



LA REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE
Université Echahid Hamma Lakhdar- El Oued

Faculté des sciences exactes
Département de chimie

N° d'ordre :

N° de série :

Thèse

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en sciences

Option : Chimie

Par M^{me} MENECEUR Souhaila

T H È M E

**Etude de la variation de la composition des toxines
de venins de quelques espèces de scorpions.**

Devant le jury :

Président:	M. A. H. KHALAF	Professeur	Université d'El-Oued
Rapporteur:	M. M. R. OUAHRANI	Professeur	Université d'El-Oued
Examineur:	M. M. ZIDANE	M. C. A	Université d'El-Oued
Examineur:	M. M. L. BELFAR	M. C. A	Université d'Ouargla
Examineur:	M. M. S. NEDJIMI	M. C. A	Université d'Ouargla
Examineur:	M. S. ZAGHDI	M. C. A	Université d'Ouargla
Invité:	M. S. E. LAOUINI	M. C. A	Université d'El-Oued

Année Universitaire 2020/2021

REMERCIEMENTS

Ce travail n'aurait pas vu le jour sans la confiance, la patience et la générosité du Monsieur le Professeur OUAHRANI Mohammed Ridha, mon directeur de thèse que je remercie vivement. Je voudrais aussi le remercier pour le temps et la patience qu'il m'a accordés tout au long de ces années et pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je tiens également à remercier vivement : Docteur LAOUINI Salah Eddine, pour ses précieux conseils durant la réalisation de ce travail ;

Mes remerciements vont aussi à :

Professeur A. H. KHALAF, pour avoir accepté la présidence de ce jury ;

Docteur M. ZIDANE, pour avoir accepté de participer à ce jury ;

Docteur M. L. BELFAR, pour avoir accepté de participer à ce jury ;

Docteur M. S. NEDJIMI, pour avoir accepté de participer à ce jury ;

Docteur S. ZAGHDI, pour avoir accepté de participer à ce jury.

Enfin, je ne saurais ignorer mes collègues de département et également tous ceux qui par leur présence ou par leur aide m'ont permis de mener à bien ce travail, en particulier mon mari pour sa contribution, son soutien et sa patience.

ملخص

من خلال الدراسة التي قمنا بها تحصلنا على نتائج واضحة حيث بدا جليا اختلاف في تركيبة السم وهذا راجع لعاملين الأول: يتمثل في الأنواع وهي (*Androctonus australis hector* ، *Buthacus arenicola* *Androctonus amoreuxi*) والعامل الثاني هو مكان المعيشة (الاختلاف في الطعام والمناخ) حيث اخترنا ثلاث مناطق جغرافية مختلفة متواجدة بإقليم ولاية الوادي.

كما قمنا باختبار فعالية المصل المضاد للتسمم العقربي SAS المصنع من طرف معهد بستانور الجزائر على هذه السموم المختلفة عن طريق المقايسة المناعية الإنزيمية ، حيث أظهر هذا المصل فعالية عالية في تحييد سم *Androctonus australis hector* ، وهو النوع الأكثر خطورة في المنطقة ، وبالمقابل لاحظنا انخفاض الفعالية مع سم *Androctonus amoreuxi* ، وكما كانت غائبة مع سم *Buthacus arenicola* ، كما استطعنا تحديد الجرعة اللازمة والتي قدرت ب 0,0387 وحدة/ميكروغرام من السم *Androctonus australis hector* وهذا يدل على أن المصل تقتصر فعاليته ضد نوع واحد من السم فقط .

الكلمات المفتاحية: العقرب ، السم ، *Androctonus australis Hector* ، *Buthacus arenicola* ، *Androctonus Amoreuxi* ، مضاد السم.

Abstract:

The separation and analyses performed by HPLC on three venoms from (*Androctonus australis hector*, *Buthacus arenicola* and *Androctonus Amoreuxi*) collected in three geographical areas located in Oued Souf region. A difference in the composition of the toxin was evident, due to two factors: the species and the living environment (food, climate, etc.).

Several tests applied on these different toxins by using an immunoenzymatic to see the effectiveness of the anti-venom SAS serum, manufactured by the Pasteur Institute of Algeria. The test showed that this serum had high efficiency in neutralizing the scorpion venom *Androctonus australis hector*, which is the most dangerous species in the region. In addition, it noticed that the efficacy of this serum was weak against the toxin *Androctonus amoreuxi*, and absent against that of *Buthacus arenicola*. As a result, we were able to determine the required dose that estimated to 0.0387 U/μg of *Androctonus australis hector* toxin, indicating that this SAS serum is limited in its effectiveness against a single type of toxin.

Key words: Scorpion, venom, *Androctonus australis Hector*, *Buthacus arenicola*, *Androctonus Amoreuxi*, antivenom.

Résumé:

La séparation et les analyses effectuées par HPLC sur trois venins de scorpions (*Androctonus australis hector*, *Buthacus arenicola* et *Androctonus Amoreuxi*) collectés dans trois différentes zones géographiques situées dans la région d'El Oued. Une différence dans la composition de la toxine était évidente, due à deux facteurs à savoir : l'espèce du scorpion et le milieu de vie (nourriture, climat, etc.).

Plusieurs tests ont été appliqués sur ces différentes toxines en utilisant un immunoenzymatique pour voir l'efficacité du sérum anti-venin SAS, fabriqué par l'Institut Pasteur d'Algérie. Le test a montré que ce sérum avait une grande efficacité de neutralisation du venin de scorpion *Androctonus australis hector*, sachant que cette espèce est considérée comme la plus dangereuse de la région. De plus, il a été remarqué que l'efficacité de ce sérum était faible contre la toxine *Androctonus amoreuxi*, et absente contre celle de *Buthacus arenicola*. En conséquence, nous avons pu déterminer la dose requise estimée à 0,0387 U / μ g de toxine *Androctonus australis hector*, indiquant que ce sérum SAS est limité dans son efficacité contre un seul type de toxine.

Mots clés: Scorpion, venin, *Androctonus australis Hector*, *Androctonus Amoreuxi*, *Buthacus arenicola*, antivenin.

LISTE DES FIGURES

LISTE DES FIGURES

Figure	Titre	Page
Figure I. 1a	Corps de scorpion.	08
Figure I. 1b	Anatomie externe de scorpion.	09
Figure I. 2	Appareil venimeux.	10
Figure I. 3	. Incidence mondiale des piqûres de scorpion. L'incidence est essentiellement limitée à quatre régions fortement endémiques : Mexique, Amérique du Sud à l'Est des Andes, Afrique du Nord, Proche et Moyen-Orient.	18
Figure I. 4	Répartition géographique mondiale des scorpions dangereux	19
Figure I. 5	Répartition des principales espèces scorpioniques en Algérie.	20
Figure I. 6	Les régions à haut risque par Envenimation scorpionique	21
Figure I. 7	Androctonus amoreuxi.	23
Figure I.8	Androctonus australis hector.	23
Figure I. 9	Buthacus arenicola	24
Figure. II. 1	Procédé pharmaceutique (Schéma général) de production des sérums thérapeutiques.	36
Figure- II. 2	Techniques de purification des immunoglobulines précipitation par les sels.	38
Figure III. 1	Structure d'une toxine de scorpion	45
Figure III. 2	Structure tridimensionnelle des Toxines active sur les canaux Na ⁺ .	50
Figure IV. 1	Carte géographique de zone d'oued souf.	59
Figure IV. 2	Zone d'étude en région de Debila.	60
Figure IV. 3	Zone d'étude en région de Hassi Khalifa	60
Figure IV. 4	Zone d'étude en région de Reguiba.	60
Figure IV. 5	Androctonus australis hector	61
Figure IV. 6	Androctonus amoreuxi	61

Figure IV. 7	Buthacus arenicola	61
Figure IV. 8	Schéma général de séparation de fraction toxique du venin	67
Figure IV. 9	Complexe d'antivenin et de venin dans les puits de microplaque de dosage immunoenzymatique.	70
Figure IV. 10	Antivenin commercial algérien.	70
Figure IV. 11	Etapes du test immunoenzymatique .	73
Figure V. 1	Chromatogramme HPLC (A) de venins collectés à partir de l'espèce <i>Androctonus australis hector</i> dans Debila.	80
Figure V. 2	Chromatogramme HPLC (B) de venins collectés à partir de l'espèce <i>Androctonus australis hector</i> dans région de Rguiba	81
Figure V. 3	Chromatogramme HPLC (C) de venins collectés à partir de l'espèce <i>Androctonus australis hector</i> dans Hassi Khalifa.	82
Figure V. 4	Chromatogramme HPLC (D) de venins collectés à partir de l'espèce <i>Androctonus Amoreuxi</i>	83
Figure V. 5	Chromatogramme HPLC (E) de venins collectés à partir de l'espèce <i>Buthacus arenicola</i>	84
Figure V. 6	Chromatogramme HPLC (F) de venins collectés à partir de l'espèce <i>Androctonus australis hector</i> à bas d'âge.	85
Figure V. 7	Courbes de la mesure de l'absorbance complexe en fonction de la concentration d'antivenin, à trois concentrations de venin (ng / ml) A <i>Androctonus australis hector</i> B <i>Androctonus Amoreuxi</i> C <i>Buthacus arenicola</i> chacun collecté à Debila.	89
Figure V. 8	Concentration de l'antivenin à laquelle l'absorption maximale du complexe s'est produite, par rapport à la concentration du venin pour deux types de venin de scorpion (<i>Androctonus australis hector</i> et <i>Androctonus Amoreuxi</i> collectés à Debila).	92

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Titre	Page
Tableau I. 1	Les espèces des scorpions dangereux à la famille de Buthidae.	14
Tableau II. 1	Propriétés pharmacocinétiques des molécules d'IgG, et les fragments d'anticorps F(ab') ₂ et Fab .	35
Tableau II. 2	Antivenin sur le marché pour le traitement de la piqûre de scorpion envenimation	36
Tableau III. 1	Pourcentage de certaines toxines dans le venin d' <i>A.a.H.</i>	48
Tableau III. 2	Toxines purifiées à partir du venin de scorpion <i>A.a.H.</i>	53
Tableau IV.1	Poids moyen du venin d'un seul scorpion en g avec le nombre de scorpions de trois espèces.	64
Tableau IV. 2	Poids moyen du venin d'un seul scorpion en g de l'espèce <i>Androctonus australis Hector</i> de différents âges.	64
Tableau IV. 3	Conditions chromatographiques d'injection Fraction toxique pour HPLC	66
Tableau V. 1	Représenter résultat d'HPLC de venins de l'espèce <i>Androctonus australis hector</i> (Debila)	80
Tableau V. 2	Résultats de Chromatogramme (B) de la HPLC de venins de l'espèce <i>Androctonus australis hector</i> (Reguiba).	81
Tableau V. 3	Résultats de Chromatogramme (C) de la HPLC de venins de l'espèce <i>Androctonus australis hector</i> v (Hassi Khalifa).	82
Tableau V. 4	Résultats de Chromatogramme (D) de la HPLC de venins de l'espèce <i>Androctonus Amoreuxi</i> .	83
Tableau V.5	Résultats de Chromatogramme (E) de la HPLC de venins collectés à partir de l'espèce <i>Buthacus arenicola</i> .	84
Tableau V. 6	Résultats de Chromatogramme (F) de la HPLC de venins collectés à partir de l'espèce <i>Androctonus australis hector</i> à bas d'âge.	85
Tableau V.7	Valeurs de la dose létale médiane.	87
Tableau V.8	Rapport entre la concentration de sérum antivenin commercial algérien et la concentration de venin à l'absorption maximale du complexe.	92

SYMBOLES
ET
ABBREVIATIONS

SYMBOLES ET ABREVIATIONS

Abréviation	Désignation
A.a.h	Androctonus australis hector
Ac	Anticorps
Ag	Antigènes
A.m	Androctonus amoreuxi
DL₅₀	Dose létale à 50%
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
Fab	Fragment Antigen
Fab₂	Fragment Antigen Binding
Fc	Fragmeny cristallisable
IgG	Immunoglobuline de type G
IPA	Institut Pasteur Alegrie
ISO	International Standardization Organization
KDa	kilos daltons
OMS	L'Organisation mondiale de la Santé
PBS	Phosphate Buffer Saline
PSA	Sérum albumine bovine
SAS	Sérum Anti Scorpionique
SAV	Sérum Anti Venin
UV	Ultra-Violet

SOMMAIRE

SOMMAIRE

	page
RESUMES.....	I
SYMBOLES ET ABREVIATIONS.....	V
LISTE DES FIGURES	VIII
LISTE DES TABLEAUX	X
INTRODUCTION GENERALE.....	2
CHAPITRE I: GENERALITES SUR LES SCORPIONS	
I Histoire du scorpion:.....	7
I.1 Scorpion.....	6
I.2 Généralités sur les scorpions :.....	6
I.3 Morphologie du scorpion:	8
I.3.1 Corps:	8
I.3.2 Appareil venimeux:.....	9
I.4 Habitat:.....	10
I.5 Comportement:.....	10
I.6 Régime alimentaire prédation et parasitisme:.....	11
I.7 Resistance aux radiations:.....	11
I.8 Ethologie:.....	13
I.9 Les espèces des scorpions de la famille des Buthidae	14
I.10 Les différentes familles de scorpions:.....	15
I.11 Les espèces de scorpions les plus dangereuses:	16
I.12 Répartition géographique des scorpions:.....	18
I.12.1 Répartition géographique mondiale des scorpions.....	19
I.12.3 Répartition géographique des scorpions en Algérie.....	19
I.12.3.1 Les espèces existant dans la wilaya d'El-Oued:	22
I.13 Venins:.....	25
I.13.1 Composition et mode d'action	25
I.13.3 Propriétés du venin :.....	26
REFERENCES.....	28

CHAPITRE II : ANTIVENIN	
II-1- Introduction.....	32
II.2. Généralité sur Anti-venin.....	34
II.2.1. Définition de l'anti-venin.....	34
II.2.2.Immunothérapie antivenimeuse	34
II.2.3 Les étapes de production des sérums thérapeutiques	36
II.2.4.Obtention du sérum	37
II.2.4.1.Ponction du sang	37
II.2.4.1.1. Récolte du sérum.....	37
II.2.4.1.2. Analyses du sérum.....	37
II.3.Purification des immunoglobulines.....	38
II.3.1. Protocole aux sels d'ammonium.....	38
II.4. Protocole à l'acide caprylique.....	39
II.5. Composition de SAV qualitative et quantitative pour 1 ml	39
II.5.1 .Principe actif.....	39
II.5.2. Conservation de l'antivenin.....	40
II.5.3.Doses et administrations	40
II.6. Conclusion.....	41
REFERENCES.....	42
CHAPITRE III LES TOXINES	
III.1 Introduction.....	45
III. 2 Mode d'action des toxines.....	46
III. 2. 1 Action au niveau cellulaire.....	46
III. 2. 2 Action sur le système nerveux central.....	46
III. 2. 3 Action sur le système cardiovasculaire.....	47
III. 2. 3. 1 Action indirecte au niveau des ganglions sympathiques avec deux phases.....	47
III. 2. 3. 1 Action directe sur le cœur	47
III. 3 Variation de la composition du venin.....	48
III. 3. 1 La variation en fonction de l'origine géographique.....	48
III. 3. 2 La variation selon les saisons.....	48
III. 4. Les types de toxines.....	49
III. 4. 1 Les toxines de scorpions actives sur les canaux potassium.....	49
III. 4. 2 Les toxines de scorpions actives sur les canaux sodium.....	50
III.4.3 Les toxines actives sur les canaux calcium.	53
III.5 Toxines du venin d' <i>Androctonus australis Hector</i>	53

Références.....	55
CHAPITRE IV : MATERIEL ET METHODES	
INTRODUCTION.....	59
IV .1. Ramassage	61
IV .1.1 Détermination des différents endroits.....	61
IV.1.2 Capture des scorpions.....	62
IV.1.2.1 Matériels:.....	62
IV.2 Identification et classification morphologique.....	62
IV.3 Extraction de venin.....	63
IV.3.1. Matériel.....	63
IV.3.2 Méthode de collecte de venin par excitation électrique du scorpion.....	63
IV.3.2.1 Quantité de venin.....	63
IV.3.2.2 Conservation de venin.....	64
IV.4 Analyses de venin.....	65
IV.4.1 Matériels.....	65
IV.4.2 Instrumentation et conditions chromatographiques.....	65
IV.4.3 Réactifs et produits chimiques	65
IV.4.4 Purification de la fraction toxique des venins du scorpion.....	65
IV.4.5 Analyse chromatographique de la fraction toxique par HPLC.....	66
IV.4.5.1 Mode d'injection pour HPLC.....	66
IV.4.5.2 Conditions opératoires.....	66
IV.4.5.3 Plan général d'analyse de venin.....	67
IV.5 Test de la dose létale de 50% de fraction toxique.....	68
IV.5.1 Quelques termes relatifs à la dose toxicité.....	68
IV.5.2 Détermination de la dose létale médiane (DL50).....	68
IV.6 Neutralisation du venin et mesure du complexe Venin– F (ab ') 2.....	69
IV.6.1 Antivenin:.....	70
IV.6.2 Venin:.....	71
IV.6.3 réactifs:.....	71
IV.6.4 Équipement.....	71
IV.6.5 Mesure de concentration de complexe Venom– F (ab ') 2:.....	71
IV.7 Méthode d'analyse.....	74

IV.7.1 Régression non linéaire:.....	74
REFERENCES.....	76
CHAPITRE V : RESULTATS ET DISCUSSIONS	
V.1 Analyse chromatographique de la fraction toxique.....	79
V.1.1 Résultats.....	79
V.1.2 Discussions.....	86
V. 2 Dose létale moyenne (LD ₅₀).....	87
V.2.1 Résultat et Discussion.....	87
V.3 Mesure de concentration de complexe venin-antivenin:.....	88
V.3.1. Résultat.....	88
V.3.2. Discussion.....	90
REFERENCES:.....	93
CONCLUSION GÉNÉRALE:.....	96

INTRODUCTION GÉNÉRALE

INTRODUCTION:

L'envenimation du scorpion est considérée comme un problème médical grave et une menace réelle dans un certain nombre de pays du monde. En particulier, cette pathologie spécifique représente l'un des problèmes de santé publique les plus importants en Algérie [1], [2] surtout dans les hauts plateaux et au sud [3]. Dans ces régions où OUED SOUF est parmi les zones les plus touchées, les scorpions piquent plusieurs milliers de personnes, dont une dizaine meurt chaque année en moyenne.

