *in vitro* des effets du venin d'*Aah* ou de la toxine *Aah* II sur la production de H_2O_2 par les macrophages en présence et en absence d'immunothérapie :

La plus forte stimulation de la production de H_2O_2 par les macrophages a été obtenue après 24 h d'incubation après l'action *in vitro* du venin d'*Aah* (10 μ g/ml) avec une concentration estimée à 4118,23 μ M; cette production diminuera au-delà de 48 h d'incubation pour atteindre à 72 h une concentration de 1465,38 μ M.

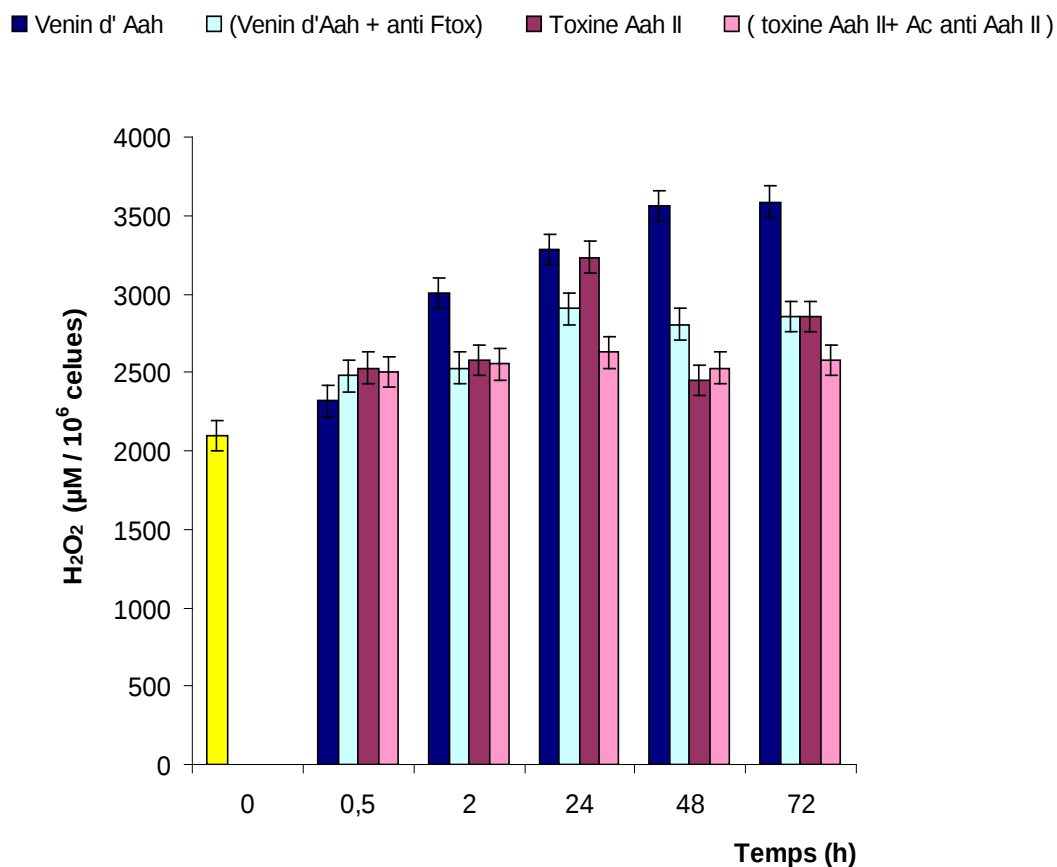


Figure 17: Cinétique de production de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) mesuré après stimulation *in vivo* des macrophages péritonéaux par envenimation des souris avec le venin d'*Aah* (10 μ g/20 g de souris) ou la toxine *Aah* II (0,1 μ g/20 g de souris) en présence et en absence de $F(ab')_2$ anti-Ftox G50 (0,8 mg/20 g de souris) ou de l'anticorps spécifique anti-*Aah* II (0,8 mg/20 g de souris), respectivement. (Moyenne $\pm$ écart-type, n=3).

Par ailleurs les mesures des concentrations de H_2O_2 obtenues après addition de la toxine *Aah* II (0,1 $\mu\text{g/ml}$), montrent une augmentation temps dépendant jusqu' au 48 h d'incubation. Dans ce cas la concentration est évaluée à 3890,84 μM . En effet la toxine *Aah* II semble provoquer un effet similaire à celui de la Concanavalin A (Con A) sur la cinétique de production de H_2O_2 .

Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par d'autres auteurs (Cruz et al, 2005; Petrecevich et Lebrun 2004) concernant l'évolution de la cinétique de production du H_2O_2 suite à l'interaction *in vitro* des macrophages péritonéaux avec le venin de *Crotalus durissus terrificus* ou de *Tityus serrulatus*.

La co-incubation *in vitro* des macrophages avec le venin d'*Aah* et les fragments $F(ab')_2$ anti – Ftox G50 pendant 24 h a permis une meilleure réduction des taux de H_2O_2 .

Une réduction partielle des taux de H_2O_2 a cependant été constatée lors du traitement des macrophages simultanément par la toxine *Aah* II (0,1 $\mu\text{g/ml}$) et son anticorps spécifiques (0,8 mg/ml) pour les différents temps d'incubation (Figure 18).

IV.3.A.3 - Effet de la dexaméthasone sur la production de H_2O_2 par les macrophages suite à leur traitement *in vitro* par le venin d' *Aah* ou la toxine *Aah* II :

Le prétraitement des macrophages par la dexaméthasone (10^{-7}M), 24 h avant l'addition du venin d'*Aah* (10 $\mu\text{g/ml}$) ou de la toxine *Aah* II (0,1 $\mu\text{g/ml}$), a montré également une réduction des taux de H_2O_2 pour certains temps d'incubation avec le venin d'*Aah* (30 min, 24 h et 72 h) et à tous les temps d'incubation avec la toxine *Aah* II, mais à un degré moindre en comparaison avec les taux de H_2O_2 mesurés après l'immunothérapie *in vitro*. En effet les pourcentages d'inhibition de la production du peroxyde d'hydrogène par la dexaméthasone en présence du venin d'*Aah* sont de 5,71 %; 22,08 % et 13,7 %, respectivement pour les temps d'exposition: 30 min, 24 h et 72 h. Les pourcentages d'inhibition de la production de H_2O_2 sous l'effet de la dexaméthasone en présence de la toxine *Aah* II sont par contre de 0,9 %; 3,44 %; 13,23 %; 22,07 % et 0,82 %, respectivement pour les temps d'incubation : 30 min, 2 h, 24 h, 48 h et 72 h (Figure 19).

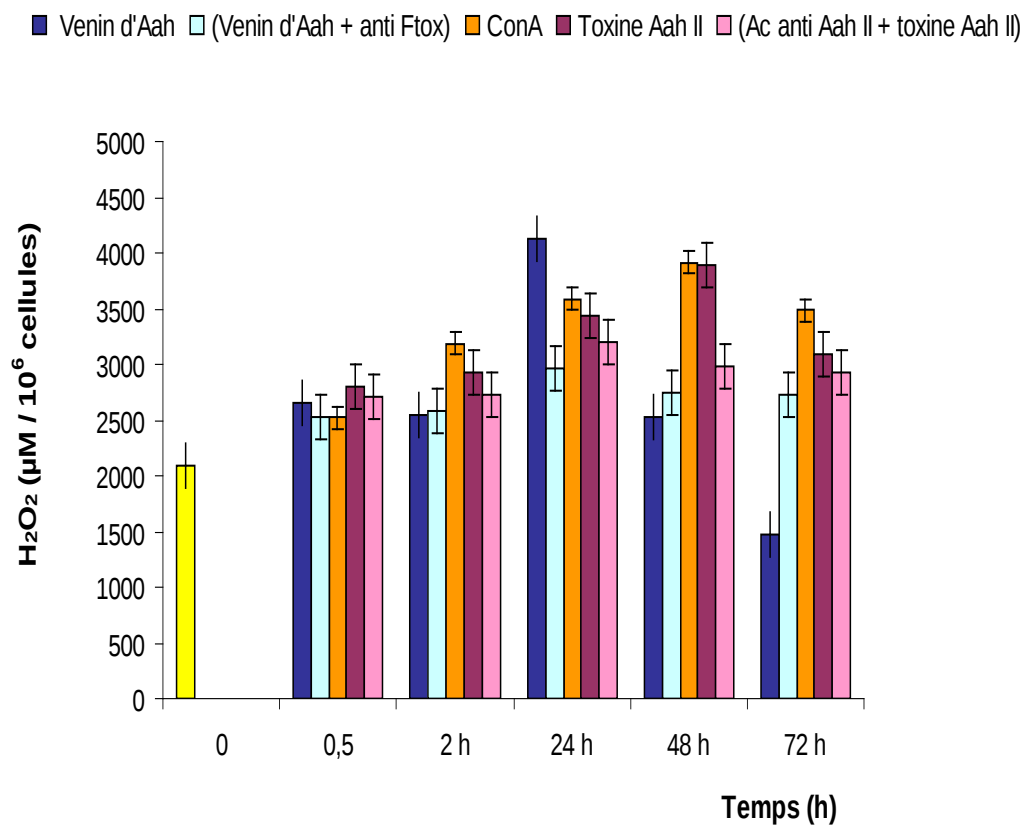


Figure 18 : Cinétique de production de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) mesuré après stimulation *in vitro* des macrophages péritonéaux avec le venin d'*Aah* (10 $\mu g/ml$) ou la toxine *Aah* II (0,1 $\mu g/ml$) en présence et en absence de F(ab')₂ anti-Ftox G50 (0,8 mg/ml) et de l'anticorps spécifique anti-*Aah* II (0,8 mg/ml), respectivement ou après stimulation *in vitro* par la Concanavalin A (ConA) (10 $\mu g/ml$). (Moyenne $\pm$ écart-type n=3).

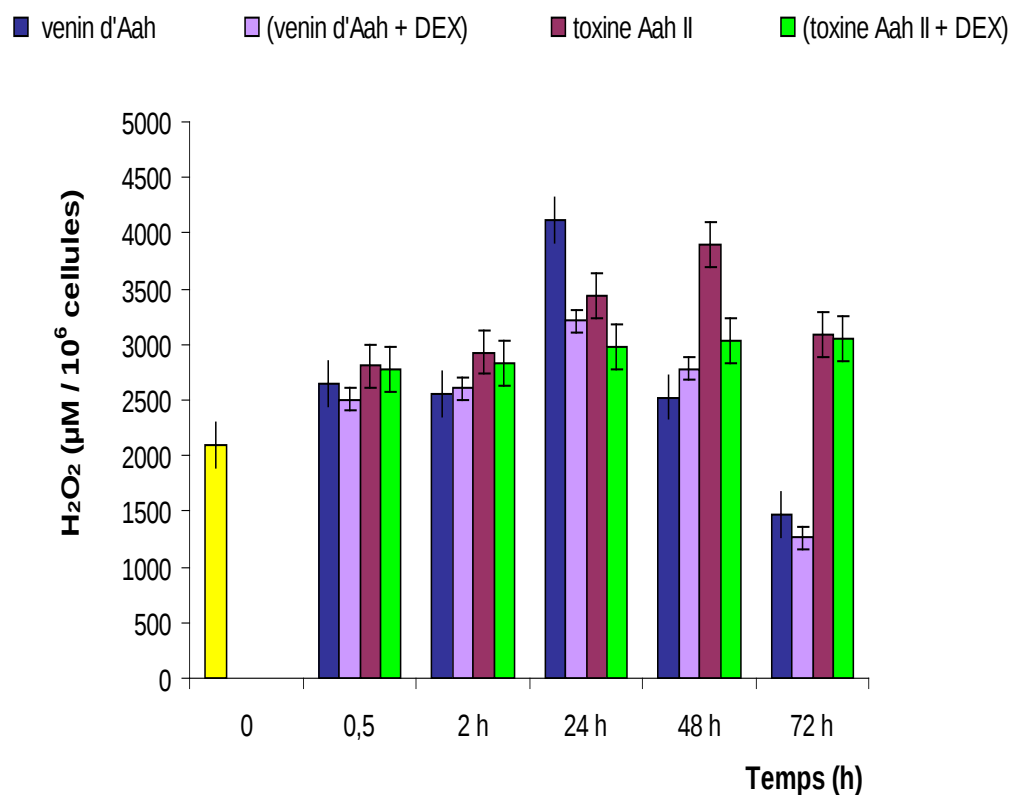


Figure 19: Cinétique de production de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) mesuré après stimulation *in vitro* des macrophages péritonéaux avec le venin d'*Aah* (10 $\mu g/ml$) ou la toxine *Aah* II (0,1 $\mu g/ml$) en présence et en absence de dexaméthasone ($10^{-7}M$). (Moyenne $\pm$ écart-type, $n=3$).

IV.3.B- Dosage de monoxyde d'azote (NO) :

IV.3.B.1 - Étude *in vivo* de la cinétique de production du monoxyde d'azote (NO) par les macrophages en culture après envenimation expérimentale par le venin d' *Aah* ou la toxine *Aah* II en présence et en absence d'immunothérapie:

L'oxyde nitrique (NO) est un messenger moléculaire produit par l'oxydation de la L-arginine par une famille d'enzymes appelé oxyde nitrique synthases (NOS) (Rawlingson, 2003). Il s'agit d'un produit cytotoxique activé par les macrophages et en réagissant avec les ROS, a été impliqué dans diverses fonctions de régulation (Wink et Mitchell, 1998).

Le monoxyde d'azote (NO) est estimé indirectement par la mesure des nitrites, ces derniers sont des produits stables dans les surnageants des différents groupes des macrophages en culture (Green et *al*, 1982).

En absence d'immunothérapie, les résultats obtenus montrent une production progressive de nitrites par les macrophages entre 30 min et 72 h d'envenimation avec une dose sublétales du venin d'*Aah* (10 µg/20 g de souris) ou de la toxine *Aah* II (0,1 µg/20 g de souris). En effet le maximum de cette production obtenu après 72 h d'envenimation avec le venin d' *Aah* ou la toxine *Aah* II est estimée respectivement à $24,37 \pm 4,67$ et $20,30 \pm 0,89$ µM.

La production de nitrites est stable après une immunothérapie entre 30 min et 2 h d'envenimation puisque des taux normaux de nitrites sont retrouvés. L'immunothérapie *in vivo*, utilisant des fragments F (ab')₂ anti F_{tox} G50 *Aah* (0,8 mg/20 g de souris) ou des anticorps anti-*Aah* II (0,8 mg/20 g de souris) a été utilisée par voie intra péritonéale 30 min après l'envenimation.

Une inhibition partielle et très faible de la production des nitrites par l'immunothérapie administrée sous les conditions décrites auparavant, est observée après 30 min, 2 h, 24 h et 72 h d'envenimation par le venin d'*Aah* avec des pourcentages d'inhibition respectives de 7,75 %; 6,95 %; 2,53 % et 7,71 % et ce même après injection des anticorps anti-*Aah* II avec des pourcentages d'inhibitions de la production des nitrites respectivement de: 9,94 %; 11,5 %; 4,18 % et 7,14 % après 30 min ; 2h ; 48 h et 72 h de l'administration de la toxine *Aah* II (Figure 20).

■ Venin d'Aah □ (Venin d'Aah + anti-Ftox) ■ Toxine Aah II □ (Toxine Aah II + Ac anti Aah II)

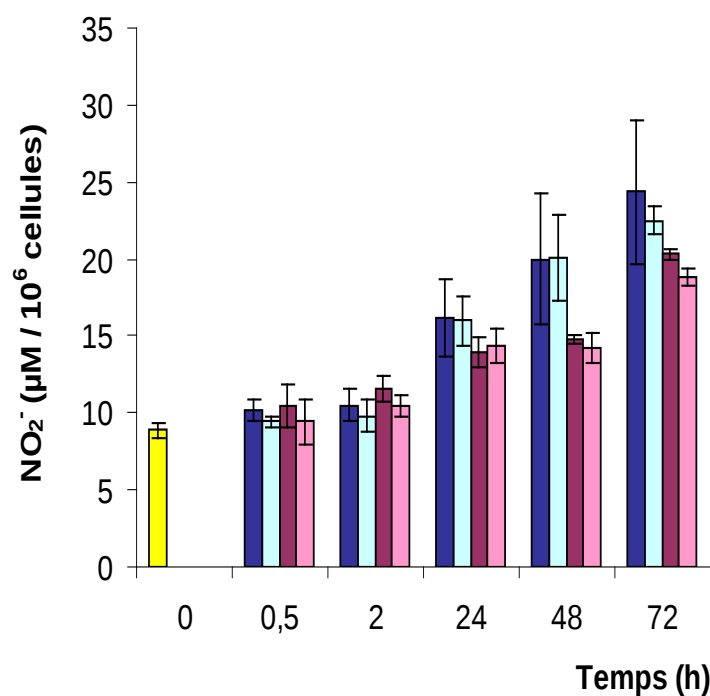


Figure 20 : Cinétique de production nitrites (NO_2^-) mesuré après stimulation *in vivo* des macrophages péritonéaux avec le venin d'Aah (10 $\mu\text{g/ml}$) ou de la toxine Aah II (0,1 $\mu\text{g/ml}$) en présence et en absence de F(ab')_2 anti-Ftox G50 (0,8 mg/ml) et de l'anticorps spécifique anti-Aah II (0,8 mg/ml), respectivement. (Moyenne $\pm$ écart-type $n=3$).

IV.3.B.2 -Étude *in vitro* de la cinétique de production de monoxyde d'azote (NO) par les macrophages en culture traités par le venin d' *Aah* ou la toxine *Aah* II en présence et en absence d'immunothérapie:

L'évaluation de la production des nitrites *in vitro*, a été déterminée après stimulation des macrophages avec une concentration du venin d'*Aah* (10 µg/ml) ou de toxine *Aah* II (0,1 µg/ml). Les résultats obtenus montrent une augmentation de la production des nitrites *in vitro* temps dépendant atteignant un maximum à 72 h d'incubation.

