

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE**  
**SCIENTIFIQUE**

**Université Blida 1**



**Faculté des Sciences De La Nature Et De La Vie**  
**Département de Biologie et Physiologie Cellulaire**

**Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention d'un diplôme de Master en :**  
**Sciences De La Nature Et De La Vie**  
**Spécialité : Biosignalisation Cellulaire et Moléculaire, Immunologie**

**Thème**



**Contribution à la recherche d'un effet immunomodulateur**  
**de la Ciclosporine sur la réponse immunitaire induite**  
**par le venin du scorpion *Androctonus australis hector***



**Présenté par : M<sup>lle</sup> KERRI Sabrina**

**Soutenue le 02/07/2016 devant le jury composé de :**

<b>M<sup>me</sup> Rahim I.</b>	<b>MAA (Blida1)</b>	<b>Présidente</b>
<b>M<sup>me</sup> Saadi L.</b>	<b>MCA (Blida1)</b>	<b>Examinatrice</b>
<b>M<sup>me</sup> Zerouti K.</b>	<b>MAB (Blida1)</b>	<b>Promotrice</b>
<b>M<sup>me</sup> Hammoudi-Triki D.</b>	<b>Professeur (USTHB)</b>	<b>Co-Promotrice</b>

**Promotion 2015 / 2016**

## Remerciements

Au terme de ce travail, réalisé au sein du laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire de la Faculté des Science Biologique de l'USTHB, je tiens à exprimer mes sincères remerciements à :

M<sup>me</sup> Laraba-Djebari F. Professeur à la Faculté des Sciences Biologiques à l'USTHB, de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire « Biochimie et Immunologie » durant la période du stage. Veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude.

M<sup>me</sup> Hammoudi Triki D. Professeur à la Faculté des Sciences Biologiques à l'USTHB, ma co-promotrice, je vous remercie pour l'honneur et la confiance que vous m'avez accordée en me confiant la réalisation de ce travail. Je tiens à vous énoncer mon éternelle gratitude et mon infinie reconnaissance. Je vous prie de trouver ici mon profond respect et ma haute considération.

M<sup>me</sup> ZEROUTI K., ma promotrice, je tiens à lui exprimer ma grande reconnaissance pour ses précieux conseils durant le stage, sa grande disponibilité, sa sympathie et sa bonté. Je tiens à lui manifester mon respect et mon estime à son égard. Veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude. J'espère être à la hauteur de vos attentes.

M<sup>me</sup> Saadi L. Maître de conférence à l'université BLIDA1, le chef du département de BPC et notre chef d'option « BCMI », pour vos précieux conseils et orientations durant notre cursus ainsi que de m'avoir honoré en acceptant d'examiner mon travail et de siéger parmi les membres du jury. Veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance et de mon respect les plus sincères.

M<sup>me</sup> RAHIM I. pour l'honneur qu'elle me fait, en acceptant de présider le jury et pour sa compréhension et sa patience. Veuillez trouver ici, l'expression de mon respect et de ma reconnaissance.

M<sup>lle</sup> NEGAB I. Chef du département de Pharmaco-Toxicologie de la filiale Antibiotical-Medea de SAIDAL, je tiens à lui exprimer mon infinie gratitude et remerciements pour sa disponibilité, ses conseils, ses encouragements, son grand cœur et pour la merveilleuse personne qu'elle est. J'espère avoir pu lui démontré ma gratitude par ce travail.

M<sup>lle</sup> KADACHE, M<sup>lle</sup> KHEMILI et M<sup>lle</sup> SAIDI, pour leur gentillesse, leur disponibilité et leur confiance, ainsi que M<sup>lle</sup> HIRECHE pour sa disponibilité et sa patience. Veuillez trouver ici l'expression de ma grande reconnaissance.

M<sup>r</sup> BOUNAAMA H. et M<sup>lle</sup> ALLIOUA Z. pour leur aide et leurs précieux conseils.

En dernier lieu, je tiens à remercier toutes les personnes ayant contribué à la réalisation de ce mémoire.



*Je dédie ce modeste travail*

*A mes très très chers parents*

*Ma sœur Soumeya et mes frères Cherif et Sofienne*

*Ma Tata adorée, ma grand-mère et mes oncles*

*Mes adorables cousines Zahra, Ania et Selma*

*Mes très chers amis Sabiha, Aymen, Chawki*

*A Abdelkader*

*Et aux braves souris sacrifiées pour la science.*



## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Le scorpion <i>Androctonus australis Hector</i> à l'âge adulte	4
<b>Figure 2.</b> Activation des cellules immunitaires par le venin de scorpions	10
<b>Figure 3.</b> Polarisation des Lymphocytes T	15
<b>Figure 4.</b> Effet de la Ciclosporine sur les Lymphocytes T	18
<b>Figure 5.</b> Démarche expérimentale	22
<b>Figure 6.</b> Effet de la ciclosporine sur la migration des leucocytes vers le sang périphérique induite par le venin et sa fraction toxique	29
<b>Figure 7.</b> Effet de la ciclosporine sur la dégranulation des polynucléaires neutrophiles induite par le venin et sa fraction toxique au niveau sérique	32
<b>Figure 8.</b> Effet de la ciclosporine sur la dégranulation des polynucléaires neutrophiles induite par le venin et sa fraction toxique au niveau des surnageants d'organes	33
<b>Figure 9.</b> Effet de la ciclosporine sur la dégranulation des polynucléaires éosinophiles induite par le venin au niveau sérique	35
<b>Figure 10.</b> Effet de la ciclosporine sur la dégranulation des polynucléaires éosinophiles induite par le venin au niveau des surnageants d'organe	36
<b>Figure 11.</b> Effet de la ciclosporine sur la production du NO au cours de la réponse immunitaire induite par le venin et sa fraction toxique	39
<b>Figure 12.</b> Effet de la ciclosporine sur la production du MDA au cours de la réponse immunitaire induite par le venin et sa fraction toxique	41
<b>Figure 13.</b> Effet de la ciclosporine sur le taux des protéines sériques suite à l'injection de venin et la fraction Ftox G50	42
<b>Figure 14.</b> Coupes histologiques de parenchymes pulmonaires	45

## Liste des abréviations

Aah	<i>Androctonus australis Hector</i>
C(n)	Facteur n du complément
CD	Cluster of Differentiation
CLP	Common Lymphoid Progenitor
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigène
CPK	Créatine Phosphokinase
CXC	Cysteine X Cysteine
Cyc A	Ciclosporine A
E2A	E-box factor 2 A
EBF	Early B Cell Factor
EPO	Eosinophile Peroxydase
i.p.	Intra-péritonéal
IFN $\gamma$	Interferon $\gamma$
IL	Interleukine
JNK	Jun Kinase
LDH	Lactate Déshydrogénase
LTB4	Leucotriène B4
MAP Kinase	Mitogen Activated Proteine Kinase
MPO	Myéloperoxydase
NFAT	Nuclear Factor of Activated T Cell
NK	Natural Killer
NO	Monoxyde d'azote
PAF	Platlet Activating Factor
PAFR	Platlet Activating Factor Receptor

PAX-5

Paired-Box 5

PGE2

Prostaglandine E 2

ROS

Reactive Oxygen Species

SCF

Stem Cell Factor

TCR

T Cell Receptor

Tfh

T follicular helper

TNF $\alpha$

Tumor Necrosis Factor  $\alpha$

# Sommaire

<b>Introduction.....</b>	<b>01</b>
<b>I. Généralités</b>	
<b>I.1. Venin de scorpion et l'envenimation scorpionique.....</b>	<b>03</b>
<b>I.1.1. Scorpions.....</b>	<b>03</b>
<b>I.1.2. Venins de scorpions.....</b>	<b>05</b>
<b>I.1.3. Physiopathologie de l'envenimation scorpionique.....</b>	<b>06</b>
<b>I.2. Réponse immunitaire induite par le venin.....</b>	<b>08</b>
<b>I.2.1. Médiateurs cellulaires.....</b>	<b>08</b>
<b>I.2.2. Médiateurs solubles.....</b>	<b>10</b>
<b>I.3. Lymphocytes T dans la réponse immunitaire.....</b>	<b>12</b>
<b>I.3.1. Ontogénèse des Lymphocytes T.....</b>	<b>12</b>
<b>I.3.2. Diversité des populations de lymphocytes T.....</b>	<b>12</b>
<b>I.3.2. Implication des lymphocytes T dans le processus inflammatoire induit par le venin.....</b>	<b>16</b>
<b>I.4. Effet immunosuppresseur de la ciclosporine.....</b>	<b>16</b>
<b>I.4. A. Effet de la Ciclosporine sur les Lymphocytes T.....</b>	<b>17</b>
<b>I.4. B. Effet de la Ciclosporine sur d'autres cellules du système immunitaire.....</b>	<b>19</b>
<b>II. Matériel et méthodes</b>	
<b>II.1. Matériel .....</b>	<b>20</b>
<b>II.1.1. Matériel biologique .....</b>	<b>20</b>
<b>II.1.2. Matériel non biologique .....</b>	<b>21</b>
<b>II.2. Méthodes .....</b>	<b>22</b>
<b>II.2.1. Démarche expérimentale.....</b>	<b>22</b>
<b>II.2.2. Exploration de la réponse immunitaire et inflammatoire .....</b>	<b>23</b>
<b>II.2.3. Etude histologique .....</b>	<b>27</b>
<b>II.2.4. Expression statistique des résultats .....</b>	<b>27</b>

**III. Résultats et discussion .....29**

**IV. Conclusion et perspectives ..... 46**

**Références bibliographiques ..... 47**

**Annexes**



## Résumé

L'envenimation scorpionique constitue un réel problème de santé publique. Sa pathogénèse implique de multiples mécanismes mettant en jeu des acteurs moléculaires et cellulaires, notamment les lymphocytes.

L'effet immunomodulateur de la Ciclosporine, un inhibiteur spécifique des lymphocytes T a été investiguée dans ce présent travail par l'étude de l'infiltration leucocytaire dans le sang périphérique, l'évaluation des marqueurs de stress oxydatif et les altérations tissulaires provoqués par le venin de scorpion algérien *Androctonus australis hector* et sa fraction toxique majoritaire Ftox G50, ceci en présence ou en absence d'un prétraitement par la ciclosporine.

Les résultats obtenus ont rapporté une modulation de la réponse immunitaire induite par le venin d'*Androctonus australis hector* et sa fraction Ftox G50. Sous l'effet de prétraitement à la ciclosporine, nous avons constaté une baisse dans l'infiltration leucocytaire et leur migration vers les tissus accompagnée d'une diminution des paramètres inflammatoires et le stress oxydatif.

Cette étude montre d'une part, l'effet immunomodulateur anti-inflammatoire de la ciclosporine et d'autre part l'implication des lymphocytes T dans les mécanismes cellulaires de la réponse immunitaire vis-à-vis de venin de scorpion et ses toxines.

**Mots clé :** envenimation scorpionique, Ciclosporine, inflammation, lymphocytes T.

## Abstract

Scorpion envenoming is a major public health problem. Its pathogenesis involves cooperation of several soluble and cellular mediators including T lymphocytes. Immunomodulatory properties of cyclosporin, a specific inhibitor of T cells have been investigated in the present study by the by evaluation of leukocyte infiltration in the peripheral blood, assessment of markers of oxidative stress and tissue damage caused by the Algerian scorpion venom *Androctonus australis hector* and its controlling toxic fraction Ftox G50, this in the presence or absence of pretreatment with cyclosporine.

The results reported modulatory effects of cyclosporin, the immune response elicited by the venom of *Androctonus australis hector* and its fraction Ftox G50 decrease under the pretreatment by ciclosporin. The results show a decrease in leukocyte infiltration and migration to the tissues accompanied by a reduction of inflammatory parameters and oxidative stress.

This study shows in first, the anti-inflammatory immunomodulatory effect of cyclosporin and secondly, the involvement of T lymphocytes in the cellular mechanisms of the immune response induced by scorpion venom and theirs toxins.

**Key words:** scorpion envenomation, Cyclosporine, inflammation, T lymphocytes.

## ملخص

يعد التسمم العقربي مشكل من مشاكل الصحة العمومية خاصة في مناطق انتشار العقارب أين تعتبر الجرائر واحدة من بين المناطق الوبائية والتي تحصي العديد من الحالات سنويا. تتمثل خطورة السم العقارب في احتوائه العديد من المكونات خصوصا السموم العصبية و التي تؤثر مباشرة على النفاقل الايونية الموجودة بالجهاز العصبي وبأجهزة حيوية اخرى مثل الجهاز التنفسي و الجهاز القلبي الوعائي. من جهة اخرى تتفاعل مركبات السم العقربي مع الجهاز المناعي و تُفعل استجابة مناعية بمشاركة العديد من الخلايا المناعية و الوسائط الجزيئية.

تهدف هذه الدراسة لإظهار الخاصية المثبتة للمناعة و المضادة للالتهاب التي يقدمها عقار السيكلوسبورين (مثبط نوعي للخلايا اللمفاوية التائية ) و ذلك في إطار الاستجابة المناعية الالتهابية المفتعلة بسم العقرب البني ذو الذيل العريض او بالجزء السام منه ، من خلال إجراء تقييم خصائص الاستجابة المناعية كانتقال الخلايا المناعية و نزوحها نحو الأنسجة الملتهبة، العوامل الالتهابية او الإجهاد التأكسدي الناجم عن هذه الاسنجابة و ذلك في حالة وجود معالجة مسبقة بالسيكلوسبورين او انعدامها.

اظهرت نتائج الدراسة فعالية العقار في خفض مظاهر الالتهاب من خلال تثبيط و إنقاص العوامل الالتهابية النزوح الخلوي نحو الانسجة بالإضافة الى التقليل من انتاج انواع الاكسجين التفاعلي الذي ينتج خلال الاستجابة المناعية للسم العقربي تخلص هذه الدراسة ايضا الى تسليط الضوء على الدور المحتمل التي تلعبه الخلايا اللمفاوية التائية خلال الاستجابة للسم العقربي.

**الكلمات المفتاحية:** التسمم العقربي، السيكلوسبورين، الالتهاب، الخلايا اللمفاوية التائية.

L'envenimation scorpionique représente un réel problème de santé publique dans les régions tropicales et subtropicales du monde, car elle est responsable d'accidents graves qui peuvent parfois être mortels (**Chippaux et Goyffon, 2008**). En Algérie, l'espèce de scorpion *Androctonus australis hector* est principalement incriminée dans ces accidents, son pouvoir létal lui est conféré par les neurotoxines qui composent son venin. Ces neurotoxines en agissant directement sur le système nerveux central provoquent la libération de neuromédiateurs (acétylcholine et catécholamines) responsables de l'altération des fonctions cardiovasculaire et respiratoire. Parallèlement, les constituants de venins de scorpion activent le système immunitaire ce qui déclenche une réponse immunitaire révélée par l'activation et l'infiltration massive des leucocytes, principalement les polynucléaires neutrophiles, vers les organes et participent ainsi aux altérations pathologiques observées lors des envenimations scorpioniques (**Nouira et al., 1996 ; Hammoudi-Triki et Laraba-Djebari, 2003 ; Adi-Bessalem et al., 2008 ; Bahloul et al., 2013**).

L'action du système nerveux potentialise la réponse immunitaire déclenchée par le venin ; la libération des neurotransmetteurs stimule la synthèse des médiateurs inflammatoires, les molécules vasodilatatrices et les cytokines par les cellules immunitaires. Cependant, une action directe des constituants du venin est aussi démontrée par plusieurs études *in vitro* et qui prouvent qu'en présence de venin de scorpion, les cellules immunitaires telles que les monocytes et les macrophages réagissent en s'activant et en libérant les molécules immunomodulatrices comme les cytokines (**Fialho et al., 2011 ; Zoccal et al., 2011; Borges et al., 2011**).

Malgré que les interactions du système immunitaire avec les constituants de venin de scorpion ont fait l'objet de plusieurs études dont le but ciblé a été de développer et d'améliorer la thérapie antiscorpionique ou de rechercher des molécules d'intérêt thérapeutiques, les mécanismes d'interaction exactes restent encore partiellement élucidés. Le rôle de certaines cellules ou molécules au sein de cette interaction reste inconnu, comme le cas des lymphocytes.

Afin de mieux comprendre la réponse immunitaire induite par le venin et le rôle des lymphocytes dans la pathogénie scorpionique, le travail entrepris a pour objectif d'élucider l'effet immunomodulateur d'un immunosuppresseur spécifique pour les lymphocytes T qui est la ciclosporine et ceci sur la réponse immunitaire et inflammatoire induite par le venin de l'*Androctonus australis hector* et sa fraction toxique majoritaire Ftox G50.

# Introduction

---

Pour arriver à cet objectif, l'étude réalisée a porté sur l'évaluation des paramètres inflammatoires : la numération différentielle des leucocytes, l'activité enzymatique des granulocytes (la myéloperoxydase neutrophile et l'éosinophile peroxydase), le stress oxydatif (les nitrites résiduels et la malondialdéhyde) et les altérations tissulaires induites par le venin et sa fraction toxique Ftox G50 en présence ou en absence d'un prétraitement par la ciclosporine.



Généralités



## I.1. Venin de scorpion et l'envenimation scorpionique

### I.1.1. Scorpions

Les scorpions sont considérés comme les animaux terrestres les plus anciens ; ce sont des arthropodes venimeux qui comptent actuellement plus de 2140 espèces. Vu leur caractère thermophile, les scorpions sont distribués généralement dans les zones tropicales sèches et subtropicales d'Afrique du Nord, du moyen Orient, d'Amérique Centrale et d'Amérique du Sud (**Charnot et al., 1994; Lourenço, 2015**).

Ce sont des invertébrés venimeux, nocturnes, pourvus d'exosquelette chitineux articulé qui les protège et leur confère une résistance aux conditions les plus extrêmes des écosystèmes. Le corps du scorpion est divisé nettement en trois parties : le céphalothorax, l'abdomen et la queue ; cette dernière comprend cinq segments dont le dernier (le telson) porte l'appareil venimeux formé d'une glande à venin, prolongée d'un aiguillon permettant l'inoculation du venin (**Vachon, 1952; Beaumont et Cassier, 1996**).

En effet, l'envenimation scorpionique représente un réel problème de santé publique dans les régions tropicales et subtropicales du monde du fait de sa morbidité et de sa mortalité (**Chippaux et al., 2011**).

En Algérie, l'Institut National de Santé Publique enregistre annuellement 30.000 à 50.000 cas de piqûres de scorpion entraînant de 100 à 150 décès principalement dans les zones sahariennes et sub-sahariennes. La plupart des accidents mortels résultent de l'envenimation par *Androctonus australis hector* (Aah). Il s'agit d'un scorpion de couleur jaune pâle et de taille de 4 à 10 cm à l'état adulte, très actif pendant les saisons chaudes dans les régions de l'Atlas Saharien, le Sud (Adrar, Biskra, El Oued, Ouargla, Ghardaïa) et les Hauts Plateaux (Ain Sefra, Mechria, El bayadh, Ksar Chellala) (**Benguedda et al., 2002**).



---

**Figure 1.** Le scorpion *Androctonus australis hector* à l'âge adulte (Goyffon, 2009)

---



### I.1.2. Venins de scorpions

Les venins de scorpions sont des mélanges d'extrême complexité contenant un grand nombre de substances bioactives. Ils sont caractérisés par une grande richesse en polypeptides de faible poids moléculaire dont la plupart sont neurotoxiques pour les mammifères, les insectes et les crustacés. Malgré qu'elles ne représentent que 5% de sa composition total, ces molécules constituent la fraction toxique du venin et lui confère la quasi-totalité de sa toxicité (**Rodriguez et al., 2010 ; Narayanan et al., 2016**).

En plus des neurotoxines, les venins de scorpions renferment également d'autres molécules non neurotoxiques et qui représentent la fraction non toxique du venin (95% de sa composition total). Cette dernière est composée de mucopolysaccharides, d'inhibiteurs de protéase (**Rochat et al., 1979 ; Heinen et al., 2011**), de bioamines comme la sérotonine (**Master et al., 1963**) et l'histamine (**Gwee et al., 2002**) et une très faible quantité d'enzymes comme les hyaluronidases, les gélatinases, les phospholipases et les protéinases (**Zlotkin et al., 1978; Rodriguez et al., 2010**).

La diversité des espèces de scorpions implique l'existence de toxines différentes, qui peuvent être classées en plusieurs familles selon de nombreux critères : la longueur de la séquence d'acides aminés qui permet de les classés en toxines longues ou courtes; en fonction de la cible animale, en toxines anti-mammifères, anti-crustacés et anti-insectes ; et suivant la cible biologique, elles se regroupent en toxines actives sur les canaux sodium, potassium, calcium et chlore (**Martin-Eauclaire et al., 1999 ; Possani et al., 2000 ; Quintero-Hernández et al., 2013 ; Aboumaâd et al. 2014**).

#### ☞ Toxines actives sur les canaux sodium

Ces toxines actives sur les cellules d'insectes et de mammifères, sont des polypeptides basiques monocaténares de 7 kDa composées de 60 à 76 résidus d'acides aminés réticulés par quatre ponts disulfures (**Martin-Eauclaire et al., 1999; Quintero-Hernández et al., 2013**).

Suivant leur fixation spécifique sur le canal sodique ( $\text{Na}^+$ ), les toxines longues ont été subdivisées en toxines  $\alpha$  et  $\beta$  provoquant deux réponses pharmacologiques différentes :

**Toxines  $\alpha$  :** Ce sont des polypeptides de 58-76 acides aminés liés par 4 ponts disulfures, leur effet majeur est l'inactivation du potentiel de fermeture de canal sodique induisant ainsi la

prolongation du potentiel d'action qui s'exprime par une forte dépolarisation membranaire suivie d'une perte de l'excitabilité (Isbister et Bawaskar, 2014; Wang et al., 2011).

**Toxines  $\beta$**  : Elles agissent sur le potentiel d'activation du canal sodique en déplaçant le seuil d'activation du canal à des valeurs négatives du potentiel membranaire. Ces toxines sont caractéristiques des venins de certaines familles de scorpions comme les *Centrurinae* et les *Tityinae* (Vandendriessche et al., 2010 ;Quintero-Hernández et al., 2013).

### ☞ **Toxines actives sur les canaux potassium**

Ce sont de courtes toxines de 23 à 43 résidus d'acides aminés réticulés par 3 ou 4 ponts disulfures qui bloquent avec une forte affinité les canaux potassium ( $K^+$ ) potentiel-dépendant et calcium dépendant.