Le très gros scorpion jaune *Androctonus australis hector*, le plus dangereux des scorpions, est responsable du plus grand nombre d'accidents et de décès en Algérie [4]. Il existe d'autres types, mais moins toxiques, nous avons choisi trois types dans cette étude *Androctonus australis hector*, *Androctonus Amoreuxi* et *Buthacus arenicola*. La petite quantité de venin inoculée par ces deux premières espèces, lors de la morsure, peut provoquer de nombreux symptômes d'envenimation.

Le seul traitement spécifique est une immunothérapie passive efficace adaptée aux sévères envenimants [5]. Ainsi, le dosage préliminaire et la caractérisation des composites de toxines [6], circulant chez les victimes humaines, aidera à définir la dose nécessaire de l'antivenin ainsi que son développement d'une façon plus efficace [7].

La dose d'anti-venin requise pour traiter un patient pour la plupart des anti-venins n'est pas clairement caractérisée et est souvent fondée sur des investigations *in vitro* et *in vivo* effectuées par le fabricant et sur la compréhension commune des cliniciens traitant systématiquement les cas [8-10].

Nous avons estimé la quantité d'anti venin nécessaire pour neutraliser le venin, qui se sépare par analyse chromatographique afin de montrer la différence de sa composition par une technique de détection par immunodosage enzymatique [11] qui permet de visualiser une réaction anticorps antigène grâce à une réaction colorée produite par l'action sur un substrat enzymatique (peroxydase) avant d'être attachée à l'anticorps (conjugué) [12-15].

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés par l'étude de la composition des toxines des venins de scorpions de différentes régions, espèces et âges. Le but de cette

étude est de vérifier l'efficacité de l'antivenin algérien SAS sur plusieurs types de venin de scorpion se trouvant dans le sud de l'Algérie et de définir la quantité d'antivenin nécessaire pour neutraliser le venin. Cette quantité recherchée correspond au point F (ab ') 2-toxine maximum [17-20].

Le manuscrit est divisé en cinq chapitres :

Dans le premier chapitre, nous présenterons une mise au point bibliographique sur les classifications des scorpions et répartition géographique des scorpions dans le monde, en Algérie et en El-Oued.

Dans le deuxième chapitre, une mise au point bibliographique sur les types de toxines, mode d'action des toxines et leurs variétés.

Le troisième chapitre concerne une étude bibliographique sur antivenin et le principe de production.

Dans le quatrième chapitre, les méthodes et matériel de capture des scorpions, l'extraction de venin, analyse chromatographique et neutralisation des toxines.

Le cinquième chapitre sera consacré aux résultats et discussions des facteurs qui influent sur la composition et la concentration des toxines pour connaître le comportement du sérum anti-scorpion sur ces toxines ainsi que l'évaluation de la dose requise de sérum anti-scorpion.

En dernier lieu, les résultats présentés ainsi que les perspectives envisagées seront résumés dans la conclusion générale de cette thèse.

REFERENCES:

- [1] Alamir B, Hamdi-Aissa L, Ouahdi M, Benguedda AC, Guerenik M & Merad R – Résultats de 3 années de lutte antiscorpionique dans une zone pilote du sud algérien. Communication au 1er Congrès international sur les envenimations et leurs traitements, Institut Pasteur de Paris, 7-9 juin 1995.
- [2] Institut National de Santé Publique – Envenimation scorpionique. Rapport annuel sur la situation épidémiologique en Algérie. Rapport de l'INSP (2000).
- [3] Vachon M – Études sur les scorpions. Institut Pasteur d'Alger, Alger, 1952, 482 p.
- [4] H. Hellal, M. Guerinik, L. Griene, Y. Laid, S. Mesbah, R. Merad ,Données épidémiologiques sur l'envenimation scorpionique en Algérie. Bulletin de la Société de pathologie exotique 105, pages189–193(2012).
- [5] Erick Bermúdez-Méndez , Albert Fuglsang-Madsen .Innovative Immunization Strategies for Antivenom Development. Toxins 2018, 10, 452; doi:10.3390/toxins10110452
- [6] Gutiérrez, J.M.; Calvete, J.J.; Habib, A.G.; Harrison, R.A.; Williams, D.J.; Warrell, D.A. Snakebite envenoming. Nat. Rev. Dis. Primer 2017, 3, 17063.
- [7] Clot-Faybesse et al. Quantitative variability in the biodistribution and in toxinokinetic studies of the three main alpha toxins from *Androctonus Australis* Hector scorpion venom. Toxicon 2004; 43: 661-9.
- [8] Krifi MN.N., Kharrat H., El Ayeb M. Evaluation of antivenom therapy in children severely envenomed by *Androctonus australis garzonii* (Aag) and *Buthus occitanus tunetanus* (Bot) scorpions. Toxicon 1999; 37 (11): 1627-34.
- [9] Bulfone, T.C.; Samuel, S.P.; Bickler, P.E.; Lewin, M.R. Developing Small Molecule Therapeutics for the Initial and Adjunctive Treatment of Snakebite. J. Trop. Med. 2018, 2018, 10.
- [10] Warell D. Animal poisons in Masson's tropical diseases. Masson Pec. Bahr. Bell DR. eds. London; Baillière tindall 1987: 889- 99.
- [11] Ismail M, Abd-Elsalam MA, al-Ahaidib MS: *Androctonus crassicauda*(Olivier), a dangerous and unduly neglected scorpion--I. Pharmacological and clinical studies. Toxicon 1994, 32(12):1599–618.

- [12] Rajniti Prasad, Abhishek Kumar, Om Prakash Mishra ,Tej Bali Singh , Ankur Singh , Efficacy of Scorpion Antivenom in Grade III and IV Scorpion Envenomation , The Indian Journal of Pediatrics (July 2018) 85(7):576
- [13]. León, G.; Vargas, M.; Segura, Á.; Herrera, M.; Villalta, M.; Sánchez, A.; Solano, G.; Gómez, A.; Sánchez, M.; Estrada, R.; et al. Current technology for the industrial manufacture of snake antivenoms. *Toxicon* 2018, 151, 63–73.
- [14] Bond GR. Antivenin administration for *Centruroides* scorpion sting: risks and benefits. *Ann. Emerg. Med.* 21 (7), 1992, 788–791.
- [15] Ismail, M. The treatment of the scorpion envenoming syndrome: the Saudi experience with serotherapy. *Toxicon.* 32, 1994, 1019–1026.
- [16] Ismail M. Treatment of the scorpion envenoming syndrome: 12- years experience with serotherapy. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 21(2), 2003, 170–174.
- [17] Tarasiuk A, Menascu S, Sofer S. Antivenom serotherapy and volume resuscitation partially improve peripheral organ ischemia in dogs injected with scorpion venom. *Toxicon.* 42(1), 2003, 73–77.
- [18] El Amin EO, Sultan OM, Al Magamci MS, Elidrissy A. A. Serotherapy in the management of scorpion sting in children in Saudi Arabia. *Ann. Trop. Paediatr.* 14, 1994, 21–24.
- [19] Freire-Maia L, Campos JA, Amaral CFS. Approaches to the treatment of scorpion envenoming. *Toxicon.* 32, 1994, 1009–1014
- [20] Krifi MN, Savin S, Debray M, Bon C, El-Ayeb M, Choumet V. Pharmacokinetic studies of scorpion venom before and after antivenom immunotherapy. *Toxicon.* 15, 2005, 429–433.

CHAPITRE I
GENERALITES SUR
LES SCORPIONS

Histoire du scorpion:

I. 1 Scorpion:

L'évolution semble avoir donné au scorpion toutes les facultés pour survivre. Déjà au Carbonifère, il y a plus de 300 millions d'années, le scorpion possédait les mêmes caractéristiques qu'aujourd'hui. Les scorpions font partie de la classe des Arachnides et de l'ordre des Scorpiones.

On comptabilise environ 1 500 espèces de scorpions dans le monde. Selon les auteurs, elles sont regroupées en 170 genres et entre 13 et 20 familles. Peu d'espèces supportent bien la captivité et beaucoup sont en danger d'extinction à cause de la destruction de leur habitat [1].

I. 2 Généralités sur les scorpions :

Le scorpion est un lointain parent de l'araignée. Tout comme elle, il a quatre paires de pattes. C'est un animal invertébré de la classe des arachnides. [1]

Ils font leur apparition, en milieu aquatique au Silurien, il y a 450 millions d'années [2],[3]. La transition vers le milieu terrestre s'est effectuée entre le Carbonifère et le Dévonien (entre 380 millions et 350 millions d'années) [4].

On compte au-delà de mille espèces de scorpions, tous sont venimeux, mais seulement une vingtaine d'entre eux ont une piqûre mortelle [1].

C'est un animal robuste qui peut résister à des écarts de température allant jusqu'à 50 degrés Celsius. Il est un champion du jeûne. Il peut vivre 3 ans sans nourriture, mais pas sans eau.

I.3 Morphologie du scorpion:

I. 3. 1 Corps:

La taille des scorpions varie de treize millimètres à cent quatre-vingt millimètres, mais on retrouve pour tous les scorpions, quel que soit leur taille, une morphologie sensiblement identique.

On peut dire que cet animal est composé de trois parties [1] :

I.3.1.1 Le céphalothorax ou prosome, pièce unique portant en avant les chélicères, une paire de pattes mâchoires dotées de grosses pinces et quatre paires de pattes ambulatoires.

I.3.1.2 L'abdomen ou mésosome, formé de sept anneaux dorsaux et ventraux portant peignes et organes génitaux.

I.3.1.3 La queue ou métasome, plus mince que l'abdomen, dépourvue d'appendices, formée de six segments. Le sixième ou telson porte la glande à venin et l'aiguillon. [3]



Figure I.1a : corps de scorpion [5].

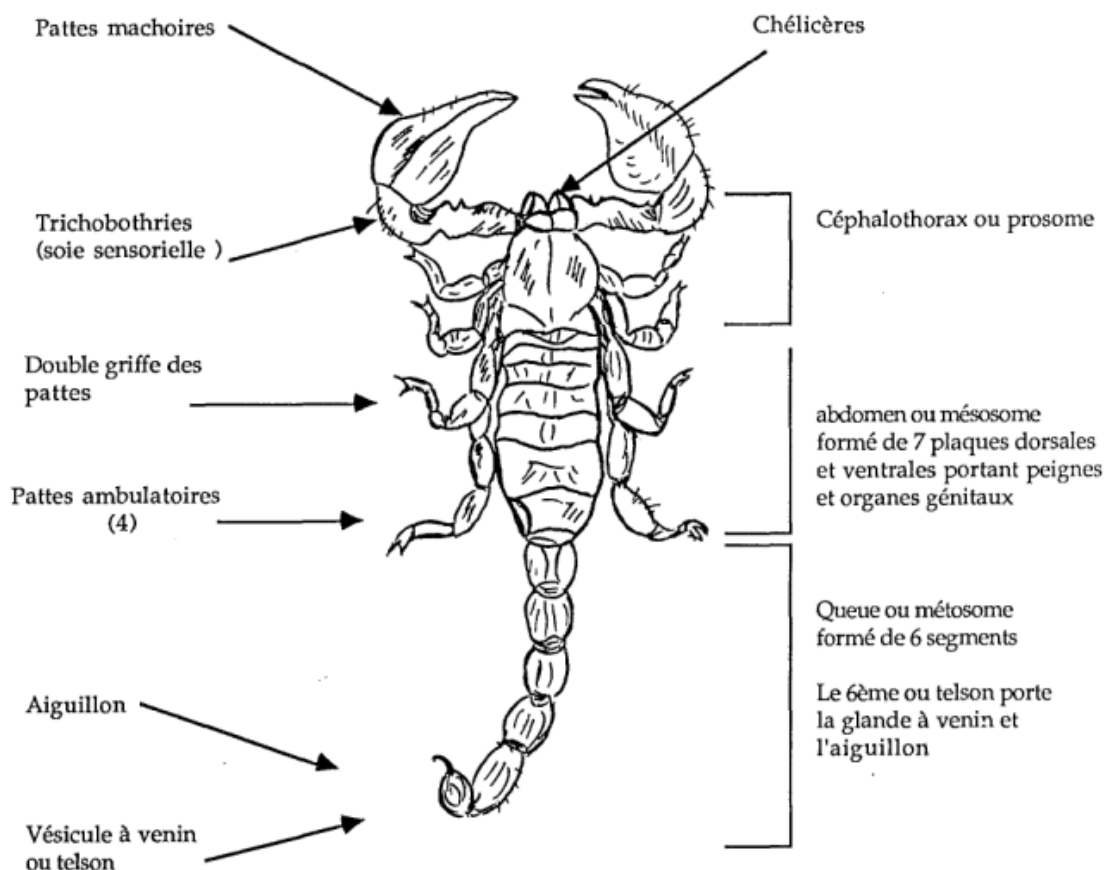


Figure I.1b : Anatomie externe de scorpion [5].

Ce scorpion peut atteindre 10 à 12 centimètres de long quand il est adulte. Il est jaune paille et selon les sous-espèces [6], des zones plus ou moins foncées sont présentes en divers endroits du corps (pinces et derniers anneaux de la queue notamment) [7] [8]. La queue présente des anneaux fortement élargis vers l'arrière [9] [10], [1].

I.3.2 Appareil venimeux:

Les scorpions sont définis, sans ambiguïté, avec la vésicule à venin située à l'extrémité de la queue prolongée par un aiguillon permettant l'inoculation du venin (Figure 3). Cette vésicule renferme deux glandes oblongues symétriques par rapport au plan sagittal logées dans le dernier segment caudal, lequel se termine par un aiguillon arqué robuste et très acéré. Chaque glande est munie de son propre canal dont l'orifice est situé plus ou moins latéralement dans la portion subterminale de l'aiguillon. Chaque glande est constituée d'un épithélium glandulaire à cellules apocrines associé à des cellules myoépithéliales et à du

tissu conjonctif [11]. Cet épithélium est entouré d'une musculature puissante permettant l'éjection du venin ce qui permet au scorpion de doser la quantité de venin à inoculer [12].

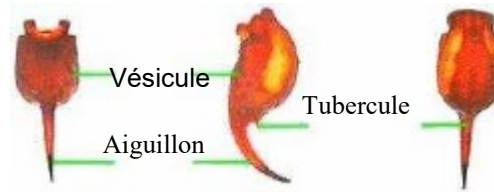


Figure I.2: Appareil venimeux.