Concernant les macrophages traités par la toxine *Aah* II, les quantités des nitrites sont généralement inférieures ou égales à celles obtenues par les macrophages traités par le venin d'*Aah*.

La neutralisation partielle du venin d'*Aah* par les fragments F (ab')₂, est bien observée entre 24 h et 72 h d'incubation, montrant une diminution sensible de la production des nitrites. La neutralisation de la toxine *Aah* II *in vitro* est beaucoup plus efficace que celle du venin d'*Aah* puisque les concentrations des nitrites observées sont identiques à celles du témoin négatif (macrophages non traités) (Figure 21). Des taux élevés de NO par les macrophages ont été également retrouvés (Petricevich et al, 2007).

IV.3.C - Mesure de Malonaldehyde :

IV.3.C.1 - Étude *in vivo* de l'effet du venin *Aah* ou de la toxine *Aah* II sur la peroxidation lipidique au niveau des membranes des macrophages en présence et en absence d'immunothérapie :

Les teneurs en MDA (marqueur de peroxidation des lipides membranaire) observées après l'administration d'une dose sublétales du venin d'*Aah* (10 µg/20 g de souris) par voie intrapéritonéale sont légèrement supérieures à celles obtenues après différents intervalles de temps de l'injection par la même voie de la toxine *Aah* II (0,1 µg/20 g de souris). Pour les deux cas, nous observons une augmentation rapide de taux de MDA après 30 min du traitement et qui continue à augmenter jusqu'à 7 fois plus à 24 h. Une faible diminution des taux de MDA survient après 48 h d'envenimation avec le venin d'*Aah* ou la toxine *Aah* II, et devient stable jusqu'à 72 h avec ces mêmes traitements.

■ Venin d'Aah □ (Venin d'Aah + anti-F-tox) ■ Toxine Aah II □ (Toxine Aah II + Ac anti-Aah II)

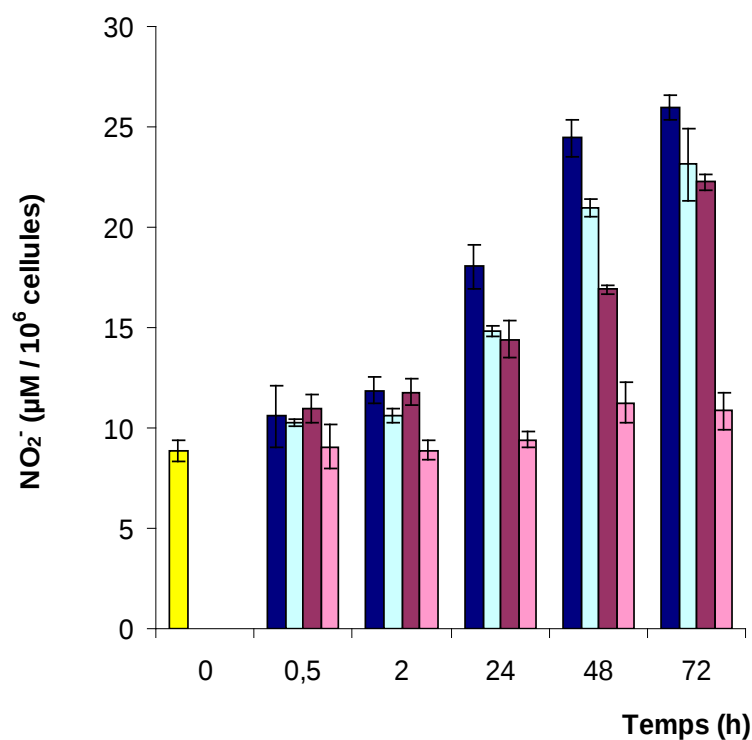


Figure 21 : Cinétique de la production des nitrites (NO_2^-) mesurés après stimulation *in vitro* des macrophages péritonéaux avec le venin d'Aah (10 $\mu\text{g/ml}$) ou la toxine Aah II (0,1 $\mu\text{g/ml}$) en présence et en absence de F(ab')_2 anti-Ftox G50 (0,8 mg/ml) et de l'anticorps spécifique anti-Aah II (0,8 mg/ml), respectivement. (Moyenne $\pm$ écart-type $n=3$).

La neutralisation partielle des effets du venin d'*Aah* sur la peroxydation lipidique au niveau des macrophages par l'immunothérapie est bien observée à différents intervalles du temps, avec une baisse plus ou moins considérable des quantités du MDA.

Par ailleurs l'immunothérapie administrée sous forme d'anticorps anti-*Aah* II, a permis de retrouver des taux en MDA quasi identiques à ceux du témoin (Figure 22).

IV.3.C.2 – Étude *in vitro* de l'effet du venin d'*Aah* ou de la toxine *Aah* II sur la peroxydation lipidique au niveau des membranes des macrophages en présence et en absence d'immunothérapie :

La cinétique du MDA *in vitro* révèle une augmentation progressive de la peroxydation lipidique au niveau des macrophages après l'addition dans leur milieu de culture d'une quantité de venin d'*Aah* (10 µg/ml) ou de la toxine *Aah* II (0,1 µg/ml).

Les teneurs les plus élevées en MDA ont été estimées après 72 h d'incubation à 1089, 74 ± 19,9 pmol/ml et à 1153,84 ± 49 pmol/ml sous l'effet du venin d'*Aah*, et de la toxine *Aah* II, respectivement.

Alors que l'addition simultanée des fragments anti-Ftox ou des anticorps anti-*Aah* II avec le venin d'*Aah* ou la toxine *Aah* II respectivement, dans le milieu de culture des macrophages a permis une réduction importante des teneurs en MDA *in vitro* dont les valeurs sont analogues à celles du témoin. En effet les pourcentages de réduction des teneurs en MDA par immunothérapie anti-Ftox, obtenues après les différents temps d'incubation (30 min, 2 h, 24 h, 48 h et 72 h) sont respectivement (16,66 % ; 34,63 % ; 25 % ; 61,54 % et 76,93 %), montrant ainsi l'efficacité de l'immunothérapie dans la protection des macrophages contre la peroxydation lipidique de leurs membranes cellulaires (Figure 23).

IV.3.D – Dosage du glutathion (GSH):

IV.3.D.1 – Évaluation du système anti-oxydant dans les macrophages par la mesure du GSH après envenimation expérimentale par le venin d'*Aah* et la toxine *Aah* II en présence et en absence d'immunothérapie :

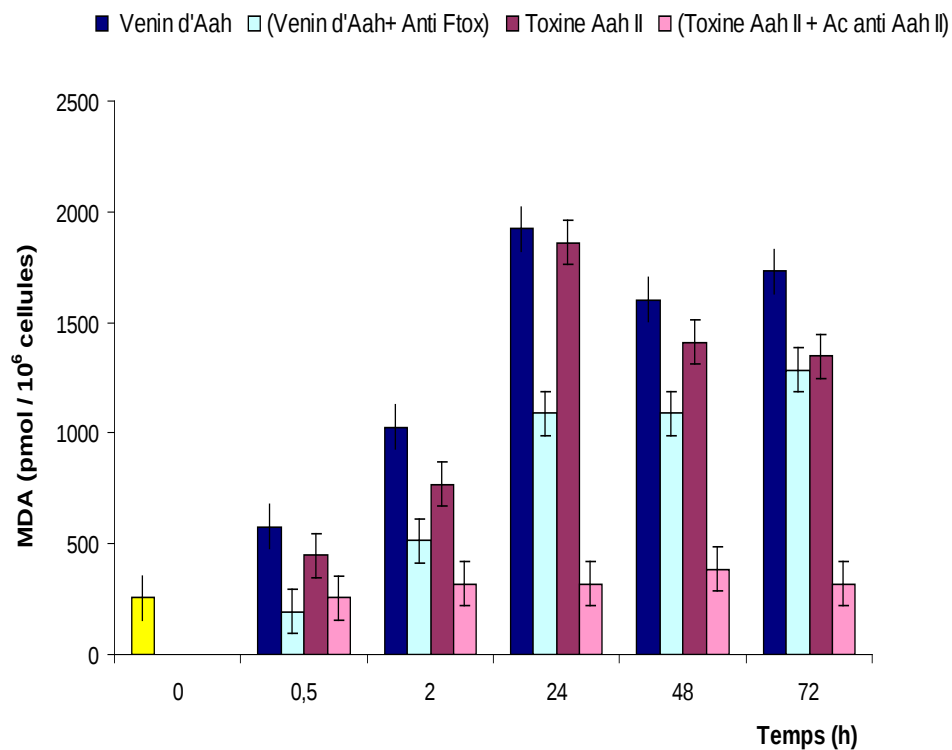


Figure 22 : Cinétique de libération du MDA mesuré après stimulation *in vivo* des macrophages péritonéaux avec le venin d'Aah (10 µg/20 g de souris) ou de la toxine Aah II (0,1 µg/20 g de souris) en présence et en absence de F (ab')₂ anti -Ftox G50 (0,8 mg/20 g de souris) ou de l'anticorps spécifique anti-Aah II (0,8 mg/20 g de souris). (Moyenne ± écart-type, n=3).

■ Venin d'Aah □ (Venin d'Aah + anti-Ftox) ■ Toxine Aah II □ (Toxine Aah II + Ac anti Aah II)

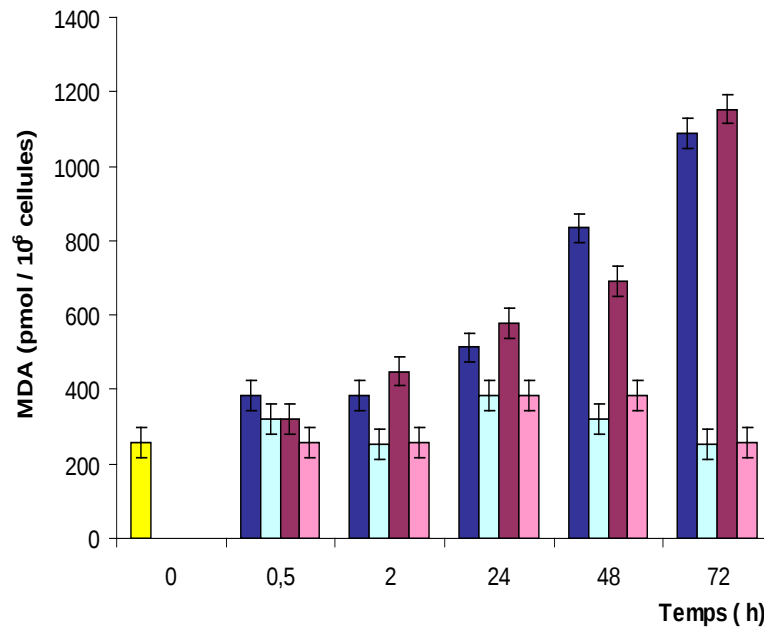


Figure 23 : Cinétique de libération du MDA mesuré après stimulation *in vitro* des macrophages péritonéaux avec le venin d'Aah (10 µg/ml) ou la toxine Aah II (0,1 µg/ml) en présence et en absence de F (ab')₂ anti -Ftox G50 (0,8 mg/ml) ou de l'anticorps spécifique anti-Aah II (0,8 mg/20g de souris). (Moyenne ± écart-type, n=3).

L'apparition de glutathion réduit (GSH) après la stimulation *in vivo* des macrophages péritonéaux par le venin d'*Aah* (10 µg/20 g de souris), montre une cinétique biphasique qui se traduit par des quantités de GSH inférieures à celles trouvées chez les macrophages témoins (macrophages avant envenimation). Ces quantités diminuent fortement après 24 h d'envenimation puis ré-augmentent après ce temps-là mais restent cependant inférieurs à celles des macrophages témoins. Par ailleurs, les valeurs du GSH enregistrés après les traitements *in vivo* par la toxine *Aah* II (0,1 µg/20g de souris) révèlent une diminution des quantités de GSH de 87,06 %, 30 minutes après l'injection de la toxine *Aah* II, mais qui augmentent par la suite en fonction du temps d'envenimation avec la toxine pour atteindre à 72 h une quantité presque équivalente à celle du témoin estimée à $35,66 \pm 1,88$ pmol /ml.

Les résultats obtenus avec la neutralisation du venin d'*Aah* par immunothérapie administrée sous forme de fragments F(ab')₂ anti-F_{tox} G50 (0,8 mg/20 g de souris) ont permis de montrer des quantités du GSH nettement supérieures à celle trouvées après envenimation seule. Une diminution lente et progressive des quantités du GSH est obtenue après 30 min et ce jusqu'à 24 h après traitement. Au delà de 24 heures, les quantités du GSH commencent à augmenter jusqu'à 72 h après traitement pour retourner au taux normal.

Le traitement *in vivo* sous forme d'anticorps spécifiques anti-*Aah* II administré à une dose de 0,8 mg/20 g de souris, 30 minutes après l'injection de la toxine *Aah* II a permis également l'élévation rapide et importante des taux de GSH entre 30 min et 48 h du traitement (Figure 24).

IV.3.D.2 - Effet *in vitro* du venin d'*Aah* ou de la toxine *Aah* II sur la cinétique du GSH au niveau des macrophages :

L'exposition des macrophages péritonéaux dans leur milieu de culture au venin d'*Aah* (10 µg/ml), après différents temps d'incubation, se traduit par une réduction très importante de quantités du GSH par rapport à celles des macrophages non traités (témoin). En effet les pourcentage de réduction de GSH sont: 91,57 %; 96,66 %; 96,08 %; 97,25 % et 93,33 %, respectivement pour les temps d'incubation 30 min, 2 h, 24 h, 48 h et 72 h. La baisse des taux

■ Venin d'Aah □ (Venin d'Aah + Anti-Ftox) ■ Toxine Aah II □ (Toxine Aah II + Ac anti-Aah II)

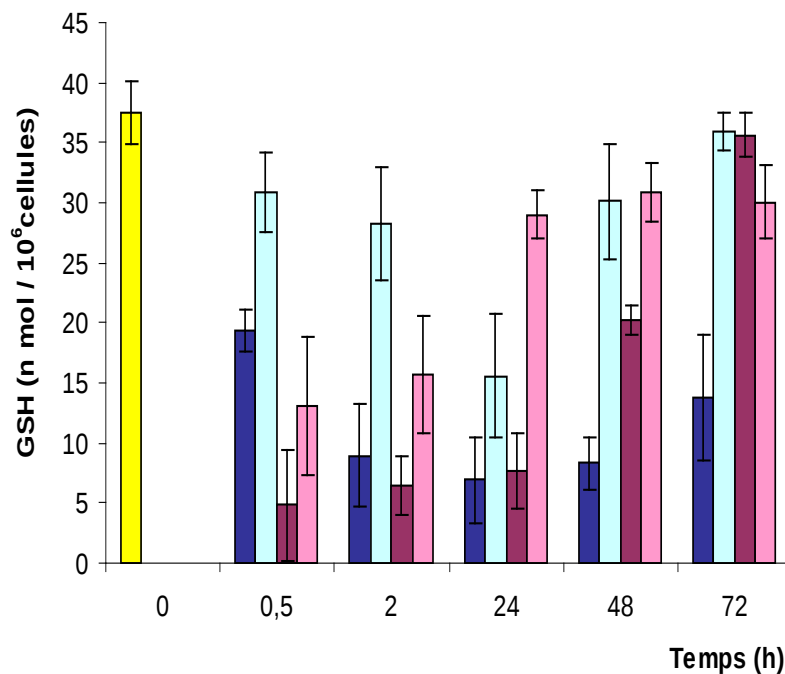


Figure 24 : Cinétique de libération du GSH mesuré après stimulation *in vivo* des macrophages péritonéaux avec le venin d'Aah (10 µg/20 g de souris) ou la toxine Aah II (0,1 µg/20 g de souris) en présence et en absence de F(ab')₂ anti -Ftox G50 (0,8 mg/20 g de souris) et de l'anticorps spécifique anti-Aah II (0,8 mg/20 g de souris). (Moyenne ± écart-type, n=3).

■ Venin d'Aah □ (Venin d' Aah + AntiF-tox) ■ Toxine Aah II □ (Toxine Aah II + Ac anti-Aah II)

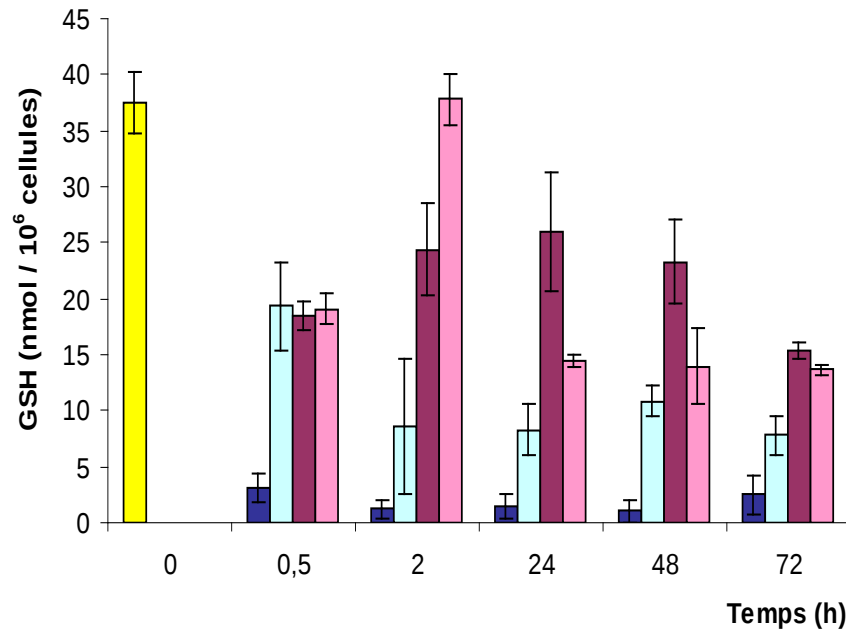


Figure 25 : Cinétique de libération de GSH mesuré après stimulation *in vitro* des macrophages péritonéaux avec le venin d'Aah (10 µg/ml) ou la toxine Aah II (0,1 µg/ml) en présence et en absence de F(ab')₂ anti -Ftox G50 (0,8 mg/ml) et de l'anticorps spécifique anti-Aah II (0,8 mg/ml). (Moyenne ± écart-type, n=3).

du GSH est également signalée par l'effet de la toxine *Aah* II (0,1 µg/ml) mais avec des valeurs supérieures à celles enregistrées après le traitement avec le venin d'*Aah*.