Bien qu'elles sont présentes dans le venin en très faible quantité (< 1% de poids sec), ce groupe de neurotoxines est d'une grande diversité structurelle car plus de 140 séquences de toxines à canaux  $K^+$  ont été rapportées et identifiées à partir des venins de scorpions. Elles ont été subdivisées suivant leur structure (présence hélice  $\alpha$  et feuillet  $\beta$ ) en toxines  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\kappa$  (Possani et al., 1982 ; Mahdjoubi et al., 2003 ; Gao et al., 2011 ; Yu et al., 2016).

### **I.1.3. Physiopathologie de l'envenimation scorpionique**

Le venin d'Aah induit des effets systémiques suivis d'une perturbation du système cardiovasculaire et respiratoire (défaillances cardiaque et œdèmes pulmonaire). La pathogénèse de ces perturbations multifactorielles est liée en grande partie aux neurotoxines actives sur les canaux sodiques et potassiques (Martin-Eauclaire et al., 2010 ; Ladjel-Mendil et al., 2012).

- **Effet du venin sur le système nerveux**

Elle résulte principalement d'une stimulation du système nerveux autonome, sympathique et parasympathique par les neurotoxines qui agissent sur les terminaisons nerveuses cholinergiques et adrénergiques par la dépolarisation membranaire (Guéron et al., 1980). Cette stimulation provoque une décharge rapide et massive de neuromédiateurs cholinergiques et adrénergiques tels que l'acétylcholine et des catécholamines (adrénaline, noradrénaline, dopamine) (Elatrous et al., 2008 ; Ladjel-Mendil et al., 2012 ; Adi-Bessalem

et *al.*, 2015). Le venin d'Aah est également responsable de la libération rapide de neuropeptide Y, de la substance P et du facteur natriurétique (Nouira et *al.*, 2005 ; Soualmia et *al.*, 2009).

- **Effet du venin sur le système cardiovasculaire et respiratoire**

Le venin d'Aah a un effet direct sur le myocarde, conduisant à une myocardite en affectant la membrane des cellules myocardiques, modifiant ainsi sa perméabilité et ses propriétés électriques. L'ischémie du myocarde rencontrée lors de l'envenimation provoque aussi une hypoxie cellulaire et un œdème interstitiel marqué avec des hémorragies aiguës dans le ventricule (Fayet et *al.*, 1974 ; Elgar et *al.*, 2006 ; Geoffrey et *al.*, 2014).

Ce dysfonctionnement cardiaque est accompagnée d'une accumulation des cellules inflammatoires y compris les granulocytes et à moindre degré les macrophages et les lymphocytes, ainsi qu'une diminution significative des activités enzymatiques de la LDH (lactate déshydrogénase) et de la CPK (créatine phosphokinase) (Gyoffon et El-ayeb, 2002 ; Abdel-Rahman et *al.*, 2015; Adi-Bessalem et *al.*, 2015 ).

En plus de l'action directe des neurotoxines, les catécholamines libérés activent les récepteurs  $\beta$ -adrénergique localisés au niveau cardiaque et aggrave l'état ischémique en créant une instabilité électrique responsable d'une contraction ventriculaire et une libération massive des radicaux libres dont leur effet toxique sur le muscle cardiaque est à l'origine de la tachycardie, l'arythmie ventriculaire et l'insuffisance cardiaque observées lors de l'envenimation scorpionique (Geoffrey et *al.*, 2014 ; Abdel-Rahman et *al.*, 2015 ).

En plus des altérations cardiovasculaires, le venin de scorpion induit une augmentation de la perméabilité vasculaire des poumons due à l'augmentation des médiateurs vasodilatateurs tels que les leucotriènes, les prostaglandines, l'histamine, le monoxyde d'azote (NO), et le facteur d'activation plaquettaire (PAF) (Nouira et *al.*, 1996 ; Adi-Bessalem et *al.*, 2008 ; Bahloul et *al.*, 2013).

La physiopathogénie de la détresse respiratoire est complexe du fait de l'interaction de nombreux facteurs cardiogéniques (défaillance aiguë du ventricule gauche) et non cardiogéniques (augmentation de la perméabilité vasculaire des poumons provoquée par la libération des substances vasodilatatrices telles que les leucotriènes, le PAF, et les prostaglandines) (Nouira et *al.*, 1996 ; Dutta et Deshpande, 2011 ; Bahloul et *al.*, 2013).

## **I.2. Réponse immunitaire induite par le venin**

L'inflammation est considérée comme un évènement crucial durant la pathogénèse de l'envenimation, et son intensité est corrélée avec la sévérité de cette dernière. Différents médiateurs solubles et cellulaires sont impliqués et leurs effets réunis provoquent les dommages tissulaires et les dysfonctionnements des organes (**Petricevich, 2010 ; Laraba-Djebari et al., 2015**).

### **I.2.1. Médiateurs cellulaires**

Au cours de la réponse inflammatoire induite par le venin de scorpion, différentes cellules sont activées et attirées vers le site inflammatoire à travers un réseau de signalisation impliquant des facteurs de croissance, des cytokines et des chimiokines.

Les neutrophiles sont les premières cellules à migrer vers le site inflammatoire et jouent un rôle primordiale dans la réponse immunitaire. Au cours de l'envenimation, une importante neutrophilie est observée avec l'infiltration de ces cellules et leur séquestration au niveau de la cavité péritonéale ainsi que dans différents tissus (**Borges et al., 2000 ; Adi-Bessalem et al., 2015**).

Cette accumulation est due d'une part, à une libération massive de neurotransmetteurs, principalement les catécholamines, et d'autre part, aux signaux chimio-attractants des chimiokines de la familles CXC (Cysteine X Cysteine), les LTB<sub>4</sub> (Leucotriène B 4) et l'IL8 qui proviendrait des cellules épithéliales et des macrophages résidents (**Borges et al., 2000 ; Coelho et al., 2007**).

Un prétraitement avec un antagoniste du récepteur PAFR (Platlet Activating Factor Receptor) lors d'une envenimation expérimentale par le venin de *Tityus serrulatus*, a significativement réduit la migration des neutrophiles suggérant que leur activation et recrutement étaient dépendant également du PAF (**Borges et al., 2000**).

Une fois activés par le venin et recrutés au site de l'inflammation, les neutrophiles produisent rapidement des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et libèrent des enzymes tels que la Myéloperoxydase (MPO) et des métalloprotéinases, aggravant ainsi les altérations au niveau des cellules endothéliales et des tissus (**Coelho et al., 2007 ; Adi-Bessalem et al., 2013**).

Les macrophages sont aussi incriminés dans la pathogénèse de l'envenimation. En réponse au venin, ils produisent du monoxyde d'azote (NO) ainsi que d'autres cytokines inflammatoires comme l'INF $\gamma$ , le TNF $\alpha$ , l'IL1 $\beta$ , IL6 et l'IL10 (**Petricevich et al., 2007 ; Zoccal et al., 2011 ; Adi-Bessalem et al., 2013**).

Les mastocytes quant à eux, sont inculpés dans le processus induisant l'œdème pulmonaire. Des rats dépourvus de mastocytes ont survécu plus longtemps suite à l'administration du venin de scorpion *Tityus Serrulatus* et ont développé un œdème pulmonaire moins important. Ces cellules situées aux alentours des terminaisons nerveuses périphériques, peuvent être directement stimulées par le venin, ou par des facteurs neuroendocriniens, tels que la substance P libérée par les terminaisons nerveuses activées par le venin. Leur activation induit la sécrétion des contenus granulaires et la libération de multiples médiateurs tels que l'histamine dont l'implication dans la formation d'œdème pulmonaire lors de l'envenimation a déjà été décrite dans plusieurs cas d'envenimations scorpioniques expérimentales (**Matos et al., 1999 ; De-Matos et al., 2001 ; Liu et al., 2007 ; Adi-Bessalem et al., 2013 ; Chair-Yousfi et al., 2014**).

Les éosinophiles, à leur tour, sont associés aux réactions d'hypersensibilités immédiates observées au cours de l'envenimation. Une éosinophilie et une infiltration de ces cellules au niveau des poumons ont aussi été rapportées (**Shah et al., 1989 ; Adi-Bessalem et al., 2012**).

Au cours d'envenimations expérimentales par le venin de l'Aah, les éosinophiles stimulés par l'IL5 et les produits d'activation du complément C3a et C5a, libèrent des médiateurs inflammatoires tel que le PAF et les leucotriènes, mais aussi, l'éosinophile peroxydase (EPO) qui catalyse la formation des espèces réactives de l'oxygène (ROS), induisant ainsi des altérations du tissu pulmonaire (**Adi-Bessalem et al., 2012**).

### **I.2.2. Médiateurs solubles**

La réponse inflammatoire consécutive à l'envenimation est caractérisée par une augmentation des taux sériques de cytokines, de chimiokines, de substances vasoactives, de métabolites lipidiques et par l'activation du système du complément ainsi que le système kinines-kallécreines, responsable d'une réponse inflammatoire systémique (**Adi-Bessalem et al., 2015**) (**Figure 1**).

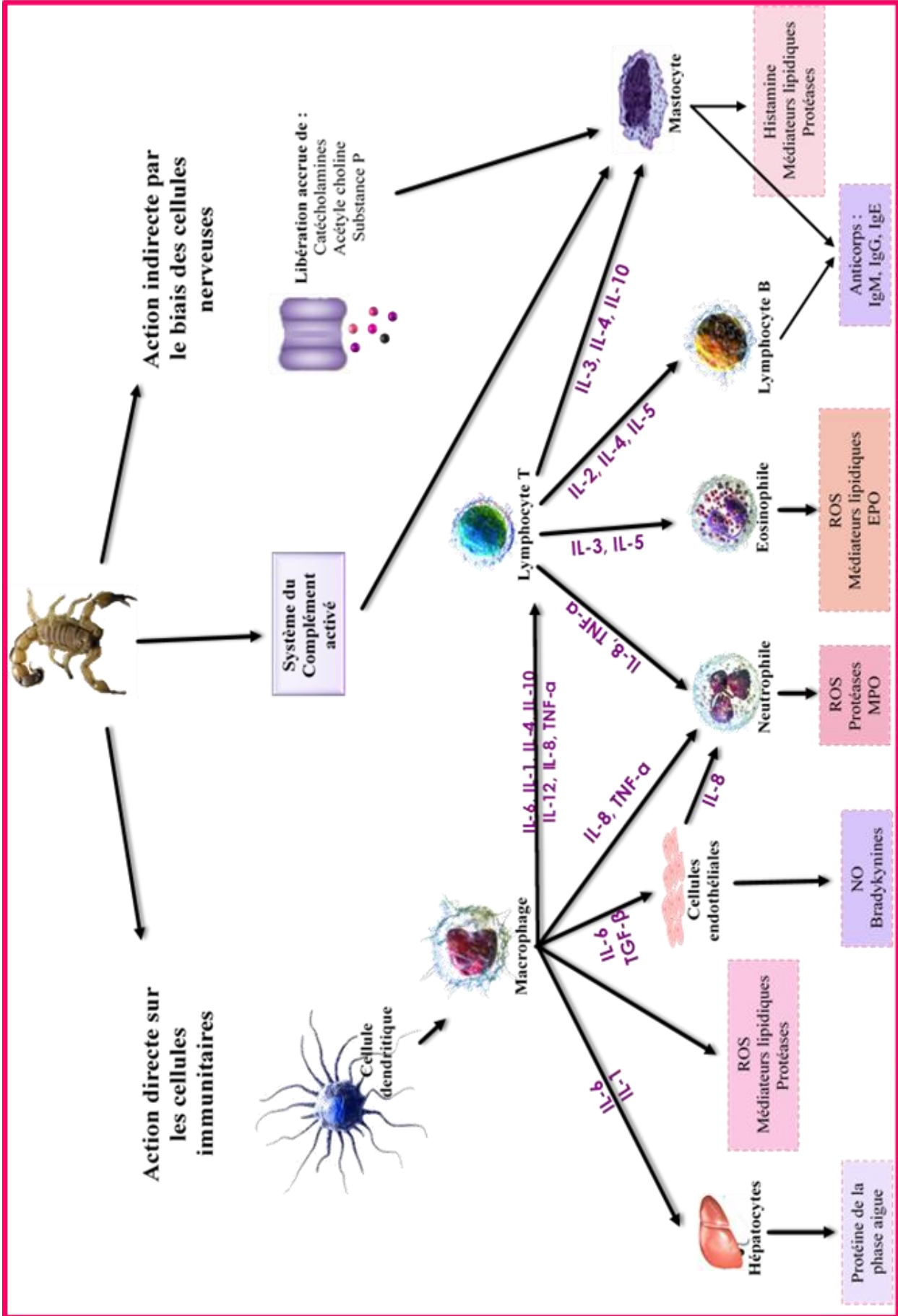


Figure 2. Activation des cellules immunitaires par le venin de scorpions (Ismail 1995; De-Matos et al. 2001; Petricevich et al. 2007 ; Adi-Bessalem et al., 2015 )

Les taux sériques des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL6, l'IL8, l'INF $\gamma$  et le TNF $\alpha$  sont augmentées, et ont des effets divers tels que le recrutement, l'activation et la différenciation des cellules immunocompétentes, l'induction de la production des protéines de la phase aiguë de l'inflammation et l'expression des molécules d'adhésion (**Petricevich, 2010**). Les taux de l'IL1, IL1 $\alpha$  et l'IL1 $\beta$ , chez les personnes envenimées ou lors d'envenimation expérimentale par le venin du scorpion *Tityus Serrulatus* ou sa toxine majoritaire, sont aussi élevés. La capacité du venin à induire la production d'IL12 a été montrée après stimulation des monocytes par le venin d'*Androctonus crassicauda* (**Saadi et al., 2015**). La sécrétion de cytokines anti inflammatoires comme l'IL1ra, l'IL4, l'IL10 et le TGF $\beta$  a également été rapportée. Ces cytokines ont pour effet de moduler la réponse immunitaire en réduisant le processus inflammatoire (**Figure 1**)

C'est le déséquilibre entre les différentes cytokines pro et anti-inflammatoires qui détermine l'amplitude de l'inflammation et sa gravité, et qui mène à une défaillance multi-viscérale pouvant être fatale (**Petricevich, 2006 ; Adi-Bessalem et al., 2015**).

Le venin de scorpions induit également l'activation du système du complément et de manière plus prononcée au niveau du foie, où l'utilisation d'un inhibiteur non spécifique du complément a significativement réduit les altérations du tissu hépatique (**Bekkari et al., 2015**).

Les produits de l'activation du système du complément C3a et C5a contribuent à l'induction des mastocytes à la décharge d'Histamine. Cette substance vasodilatatrice aussi retrouvée dans certains venins, serait impliquée dans la formation de l'œdème pulmonaire lors des envenimations (**De-Matos et al., 2001 ; Liu et al., 2007 ; Adi-Bessalem et al., 2013**) (**Figure 1**).

Les dérivés métaboliques de l'acide arachidonique sont eux aussi impliqués dans le processus inflammatoire de l'envenimation. Les prostaglandines (PGE2) augmentent la perception de la douleur à travers les bradykinines et l'histamine, et les leucotriennes (LTB4) contribuant ainsi au recrutement des cellules immunitaires et à la dégranulation des polynucléaires. Les taux de ces deux médiateurs lipidiques sont considérablement augmentés au cours des envenimations accidentelles et expérimentale par le venin de *Tityus serrulatus* et ses toxines (**Teixeira et al., 1997 ; Pessini et al., 2006 ; Zoccal et al., 2013**).

Le PAF est également un médiateur lipidique soluble, dérivé de phospholipides membranaires, qui induit l'agrégation des plaquettes sanguines, la vasodilatation et l'attraction

des neutrophiles lors de l'envenimation (**Matos et al., 1999 ; Borges et al., 2000 ; Adi-Bessalem et al., 2013**).

### **I.3. Les lymphocytes T dans la réponse immunitaire**

Les lymphocytes T sont des cellules clé au sein du système immunitaire ; ils participent essentiellement à la réponse immunitaire adaptative. Néanmoins, son rôle dans la réponse immunitaire innée a aussi été rapporté par sa capacité à diriger indirectement les cellules de la réponse innée par la synthèse de différents médiateurs tels que les cytokines (**Larbi et al., 2013**).

#### **I.3.1. Ontogénèse des Lymphocytes T**

Les lymphocytes T proviennent d'un progéniteur lymphoïde commun au niveau de la moelle osseuse et qui sous l'influence des signaux chimioattractant et des cytokines, donne naissance aux cellules lymphocytaires B, T et les cellules Natural Killer (NK). En effet, ce progéniteur se différencie en cellules NK sous l'influence d'IL2 et de facteur de croissance des cellules souches (SCF), tandis qu'en présence de l'IL7, il donne naissance soit aux lymphocytes B ou T ; si le CLP exprime les facteurs de transcription EBF, E2A et Pax-5, il est dit " pro-B" et se différenciera en lymphocytes B alors que s'il exprime le Notch-1 et GATA-3, ce CLP est " pro-T" se différenciera en LT (**Porritt et al., 2003 ; Allman et al., 2003 ; Kiel et al., 2005 ; Bell et al., 2008**).

Le pro-T migre de la moelle osseuse vers le thymus où il entame un processus de maturation ou de sélection lui permettant d'acquérir les propriétés du lymphocyte T immunocompétent. Cette maturation résulte dans l'expression de récepteur TCR et les marqueurs caractéristiques de la lignée lymphocytaire T (les clusters de différenciation CD3, CD4, CD8, CD25) (**Burtrumet al., 1996 ; Porritt et al., 2003 ; Bell et al., 2008**)

#### **I.3.2. Diversité des populations de lymphocytes T**

La différenciation des lymphocytes T est déterminée par l'interaction du TCR avec une cellule présentatrice de l'antigène (CPA) lui présentant l'antigène couplé à une molécule de CMH et par un second signal transmis par les molécules de co-stimulation (**Abdoli et al., 2014**).



Cette différenciation implique de multiples cascades de signalisation aboutissant à la polarisation du lymphocyte vers une population définie, nécessite l'intervention de second messager essentiel à la transduction du signal. Ces derniers passent à travers la membrane cellulaire par le biais des canaux ioniques dont l'implication dans la différenciation des cellules immunitaires et leur fonctionnement a récemment été mise en évidence (**Feske et al., 2015**) (**Figure 2**).

- **Lymphocytes T cytotoxique CD8<sup>+</sup>**

Un lymphocyte CD8<sup>+</sup> naïf s'active suite à son interaction avec une CPA qui lui présente l'antigène spécifique dans un contexte CMH-1. Ces cellules cytotoxiques sont capables d'éliminer les cellules du soi modifiées ou les cellules infectées. Elles disposent de deux principales voies inductrices de la mort ; la voie perforine/granzyme et la voie Fas/Fas-L. Il existe également une troisième voie basée sur la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF- $\alpha$  ou l'IFN- $\gamma$ , (**Chávez et al., 2009**).

- **Lymphocytes T auxiliaires CD4<sup>+</sup>**

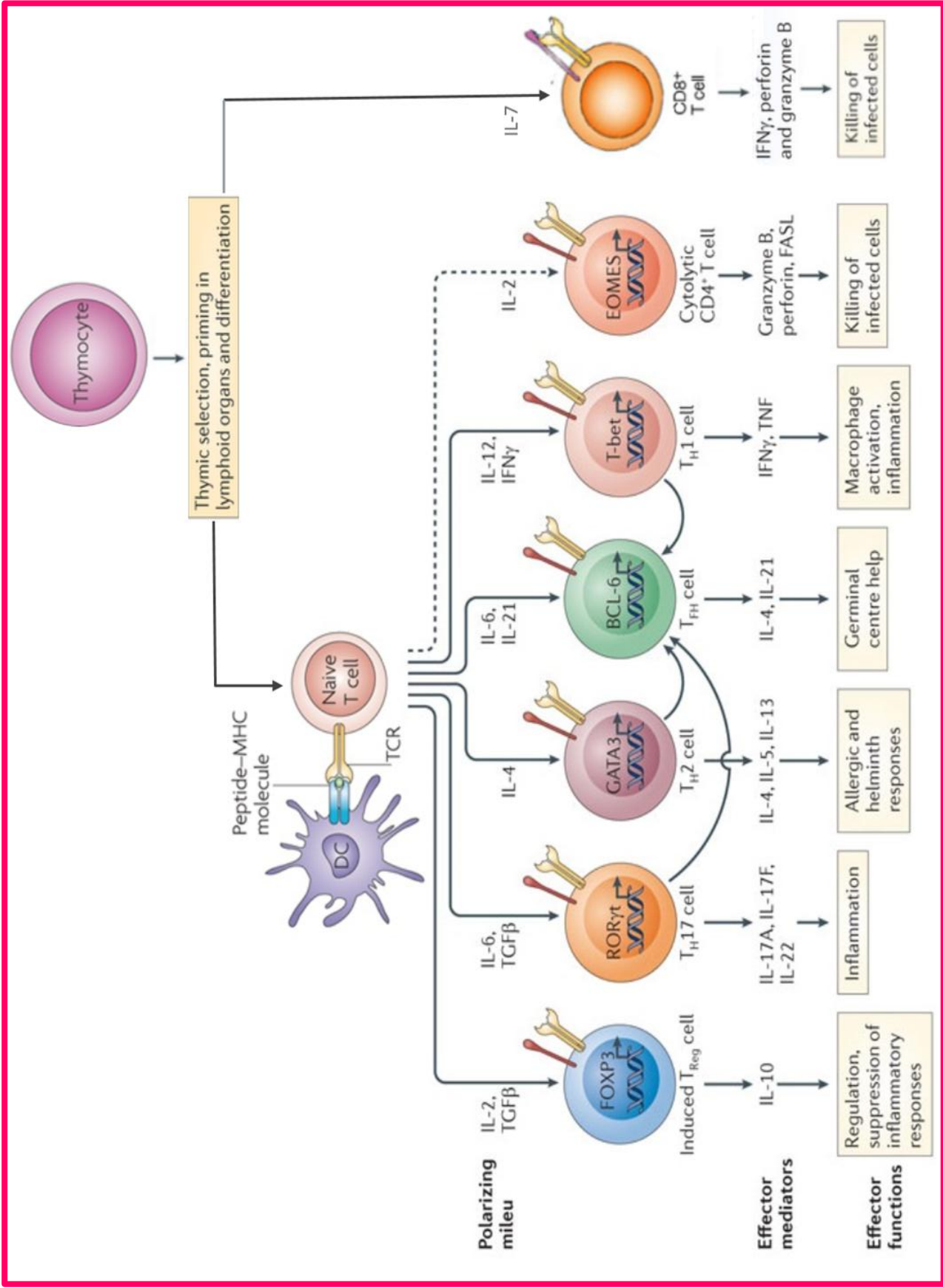
Les Lymphocytes T auxiliaires ou helper (Th) orchestrent la réponse immunitaire adaptative. Ils se différencient suite à leur activation par une CPA et sous l'effet de diverses cytokines en différentes sous-populations, chacune produisant un éventail de cytokines spécifiques et ayant une fonctionnalité distincte (**Sharpe et al., 2009 ; Zhou et al., 2009 ; Dardalhon et al., 2008 ; Veldhoen et al., 2008 ; Femke et al., 2011**) (**Figure 2**).