I.4 Habitat:

Les scorpions sont des animaux thermophiles bien adaptés aux milieux désertiques [13-15]. Ils vivent presque toujours en colonies non socialement organisées. Il s'agit d'une occupation de terrain de proche en proche car les jeunes s'éloignent peu du lieu de leur naissance et les adultes ne se déplacent jamais très loin [16]. Du fait qu'ils se caractérisent par une modeste capacité de déplacement, les scorpions sont de bons indicateurs biogéographiques. Ce mode de déplacement est attribué essentiellement à leur dépendance stricte de micro-habitats particuliers [17]. Actuellement, ils sont en bonne position pour les études de la biodiversité avec des implications directes dans les programmes de conservation [18], [19].

I.5 Comportement:

Les scorpions sont d'un naturel craintif et peuvent piquer lorsqu'ils sont dérangés ou malmenés. Ils ne sont actifs que pendant la belle saison. Leur vie est considérablement ralentie pendant l'hiver. Du fait qu'ils sont photophobes, sensibles aux rayonnements visibles, ils restent toute la journée cachés sous les pierres, dans des terriers ou sous les écorces d'arbres, et leurs piqûres sont essentiellement nocturnes. Certains s'abritent à l'intérieur des habitations humaines. La photo-réception se produit dans les yeux latéraux de la plupart des espèces de scorpions alors que les yeux médians sont généralement moins sensibles à la lumière [20]. Plusieurs espèces de scorpions restent relativement inactives dans leurs terriers pendant 92 à 97 % de leur vie [21] [19].

I. 6 Régime alimentaire prédation et parasitisme:

Les scorpions, animaux à digestion externe très lente[22], sont généralement anthropophages[23] Ils se nourrissent de proies vivantes ou fraîchement tuées, essentiellement d'insectes (petits coléoptères, papillons, criquets, sauterelles, fourmis...), de crustacés (cloportes), d'arachnides (araignées, opilions...) et d'autres arthropodes [24] Le cannibalisme est un phénomène commun chez les scorpions [25].

Cependant, certaines espèces peuvent se nourrir de petits vertébrés (reptiles et rongeurs) [20]. Dès qu'une proie se trouve à sa portée, le scorpion la happe et l'immobilise avec ses pinces. Tantôt il peut la dévorer sans défense. Econome de venin, il attend prudemment l'effet de la première piqure avant d'intervenir à nouveau [19]. Les prédateurs de ces animaux incluent par ordre d'importance, les oiseaux, les lézards, les mammifères (singes), les amphibiens, les serpents, les arachnides et les insectes [20]. Les scorpions sont généralement parasités par des nématodes (larves de Mermithidae) au niveau des cavités du mésosome et du métasome ; et des acariens (Acaridae, Pterygosomidae,...) au niveau des peignes et la membrane articulaire de la chitine [20], [19].

I.7 Résistance aux radiations:

Les contrôles biologiques menés à l'occasion des premières expérimentations nucléaires françaises au Sahara d'Algérie ont révélé la résistance élevée aux radiations des arthropodes de ces régions, notamment les scorpionidés.

Les chercheurs du Service de Santé Militaire [27], [35] furent intéressés naturellement par les mécanismes de radiorésistance des organismes vivants. Cette radiorésistance varie dans des proportions considérables d'un embranchement à l'autre, et même d'une espèce à l'autre.

Ces chercheurs ont testés systématiquement la sensibilité aux rayonnements ionisants X et gamma de scorpions sahariens. Ils ont ainsi étudié les scorpions : *Androctonus australis*, *Androctonus amoreuxi* *Buthacus leptochelys*[19].

D'autres scorpions ont été testés par ailleurs : le scorpion *Centruroides Sculpturatus* des déserts arizoniens et le *Centruroides Testaceus* des Caraïbes. Les résultats varient

largement en fonction semble-t-il des données génétiques, physiologiques et écologiques [20-23].

Ainsi, les scorpions des zones arides sont plus radiorésistants que ceux qui vivent en ambiance marine ou hydratée. Quoiqu'il en soit, le niveau élevé de radiorésistance de l'ensemble des scorpions est maintenant un fait acquis [24].

Les diverses tentatives d'explication de cette étonnante propriété de radiorésistance ont mis en évidence deux facteurs généraux.

- **L'hypométabolisme** : plus l'activité métabolique est ralentie, plus la radiorésistance est élevée ;

- **L'importance et la structuration** de l'équipement génétique et chromosomique et l'état des acides nucléiques.

De plus, deux éléments spécifiques accroissent la radiorésistance des scorpions:

- la fluorescence importante de leurs téguments qui se traduirait en quelque sorte par une réflexion de l'énergie au niveau de la carapace. On sait que les effets destructeurs d'une irradiation sont liés à l'absorption de l'énergie de rayonnement par les tissus [25],[26].

- la venimosité : le venin de scorpion comporte de la sérotonine, alkylamine dont les propriétés radioprotectrices ont été reconnues. On a pu observer également qu'au sein de l'ordre des arthropodes résistent le mieux aux rayonnements, les espèces fixées depuis les plus lointaines époques géologiques. C'est le cas du scorpion qui apparaît dès le silurien [29].

Le Scorpion est présent aussi bien dans les forêts tropicales, que dans le désert en passant par les milieux ouverts comme la savane, les steppes ou les prairies.

Mais le principal danger pour l'homme réside dans la préférence marquée des scorpions pour les habitations où ils n'hésitent pas à se glisser dans les lits, les chaussures ou sous les tapis.

Dans la nature, les scorpions passent la journée cachés sous des rochers ou dans des galeries qu'ils creusent dans le sable. [29]

Ils cherchent la solitude et l'obscurité, c'est pourquoi ils apparaissent rarement [6]. Dans la région d'El-Oued (ALGERIE), *A. australis hector* est l'espèce la plus répandue, ayant une large répartition et particulièrement les habitations [22].

I.8 Ethologie:

En général, les scorpions vivent en groupe [30]. On les trouve dans des habitats divers : sous les pierres, les rochers, les écorces d'arbres et les vieilles constructions. Ils cherchent les coins obscurs où ils creusent des terriers [31-33]. Par contre certains scorpions affectent le voisinage des habitations, se placent entre les draps, dans les chaussures, dans les cuisines et les salles de bains [33].

I.9 Les espèces des scorpions de la famille des Buthidae :

La famille des Buthidae regroupe quarante genres et trois cent espèces, les plus importants étant *Androctonus* (tableau I.1) [19].

GENRE	ESPECE	MORPHOLOGIE	COULEUR	LOCALISATION
Androctonus	australis hector	10 à 12cm Pincés fines anneaux de la queue épais	jaune avec l'extrémité des pincés et de la queue plus sombres	Sud Algérie, Lybie, Tunisie
	aenas	8cm	noir ce qui le différencie des autres <i>Androctonus</i>	Tunisie
	amoureuxi	robuste		Mauritanie
	mauretanicus			Maroc
Leiurus	quinquestriatus	8cm	jaune	Afrique du Nord Sahara Soudan, Egypte, Palestine Arabie Saoudite
Buthus	occitanus	5,5 à 7,5 cm pincés fines, allongées les anneaux de la queue allongés. les carènes du céphalothorax saillantes, foncées, en forme de lyre	jaune	Tunisie
Centruroides	noxius infamatus			Mexique, Arizona
Tityus	sculpturatus exilicauda	1,3 à 7,5 cm, Segments de la queue rectangulaire petit tubercule à la base de l'aiguillon		Etats-Unis
	serrulatus		brun jaunâtre	Brésil
	bahiensis		uniformément brun	Brésil Argentine

Tableau I.1 : les espèces des scorpions dangereux à la famille de Buthidae.

I.10 Les différentes familles de scorpions:

Il est à noter que la classification des scorpions fait l'objet de nombreuses controverses. On a choisi la classification de Fet & Sologlad de 2005 en y incluant les mises à jour de 2007.

I. 10. 1 Bothriuridae:

Réparties en 14 genres actuellement, les 128 espèces environ vivent en Amérique du Sud, en Afrique du Sud, en Australie et en Inde.

Genres les plus connus : Bothriurus, Brachistosternus, Cercophonius, Orobothriurus, Urophonius

I.10. 2 Buthidae:

Les Buthidae comptent plus de 700 espèces dont celles qui sont dangereuses pour l'homme. Elles sont présentes dans le monde entier et particulièrement dans les zones arides, tropicales et subtropicales.

Leur couleur varie généralement du jaune au brun foncé et leur taille de 20 à 120 mm.

Parmi les espèces les plus dangereuses, on trouve notamment celles des genres Androctonus, Buthacus, Buthus, Centruroides ou Tityus.

I.10.3 Caraboctonidae:

Ces scorpions sont présents en Amérique du Nord, en Amérique centrale et en Amérique du Sud.

L'espèce la plus connue est Hadrurus arizonensis qui est très présent en captivité. C'est également le plus grand scorpion d'Amérique du Nord. Cette famille comprend 4 genres et 18 espèces.

Genres : Caraboctonus, Hadrurides, Hadrurus, Hoffmannihadrurus

I.10.4 Chactidae:

Les Chactidae regroupent plus d'une centaine d'espèces réparties de Mexico à l'ensemble de l'Amérique du Sud. Ces scorpions se caractérisent par deux paires d'yeux latérales. Ils vivent aussi bien dans les déserts que dans les forêts humides. Ce sont des espèces principalement cavernicoles. Leur venin est en général inoffensif.

Cette famille comprend 12 genres et environ 150 espèces.

I.10.5 Superstitioniidae:

Cette famille comprend 10 espèces qui vivent en Amérique du Nord et en Amérique du Sud. La plupart des espèces sont cavernicoles. Certaines vivent dans l'obscurité totale et ne possèdent ni yeux, ni pigments.

5 genres : Alacran, Sotanochactas, Superstitionia, Troglotayosicus, Typhlochactas

I.10.6 Vaejovidae:

Cette famille est assez hétéroclite et comprend plus de 150 espèces. Ces scorpions vivent en Amérique du Nord et en Amérique centrale. Ils fréquentent tous les biotopes, y compris les zones montagneuses jusqu'à 3000 m d'altitude.

Principaux genres : Paruroctonus, Pseudouroctonus, Serradigitus, Vaejovis.

I.11 Les espèces de scorpions les plus dangereuses:

Environ 25 espèces de scorpions sont dangereuses pour l'homme. Le scorpion n'attaque pas l'homme, il contre-attaque quand il se sent menacer ou qu'il est surpris. Le scorpion est responsable d'un nombre important des décès par an dans les pays de l'Afrique du Nord. En revanche les espèces d'Europe ne sont pas mortelles pour l'homme en comparant par celles de l'Afrique [1].

I.11.1 Amérique Du Nord :

Centruroides exilicauda, Centruroides infamatus, Centruroides noxius, Centruroides suffusus

I.11.2 Amérique du Sud :

Genre Tityus

I.11.3 Afrique du Sud et Afrique de l'Est :

Genre Parabuthus et Rhopalurus debilis.

I.11.4 Irak Et Iran :

Hemiscorpius lepturus.

I.11.5 Afrique du Nord et pays méditerranéens :

Genre Buthus, genre Androctonus et Leiurus quinquestriatus.

I.12 Répartition géographique des scorpions:

Le scorpionisme est un problème de santé publique dans plusieurs pays du monde en particulier en Amérique Centrale, en Amérique du Sud, en Afrique du Nord, au Moyen-Orient et en Inde. En 2008, l'incidence mondiale annuelle des piqûres de scorpion a été estimée à 1,2 million et la mortalité à plus de 3 250 décès.

La carte de répartition géographique (figure I.3) donne une idée plus globale sur les envenimations scorpioniques à l'échelle mondiale et leur répartition géographique.

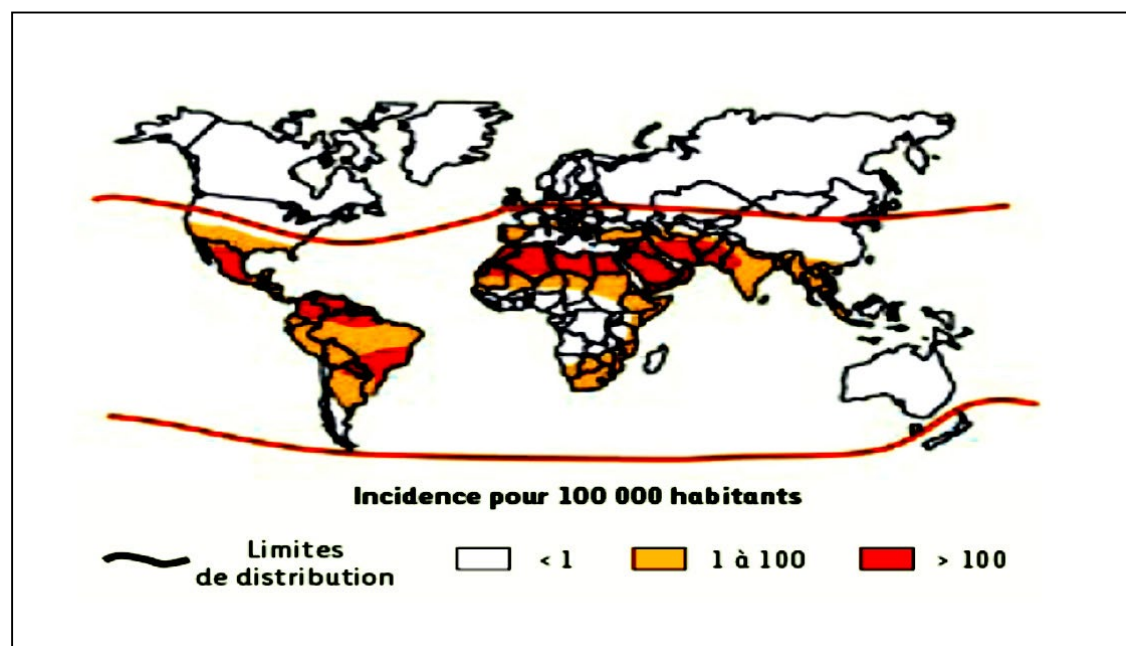


Figure I.3 : Incidence mondiale des piqûres de scorpion.

L'incidence est essentiellement limitée à quatre régions fortement endémiques : Mexique, Amérique du Sud à l'Est des Andes, Afrique du Nord, Proche et Moyen-Orient.

I.12.1 Répartition géographique mondiale des scorpions :

Ils sont répartis entre les 45° de latitude nord et sud et occupent les biotopes les plus divers et peuvent être rencontrés en altitude, à plus de 3000 mètres (Figure I.4). Cette large répartition s'explique par la résistance multifactorielle qu'ils ont acquise au cours de leurs évolutions [10].

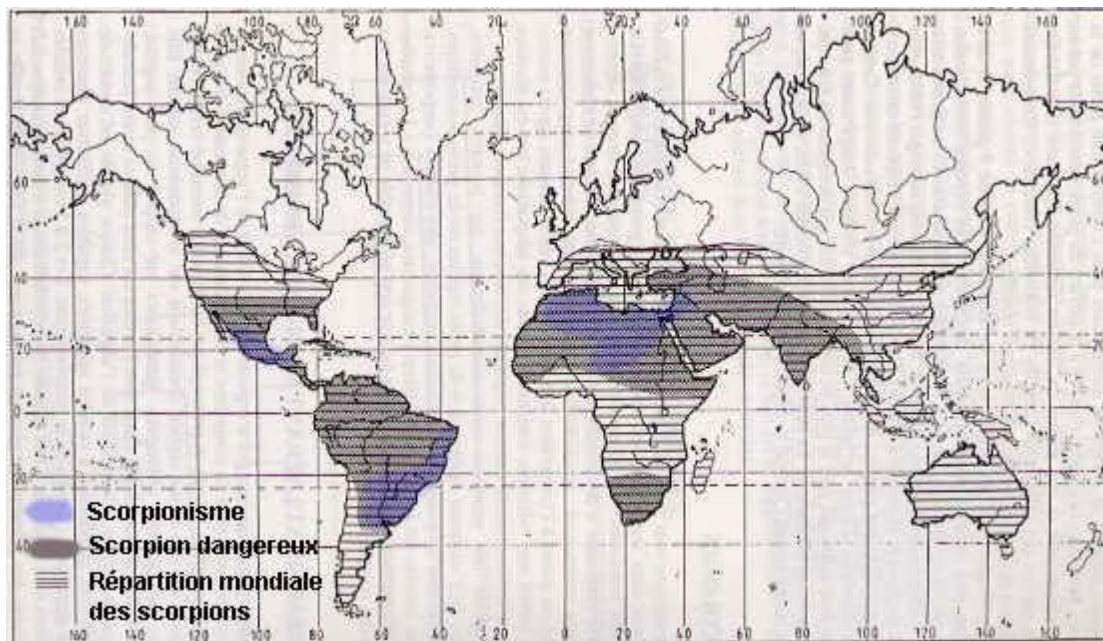


Figure I. 4: Répartition géographique mondiale des scorpions dangereux.