L'addition des fragments F(ab)'₂ anti-Ft_{ox} G50 au venin d'*Aah* dans le milieu de culture des macrophages induit l'élévation des quantités de GSH qui restent cependant inférieures à celles du témoin (macrophages sans traitement). D'autre part l'ajout des anticorps spécifiques à la toxine *Aah* II a permis d'augmenter les quantités du GSH au taux normal après 2 h d'incubation bien qu'un effet inattendu de l'immunothérapie concernant les temps 24 h, 48 h et 72 h d'incubation, induisant une diminution de taux du GSH, en comparaison avec ceux obtenus en présence de la toxine *Aah* II sans immunothérapie (Figure 25).

IV.3.E – Dosage des cytokines :

IV.3.E.1 - Effet *in vivo* du venin d'*Aah* ou de la toxine *Aah* II sur la production des cytokines (IL-1β, IL-6, TNF-α, l'IFN-γ, IL-12 et IL-10) par les macrophages péritonéaux :

L'état d'activation des macrophages a été également évalué au cours de l'envenimation par une dose sublétales du venin d'*Aah* (10 µg/20 g de souris) injectée par voie intra péritonéale à des souris BALB/c, en mesurant la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α, IL-6, IFN-γ, IL-12), et anti-inflammatoires (IL-10).

En outre, l'effet d'une dose sublétales de la toxine purifiée *Aah* II (0,1 µg/20 g de souris) a été testé sur l'activation des macrophages via le dosage des différentes cytokines citées précédemment.

Le dosage de l'IL-1β, montre des taux quasi identiques entre 2 h et 72 h d'envenimation, avec une légère tendance à la baisse par rapport au temps 0 h (témoin) (Figure 26).

Les résultats obtenus pour le dosage de TNF-α, montrent une légère augmentation du taux de cette cytokine pour les temps 2 h et 72 h avec des concentrations maximales suite au traitement par la toxine *Aah* II ou le venin d'*Aah*, respectivement. Comparée au témoin, cette cytokine est restée plutôt stable entre 24 h et 48 h d'envenimation (Figure 27).

Les résultats du dosage de l'IL-6 après injection de la toxine *Aah* II montrent une augmentation importante d'un facteur de 13 du taux de cette cytokine à 72 h par rapport à celui du témoin. Il existe cependant une grande variabilité de réponse entre la toxine *Aah* II et le venin d'*Aah*.

En effet dans le cas du venin des valeurs inférieures ou égales à celles du témoin ont été obtenues (Figure 28).

Le dosage de l'IFN- γ , permet d'obtenir des valeurs stables à 48 h, alors que l'administration de la toxine Aah II montre une légère augmentation de la concentration de cette cytokine comparée au témoin (Figure 29).

La synthèse de l'IL-12 par les macrophages stimulés *in vivo* par la toxine Aah II révèle un profil biphasique avec une induction précoce à 2 h puis tardive et maximale à 48 h. Il est noté que les concentrations d'IL-12 induites par la toxine Aah II dépassent plus ou moins légèrement celles induites par le venin d'Aah dans les mêmes conditions de dosage (Figure 30).

D'autre part, la quantification de l'IL-10 induite dans les surnageants de culture des macrophages sous l'effet de la dose sublétales de venin d'Aah ou de la toxine Aah II révèle une certaine stabilité des taux de production montrant des valeurs qui se rapprochent au taux basal du témoin ($294 \pm 16,26$ pg/ml). La quantification de l'IL-10 déterminée à 48 h d'envenimation par le venin d'Aah, permet d'obtenir des taux de $378,84 \pm 15,8$ pg/ml (Figure 31).

IV.3.E.2 - Effet *in vitro* du venin d'Aah et sa toxine Aah II sur la production des cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α , l'IFN- γ , IL-12 et IL-10) par les macrophages péritonéaux :

Les résultats obtenus *in vivo*, permettent d'indiquer si la production des cytokines induites *in vitro* par les macrophages péritonéaux sous l'effet de la même concentration du venin d'Aah ou la toxine Aah II suivent les mêmes cinétiques. En effet le dosage des cytokines dans les surnageants de cultures des macrophages est effectué après incubation de ces cellules avec 10 μ g/ml du venin d'Aah ou 0,1 μ g/ml de toxine Aah II à différents intervalles de temps (0 min, 30 min, 2 h, 24 h, 48 h et 72 h).

L'analyse des résultats du dosage de IL-1 β révèle une augmentation modérée à 24 h d'incubation après addition du venin d'Aah, pour atteindre une concentration de $32,77 \pm 6,36$ pg/ml. Les concentrations d'IL-1 β pour les autres temps d'incubation demeurent constantes avec des valeurs qui sont généralement inférieures ou égales à celle du témoin (Figure 26).

Le traitement des macrophages dans leur milieu de culture par le venin d' *Aah* (10 µg /ml) induit une augmentation des taux de TNF- α atteignant son maximum à 72 h ($122,42 \pm 12,02$ pg/ml), tandis que l'addition de la toxine *Aah* II (0,1 µg/ml) provoque rapidement la libération de TNF- α après 2 h d'incubation quantifiée à $108,47 \pm 18,38$ pg/ml mais cette production diminue plus tard, après 72 h atteignant une valeur de $85,2 \pm 5,65$ pg/ml (Figure 27).

Après 48 h et 72 h, une production très élevée d'IL-6 a été observée après traitement des macrophages avec le venin d'*Aah* (10 µg/ml). En effet les taux obtenus sont respectivement de $1504,02 \pm 2,12$ pg/ 10^6 cellules/ml et de $834,54 \pm 12,02$ pg/ 10^6 cellules/ml (Figure 28). La production tardive d'IL-6 reflète probablement une production précoce de TNF- α , puisque en agissant en synergie avec l'IL-1 β induit la synthèse d'IL-6. Par contre aucune augmentation de taux d'IL-6 n'est observée après stimulation des macrophages avec la toxine *Aah* II (0,1 µg/ml). Il existe en fait une grande variabilité de réponse entre la toxine *Aah* II et le venin d'*Aah*.

La stimulation des macrophages avec le venin d'*Aah* ou la toxine *Aah* II, semble n'exerce aucun changement de taux basal d'IFN- γ , à l'exception d'une augmentation faible de taux de cette cytokine après 72 h suite au traitement par le venin d'*Aah* (Figure 29).

La cinétique de production d'IL-12 par les macrophages suite à leur incubation avec le venin d'*Aah* semble avoir la même allure que celle qui a marqué l'incubation des macrophages par la toxine *Aah* II. En effet les taux les plus élevés de production d'IL-12 induits par le venin d'*Aah* et la toxine *Aah* II ont été évalués respectivement à 24 h et 72 h pour une augmentation de 2 fois supérieure à la normale (Figure 30).

En suivant la cinétique de production de l'IL-10 après addition du venin d'*Aah*, un niveau élevé de production à 24 h d'incubation avec un taux maximal de $924,2 \pm 8,04$ pg /ml a été observé, une diminution de cette production d'un facteur de 1,8 est ensuite constatée après 48 h d'incubation. En parallèle, une légère augmentation de la production de l'IL-10 a été observée à 24 h d'incubation suite à l'addition de la toxine *Aah* II. Les valeurs obtenues à 48 h et 72 h avec le même traitement montrent que les taux de cette cytokine redeviennent presque normaux. (Figure 31).

IV.3.E.3 - La balance pro-et anti-inflammatoire des cytokines :

L'analyse de la balance des cytokines pro et anti-inflammatoire produites par les macrophages stimulées par le venin d'*Aah* ou la toxine *Aah* II est traduite dans le tableau IV.

Tableau IV : Balance inflammatoire des cytokines

	Temps	2 h		24 h		48 h		72 h	
	stimulus	Venin d' <i>Aah</i>	Toxine <i>Aah</i> II	Venin d' <i>Aah</i>	Toxine <i>Aah</i> II	Venin d' <i>Aah</i>	Toxine <i>Aah</i> II	Venin d' <i>Aah</i>	Toxine <i>Aah</i> II
In vivo	IL-1 β /IL-10	0,072	0,068	0,079	0,081	0,054	0,074	0,097	0,094,
	TNF- α /IL-10	0,076	0,337	0,263	0,294	0,192	0,279	0,446	0,304
	IL-6/IL-10	0,473	0,314	0,231	0,200	0,137	0,668	0,097	5,499
	IFN- γ /IL-10	0,264	0,293	0,306	0,304	0,200	0,416	0,404	0,344
In vitro	IL-1 β /IL-10	0,080	0,103	0,035	0,064	0,069	0,065	0,037	0,059
	TNF- α /IL-10	0,326	0,460	0,082	0,204	0,377	0,277	0,245	0,229
	IL-6/IL-10	0,709	0,192	0,094	0,121	5,81	0,112	1,793	0,122
	IFN- γ /IL-10	0,316	0,356	0,090	0,196	0,333	0,258	0,201	0,226

Cette analyse se base sur la comparaison des rapports des concentrations entre les cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , TNF- α , IL-6 et IFN- γ) et la cytokine anti-inflammatoire (IL-10), calculés après les différents temps de stimulations des macrophages et sans stimulation (témoin). Ces rapports sont évalués pour le témoin à 0,091; 0,231; 0,360 et 0,277, respectivement pour IL-1 β /IL-10, TNF- α /IL-10, IL-6/IL-10 et IFN- γ /IL-10. Les résultats les plus marquants sont résumés comme suit :

Les macrophages exposés *in vitro* à la toxine *Aah* II pendant 2 h d'incubation, induisent une implication marquée des rapports IL-1 β /IL-10, TNF- α /IL-10. Pour ces mêmes macrophages, quoique le rapport d'IL-6/IL-10 le plus élevé soit observé à 2 h, il reste cependant très faible. Pour ce même temps d'incubation, le rapport IFN- γ /IL-10 apparaît élevé à 2 h puis diminue à 24 h et réapparaît après 48 h d'incubation des macrophages avec la toxine *Aah* II. Ces résultats indiquent un déclenchement rapide (en 2 h) du processus inflammatoire induit par la toxine *Aah* II, et qui semble être régulé négativement par l'IL-10, surtout si nous comparons

ces derniers avec les résultats de Petricevich et ses collaborateurs (2007) concernant l'étude de la balance inflammatoire des macrophages par la toxine gamma (Ts1) et qui a montré un début de l'altération de la balance inflammatoire à partir de 12 h d'incubation avec cette toxine.

In vivo, il y' une forte implication de la toxine *Aah* II à 72 h par rapport au venin d'*Aah* dans le déséquilibre de la balance inflammatoire en faveur de l'IL-6.

In vitro le rapport d'IL-6/IL-10 est plus élevé après 48 h sous l'effet du venin d'*Aah*.

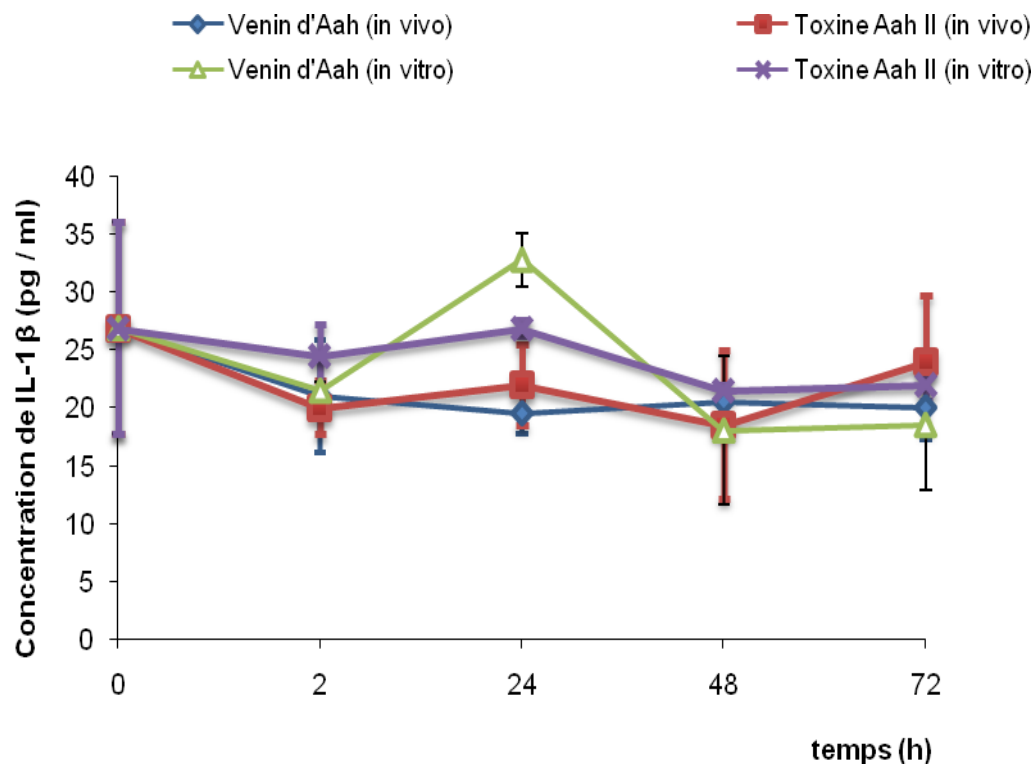


Figure 26: Dosage de IL-1 β dans les surnageants de cultures des macrophages apr stimulation *in vivo* avec le venin d'Aah (10 μ g/20 g de souris) ou de la toxine Aah II (0,1 μ g/ 20 g de souris) ou par stimulation *in vitro* par le venin d'Aah (10 μ g/ml) ou de la toxine Aah II (0,1 μ g/ml). (Moyenne $\pm$ écart-type, n=3)

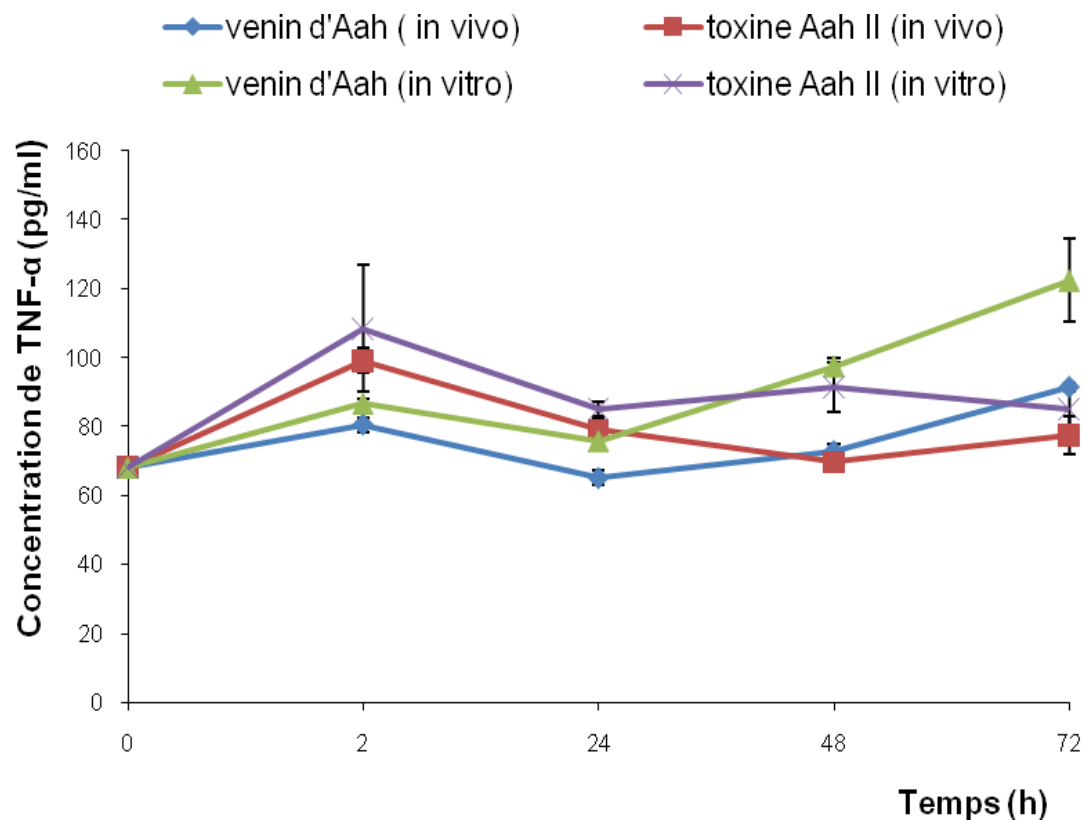


Figure 27 : Dosage de TNF- α dans les surnageants de cultures des macrophages après stimulation *in vivo* avec le venin d'Aah (10 μ g/20 g de souris) ou de la toxine Aah II (0,1 μ g/20 g de souris) ou par stimulation *in vitro* par le venin d'Aah (10 μ g/ml) ou de la toxine Aah II (0,1 μ g/ml). (Moyenne $\pm$ écart-type, n=3).