- **Lymphocytes Th1** : les cellules Th1, essentielles à l'immunité à médiation cellulaires, stimulent les macrophages et les cellules CD<sup>+</sup> cytotoxiques en réponse aux pathogènes intracellulaires. Elles sont caractérisées par l'expression du facteur de transcription T-bet et la production des cytokines IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF et LT- $\alpha$ . Les Th1 sont aussi associées à divers pathologies inflammatoires chroniques tel que la sclérose, le diabète et l'arthrite rhumatoïde (**Zhou et al., 2009 ; O'Shea et al., 2010**).

- **Lymphocytes Th2** : les cellules Th2 stimulent quant à eux les réponses à médiation humorale en réponse aux infections et aux parasites extracellulaires et induisent la prolifération des lymphocytes B, la production d'anticorps ainsi que l'activation des polynucléaires éosinophiles. Elles interviennent aussi dans les pathologies inflammatoires, l'asthme et les réactions allergiques. Les Th2 sont caractérisées par la production des

cytokines tels que IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 et l'IL-13 (Tao et al., 1997 ; So et al., 2006 ; O'Shea et al., 2010).

- **Lymphocytes Th9** : une lignée cellulaire récemment caractérisée, impliquées dans la protection contre les parasites particulièrement les nématodes. Ce cellules peuvent également produire l'IL-10, l'IL-9 et participent aux réactions allergiques (Dardalhon et al., 2008 ; Soroosh et Doherty, 2009).
- **Lymphocytes Th17**: cette lignée de lymphocytes T caractérisée par la sécrétion de différents cytokines IL-17A, IL-17F, IL-21 et d'IL-22 est impliquée dans la défense antimicrobienne au niveau des barrières épithéliales et des muqueuses et incriminées également dans de multiples pathologies auto-immunes (Ivanov et al., 2006 ; Mangan et al., 2006 ; McGeachy et al., 2009).
- **Lymphocytes Th22**: les cellules Th22 sont une lignée de lymphocytes pro-inflammatoires qui semblerait être impliquée dans les mécanismes de défense au niveau de la peau et la prolifération des kératinocytes. Elles sont impliquées dans les maladies auto-immunes telles que l'arthrite rhumatoïde, le psoriasis et la maladie de Crohn (Ikeuchi et al., 2005 ; Duhon et al., 2009).
- **Lymphocytes Tfh**: les lymphocytes Tfh (follicular helper) ont pour rôle d'assister la maturation des lymphocytes B au niveau des centres germinatifs, une aide qui se distingue de celle apportée par les Th2, par le biais de l'IL-21 qui stimule la différenciation des LB en cellules productrices d'anticorps. (Ansel et al., 1999 ; Dienz et al., 2009 ; Linterman et al., 2010).
- **Lymphocytes T régulatrices** : sont dites régulatrices car elles induisent une tolérance et suppriment les réponses des autres cellules, initialement pour limiter les réactions excessives et prévenir l'auto-immunité (Mucida et al., 2007).



**Figure 3.** Polarisation des Lymphocytes T (Sharpe et al., 2009 ; Zhou et al., 2009 ; Dardalhon et al., 2008 ; Veldhoen et al., 2008 ; Femke et al., 2011)

### **I.3.2. Implication des lymphocytes T dans le processus inflammatoire induit par le venin**

Très peu d'études ont montré l'implication des lymphocytes T au cours d'une réponse immunitaire anti-venins de scorpions. L'effet du venin de scorpion *Tityus serrulatus* sur les lymphocytes du sang périphérique a permis de démontrer qu'une concentration de 25 à 100 µg/mL du venin ne provoque aucune cytotoxicité ou un changement de prolifération lymphocytaire, et aucune polarisation vers la ligné CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>. Cependant, le venin a induit la production de cytokine pro-inflammatoire l'IL-6 ( **Casella-Martins et al., 2015**).

En effet, le venin d'Aah induit une augmentation des concentrations plasmatiques des cytokines pro-inflammatoires, y compris l'IL-6 qui joue un rôle crucial dans le processus inflammatoire en réponse à l'envenimation. La réduction de l'état inflammatoire en utilisant des anticorps anti-IL-6 a diminué significativement les paramètres inflammatoires et les altérations tissulaires rencontrés suite à l'injection du venin d'Aah chez un modèle murin d'envenimation (**Adi-Bessalem et al., 2008** ; **Ladjel-Mendil et al., 2012** ; **Djenah et Laraba, 2015**).

Les lymphocytes T semblent qu'ils orchestrent la réponse immunitaire induite par le venin par la production de TNFα et IL-6, cytokines clés qui amplifient la production d'autres cytokines pro-inflammatoires, néanmoins il sera important d'investiguer l'interaction de ces cellules immunitaires avec les constituants du venin de scorpion (**Casella-Martins et al., 2015** ; **Adi-Bessalem et al., 2015**).

### **I.4. Effet immunosuppresseur de la ciclosporine**

La ciclosporine (Cyc A) est un polypeptide cyclique de 11 acides aminés lipophile isolé à partir de champignon *Beauveria nivea*. Elle possède des propriétés immunosuppressives exploitées essentiellement au cours du traitement des transplantations et des allogreffes, mais aussi, dans le traitement de multiples pathologies inflammatoires et auto-immunes (**Patil et al., 2012**).

La ciclosporine exerce son action immunosuppressive en bloquant la transcription des gènes qui codent pour les cytokines chez les lymphocytes T activés, en l'occurrence ceux de

l'IL2, cette action a aussi été démontrée avec une faible fréquence chez les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) tels que les lymphocytes B (**Leung et al., 1999**), les macrophages (**Wasowska et al., 2001**) et les cellules dendritiques (DC) (**Tajima et al., 2003**).

### **A. Effet de la Ciclosporine sur les Lymphocytes T**

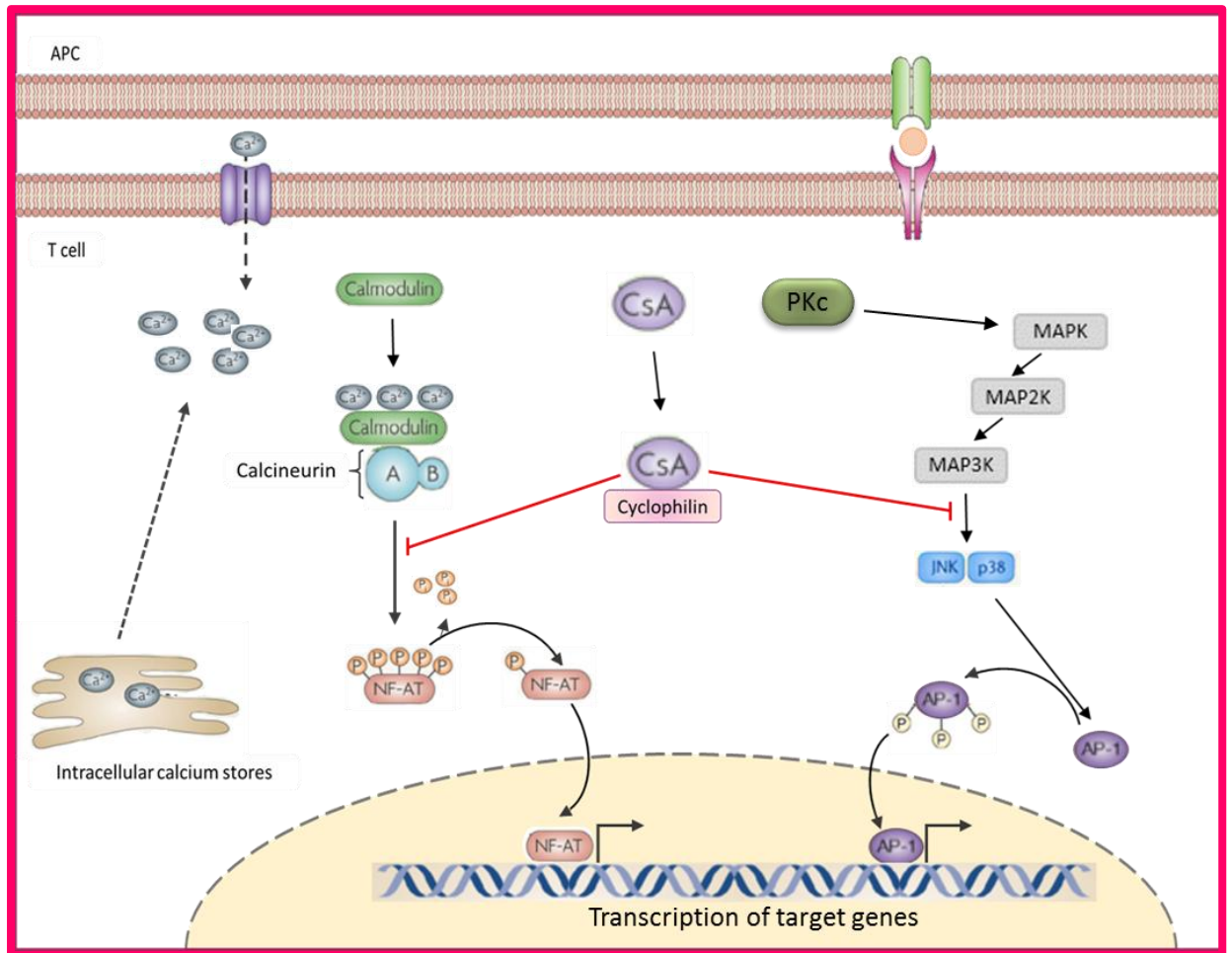
En effet, l'identification de deux voies de signalisations sensibles à la Ciclosporine chez les Lymphocytes T activés (voie Calcineurine-NFAT et P38 et JNK), explique sa haute spécificité (**Koyasu et Matsuda, 2000**) (**Figure 3**).

- **Action de la Ciclosporine sur la voie Calcineurine-NFAT**

La ciclosporine se lie avec une haute affinité à la cyclophiline A, une protéine de 17 kDa appartenant à une famille de protéines cytosoliques ubiquitaires, dont elle est la plus abondante chez les lymphocytes T (**Handschumacher et al., 1984**). Le complexe formé est alors capable de se lier avec une autre protéine cytosolique, la calcineurine qui possède une activité sérine/thréonine phosphatase, hautement régulée par le complexe Calmoduline-Ca<sup>2+</sup> (**Shenolikar, 1994**).

Lors de l'activation du lymphocyte T, la concentration intracellulaire du calcium augmente, de manière subséquente, la Calmoduline activée, interagit avec domaine d'auto-inhibition de la sous-unité catalytique de la calcineurine.. Une fois activée, la Calcineurine active alors les facteurs de transcriptions de la famille NFAT (NFAT1, NFAT2 et NFAT4) par une déphosphorylation qui permet leur translocation vers le noyau et l'activation de la transcription des gènes codant pour l'IL2, l'IL6 et le CD40L (**Rao et al., 1997**).

Le complexe ciclosporine-cyclophiline se lie à la sous-unité catalytique de la calcineurine et inhibe son activité phosphatase. En inhibant la déphosphorylation activatrice des facteurs de transcription NFAT, la ciclosporine inhibe leur translocation vers le noyau, et ainsi, l'expression des gènes codant pour l'IL2, l'IL4 et le CD40L dans les lymphocytes T activés (**Shigeo et Satoshi, 1999**).



**Figure 4.** Effet de la Ciclosporine sur les Lymphocytes T  
(Shigeo et Satoshi, 2000)

- **Action de la ciclosporine sur les voies P38 et JNK**

Les protéines de la famille MAPKinases P38 et JNK sont impliquées dans les processus de prolifération et de différenciation, notamment chez les lymphocytes T. Elles activent par phosphorylation les membres du complexe AP-1, facteur de transcription impliqué dans la production de l'IL2 chez les Lymphocytes T activés, et aussi, le facteur de transcription NFκB (**Dong et al., 2000**). La Ciclosporine est également capable d'interférer avec l'activation de P38 et JNK en agissant sur la cascade de MAP Kinases. la ciclosporine bloque l'activation de l'AP-1 et de façon subséquente la production d'IL2 (**Matsuda et Koyasu, 2000**).

## **B. Effet de la Ciclosporine sur d'autres cellules du système immunitaire**

- **Les cellules dendritiques (DC)**

L'étude de effet de la Ciclosporine sur les cellules dendritiques (DC) du sang périphérique avec ses deux sous-ensembles CD11c+ myéloïdes et CD11c- lymphoïdes, a démontré sa capacité à inhiber l'expression des molécules de costimulation CD40L, à diminuer le pouvoir d'endocytose et la production d'IL12 par ces cellules. En revanche, la ciclosporine augmenter la sécrétion d'IL10, interleukine anti-inflammatoire par ces même cellules (**Tajima et al., 2003**).

- **Les Lymphocytes B et les Macrophages**

L'effet immunosuppresseur de la ciclosporine sur les lymphocytes B ainsi que les Macrophage est similaire à son action chez les Lymphocytes T. En bloquant la transcription des gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire vers la phase G1, la ciclosporine inhibe la prolifération de ces cellules, limitant ainsi la réponse immunitaire (**Wicker et al., 1985 ; Hannam-Harris et al., 1985 ; Mouy et al., 1996**).



# Matériel et Méthodes





## II. Matériel et méthodes

La présente étude a été réalisée au sein du laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire à l'USTHB dans le but d'investiguer l'effet de la Ciclosporine sur la réponse immunitaire induite par le venin de l'*Androctonus australis hector* et sa fraction toxique Ftox G50, ainsi que d'explorer l'effet du traitement sur les altérations tissulaires engendrées par l'envenimation, où différents paramètres inflammatoires ont été explorés ainsi qu'une étude histologique.

### II.1. Matériel

#### II.1.1. Matériel biologique

##### a. Souris

L'étude a été faite sur des souris adultes mâles de souche NMRI (*Naval Medical Research Institute*) de 15 à 20 g, fournies par l'animalerie du service de Pharmaco-Toxicologie de la filiale SAIDAL-Antibiotical de Médéa.

Les souris utilisées ont été gardées à l'animalerie de la faculté des Sciences Biologiques, à l'Université des Sciences et de la Technologie, Houari Boumedienne (U.S.T.H.B) dans des conditions expérimentales optimales (température et humidité) et nourries avec un régime normal constitué de l'aliment de base et l'eau de robinet.

##### b. Venin

Le venin d'Aah fourni par le laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire de la Faculté des Sciences Biologique (FSB), est obtenu après stimulation électrique, il est par la suite lyophilisé et stocké à 4°C.

Le venin est reconstitué dans de l'eau physiologique stérile (NaCl à 0.9 %) puis centrifugé à 14000 g pendant 10 minutes à 4°C. Il a été aliquoté et conservé à -20°C jusqu'à son utilisation.

##### c. Fraction toxique Ftox G50

La fraction toxique majoritaire Ftox G50 est obtenue après le fractionnement du venin brut d'Aah par chromatographie d'exclusion moléculaire sur un gel séphadex G-50. Cette fraction est toxique à une dose létale de 13 µg/ 20g de souris par voie intrapéritonéale (i.p). Elle est principalement constituée de neurotoxines longues agissantes sur les canaux sodiques.

## d. Ciclosporine

La Ciclosporine utilisée dans cette étude est la Sandimmun Neoral® de la firme NOVARTIS. Cet immunosuppresseur fréquemment utilisé pour les rejets de greffes a été administré à raison de 10mg/Kg en deux injections par jour avec un espacement de 6h entre chacune.

### II.1.2. Matériel non biologique

Les produits chimiques de bonne qualité analytique, les réactifs et l'appareillage utilisé pour la réalisation des différentes expérimentations sont représenté dans la partie annexe (**Annexe I**).

## II.2. Méthodes

### II.2.1. Démarche expérimentale

Deux groupes de 30 souris chacun ont été utilisés dans cette étude ; le premier groupe à reçu par voie orale deux prises journalières à un intervalle de 6 heures de la ciclosporine (3 µg/g de souris dissout dans 50 µl d'eau). Le prétraitement avec la ciclosporine a duré 21 jours afin d'inhiber spécifiquement l'activité des lymphocytes T.

Le deuxième groupe a reçu de l'eau dans les mêmes conditions que le premier groupe prétraité avec la ciclosporine; c'est le groupe témoin non traité.

Le groupe prétraité est ensuite réparti en 3 lots à raison de 10 souris par lot et dont le 1<sup>er</sup> a servi de témoin et a reçu une injection d'eau physiologique stérile (NaCl à 0.9 %) par voie i.p ; le second lot de souris a reçu une dose sublétales du venin d'Aah par i.p. (10 µg/20g) et le 3<sup>ème</sup> lot est soumis à une injection par voie i.p. d'une dose sublétales de la Ftox G50 (8 µg/ml). De la même manière, le groupe non traité a été subdivisé en 3 lots ayant reçu les mêmes injections que les 3 premiers lots cités précédemment (**Figure 4**).

Les souris de tous les lots ont été sacrifiées 3 heures après l'injection du venin, de la Ftox G50 ou de l'eau physiologique. Le sang récupéré après sacrifice des souris, a été soumis à une centrifugation de 3000 g pendant 10 minutes pour séparer les sérums qui ont été conservés au frais à -20°C pour le dosage des différents paramètres biochimiques (**Figure 4**).

Le foie, la rate, le cœur et les poumons ont été prélevés, lavés au tampon PBS (0,1M pH 7,4) et broyés dans un volume, égal à 9 fois le poids initial de l'organe, de tampon Tris-HCL à 0,1 % Triton x 100 (0,05M pH 7,4) et à une température de 4°C. Le broyat des organes a subi

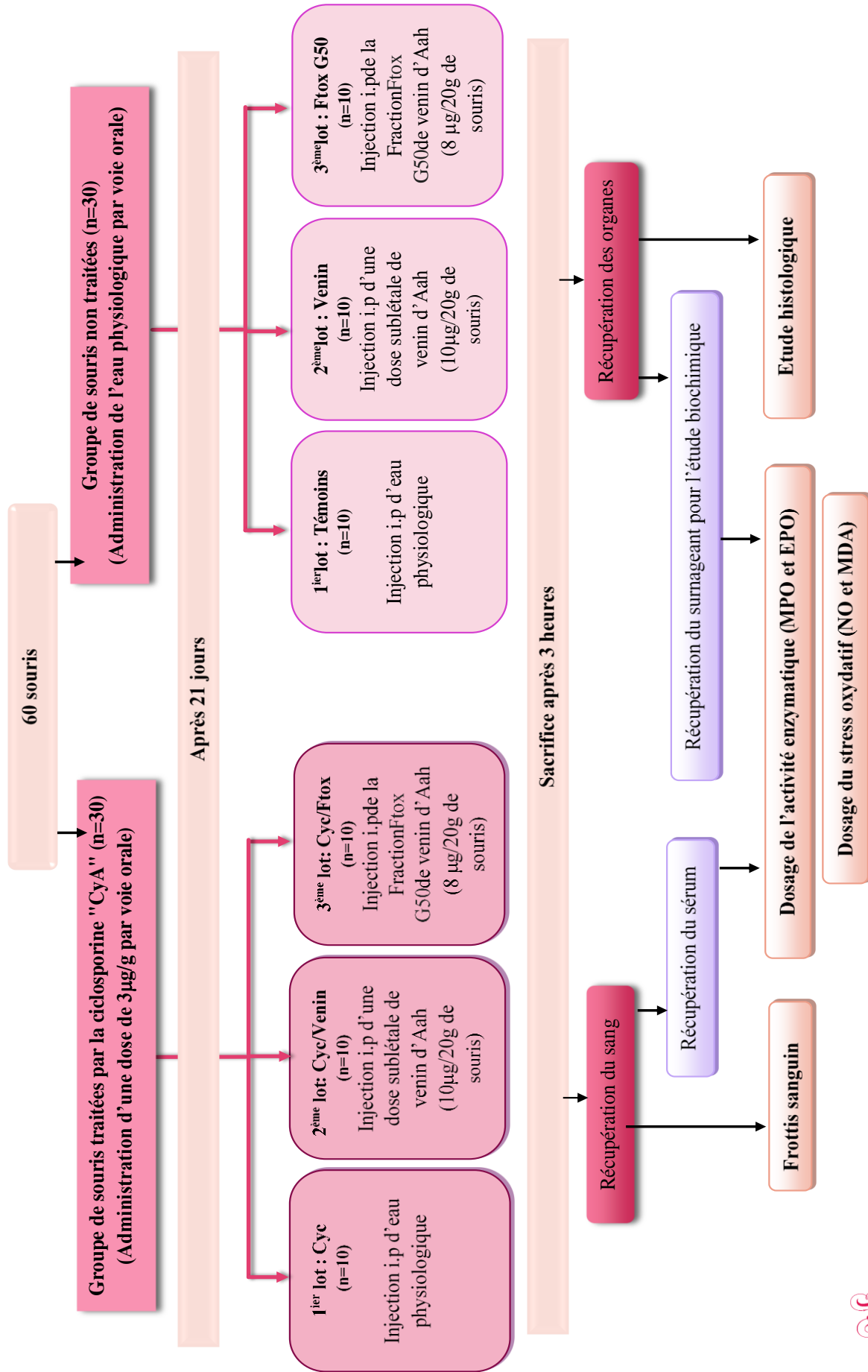


Figure 4. Démarche expérimentale

des séries de congélation et de décongélation pour accentuer la lyse cellulaire et la dégranulation des polynucléaires granulocytes avant qu'il soit centrifugé (10000 g/20 minutes à 4°C) pour la récupération du surnageant (**Annexe II**).

## **II.2.2. Exploration de la réponse immunitaire et inflammatoire**

### **II.2.2.1. Comptage différentiel des leucocytes sur frottis sanguin**

L'analyse du frottis sanguin permet de déterminer quantitativement et qualitativement des éléments figurés présents dans le sang.

Dans cette étude, le frottis sanguin a été effectué pour étudier le recrutement des leucocytes au niveau sanguin ou leur migration vers les tissus après chaque traitement.

Après sacrifice des souris, une goutte de sang de chaque souris a été étalée en couche mince sur des lames porte-objet. Après séchage à l'air libre, les lames ont été fixées avec le May-Grünwald pendant 3 minutes puis avec le colorant Giemsa (dilué à 1/10) pendant 20 minutes. Après coloration, les lames ont été rincées à l'eau courante, séchées et observées au microscope photonique Gx100.