I.12.2 Répartition géographique des scorpions en Algérie :

La répartition des scorpions sur le territoire national reste mal connue, une étude cartographique complète nécessite un bon équipement [11].

La principale espèce est représentée par l'*Andoctonus australis*. Cette espèce se trouve dans un espace compris entre Biskra, El Oued, Bou-Saada, Ouargla et Adrar [12] (Figure I. 5) et (Figure I. 6).

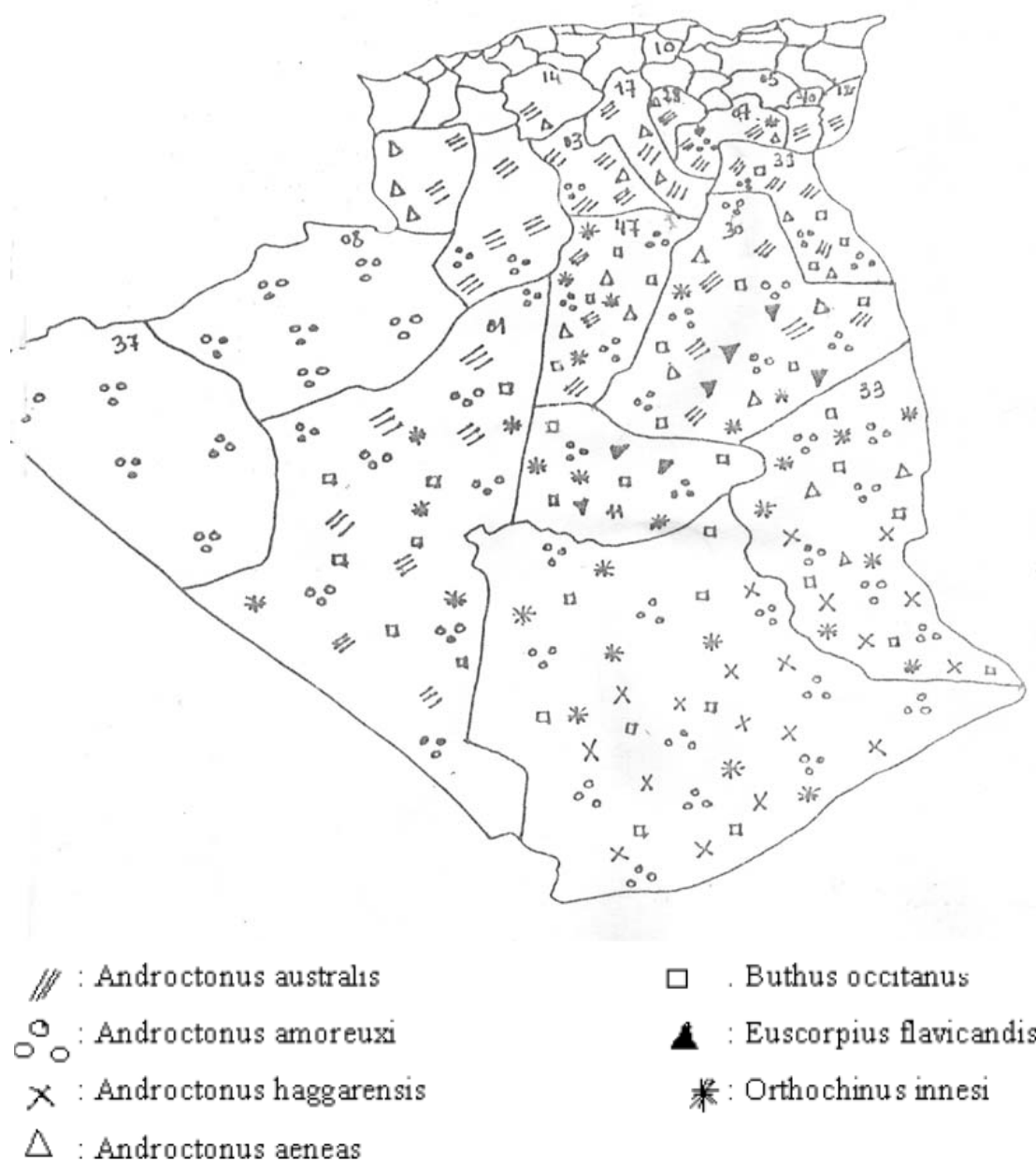


Figure I. 5: Répartition des principales espèces scorpioniques en Algérie.

Voici ci-après la répartition géographique des régions les plus touchées par envenimation scorpionique en Algérie (**Figure I. 6**) [34].

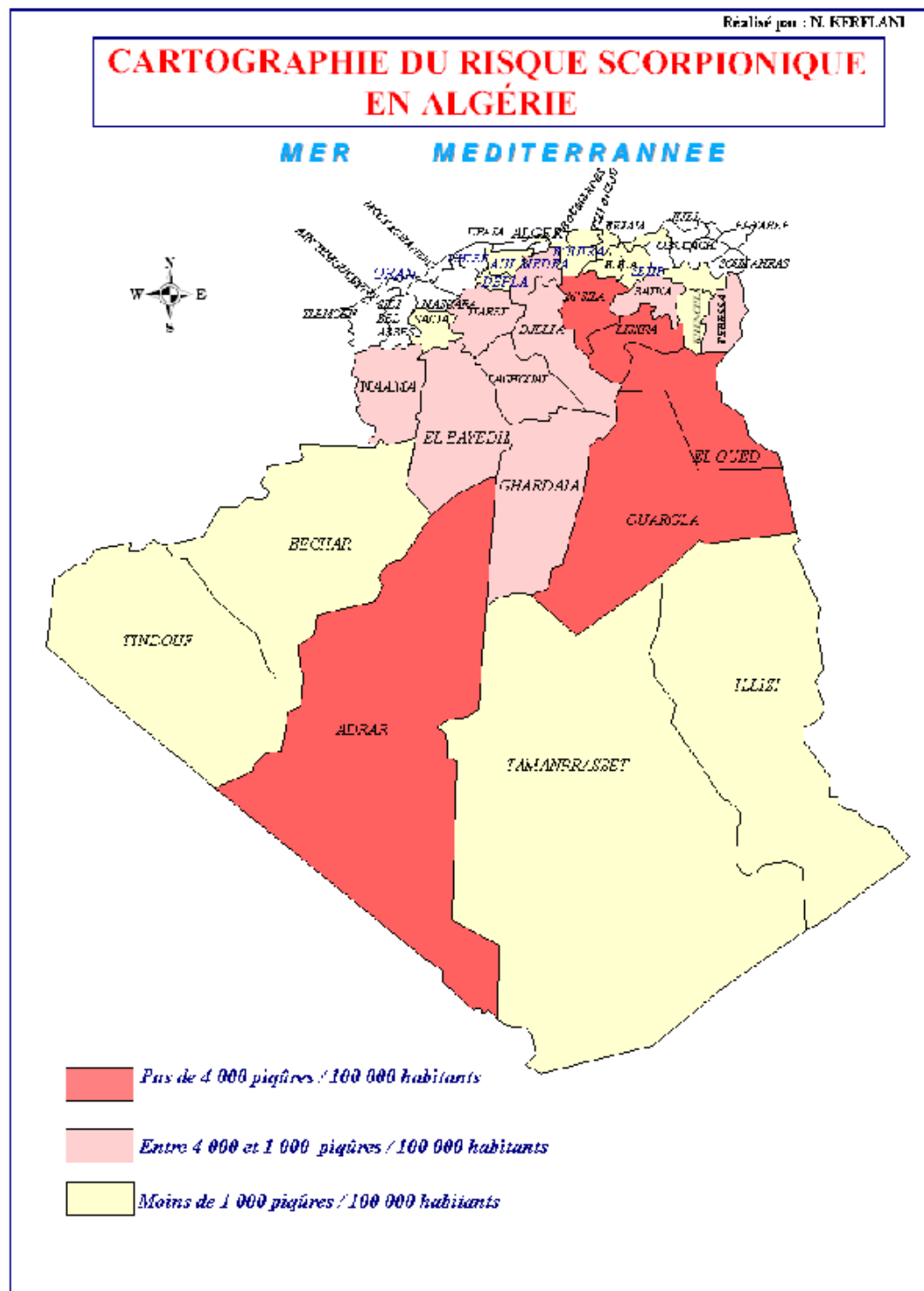


Figure I. 6: Les régions à haut risque par Envenimement scorpionique [34].

I.12.3 Les espèces existant dans la région d'Oued-Souf:

Le climat de la région d'El-Oued est, à certains points, analogue à celui du reste du Sahara ; c'est-à-dire un climat des contrées désertiques, si l'on considère sa pauvreté en végétation, la sécheresse de l'air, le manque d'eau en surface et l'irrégularité des précipitations font de cette zone un biotope naturel pour le développement des scorpions [30]. Parmi ces scorpions, on peut recenser ceux les plus répandus dans la région à savoir :

1- *Androctonus amoreuxi*:

Cette espèce a une large répartition dans la région d'El-Oued, elle se trouve généralement dans les endroits sableux et parfois certains terrains à fond caillouteux [32].

L'*Androctonus amoreuxi* est une espèce de scorpions de la famille des Buthidae de grande taille, pouvant atteindre 12 cm de longueur avec une queue beaucoup plus fine à partir du 3^{ème} anneau [30-31]. De couleur jaune paille aux carènes plus foncées. Céphalothorax à front droit granulé avec carènes distinctes, carènes oculaires médianes et postérieure entrecoupées, carènes oculaires latérales, carènes latérales centrales moins prononcées, petits yeux médians, et 3 yeux latéraux distincts. Tergites tricarénés finement granuleux à partir du 2^{ème} anneau. Sternite 7 à 4 carènes granuleuses. Metasoma mince et à surface dorsale concave et lisse, le 1^{er} anneau est plus large que long avec 10 carènes granulées, la surface dorsale est affublée de granules disposés en forme de V, le 2^{ème} anneau plus long que large à 8 carènes granuleuses. Le troisième anneau est plus long que large à 8 carènes, 4^{ème} anneau plus long que large à carènes ventrale séparées en deux et incomplètes. L'anneau 5 est plus long que large à 5 carènes à dents irrégulières terminé de quatre lobes d'anneaux. Telson jaune avec l'aiguillon plus rougeâtre peu courbé aussi long que la vésicule. Bras et avant-bras des pédipalpes dorsalement granulé deux fois plus long que large. Main lisse avec granules intérieur, deux dents au doigt fixe ventralement, encoche au doigt fixe du mâle, 12 - 16 série de dents. Éperon basitarse à dent simple, basitarse des pattes 1, 2,3, aplati avec peigne.

Pectines : Nombres de lames, mâle 28 à 33, femelle de 22 à 29.



Figure I.7: *Androctonus amoreuxi*

2- *Androctonus australis hector*:

Cette espèce ayant une large répartition dans la région de notre étude et surtout présente à proximité des habitations [36].

A. australis hector est une espèce, pouvant mesurer 10 cm, facile à reconnaître par sa queue la plus épaisse (figure I.1), de teinte jaune paille plus ou moins ocre avec parfois des zones plus ou moins foncées sur le corps. Sternites jaune pâle. Metasoma jaunâtre, avec des carènes ventrales brunâtres, cinquième anneau et vésicule plus sombre. Telson avec l'aiguillon rougeâtre à la base et brunâtre à l'extrémité. Pédipalpes jaunes plus ou moins ocre, avec les doigts plus foncés, pattes jaunes pâles avec des parties du corps (pinces et derniers anneaux de la queue) plus ou moins assombries [37].



Figure I.8: *Androctonus australis hector*.

3- *Buthacus arenicola*:

Buthacus arenicola est une espèce ayant une taille entre 5 et 6 cm, de couleur uniforme brun claire à jaune paille. Céphalothorax lisse et granulé sur les flancs, carènes oculaire médiane lisse à légèrement granuleuses, yeux médians séparés de plus d'une fois leurs diamètre, 3 à 4 petits yeux latéraux. Tergites à carènes sobres tricarénés dès le 2^{ème} et parfois le 1^{er} tergite. Sternites 7 granuleux avec macrochètes nombreuses sur les bords postérieurs et latéraux. Pédipalpes mince et lisse à peine granulés, main lisse plus large que l'avant-bras, doigts. De 8 à 11 séries de dents terminées par un gros granule, flanqué ou non d'un granule accessoire du côté externe, toujours un granule accessoire du côté interne, 3 ou 4 granules distaux terminent le doigt mobile [36]. Pattes ambulatoires avec éperons basitarsaux externes bien développés porteur de nombreuses soies, éperons interne long et mince avec une ou deux soies, basitarce des pattes 1,2 et 3 très comprimé, griffes peu courbées et minces. Premier segment du metasoma avec dix carènes et huit dans le 2^{ème} où carènes intermédiaires incomplètes n'atteignent pas la moitié de l'article du mâle et n'ont que 5-6 granulations pour la femelle, 8 carènes au 3^{ème} segment avec quelques granules aux carènes intermédiaires, 4^{ème} segment sans carènes intermédiaires et 5^{ème} segment à carènes dorsales et dorso latérales timide et lisses, [37].



Figure I.9: *Buthacus arenicola*

I.13 Le Venin:

I.13.1 Composition et mode d'action:

Les venins de scorpion contiennent un certain nombre de principes actifs de structure polypeptidique: enzymes, sérotonines, histamines et quinines. Ils ont tous une action neurotoxique et cardiotoxique, mais certaines espèces indiennes ont également une action hémolytique [38]. Les composants actifs du venin des scorpions dangereux pour l'homme sont des neurotoxines peptidiques (dites toxines longues) contenant une soixantaine d'acides-amino en une chaîne réticulée par quatre ponts disulfure [39].

L'essentiel des connaissances acquises sur les venins de scorpions se rapporte à la famille des Buthidés, en raison de leur importance médicale. Ces venins sont avant tout neurotoxiques, comme l'a montré Paul Bert en 1865 [40]. Un siècle plus tard, les premières neurotoxines de venin de scorpion ont été isolées (1960), par une équipe de Marseille [41], des venins des scorpions nord-africains dangereux *Androctonus australis* (scorpion noir) et du scorpion jaune *Buthus occitanus* [42,43].

Les neurotoxines sont les principales composantes des venins de scorpions responsables des effets toxiques observés après envenimation. La classification de ces toxines est basée sur le type du canal sur lequel elles interagissent. Ainsi elles se fixent spécifiquement avec les canaux ioniques sodium, potassium, chlore et calcium des membranes des cellules excitables. Il existe quatre types de toxines :

On reconnaît actuellement quatre familles de toxines qui agissent sur :

- Les canaux sodium.
- Les canaux potassium.
- Les canaux calcium.
- Les canaux chlore.

Les deux premières familles sont de loin les mieux connues. Il a été établi en effet que les neurotoxines actives sur les canaux sodium sont responsables de la symptomatologie de l'envenimation, les toxines actives sur les canaux potassium potentialisent l'effet des premières [44].

I.13.2 Propriétés du venin :

Le venin de scorpion se présente sous forme d'un liquide blanchâtre, jaunit et devient opalescent et visqueux aux cours du temps. Il contient de petits granules insolubles, des débris cellulaires [45-49], et des protéines solubles de faible poids moléculaire, peu représentées, qui sont responsables de manifestations physiopathologiques de neurotoxicité chez les envenimés [50-52].

Il est distribué beaucoup plus rapidement dans l'organe vivant. Cette observation implique immunothérapie antivenimeuse soit pratiquée beaucoup plus rapidement dans le cas d'une envenimation scorpionique [53].

Le venin de scorpion est thermostable, résiste à la dessiccation sous vide et son pouvoir toxique se conserve pendant plusieurs années [54].

La quantité de venin injectée par un seul scorpion varie entre 0,006 mg et 2,0 mg.