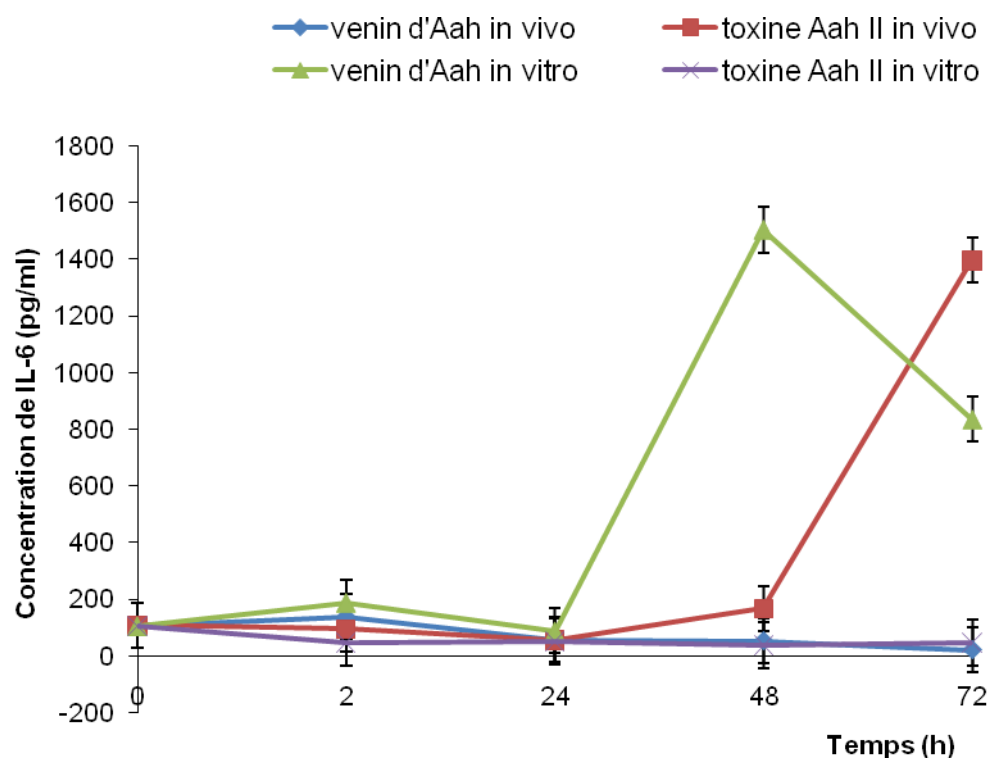


Figure 28 : Dosage de IL-6 dans les surnageants de cultures des macrophages après stimulation *in vivo* avec le venin d'Aah (10 µg/20 g de souris) ou de la toxine Aah II (0,1 µg/20 g de souris) ou par stimulation *in vitro* par le venin d'Aah (10 µg/ml) ou de la toxine Aah II (0,1 µg/ml). (Moyenne ± écart-type, n=3).

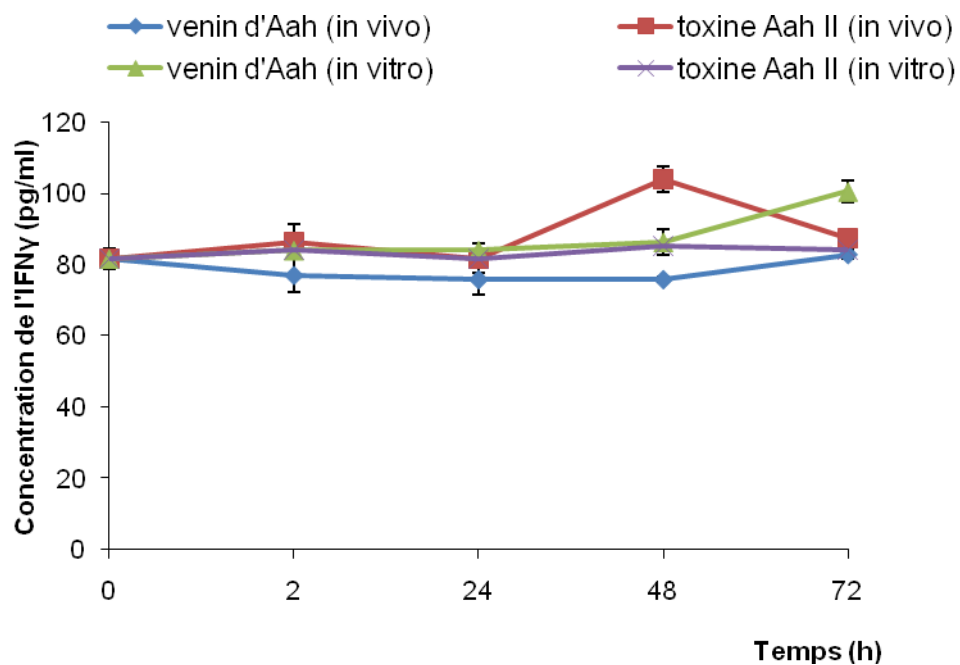


Figure 29: Dosage de IFN- γ dans les surnageants de cultures des macrophages apr stimulation *in vivo* avec le venin d'Aah (10 μ g/20g de souris) ou de la toxine Aah II (0,1 μ g/20 g de souris) ou par stimulation *in vitro* par le venin d'Aah (10 μ g/ml) ou de la toxine Aah II (0,1 μ g/ml). (Moyenne $\pm$ écart-type, n=3).

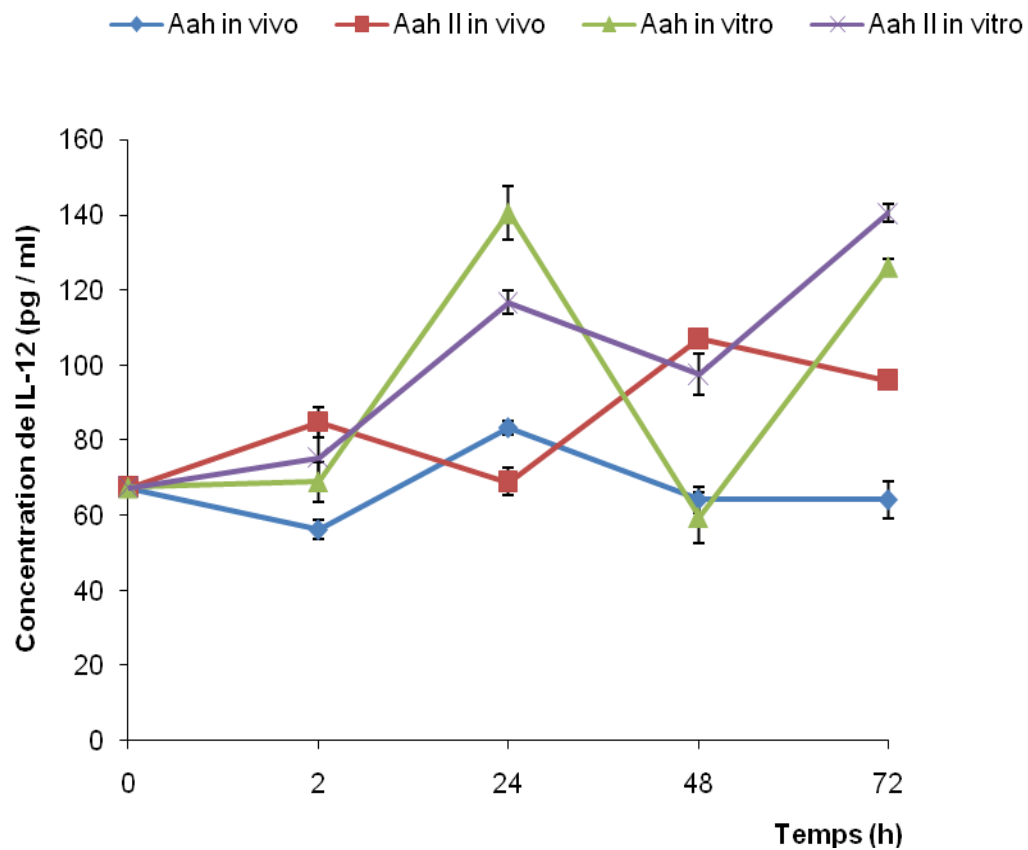


Figure 30 : Dosage de IL-12 dans les surnageants de cultures des macrophages après stimulation *in vivo* avec le venin d'*Aah* (10 µg/20g de souris) ou la toxine *Aah* II (0,1 µg/ 20 g de souris) ou par stimulation *in vitro* par le venin d'*Aah* (10 µg/ml) ou de la toxine *Aah* II (0,1 µg/ml). (Moyenne ± écart-type, n=3).

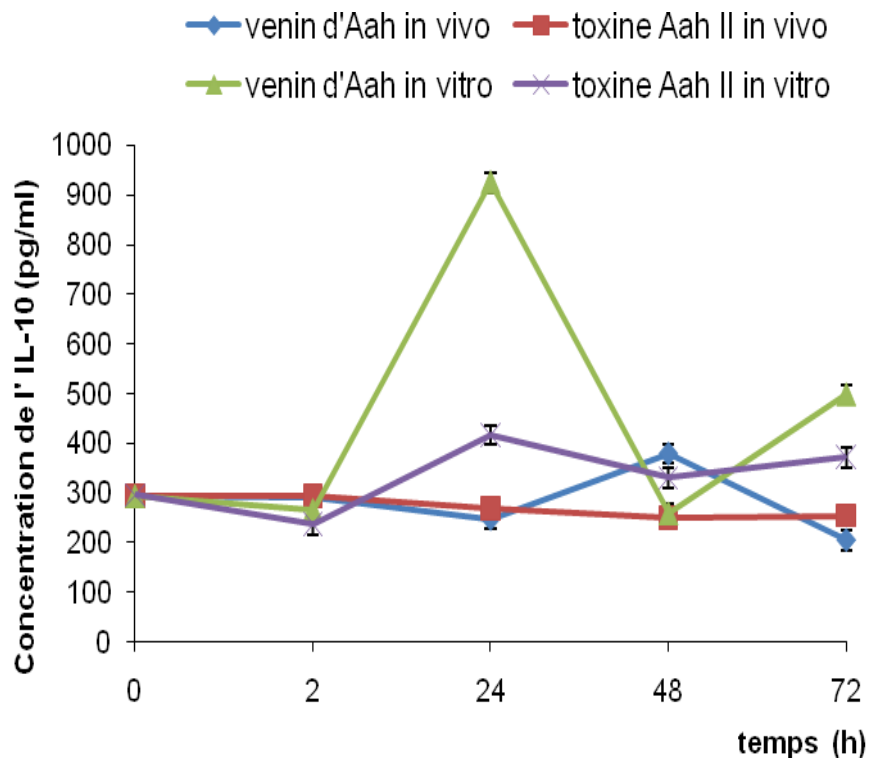


Figure 31 : Dosage de IL-10 dans les surnageants de cultures des macrophages après stimulation *in vivo* avec le venin d'Aah (10 µg/20g de souris) ou de la toxine Aah II (0,1 µg/20 g de souris) ou par stimulation *in vitro* par le venin d'Aah (10 µg/ml) ou de la toxine Aah II (0,1 µg/ml). (Moyenne ± écart-type, n=3).

Discussion :

Il est bien connu que les venins scorpioniques par leur action sur les canaux sodiques, favorisent la libération de plusieurs neurotransmetteurs tel que l'adrénaline et la noradrénaline. En effet plusieurs études avaient montré le pouvoir des catécholamines à induire la génération des radicaux libres qui mènent au stress oxydatif et à l'apoptose (Khorchid et *al*, 2002). L'état d'une augmentation modérée des espèces réactives de l'oxygène (ROS) au niveau cellulaire est connu sous le nom de stress oxydatif (Alonso et *al*, 2003). Ces ROS ont un potentiel oxydatif sur les molécules biologiques telles que les protéines, les lipides et l'ADN (Al-Omar et *al*, 2004).

Le stress oxydatif semble être l'élément central dans la régulation des voies déclenchées par l'apoptose via plusieurs facteurs environnementaux comme les agents cytotoxiques, polluants, substances toxiques.... Ces derniers contribuent à établir des conditions pathologiques variables (Franco et *al*, 2008). Le macrophage en tant que première ligne de défense, est particulièrement impliqué dans les désordres oxydatifs et dans leur contrôle; par ailleurs il joue un rôle majeur dans la réponse inflammatoire.

Dans notre étude, une activité cytotoxique maximale a été révélée au niveau des macrophages péritonéaux des souris BALB/c après 24 h et 48 h d'incubation suite à un traitement *in vitro* par le venin d'*Aah* ($10 \mu\text{g}/10^6$ cellules/ml) ou la toxine *Aah* II ($0,1 \mu\text{g}/10^6$ cellules/ml) respectivement, réalisé dans des conditions strictes de la culture cellulaire. Une étude récente réalisée sur le venin de scorpion *Leiurus quinquestriatus* a révélé l'implication des protéases de ce venin dans les dommages cellulaires, suggérant la possibilité de ce venin, par son action sur les canaux sodiques et induction d'une dépolarisation prolongée à augmenter l'influx de calcium qui peut engendrer par la suite l'activation des protéases entraînant une dégradation excessive des protéines accompagnée de la génération des radicaux libres et par conséquent des dommages cellulaires (Fatani et *al*, 1998).

La mort cellulaire est un phénomène complexe qui peut impliquer l'apoptose, la nécrose et l'autophagie (Orrenius et *al*, 2003; Lemasters 2005). La génération des ROS est partiellement impliquée dans le phénomène de cytotoxicité. Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est un composant majeur des produits ROS intracellulaires qui est produit au cours des processus physiologiques et physiopathologiques, d'autant plus qu'il est responsable des dommages

oxydatifs (Xie et *al*, 1992) surtout au niveau de l'ADN où il provoque des cassures latérales et des modifications de bases (Halliwell et *al*, 1991).

D'autre part une diminution progressive de la cytotoxicité du venin d'*Aah* ainsi que sa toxine *Aah* II sur les macrophages en culture a été constatée dans notre étude après un traitement préalable des macrophages par un corticoïde : la dexaméthasone. Les corticoïdes compte tenu de leur puissante action anti inflammatoire, sont utilisés en clinique dans la prise en charge thérapeutique de certains cas d'envenimations scorpioniques sévères compliquées par l'oedème pulmonaire (Rhalem et *al*, 1995). L'effet protecteur de la dexaméthasone contre l'apoptose des macrophages RAW 264.7 a été mis en évidence par Chi-Chung Fong et ses collaborateurs (2007) après une induction par l' H_2O_2 exogène. Ces données laissent penser que la réduction de la viabilité des macrophages induite *in vitro* par le venin d'*Aah* ou la toxine *Aah* II montrée par nos résultats, est probablement due à un effet cytotoxique apoptotique exercé par le venin ou la toxine via une stimulation de la production de H_2O_2 par les macrophages. Cela a été vérifié au cours de cette étude à travers un dosage du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) produit par les macrophages péritonéaux des souris BALB/c exposés *in vitro* au venin d'*Aah* ou à la toxine *Aah* II. Les résultats obtenus ont montré une forte production de H_2O_2 à 24 h et 48 h d'incubation des macrophages avec le venin d'*Aah* et la toxine *Aah* II, respectivement. Cette augmentation de la concentration de H_2O_2 reflète une activation des fonctions macrophagiques par cette molécule qui agit en tant que signal inter et intra cellulaire (Gamalay et *al*, 1994 ; Halliwell et *al*, 2000). En effet une production élevée de H_2O_2 est la conséquence d'une catalyse enzymatique de la dismutation de l' O_2^- qui est générée pendant la flambée respiratoire médiée par la stimulation de la membrane de NADPH oxydase (Kim et *al*, 1996).

La synthèse de H_2O_2 et de NO par les macrophages peut être induite par un stimulus comme le lipopolysaccharide (LPS) et qui est régulée par les cytokines tel que l'IFN- γ et le TNF- α (Xie et *al*, 1992; Lorsbach et *al*, 1993).

Petreceivich et Lebrun (2004) avaient montré une augmentation significative des taux de H_2O_2 et de NO après stimulation des macrophages avec le venin de *Tituys serrulatus* (TSV) ainsi que ses fractions FII et FIII, combinée *in vitro* avec un costimulus : l'IFN- γ , suggérant qu'un composant du venin TSV ou bien une synergie entre les constituants de ce venin

présente une activité immunomodulatrice à travers l'activation des fonctions du macrophages qui se manifeste par la production des espèces réactives d'oxygène.

Toutefois, Hoffman et Weinberg (1987) ont démontré que le TNF- α induit la production de H₂O₂ dans les macrophages péritonéaux. En outre le TNF- α induit la synthèse d'ARNm de superoxyde dismutase manganèse (MnSOD) qui est une enzyme qui catalyse la dismutation de l'O₂⁻ en H₂O₂ (Wong et Goeddel, 1988 ; Shaffer et *al*, 1990).

Dans cette étude une diminution de la production de H₂O₂ survient après 72 h d'incubation *in vitro* des macrophages avec la toxine Aah II, pourrait s'expliquer par une stimulation de l'IFN- γ qui a inhibé cette production qui peut être liée à la capacité des macrophages à produire une faible quantité de TNF- α en présence de la toxine Aah II. Ce ci n'est pas le cas en présence du venin d'Aah.

La production tardive de H₂O₂ *in vitro* par les macrophages stimulés par l'IFN- γ a été également observée en présence d'une mycotoxine (trichothecene vomitoxine) produite par les espèces du *fusarium* (Ji et *al*, 1998).