L'examen microscopique a permis de déterminer le pourcentage relatif de chaque type de leucocyte (polynucléaires neutrophiles, lymphocytes et monocytes) par un comptage différentiel portant sur 100 cellules.

### **II.2.2.2. Dosage des marqueurs inflammatoires**

- **Détermination de l'activité de la Myéloperoxydase neutrophile (MPO)**

La myéloperoxydase est une enzyme hémique contenue dans les granules azurophiles des cellules polynucléaires neutrophiles. Elle exerce une action bactéricide et antimicrobienne en produisant des espèces oxydantes telles que l'acide hypochloreux (HClO). Ce dernier est capable de détruire les capsules polysaccharidiques bactériennes résistantes aux enzymes protéolytiques (**Tobler et Koeffler, 1991 ; Klebanoff, 1999**).

Des concentrations élevées en MPO dans le plasma, dans les liquides biologiques et dans les tissus, sont marqueurs d'une activation et une infiltration des neutrophiles (Serteyn et al., 2003).

L'activité de la MPO a été estimée par la méthode colorimétrique de Bradely, 1983. Un volume de 20 µl d'échantillons (sérum ou surnageant d'organes) est homogénéisé avec 960 µl de milieu réactionnel contenant 0,167 mM d'O-dianisidine préparé dans du tris-HCl 50 mM; pH 6,6 et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 8,8 mM) (Annexe II).

L'activité enzymatique a été déterminée en mesurant les variations de l'absorbance (DO) de chaque échantillon toutes les 60 secondes sur une période de 5 minutes à 460 nm et l'activité est exprimée en ΔDO/min/mg de protéines.

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

La peroxydase éosinophile est une enzyme sécrétée par les cellules polynucléaires éosinophiles activées dans des conditions variant d'une inflammation ou une réaction allergique, à une défense antiparasitaire (Gleich, 2000).

Cette enzyme peut avoir comme substrat, le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en présence soit du bromide (Br<sup>-</sup>), du nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), ou du thiocyanate (SCN<sup>-</sup>) pour produire respectivement de l'acide hypobromeux (HOBr), le dioxyde d'azote (NO<sub>2</sub>) et l'acide hypothiocyanite (HOSCN). Ces produits sont des oxydants capables d'engendrer un stress oxydatif au sein d'une cellule ainsi que la lyse de sa membrane plasmique (McCormick et al., 1994 ; Wang et Slungaard, 2006).

Le dosage de la peroxydase éosinophile révèle l'infiltration des éosinophiles et leur activation. Il a été effectué par la micro-méthode colorimétrique de Schneider et al. (1997). Dans une microplaque, 50 µl d'échantillon (sérum ou surnageant) ont été déposés en présence de 100 µl de solution tampon Tris 0,05 M pH 8 contenant l'O- Phényl-enédiamine-Dihydrochloride (OPD) (20 mg) et l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Annexe II).

La plaque a été mise en incubation à l'abri de la lumière pendant une heure à 37°C. L'évaluation de l'activité enzymatique est réalisée après la lecture de l'absorbance à l'aide d'un lecteur de plaques à 490 nm. Les résultats ont été exprimés en ΔDO/min/µg de protéines.

- **Dosage des protéines**

La concentration des protéines dans chaque échantillon (sérum ou surnageant d'organes) a été estimée suivant la méthode de Bradford (1976).

C'est une méthode colorimétrique quantitative basée sur l'utilisation de colorant, le bleu de Coomassie qui forme un complexe avec les acides aminés basiques (arginine, histidine, lysine) et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans les protéines. La formation de ce complexe est proportionnelle à la concentration des protéines et est suivie par l'absorbance à 595 nm (**Bradford, 1976**).

Un volume de 100 µl d'échantillon est mélangé avec 1ml du réactif de Bradford ; l'absorbance est mesurée à 595 nm avec un spectrophotomètre après 2 minutes d'incubation à l'obscurité. La quantité en microgramme des protéines est déterminée par extrapolation des valeurs de l'absorbance des échantillons sur une courbe étalon standard ( $DO=f([BSA \mu g])$ ) obtenue après dilution du sérum albumine bovine (BSA), utilisé comme protéine de référence (**Annexe II et III**).

### **II.2.2.3. Evaluation du stress oxydatif**

Le stress oxydant est caractérisé par un déséquilibre entre la production des espèces réactives de l'oxygène et les capacités antioxydantes de l'organisme. Cet état est observé dans de nombreuses pathologies où des altérations des composants cellulaires, dues aux réactions chimiques des espèces oxygénées réactives avec les lipides, les protéines et les acides nucléiques cellulaires, sont retrouvées (**Michel et al., 2008**).

De multiples structures moléculaires peuvent servir de cible aux espèces oxygénées réactives conduisant alors à différents produits de dégradation dont le dosage permet l'évaluation indirecte du stress oxydatif (**Lefèvre et al., 1998**).

Afin d'évaluer le stress oxydatif induit par le venin d'Aah et sa fraction toxique Ftox G50 en absence ou en présence du prétraitement à la Ciclosporine, deux médiateurs pro-oxydants ont été dosés, les nitrites résiduels et le malondialdéhyde qui est un marqueur de la peroxydation lipidique.

- **Dosage du Malondialdéhyde (MDA)**

Le malondialdéhyde est l'un des produits terminaux formés lors de la décomposition des acides gras polyinsaturés, une décomposition médiée par les radicaux libres qui sont générés lors du stress oxydatif (**Favier, 1997**).

Ce phénomène est évalué grâce à un test colorimétrique quantitatif en utilisant l'acide thiobarbiturique (TBA). La technique est fondée sur la détermination de la concentration en malondialdéhyde (MDA), le produit final de la peroxydation lipidique. Le MDA forme en présence du TBA, dans un milieu acide et à haute température, un complexe de pigmentation rose dont l'optimum de son absorbance est lu à 532 nm (**Kummar et al., 2003**).

Les concentrations en malondialdéhyde ont été mesurées dans le sérum. Après avoir déprotéinisé les échantillons par l'acétonirile, 100 µl de chaque échantillon est mélangé avec 375 µl de l'acide acétique (pH 3,5) à 20%, 50 µl de sodium dodécylsulfate (SDS) à 8,1% préparé dans l'acide acétique, 375 µl de TBA à 0,8% et 100 µl d'eau distillée. Le mélange est chauffé à une température de 95-100°C pendant une heure puis directement refroidie dans un bain glaciale. La DO est par la suite mesurée à 532 nm et les résultats sont exprimés par UDO/mg de protéines (**Annexe II**).

- **Dosage du Monoxyde d'Azote (NO)**

L'oxyde nitrique (NO) joue un rôle clé dans les mécanismes physiologiques, et dans un état pathologique, tel qu'une inflammation, sa production est augmentée. C'est une molécule instable qui se transforme dans l'organisme en nitrites (NO<sub>2</sub>) et nitrates (NO<sub>3</sub>) en présence d'oxygène. Ces deux métabolites, beaucoup plus stables, constituent un moyen indirect pour doser la production du NO dans les milieux biologiques (**Navarro-Gonzalvez et al., 1998**).

La production de NO dans le sérum et les surnageants des organes, a été évaluée par la détermination de la concentration de son métabolite physiologiquement stable, les nitrites (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>). Les teneurs en nitrites ont été évaluées selon la méthode de Griess (**Green et al., 1981 ; Sun, 2003**).

Les échantillons ont été déprotéinisés par l'acétonirile (v/v) ensuite déposés dans une microplaque de 96 puits à raison de 50 µl/puits, le réactif de Griess (2% de sulfanilamide et 0.1 % naphthyl-enediamine hydrochloride dans l'acide orthophosphorique) est rajouté dans chaque puits. Après une incubation de 20 minutes à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 540 nm en utilisant un lecteur de microplaques. La détermination de la concentration des nitrites a été faite par extrapolation de la valeur des DO obtenues sur la courbe étalon de la DO en fonction de la concentration de NaNO<sub>2</sub> (**Annexe II et III**).

### II.2.3. Etude histologique

Une étude anatomopathologique des poumons a été entreprise dans le but de mettre en évidence les altérations tissulaires engendrées par le venin d'Aah et la fraction Ftox G50 en présence et en absence de prétraitement par la ciclosporine.

Les organes ont été prélevés et lavés soigneusement dans le tampon PBS puis immédiatement fixés dans un fixateur tamponné (formaldéhyde 4% préparé dans du PBS de 0,1M à pH 7,4) pendant 24 à 48 heures. Après fixation, ils ont été déshydratés dans des bains d'alcool de concentrations croissantes (70°, 90° et 100°) puis éclaircies par deux bains de xylène de 15 minutes chacun. Après cette étape, les organes ont été imprégnés directement dans de la paraffine fondue à 60°C durant 24 heures.

Après l'étape de l'enrobage dans la paraffine, les organes ont été confectionnés en blocs et ajustés aux cassettes pour être coupés à l'aide de microtome en coupes régulières de 3 µm. Les coupes ont été étalées sur des lames de verre, déparaffinées, réhydratés avant d'être colorées à hématoxyline-éosine qui colorent le noyau en violet et le cytoplasme et en rose. Le montage des coupes a été réalisé à l'aide d'Eukit, afin d'éviter leur dessèchement. L'étape de confection des coupes ainsi que la coloration ont été réalisées au niveau du laboratoire d'Anatomie Pathologique du service de Cytologie au niveau de Centre Hospitalier Universitaire Nafissa Hamoud.

L'observation microscopique et la prise des photos ont été réalisées à l'aide d'un appareil photo couplé au microscope optique (Motic digital microscope B1) au niveau du laboratoire de Biochimie, Immunologie et biothérapie innovante de l'USTHB et cela au grossissement x 40.

### II.2.4. Expression statistique des résultats



Tous les résultats ont été exprimés en moyenne  $\pm$  écart type, et la comparaison entre les différentes moyennes a été effectuée par le test de Student à l'aide du logiciel SPSS.

La comparaison des moyennes a été effectuée d'une part, entre le lot témoin injecté par l'eau physiologique et celui injecté par le venin d'Aah et la fraction Ftox G50 pour le groupe non traité par la ciclosporine et dont la signification statistique est représentée par un astérisque (\*) et d'autre part, entre les lots injectés par le venin et la fraction des groupes traités et non traité par la ciclosporine, la signification statistique pour ces derniers est exprimée par un carré (#).

Le degré de la signification statistique est en fonction de la valeur de la probabilité P, il est :

Significatif (\* ou #) si  $p < 0,05$

Très significatif (\*\* ou ##) si  $p < 0,01$

Hautement significatif (\*\*\*) ou ####) si  $p < 0,001$

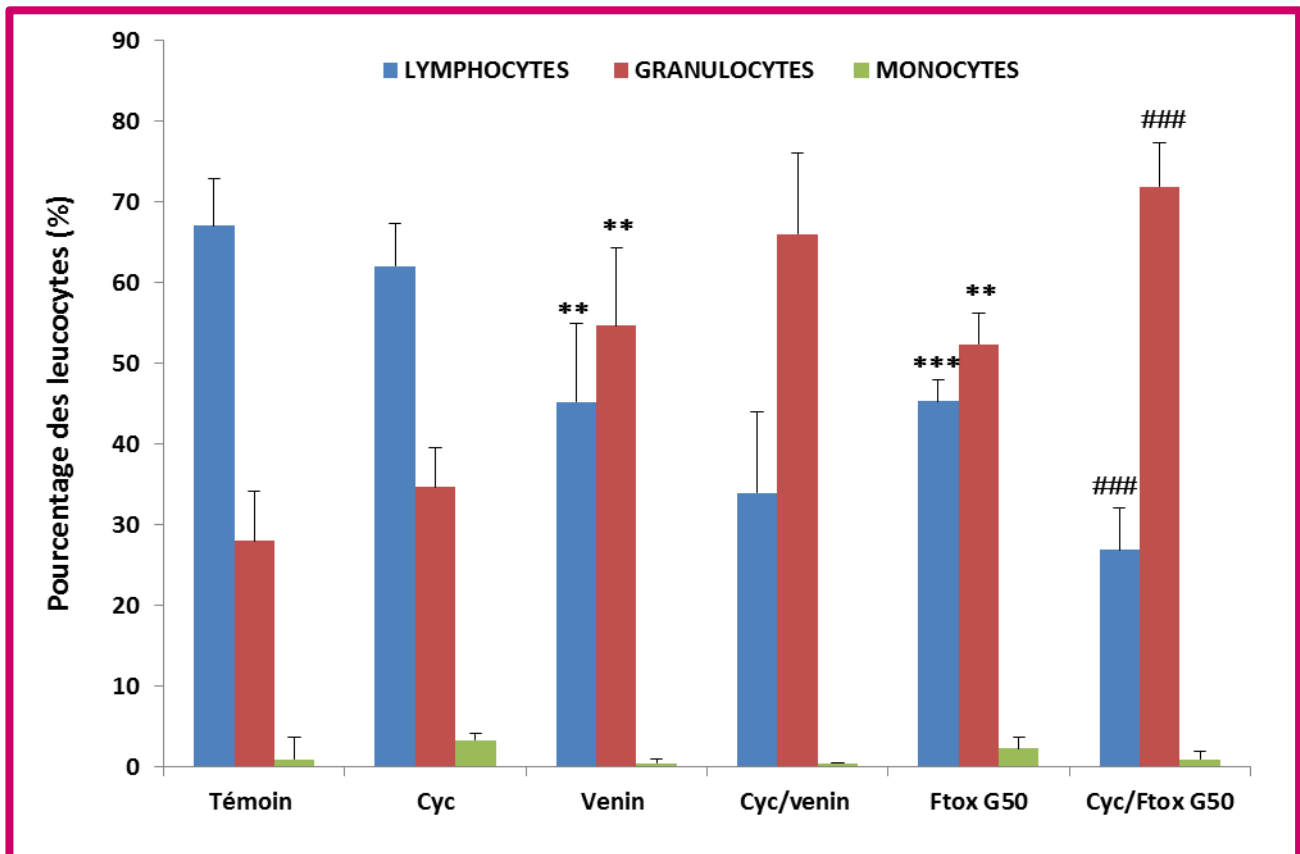


# Résultats et Discussion



## III.1. Effet de la ciclosporine sur la migration des leucocytes vers le sang périphérique induite par le venin et sa fraction toxique

Dans le but d'évaluer l'effet du prétraitement à la ciclosporine sur le flux des leucocytes dans le sang des souris envenimées par une dose sublétales du venin de l'Aah (10 µg/20g) ou de sa fraction toxique Ftox G50 (8 µg/ml), le pourcentage relatif des différentes leucocytes sanguins (polynucléaires, lymphocytes et monocytes) a été établi à partir de frottis sanguins.



**Figure 6.** Effet de la ciclosporine sur la migration des leucocytes vers le sang périphérique induite par le venin et sa fraction toxique

Chez les souris injectées avec une dose sublétales du venin d'Aah, une diminution très significative ( $P=0.001$ ) du pourcentage des lymphocytes ( $45,248 \pm 9,634$ ) a été observée en comparaison au lot témoin ( $67 \pm 5,788$ ) ; alors que le pourcentage des granulocytes ( $54,653 \pm 0,0015$ ) quant à lui a augmenté de façon moyennement significative ( $P= 9,706$ ) par rapport au témoin ( $28 \pm 6,2024$ ). Un profil comparable à celui du venin a été observé avec la fraction Ftox G50 ; une diminution hautement significative ( $P= 0.0004$ ) du pourcentage de lymphocytes

(45,333± 2,666), accompagné d'une augmentation moyennement significative (P= 3,833) de celui des granulocytes (52,333± 3,833) (**Figure 6**).

Ces résultats obtenus avec le venin et la fraction corroborent avec ceux obtenus par des études antérieures indiquant que le venin d'Aah provoque une hyperleucocytose à prédominance granulocytaire (neutrophilique) au niveau du sang périphérique avec un pic obtenu entre 2 et 4 heures post-injection selon le mode d'injection ( **Hammoudi-Triki et al., 2007 ; Adi-Bessalem et al., 2008 ; Sami-Merah et al., 2008** ).

Une infiltration similaire des cellules immunitaires a été observée dans différents modèles expérimentaux envenimés par d'autres venins de scorpion ou des toxines purifiées (**Rodríguez et al., 2015 ; Medjadba et al., 2015** ).

En effet, la diminution des lymphocytes vs les granulocytes suite à l'injection du venin pourra être expliquée aussi par la migration des lymphocytes du compartiment sanguin vers les tissus et organes lymphoïdes secondaires sièges de réponse immunitaire inflammatoire.

Par ailleurs, chez le lot prétraité à la ciclosporine et injecté par la Ftox G50, le pourcentage des lymphocytes (26,888±5,185) a diminué de manière hautement significative (P=0.0001) tandis que le pourcentage des granulocytes (71,888±5,481) a connu une augmentation hautement significative (P=0.0001) comparativement au lot non traité (**Figure 6**).

Le lot prétraité à la ciclosporine et injecté par le venin d'Aah a révélé un profil similaire à celui rencontré pour la fraction, une diminution du pourcentage des lymphocytes avec une augmentation des granulocytes qui reste statistiquement non significatif. La migration des monocytes vers le sang périphérique n'a pas connus de variations significatifs à travers les différents lots (**Figure 6**).

Les résultats trouvés dans cette étude sont en accord avec ceux notés par **Kabrine et Laraba en 2014** qui ont démontré qu'un prétraitement de 21 jours avec la tacrolimus (inhibiteurs spécifique des lymphocytes T) administrée à une dose de 1mg/kg a diminué significativement la migration des leucocytes vers les tissus, 30 minutes et 3 heures après l'injection du venin et ce qui augmente leur concentration au niveau du sang périphérique (**Kabrine et Laraba, 2014** ).

La ciclosporine inhibe la différenciation et l'activation des lymphocytes en bloquant les voies de signalisation indispensables à ces phénomènes. Elle exerce son action

immunosuppressive en bloquant la voie MAP Kinases P38 et JNK, impliquées dans la transcription des gènes qui codent pour les cytokines pro-inflammatoires chez les lymphocytes, en l'occurrence ceux de l'IL-1, l'IL-2, IL-6 et le TNF $\alpha$  (**Dong et al., 2000 ; Matsuda et Koyasu, 2000 ; Kumar et al., 2003**). Cela pourra expliquer d'une part la diminution de pourcentage de lymphocytes sous l'effet du prétraitement mais d'autre part révèle une probable implication de ces leucocytes au cours de la réponse immunitaire induite par le venin d'Aah.

L'IL-1 demeure une cytokine clé dans le phénomène de migration leucocytaire, elle augmente l'expression des facteurs d'adhésion sur les cellules endothéliales ce qui facilite l'infiltration des leucocytes par diapédèse (**Dinarello et al., 2011 ; Schett et al., 2013**). L'inhibition des voies de signalisation aboutissant à la transcription de l'IL-1 par la ciclosporine influence directement la migration des leucocytes et explique probablement les résultats obtenus pour le prétraitement.

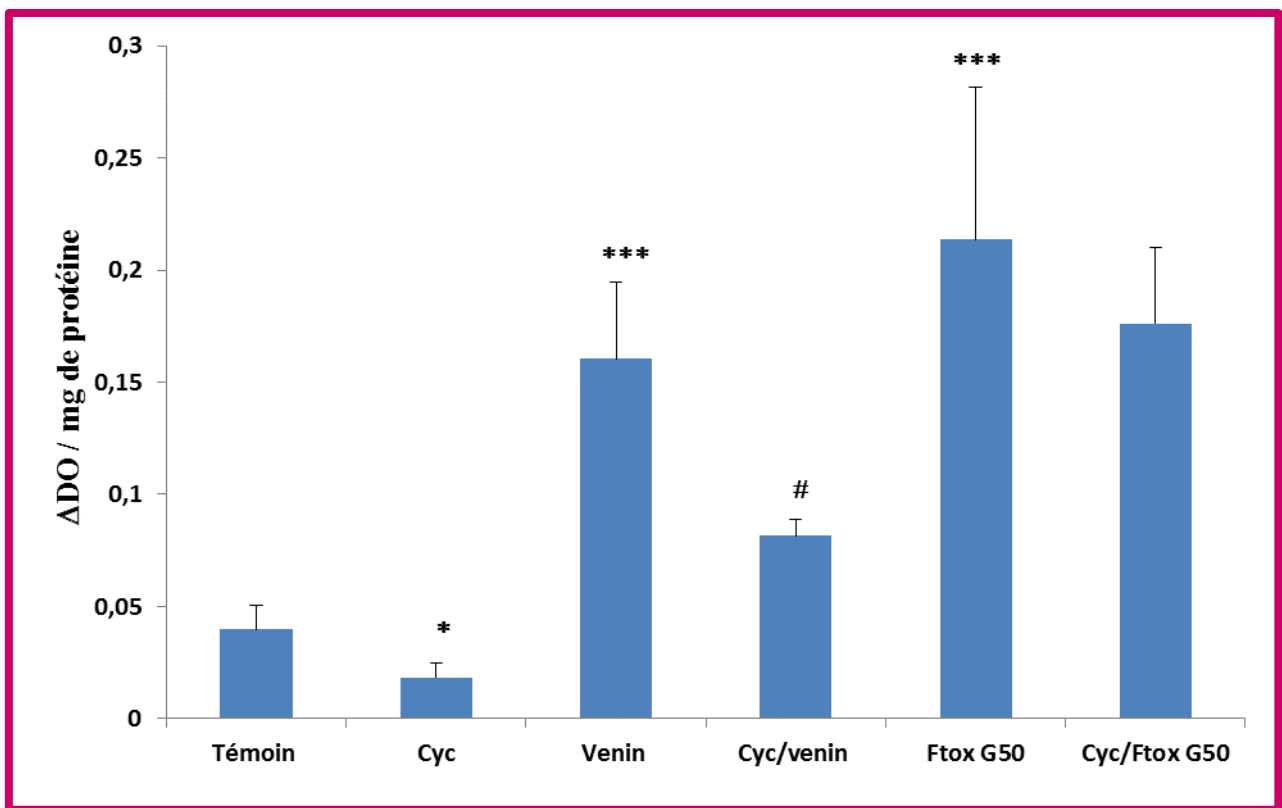
En effet, l'inhibition des lymphocytes T par la ciclosporine diminue le processus inflammatoire général d'où son utilisation, en dehors des greffes d'organes, dans le traitement de plusieurs pathologies inflammatoires notamment les connectivites telles que la polyarthrite rhumatoïdes, le syndrome néphrotique, uvéite (maladie de Behçet) et le psoriasis, il a été démontré que le traitement par la ciclosporine réduit significativement les signes inflammatoire et l'infiltration leucocytaire dans les tissus foyers inflammatoires, observée au cours de ces maladies (**Patil et al., 2012 ; Soriano et al., 2015 ; Kumar, et al., 2016**). Ces constatations peuvent expliquer en partie l'augmentation des granulocytes dans le compartiment sanguin lors de l'injection du venin ou de la Ftox G50 aux lots prétraités, les granulocytes se concentrent dans le sang périphérique qui reflète la diminution de leur migration vers les tissus.