REFERENCES:

- [1] Site web [<https://www.dinosoria.com/scorpions.htm>], Septembre 2020.
- [2] Goyffon M., 2002- Le scorpionisme en Afrique sub-saharienne. Bull. Soc. Pathol. Exot, 95: 191-193.
- [3] Pisani, D., Poling, L.L. Lyons-Weiler, M. & Hedges, S.B. The colonization of land by animals: molecular phylogeny and divergence times among arthropods. BMC Biology 2, 19 Jan 2004: 1-10.
- [4] Dunlop, J. A, & Webster, M. (1999). Fossil evidence, terrestrialization and arachnid phylogeny. Journal of Arachnology, 27, 86–93.
- [5] Balozet L. Le scorpionisme en Afrique du Nord Bulletin de, la Société de Pathologie. Exotique 1974,57 (1), 33-38.
- [6] Aboumaâd N. Iba N. Dersi, L'envenimation scorpionique au Maroc scorpions du genus *Androctonus*, *Buthus* et *Hottentota* Bull. Soc. Pathol. Exot. (2014) 107 :39 -47.
- [7] J.P. Chippaux., M. Goyffon, (Animaux venimeux terrestres) 16078 A Io 4-1990, Editions Techniques - EMC - 4-1990 - 6e éd, (1990), p 6.
- [8] Site web Source: <http://fr.wikipedia.org/wiki/Scorpiones>, Août 2020.
- [9] Kaltsas, Stathi & Fet, 2008 : Scorpions Of The Eastern Mediterranean Advances in Arachnology and Developmental Biology, Monographs, n. 12, p. 209-246 .
- [10] Claire Marin, Le scorpionisme : prévention et traitements, dumas-01762972, version 1, 1988, p23-24.
- [11] Goyffon et Heurtault, la fonction venimeuse, ISBN 978-2-7430-1576-3, 1995, 284p.
- [12] Goyffon et lamy, une nouvelle sous-espèce d'*andouctonus australis*, 1973, Bull. Sco. ZOLL.FR98, 137-144.
- [13] Warburg, M.R. & Polis, G.A. Behavioural responses, rhythms. And activity patterns. The Biology of Scorpions (Ed. By G. A. Polis). (Stanford University Press. 1990). pp. 224-246.
- [14] Cloudsley-Thompson, Indo-British Workshop on Biodiversity, held in Various Places in India during 30 January–12 February 1993 .Volume 20, Issue 2. Summer 1993, p. 180.
- [15] Dr Naoual Oukkache, Etude des venins antivenin des scorpions marocains. Lettre pasteur N° 5 - Mai (2016), p12.

- [16] Millot J, Vachon M. Millot J, Vachon M. Traité de Zoologie Grasse Anatomie systématique. Biologie onychophores tardigrades 1949; 6: 135-5
- [17] BA Teachman, and KD Brownell1 .Brownell, implicit anti-fat bias among health professionals: is anyone immune, 2001. 25, 1525–1531.
- [18] Goyffon, Production and use of snake antivenin; 1991. p. 529-555.
- [19] Lourenço, W.R. Biogéographie évolutive, écologie et les stratégies biodémographiques chez les scorpions néotropicaux. Comptes Rendus des Séances de la Société de Biogéographie, 1991. 67(4): 171-190.
- [20] Warburg, M.R. & G.A. Polis 1990 Behavioral responses, rhythms, and activity patterns. In: G.A. Polis, The Biology of Scorpions, Stanford University Press, Stanford pp. 224–46.
- [21] Polis G.A - Biology of scorpions, ISBN-13: 978-0804712491, 1996.233p
- [22] T.G.Quinlan', G.T.Smithz and M.C.Calver'. Relationships Between Morphology and Feeding Behaviour in the Syntopic Scorpions *Urodacus armatus* Pocock and *Urodacus novaehollandiae* Peters (Scorpiones: Scorpionidae). J.Aust. ent. Soc, 1995, 34: 277-279.
- [23] SJ McCormick, GA Polis Stanford, The biology of scorpions. 587 p.
- [24] S, C Williams, scorpion bionomic, Ann, R 1987, 32, 335, 357.
- [25] Polis et Mc Cormick, Polis, G.A. & S.J. McCormick. 1987. Intraguild predation and competition among desert scorpions. Ecology, 1987.68: 332-343.
- [26] Cloudsley-Thompson, scorpion biologist 1992.39.206-210.
- [27] Couraud F. et Jovere., Dubois J M., Rochat H ., Two types of scorpion toxin receptor sites, one related to the activation, the other to the inactivation of the action potential sodium channel. Toxicon 20, (1982), p 9.
- [28] Goyffon, M. et Billiald, P. Envenimations. Le scorpionisme en Afrique. Med. Trop. (2007), 67, 439-446.
- [29] Geniez P., Découverte au Maroc d'*Androctonus australis* (Linnaeus, 1758) (Scorpiones, Buthidae). Poiretia (1), (2009), p 1-4.
- [30] Vachon, M., 1952. — Études sur les Scorpions. Inst. Pasteur Algérie: 482 pp.
- [31] Ismail M. Treatment of the scorpion-envenoming syndrome: 12 years' experience with serotherapy. International Journal of Antimicrobial Agents, (2003)21 (2): 170-174.

- [32] Geoffery KI, Erich SV, Corrine RB, Mark SH.,(2003).Australian scorpion stings: a prospective study of definite stings. *Toxicon*.41: 877-883
- [33] Pinkston et Wright, Scorpions. OSU Extension Facts, (2001). 7303.
- [34] F. Aliane, envenimation scorpionique en Algérie Centre Anti-Poisons d'Alger CHU Bab El Oued – Alger - 24 mai 2005.
- [35] Sadine Salah Eddine., Contribution à l'étude de la faune scorpionique du Sahara septentrional est algérien (ouargla et el oued). *Protection des végétaux*, (2012).
- [36] Simon E. Etude sur les Arachnides recueillis en Tunisie en 1883 et 1884 par MM. A. Letourneux, M. Sedillot et V. Mayet, membres de la Mission de l'Exploration scientifique de la Tunisie". ". In " Exploration scientifique de la Tunisie (1885)". Imprimerie nationale, Paris, 55pp.
- [37] Site web; <http://scorpuspark.e-monsite.com/pages/fiches-scorpions/buthacus-arenicola.html>).
- [38] El Yassir, Fatima EZ, Envenimations chez l'enfant par morsure de serpent et piqûre de scorpion à propos d'un cas. Thèse de doctorat. Université Mohammed V – Souissi Faculte de Medecine et de Pharmacie -Rabat. (2013).
- [39] Goyffon M, Billiald P, Envenimations des scorpions en Afriqueen. *Med Trop* .67 :439-446, (2007).
- [40] Bert P. Contribution à l'étude des venins (venins de scorpions). *C. R. Soc. Biol* 1665; 7: 136-7.
- [41] Miranda F., Rochat H., Lissitzky S. Sur la neurotoxine du venin des scorpions, I. Purification à partir du venin de deux espèces de scorpions. *Bull. Soc. Chim. Fr*, 1960; 42: 379-91.
- [42] Miranda E, Rochat H, Lissitzky S. Sur les neurotoxines de deux espèces de scorpions nord-africains, II. Purification des toxines (scorpamines) d'*Androctonus australis* (L) et de *Buthus occitanus* (Am.). *Toxicon* 1964; 2: 113-21.
- [43] Miranda F, Kopeyan C, Rochat H, Rochat C., Lissitzky S. Purification of animal neurotoxins. Isolation and characterisation of eleven neurotoxins from the venoms of *Androctonus australis* hector, *Buthus occitanus tunetanus* and *Leiurus quinquestriatus*, *Eur. J. Biochim*, 1970 ; 16: 514-23.
- [44] Goyffon M, El Ayeb M. Epidémiologie du scorpionisme. *Infotox* 2002 ; 15: 2-6.
- [45] Jean-Pierre Wainsten, Larousse medical. LAROUSSE. (2006).

- [46] Kalium, Scorpion Toxins Active on Potassium Channels". Kaliumdb.org. Retrieved. (2017).09p.
- [47] Karren J B, Scorpions. Extension Entomology, (2001). N° 68
- [48] Keegan HL, Scorpions of medical importance. Jackson: Univ. Press of Mississippi. (1980).140 p.
- [49] Khechekhouche, Hamdat, L'envenimation scorpionique et un analyse du venin de *Buthusoccitanus tenuitanus* dans la région de Ouargla, (2007).
- [50] Khiati M, L'envenimation scorpionique en Algérie, O.P.U. Alger, (1984). p621.
- [51] Krifi M, Chaumet V, Bon C, Elayeb M, Scorpionisme .Bulttein de la société de Toxicologie Clinique, (2001).N16
- [52] Krifi MN ,Miled K, Choumet V Bon C , El Ayeb M,. Immunothérapie anti-scorpionique : faits et perspectives Edition scientifiques et médicales El serier. (2002) p253- 265.
- [53] Mirand F, Rochat H, Lissizky S, la neurotoxine du venin des scorpions, I. Purification à partir du venin de deux espèces de scorpions. Bull. Soc. Chim. Fr. (1960).42: 379-91.
- [54] Petricevich VL, Scorpion Venom and the Inflammatory Response. Mediators of Inflammation. (2010).Vol.16p.

CHAPITRE II

GÉNÉRALITÉS SUR

L'ANTI-VENIN

Introduction:

Dans les pays tropicaux, les envenimations constituent un problème de santé publique fréquent mais négligé en raison d'une sous-estimation de leur incidence et parce qu'elles concernent des populations démunies. De plus, ces accidents sont considérés comme inévitables, ce qui restreint les stratégies de contrôle. Une meilleure estimation de l'incidence et de la sévérité des morsures de serpent et piqûres de scorpion améliorerait leur prise en charge. Le sérum antivenimeux, aujourd'hui très bien toléré grâce à la purification des immunoglobulines, est le traitement le plus efficace. Il reste cependant inaccessible aux populations du Sud en raison de son coût et de contraintes logistiques et commerciales. L'OMS vient de faire des recommandations pour standardiser la fabrication des sérums antivenimeux et en faciliter la distribution.

Les piqûres de scorpions sont redoutées par les populations qui les considèrent au mieux comme une fatalité, au pire comme un maléfice. Elles sont également craintes par le personnel de santé qui hésite sur la conduite à tenir et reste désarmé devant l'évolution imprévisible d'une symptomatologie spectaculaire. Plusieurs études récentes soulignent le paradoxe de cette urgence médicale fréquente et néanmoins négligée malgré une mortalité élevée. Il est lié à la méconnaissance de l'épidémiologie des envenimations et à l'inaccessibilité des moyens thérapeutiques. Le sérum antivenimeux reste controversé, bien qu'efficace, en raison du risque supposé de réactions indésirables graves.

La rencontre entre un animal venimeux et l'homme n'est pas fortuite. Elle est la conséquence de comportements et d'activités explicables, voire prévisibles. L'évaluation de l'incidence et de la gravité des envenimations est rendue difficile par la rareté et le manque de fiabilité des sources d'information. En revanche, la technologie des antivenins est désormais maîtrisée et l'on dispose de produits efficaces et bien tolérés [1]. Cependant, leur coût et les difficultés de leur distribution en limitent considérablement l'utilisation [2].

Une meilleure connaissance de la morbidité et de la mortalité par morsures de serpent permettrait sans aucun doute d'améliorer leur prise en charge et l'accessibilité des antivenins afin de réduire sinon l'incidence, du moins la létalité et les séquelles [3].

Les étapes de la production et du contrôle réglementaire des anti-venins de scorpion et contiennent une annexe qui répertorie la distribution mondiale de scorpion venimeux, cliniquement pertinente pour la production de venins et antivenins. Ce document est destiné à guider les autorités nationales de contrôle et les fabricants dans leurs efforts pour améliorer la production mondiale d'antivenins sûrs et efficaces. En outre, une base de données mondiale de l'OMS, comprenant des cartes et une bibliothèque d'images, a été créée pour prendre conscience de la représentation géographique du scorpion venimeux inclus dans l'annexe.

Cet effort a été entrepris pour soutenir les agents de santé publique, les agences d'achat, les régulateurs et les fabricants impliqués dans la prise de décision liée à la préparation et l'utilisation de sérums antivenimeux appropriés et pour aider les soignants dans leur prise en charge clinique des envenimations par morsure de scorpion.

En présence d'une envenimation scorpionique, la thérapie vise à ralentir la diffusion du venin, à neutraliser les toxines et à traiter les désordres cliniques observés. La sérothérapie représente le seul moyen rationnel pour combattre l'envenimation scorpionique et surtout les symptômes cliniques engendrés [1-3].

L'efficacité d'un anti-venin dépend de plusieurs paramètres : il y a d'une part, l'immunisation de l'animal devant se faire avec l'antigène le plus homogène possible ; d'autre part, l'efficacité du sérum doit également tenir compte de la pureté des anticorps spécifiques produits et Antivenom immunothérapie est le traitement spécifique singulier Pour scorpion envenomin [4].

L'administration de sérums antivenimeux reste empirique et leur efficacité est controversée, bien que certaines études ont décrit des effets thérapeutiques [5] La sérothérapie ou actuellement l'immunothérapie antivenimeuse constitue le seul traitement spécifique efficace contre les envenimations. En bénéficiant de nombreux perfectionnements techniques pour assurer la purification du sérum de cheval [6].

II.2. Généralité sur l'Anti-venin

II.2.1. Définition de l'anti-venin:

Un siècle après les travaux de Calmette, ainsi que ceux de phisalix et bertand, les anti-venins se sont préparés toujours de plasma ou de sérum d'animaux, généralement le cheval, hyperimmunisé avec le venin correspondant [7].

L'immunisation par voie sous-cutanée ou intraveineuse stimule la production d'anticorps sériques, l'ensemble de ces anticorps circulant dans le sang constitue « l'immuno-sérum » [8].

Cette dernière n'est pas utilisée à l'état brut, des améliorations successives lui ont été apportées pour obtenir une plus grande efficacité et une meilleure tolérance.

Une digestion d'une IgG (150 KDa) par la pepsine libère les fragments F (ab')₂ ; de masse moléculaire moyenne de 100 KDa et porteur de deux sites de fixation de l'antigène.

Si un traitement par la papaïne libère un fragment Fc et deux fragments Fab de masse moléculaire moyenne de 50KDa et porteur d'une seule valence de fixation de l'antigène. Ces caractéristiques confèrent aux fragments Fab des propriétés biologique différentes, par rapport à l'anticorps d'origine IgG ou aux fragments F(ab')₂ Une comparaison de ces trois molécules d'anticorps, montre les caractéristiques particulières pour chacun d'elles[8].

II.2.2.Immunothérapie antivenimeuse :

Du point de vue thérapeutique, l'immunothérapie reste un traitement spécifique indispensable pour neutraliser directement l'action des toxines du venin. Son efficacité dépend en grand partie de l'anti venin (la pharmacocinétique des fragments d'anticorps constituant l'antivenin), mais également des conditions de son application (délai d'administration de l'antivenin, sa dose injectée et sa voie d'injection) [11].

L'anti-venin doit atteindre les différents tissus cibles des toxines du venin, il doit complexer la toxine en provoquant une redistribution de celle-ci depuis les tissus vers le compartiment vasculaire. Le complexe ainsi constitué doit rapidement être éliminé par le système réticulo-endoplasmique ou rénal [9].

Les paramètres pharmacocinétiques des anticorps de sérums antivenimeux ont été étudiés chez l'animal.

Après administration intraveineuse, les IgG restent localisées dans les vaisseaux et ne sont pas distribuées dans les tissus alors que les fragments F (ab')₂ et les fab se distribuent dans l'espace extravasculaire. Le volume de distribution des IgG est égal à celui du

compartiment vasculaire tandis que F(ab')₂ et Fab ont un volume de distribution 1,5 à 3 fois plus élevé que le volume plasmatique [10].

Anticorps Propriétés	IgG	F(ab') ₂	Fab
Poids moléculaire	150KDa	100KDa	50KDa
Affinité aux tissus	+++	++	+
Temps de distribution dans l'organisme	>6h	3h	1h
Temps de distribution (demi-vie)	>100h	60h	10h
Effet indésirable	>30%	<5%	>5%

Tableau. II. 1 .Propriétés pharmacocinétiques des molécules d'IgG, et les fragments d'anticorps F(ab')₂et Fab [12].

Les antivenins ont été développés en fonction du venin associé aux espèces suivantes :

Antivenin	Espèce ou genre	Pays
Alacramyn	Centruroides limpidus, C. noxius, C. Suffusus	Mexique
Sueo Antialacran	Centruroides limpidus, C. noxius, C. Suffusus	Mexique
Antivenin polyvalent Tunisien	Toute espèce de scorpion	Tunisie
Anti-Scorpion venom serum.I.P(AScVS)	Hottentotta tamulus	Inde
Anti-Scorpionique	Androctonus spp. Buthus spp.	Algérie
Anti-Scorpionique	Scorpion noir, Buthus occitanus	Maroc
Soro antiscorpionico	Tityus spp	Brésil
SAIMR scorpion antivenin	Parabuthus spp	Afrique du Sud
Purified prevalent Sérum (équine) Anti-scorpion	Scorpion Leiurus spp. Androctonus	Egypte

Tableau .II.2 . Antivenins existant sur le marché pour le traitement de la piqûre de scorpion (Envenimation).