Le potentiel d'action du venin d'Aah ou de la toxine Aah II sur la production de H₂O₂ *in vitro* est analogue à celui montré *in vivo* avec quelques variations cinétiques. Une similitude entre la toxine Aah II et la Concanavaline A (Con A) concernant leur effet *in vitro* sur la cinétique et les quantités de H₂O₂ produites par les macrophages, est rapporté dans nos résultats. Cette comparaison nous apparaît intéressante vu le rôle de la Concanavalin A dans le *priming* des phagocytes vers une flambée respiratoire traduite par une activation de la NADPH oxydase conduisant à une production de H₂O₂ (Walz et *al*, 1991).

L'utilisation de la dexaméthasone dans notre étude a permis une réduction des quantités de H₂O₂ produit par les macrophages stimulés *in vitro* par le venin d'Aah ou la toxine Aah II, mais à un degré moindre en comparaison avec les taux de H₂O₂ mesurés après l'immunothérapie *in vitro*. En effet, la dexaméthasone est un médicament qui peut inhiber la production de TNF- α et par conséquent inhiber la capacité à stimuler la synthèse de H₂O₂ (Rahmouni et *al*, 2002). Un déficit dans la production des radicaux libres par les leucocytes ou une baisse de l'activité de myéloperoxydase a été observé lors de la corticothérapie, caractérisée par une sensibilité aux infections (Milane 2004). D'autre part la diminution des

concentrations de H_2O_2 peut réduire la formation des radicaux hydroxyles et par conséquent atténuer les effets délétères causés par les lésions oxydatives (Zhang et *al*, 2008).

La capacité du venin d'*Aah* ainsi que la toxine *Aah* II à stimuler la production de monoxyde d'azote (*NO*) a été également décelée dans cette étude.

L'effet temps dépendant du venin d'*Aah* ou de la toxine *Aah* II sur la production des nitrites par les macrophages stimulés *in vivo* est semblable à celui observé *in vitro* à savoir l'augmentation des taux du *NO*. En effet les valeurs des concentrations des nitrites obtenues *in vivo* se reprochent de celles trouvés *in vitro*, avec des quantités moindres pour les traitements avec la toxine *Aah* II par rapport aux traitements par le venin d'*Aah*. Cette production de nitrites reflète une synthèse du monoxyde d'azote (*NO*) qui est un dérivé de L-arginine via une voie enzymatique contrôlée par *iNOS* (*NO* synthase inductible) qui est à son tour modulée par les cytokines (Nathan et *al*, 1994). La génération de production massive de *NO* par les macrophages activés, peut être responsable non seulement des défenses immunitaires contre les agents pathogènes mais aussi de lésions cellulaires et tissulaires. L'excès du *NO* produit par le macrophage joue un rôle clé dans la réponse inflammatoire (Coleman 2001; Malyshev et shnyra, 2003). Des taux élevés de *NO* produits par les macrophages ont été également retrouvés après 72 h d'incubation des macrophages avec 50 μ g de la fraction FII et/ou la toxine gamma (Ts1) du venin *Tityus serrulatus* (Petricevich et *al*, 2007).

Le *NO* est connu pour être impliqué dans plusieurs réactions biologiques importantes y compris les transitions des ions métalliques, les thiols, et les formes redox de l'oxygène (Stamler et *al*, 1992). *In vivo*, il joue également le rôle d'un neurotransmetteur. Il intervient dans la régulation du système immunitaire (Han et *al*, 2001).

D'autre part des études expérimentales menées pour la compréhension des modes de régulation de l'expression des gènes *iNOS* au niveau des macrophages RAW.264.7 stimulés par le LPS ont suggéré que le H_2O_2 produit par ces cellules, participe à la régulation positive de l'expression des gènes *iNOS* via l'activation de NF-kappa B et que le *NO* inhibe l'expression des protéines *iNOS* par un mécanisme *feed back* négatif (Han et *al*, 2001). Les résultats rapportés par Petricevich (2002) ont montré une corrélation évidente entre le H_2O_2 et le *NO* produits par les macrophages stimulés par le venin de *Tityus serrulatus*. L'effet

stimulateur de la production accrue d' H_2O_2 et le NO a été également observé dans l'interaction des macrophages péritonéaux résidents avec le venin de serpent *Crotalus durissus terrificus* qui mène ces macrophages à un état d'activation (Sampaio et al, 2001). En effet plusieurs donneurs d'électrons cytosoliques comme le NADPH, dinucléotide adénine flavine (FAD), mononucléotide flavine, et le glutathione sont impliqués dans l'activité d'iNOS (Jorens et al, 1995; Albina et al, 1993; Corraliza, 1993). L'induction de la synthèse du NO survient en parallèle avec l'augmentation de l'explosion oxydative et la peroxidation lipidique (Ayub et al, 2003).

En outre, l'effet du NO sur la modulation de la réponse inflammatoire dépend de ses concentrations. Le NO semble exercer un effet anti-inflammatoire quand sa production est faible, cependant il peut être pro inflammatoire quand sa concentration est élevée comme dans le cas des macrophages stimulés par le LPS (Grisham et al, 1999). Cependant une production non contrôlée de NO par les macrophages peut induire leur autolyse, dans ce cas le NO rentre en compétition avec l'oxygène pour se lier avec le cytochrome oxydase en créant un collapsus au niveau de la chaîne du transport des électrons des mitochondries (Khan et al, 1997).

L'implication du NO dans l'envenimation scorpionique sévère chez des enfants a été révélée au niveau des tissus (Meki et Mohey El-Dean, 1998). En revanche une étude récente a montré qu'après utilisation d'un inhibiteur de NOS, il y'a eu une aggravation des symptômes due a une envenimation expérimentale par la fraction FG50 du venin d'*Aah* avec une diminution de la DL_{50} , cela a été argumentée par le faite que la libération du NO n'intervienne pas dans la toxicité du venin, d'autant plus que la libération du NO participe à la vasodilatation qui compense l'effet des catécholamines pour l'augmentation de la pression artérielle (Dousset et al, 2005).

Dans le but d'élucider l'effet du venin d'*Aah* ou de la toxine *Aah* II sur la production de NO par les macrophages, nous avons testé *in vivo* et *in vitro* l'effet de l'immunothérapie sur cette production. La diminution de la production de nitrites *in vivo* à un temps donné, pourrait être expliquée par la neutralisation des toxines du venin par les anticorps administrés par voie intrapéritonéale, bien que cette neutralisation est le plus souvent partielle, cela est probablement du à la différence des caractéristiques pharmacocinétiques entre le venin d'*Aah*

ou la toxine *Aah* II et les fragments F (ab')₂ (Rivière et *al*, 1997; Ismail, 1995). Ainsi, le venin ou la toxine réabsorbé(e) au niveau des tissus avant l'arrivée des l'antisérum induit une action directe sur les médiateurs de l'inflammation et par conséquent une production de NO.

Par ailleurs la neutralisation des toxines *Aah* II *in vitro* par leurs anticorps spécifiques est presque totale, démontrant ainsi l'efficacité de ce traitement spécifique dans le maintien des concentrations physiologiques de NO. Néanmoins l'effet neutralisant des fragments F(ab')₂ *in vitro* est similaire à celui observé *in vivo* concernant la production des nitrites, ceci nécessite une exploration précise du mécanisme d'action de ses fragments d'anticorps sur les récepteurs des macrophages.

Le dosage de MDA dans notre modèle expérimental, montre que l'addition du venin d'*Aah* ou de la toxine *Aah* II, dans le milieu de culture de macrophages induit une élévation très importante des quantités de celui-ci dans les surnageants de cultures, dénotant une forte peroxidation des lipides membranaires. Cette forte peroxidation est due à une grande dismutation des O₂⁻, une des formes actives de l'oxygène (Baisak et *al*, 1994). En effet d'autres travaux rapportent que la peroxidation lipidique est l'un des mécanismes majeurs causés par le H₂O₂ (Yang et *al*, 1999). Cette explication serait en faveur des résultats obtenus dans cette étude concernant la relation entre la cytotoxicité des macrophages par le venin d'*Aah* ou la toxine *Aah* II, la production de H₂O₂ et l'induction de la peroxidation lipidique.

La diminution de la peroxidation lipidique au niveau des macrophages suite à l'addition *in vitro* des fragments F (ab')₂ anti Ftox G50 *Aah* traduit une diminution des effets oxydatifs du venin d'*Aah*, grâce à l'interaction *in vitro* entre l'épitope de l'antigène (le venin d'*Aah*) et le paratope de l'anticorps (fragments F (ab')₂), ce qui a permis d'éviter ou de réduire les dégâts occasionnés par le stress oxydatif. Tandis que l'apport des anticorps spécifiques anti-*Aah* II dans le milieu de culture des macrophages a permis une neutralisation partielle de l'effet *in vitro* de la toxine *Aah* II sur la peroxidation lipidique, ce qui est probablement lié à des interférences dans le milieu de culture des macrophages.

Les taux de MDA sont également élevés au niveau des macrophages après leur stimulation *in vivo* par une dose sublétales du venin d'*Aah* ou par la toxine *Aah* II surtout après 24 h d'envenimation. La présence des concentrations élevées en MDA, est un indicateur direct de la peroxidation ou bien la destruction des lipides membranaires des macrophages

probablement lié à un excès des radicaux libres au niveau des macrophages de la cavité péritonéale et qui est associée indirectement à une faible activité enzymatique antioxydante. Beaucoup de travaux ont montré que la peroxidation lipidique dans les macrophages péritonéaux est l'une des conséquences de stress oxydatif, et qui peut être causée par une variété de stimulus endogènes (IFN- γ) ou exogènes (LPS et xénobiotiques comme l'endosulfane) (Smith et *al*, 2001 ; Ayub et *al*, 2003). Des études sur les venins de scorpions d'*Aah* et de *Leiurus quinquestriatus* ont montré leur effet cytotoxique via la génération des taux élevés de radicaux libres et leur implication dans la destruction des biomembranes par peroxidation lipidique au niveau de plusieurs organes et tissus (Dousset et *al*, 2005 ; Fatani et *al*, 2006).

La génération de la peroxidation lipidique est moins importante après immunothérapie *in vivo* avec les fragment F(ab')₂ anti F_{tox} G50 *Aah*. Cependant l'efficacité de ce traitement est probablement limitée par sa faible biodisponibilité. Par ailleurs le traitement *in vivo* avec les anticorps anti-*Aah* II, présente une capacité neutralisante au niveau des macrophages démontrant ainsi son efficacité dans la prévention de la peroxydation lipidique qui peut être induite par les toxines *Aah* II.

Au cours de cette étude, nous nous sommes intéressés à évaluer l'activité antioxydante à travers le dosage de glutathione réduit (GSH) dans les macrophages stimulés *in vivo* ou *in vitro* par le venin d'*Aah* ou la toxine *Aah* II.

En effet, dans les conditions expérimentales *in vivo* et *in vitro*, le venin d'*Aah* ainsi que la toxine *Aah* II ont présenté une capacité à diminuer le taux intracellulaire du GSH montrant ainsi une diminution de l'activité antioxydante, avec des quantités et cinétiques différentes. Cette baisse des quantités de GSH est un indice de surconsommation de cette molécule pendant le stress oxydatif. Elle peut être expliquée par la peroxidation lipidiques des lipides membranaires des macrophages induite par la production importante des ROS.

Le rôle du GSH est connu dans l'homéostasie cellulaire par le piégeage des radicaux libres, conduisant ainsi à un maintien de la balance entre la production et la suppression des ROS endogènes et autres pro-oxydants (Di Giulio et *al*, 1995; Livingstone, 2001; Correia et *al*, 2003).

En tenant compte des résultats précédents concernant la cinétique de production des ROS tel que le H_2O_2 , le NO, la cytotoxicité et la génération de la peroxydation lipidique au niveau des macrophages qui interagissent *in vivo* ou *in vitro* avec le venin d'*Aah*, ou la toxine *Aah* II et leur corrélation avec les résultats de la cinétique du GSH, nous pouvons suggérer que le stress oxydatif observé à un temps donné est probablement lié à un déficit en GSH.

Plusieurs xénobiotiques ont démontré leur effet dans l'épuisement de GSH intracellulaire qui cause la génération des radicaux libres, tels que l'alloxane qui induit le diabète, et dans le cas de la toxicité par l'aluminium (Abd El-Fattah et al, 1998).

L'immunothérapie, testée *in vivo* et *in vitro* dans notre étude a démontré une certaine efficacité dans l'envenimation scorpionique par son aptitude à maintenir le taux intracellulaire de GSH dans une situation physiologique proche à la normale.

Par ailleurs Fatani et ses collaborateurs (2006) ont montré l'effet antioxydant des extraits de *Gingko biloba* et un inhibiteur de protéases dans l'amélioration des dommages cellulaires causés par le venin de scorpion *Leiurus quinquestriatus*.

L'étude de la réponse cytokinique a été également abordée dans notre étude vu l'importance de ces médiateurs en tant qu'éléments clés à la compréhension de la physiopathologie de l'envenimation scorpionique.

La production des cytokines pro- et anti-inflammatoires est strictement contrôlée par un mécanisme *feed back* (Van Dissel et al, 1998 ; Taniguachi et al, 1999). Cependant, tout dérèglement dans la production de ces protéines peut avoir des conséquences graves engendrant le dysfonctionnement de plusieurs organes, et la mort (Stein et al, 1996).

Le suivi de la cinétique de production des cytokines dans les surnageants de cultures des macrophages stimulés *in vivo* par le venin d'*Aah*, a montré que IL-12 présente un maximum de production après 24 h d'envenimation tandis que les cytokines qui présentent un pic à 2 h après l'injection de la toxine *Aah* II sont le TNF- α et l'IL-10. Les cytokines IL-1 β , IL-6, et TNF- α exercent un effet pro-inflammatoire (Akira et al, 1990; Beutler et al, 1995; Dinarello et al, 1991). Le TNF- α possède un large spectre d'activités biologiques et qui contribue probablement à une réponse inflammatoire systémique chez les souris envenimées (Petricevich et al, 2004).

Le TNF- α est rapidement produit par les macrophages ~~réponse~~ à un stimulus inflammatoire généré après une lésion tissulaire. En outre il favorise l'accumulation des phagocytes vers les sites lésés. Le TNF- α stimule ces cellules à produire des oxydants cytotoxiques tels que le NO, les anions superoxydes et le peroxyde d'hydrogène (Larrik et Wright, 1990).

En revanche l'IL-10 est une cytokine pleiotropique, connue par ses activités inhibitrices de plusieurs fonctions immunitaires, en effet elle exerce des actions anti-inflammatoires sur les macrophages et les cellules dendritiques par la suppression de la production des cytokines inflammatoires comme le TNF- α , IL-1 et IL-6 (Cruz et al, 2005).

L'IL-6 est un inducteur de la synthèse des protéines de la phase aigue, elle joue un rôle dans l'augmentation du potentiel cytotoxique des neutrophiles (Johansson et al, 1979), cependant il peut être considéré comme une cytokine anti-inflammatoire (Marie et Cavaillon, 1997).

Les macrophages péritonéaux traités *in vivo* par la toxine *Aah* II pendant 48 h sont capables d'induire la sécrétion d'IFN- γ . En effet l'IFN- γ , active le macrophage à produire les molécules intermédiaires d'azote, et cette production est inhibée par l'IL-4 et l'IL-10 (Seyler et al, 1997; Otsuka et al, 2005). Ceci peut expliquer l'inhibition ou la faible production de NO, qui a caractérisée le traitement *in vivo* des macrophages par le venin d'*Aah* ou la toxine *Aah* II pendant 2 h et 24 h. En activant les macrophages, l'IFN- γ est responsable de la régulation positive des métabolites d'oxygène toxiques (Murray et al, 1985).

D'autres travaux ont montré l'implication des kinines dans le processus inflammatoire de l'envenimation, par l'induction des cytokines pro-inflammatoires (Fukuhara et al, 2001).

L'exposition *in vitro* des macrophages au venin d'*Aah* pendant 72 h d'incubation a permis l'induction d'IFN- γ accompagnée de la production élevée de TNF- α et de NO. Ces mêmes médiateurs (sauf le TNF- α) ont été induits fortement à 72 h chez les macrophages par le venin de *Tityus serrulatus* (Petricevich et Lebrun, 2004). Le TNF- α semble permettre l'activation autocrine des macrophages. En effet le TNF- α et l'IFN- γ sont des activateurs puissants d'iNOS (Flesch et al, 1993; Gazzinelli et al, 1992).

La diminution de taux de TNF- α après 24 h d'exposition *in vitro* des macrophages au venin d'*Aah* est due probablement à son inhibition par les cytokines anti-inflammatoires.

La libération accrue d'IL-6 était signalée tardivement dans les surnageants de culture des macrophages traités *in vitro* par le venin d'*Aah*. La production tardive d'IL-6 reflète une production précoce de TNF- α , puisque en agissant en synergie avec l'IL-1 β induit la synthèse d'IL-6 et de son récepteur (Sancéau et *al*, 1991). *In vivo*, l'IL-6 active la différenciation des lymphocytes B et T (Sancéau et *al*, 1991).

La synthèse d'IL-12 par les macrophages exposés *in vivo* à la toxine *Aah* II d'une part et à la stimulation *in vitro* par le venin d'*Aah* ou de la toxine *Aah* II d'autre part est probablement liée à la réponse tardive à l'activation de TLR, qui joue un rôle crucial dans l'immunité adaptative et ce en activant les lymphocytes Th naïves en Th1 (Del Vecchio et *al*, 2007).

Les corticoïdes peuvent jouer un rôle important dans la répression des cytokines pro-inflammatoires mais sans affecter ou augmenter la production des cytokines anti-inflammatoires (Katzung et Lagier, 1998).