### **III.2. Effet de la ciclosporine sur la dégranulation des polynucléaires neutrophiles induite par le venin et sa fraction toxique**

La migration des leucocytes du compartiment vasculaire, vers le site de lésion est un événement clé dans l'inflammation. Les polynucléaires neutrophiles sont les premières cellules leucocytaires qui arrivent aux sites de l'infection. Ces cellules, impliquées à la fois dans l'immunité innée et adaptative, participent crucialement à la physiopathologie de l'envenimation par son pouvoir phagocytaire, la libération des médiateurs chimioattractant ainsi que ses capacités cytotoxique assurées par son arsenal enzymatique.

La MPO est la protéine majeure des granules cytosoliques des neutrophiles. Cet enzyme est l'un des acteurs clé dans les fonctions de ces granulocytes (Odobasic et al., 2016). Elle est rapidement libérée par les neutrophiles suite à leur activation et dégranulation (Bentwood and Henson, 1980 ; Van der Veen et al., 2009 ; Odobasic et al., 2013).

Plusieurs études ont montré que le venin d'Aah et ses fractions toxiques et non toxiques activent les polynucléaires neutrophiles et stimulent la dégranulation rapide et massive de ces cellules dès les premières heures de l'envenimation ce qui augmente l'activité de l'MPO (Adi-Bessalem et al., 2008 ; Sami-Merah et al., 2008 ; Raouraoua-Boukari et al., 2012).

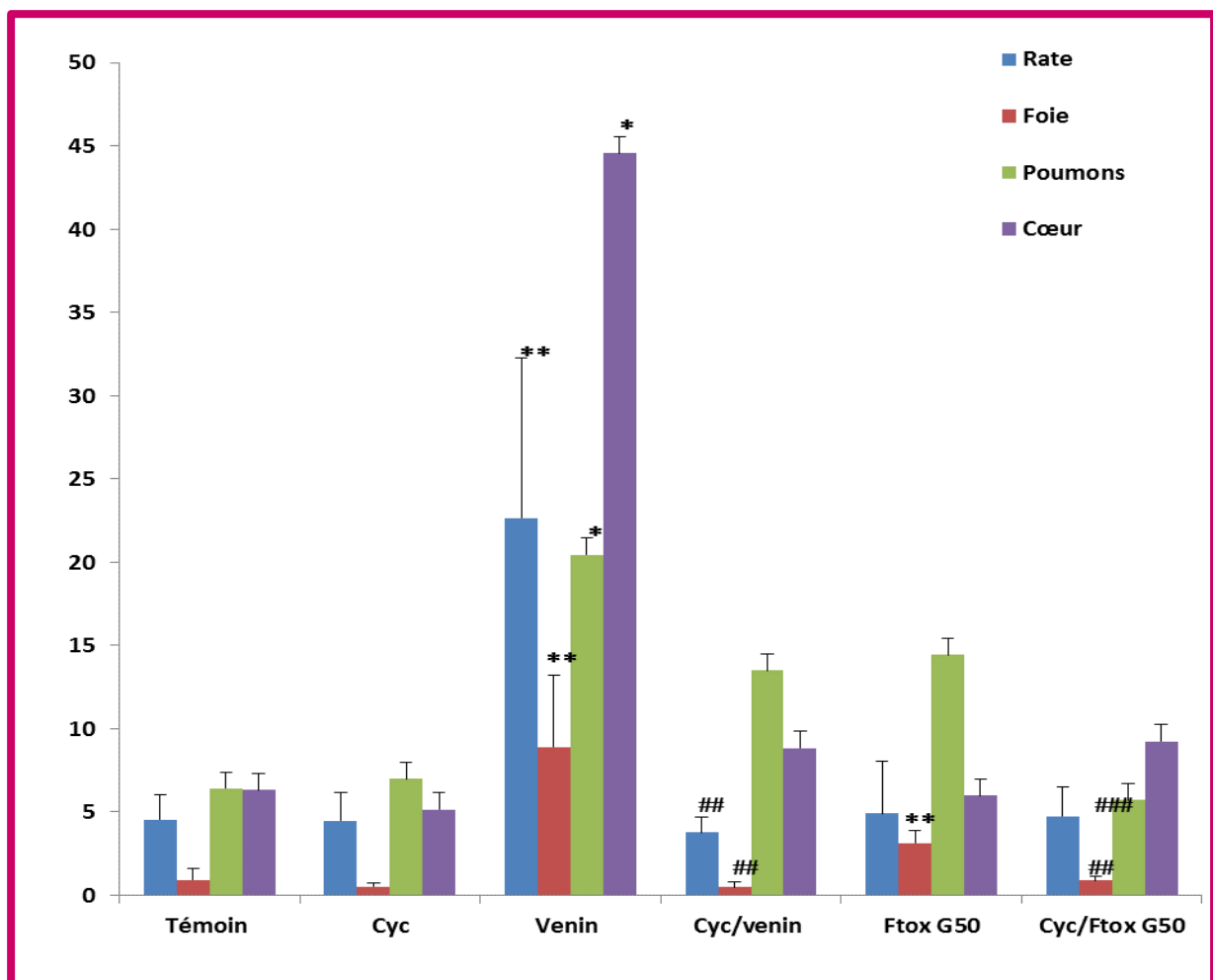


**Figure 7.** Effet de la ciclosporine sur la dégranulation des polynucléaires neutrophiles induite par le venin et sa fraction toxique au niveau sérique

Les résultats obtenus dans notre étude viennent confirmer ces aboutissements. L'injection du venin d'Aah et la Ftox G50 augmente d'une manière hautement significative l'activité de la MPO sérique, 3 heures après injection, par rapport au témoin qui enregistrant une activité de  $0,039 \pm 0,010$  contre  $0,160 \pm 0,034$  ( $P= 1,08.10^{-6}$ ) et  $0,213 \pm 0,068$  ( $P=1,21.10^{-5}$ ) pour le venin et la fraction respectivement (Figure 7).

Cependant, le prétraitement à la ciclosporine a réduit significativement ( $P= 0,015$ ) cette activité lors de l'injection du venin d'Aah ( $0,081 \pm 0,007$ ) et non significativement pour l'injection de la fraction toxique ( $0,17 \pm 0,03$ ) (**Figure 7**). Cela rejoint les résultats enregistrés avec la tacrolimus où une diminution significative de l'activité MPO sérique a été enregistrée 30 minutes et 3 heures après l'injection du venin d'Aah (**Kabrine et Laraba, 2014**).

Les résultats obtenus démontrent d'une part, l'effet modulateur indirect de la ciclosporine sur l'activation des polynucléaires neutrophiles par une probable action de lymphocyte T et d'une autre part l'implication de ces derniers dans la réponse inflammatoire induite par le venin d'Aah.



**Figure 8.** Effet de la ciclosporine sur la dégranulation des polynucléaires neutrophiles induite par le venin et sa fraction toxique au niveau des surnageants d'organes

En outre, l'activité de la MPO a aussi été mesurée aux niveaux des surnageant des homogénats de rates, en tant qu'organe lymphoïde lieu de la réponse immunitaire, mais également dans les poumons, cœurs et foies en tant qu'organes sièges important de l'inflammation et l'infiltration leucocytaire au cours de l'envenimation scorpionique. Dans des modèles expérimentaux d'envenimation par le venin total d'Aah, sa fraction toxique ou par ses toxines purifiées (Aah I et II), une inflammation leucocytaire à prédominance lymphocytaire et neutrophilique à été décrite, avec un pic de l'activité MPO situé entre 30 minutes à 6 heures post injection. Suivant le mode d'injection utilisé, l'infiltration est plus rapide pour une injection i.p que celle d'une injection sous cutané (**Adi-Bessalem et al., 2008 ; Sami-Merah et al., 2008 ; Medjadba et al., 2015** ).

Les résultats obtenus corroborent avec ceux cités précédemment, l'injection de souris avec la dose sub létale du venin a provoqué une augmentation significative de l'activité de la MPO au niveau des organes étudié et de façon très significative dans la rate ( $22,659 \pm 9,592$  ;  $P=0,005$ ) et le foie ( $8,906 \pm 4,327$  ;  $P=0,006$ ). Le prétraitement à la ciclosporine a considérablement réduit cette activité au niveau de ces organes (**Figure 8**).

Chez les souris envenimées par la fraction toxique, les résultats ont déployés une allure semblable au venin avec une augmentation moyennement significative ( $P=0,006$ ) de l'activité de la MPO neutrophile au niveau du foie ( $3,127 \pm 0,765$ ) comparativement au lot témoin ( $0,930 \pm 0,691$ ). Cette augmentation est diminuée chez le lot prétraité à la ciclosporine de façon hautement significative ( $P=3,69.10^{-5}$ ) au niveau des poumons ( $5,721 \pm 1,262$ ) (**Figure 8**).

L'axe lymphocytes T- neutrophiles au cours d'un processus inflammatoire reste méconnu. Néanmoins, certaines études ont signalés l'importance des cytokines pro-inflammatoires libérées par les lymphocytes T dans l'activation des neutrophiles en réponse à certaines infections bactériennes ou au cours de certaines pathologies telles que l'asthme et l'allergie (**Walker et al., 2013 ; Artis et Spits, 2015 ; Tait Wojno, 2016** ).

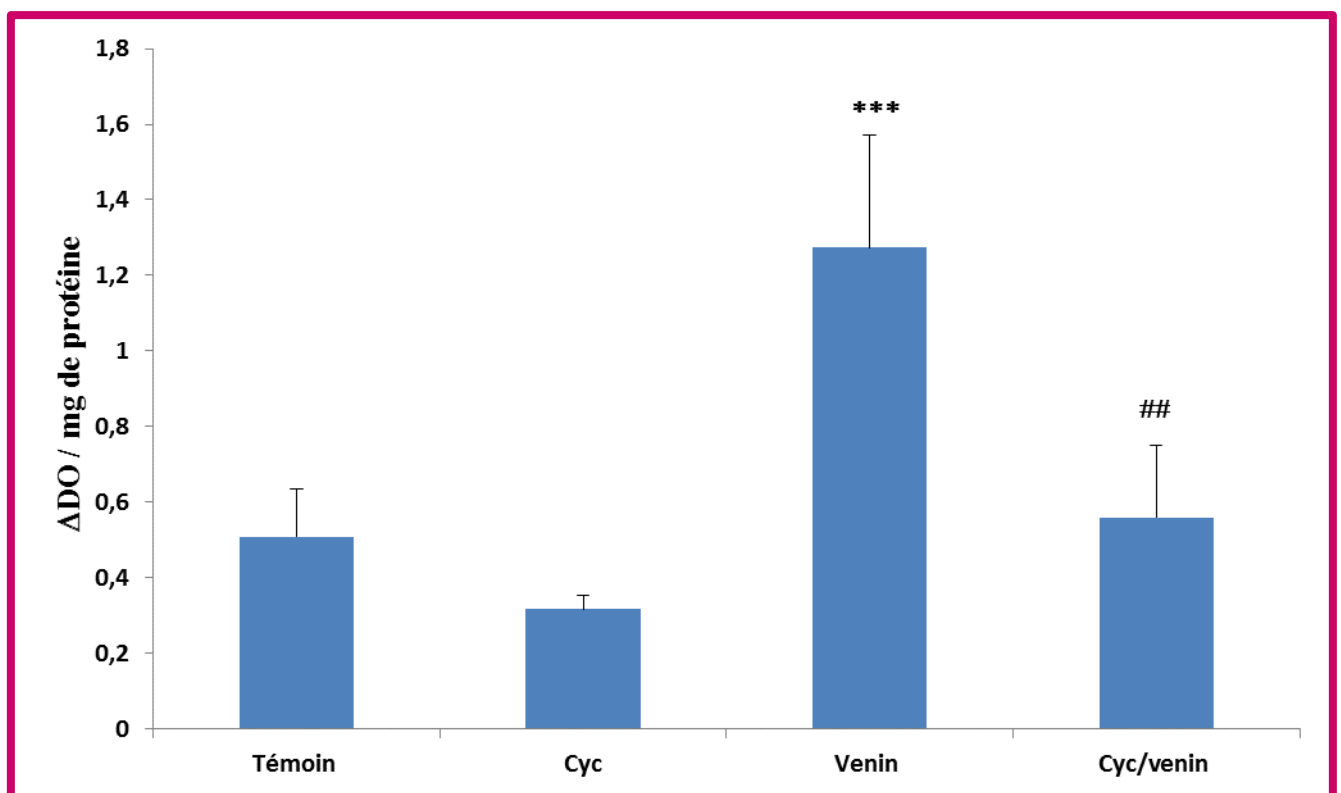
A titre d'exemple, les cytokines de la voie Th2 (IL-5, IL-6, IL-10 et l'IL-13) sont indispensables et induisent l'activation des polynucléaires éosinophiles (**Tao et al., 1997 ; So et al., 2006 ; O'Shea et al., 2010**). La transcription de ces cytokines est médiée par des facteurs de transcription, JNK et NFAT, et des voies de signalisation sensibles à l'action de la ciclosporine (**Rao et al., 1997 ; Shigeo et Satoshi, 1999**).



L'inhibition des lymphocytes T ainsi leurs cytokines par la ciclosporine pourrait expliquer la baisse enregistrée dans l'activation et la dégranulation des neutrophiles en réponse au venin et à sa fraction toxique, enregistrée pour les lots prétraités. Elle révèle également l'implication et la collaboration existant entre les lymphocytes T et les neutrophiles dans la genèse de l'inflammation suite à l'envenimation scorpionique. Elle laisse à proposer qu'une partie de l'activation et l'infiltration des neutrophiles en réponse au venin d'Aah est probablement assurée par une implication indirecte des lymphocytes T par le biais des cytokines qui offre aux polynucléaires neutrophile un environnement cytokinique favorable à leur activation.

### III.3. Effet de la ciclosporine sur la dégranulation des polynucléaires éosinophiles induite par le venin

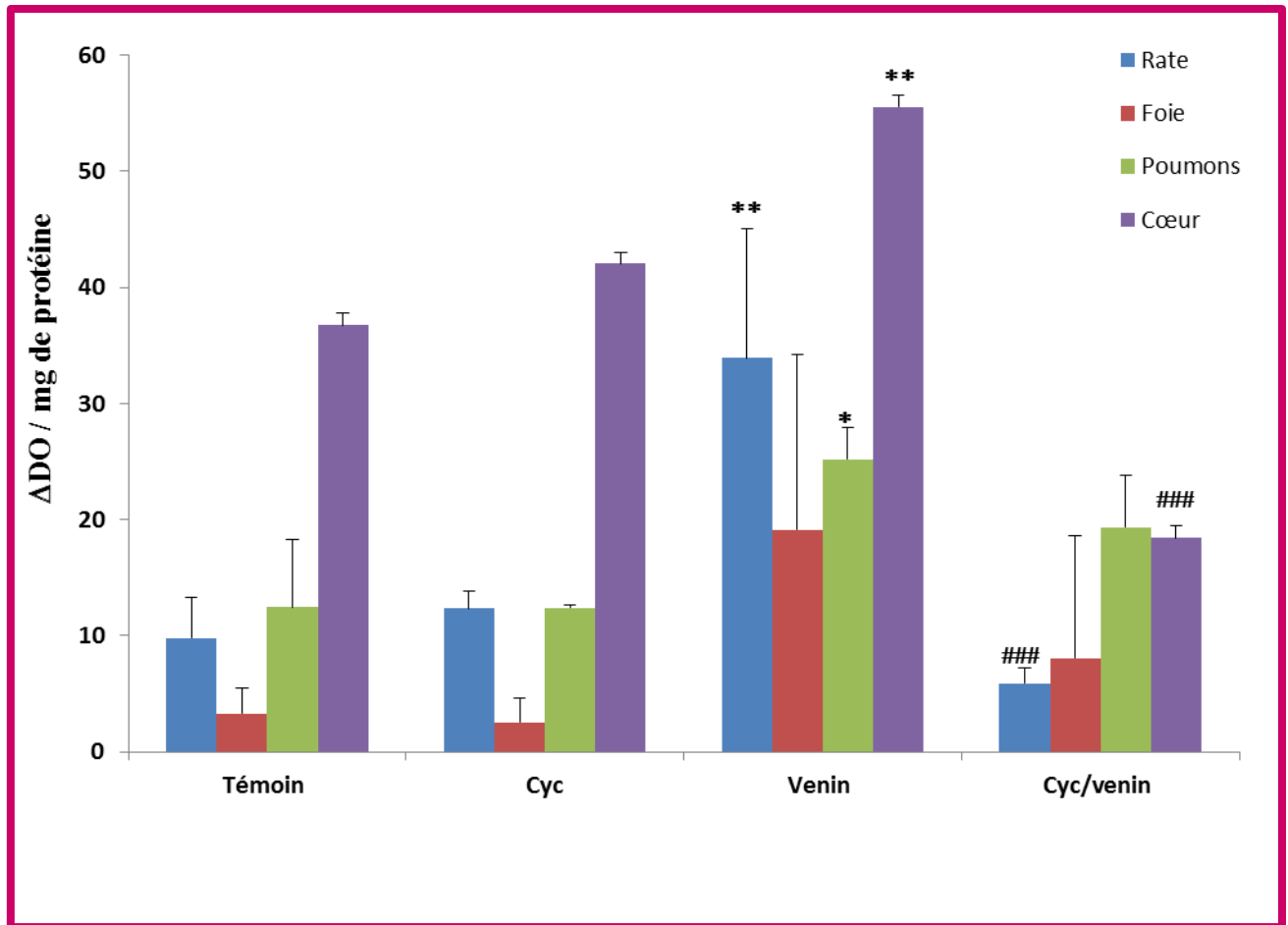
Les polynucléaires éosinophiles sont des cellules classées comme appartenant à la réponse immunitaire innée, elles jouent un rôle primordial dans certains mécanismes de défense essentiellement lors de la réponse antiparasitaire, inflammatoire et allergique.



**Figure 9.** Effet de la ciclosporine sur la dégranulation des polynucléaires éosinophiles induite par le venin au niveau sérique

L'EPO est une enzyme typique des polynucléaires éosinophiles, elle est qualifiée comme un marqueur de l'inflammation et de la de séquestration des éosinophiles au niveau tissulaire (Hogan et al., 2014 ; Kawa et Janson, 2016).

Chez les souris injectées par le venin de l'Aah, l'activité de l'EPO sérique ( $1,27 \pm 0,29$ ) est augmentée de manière hautement significative ( $P= 0,0007$ ) comparativement au lot témoin ( $0,507 \pm 0,126$ ) (Figure 9).



**Figure 10.** Effet de la ciclosporine sur la dégranulation des polynucléaires éosinophiles induite par le venin au niveau des surnageants d'organe

En plus, l'activité EPO a été déterminé au niveau des surnageants de la rate, le foie, les poumons et le cœur. Les résultats obtenus ont appuyé la dégranulation des polynucléaires neutrophiles suite à leur réponse *vis-à-vis* de constituants du venin d'Aah. Cette activité est augmentée après injection i.p du venin par rapport aux témoins qui ont reçu une injection de l'eau physiologique par la même voie (Figure 10).

L'augmentation est moyennement significative pour la rate et le cœur ; elle augmente dans la rate de  $9,79 \pm 3,55$  pour le témoin à  $33,93 \pm 11,17$  pour l'envenimé avec une  $P=0,001$ . Elle enregistre dans le cœur une élévation moyennement significative ( $P=0,005$ ) de  $(55,53 \pm 15,83)$  contre un témoin de  $(36,76 \pm 17,04)$ . L'activité EPO augmente significativement dans les poumons, elle est de  $(25,21 \pm 2,72)$  pour le venin par rapport au témoin  $(12,48 \pm 5,84)$  (**Figure 10**).

En effet ces obtentions corrélerent avec ceux déjà démontrés, le venin d'Aah a comme effet d'induire une migration des polynucléaires éosinophiles vers les sites inflammatoires et la dégranulation de ces cellules. Ce phénomène se traduit par une augmentation de l'activité EPO au niveau sérique mais également dans le surnageant des organes principalement les poumons, le cœur, le foie et les reins (**Adi-Bessalem et al., 2008 ; Adi-Bessalem et al., 2011 ; Lamraoui et al., 2015 ; Medjadba et al., 2015**).

L'injection d'une dose sublétales du venin d'Aah, sa fraction toxique et non toxique Ftox G50 et F1 respectivement ont engendré une hausse significative de l'activité EPO dans le cœur, le liquide intrapéritonéale et broncho-pulmonaire (**Adi-Bessalem et al., 2011 ; Sami-Merah et al., 2008 ; Yousfi-Chair et al., 2015**).

Par ailleurs, le prétraitement à la Ciclosporine a réduit cette activité de façon moyennement significative ( $0,559 \pm 0,190$ ) ( $P=0,002$ ) au niveau sérique (**Figure 8**). Ce résultat s'accorde avec celui obtenu avec la tacrolimus, le prétraitement avec cet immunosuppresseur a diminué d'une manière hautement significative l'activité EPO dans le sérum des souris suite à l'injection du venin d'Aah, cet effet a été remarqué 30 minutes après l'injection et s'étale jusqu'à 24 heures post injection (**Kabrine et Laraba, 2014**).

En plus, la ciclosporine a baissé d'une attitude hautement significative au niveau de la rate ( $5,89 \pm 1,27$ ) et le cœur ( $18,44 \pm 5,80$ ) avec une ( $P= 0,0004$ ) et ( $P= 0,0006$ ) respectivement par rapport au lot injecté seulement par le venin sans le prétraitement (**Figure 10**).

A la base de ces résultats, on peut suggérer que la ciclosporine influence le déroulement de la réponse immunitaire au niveau de la rate, elle exerce probablement un effet inhibiteur sur l'activité des polynucléaires neutrophiles en réduisant leur dégranulation ainsi leur infiltration vers dans les tissus pulmonaires, cardiaque et hépatique expliquant de ce fait la baisse de l'activité EPO dans ces organes.

La ciclosporine cible principalement les lymphocytes T, elle inhibe la différenciation de ces cellules en bloquant deux voies indispensables à l'activation et à la transcription des cytokines pro-inflammatoires, c'est les voies calcineurine-NFAT et P38 et JNK. Ces cytokines ont une action importante sur les autres cellules durant la réponse immunitaire, en particulier au cours de l'inflammation (**Koyasu et Matsuda, 2000**).