II.2.3 Les étapes de production des sérums thérapeutiques :

La production d'immuns sérums suit un processus qui commence par l'immunisation des chevaux, suivi de la ponction sanguine et le recueil de l'immun sérum et se termine par l'étape de la purification du produit obtenu qui précède le conditionnement en formes galéniques (Figure II.1). Ce processus comporte en tout trois étapes. Chaque étape se révèle très importante car il s'agit des produits issus du vivant et donc les risques de contamination sont présents. La production se fait dans le respect scrupuleux de la trinité pharmaceutique : qualité, efficacité et sécurité.

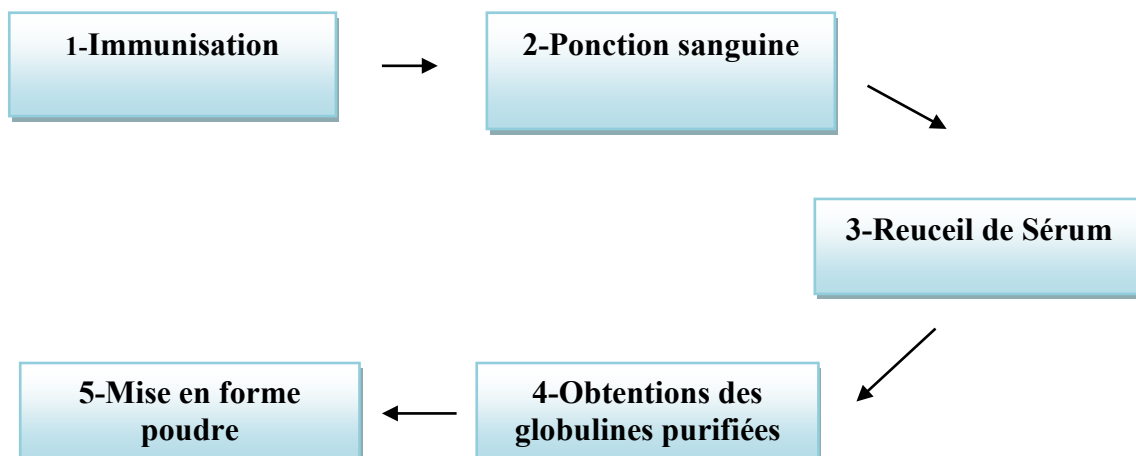


Figure. II.1. Procédé pharmaceutique (Schéma général) de production des sérums Thérapeutiques.

II.2.4.Obtention du sérum :

II.2.4.1.Ponction du sang :

La ponction est effectuée sous anesthésie locale et est assurée par un vétérinaire. Le volume de sang récupéré dépend du poids et des données hématologiques de l'animal. Cette opération se fait de façon stérile à la ferme, puis se poursuit dans une salle blanche (une salle blanche est une pièce ou une série de pièces où la concentration de particules est maîtrisée afin de minimiser l'introduction, la génération, la rétention de particules à l'intérieur. Les paramètres tels que la température, l'humidité et la pression relative sont également maintenus à un niveau précis. Ne contenant que du matériel nécessaire au traitement du sang.

II.2.4.1.1. Récolte du sérum:

Le sérum est séparé du sang par centrifugation selon le protocole décrit précédemment [13], puis contrôlé par électrophorèse pour en déterminer certains pourcentages protéiques, et enfin recueilli dans des flacons stériles et conservé sous forme liquide à - 20°C.

II.2.4.1.2. Analyses du sérum:

Pour assurer l'innocuité des produits et la sécurité des patients, des analyses biochimiques et microbiologiques sont effectuées sur le sérum obtenu avant d'être libéré pour débiter le procédé de production des globulines.

- Les analyses biochimiques : permettent le dosage des protéines totales, le titrage d'anticorps (ELISA), le dosage albumine/ globuline et la mesure du pH.
- Les analyses microbiologiques : permettent la recherche sérologique de l'anémie infectieuse des équidés (test de Coggins), et de l'artérite à virus (séroneutralisation) doit donner des résultats négatifs [14]. Quant au virus herpétique équin, son dépistage tient compte de la cinétique des anticorps.
- Les analyses sérologiques sont réalisées par un laboratoire spécialisé.

Au final, le sérum destiné à la production doit être stérile.

II.3.Purification des immunoglobulines:

Le sérum recueilli contient une panoplie de protéines et compte tenu des objectifs thérapeutiques de production des sérums, la nécessité d'obtention des immunoglobulines purifiées s'impose. Ainsi l'étape de purification consiste dans un premier temps, à précipiter les Ig dans le sérum obtenu en se débarrassant de l'albumine. Secondairement, au cours de cette purification, les techniques ont été adaptées pour assurer en même temps l'inactivation et/ou l'élimination virale totale.

Parmi les différents protocoles de purification des immunoglobulines étudiées dans la première partie, les laboratoires utilisent la précipitation par les sels d'ammonium, qui est la plus connue. Aussi il existe un autre protocole basé sur la précipitation par l'acide caprylique, plus utilisé et décrit par Redwan el R M [17], comme étant plus efficace que le premier.

II.3.1. Protocole aux sels d'ammonium :

Le pH du sérum est ajusté à 3,3 par ajout de l'acide acétique à 1,76 N. La prochaine étape consiste à précipiter les anticorps contenus dans le sérum en présence des sels d'ammonium (sulfate d'ammonium) Figure. II.2.

Ensuite la digestion des immunoglobulines précipitées, en présence de la pepsine, aboutit à l'obtention des fragments $F(ab')_2$ et F_c . La filtration qui suit permet d'éliminer les fragments F_c et en ne retenant que les fragment $F(ab')_2$ qui constituent le principe actif des sérums thérapeutiques. La filtration se fait en présence des agents de filtration qui ont pour rôle de stériliser le produit [15].

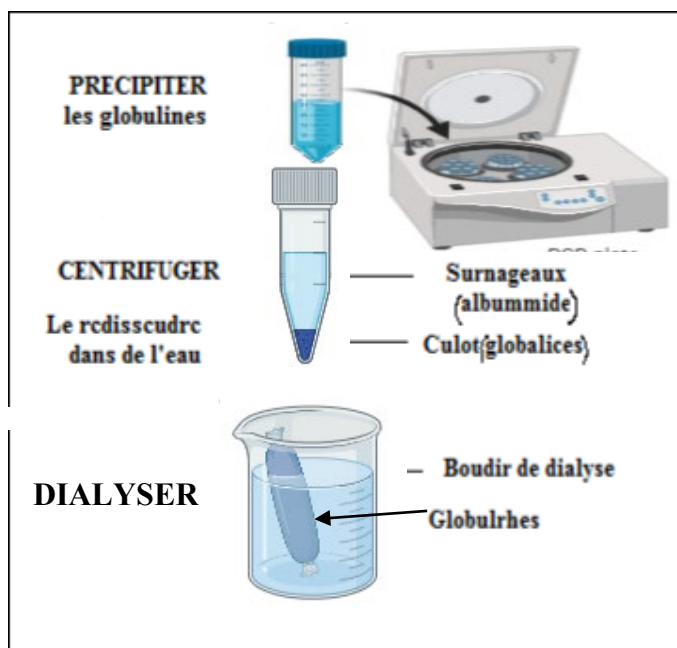


Figure- II.2 - Techniques de purification des immunoglobulines : précipitation par les sels.

II.4. Protocole à l'acide caprylique:

Comme dans la plupart des laboratoires de production des sérums thérapeutiques, c'est le protocole utilisé par laboratoire en Suisse. Il est basé sur une précipitation en présence d'acide caprylique. L'acide caprylique est un acide gras insaturé retrouvé dans les huiles végétales et les graisses animales ou obtenu par synthèse chimique.

Le sérum initialement conservé à +4° C est réchauffé à +56° C pendant 90 minutes puis ramené à la température ambiante. Le pH est ajusté à 5,5 par ajout d'acide acétique 1,76%. Puis l'acide caprylique est ajouté jusqu'à une concentration finale de 5% suivi de l'agitation vigoureuse pendant une heure à température ambiante. Ensuite le mélange est centrifugé à 3000 x G pendant 30 minutes pour ôter le précipité du mélange. Le surnageant est filtré à travers une membrane de 0,45 µm puis dialysé par une solution saline tamponnée au phosphate (PBS) à pH 7,4 et stérilisé par filtration à travers une membrane de 0,22 µm. Enfin, le produit est pasteurisé à 60° C pendant 10 heures [16].

Le produit final est stérile, la teneur moyenne en protéine est généralement d'environ 20g/l, celle de l'albumine est réduite à moins de 2g/l et la concentration d'acide caprylique se retrouve à une valeur inférieure à 0,05 mmol/l.

Ce processus de production des immunoglobulines peut être facilement validé et adapté à une grande production. Un appareillage muni d'un logiciel d'exploitation programmable a été créé par Riera Nadeu (Barcelone, Espagne) pour la précipitation à grande échelle en présence l'acide caprylique et intégrant un système automatique de nettoyage.

II.5. Composition de SAV qualitative et quantitative pour 1 ml :

II.5.1 Principe actif :

Fragments F(ab')₂ d'immunoglobulines équine Glutamyl Transférase (IgGT) contre le venin suffisant pour neutraliser le:

- venin de *Androctonus australis hector* ~ 50 LD₅₀.
- venin de *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus* ~ 50 LD₅₀.
- venin de *Buthus occitanus mardochei* ~ 5 0 LD₅₀.
- Chlorure de sodium 9 mg.
- Polysorbate 80 0.05 mg.

- Eau pour injection 1ml.
- Hydroxyde concentré d'acide chlorhydrique ou de sodium pH 6-7.

II.5.2. Conservation de l'antivenin:

L'antivenin est stable à une température ambiante, il peut être conservé une année à 37°. Dans les limites de la date de péremption, le sérum antivenimeux doit être conservé à moins de 25°C [2].

II.5.3.Doses et administrations :

Le sérum antivenimeux (SAV) doit être administré aussitôt que possible après l'envenimation, plus l'administration est exécutée tôt, plus le traitement sera efficace.

La dose dépend de la sévérité d'envenimation. Des doses répétées sont nécessaires parfois dans des cas graves.

Dose initiale : la dose est identique chez les adultes et les enfants, indépendamment du poids.

Conclusion:

Depuis 1894, la préparation des sérums antivenimeux ne s'est pas beaucoup modifiée. Le principe de base est d'immuniser un animal dont on utilisera les anticorps pour protéger la victime de l'envenimation. En général, on utilise le cheval, du fait de la quantité importante du sérum que l'on peut recueillir. D'autres auteurs ont proposé de produire les antivenins à partir d'autres animaux, la chèvre et le mouton sont souvent suggérés car leurs immunoglobulines sont moins immunogènes que les immunoglobulines équines.

Le sérum contient des anticorps spécifiques ou immunoglobuline (IgG).

Le sérum est monovalent lorsque l'on utilise un seul venin et polyvalent lorsque les venins utilisés proviennent de différentes espèces. La purification du sérum permet l'élimination des protéines et des immunoglobulines non spécifiques [16].

La pasteurisation renforce la sécurité du produit car elle permet d'éliminer d'éventuels microorganismes contaminants. Les anticorps peuvent être fragmentés, le sérum contient alors des fragments $F(ab')_2$ ou des fragments Fab. Cette technique préparatoire augmente alors l'efficacité et la tolérance du sérum, tout en lui assurant une efficacité maximale.

REFERENCES

- [1] De Rezende N. A. ; Borges Dias M. ; Campolino D. ; Chavez-Ortegui C. ; Diniz C.R. ; Amareal C.F.S. Efficacy of antivenom therapy for neutralising circulating venom antigens in patients stung by *Tityus serrulatus* scorpions. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 52; (1995), p 277-280
- [2] Ismail M.; Fatani A.J.A; Dabees T.T-Experimental protocols for scorpion envenomation: A review of common therapies and effect of kallikrein-kinin inhibitors. *Toxicon* 30; (1992), 1257-1279.
- [3]-Revelo M.P.; Bambirra E.A.; Ferreira A.P.; Diniz C.R. and Chavez-Ortegui C. Body distribution of *Tityus serrulatus* scorpion and effects of scorpion antivenom. *Toxicon* 34; (1996), p1119-1125
- [4]- Laraba-Djebari F. et Hammoudi D. -Utilisation de la fraction toxique majoritaire isolée à partir du venin dans la valorisation du sérum antiscorpionique. *Archives de l'Institut Pasteur d'Algérie*, T62 (ISSN : 0020-2460), (1998), p 254-266.
- [5] Ehsan Zayerzadeh Inhibition of Nephrotoxic Activity of *Mesobuthus Eupeus* Scorpion Venom by Commercial Polyvalent Antivenom in Rabbits, *Iranian Journal of Toxicology*, Volume 8, No 27, Winter (2015), p1216-1221.
- [6] C. Caens-Daudin, M. Guerbet, *Lyon Pharmaceutique*, 52, 182-188 ; Le point sur le traitement des morsures de vipères (2001), p 184.
- [7] Riviere G. et bon C., Immunothérapie antivenimeuse vers une nouvelle approche rationnelle d'un traitement empirique -*Annales de l'institut pasteur/actualités*, Ed. Elsevier, Paris, (2000), p 53-55.
- [8] Grandgeorge M, Veronj. L, Lutsch C, Makula M. F, Riffard P. Pepin S. Et Schermann. J. M., preparation of improved F(ab')₂ anti-venoms. An example: New polyvalent European viper anti-venom (equine) .*Envenoming and their treatments*. Eds Bon C; Goyffon, M.Fan edition Marcel Mèriex, p. (1996), p161-172.
- [9] Vazquez H.,Chevez Haro A.,Garcia Ubbelohd W.,Mancilla Nava R, Paniagua-Solic J, Algon A. et Seveik. C, Pharmacocinétique d'un anti-venin de scorpion F(ab')₂ chez un groupe de volontaires humains sains, *Toxicon* , 46, (2005), p 797-805.
- [10] Hammoudi. Triki D., (Thèse Doctorat). Effets physiopathologiques et pharmacodynamie du venin d'Aah avant et après immunothérapie. (2004), p1-48.
- [11] Vazquez H.,Chevez Haro A., Garcia Ubbelohd W., Mancilla. Bernard J., *Le technicien d'analyses biologique guide théorique et pratique*, Ed Lavoisier, paris. (2001), pp 1903.

- [12] Nava R., Paniagua-Solic J., Alagon A. et Seveik. C., Pharmacocinétique d'un anti-venin de scorpion F(ab')₂ chez un groupe de volontaires humains sains, *Toxicon* 46, (2005), p 797-805.
- [13] Site http://myrte.u-strasbg.fr/IHC/IHC_en_ligne/Documents/Ecrits/Manuel_IHC/PDF/IHC.pdf Garaud J-C. et Roussel G., Immun histochimie en microscopie photonique et électronique. Stage d'immun histochimie, Strasbourg. [En ligne]. [Consulté le 07/05/2020], (2004).
- [14] Site http://www.haras-nationaux.fr/portail/uploads/tx_vm19docsbase/DCO_precisions_sanitaires_PS_A_QPS_2007.pdf, Sous-commission sanitaire du stud book français du cheval de pur-sang. Précisions concernant les règles sanitaires applicables dans le cadre du Stud Book français du cheval de pur-sang. Monte. [En ligne]. [Consulté le 21/07/2020], (2007).
- [15] Site <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1045105600902549> Cameron-Smith R.; Miloradovic L; Cheyne I. et Healy K. The removal of viruses during the purification of equine antisera using filtration aids Hyflo Super-cel and Fulmont Super A. Australia: International Association for Biologicals, [En ligne]. [Consulté le 21 /07/2020], vol 28, (2000), pp 169-174.
- [16] Site <http://lib.bioinfo.pl/pmid:17470396>, Mpandi M.; Schmutz P.; Legrand E. et al., Partitioning and inactivation of viruses by the caprylic acid precipitation followed by a terminal pasteurization in the manufacturing process of horse immunoglobulins. *Biologicals*. [En ligne]. [Consulté le 24/05/2020], (2007).
- [17]- Amarat (C. S. F), DA Silva (O. A), Godoy (P) & Miranda (D). - Renal cortical necrosis following Bothrops jararaca and B. jararacussu snake bite. *Toxicon*, 1985,
- [18] Blayloc (RK. S.). - Time of onset of clinical envenomation following snakebite. *S. Afr. Med. J.*, 1983, 64 (10), 357-360.
- [19] Boche (J), Chippaux (J. P.) & Courtoi (SB). - Contribution à l'étude des variations biochimiques des venins de serpents d'Afrique de l'ouest. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1981, 74 (3), 356.
- [20] Boulain (J. C.) & Mwu (A.). - Neurotoxin specific immunoglobulins accelerate dissociation of the neurotoxin-acetylcholine receptor complex. *Science*, 1982, 217, 732-733.
- [21] CAL" (A.). - Contribution à l'étude du venin des serpents. Immunisation des animaux et traitement de l'envenimation. *Ann. Inst. Pasteur Lille*, 1894, 8, 275-297.