En fonction du temps qui s'écoule entre l'injection du venin d'*Aah* ou la toxine *Aah* II et l'évaluation des paramètres (médiateurs cellulaires), le taux de ces activateurs cellulaires ou inhibiteurs peut varier considérablement, cette même remarque a été constatée dans une autre étude lors de la détermination de quelques paramètres après l'injection de la toxine Ts1 du venin *Tityus serrulatus* (Petricevich, 2007). C'est pour cette raison qu'il est important de mesurer et différencier en parallèle les molécules (si possibles les gènes) qui sont impliquées en réseau dans les événements moléculaires suite à l'envenimation scorpionique afin d'avoir une meilleure vision sur les événements secondaires qui surviennent après la reconnaissance des canaux ioniques par les toxines.

L'ensemble de nos résultats montre clairement une induction d'un mécanisme pro-inflammatoire par les macrophages péritonéaux en réponse au venin d'*Aah* et à la toxine *Aah* II. Cependant l'amplitude de cette réponse semble parfois différente entre les deux stimulateurs.

CHAPITRE 4 :

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Chapitre IV : Conclusion et perspectives

Dans cette étude, il a été montré qu'une stimulation réalisée *in vivo* ou *in vitro* à l'aide d'une faible dose de venin d'*Aah* ou de la toxine *Aah* II, a provoqué une réponse inflammatoire par les macrophages. Cette réponse est marquée par une augmentation cinétique de la production des cytokines pro inflammatoires tels que IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ et IL-12. Sous l'effet du venin d'*Aah* ou de sa toxine *Aah* II *in vitro*, la balance de ces cytokines inflammatoire est régulée positivement à 24 h mais tardivement, par IL-10 par son action anti-inflammatoire. La balance pro/anti-inflammatoire est altérée en faveur d'un statut inflammatoire.

Les résultats obtenus ont permis de montrer *in vivo* et *in vitro* que le venin d'*Aah* ou sa toxine *Aah* II activent les macrophages, en provoquant la libération des radicaux libres tels que l'H₂O₂ et le NO.

Il semblerait que le venin d'*Aah* ou sa toxine sont à l'origine d'un stress oxydatif dans l'environnement des macrophages marqué par des teneurs élevées en MDA (marqueur de la peroxidation lipidique) et d'une consommation du GSH (indicateur de l'état du système anti-oxydant). Ces résultats suggèrent que seule la toxine *Aah* II ou bien une synergie entre différents constituant du venin d'*Aah* présente une activité modulatrice des fonctions du macrophage. Les médiateurs libérés par ces cellules interagissent probablement avec d'autres médiateurs d'une manière complexe et pourraient favoriser les désordres physiopathologiques et les dommages tissulaires induits par le venin.

L'immunothérapie administrée *in vivo* et *in vitro* semble moduler cette réponse. *In vitro*, la dexaméthasone a entraîné une réduction de l'inflammation montrée par une diminution de la production de H₂O₂ par les macrophages et de la cytotoxicité du venin d'*Aah* et de sa toxine *Aah* II sur ces cellules.

En perspective de ce travail, il sera intéressant de tester l'effet des différents antioxydants sur les dommages cellulaires provoqués par l'envenimation scorpionique, ce qui pourrait apporter dans le futur de nouveaux protocoles de traitement de l'envenimation scorpionique. La modulation de la réponse inflammatoire aux différents stades de l'envenimation scorpionique reste une voie de recherche thérapeutique. Les cytokines sont des cibles potentielles d'immunomodulation.

La détermination des mécanismes impliqués au niveau cellulaire sera utile pour comprendre les effets physiopathologiques induits lors du syndrome de l'envenimation scorpionique, et ce à fin d'établir une meilleure stratégie thérapeutique pour la prise en charge des personnes envenimés.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Bibliographie

- Abd El-Fattah, A.A., Al-Yousef, H.M., Al-Bekairi, A.M., Al-Sawaf, H.A. (1998). Vitamin E protects the brain against oxidative injury stimulated by excessive aluminum intake. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **46**: 1175-1180.
- Abdel-Haleem, A.H., Meki, A.R., Noaman, H.A., Mohamed, Z.T. (2006). Serum levels of IL-6 and its soluble receptor, TNF- α and chemokine RANTES in scorpion envenomed children : their relation to scorpion envenomation outcome. *Toxicon*. **47**: 437-444.
- Abroug, F., El-Atrous, S., Nouira, S., Hagiga, H., Touzi, N., Bouchoucha, S. (1999). Sérothérapie in scorpion envenomation: a randomised controled trial. *Lancet*. **354**: 906-909.
- Abroug, F., Nouira, S., El-Atrous, S., Besbes, L., Boukef, R., Boussarsar, M., Marghli, S., Eurin, J., Barthelemy, C., El-Ayeb, M., Dellagi, K., Carayon, A. (2003). A canine study of immunotherapy in scorpion envenomation. *Intensive Care Med.* **29**:2266–2276.
- Adi-Bessalem, S., Hammoudi-Triki, D., Laraba-Djebari, F. (2008). Pathophysiological effects of *Androctonus australis hector* scorpion venom: Tissue damages and inflammatory response. *Experimental and Toxicologic Pathology*. **60**: 373-380.
- Akira, S., Hirano, T., Taga, T., Kishimoto, T. (1990). Biology of multifunctional cytokines: IL-6 and related molecules (IL-1 and TNF). *FASEB J.***4**(11): 2860-2867.
- Alami, M., Vacher, H., Bosmans, F., Devaux, C., Rosso, J.P., Bougis, P.E., Tytgat, J., Darbon, H., Martin-Eauclaire, M.F. (2003). Characterization of Amm VIII from *Androctonus mauretanicus mauretanicus*: a new scorpion toxin that discriminates between neuronal and skeletal sodium channels. *Biochem. J.* **375**: 551-560.
- Al-Ashmawy, M.B. (1999). The role of natural antioxidants and synthetic nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the chemoprotection of cancer. *Saudi Pharm. J.* **7**: 1-13.
- Albina, J.E., Cui, S., Mateo, R.B., Reichner, J.S. (1993). Nitric oxide mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages. *J. Immunol.* **150**: 5080-5085.
- Alejandro, G., Cortés Hernando, C., et al. (2004). "Escorpionismo del género *Tityus* en la sierra falconiana y su correlación con la liberación de mediadores inflamatorios y enzimas cardíacas." *Gac. Méd .Caracas*. **112**(2): 131 - 138.
- Ali, S.A., Wang, B., Alam, M., Beck, A., Stoeva, S., Voelter, W., Abbasi, A., Duszenko, M. (2006). Structure activity relationship of an alpha-toxin Bs-Tx28 from scorpion (*Buthus indicus*) venom suggests a new alpha-toxin subfamily. *Arch. Biochem. Biophys.* **445**: 81-94.
- Al-Omar, M.A., Beedham, C., Alsarra, I.A. (2004). Pathological roles of reactive oxygen species and their defense mechanisms. *Saudi Pharm. J.* **12**: 1-18.

Alonso-Magdalena, P., Arguelles, J., Jimenez, N.C., Gonzalez-Pardo, H., Perillan, C., Costales, M., Vijande, M. (2003). Quantitative histochemical assessment of oxidative metabolism in the subfornical organ after partial aortic ligation in rats. *Neuroscience Letters*.**344**: 49-52.

Amaral, C.F.S., Lopes, J.A., Magalhaes, R.A. and Rezende, N.A. (1991). Electrocardiographic, enzymatic and echocardiographic evidence of myocardial damage after *Tityus serrulatus* scorpion poisoning. *Am J Cardiol*.**67**: 655-657.

Amitai, Y. (1998). Clinical manifestations and management of scorpion envenomation. *Public Health Rev*. 26: 257-263.

Arnon, T., Potikha, T., Sher, D., Elazar, M., Mao, W., Tal, T., Bosmans, F., Tytgat, J., Ben-Arie, N., Zlotkin, E. (2005). Bja1: a novel scorpion alpha-toxin selective for insects: a unique pharmacological tool. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* **35** : 187-195.

Aubrey, N., Muzard, J., Juste, M., et Billiard, P. (2006). Anticorps recombinants : vers une nouvelle génération d'antivenins ?. *Journal de la Société de Biologie*. **200** (4), 345-354.

Auerbach, P.S. (1992). Pathologies secondaires à des agents physiques ou à l'environnement. In *Les Urgences : diagnostic et traitement*. Padoue, Piccin, 477-501.

Auger, M and Ross, J.A. (1992). The biology of the macrophage. In *The macrophage*, Lewis, C.E., and McGee J.O'D., Eds. (Oxford: Oxford University Press), pp. 3-74.

Avissar, N., Whitin, J.C., Allen, P.Z. (1989). Plasma selenium-dependent glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem.***2**: 15850-15855.

Ayub, S., Verma, J., Das, N. (2003). Effect of endosulfan and malathion on lipid peroxidation, nitrite and TNF- α release by rat peritoneal macrophages. *International Immunopharmacology*. **3**: 1819–1828.

Baisak, R., Rana, D., Acharya, P.B.B., Kar, M. (1994). Alteration in activities of active oxygen scavenging enzymes of wheat leaves subjected to water stress. *Cell Physiol*. **35**: 489–459.

Bawaskar, H.S., Bawaskar, P.H. (1998). Indian red scorpion envenoming. *Indian J Pediatr*. **3**: 383-391.

Bertazzi, D.T., Assis-Pandochi, A.I., Azzolini, A.E., Talhaferro, V.L., Lazzarini, M., Arantes, E.C. (2003). Effect of *Tityus serrulatus* scorpion venom and its major toxin TsTX-I, on the complement system in vivo. *Toxicon*.**41**:501-508.

Bertazzi, D.T., Assis-Pandochi, A.I., Talhaferro, V.L., Azzolini, A.E.C.S., Crott, L.S.P., Arantes, E.C. (2005). Activation of complement system and leukocyte recruitment by *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Int. Immunopharmacol*.**5**:1077-1084.

- Bertke, E.M and Atkins, J.H. (1961). Effect of *Centruroides sculpturatus* venom upon rat tissue: A histopathological study. *Toxicon*. **2**: 205-209.
- Bessalem, S., Hammoudi-Triki, D., Laraba-Djebbar, F. (2003). Effet de l'immunothérapie sur les modifications métaboliques et histopathologiques après envenimation scorpionique expérimentale. *Bull Soc Pathol Exot*. **96**(2): 110-114
- Bhaumik, G., Srivastava, K.K., Selvamurthy, W., Purkayastha, S.S. (1995). The role of free radicals in cold injuries. *Int. J. Biometeorol*. **38**: 171-175.
- Bone, R.C. (1996). Toward a theory regarding the pathogenesis of the systemic inflammatory response syndrome: What we do and don't know about cytokine regulation. *Crit Care Med*. **24**:163-172.
- Bouaziz, M., Ben Hamida, C., Chelly, H., Rekik, N., Jeddi, H.M. (1996). L'envenimation scorpionique : étude épidémiologique, clinique et éléments de pronostic. In Envenimations. Paris, *Arnette*. 11-35.
- Bouhrel, M.A., Derudas, B., Rigamonti, E., Dievart, R., Brozek, J., Haulon, S et al. (2007). PPAR γ activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell Metab*. **6** (2), 137-143.
- Boyne, A.F., Ellman, G.L. (1972). A methodology for analysis of tissue sulfhydryl components. *Anal Biochem*. **46**: 639-653.
- Broglio, N., Goyffon, M. (1980). Les accidents d'envenimation scorpionique. *Conc Méd*. **38**: 5615-5622.
- Beutler, B. (1995). TNF, immunity and inflammatory disease: lessons of the past decade. *J Investig Med*. **43**: 227-235.
- Bush, S.P. (1999). Envenomation by the scorpion (*Centruroides limbatus*) outside its natural range and recognition of medically important scorpions. *Wilderness Environ Med*. **3**: 161-164.
- Bucarechi, F., Bracatt, E.C., Nogueira, R.J.N., Chavez, A., Zambrone, F.A.D., Fonseca, M.R.C.C., Tourinho, F.S. (1995). Severe scorpion envenomation in children: a comparison study between *Tityus serrulatus* and *Tityus Bahiensis*. *Rev. Inst. Med. Trop*. **37**: 331-336.
- Buettner, G.R., Jurkiewicz, B.A. (1996). Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid. *Radiat Res*. **145**: 532-541.
- Catterall, W.A. (1980). *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol*. **20**: 15-43.

César, A.M.P. (2001). Génération de médiateurs lipidiques inducible par tert-butylhydroperoxyde en hépatocytes de rat. Thèse de Doctorat.

Cestele, S., Qu, Y., Rogers, J., Rochat, H., Scheuer, T., Catterall, W. (1998). *Neuron* **21**: 919-931.

Chaymol, J., Bourillett, F., Roch-Arveiller, M., Hecchle, J. (1973). Action neuromusculaire de trois venins de scorpions Nord-Africains et de deux toxines extraites de l'un d'entre eux. *Toxicon*. 277-282.

Chi, D.S., Qui, M., Krishnaswamy, G., Li, C., Stone, W. (2003). Regulation Of nitric oxide production from macrophages by lipopolysaccharide and catecholamines. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*. **8**: 127-132.

Chipaux, J.P., Goyffon, M. (1998). Venoms, antivenoms and immunotherapy. *Toxicon*. 36 (6): 823-846.

Chiueh, C.C., Rauhala, P. (1999). The redox pathway of S-nitrosoglutathione, Glutathione and nitric oxide in cell to neuron communications. *Free Radic Res*. **31**: 641-650.

Cillard, J. and Cillard, P. (1980). Prooxidant effect of alpha-tocopherol on essential fatty acids in aqueous media. *Ann. Nutr. Aliment*. **34**: 579-591

Claman, H.N. (1972). Corticosteroids and lymphoid cells. *N. Engl. J. Med*. 287-388.

Clark, R.A. Activation of the neutrophil respiratory burst oxidase. (1999). *J Infect Dis*. **179**. Suppl 2: 309-317.

Clot-Faybesse, O. (1999). Relations structure-antigénicité des neurotoxines de scorpion : application à la pathologie de l'envenimement scorpionique. Thèse Doctorat science. Marseille. P 150.

Coffman, R.L., Mosmann, T.R. (1991). CD4 T-cell subsets: regulation of differentiation and function. *Res Immunol*. **142**: 7-79.

Cohen, A.B and Cline, M.J. (1971). The human alveolar macrophage: Isolation, cultivation in vitro, and studies of morphologic and functional characteristics. *The journal of clinical Investigation*. **50** : 1390-1398.

Cohn et al. (1997). Induction of airway mucus production by T helper 2 (Th2) cells: a critical role for interleukin 4 in cell recruitment but not mucus production. *J Exp Med* **186**:1737-1747.

Coleman, J.W. (2001). Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int. Immunopharmacol*. **1**: 1397-1406.

Comhair, S.A., Erzurum, S.C. (2002). Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *Am. J. Physiol.* **283**: 246-255.

Corraliza, I.M., Campo, M.L., Fuentes, J.M., Campos-Portuguez, S., Soler, G. (1993). Parallel induction of nitric oxide and glucose-6-phosphate dehydrogenase in activated bone marrow derived macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* Oct 15. **196**(1):342-347

Correâ, M.M., Sampaio, S.V., Lopez, R.A., Mancuso, L.C., Cunha, O.A.B., Franco, J.J., Giglio, J.R. (1997). Biochemical and histopathological alterations induced in rats by Tityus serrulatus scorpion venom and its major neurotoxin Tityustoxin- I. *Toxicon* **35**: 1053-1067.

Correia, A.D., Costa, M.H., Luis, O.J., and Livingstone, D.R. (2003). Age-related changes in the antioxidant enzyme activities, fatty acid composition and lipid peroxidation in whole body Gammarus locusta (Crustacea: Amphipoda). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **289**: 83-101.

Cross, A., Asher, L., Seguin, M., Yuan, L., Kelly, N., Hammack, C., Sadoff, J., Gemski, P.Jr. (1995). The importance of a lipopolysaccharide-initiated, cytokine-mediated host defense mechanism in mice against extraintestinally invasive Escherichia coli. *J Clin Invest.* **96**: 676-686.

Cruz, A.H, RonaldoZ. Mendonça, R.Z., Petricevich, V.L. (2005). *Crotalus durissus terrificus* venom interferes with morphological, functional, and biochemical changes in murine macrophage. *Mediators of Inflammation.* **6**: 349-359.

Cuzzocrea, S., Riley D.P., Caputi, A.P., and Salvemini, D. (2001). Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol. Rev.* **53**: 135-159.

Daisley, H., Alexander, D., Pitt-Miller, P. (1999). Acute myocarditis following Tityus trinitatis envenoming: morphological and pathophysiological characteristics. *Toxicon.* **37**: 159-165.

De Haro, L. (1999). Animaux toxiques : envenimations et intoxications. In *Intoxications aiguës en réanimation*. Paris, Arnette. 581-610.

De Haro, L. (2000). Intoxications par les animaux. In *Toxicologie clinique*. Paris, Flammarion. 459-473.

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

Del Vecchio, M., Bajetta, E., Canova, S., Lotze, M.T., Wesa, A., Parmiani, G., et al. (2007). Interleukin-12 : biological properties and clinical application. *Clin Cancer Res.* **13** : 4677-4685.

De Matos, I.M., Talvani, A., Rocha, O.O et coll. (2001). Evidence for a role of mast cells in the lung oedema induced by *Tityus serrulatus* venom in rats. *Toxicon*. **39**: 863-867.

Demuth, K., Myara, I., Moatti, N. (1995). Biologie de la cellule endothéliale et athérogenèse. *Ann. Biol. Clin.* **53** : 171-189.

De Roodt, A.R., Garcia, S.I., Salamon, O.D., Segre, L., Dolabja, J.A., Funes, R.F., et al. (2003). Epidemiological and clinical aspects of scorpionism by *Tityus trivittatus* in Argentina. *Toxicon*. **41**: 971–977.