Des études portant sur la compréhension des mécanismes moléculaires dirigeant l'activation des polynucléaires éosinophiles dans certaines pathologies inflammatoires, telle que l'asthme, ont décrit que les cytokines de la voie Th2 spécifiquement l'IL-5, IL-13 et IL-4 sont des promoteurs indispensables à la l'activation et la dégranulation des éosinophiles et sont responsables à l'éosinophilie observée au cours de ces pathologies (**Perkins et al., 2006 ; Kawa et Janson, 2016**). La diminution de ces cytokines sous l'effet de la ciclosporine influence les éosinophiles et limite leur activation en réponse à l'injection du venin d'Aah.

En effet, L'inhibition des lymphocytes T, une source extrêmement importante de cytokines peuvent donner une explication pronostique de la baisse rencontrée dans l'activité de l'EPO après prétraitement par la ciclosporine. Cette suggestion est confortée par des études antérieures qui mettent en évidence l'implication des cytokines de la voie Th2 dans la réponse immunitaire induite par le venin d'Aah ou d'autres espèces de scorpions (**Petricevich et Peña, 2002 ; Adi-Bessalem et al., 2008 ; Ladjel-Mendil et al., 2012 ; Adi-Bessalem et al., 2015**).

#### **III.4. Effet de la ciclosporine sur le stress oxydatif induit par le venin et sa fraction toxique**

La réponse inflammatoire observée lors de l'envenimation scorpionique est l'action synergique des cellules inflammatoires, d'enzyme et de divers métabolites, responsables de la perturbation de l'homéostasie et des troubles rencontrés lors des envenimations. En effet, les venins de scorpions peuvent stimuler la génération des espèces réactives oxygénées qui engendrent un déséquilibre avec une superproduction de radicaux libres et/ou une défaillance des systèmes antioxydants qui mène à des altérations structurelles et fonctionnelles (**Nouira et al., 2005 ; De Matos et al., 2001 ; Petricevich , 2010 ; Adi-Bessalem et al., 2015** ).

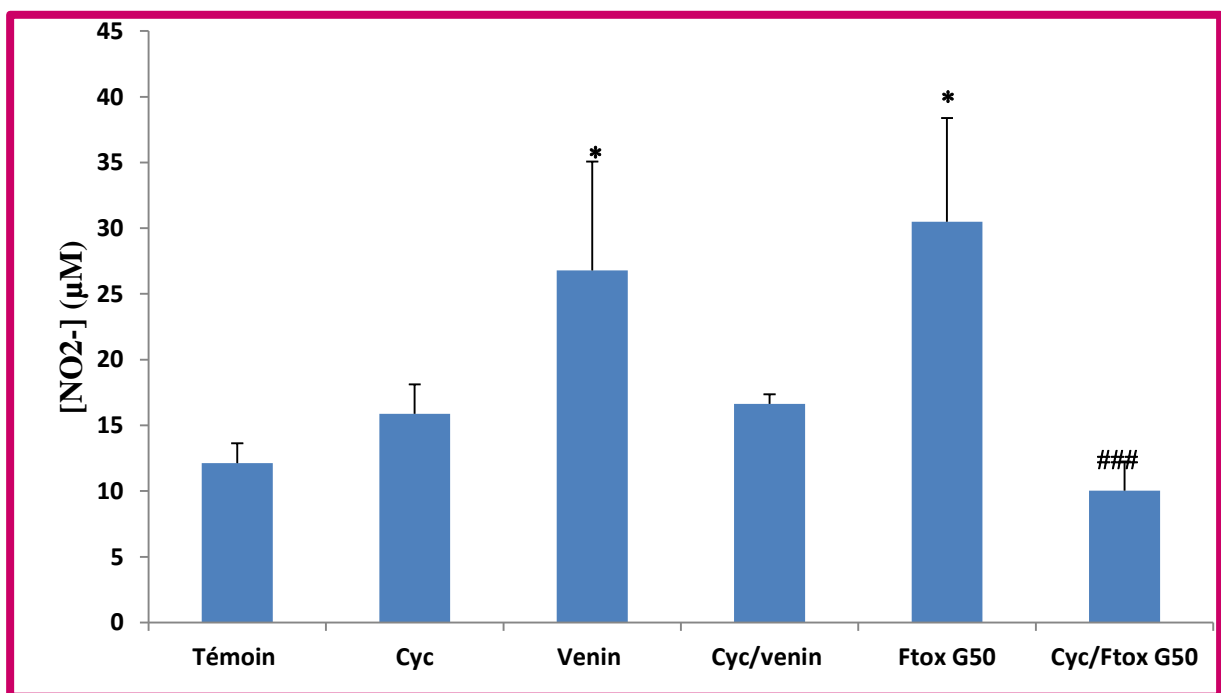
Afin d'évaluer l'effet de la ciclosporine sur le stress oxydatif induit par le venin ou sa fraction Ftox G50, nous avons dosé dans le sérum deux médiateur du système pro-oxydant : le NO en évaluant le taux de son dérivé oxygéné les nitrites, ainsi que le MDA qui indique une peroxydation lipidique.

## III. 4.1. Evaluation de taux des nitrites résiduels

Le dosage des nitrites résiduels est une évaluation indirecte du taux de NO, cette espèce réactive d'oxygène est impliqué dans de nombreux processus physiologiques tels que la vasodilatation, la régulation de la tension artérielle, la neurotransmission et les réactions inflammatoires et immunitaires (Petricevich, 2004). Cependant, il joue également un rôle important au cours des processus pathologiques tel que l'envenimation scorpionique (Moncada et al., 1991, Davies et al., 1995, Pessini et al., 2006, Petricevich, 2010).

Le NO est formé par des enzymes NO Synthase, Trois isoformes de NO Synthase ont été décrites ; NOs n (NOs neuronales ou type 1), NOs e (NOs endothéliales ou type 3) et NOs i (NOs inductible ou type 2). Les types 1 et 3 sont des isoformes constitutives, calcium dépendantes et produisant de faibles quantités de NO à l'état basal (de l'ordre de la  $\mu\text{M}$ ) (Davies et al., 1995).

Tandis que le type 2 est une isoforme inductible, calcium indépendante et pouvant produire d'importantes quantités de NO, retrouvée essentiellement dans les cellules immunitaire, notamment le macrophage et constitue une arme indispensable à la fonction de défense (Davies et al., 1995 ; Sennequier et Vadon Le Goff, 1998).



**Figure 11.** Effet de la cyclosporine sur la production du NO au cours de la réponse immunitaire induite par le venin et sa fraction toxique

Le venin d'Aah et la fraction toxique ont provoqué, après 3heures d'injection, une augmentation significative de  $(26,79 \pm 8,27)$  et  $(30,5 \pm 7,87)$  respectivement ( $P= 0,04$  et  $0,01$ ) du taux de nitrites face au lot témoin  $(12,12 \pm 1,5)$  (**Figure 11**). L'augmentation des nitrites sérique et par conséquent le NO a été mentionné dans plusieurs études portant sur l'injection du venin total, fraction toxique ou les toxines purifiées du venin d'Aah (**Djenah et Laraba, 2015 ; Lamraoui et al., 2015, Adi-Bessalem et al., 2015**).

Ces résultats sont en accord avec d'autres études qui ont rapporté que l'injection du venin d'Aah, de sa fraction toxique G-50 et sa toxine majoritaire Aah II induisent une augmentation des concentrations plasmatiques des nitrites reflétant la production du monoxyde d'azote (**Raouraoua-Boukari et al., 2012**).

D'autres travaux ont également montré l'augmentation du NO dans des cas cliniques, chez des personnes piquées par le scorpion de *Tityus serrulatus* et chez des modèles expérimentaux (**Petricevich et Alves, 2000; Petricevich et Peña, 2002**).

Le prétraitement à la Ciclosporine a réduit cette hausse avec une haute significativité ( $P= 0,0004$ ), le taux de nitrites résiduels enregistré a été de  $(10,025 \pm 2,22)$  par rapport celui observés chez le lot non prétraité  $(30,5 \pm 7,875)$ , ces résultats révèle encore une fois l'effet immunomodulateur et anti-inflammatoire de la ciclosporine au cours d'un processus inflammatoire comme l'envenimation (**Figure 11**).

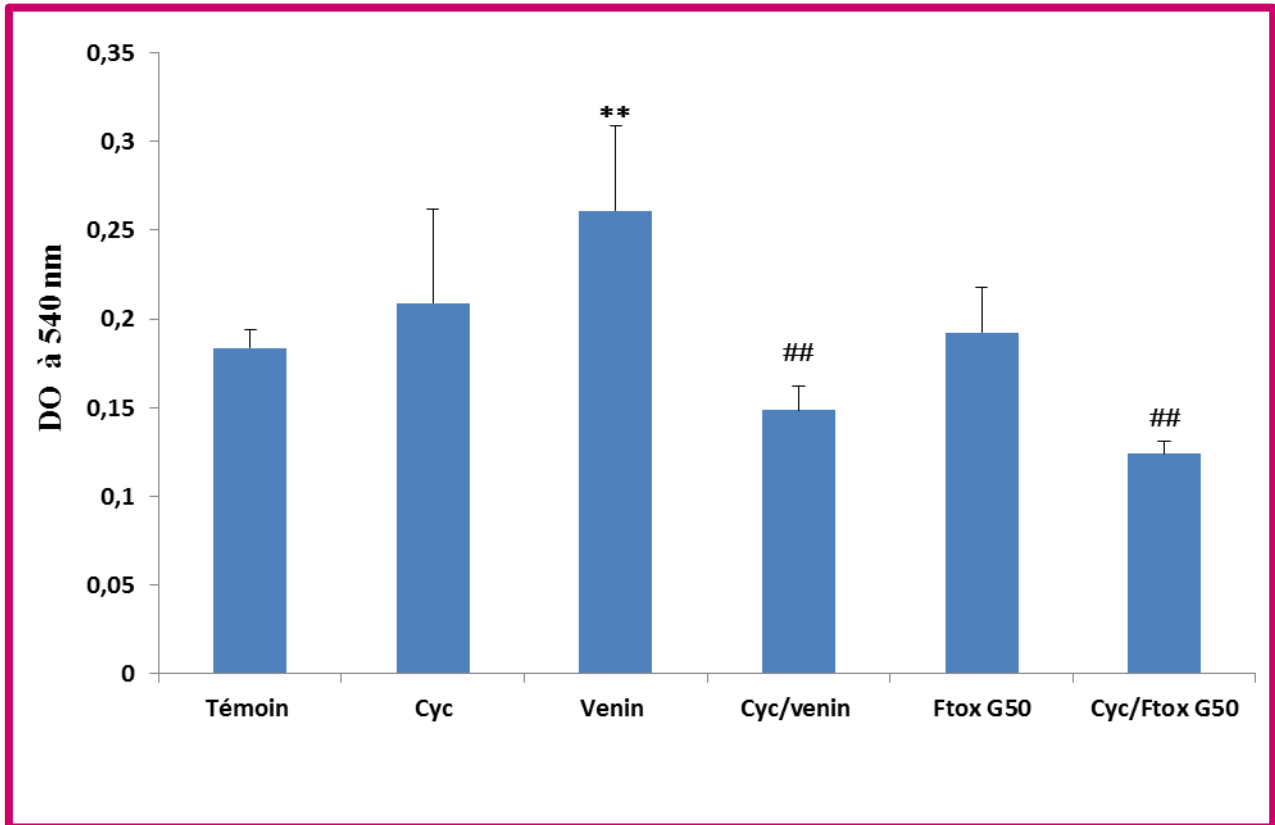
La cyclosporine inhibe les lymphocytes T en bloquant les voies Calcineurine-NFAT, P38 et JNK, elle atténue l'activation et l'expression des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 et l'IL-2 qui joue un rôle primordiale dans la production de NO par les cellules inflammatoires (**Matsuda et Koyasu, 2000**). Cela pourra justifier la réduction du taux de NO au cours de l'envenimation par le venin d'Aah ou la fraction toxique. Cet effet immunomodulateur dévoile le rôle probable des lymphocytes dans l'orchestration de la réponse immunitaire.

### III. 4.2. Evaluation de taux sérique de la malondialdéhyde

Dans les mêmes objectifs que le dosage du NO, une évaluation du taux sérique de MDA a été entreprise.

En effet, le venin d'Aah semble avoir un pouvoir pro-oxydant caractérisé par la libération des espèces réactives de l'oxygène notamment le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), ce

dernier étant moins réactif serait transformé en radical hydroxyle  $\text{OH}\cdot$  qui pourrait oxyder les lipides membranaires conduisant à la modification et la perturbation de la perméabilité membranaire, il donne également lieu à un produit final le MDA (Petricevich, 2004 ; Petricevich, 2010 ; Adi-Bessalem *et al.*, 2015).



**Figure 12.** Effet de la ciclosporine sur la production du MDA au cours de la réponse immunitaire induite par le venin et sa fraction toxique

Les résultats rapportent que le taux de MDA sérique des souris injectées par le venin d'Aah, a augmenté ( $0,26 \pm 0,048$ ) de façon moyennement significative ( $P=0,006$ ) comparativement au lot témoin ( $0,18 \pm 0,010$ ). (Figure 12).

Il a été rapporté que le venin d'Aah est comme autres venins de scorpion, responsable de l'élévation des concentrations sérique ou tissulaire chez des modèles expérimentaux d'envenimation par le venin ou les différentes toxines (Djenah *et al.*, 2014 ; Bekkari et Laraba, 2015 ; Lamraoui *et al.*, 2015).

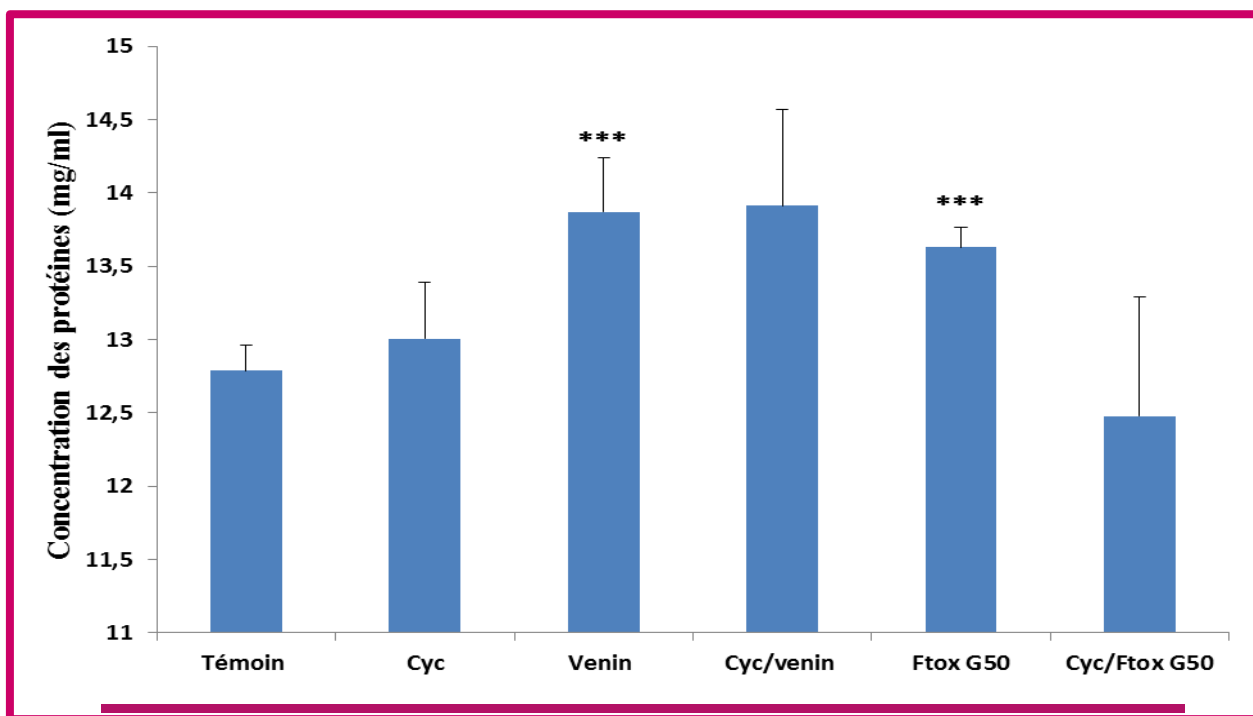
Chez le lot prétraité à la Ciclosporine puis injecté par le venin, une diminution moyennement significative ( $P=0,003$ ) du taux de MDA a été notée ( $0,148\pm 0,013$ ) par rapport au lot témoin et au lot non prétraité.

Une même évolution a été enregistrée pour la fraction Ftox G50. Dans le sérum des souris prétraitées puis envenimées par la fraction Ftox G50, le taux de MDA a diminué ( $0,124\pm 0,007$ ) de façon moyennement significative ( $P=0,001$ ) en comparaison avec le lot non prétraité et le lot témoin (**Figure 12**).

L'évaluation de taux de MDA renforce encore une fois l'effet immunomodulateur de la ciclosporine sur la réponse immunitaire induite par le venin d'Aah et qu'elle inhibe la libération des espèces réactives de l'oxygène, telles que le NO et le  $H_2O_2$  en réponse au venin et ses toxines.

Les aboutissements conclus à partir de l'évaluation de l'effet de la ciclosporine sur le stress oxydatif induit par le venin et la fraction toxique pourront révéler une probable implication des lymphocytes T et des voies de signalisation Calcineurine-NFAT dans les mécanismes pro-oxydants du venin.

### III.5. Effet de la ciclosporine sur le taux des protéines sériques



**Figure 13.** Effet de la ciclosporine sur le taux des protéines sériques suite à l'injection de venin et la fraction Ftox G50



Lors d'une réponse inflammatoire le système immunitaire élimine l'antigène par l'intervention des cellules immunitaire mais également des molécules solubles dont la plus part sont de nature protéique telle que les cytokines, les protéines de complément, enzyme et protéines de la phase aigüe de l'inflammation comme la protéine réactive C (CRP) (**Wolpe et Cerami,1989**).

Le taux de protéines sériques a été haussé ( $13,86\pm 0,37$ ) de manière hautement significative dans le sérum des souris injectées par le venin et la fraction toxique. Les concentrations sont de même chez le lot injecté par le venin ( $13,86\pm 0,38$ ) et de ( $13,62\pm 0,13$ ) pour celui injecté par la fraction toxique contre un taux de ( $12,78\pm 0,17$ ) observé chez le lot témoin.

Dans le même sens, des travaux ont montré que le venin de scorpion Aah provoque une augmentation de l'activité lytique de compléments, la production des cytokines pro inflammatoires tel que IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$  et l'élévation de taux des enzymes CPK et LDH au niveaux de sérum des animaux envenimés traduisant une augmentation de la concentration des protéines au niveau sérique (**Adi-Bessalema et al., 2008 ; Adi-Bessalema et al., 2015 ; Bekkari et al., 2015**).

Le prétraitement à la ciclosporine a diminué, mais d'une manière non significative, la concentration des protéines sériques au niveau de lot prétraité et injecté par la fraction toxique (**Figure 13**).

Ces résultats pourrait montrer que le processus inflammatoire engendré par les neurotoxines seulement est légèrement plus influencé par la ciclosporine, que celui du venin totale du scorpion Aah qui fait intervenir plusieurs molécules solubles dont l'origine est les différentes cellules immunitaires. L'inhibition d'une seule ligné cellulaire pourrait influencer la libération des médiateurs inflammatoires par les autres cellules.

Cependant, il est important à noter que la technique de dosage utilisée (dosage par la méthode de Bradford) reste moins sensible, il serait préférable de confirmer ce résultat par d'autre techniques de dosage plus sensibles ou de d'effectuer le dosage de certaines protéines spécifiques pour l'inflammation comme la CRP.

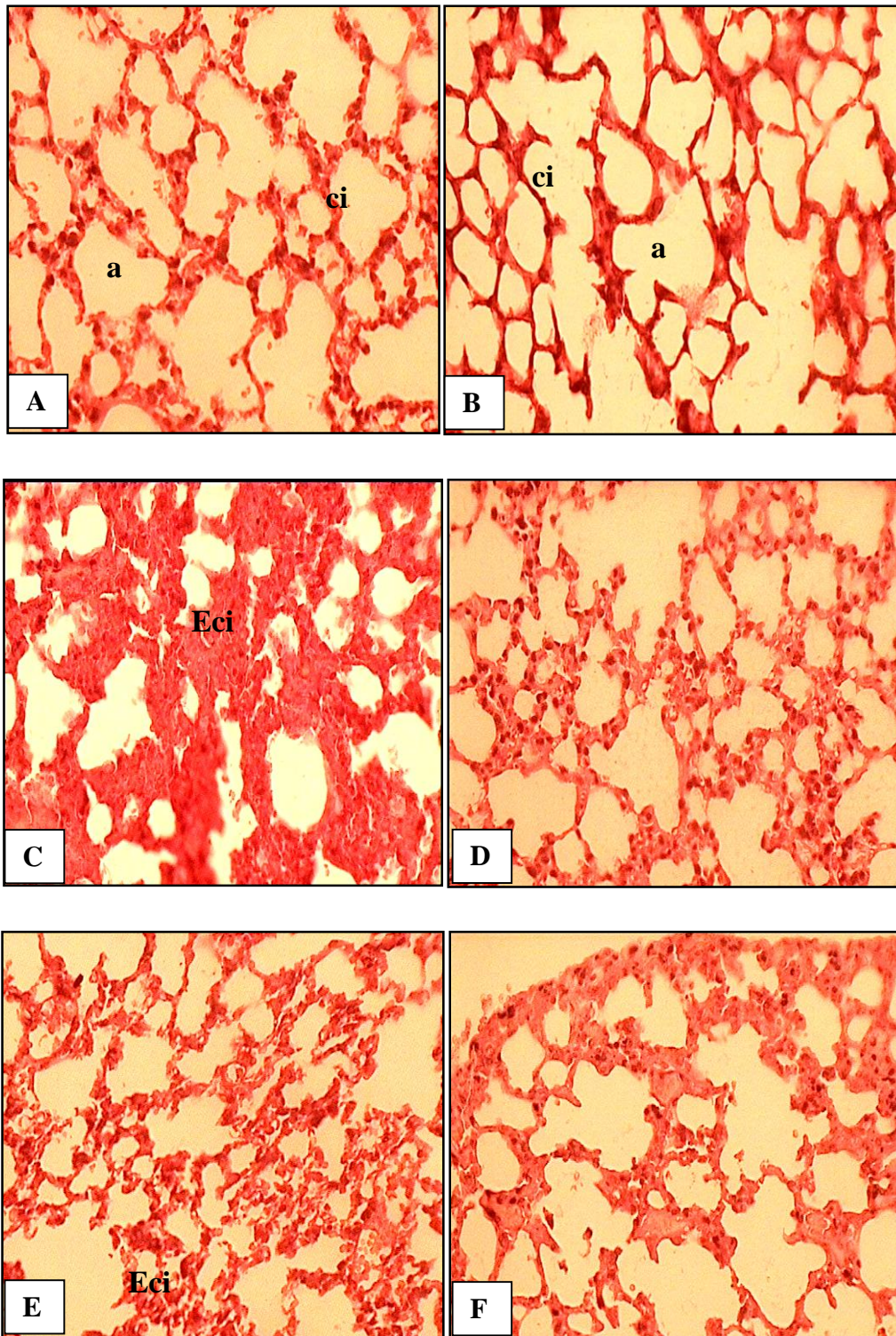
## III.6. Effet de la ciclosporine sur les altérations tissulaires du parenchyme pulmonaire induites par le venin et sa fraction toxique

Le poumon est un organe invaginé permettant d'échanger des gaz vitaux, constitué d'un tissu parenchymateux vascularisé, présentant des alvéoles délimitées par des cloisons inter alvéolaire d'aspect mince qui hébergent des nombreux pneumocytes et des macrophages alvéolaires. Les coupes histologiques du parenchyme pulmonaire des souris témoins ayant reçu une injection de l'eau physiologique par voie intrapéritonéale présentent une organisation multi-alvéolaire avec des cloisons inter-alvéolaires fines (**Figure 14**).