CHAPITRE III

LES TOXINES

III.1 Introduction:

Les toxines de venins de scorpion sont des mini-protéines basiques, de 60–70 résidus d'acides aminés, possédant quatre ponts disulfure dans le cas des toxines modulant les canaux Na^+ voltage-dépendants des cellules excitables, et de 30–40 résidus, avec trois ou quatre ponts disulfure, pour les toxines bloquant divers canaux K^+ . Leurs structures tridimensionnelles montrent l'existence d'une hélice α et d'un feuillet β hautement conservés. Une approche génétique a isolé les ADNc codant pour leurs précurseurs, puis décrypté les séquences promotrices et structurales de leurs gènes. Des activités diverses sur les canaux Ca^{2+} et Cl^{-} coexistent aussi dans les venins de scorpion [1].

Les venins constituent ainsi une source inestimable d'agents pharmacologiques très spécifiques pour la caractérisation de sous-types de canaux ioniques et de récepteurs membranaires. Par leur efficacité et leur sélectivité d'action, ils offrent un potentiel thérapeutique important, et plusieurs toxines sont aujourd'hui en cours d'essai clinique pour des troubles du système nerveux [2]. Nous proposons ici de résumer les principes généraux concernant les toxines protéiques, leurs actions sur les canaux ioniques, et leur potentiel thérapeutique, sujet abordé lors du 11^e colloque annuel de l'Association Canaux Ioniques (Lalonde-les Maures, septembre 2000). Nous illustrerons nos propos par des exemples principalement fournis par les escargots marins (cônes) et les scorpions, dont les venins ont été bien étudiés ces dernières années. Les lecteurs intéressés pourront trouver des informations détaillées dans plusieurs revues récentes [3-12].

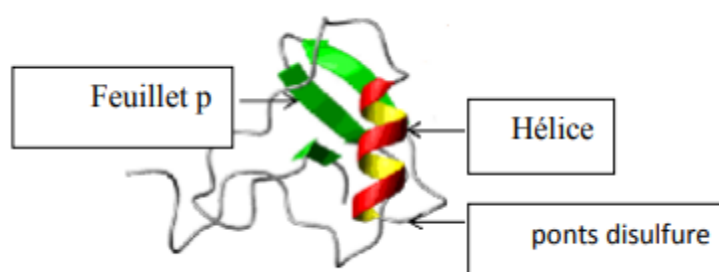


Figure III. 1: Structure d'une toxine de scorpion

III. 2 Mode d'action des toxines:

La composition du venin de chaque espèce est extrêmement complexe, contenant de nombreuses toxines différentes (entre 50 et 200 chez les cônes et scorpions). Outre la diversité des victimes potentielles, un des avantages remarquables fournis par cette complexité est l'effet complémentaire, voire synergique, qui résulte de la combinaison de peptides agissant sur différentes cibles. En ce sens, certains animaux ont largement anticipé le principe des thérapies multiples développées aujourd'hui pour certaines pathologies humaines. Cette multiplicité d'action permet d'augmenter considérablement l'efficacité du venin et de prévenir le développement de résistance aux toxines.

III. 2. 1 Action au niveau cellulaire:

L'action du venin de scorpion s'exerce sur le métabolisme cellulaire du sodium en perturbant ses systèmes de transport transmembranaires et en créant de nouveaux courants sodiques. En effet le venin augmente la perméabilité de sodium au niveau de la membrane par l'ouverture des canaux sodiques sensible au voltage, qui est accompagné d'entrée de calcium [1]. Les expériences de Gerardo et ses collaborateurs (2008) ont montré aussi que le venin bloque les courants de potassium des canaux voltage dépendants.

III. 2. 2 Action sur le système nerveux central:

L'injection expérimentale de venin purifié dans les ventricules cérébraux chez le chat, le lapin et le rat entraîne des manifestations très variées d'excitation du système nerveux: état d'agitation, tremblement, mouvement anormaux, convulsion, hyperthermie et troubles respiratoires [2]. Le système nerveux autonome semble particulièrement mis en jeu. La stimulation du système nerveux autonome avec une prédominance de la stimulation du système sympathique engendre la libération massive dans le tissu des catécholamines [3], corticoïdes et prostaglandines induisant la libération des médiateurs de l'inflammation comme IL6 [4].

Le système parasympathique est aussi mis en jeu par le biais de la libération de l'acétylcholine [5]. Les expériences de [6] sur les rats par injection du venin de *Buthus occitaninus australis*, hector suggère la non implication du système suprachoracique dans les manifestations neurotoxiques du venin. Les toxines se fixent sur les centres supérieurs et principalement sur les centres bulbaires pouvant entraîner une agitation

intense, délire, et dérèglement thermique (particulièrement fréquent et grave chez l'enfant), vomissement et diarrhées.

III. 2. 3 Action sur le système cardiovasculaire:

Les réactions du système cardiovasculaire au cours de l'envenimation scorpionique ont été à l'origine de beaucoup de publications. Les signes particuliers sont des perturbations de la tension, des anomalies de l'électrocardiogramme. Les toxines du scorpion agissent sur le système cardiovasculaire par deux actions [7].

III. 2. 3. 1 Action indirecte au niveau des ganglions sympathiques avec deux phases:

- **Première phase:** le venin agit au niveau des terminaisons nerveuses présynoptiques ganglionnaires. Il s'ensuit une stimulation des deux branches du système nerveux autonome avec une prédominance pour le système sympathique [8]. Cela déclenche donc une libération d'acétylcholine au niveau des terminaisons nerveuses sympathiques et des surrénales entraînant une hypertension artérielle. En plus de cette augmentation de la pression artérielle, la décharge de catécholamines entraîne une vasoconstriction périphérique et un effet inotrope positif avec une prédominance de dysfonctionnement du ventricule gauche [10-13].

- **Deuxième phase:** se traduit par un blocage ganglionnaire qui est partiellement responsable de la phase d'hypotension par inhibition du tonus vasculaire. [14].

III. 2. 3. 1 Action directe sur le cœur:

- Effet inotrope négatif avec bradycardie et arythmie. Cet effet "toxicardique" met en jeu les récepteurs intracardiaques, muscariniques et surtout adrénergiques ce qui engendre une fibrillation ventriculaire [15-17].

- Effet hémodynamique: dans les cas graves le venin de scorpion entraîne une forte hypertension artérielle progressive pouvant entraîner la mort. Cette hypertension est suivie d'un collapsus avec défaillance myocardique et une vasoconstriction périphérique [18-21].

III. 3 Variation de la composition du venin:

III. 3. 1 La variation en fonction de l'origine géographique:

L'espèce de scorpion *A.a.H* ne possède pas une composition constante de toxines. Le venin du scorpion *A.a.H* de Mecheria contient les toxines I, II, III, à peu égale dans la toxicité totale du venin estimée à 18% trois fois plus forte que celle des toxines du scorpion de la même sous espèce existant en Tunisie, qui est de 6 %. Le venin d'*A.a.H* de Ghardaïa analysé par El-Ayeb et Rochat en 1985 montre que la toxine III est faiblement représentée moins de 0,1 %, et la toxine IV n'est jamais signalée dans l'Algérie [18] (tableau III.1).

Origine du venin	Toxine testée	% des Toxine dans le venin
Algeria (Mechria)	<i>A.a.H</i> I	0,51
	<i>A.a.H</i> II	0,68
	<i>A.a.H</i> III	0,60
Tunisie (Tozeur)	<i>A.a.H</i> I	0,75
	<i>A.a.H</i> II	1,02
	<i>A.a.H</i> III	0,44
	<i>A.a.H</i> IV	Non déterminé

Tableau III. 1 : pourcentage de certaines toxines dans le venin d'*A.a.H*.

III. 3. 2 La variation selon les saisons:

La gravité des piqûres et la létalité varient au cours de l'année d'une saison à une autre, ce qui explique une variabilité de la composition en toxines même en fonctions du temps. Cette variation a été observée pour les fractions de l'hémolymphes [22-23], ont rapporté que cette variation peut être attribuée à des facteurs intrinsèques plutôt qu'à l'origine géographique, le sexe, l'âge ou l'alimentation [18].

III.4 Les types de toxines :

III.4.1 Les toxines de scorpion actives sur les canaux potassium :

- Réticulation des ponts disulfures

Les toxines à trois ponts disulfures L'intégrité structurale des toxines courtes de scorpion est assurée par des ponts disulfures. Une catégorie de toxine comporte six demi-cystines formant trois ponts disulfures.

Ce motif Cs α/β impose des contraintes stériques ainsi que des angles diédraux spécifiques des structures secondaires (hélice α et feuillet β antiparallèle). De ce fait, le résidu en position -2 par rapport à la CIV est presque toujours une glycine et se place entre l'hélice et le feuillet. Toutefois, l'insertion d'une proline dans l'hélice α avant la CIII induit une torsion dans l'hélice α et permet l'incorporation en position CIV-2 d'une sérine ou d'une alanine.

- Surface d'interaction toxine/canal :

Les toxines de scorpion actives sur les canaux K⁺ montrent des gammes d'activités variables. Certaines toxines sont spécifiques d'une seule classe de canaux K⁺, alors que d'autres présentent des gammes d'activités bien plus étendues. La production de mutants de toxines et la mesure de leurs activités de blocage de canaux K⁺, associée à la détermination de leur structure tridimensionnelle, est à l'origine de la caractérisation des résidus d'acides aminés qui sont impliqués dans la liaison aux canaux K⁺.

De l'ensemble de ces études, il ressort que les toxines de scorpion se fixent sur le pore de conduction des canaux K⁺ au niveau de l'embouchure externe et inhibent le passage d'ions en obturant le pore de conduction. Dans l'optique de la compréhension des éléments structuraux responsables de l'activité des toxines courtes de scorpion, il est important de pouvoir définir l'ensemble des résidus fonctionnels (les cartes fonctionnelles) des toxines appartenant aux diverses sous-familles répertoriées. Les cartes fonctionnelles de plusieurs toxines ont été établies par alanine scanning et synthèse d'analogues et ont ainsi permis de caractériser les résidus primordiaux dans la fixation des toxines aux canaux ioniques.

III.4.2 Les toxines de scorpion actives sur les canaux sodium:

Les toxines de scorpion actives spécifiquement sur les canaux Na^+ sont des peptides composés de 60 à 76 résidus (d'où la dénomination de toxines longues de scorpion) dont 8 cystéines permettant la formation de 4 ponts disulfures. Actuellement, la séquence en acides aminés de plus de 80 d'entre elles a été déterminée.

Le motif structural est conservé, soit un segment d'hélice α connecté par des boucles à un feuillet β à trois brins et stabilisée par des ponts disulfures (voir figure III.2).

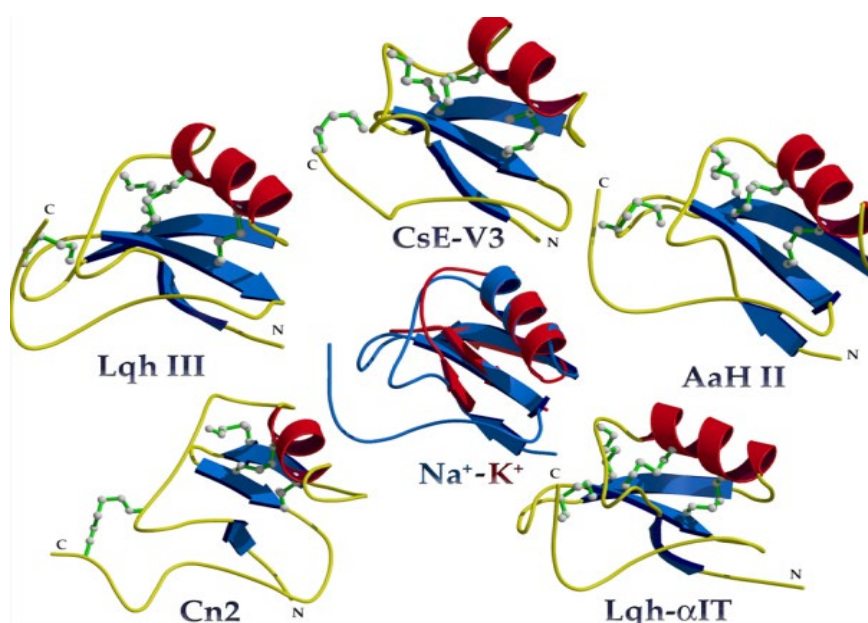


Figure III. 2: structure tridimensionnelle des toxines actives sur les canaux Na^+

Les tests électrophysiologiques ont montré que ces toxines modifient les propriétés d'ouverture des canaux Na^+ en se fixant sur des sites d'interaction différents [24,25]. Des différences notoires dans les tests électrophysiologiques ont permis l'établissement d'une classification de ces toxines en deux classes majeures : les toxines de classe α et β .

A- Toxines de la classe α

Les toxines de cette classe montrent une variabilité dans leur toxicité apparente envers les mammifères et les insectes, une variabilité de séquence et une variabilité dans leurs propriétés [26-29]. Le mode d'action des α -toxines est caractérisé par une prolongation du potentiel d'action provoquée par l'inhibition de l'inactivation des canaux Na^+ de façon voltage-dépendante [30].

- **L'archétype α anti-mammifère:**

AaH II : AaH II est extraite du venin du scorpion tunisien *Androctonus australis* hector. Cette toxine est responsable à elle seule de 50% de la toxicité létale du venin. Si on tient compte de ses deux analogues, AaH I et AaH III, ces trois toxines supportent alors 90% de la toxicité du venin. Ces toxines, composées de 60 à 64 résidus et architecturées autour de 4 ponts disulfures, inhibent l'inactivation des canaux Na^+ voltage-dépendants et favorisent l'entrée d'ions Na^+ dans les cellules excitables [31,32]. Ceci perturbe les systèmes neuromusculaire, respiratoire et cardiovasculaire conduisant irrémédiablement à la mort [33]. Etant la plus active ($K_D = 0.1\text{nM}$), AaH II est devenue l'archétype des toxines de classe α .

- **Les toxines α anti-insectes**

• **Lqh- α IT**

Composée de 64 résidus et extraite du venin du scorpion *Leiurus quinquestriatus* hebraeus, inhibe l'inactivation des canaux Na^+ d'insectes et de muscles de rat, elle fut ainsi classée parmi les toxines α [34]. Très active sur les neurones d'insectes ($K_d = 0.2\text{ nM}$ et 0.02 nM sur les cafards et les sauterelles respectivement) ^{125}I -Lqh- α IT ne déplace pas AaH II de son site de fixation sur les synaptosomes de rats, et n'est toxique qu'à relativement forte concentration sur les souris [35].

• **Lqq III**

Purifiée à partir du venin du scorpion *Leiurus quinquestriatus* quinquestriatus, Lqq III se fixe avec une très haute affinité sur les canaux Na^+ de neurone de cafards ($K_d = 72\text{ pM}$) et fixe moins bien les synaptosomes de rats ($K_d = 100\text{nM}$) de façon compétitive à AaH II [36]; la fixation de Lqq III est inhibée à très faible concentration de Lqh- α IT ($\text{IC}_{50} = 80\text{ pM}$), ces deux toxines ne diffèrent en séquence qu'en trois positions [37,38].

- **Le groupe des α -like**

Aah II, l'archétype des toxines de classe α , a servi de base comparative pour définir un nouveau groupe de toxines qui lui sont apparentées : Les toxines dites de classe α like [39,41]. Pour appartenir à ce nouveau groupe, la toxine doit : - avoir une forte homologie de séquence avec les toxines de classe α - inhiber l'inactivation des canaux Na^+ - être active sur les seuls mammifères ou sur les mammifères et les insectes - ne

pas être compétitive d'AaH II sur le site d'interaction de cette dernière (site récepteur 3 du canal Na⁺).