Devaux, C and Rochat, H. (2002). Bases théoriques et expérimentales du traitement des envenimations scorpioniques. *Bull Soc Pathol Exot.* 95, 3, 197-199.

Devaux, C., Jouirou, B., Naceur Krifi, N et Coll. (2004). Quantitative variability in the biodistribution and in toxicokinetic studies of the three main alpha toxins from the *Androctonus australis hector* scorpion venom. *Toxicon*.**43**: 661-669.

Devaux, C., Jouiro, B., Krifi, M.N., Clot-Faybese, O., El Ayeb, M., Rochat, H. (2004). Quantitative variability in the biodistribution and in toxicokinetic studies of the three main alpha toxins from the *Androctonus australis hector* scorpion venom. *Toxicon*. **34**: 661-669.

Devi, CS., Reddy, CN., Devi, S.L., Subrahmanyam, Y.R., Bhatt, H.V., Suvarnakumari, G., et al. (1970). Defibrination syndrome due to scorpion venom poisoning. *B. M. J.* **1**: 345-347.

Di Giulio, R.T., Benson, W.H., Sanders, B.M. and Van Veld, P.A. (1995). Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation and toxicity. In fundamentals of Aquatic Toxicology (ed. G.M. Rand), pp. 523-561. Washington, DC: Taylor and Francis.

Di Giulio, R.T., Behar, J.V., Carlson, D.B., Hasspieler, B.M., and Watso, D.E. (1995). Determinants of species susceptibility to oxidative stress: A comparison of channel catfish and brown bullhead. *Mar. Environ. Res.* **39**: 175-179.

Dinarello, CA. (1991). The proinflammatory cytokines interleukin-1 and tumor necrosis factor and treatment of the septic shock syndrome. *J Infect Dis.* **163**: 1177–1183.

Ding, A.H., Nathan, C.F., Stuehr, D. (1988). Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol.* **141**: 2407-2412.

Dousset, L., Carrega, J.G., Steinberg, O., Clot-Faybese, B., Jouirou, N., Sauze, T., Devaux, Y., Autier, Y., Jammes, M.F., Martin-Eauclaire, R., Guieu. (2005). Evidence that free radical generation occurs during scorpion envenomation. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* **140**: 221–226.

Dröge, W. (2002). Free Radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* **82**: 47-95.

D'Suze, G., Sevcik, C., Ramos, M. (1995). Presence of curarizing polypeptide and pancreatitis-inducing fraction without muscarinic effects in the venom of the Venezuelan scorpions *Tityus discrepans* (Karsch). *Toxicon*. **33**: 333-345.

D'Suze, G., Comellas, A., Pesce, L., Sevcik, C., Sánchez-de León, R. (1999). *Tityus discrepans* venom produces a Respiratory Distress Syndrome in rabbits through and indirect mechanism. *Toxicon*. **37**: 173-180.

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

Dube, P.H., Handley, S.A., Lewis, J., Miller, V.L. (2004). Protective role of interleukin-6 during *Yersinia enterocolitica* infection is mediated through the modulation of inflammatory cytokines. *Infect.Immun.* **72** (6), 3561-3570.

Elatrous, S., Belghith, M., Abroug, F. (1996). Traitement des perturbations cardiocirculatoires de l'envenimation scorpionique. In *Envenimations*. Paris, Arnette. 69-79.

Elatrous, S., Nour, S., Besbes-Ouanes, L., Boussarsar, M., Boukef, R., Marghli, S., Abroug, F. (1999). Dobutamine in severe scorpion envenomation : effects on standard hemodynamics, right ventricular performance, and tissue oxygenation. *Chest*. **3**: 748-753.

El Ayeb, M., Delori, P., Rochat, H. (1983). Immunochemistry of scorpion alpha-toxins: antigenic homologies checked with radioimmunoassays (RIA). *Toxicon*. **21** (5) : 709-716.

El Ayeb, M., Bahraoui, E.M., Granier, C., Rochat, H. (1986). Use of antibodies specific to defined regions of scorpion alpha-toxin to study its interaction with its receptor site on the sodium channel. *Biochemistry*. **25** (21): 6671-6678.

El- Hafny, B and Ghalim, N. (2002). Évolution clinique et taux circulants du venin dans les envenimations scorpioniques au Maroc. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* **95**, 3: 200-204.

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

Fatani, A.J., Al-Zuhair, H.A., Yaquob, H.I., Abdel-Fattah, A.A., El-Sayed, M.I., El-Sayed, F.A. (2006). Protective effects of the antioxidant *Ginkgo biloba* extract and the protease inhibitor aprotinin against *Leiurus quinquestriatus* venom-induced tissue damage in rats. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* **12** (2): 255-275.

Flesh, I.E., Kaufmann, S.H. (1993). Role of cytokines in tuberculosis. *Immunobiology* **189** (34). 316-339.

Fontecilla-Camps, J.C., Almassy, R.J., Suddath, F.L., Bugg, C.E. (1982). The three-dimensional structure of scorpion neurotoxins. *Toxicon*. **20**:1-7.

Fontecilla-Camps, J.C., Habersetzer-Rochat, C., Rochat, H. (1988). Ortho rhombic crystal and the three-dimensional structure of the Potent toxin II from the scorpion *Androctonus australis*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **85**: 7446-7447.

Fong, C.C., Zhang, Y., Zhang, Q., Chi-Hung Tzang, C.H., Fong, W.F., Wu, R.S.S., Yang, M. (2007). Dexamethasone protects RAW 264.7 macrophages from growth arrest and apoptosis induced by H₂O₂ through alteration of gene expression patterns and inhibition of nuclear factor-kappa B (NF-κB) activity. *Toxicology*. **236**: 16–28.

Franke, O.F. (1982). Scorpiones. In *synopsis and classification of living organisms* (Sybil P. Parker,) Mc Graw Book Co., New york. 73 - 75.

Franco, R., Sánchez-Olea, R., Reyes-Reyes, E.M., Panayiotidi, M.I. (2008). Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: Ménage à Trois., *Mutation Research / Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. **12**: 1-78.

Fukahara, Y.D.M, Reis, M.L., Dellalibera-Joviliani, R., Cunha, F.Q.C., Donadi, EA. (2003). Increased levels of IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10 and TNF-α in patients moderately or severely envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. *Toxicon* **41**: 49-55.

Gamaley, I.A., Ksenia, M., Kirpichnikova, K.M., Klyubin, I.V. (1994). Activation of murine macrophages by hydrogen peroxide. *Cell. Signal*. **6**: 949–957.

Gamper, N.S.M., Huber, K., Badawi, F. (2000). Lang-Cell volume-sensitive sodium channels upregulated by glucocorticoids in U937 macrophages. *Pflugers Arch - Eur J Physiol*. **441**: 281-286.

Gaudreault, P. (2000). Qu'est-ce qui m'a piqué ? Un scorpion....*Bulletin d'Information Toxicologique*. **2** : 3-4.

Gazzinelli, R.T., Oswald, I.P., Hieny, S., James, S.L., Sher, A. (1992). The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism in habitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. *Eur. J. Immunol*. **22**(10) : 2501-2506.

González-Sponga, M A. (1996). Guía para identificar los escorpiones en Venezuela. Caracas, Venezuela: *Cuadernos Lagoven*.

Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*. **3** : 23-35.

Gorden, D., Gurevitz, M. (2003). The selectivity of scorpion α-toxins for sodium channel subtypes is determined by subtle variations at the interacting surface. *Toxicon*. **41**: 125-128.

- Gordon, S., Taylor, P.R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol.* 5(12): 953-964. Review.
- Goyffon, M., Vachon, M., Broglia, N. (1982). Epidemiological and clinical characteristics of the scorpion envenomation in Tunisia. *Toxicon.* **20**: 337-344.
- Goyffon, M et Heurtault, J. (1995). La fonction venimeuse. Ed. Masson, 284 p.
- Goyffon, M. (2002). Le scorpionisme. *Rev franç Lab.* **342** : 41- 48.
- Goyffon, M et El-Ayeb, M. (2002). Épidémiologie du scorpionisme. *Infotox* - N°15.
- Goyffon, M et Billiald, P. (2007). Envenimations VI – Le scorpionisme en Afrique. *Med Trop.* **67** : 439- 446.
- Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R. (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* **126** : 131-138.
- Griess, B. (1879). *Dtsch. Chem. Ges.* 124-126.
- Grisham, M.B., Jourdain, D., Wink, D.A. (1999). Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: Implications in inflammation. *Am. J. Physiol.* **276**(2pt1): 315-321.
- Gueron, M and Sofer, S. (1991). Scorpion envenomation (Letter). *Chest.* 100: 883-884.
- Halliwell, B., Aruoma, O.I. (1991). DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett.* **281**: 919.
- Halliwell, B., Clement, M.V., Long, L.H. (2000). Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett.* **486**: 10–13.
- Hammoudi-Triki, D., Ferquel, E., Robbe-Vincent, A et Coll. (2004). Epidemiological data, clinical admission and biological quantification by ELISA of scorpion envenomations in Algeria: effect of immunotherapy. *Trans R soc Trop Med Hyg.* **98**: 240-250.
- Hammoudi-Triki D, Bessalem, S et Laraba-Djebari, F. (2005). Venin d'*Androctonus Australis Hector*: Physiopathologie et immunothérapie. Colloque scientifique du réseau international des instituts Pasteur.
- Hammoudi-Triki, D., Lefort, J., Rougeot, C., Robbe-Vincent, A., Bon, C., Laraba-Djebari, F et al. (2007). Toxicokinetic and Toxicodynamic analyses of *Androctonus australis hector* venom in rats: optimization of antivenom. *Ther. Toxocol. Appl. Pharmacol.* **218**(3): 205-214.

Hampton, M.B., Kettle, A.J., and Winterbourn, C.C. (1998). Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*. **92**: 3007-3017.

Han, Y.J., Kwon, Y.G., Chung, H.T., Lee, S.K., Simmons, R.L., Billiar, T.R., Kim, Y.M. (2001). Antioxidant enzymes suppress nitric oxide production through the inhibition of NF κ -B activation: role of H₂O₂ and nitric oxide in inducible nitric oxide synthase expression in macrophages. *Nitric oxide: Biology and Chemistry*, vol. 5 (5): 504-513.

Harvey, A.L., Anderson, A.J., Braga, M.F.M., Marshall, D.L., Rowan, E.G., Vatanpour, H., Castaneda, O., Karlsson, E. (1992). Toxins affecting neuronal ion channels. In: Gopalakrishnakone, P., Tan C.K. Eds. *Recent advances in toxicology research*. Singapore: National University of Singapore : 59-70.

Herbert, V., Shaw, S., Jayatilak, E. (1996). Vitamin C-driven free radical generation from iron. *J Nutr*. **126**: 1213-1220.

Herbertson, M.J., Werner, H.A., Goddard, C.M, et al. (1995). Anti-tumor necrosis factor-prevents decreased ventricular contractility endotoxemic pigs. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **152** (2):480-488.

Hoffman, M., Weinberg, J.B. (1987). Tumor necrosis factor induces increased hydrogen peroxide production and Fc receptor expression, but not increased antigen expression by peritoneal macrophages. *J. Leuko. Biol*. **42**: 704-707.

Hughes, A.R., Bando, K.J., Rodriguez, L.F., and Williams, S.L. (2004). Relative effects of grazers and nutrients on seagrasses: a meta-analysis approach. *Marine Ecology Progress Series*. **282**: 87-99.

Ismail, M. (1995). The scorpion envenoming syndrome. *Toxicon*. **33**(7): 825-858.

Ismail, M. (1996). The therapeutic controversies in the management of scorpion envenoming. In *Envenimations*. Paris, Arnette. 51-67.

Ismail, M. (2003). Treatment of the scorpion envenoming syndrome: 12 years experience with serotherapy. *Int. J. Antimicrob. Agents*. **21** : 253-261.

Jeddi, H., Benhamida, C., Dammak, J. (1988). Piqûres par Scorpion chez l'homme en Tunisie : étude épidémiologique. *Pub Med Sfax*, vol 1 : 463.

Ji, G.E., Park, S.Y., Wong, S.S., Pestka, J.J. (1998). Modulation of nitric oxide, hydrogen peroxide and cytokine production in a clonal macrophage model by the trichothecene vomitoxin (deoxynivalenol). *Toxicology*. **125**: 203-214.

Jo, T., Terada, N., Takauchi, Y., Nishizawa, Y., Tanaka, S., Kosaka, N. (1995). Cytotoxic actions of cytokines on cultured mouse luteal cells are independent of nitric oxide. *J Steroid Biochem Mol Biol*. **55**: 291-296.

Johansson, S., Rubin, K., Hook, M., Ahlgren, T., Seljelid, R. (1979). In vitro biosynthesis of cold insoluble globulin (fibronectin) by mouse peritoneal macrophages. *FEBS Lett.* **105**(2): 313-316.

Jorens et al. (1995). Modulation of nitric oxide synthase activity in macrophages. *Mediators of Inflamm.* **4**: 75-89.

Katzung, B.G., Lagier, G. (1998). *Pharmacologie fondamentale et clinique*. 7^{ème} édition. Piccin Nuova Libreria, Padoue, 1150p.

Khan, S., Kayahara, M., Joashi, U., Nicholas, D., Mazarakis, N.D., Sarraf, C., Edwards, A.D., Hughes, M.N., Mehmet, H. (1997). Differential induction of apoptosis in Swiss 3T3 cells by nitric oxide and the nitrosonium cation. *Journal of Cell Science.* **110**: 2315-2322.

Khorchid, A., Fragos, G., Shore, G., Almazan, G. (2002). Catecholamine-induced oligodendrocyte cell death in culture is developmentally regulated and involves free radical generation and differential activation of caspase-3. *Glia.* **40**: 283-299.

Kim, H.S., Kang, S.W., Rhee, S.G., Clerch, L.B. (2001). Rat lung peroxiredoxins I and II are differentially regulated during development and by hyperoxia. *Am. J. Physiol.* **280**: 1212-1217.

Kim, Y.M., Billiar, T.R., Lancaster Jr., J.R. (1996). Reactive oxygen and nitrogen metabolites and related enzymes. In Hezenberg, L.A., Weir, D.M., Herzenberg, L.A., Blackwell, C. (Eds.), *Weir's Handbook of Experimental Immunology*, Vol.4. *The Integrated Immune System.* **10**: 171.

Kingsnorth, A. (1997). Role of cytokines and their inhibitors in acute pancreatitis. *Gut.* **40**: 1-4.

Kletzien, R.F., Harris, P.K., Foellmi, L.A. (1994). Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a "housekeeping" enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones, nutrients, and oxidant stress. *FASEB. J.* **8**: 174-181.

Krifi, M.N., El-Ayeb, M., Dellagi, K. (1996). New procedures and parameters for better evaluation of *Androctonus australis Garzonii* (Aag) and *Buthus occitanus tunetanus* (Bot) scorpion envenomations and specific serotherapy treatment. *Toxicon.* **34**: 257-266.

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.

Larrik, J.W., Wright, S.C. (1990). Cytotoxic mechanism of tumor necrosis factor- α . *FASEB. J.* **4**: 3215-3223.

Legros, C., Céard, B., Vacher, H., Marchot, P.T., Bougis, P.E., Martin-Eauclaire, M.F. (2005). Expression of the standard scorpion alpha-toxin AaH II and AaH II mutants leading to the identification of some key bioactive elements. *Biochimica et Biophysica Acta*.**172**: 391–99.

Lemasters, J.J. (2005). Dying at house and deaths: redundant pathways from different suppression / tolerance by depleting immune-competent cells, by organelles to apoptosis and necrosis. *Gastroenterology*. **129**: 351.

Liu, L.H., Bosmans, F., Maertens, C., Zhu,R.H., Wang, D.C., Tytgat, J. (2005). Molecular basis of the mammalian potency of the scorpion alpha like toxin, BmKM1. *Faseb. J.* **19**: 594-596.

Livingstone, D. R. (2001). Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.* **42**: 656-566.

Loret, E and Hammock, B. (2001). Structure and neurotoxicity of venoms. In «*Scorpion Biology and Research*'' P. Brownell and G. A. Polis Eds Oxford, University Press Oxford/NY: 205-233

Lorsbach, R.B., Murphy, W.J., Lowenstein, C.J., Snyder, S.H., Russell, S.W. (1993). Expression of the nitric oxide synthase gene in mouse macrophages activated for tumor cell killing: Molecular basis for the synergy between interferon gamma and lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* **268**: 1908-1913.

Lourenço, W. (1988). Peut-on parler d'une biogéographie du scorpionisme. *C. R. Soc. Biogeor.* **64**: 137–143.

Love, S. (1999). Oxidative stress in brain ischemia. *Brain Pathol.* **9**: 119-131.

Lo Vecchio, F., Welch, S., Klemens, J., Curry, S.C., Thomas, R. (1999). Incidence of immediate and delayed hypersensitivity to *Centruroides* antivenom. *Ann Emerg Med.* **5**: 615-619.

Magalhaes, M.M., Pereira, M.E.S., Amaral, C.F.S., and *al.* (1999). Serum levels of cytokines in patients envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. *Toxicon.* **37**(8): 1155-1164.

Malyshev, I.Y and Shnyra,A.. (2003). Controlled modulation of inflammatory, stress and apoptotic responses in macrophages. *Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metabol. Disord.* **3** : 1–22.

Mantovani, A, Sica, A., Locati, M. (2007). *New vistas on macrophage differentiation and activation.* *Eur J Immunol.* **37**(1): 14-16. Review.

Marie and Cavaillon, J.M. (1997). Le rétrocontrôle négatif de l'inflammation: rôle des cytokines antiinflammatoires, Negative feedback in inflammation: the role of antiinflammatory cytokines. *January-March*, 41-54.