Après 3 heures de l'injection du venin d'Aah et de sa fraction toxique par la voie intrapéritonéale, la structure de parenchyme pulmonaire montre des altérations structurelles, une infiltration inflammatoire et un épaissement des septums inter-alvéolaires et des parois alvéolaires. Ces altérations sont liées directement à une accumulation anormale de cellules inflammatoires par rapport aux témoins (**Figure 14**).

L'infiltration de ces cellules au niveau des poumons lésés serait la conséquence d'une augmentation de perméabilité vasculaire induite par des médiateurs phospholipidique tels que prostaglandines, leucotriènes et PAF, impliqués dans la migration, l'activation et la séquestration de ces leucocytes au niveau de site inflammatoire. Des altérations comparables ont été rapportés suite à l'envenimation des animaux avec une dose sublétales des venins de *Tityus serrulatus*, d'Aah et de *Leiurus quinquestriatus*. Les parois alvéolaires sont élargies et envahies par des polynucléaires (**Mohamed et al., 1978 ; Correa et al., 1997 ; Adi-Bessalem et al., 2003**).

Le prétraitement à la ciclosporine a réduit partiellement les altérations dues au venin ou à la fraction toxique. En effet, une diminution de l'épaississement des septums inter-alvéolaire et des parois alvéolaires est observée (**Figure 14**). Ces résultats corrélerent avec ceux déjà retrouvés précédemment et qui sont en faveur d'une diminution de l'infiltration cellulaire vers les tissus et avec la réduction des paramètres inflammatoires au niveau de cet organe. Ce résultat conforte l'effet immunomodulateur de la ciclosporine au cours de l'envenimation et orientent vers une probable implication des lymphocytes T dans la genèse des altérations tissulaires et l'inflammation en présence du venin d'Aah et de sa fraction toxique.



**Figure 14.** Coupes histologiques de parenchyme pulmonaire de **A.** Témoin ; **B.** Témoin cyclosporine **C.** 3 heures après injection i.p du venin d'Aah à une dose sublétales (10 $\mu$ g /20g du poids corporel) **D.** 3heures après injection i.p du venin d'Aah à une dose sublétales (10 $\mu$ g /20g du poids corporel) à des souris prétraitées par la ciclosporine **E.** 3heures après injection i.p de la fraction FtoxG50 **F.** 3heures après injection i.p de la fraction FtoxG50 à des souris prétraitées par la ciclosporine (10 $\mu$ g /20g du poids corporel). Tissu coloré à l'Hématoxyline éosine, grossissement: x40. **a:** alvéole ; **ci:** cloison inter-alvéolaire ; **Eci:** épaissement des cloisons inter-alvéolaires.



# Conclusion et Perspectives



Le travail réalisé au sein du laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire à l'Université des Sciences et Technologies Houari Boumediene est une contribution à l'étude de l'effet immunomodulateur de la ciclosporine sur la réponse immunitaire induite par le venin d'Aah et sa fraction toxique.

Pour accomplir cet objectif, des dosages de paramètres inflammatoires (MPO, EPO, MDA, NO) qui renseignent sur l'implication des cellules immunitaires et le stress oxydatif engendré par l'envenimation, ont été réalisés. En plus, une analyse anatomopathologique du parenchyme pulmonaire, siège principale de la réponse inflammatoire lors de l'envenimation scorpionique, a été réalisée afin de compléter cette étude.

Les résultats obtenus ont permis de montrer que le prétraitement à la ciclosporine à influencer la migration des leucocytes du sang vers les tissus, elle a été réduite suggérant une probable implication des lymphocytes T dans le recrutement leucocytaire au niveau des tissus en réponse au venin d'Aah et la fraction toxique.

Une baisse significative de l'activation des neutrophiles et éosinophiles a été également engendrée par la ciclosporine en réponse au venin et à la fraction toxique majoritaire. Les stress oxydatif induit lors de l'injection du venin d'Aah ou la fraction toxique a été diminué par le prétraitement à la ciclosporine. Les résultats obtenus ont été confortés par l'étude anatomopathologiques des poumons ; les coupes histologiques du parenchyme pulmonaire révèlent une diminution partielle de l'infiltration leucocytaire et montre une réduction des altérations structurelles observées (épaississement des septums inter-alvéolaires et des parois alvéolaires).

Ces aboutissements laissent à penser que les lymphocytes exercent un effet modulateur au cours de la réponse inflammatoire en activant les polynucléaires neutrophiles et éosinophiles et que l'inhibition de ces lymphocytes par la ciclosporine diminue le processus inflammatoire généré par le venin d'Aah ou sa fraction toxique.

En outre, bien que la réponse immunitaire induite par l'envenimation soit à dominance pro-inflammatoire mettant en jeu les différentes cellules de l'immunité innée, l'implication des cellules de l'immunité adaptative ne serait pas à exclure, le rôle des lymphocytes T ne serait pas à négliger, étant les chefs d'orchestre de la réponse immunitaire.

Comme perspectives, il serait intéressant d'explorer d'autres paramètres inflammatoires qui renseignent sur la balance redox comme l'activité de la peroxydase d'hydrogène ou les

molécules à effet anti-oxydant comme le glutathion, et de doser les cytokines pro- et anti-inflammatoires produites, à fin de mieux évaluer l'action du traitement et de caractériser les acteurs cellulaires et moléculaires impliqués dans le processus inflammatoire de l'envenimation. Dans le même axe, il serait utile d'investiguer d'autres voies d'inhibition des lymphocytes T par des antagonistes de leurs récepteurs ou de leurs produits sécrétés.

D'autres parts, une étude *in vitro* sur des lymphocytes T en culture viendrait éclairer l'hypothèse de leur implication dans la pathogenèse de l'envenimation. Il serait également intéressant d'étudier le comportement de ces cellules *vis-à-vis* de venin par le dosage de différentes cytokines produites ainsi la détermination de différentes populations lymphocytaires activées par la technique de cytométrie en flux.



# Références Bibliographiques



# Références bibliographiques



**Abdoli, R., and N. Najafian. (2014).**T Helper Cells Fate Mapping by Co-stimulatory Molecules and its Functions in Allograft Rejection and Tolerance. *International Journal of Organ Transplantation Medicine* 5 (3): 97-110.

**Aboumaâd B. , N. Iba N. Dersi . (2014).** L'envenimation scorpionique au Maroc : scorpions du genre *Androctonus*, *Buthus* et *Hottentota*. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 107:39-47.

**Adi-Bessalem S, Hammoudi-Triki D, Laraba-Djebari F. (2008).** Pathophysiological effects of *Androctonus australis hector* scorpion venom: tissue damages and inflammatory response . *Exp Toxicol Pathol.*60 (4-5):373-80.

**Adi-Bessalem S, Mendil A, Hammoudi-Triki D, Laraba-Djebari F. (2012).** Lung immunoreactivity and Airway inflammation: their assessment after scorpion envenomation. *Inflammation.* ;35(2):501–8.

**Adi-Bessalem S., Hammoudi-Triki D., Laraba-Djebari F. (2013).** Scorpion Venom Interactions with the Immune System. *Toxinology* pp 1-18.

**Allman D, Sambandam A, Kim S, Miller JP, Pagan A, Well D, Meraz, A, Bhandoola A. (2003).** Thymopoiesis independent of common lymphoid progenitors. *Nature immunology.*4 (2):168-74.

**Ansel KM, McHeyzer-Williams LJ, Ngo VN, Mc Heyzer-Williams MG, Cyster JG. (1999).** In vivo-activated CD4 T cells upregulate CXC chemokine receptor 5 and reprogram their response to lymphoid chemokines. *The Journal of experimental medicine* 190(8):1123-34.



**Bahloul M, Chaari A, Dammak H, Samet M, Chtara K, Chelly H, Ben Hamida C, Kallel H, Bouaziz M. (2013).** Pulmonary edema following scorpion envenomation: mechanisms, clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Int J Cardiol.*162(2):86-91.

**Beaumont A, Cassier P. (1996).** *Biologie animale des Protozoaires aux Métazoaires.* DUNOD; 2: 527-33.

**Bekkari N, Martin-Eauclaire MF, Laraba-Djebari F. (2015).** *Exp Toxicol Pathol.* 67(7-8):389-97.



**Bell J. J. and Bhandoola A. (2008).** The earliest thymic progenitors for T cells possess myeloid lineage potential. *Nature*. 452(7188):764-7.

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

**Bentwood B.J, Henson P.M. (1980).** The sequential release of granule constituents from human neutrophils. *J Immunol*.124(2):855-62.

**Borges CM, Silveira MR, Aparecida M, Beker CL, Freire-Maia L, Teixeira MM. (2000).** Scorpion venom-induced neutrophilia is inhibited by a PAF receptor antagonist in the rat. *J Leukoc Biol*. 67(4):515-9.

**Bradford MM. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *J Biol Chem*. 270:248-54.

**Burtrum DB, Kim S, Dudley EC, Hayday ACand Petrie HT. (1996).**TCR gene recombination and alpha beta-gamma delta lineage divergence: productive TCR-beta rearrangement is neither exclusive nor preclusive of gamma delta cell development. *J Immunol*.157 (10):4293-6.



**Casella-Martins Andrea, Lorena R Ayres, Sandra M Burin, Fabiana R Morais, Juliana C Pereira, Suely V Sampaio, Eliane C Arantes, Fabiola A Castr, Luciana S Pereira-Crott, Lucia H Faccioli. (2015).** Immunomodulatory activity of *Tityus serrulatus* scorpion venom on human T lymphocytes. *The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*. 21:46.

**Chair-Yousfi Imène, Laraba-Djebari Fatima, Hammoudi-Triki Djelila (2014 ).** *Androctonus australis hector* venom contributes to the interaction between neuropeptides and mast cells in pulmonary hyperresponsiveness. *Int Immunopharmacol*. 25(1):19-29.

**Chávez-Galán L, Arenas-Del Angel MC, Zenteno E, Chávez R, Lascurain R. (2009) .**Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell Mol Immunol*. 6(1):15-25.

**Chippaux JP(1), Diouf A, Stock RP, Parra HJ, Massougboji A. (2011).** Report of the 4th International Conference on Envenomations by Snakebites and Scorpion Stings in Africa, Dakar, April 25-29, 2011. *Toxicon*. 58(5):426-9.

**Chippaux JP, Goyffon M. (2008).** Epidemiology of scorpionism: a global appraisal. *Acta Trop*.107(2):71-9.

**Coelho MF, Pessini AC, Coelho AM, Pinho VS, Souza DG, Arantes EC, Teixeira MM, Teixeira A. (2007).** Platelet activating factor receptors drive CXC production, neutrophil influx and edema formation in lungs of mice injected with *Tityus serrulatus* venom. *Toxicon*.;50:420–7.

**Corrêa M.M, Sampaio S.V., Lopes R.A., Mancuso L.C., Cunha O.A., Franco J.J., Giglio J.R..(1997).**Biochemical and histopathological alterations induced in rats by *Tityus serrulatus* scorpion venom and its major neurotoxin tityustoxin-I. *Toxicon*. 35(7):1053-67



**Dardalhon V, Awasthi A, Kwon H. (2008).** IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3 (-) effector T cells. *Nat Immunol*. 9:1347-55.

**David Artis, Hergen Spits.(2015).** The biology of innate lymphoid cells .*Nature*.517:293-301.

**De-Matos IM, Talvani A, Rocha OOA, Freira-Maia L, Teixeira MM. (2001).** Evidence for the role of mast cells in the lung edema induced by *Tityus serrulatus* venom in rats. *Toxicon*.;39:861–7.

**Dienz O, Eaton SM, Bond JP, Neveu W, Moquin D, Noubade R, Briso EM, Charland C, Leonard WJ, Ciliberto G, Teuscher C, Haynes L, Rincon M. (2009).**The induction of antibody production by IL-6 is indirectly mediated by IL-21 produced by CD4+ T cells. *The Journal of experimental medicine*.206 (1):69-78.

**Dinarello CA. (2011).** Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood*. 117:3720–3732.

**Djennah Z., Laraba-Djebari F. (2015).** Effect of cytokine antibodies in the immunomodulation of inflammatory response and metabolic disorders induced by scorpion venom. *International Immunopharmacology* 27 122–129.

**Dong Chen, Derek D. Yang, Cathy Tournier, Alan J. Whitmarsh, Jie Xu1, Roger J. Davis, Richard A, Flavell.2000.** JNK is required for effector T-cell function but not for T-cell activation. *Nature*. 405(6782):91-4.

**Duhen T, Geiger R, Jarrossay D, Lanzavecchia A and Sallusto F. (2009).** Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nature immunology*.10 (8):857-63.

**Dutta A, Deshpande SB. (2011).** *Toxicon*. 57(2):193-8.



**Elatrous S, Abroug F, Ouanes-Besbes L, Brochard L. (2008).** The effect of prone positioning in acute respiratory distress syndrome or acute lung injury: a meta-analysis. Areas of uncertainty and recommendations for research. *Intensive Care Med.* 34(6):1002-11.

**Elgar D, Verdonck F, Grobler A, Fourie C, du Plessis J. (2006).** Ion selectivity of scorpion toxin-induced pores in cardiac myocytes. *Peptides.* 27(1):55-61.

**Elia D., Tait Wojno .(2016).** Innate Lymphoid Cells: An Emerging Population in Type 2 Inflammation. Springer Science. 13-31.



**Favier A. (1997).** Le stress oxydant : intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur. *Annales de Biologie Clinique.* 55(1):9-16.)

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

**Femke Broere, Sergei G. Apasov, Michail V. Sitkovsky and Willem van Eden. (2011) .** T cell subsets and T cell-mediated immunity. *Principles of Immunopharmacology* 3: 15-27.

**Feske Stefan, Heike Wulff, Edward Y. Skolnik. (2015).** Ion Channels in Innate and Adaptive Immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 33:291-353.

**Fialho E., Maciel M., Silva A., Reis A-S., Assunção A., Fortes T., Silva A., Guerra R., Kwasniewski F-H. et Nascimento F. (2011).** Immune cells recruitment and activation by *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon,* 58 (6-7) :480-485.



**Gao B., Peigneur S., Dalziel J., Tytgat J. et Zhu S. (2011).** Molecular divergence of two orthologous scorpion toxins affecting potassium channels. *Comparative Biochemistry and Physiology,* 159 (29) : 313-321.

**Georg Schett, Dirk Elewaut, Iain B. McInnes, Jean-Michel Dayer, Markus F. Neurath. (2013).** How Cytokine Networks Fuel Inflammation: Toward a cytokine-based disease taxonomy. *Nature Medicine.* 19:822–82.

**Gerald J. Gleich. (2000).** Mechanisms of eosinophil-associated inflammation, *Journal of Allergy and Clinical Immunology,* V105, I4, P651-663.

**Guerin E., Cambray G., Da Re S., Mazel D. et Ploy M-C. (2010).** Les antibiotiques induisent la capture de gènes de résistance par les bactéries. *Médecine et science,* 26 : 28-30.

**Gueron M., Adolph R-J., Grupp I-L., Gabel M., Grupp G. et Fowler N-O. (1980).** Hemodynamic and myocardial consequences of scorpion venom. *The American Journal of Cardiology*, 45 :Pages 979-986.

**Gwee M.C.E, S.Nirthanan,H.-E.Khoo,P.Gopalakrishnakone, R. M. Kini, and L.-S. Cheah, (2002 ).** Autonomic effects of some scorpion venoms and toxins. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*.,29: (9) :795–801.

**Goyffon M. et El AyeB. (2002).** Epidémiologie du scorpionisme. *Infotox* , 15 : 1-12.



**Hammoudi-Triki Djelila, Adi-Bessalem Sonia, Abib Lila, Mouhoub Samia, Laraba-Djebari Fatima . (2007).** Immuno-détection des cibles tissulaires du venin d'*Androctonus australis hector*. » *Toxines émergentes : nouveaux risques Rencontres en toxicologie*. Lavoisier. 205-206.

**Hammoudi-Triki D. et Laraba-Djebari F. (2003).** Application du test ELISA pour la quantification du venin d'*Androctonus australis hector* dans les sérums de personnes et de rats envenimés avant et après immunothérapie. *Bull Soc Pathol Exot*, 96 : 297-301.

**Handschumacher, R.E., Harding, M.W., Rice, J., Drugge, R.J.. (1984).** Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science* 226, 544–547.

**Hannam-Harris AC, Taylor DS, Nowell PC. (1985 ).** Cyclosporin A directly inhibits human B-cell proliferation by more than a single mechanism. *J Leukoc Biol*. Aug;38(2):231-9

**Heinen TE, Gorini da Veiga AB. (2011).** Arthropod venoms and cancer. *Toxicon*. 57: 497–511.

**Hogan SP, Rosenberg HF, Moqbel R, Phipps S, Foster PS, Lacy P, Kay AB, Rothenberg ME. (2008)** Eosinophils: biological properties and role in health and disease. *Clin Exp Allergy* 38: 709–750.18384431.



**Ikeuchi H, Kuroiwa T, Hiramatsu N, Kaneko Y, Hiromura K, Ueki Kand Nojima Y. (2005).** Expression of interleukin-22 in rheumatoid arthritis: potential role as a proinflammatory cytokine. *Arthritis and rheumatism*.52 (4):1037-46.

**Isbister GK, Bawaskar HS. (2014).** Scorpion envenomation. *N Engl J Med*. 31;371(5):457-63.

**Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, Cua DJ, Littman DR.(2006).** The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17<sup>+</sup> T helper cells. *Cell*. 126(6): p. 1121-33.

**Jennifer A. Walker, Jillian L. Barlow and Andrew N. J. McKenzie. (2013).** Innate lymphoid cells -how did we miss them?. *Nature Reviews Immunology*.

**Jirapongsananuruk O, Leung DY. (1999).** The modulation of B7.2 and B7.1 on B cells by immunosuppressive agents. *Clin Exp Immunol*. 118:1–8.



**Kabrine Mohamed, Laraba –Djebari Fatima .(2014).** Protective effects of macrolide FK-506 on experimental scorpion envenomation .*Toxicon*. 91(1): 180.

**Kawa Amin , Janson C, Bystrom J. (2016).** Role of Eosinophil Granulocytes in Allergic Airway Inflammation endotypes. *Scand J Immunol*.

**Kawa Amin, Christer Janson ,Jonas Bystrom. (2016).** Role of Eosinophil Granulocytes in Allergic Airway Inflammation endotypes. *Scandinavian Journal of Immunology*.1(84):1-32.

**Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Terhorst Cand Morrison SJ. SLAM. (2005).** Family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell*.121 (7):1109-21.

**Klebanoff SJ. Myeloperoxidase (1999).** *Proc Assoc Am Physicians*. 111(5):383-9.

**Kumar O., Sugendran K., Vijayaraghavan R., (2003).** Oxidative stress associated hepatic and renal toxicity induced by ricin in mice. *Toxicon*, 41, 333-338.



**Ladjel-Mendil Amina, Adi-Bessalem Sonia, Hammoudi-Triki Djelila, Laraba-Djebari Fatima.(2012).** Development of Immune Sera Against Algerian Scorpion Venoms : Which Antibodies for Envenoming Treatment in Regions At-Risk ? .*Toxicon*. 60 : 95–248, 189-190.

**Ladjel-Mendil A1, Martin-Eauclaire MF, Laraba-Djebari F. (2013).** Neuropathophysiological effect and immuno-inflammatory response induced by kaliotoxin of androctonus scorpion venom. *Neuroimmunomodulation*. 20(2):99-106.

**Lamraoui A, Adi-Bessalem S, Laraba-Djebari F. (2015).** Immunopathologic effects of scorpion venom on hepato-renal tissues: Involvement of lipid derived inflammatory mediators. *Exp Mol Pathol*.99 (2):286-96.

**Laraba-Djebari F., Ait-Lounis A., (2015).** TNF-alpha modulates adipose macrophage polarization to M1 phenotype in response to scorpion venom. *Inflamm Res*. 2015 Nov;64(11):929-36.

**Larbi A., C. Purnama, X. Camous. (2013).** An overview of T cell subsets and their potential use as markers of immunological ageing.

**Lefèvre G., M. Beljean-Leymarie, F. Beyerle, D. Bonnefont-Rousselot, J.-P. Cristol, P. Thérond, J. Torreilles. (1998).** Evaluation de la peroxydation lipidique par le dosage des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique. *Annales de Biologie Clinique*.56(3):305-19).

**Linterman MA, Beaton L, Yu D, Ramiscal RR, Srivastava M, Hogan .JJ, Verma NK, Smyth MJ, Rigby RJand Vinuesa CG.(2010).**IL-21 acts directly on B cells to regulate Bcl-6 expression and germinal center responses. *The Journal of experimental medicine*.207 (2):353-63.

**Liu T, Bai ZT, Pang XY, Chai ZF, Jiang F, Ji YH. (2007).** Degranulation of mast cells and histamine release involved in rat pain-related behaviors and edema induced by scorpion *Buthus martensi* Karch venom. *Eur J Pharmacol.*;575:46–56.Lourenço, 2015).



**Mahdjoubi M ., El Ayeb M. et Kharrat R. (2003).** Caractérisation d'une nouvelle toxine active sur des canaux potassium apamine sensible purifiée à partir du venin de *Buthus occitanus tunetanus*. *Archs. In t . Pasteur Tunis*, 80 : 43-52.

**Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, Hatton RD, Wahl SM, Schoeb TR, Weaver CT. (2006).**Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature*. 441(7090): p. 231-4.

**Martin-Eauclaire M-F., Legros C., Bargis P. et Rochat H. (1999).** Les toxines des venins de scorpion. *Annales de l'institut Pasteur*, 10 (2) : 207-222.

**Martin-Eauclaire M-F., Abbasa N., Sauzea N., Mercierb L., Berge-Lefranco J-L.,Condoc J., Bougisa P. et Guieu R. (2010).** Involvement of endogenous opioid system in scorpion toxin-induced antinociception in mice. *Neuroscience Letters*, 482 : 45-50.

**Master Rw, Rao S & Somanpd. (1963).** Electrophoretic separation of biologically active constituents of scorpion venom. *Biochem Biophys Acta*, , 71 , 422-430.

**Matos IM, Souza DG, Seabra DG, Freire-Maia L, Teixeira MM. (1999).** Effects of tachykinin NK1 or PAF receptor blockade on the lung injury induced by scorpion venom in rats. *Eur J Pharmacol.*;376:293–300.

**Matsuda S, Koyasu S. (2000).** Mechanisms of action of cyclosporine. *Immunopharmacology.* 47(2-3):119-25.

**McCormick M L, T L Roeder, M A Railsback and B E Britigan. (1994).** Eosinophil peroxidase-dependent hydroxyl radical generation by human eosinophils.. *The Journal of Biological Chemistry.*

**McGeachy MJ, Chen Y, Tato CM, Laurence A, Joyce-Shaikh B, Blumenschein WM, McClanahan TK, O'Shea JJ, Cua DJ. (2009) .**The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo. *Nat Immunol.* 10(3): 31424.

**Medjadba Wafa, Marie-France Martin-Eauclaire and Fatima Laraba-Djebari. (2016) .** Involvement of Kallikrein-Kinin System on Cardiopulmonary Alterations and Inflammatory Response Induced by Purified Aah I Toxin from Scorpion Venom. *Inflammation.*39(1):290-302.

**Michel F, D Bonnefont-Rousselot, E Mas, J Drai, P Thérond. (2008).** Biomarqueurs de la peroxydation lipidique : aspects analytiques. *Annales de Biologie Clinique.*66(6):605-620.

**Mohamed AH, Saleh AM, Ahmed S, Beshir SR. (1978).** Histopathological effects of Naja haje snake venom and a venom gland extract of the scorpion *Buthus quinquestriatus* on the liver, suprarenal gland and pancreas of mice. *Toxicon.* 1978;16(3):253-61

**Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. (1991).** Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 43(2):109-42.

**Mouy R1, Stephan JL, Pillet P, Haddad E, Hubert P, Prieur AM. (1996) .** Efficacy of cyclosporine A in the treatment of macrophage activation syndrome in juvenile arthritis: report of five cases. *Nov;*129(5):750-4.)

**Mucida D., Cheroutre H. (2007).** TGFbeta and retinoic acid intersect in immune-regulation. *Cell Adh Migr.* 2007 Jul-Sep;1(3):142-4.



**Narayanan Nikhitha, Garge Vaibhavi N, Kadam Vilasrao J. (2016).** Scorpion venom: therapeutically potential drug candidate. *International Standard Serial Number .* 5: 2319-8141.

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

**Nouira S., Abroug F., Boujdaria R., Ayari M., Jaafoura M., Haguiga H., Ben farhat M. et Bouchoucha S. (1996).** Mécanisme de l'œdème pulmonaire et de la dysfonction cardiaque

au cours de l'envenimation scorpionique grave. *Réanimation et urgence*, 5(1) : 17-24.



**O'Shea JJ, Paul WE. (2010).** Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science* 327:1098-102.

**Odobasic D(1), Kitching AR, Yang Y, O'Sullivan KM, Muljadi RC, Edgton KL, Tan DS, Summers SA, Morand EF, Holdsworth SR. (2013).** Neutrophil myeloperoxidase regulates T-cell-driven tissue inflammation in mice by inhibiting dendritic cell function. *Blood*. 121(20):4195-204.

**Odobasic D, Kitching AR, Holdsworth SR. (2016).** Neutrophil-Mediated Regulation of Innate and Adaptive Immunity: The Role of Myeloperoxidase. *J Immunol Res*. 2349817.



**Patil U.S., Jaydeokar A.V, Bandawane D.D. (2012).** Immunomodulators: pharmacological review. *Int J Pharm Pharm Sci*. (4-1): 30-36.

**Pessini AC, Santos DR, Arantes EC, Souza GEP. (2006).** Mediators involved in the febrile response induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom in rats. *Toxicon*.;48(5):556–66.

**Petricevich VL., Hernández Cruz A, Coronas FI, Possani LD. (2007 ).** Toxin gamma from *Tityus serrulatus* scorpion venom plays an essential role in immunomodulation of macrophages. *Toxicon*. 50(5):666-75.

**Petricevich Vera L. (2010).** Scorpion Venom and the Inflammatory Response. *Med. Of. Inflam*.

**Petricevich VL. (2006).** Balance between pro- and anti-inflammatory cytokines in mice treated with *Centruroides noxius* scorpion venom. *Mediators Inflamm*. (6):54273.

**Porritt HE, Gordon Kand Petrie HT. (2003).** Kinetics of steady-state differentiation and mapping of intrathymic-signaling environments by stem cell transplantation in non irradiated mice. *The Journal of experimental*.

**Possani L-D., Martin B-M. et Svendsen J. (1982).** The primary structure of noxiustoxin a K<sup>+</sup> channel blocking peptide, purified from the venom of the scorpion *Centruroids noxius hoffiman*. *Carlsberg Res*,285-289.

**Possani L. D., E. Merino, M. Corona, F. Bolivar, and B. Becerril. (2000).** Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion-channels. *Biochimie*.. 82 (9-10): 861–868.





**Quintero-Hernández V., Ortiz a E., Rendon M-R., Schwartz E-F., Becerril B. et Corzo G. (2011).** Scorpion and spider venom peptides: Gene cloning and peptide expression. *Toxicon*, 25 : 1-20.



**Rao, A., Luo, C., Hogan, P.G. (1997).** Transcription factors of the NF-AT family: regulation and function. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 707–747.

**Raouraoua-Boukari R, Sami-Merah S, Hammoudi-Triki D, Martin-Eauclaire MF, Laraba-Djebari F. (2012).** Immunomodulation of the inflammatory response induced by *Androctonus australis hector* neurotoxins: biomarker interactions. *euroimmunomodulation.* 19(2):103-10.

**Rochat H, Bernard P, Couraud F. (1979).** Scorpion toxins: chemistry and mode of action; in Ceccarelli B, Clemenli F (eds): *Advances in Cytopharmacology. New York, Raven Press,* vol 3, pp 325–334.

**Rodríguez Andrés, Yndira Rodríguez, Fayruz Yusef, Héctor Zerpa , Ernesto Trejo, Mario Rossini. (2015).** Hematological alterations induced by *Tityus discrepans* scorpion Venom in mice. *Rev. Fac. Cs. Vets. - UCV.* 56 (1): p. 10-16. 2015.

**Rodriguez de la Vega RC, Schwartz EF, Possani LD. (2010).** Mining on scorpion venom biodiversity. *Toxicon.*; 56: 1155–1161.



**Saadi S, Assarehzadegan MA, Pipelzadeh MH, Hadaddezfuli R. (2015).** Induction of IL-12 from human monocytes after stimulation with *Androctonus crassicauda* scorpion venom. *Toxicon.* 106:117-21.

**Sami -MERAH S., Hammoudi-Triki D., Aroune D., Martin-Eauclaire M-F , Laraba-Djebari F. (2008).** Incidence de la fraction toxique du venin d'*Androctonus australis hector* dans la leucocytose pulmonaire Toxines et fonctions cholinergiques neuronales et non neuronales .Editions de la SFET. 1 : 129-130.

**Sanjay Kumar, Jeffrey Boehm, John C. Lee. (2003).** p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. *Nature Reviews Drug Discovery.* 2:717-726

**Schett G, Elewaut D, McInnes IB, Dayer JM, Neurath MF. (2013).**How cytokine networks fuel inflammation: Toward a cytokine-based disease taxonomy. *Nat Med.* 19(7):822-4.

**Sennequier N., S. Vadonle Goff (1998).**Bio-synthèse du monoxyde d'azote (NO) : mécanisme, régulation et contrôle. *Medecine/Sciences* .14: 1185.1195.

**Sertejn D. ; Grulke S. ; Franck T. ; Mouithys-Mickalad A. ; Deby-Dupont G. (2003).** La myéloperoxydase des neutrophiles, une enzyme de défense aux capacités oxydantes. vol. 147, no2, pp. 79-93 [15].

**Shah PK, Lakhota M, Chittora M, Mehta S, Purohit A. (1989).** Pulmonary infiltration with blood eosinophilia after scorpion sting. *Chest.*;95:691–2.

**Sharpe AH. (2009).** Mechanisms of costimulation. *Immunol Rev.*229:5-11.

**Shenolikar S. (1994).** Protein serine-threonine phosphatases: new avenues for cell regulation. *Annu. Rev. Cell Biol.* 10, 55–86.

**Shigeo M. , Stoshi K. (1999).** Mechanisms of action of cyclosporine. *Immunopharmacology* 47 2000 119–125.

**Simon P. Hogan, Amanda Waddell, and Patricia C. Fulkerson . (2013).** Eosinophils in Infection and Intestinal Immunity. *Curr Opin Gastroenterol.* 29(1): 7–14.

**So T, Song J, Sugie K, et al. (2006).**Signals from OX40 regulate nuclear factor of activated T cells c1 and T cell helper2 lineage commitment. *Proceed Nat Acad Sci USA.*103:3740-5.

**Soriano JB, Lamprecht B, Ramírez AS, Martínez-Cambor P, Kaiser B, Alfageme I, Almagro P, Casanova C, Esteban C, Soler-Cataluña JJ, de-Torres JP, Miravittles M, Celli BR, Marin JM, Puhan MA, Sobradillo P, Lange P, Sternberg AL, Garcia-Aymerich J, Turner AM, Han MK, Langhammer A, Leivseth L, Bakke P, Johannessen A, Roche N, Sin DD. (2015).** Mortality prediction in chronic obstructive pulmonary disease comparing the GOLD 2007 and 2011 staging systems: a pooled analysis of individual patient data. *Lancet Respir Med.* 2015 Jun;3(6):443-50.

**Soriano A., N. Pipitone, C. Salvarani. (2015).**Cyclosporine in psoriatic arthropathy. *Clin Exp Rheumatol.* 33 (Suppl. 93): S101-S103.  
Abdel-Rahman et al., 2015;

**Soroosh P, Doherty TA. (2009).** Th9 and allergic disease. *Immunology.*127 (4):450-8.

**Soualmia S., Eurin J.et Djeridane Y. (2009).** Scorpion toxin of *Androctonus australis garzonii* induces neuropeptide Y release via bradykinin stimulation in rat atria and kidneys. *Peptides*, 30 : 1553-1556.



**Tajima Kenichirou, Ryuichi Amakawa, Tomoki Ito, Michihiko Miyaji, Masashi Takebayashi ; & Shirou Fukuhara. (2003).** Immunomodulatory effects of cyclosporin A on human peripheral blood dendritic cell subsets. *Immunology*.108 321–328.

**Tao X, Constant S, Jorritsma P, Bottomly K. (1997).** Strength of TCR signal determines the costimulatory requirements for Th1 and Th2 CD4+T cell differentiation. *J Immunol*. 159: 5956-63.

**Teixeira CFP, Galante F, Manzoli S, Steil AA, Jancar S. (1997).** Inflammatory reaction induced by *Tityus serrulatus* crude venom (TsV) in the lung of rats. *J Venom Anim Toxin.*;3:111.

**Tobler A., Koeffler H.P.(1991).** Myeloperoxidase: localization, structure, and function. Harris G.R. (ed), *Blood cell biochemistry. Lymphocytes and granulocytes*. Plenum Press New York, 255-288.



**Vachon M., Millot J. (1949).** *Traité de Zoologie Grasse Anatomie systématique. Biologie onychophores tardigrades*; 6: 135-5.

**Van der Veen BS, de Winther MP, Heeringa P. (2009).** Myeloperoxidase: molecular mechanisms of action and their relevance to human health and disease. *Antioxid Redox Signal*. 2009 Nov;11(11):2899-937.

**Veldhoen M, Uyttenhove C, van Snick J.(2008).** Transforming growth factor-beta ‘reprograms’ the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol*.9:1341-6.



**Wang, J., & Slungaard, A. (2011).** Role of eosinophil peroxidase in host defense and disease pathology. *Archives of biochemistry and biophysics*, 445(2), 256-260.

**Wasowska BA, Zheng XX, Strom TB, Kupieck-Weglinski JW. (2001).** Adjunctive rapamycin and CsA treatment inhibits monocyte/macrophage associated cytokines/chemokines in sensitized cardiac graft recipients. *Transplantation*. 71:1179–83.

**Wicker Linda S. , Robert C. Boltz Jr., Victoria Matt, Elizabeth A. Nichols, Laurence B. Peterson and Nolan H. Sigal. (1985).** Suppression of B cell activation by cyclosporin A, FK506 and rapamycin. *J Leukoc Biol*. Aug;38(2):231-9.

**Wolpe SD, Cerami A. (1989).** Macrophage inflammatory proteins 1 and 2: members of a novel superfamily of cytokines. *FASEB J.* 1989 Dec;3(14):2565-73.



**Zhou Liang, Mark M.W. Chong, Dan R. Littman., (2009).**Plasticity of CD4 T cell Lineage Differentiation. *immuni.*05:001.

**ZLOTKIN E, MIRANDA F & ROCHAT H. (1978)** . Chemistry and pharmacology of ButhinaeScorpion venoms. In: BETTINI S (Ed.), *Arthro pods venoms.* Springer Verlag, Berlin, pp. 317-369.

**Zoccal KF, Bitencourt CD, Sorgi CA, De Castro Figueiredo Bordon K, Sampaio SV, Arantes EC, Faccioli LH. (2013).** Ts6 and Ts2 from *Tityus serrulatus* venom induce inflammation by mechanisms dependent on lipid mediators and cytokine production. *Toxicon.*;61:1–10.



Werner



**Annexe I: Appareillage**



**Microscope optique**



**Lecteur ELISA**



**Microtome**



**Spectrophotomètre**



**pH-Mètre**



**Etuve**



**Autoclave**



**Agitateur**



**Bain-Marie**





**Centrifugeuse pour tubes**



**Centrifugeuse à eppendorf**



**Vortex**



**Balance De Précision**



**Broyeur Manuel**

## Réactifs :

Les réactifs de bonne qualité analytique ont été procurés des différentes firmes :

Rituxan® (Roche), Paraffine (Leica), Formol, xylène, éthanol, May-Grünwald, Giemsa (Sigma-Aldrich), O-Dianisidine, Eukit (Fluka), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, PBS, Tris-HCl, Triton ×100 (Sigma), Sulfanilamide, Acide Orthophosphorique (Merck), Acide Acétique (PANREC), O-phénylène diamine (Sigma), sulfanilamide (Sigma), naphthylène-diamine hydro-chloride (Merck), sérum albumine bovine BSA (Sigma).

## Annexe II : Tampons et réactifs

### II.1. Tampons

#### II.1.i. Tris-HCl 0,05 ; pH=8,6:

Solution A (Tris 0.2 M) : dissoudre 21.03 g de Tris (hydroxyméthyl) dans 1000 mL d'eau distillée.

Solution B (HCl 0.1 M) : ajouter 10 ml de HCl (1M) à de l'eau distillée, ajuster jusqu'à 100 mL.

Pour une solution tampon à un pH=8.6 :

50 mL de solution A sont ajoutés à 26 mL de solution B puis on complète avec l'eau distillée jusqu'à l'obtention d'un volume de 200 mL.

### II.2. Réactifs

#### i. Réactif du dosage de la MPO

Pour la préparation de 20 mL de réactif :

Orthodiansidine Dihydrochloride (OD) (0.167 mg/ml) .....	0.0032 g.
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0.5 mM) .....	20 µL.
Bromure de potassium (KBr) .....	0.0071 g.
Tris-HCL (0.05 mM , pH 6.6) .....	10 µL.

#### ii. Réactif du dosage de l'EPO

Pour la préparation de 20 mL de réactif :

Ortho-Phénylène diamine-Dihydrochloride (OPD) .....	20 mg.
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0.5 mM) .....	10 µL.
Tris-HCL (0.05 mM , pH 8.6) .....	10 µL.

#### iii. Réactif du dosage Malondialdéhyde (MDA)

Pour la préparation de 20 mL de réactif :

Acétonitrile .....	100 µL.
--------------------	---------

---

Aacide acétique (20%) .....	375 µL.
Sodium dodécylsulfate (SDS) (8,1% dans l'acide acétique) .....	50 µL.
Thio-Barbiturique Acide (0,8%)(TBA) (0,8%) .....	375 µL.
Eau distillée .....	100 µL.

#### iv. Réactif du dosage du NO

Acide sulfanilique(SA, Griess B) (0.2%) : 2g de SA dans 100 mL d'acide orthophosphorique (85%).  
N-ethylenediaminehydrochloride (NED,Griess A) (0.1%) : 1g de NED dans 100mL d'eau distillée.

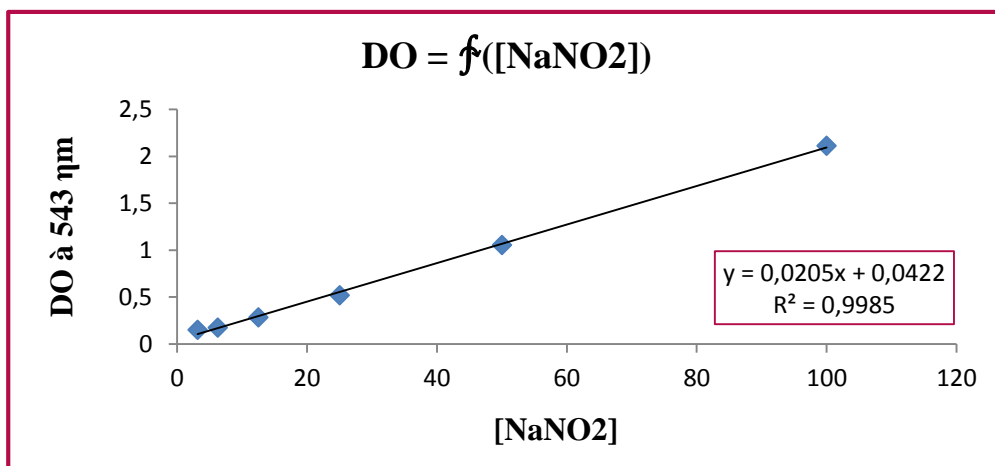
#### v. Réactif du dosage des protéines

Réactif de Bradford ou bleu de Coomassie : Réaction avec l'Arg et, dans une moindre mesure, avec l'His, la Lys et les acides aminés aromatiques.

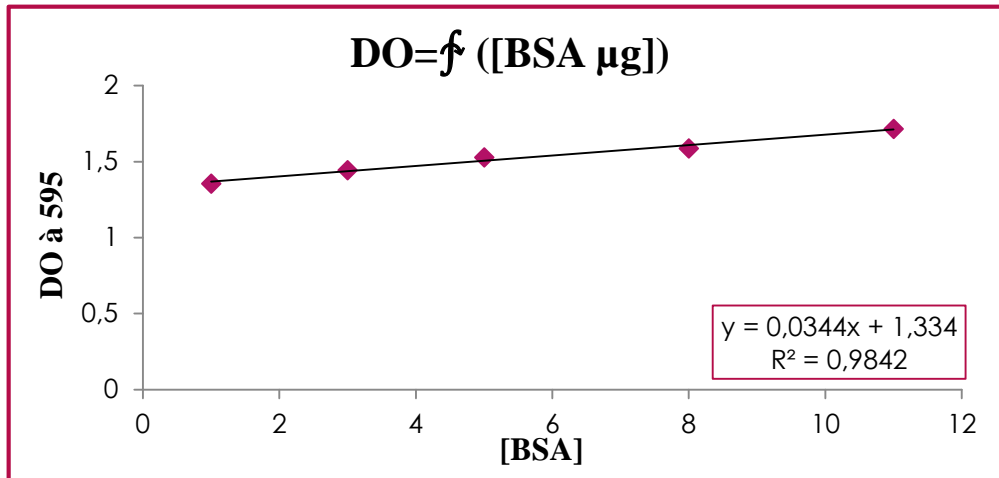
Bleu de Coomassie G 250.....	0,060 g.
Acide perchlorique .....	3 g.
Chlorure de sodium.....	2,92 g.
Eau distillée .....	100 ml.

### Annexe III : Courbes étalon

#### i. Dosage du NO



**ii. Dosage des protéines**



**Annexe IV : Etude histologique**

**1. Coloration à l'Hématoxyline et l'Eosine**

**1.1. Principe et objectif :**

**1.1.a. Hématoxyline de Groat :**

Le principe colorant, l'hématine, produit de l'oxydation de l'hématoxyline par un cation métallique, souvent le Fe ou de l'Al, qui forme un complexe avec l'hématine. C'est cet ion qui va par la suite réagir avec les acides nucléiques et colorer en bleu-violet les noyaux des cellules et les parties du cytoplasme riches en ARN.

**1.1.b. Eosine :**

C'est un colorant rose-rouge, qui réagit essentiellement par force électrostatique avec les acides aminés basiques tels que l'histidine, l'arginine ou encore la lysine. Ainsi, le cytoplasme, la matrice extracellulaire, les fibres musculaires et les globules rouges prennent une couleur rouge.

**1.2.Mode opératoire :**

**Etape 01 : Déparaffinage et hydratation:**

Les coupes à la paraffine collées sur lames doivent être débarrassées de la masse d'inclusion, avant de subir l'action des colorants et cela dans des bains d'alcool et de Xylène :

- Xylène.....2 bains de 15 min.
- Alcool 100°.....1 bain de 3 min.
- Alcool 90° .....1 bain de 3 min.
- Alcool 70°.....1 bain de 3 min.
- Eau distillée.....1 bain de 1 min.

**Etape02 : coloration et montage :**

Les lames déparaffinées sont prêtes à être colorées dans les bains de colorants comme suit :

Bain d'Hématoxyline de Groat..... 2 min.

Lavage à l'eau courante.....5 min.

Eosine .....30 seconde.

Lavage l'eau distillée.

Par la suite, une étape de séchage à l'étuve précède le montage avec l'Eukitt.

**1.3.Résultat :**

Les noyaux sont colorés en bleu violacé, le cytoplasme en rose vif.

---