Marletta, M.A., Yoon, P.S., R.Iyengar, R., Leaf, C.D., Wishnok J.S. (1989). *Biochemistry*. **27** : 8706.

Martin-Eauclaire, M.F., Couraud, F. (1994). Scorpion neurotoxins: effects and mechanisms. In : Chang, Dyer (ed.), *Handbook of neuro toxicology*, Basel, Hong-Kong publishers. 683-716.

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

Martin-Eauclaire, M.F., Legros, C., Bougis, P.E., Rochat, H. (1999). Les toxines des venins de scorpion. *Ann. Inst. Past.* **10** (2): 207-222.

Mates, J.M., Perez-Gomez, C., Nunez de Castro, I. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin. Biochem.* **32**: 595-603.

Meister, A. (1995). Glutathione metabolism. *Methods Enzymol* .**251**: 3-7.

Meki, A.R.M.A., Mohey El-Dean, Z.M. (1998). Serum interleukin 1 beta, interleukin 6, nitric oxide and alpha 1 antitrypsin in scorpion envenomed children. *Toxicon*. **12**: 1851–1859.

Michael, J., Parnham, and Werner Englberger, A., Nattermann & Cie. (1985). Regulation of the macrophage oxidative burst by mediators: effects of inhibitors. *Agents and Actions*, vol. **16**: 1-2.

Milane, H. (2004). La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Thèse de Doctorat.

Miranda, F., Kopeyan, C., Rochat, C., Rochat, H and Lissitzkys. (1970). Purification of animal neurotoxins. Isolation and characterization of eleven neurotoxins from the venoms of the scorpions *Androctonus australis hector*, *Buthus occitanus tunetanus* and *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*. *Eur J Biochem.* **16**: 514-523.

Mosser, D. M. (2003). The many faces of macrophage activation. *J. Leukoc. Biol.* **73**: 209-212.

Munck, A., and Leung, K. (1977). Glucocorticoid receptors and mechanisms of action. In *Receptors and Mechanism of Action of Steroid Hormones*, Part II. J. R. Pasqualini, editor. Marcel Dekker, Inc., New York. 311.

Murray, H.W., and spitalny, G.L., and Nathan, C.F. (1985). Activation of mouse peritoneal macrophages in vitro and in vivo by interferon-gamma. *J. Immunol.* **134**: 1619-1622.

Murthy, R.K., Hase, N.K. (1994). Scorpion envenoming and the role of insulin. *Toxicon*. **32**(9): 1041-1044.

- Nathan, C., Xie, Q.W. (1994). Nitric oxide synthesis: roles, tolls and controls. *Cell*. **78**: 915–918.
- North, R.J. (1978). The concept of the activated macrophage. *The Journal of Immunology*. **121**(3): 806-809.
- Nouira, S., Abroug, F., Haguiga, H., Jaafoura, M., Boujdaria, R., Bouchoucha, S. (1995). Right ventricular dysfunction following severe scorpion envenomation. *Chest*. 108: 682–687.
- Nouira, S., Elatrous, S., Besbes, L., Boukef, R., Devaux, C., Aubrey, N., Elayeb, M., and Abroug, F. (2005). Neurohormonal activation in severe scorpion envenomation: correlation with hemodynamics and circulating toxin. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **208**: 111-116.
- Novelli, G.P. (1997). Role of free radicals in septic shock. *J Physiol Pharmacol*. **48**: 517-527.
- Novoa, E., D'Suze, G., Winter, M., Crespo, A., Tortoledo, M.A., Marcano, H., et al. (2003). The indirect effect of *Tityus discrepans* on rabbit pulmonary vasculature. *Resp Physiol Neurobiol*. **134** (1): 33-41.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal-tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analyt. Biochem*. **95**: 351-358.
- Okigaki, M., Davis, C., Falasca, M., Harroch, S., Felsenfeld, D.P., Sheetz, M.P., and Schlessinger, J. (2003). Pyk 2 regulates multiple signaling events crucial for macrophage morphology and migration. 10740- 10745.
- Orrenius, S., Zhivotovsky, B., Nicotera, P. (2003). Regulation of cell death: the calcium-actively resistant to apoptosis and the control of its cell death apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **4**: 552.
- Osman, O.H., Ismail, M., Wenger, T. (1973). Hyperthermie response to intraventricular injection of scorpion venom: role of brain mononmines. *Toxicon*. **11**: 361-368.
- Osnaya romero, N. De Jesus Medina Hernandez, T., Flores-Hernandez, S.S., Leon-Rojas, G. (2001). Clinical symptoms observed in children envenomed by scorpion stings, at the children's hospital from the state of Morelos, Mexico. *Toxicon* **39**: 781-785.
- Otsuka, M., Ambiru, S., Uruyuhara, K., Herman, P., Talpe, S., Dehoux, J.P., Jamar, F., Gianello, P. (2005). Early biological and immune response to semi-identical liver or kidney allograft in miniatura swine. *Transplant. Int*. **18**(1): 7888.
- Petricевич, V.L. (2002). Effect of *Tityus serrulatus* venom on cytokine production and the activity of murine macrophages. *Mediators of Inflammation*. **11**: 23–31.

Petricevich, V.L. (2004). Cytokine and nitric oxide production following severe envenomation. *Curr. Drug Targets Inamm. Allergy*. **3** (3). 325-332.

Petricevich, V.L and Lebrun, I. (2005). Immunomodulatory effects of the *Tityus serrulatus* venom on murine macrophage functions in vitro. *Mediators of Inflammation*. **1**: 39-49.

Petricevich, V.L. (2006). Balance between pro-and anti-inflammatory cytokines in mice treated with *Centruroides noxius* scorpion venom. *Mediators of Inflammation*. **10**: 1-11.

Petricevich, V.L., Cruz, A.H., Coronas, F.I.V., Possani, L.D. (2007). Toxin gamma from *Tityus serrulatus* scorpion venom plays an essential role in immunomodulation of macrophages. *Toxicon* .**50**: 666-675.

Peytel, E., Goyffon, M. (1999). Scorpionisme. In SAISSY JM- Urgences et réanimation en milieu militaire. Vol 1, Arnette. Ed, Rueil Malmaison. 363-379.

Pick, E.; Mizel, D. (1981). Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. *Journal of Immunological Methods*, vol. **46**: 211-226.

Pincemail, J., Meurisse, M., Limet, R., Defraigne, J.O. (1999). L'évaluation du stress oxydatif d'un individu : une réalité pour le médecin. *Vaisseaux, Cœur, Poumon*. **4**: 148-154.

Polis G.A., Sissom, W.D. (1990). Life History. In "Biology of Scorpions" G. Polis ed. *Stanford University Press. Stanford*: 161 - 223.

Possani, D.B., Delepierre, M., Tytgat, J. (1999). Scorpion toxins specific for channels. *Eu J of Biochemistry*. **264**(2): 287.

Possani L.-D. (2000). Antivenom for scorpion sting. *Lancet*. **355** :67-68.

Rahmouni, K., Haynes, W.G., Morgan, D.A., Mark, A.L. (2002). Selective resistance to central neural administration of leptin in agouti obese mice. *Hypertension*. **39**: 486-490.

Ramanaiah, M., Venkaiah, B. (1992). *Biochem. Int*. **26**:113.

Rawlingson, A. (2003). Nitric oxide, inflammation and acute burn injury. **29** (7): 631-640.

Reis, D.S., Souza, M.A., Mineo, J.R., Espindola, F.S. (2001). Myosin V and iNOS expression is enhanced in J774 murine macrophages treated with IFN- γ . *Brazilian Journal of Medical Biological Research*. **34**: 221–226.

Rhalem, N., Elhaddoury, M., Saidi, N., Chajii, Y., Kettani, S., Alaoui, I. (1998). Oedème aigu du poumon secondaire à l'envenimation scorpionique: A propos d'un cas. *Médecine du Maghreb*. **871** : 33-36.

- Rimbach, G., Park, Y.C., Guo, Q., Moini, H., Qureshi, N., Saliou, C., Takayama, K., Virgili, F., Packer, L. (2000). Nitric oxide synthesis and TNF- α secretion in Raw 264.7 macrophages: mode of action of a fermented papaya preparation . *Life Science*. **67**: 679–694.
- Rivière, G., Choumet, V., Audebert, V., Saboraud, A., Debray, M., Scherrmann, J.M., Bon, C. (1997). Effect of antivenom on venom pharmacokinetics in experimentally envenomed rabbits: toward an optimization of antivenom therapy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **281**: 1-8.
- Rochat, H., Bernard, P and Couraud, F. (1979). Scorpion toxins: chemis-try and mode of action. *Adv Cytopharmacol.* **3**: 325-334.
- Rodriguez de la Vega, R.C., Possani, L.D. (2005). Overview of scorpion toxins specific for Na⁺ Channels and related Peptides: biodiversity, structure- function relationships and evolution. *Toxicon*. **46**: 831-844.
- Roitt, I., Brostoff, J., Male, D. (1999). *Imunologie*. Ed. Manole .Ltda. 5 ed. P 423.
- Rossi, M.A., Ferreira, A.L. and Paiva, S.M. (1974). Fine structure of pulmonary changes induced by Brazilian csorpion venom. *Arch. Path.* **97**: 284-288.
- Ryu, J.H., Ahn, H., Kim, J.Y., Kim,Y.K. (2003). Inhibitory activity of plant extracts on nitric oxide synthesis in LPS-activated macrophages. *Phytotherapy Research*. **17**: 485–489.
- Sanceau, J., Wijdenes, J., Revel, M and Wietzerbin J. (1991). IL-6 and IL-6 receptor modulation by IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha in human monocytic cell line (THP-1). Priming effect of IFN-gamma. *J Immunol.* **147**(8): 2630-2637.
- Sampaio, S.C., Sousa-e-Silva, M. C. C., Borelli, P., Curi, R., and Cury, Y. (2001). *Crotalus durissus terricus* snake venom regulates Macrophage metabolism and function. *J. Leukoc. Biol.* **70**: 551-558.
- Seyler, I., Appel, M., Devissaguet, J.P., Legrand, P., Barratt, G. (1997). Modulation of nitric oxide production in RAW264.7 cells by transforming growth factor beta and interleukin-10: differential effects on free and encapsulated immunomodulator. *J. Leuk. Biol.* **62** (3): 374-380.
- Shaffer, J.B., Treanor, C.P., Del Vecchio, P.J. (1990). Expression of bovine and mouse endothelial cell antioxidant enzymes following TNF- α exposure. *Free Radic.Biol. Med.* **8**: 497-502.
- Shimizu, F., Shimizu, M., and Kamiyama, K. (1984). Inhibitory Effect of Interferon on the Production of Insulin. *Endocrinology*. **117**(5): 2081-2084 .
- Singal, P.K., Petkau, A., Gerrard, J.M. Free Radicals in health and disease. (1988). *Mol. Cell. Biochem.* 121-122.

- Smith, P.D., Smythies, L.E., Wahl, S.M. (2001). Cytokine effector activities of macrophages. In: Rich, R.R., Fleisher, T.A., Shearer, W.T., Kotzin, B.L., Schroeder, H.W., editors. *Clinical immunology: principal and practice*. London: MosbyInt. p. 260–98.
- Sofer, S., Shahak, E., Slonim, A., Gueron, M. (1991). Myocardial injury without heart failure following envenomation by the scorpion *Leiurus quinquestriatus* in children. *Toxicon*. **29**: 382-385.
- Sofer, S. (1995). Scorpion envenomation. *Intensive Care Medicine*. **21**(8): 626-628.
- Sofer, S., Gueron, M., White, R.M., Lifshitz, M., Apte, R.N. (1996). Interleukin 6 release following scorpion sting in children. *Toxicon*. **34**: 389-392.
- Srairi, N., Kharrat, R., El Ayeb, M. (2002). Données biochimiques et pharmacologiques des venins de scorpions. *Infotox*. N°15.
- Stamler, JS., Singel, D.J., Loscalzo, J. (1992). Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science*. **258**: 1898–1902.
- Stein, M., S. Gordon. (1991). Regulation of tumor necrosis factor (TNF) release by murine peritoneal macrophages: role of cell stimulation and specific phagocytic plasma membrane receptors. *Eur. J. Immunol*. **21**:431.
- Stein, P.C., Pham, H., Ito, T and Parsons, C.L. (1996). Bladder injury model induced in rats by exposure to protamine sulfate followed by bacterial endotoxin. *J Urol*. **155**: 1133-1137.
- Taniguchi, M et al. (1999). High expression of alternative transcript of granzyme M in the mouse retina. *Neuroscience Research*. **34**(2): 115-123.
- Tejedor, F.J., Catterall, W.A. (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **85**: 8742-8746.
- Theakston, R.D., Warrell, D.A., Griffiths, E. (2003). Report of WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. *Toxicon*. **41**: 541-557.
- Thomsen, W.J., Catterall, W.A. (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **86**: 10161-10165.
- Tsikas, D. (2007). Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: Appraisal of the Griess reaction in the l-arginine/nitric oxide area. *research Journal of Chromatography B*. 85151–85170.
- Van Dissel, J.T., Van Langevelde, P., Westendorp, R.G., Kwappenberg, K., Frolich, M. (1998). Anti-inflammatory profile and mortality in febrile patients. *Lancet*. **351** (9107). 950-953.

Walz, A., Meloni, F., Clark-Lewis, I., Tschärner, V.V., and Baggiolini, M. (1991). [Ca²⁺] Changes and Respiratory Burst in Human Neutrophils and Monocytes Induced by NAP-1/Interleukin-8, NAP-2, and gro/MGSA. *Journal of Leukocyte Biology*. **50**: 279-286.

Wong, G.H., Goeddel, D.V. (1988). Induction of manganous superoxide dismutase by tumor necrosis factor: possible protective mechanism. *Science*. **242**: 941-944.

Werb, Z., Foley, R., and Munck, A. (1978). Interaction of glucocorticoids with macrophages: Identification of Glucocorticoid Receptors in Monocytes and Macrophages. *J. Exp. Med.* The Rockefeller University Press.

Wink, D.A. and Mitchell, J.B. (1998). Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med*. **25**: 434-56.

Wood, Z.A., Schroder, E., Robin, H.J., AND Pool, L.B. (2003). Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *TRENDS BIOCHEM.Sci*. **28**: 32-40.

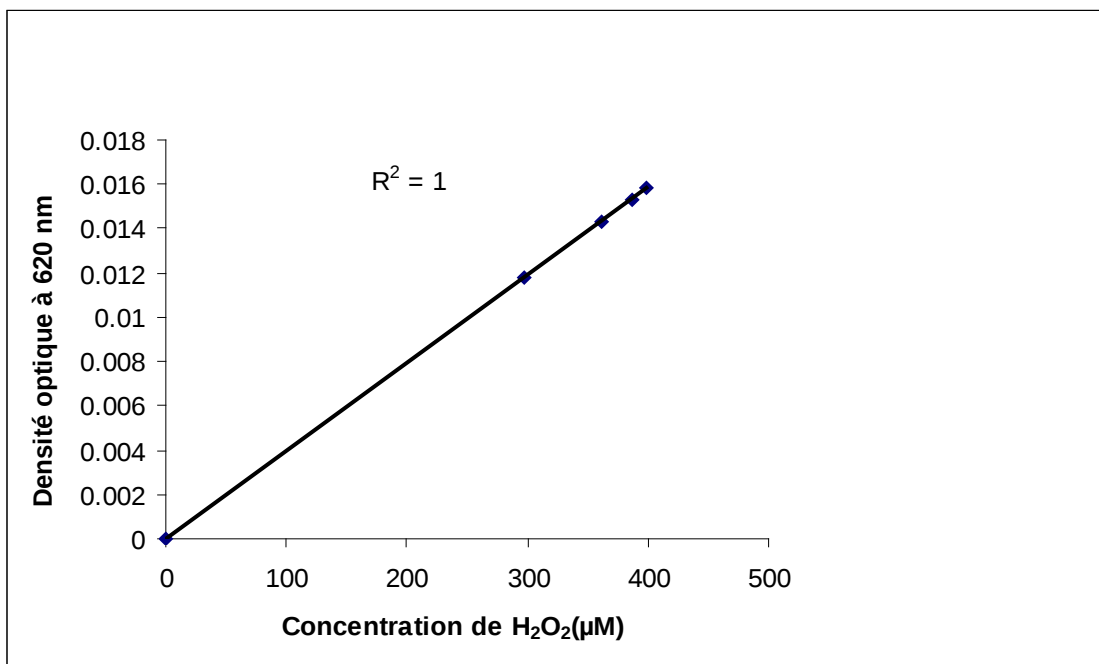
Xie, Q.W., Cho, H.J., Calaycay, J., Mumford, R.A., Swiderek, K.M., Lee, T., Ding, A., Troso, T., Nathan, C. (1992). Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science*. **256**: 225-228.

Yang, C.F., Shen, H.M., Ong, C.N. (1999). Protective effect of ebselen against hydrogen peroxide induced cytotoxicity and DNA damage in HepG2 cells. *Biochem. Pharmacol*. **57**: 273-279.

Zeghal, K., Sahnoun, Z., Guinot, M., Richer, C., Giudicelli, J.F. (2000). Characterization and mechanisms of the cardiovascular and haemodynamic alterations induced by scorpion venom in rats. *Fundam. Clin. Pharmacol*. **14**: 351-361.

Zhang, R., Ah Kang, K., Piao, M.J., Maeng, Y.H., Lee, K.H., Chang, W.Y., You, H.J., Kim, J.S., Kang, S.S., Hyun, J.W. (2009). Cellular protection of morin against the oxidative Stress induced by hydrogen peroxide. *Chemico Biological Interactions*. **177**: 21-27.

Annexe 1: Courbe étalon de peroxyde d'hydrogène.



Annexe 2: Courbe étalon des nitrites