B- Toxines de la classe β

- Les toxines β :

Les toxines de classe β ont été caractérisées pour leur habilité à perturber les mécanismes d'activation des canaux Na⁺ de façon voltage-indépendante [42]. L'effet macroscopique observable de ces toxines est l'apparition de trains de potentiels à la suite d'une stimulation unique, due à un déplacement de -50 mV du potentiel d'activation des canaux [43]. En clair, le canal s'ouvre plus rapidement et se rouvre spontanément ensuite. Ces toxines n'agissent pas sur la phase d'inactivation des canaux. Le résidu critique pour l'interaction des toxines β avec le canal a été identifié en K13 sur la toxine C_{ss}-II [44].

- Les toxines anti-insecte de type « relaxant » :

L'effet induit par ces toxines est à l'inverse de celui observé avec des toxines de type contracturant. Les insectes testés montrent un relâchement musculaire et une paralysie entraînant la mort dans les 20 à 30 heures selon la dose administrée [4]. Peu de toxines appartenant à ce groupe ont été caractérisées, on peut citer la détermination de la séquence de Lq_q-IT2 du scorpion *Leiurus quikestriatus quikestriatus* [46], Lq_h-IT2 du scorpion *Leiurus quikestriatus hebraeus* [48] et B_j-IT2 du scorpion *buthatus judaicus* [49]. Ces toxines induisent une dépolarisation graduelle de la membrane qui aboutit à un blocage total des potentiels d'action. Malgré cette différence de pharmacologie, ces toxines « relaxantes » se lient au canal sur un site ($K_d=0.9$ nM) proche de celui des toxines contracturantes puisque étant compétitives les unes des autres, mais reconnaissent aussi un deuxième site d'interaction ($K_d=185$ nM) de moindre affinité [40].

- Les toxines anti-insectes de type « contracturant » :

Ces toxines provoquent chez les insectes des effets contracturants immédiats se traduisant par une contraction paralysante de la larve de la mouche [22] ou des mouvements désordonnés de pattes de l'insecte adulte et à court terme par une paralysie qui conduit rapidement à la mort.

III.4.3 Les toxines actives sur les canaux calcium:

La structure de toxine active sur les canaux calcium et architecturées autour du motif ICK [43].

A- Les oméga-conotoxines: Les cônes marins sécrètent un venin contenant une gamme variée de toxines (par extension, les conotoxines) qui, après injection, immobilise instantanément leurs proies [44,45].

B- Les oméga-agatoxines Les oméga-agatoxines (ω -agatoxines) sont des peptides extraits du venin de l'araignée *Agelenopsis aperta* qui sont spécifiques des canaux Ca^{2+} voltage-dépendants. D'un poids moléculaire variant de 5 à 10 kDa, elles sont divisées en quatre groupes [34].

C- Les ω -atracotoxines : Les ω -atracotoxines (ω -ACTX) sont purifiées à partir du venin d'araignées du genre *Hadronyche* et *Atrax*, appartenant à la sous-famille des *Atracinae* (d'où découle le nom de ces toxines) [28].

III. 5 Les toxines du venin d'*Androctonus australis Hector* :

Les toxines du venin d'*Androctonus australis Hector* ont été décrites par plusieurs littérateurs (tableau III.2) [49].

Toxicité	Nombre de résidus	Spécificité	DL50 $\mu\text{g/kg}$ souris	Références
<i>AaHI</i>	63	Canaux Na^{+} des mammifères	17	Rochat et Coll.,1970
<i>AaHI'</i>	63		17	.
<i>AaHI''</i>	64		17	Martin et Rochat , 1984
<i>AaHII</i>	64		9	Rochat et Coll.,1972 .
<i>AaHIII</i>	64		23	Kopeyan et Coll., 1970
<i>AaHIV</i>	64		122	Mansuelle et Coll., 1992

<i>AaH</i> IT1				Darbon et Coll., 1982
<i>AaH</i> IT2		Insectes		Bougis et Coll., 1989
<i>AaH</i> IT3				Loret et Coll., 1990
<i>AaH</i> IT4	65	Double spécificité, insectes		Loret et Coll., 1991
<i>AaH</i> KTx	38	Canaux K ⁺ des insectes		Laraba-Djebari et Coll 1996

Tableau III.2: Toxines purifiées à partir du venin de scorpion *A.a.H* .

Références:

- [1] M-F-Eauclaire, C- Pierre E, Bougis, H-Rochat- Les toxines des venins de scorpion, ScienceDirect, Volume 10, Issue 2, April–June 1999, Pages 207-222.
- [2] Mini-Synthèse, Toxines de venin : des armes biologiques redoutables au service de la santé humaine, médecine/sciences 2001 ; 17 : 947-51.
- [3]. Olivera BM EE. Just Lecture, Conus venom peptides, receptor and ion channel targets, and drug design: 50 million years of neuropharmacology. Mol Biol Cell 1997, 1996; 8: 2101-9.
- [4] Harvey AL. Twenty years of dendrotoxins. Toxicon 2001; 39: 15-26.
- [5]. McIntosh JM, Santos AD, Olivera BM. Conus peptides targeted to specific nicotinic acetylcholine receptor subtypes. Annu Rev Biochem 1999; 68: 59-88.
- [6]. Grishin E. Polypeptide neurotoxins from spider venoms. Eur J Biochem 1999 ; 264 : 276-80.
- [7]. Darbon H. Toxines animales et canaux ioniques. J Soc Biol 1999; 193: 445-50.
- [8]. Possani LD, Becerril B, Delepierre M, Tytgat J. Scorpion toxins specific for Na⁺ - channels. Eur J Biochem 1999; 264: 287-300.
- [9]. Possani LD, Merino E, Corona M, Bolivar F, Becerril B. Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion-channels. Biochimie 2000; 82: 861-8.
- [10]. Jones RM, Bulaj G. Conotoxins – New vistas for peptide therapeutics. Curr Pharm Des 2000; 6: 1249-85.
- [11]. Escoubas P, Diochot S, Corzo G. Structure and pharmacology of spider venom neurotoxins. Biochimie 2000; 82: 893-907.
- [12]. M. El Ayeb et H. Rochat, *Toxicon*, 1985, 23, 755-760.
- [13] J. Lamy et M. Goyffon, CR.Acad.Sc.Paris, 1970, 270, 3315-3317.
- [14] M. F. Martin Eauclaire et F. Couraud, Handbook of neurotoxicology, Hang Kong publishers, ISBN 978-3-7643-6020-7, 1994, 683-716.
- [15] F. Miranda, H. Rochat et S. lissitzky, sur la neurotoxine du venin des scorpions, Bull.Soc.Chim.Biol., 1960, 42, 379-391.
- [16] F. Miranda, H. Rochat et S. lissitzky, *Toxicon*, 1964, 2, 51-69.
- [17] F. Miranda, H. Rochat et S. lissitzky, *Toxicon*, 1964, 2, 113-121.
- [18] C. Rochat, H. Rochat, F. Miranda et S. lissitzky, *Biochemistry*, 1967, 6, 578-585.
- [19] F. Miranda, C. Kopeyan, H. Rochat et S. lissitzky, *Biochemistry*, 1970, 16, 514-523.
- [20] F.Courand, E. Jover, M. J. Dubois et H. Rochat, *Toxicon*, 1982, 20, 9-16.

-
- [21] F. J. Tejedor et W. A. Catteral, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, 85, 8742-8746.
- [22] W. J. Thomsen et W. A. Catteral, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, 86, 10161-10165.
- [23] S. Cestele, Y. Qu, J. Rogers, H. Rochat, T. Scheuer et W. Catterall, *Neuron*, 1998, 21, 919-931.
- [24] E. Zlotkin, F. Miranda et H. Rochat, *Toxicon*, 1972, 10, 211-216.
- [25] D. Gordon, E. Jover, F. Couraud et E. Zlotkin, *Biochem. Biophys. Acta.*, 1984, 778, 349-358.
- [26] E. Zlotkin, D. Kadouri, D. Gordon, M. Pehate, M. F. Martin et H. Rochat, *Biochem. Biophys. Acta.*, 1985, 240, 877-887.
- [27] D. Gordon, Moskowitz, C. Warmer, W. A. Catterall et E. Zoltkin, *Biochemistry*, 1992, 31, 7622-7628.
- [28] M. E. De Lima, M. F. Martin, C. R. Diniz et H. Rochat, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1986, 139, 296-302.
- [29] Zlotkin, E.; Miranda, F.; Rochat, H. Chemistry and pharmacology of Buthinae scorpion venoms. In *Arthropod Venoms*; Bettini, S., Ed.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 1978; pp. 317-369.
- [30] Mebs, D. *Animaux Venimeux et Vénéneux*; Lavoisier: Cachan, France, 2006; Volume 1, p. 345.
- [31] E. Carbone, E. Wanke, G. Prestipino, L. D. Possani et A. Haelicke, *Nature*, 1996, 296, 90-91.
- [32] L. D. Possani, B. M. Martin et I. Svendsen, *Carlsberg Res. Commun*, 1982, 47, 285-289.
- [33] F. Dreyer, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 1990, 115, 94-136.
- [34] M. L. Garcia, M. Honner, H. G. Knaus, R. Koch, W. Schmalhofer, R. S. Slaughter et G. J. Kaczorowski, *Pharmacol.*, 1997, 425-471.
- [35] J. M. Sabatier, V. Frémont, K. Mabrouk, M. Crest, H. Darbon, H. Rochat, J. Vantschoten et M. F. Martin Eaucclair, *Peptide Protéine Res.*, 1994, 43, 486-495.
- [36] J. M. Sabatier, H. Zerrouk, H. Darbon, K. Mabrouk, A. Benslimene, H. Rochat et M. F. Martin Eaucclair, *Biochemistry*, 1993, 32, 2763-2770.
- [37] M. L. Garcia, M. Garcia-Calvo, P. Hidalgo, A. Lee et MacKinnon, *Biochemistry*, 1994, 33, 6834-6839.
- [38] F. Gomez-Lagunas, T. Olamendi-Portugal, F. Z. Zamudio, et L. D. J. Possani, *Membr. Bio.*, 1996, 152, 49-56.

-
- [39] G. Gimenez-Gallego, M. A. Navia, J. P. Reuben, G. M. Katz, G. J. Kaczorowski et M. L. Garcia, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85, 3329-3333.
- [40] K. Lucchesi, A. Ravindran, H. Young et E. Moczydlowski, *J. Membr. Biol.*, 1989, 109, 269-281.
- [41] A. Galvez, G. Gimenez-Gallego, J. P. Reuben, L. Roy-Contancin, P. Feigenbaum, G. J. Kaczorowski et M. L. Garcia, *Biol. Chem.*, 1999, 265, 11083-11090.
- [42] M. Crest, G. Jacquet, M. Gola, H. Zerrouk, A. Benslimane, H. Rochat, P. Mansuelle, et M. F. Martin-Eauclaire, *Biol. Chem.*, 1992, 267, 1640-1647.
- [43] F. Laraba-Djebari, C. Legros, M. Crest, B. Ceard, R. Romi, P. Mansuelle, G. Jacquet, J. Van Rietschoten, M. Gola, H. Rochat, P. E. Bougis et M. F. Martin-Eauclaire, *Biol. Chem.*, 1994, 269, 32835-32843.
- [44] L. D. Possani, B. M. Martin et I. B. Svendsen, *Carlsberg Res. Commun*, 1982, 47, 285-289.
- [45] M. Garcia-Calvo, R. J. Leonard, J. Novick, S. P. Stevens, W. Schmalhofer, G. J. Kaczorowski et M. L. Garcia, *Biol. Chem.*, 1993, 268, 18866-18874.
- [46] R. S. Rogowski, B. K. Krueger, J. H. Collins et M. P. Blaustein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1994, 91, 1475-1479.
- [47] R. Kharrat, K. Mabrouk, M. Crest, H. Darbon, R. Oughideni, M. F. Martin-Eauclaire, G. Jacquet, M. El Ayeb, J. Van Rietschoten, H. Rochat, et J. M. Sabatier, *Biochem.*, 1996, 242, 491-498.
- [48] F. Z. Zamudio, G. B. Walker, H. H. Valdivia et L. D. Possani, *FEBS Lett.*, 1997, 405, 385-389.
- [49] F. Laraba-Djebari, Thèse de doctorat d'état, présentée à l'USTB, Alger, 1996.

CHAPITRE IV

Matériel et Méthodes

Introduction:

Les accidents d'envenimation par morsure de scorpion venimeux sont fréquents dans les régions tropicales où la densité de scorpion y est plus élevée et que de nombreuses causes environnementales et biologiques favorisent le contact entre l'homme et les scorpions venimeux. En zones de notre étude, les principaux scorpions responsables des accidents appartiennent à la famille des scorpions *Androctonus australis Hector Aah*, *Androctonus amoreuxi Am*, du fait que ces deux espèces sont les plus dangereuses et les plus répandues de la région, comme indiqué sur la carte géographique (Figure 1).

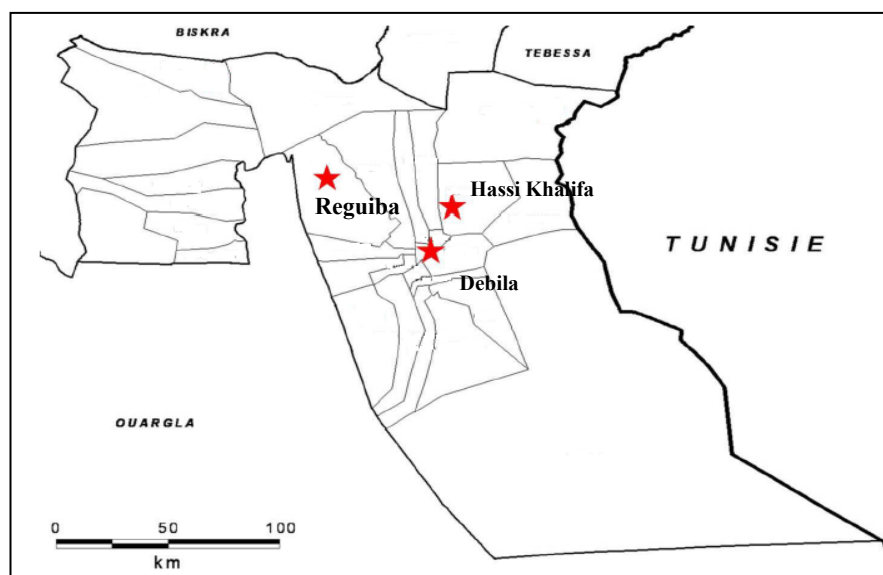


Figure IV.1 : carte géographique de zone d'Oued souf.

La figure IV- 1 montre une carte correspondant à trois zones où les quatre-vingt-dix scorpions ont été capturés pour le venin traité comme décrit dans la section Matériel et Méthodes, après quoi les échantillons ont été soumis à l'analyse chromatographique.



Figure IV.2 zone d'étude (Région de Debila).



Figure IV.3 : zone d'étude (région de Hassi Khalifa)



Figure IV.4 : zone d'étude (région de Reguiba)

Notre travail consiste essentiellement à réaliser trois (03) cas de comparaison de la composition centésimale de chaque venin par la méthode chromatographique liquide à haute performance :

1^{er} cas : comparaison de la composition centésimale présente dans trois venins d'une même espèce de scorpion (*Androctonus australis Hector*) prélevés dans trois différentes régions à savoir: Reguiba, Debila et Hassi Khalifa.

2^{eme} cas : comparaison de la composition de venin prélevé de trois différentes espèces en l'occurrence (*Androctonus australis Hector*, *Androctonus amoreuxi* et *Buthacus arenicola*) capturées dans la même région Debila,

3^{eme} cas : comparaison de la composition de venin de scorpion d'espèce *Androctonus australis Hector* ayant différents âges, capturés aussi dans la zone de Debila.



Figure IV.5: *Androctonus australis*



Figure IV.6: *Androctonus amoreuxi*



Figure IV.7: *Buthacus arenicola*

IV. Matériel et méthodes :

IV. 1 Ramassage (capture des scorpions)

IV.1.1 Détermination des différents endroits:

La capture des scorpions est réalisée de deux façons, collective et individuelle. La capture collective obéit à une stratégie dans chaque zone d'étude. En effet, un groupe de personnes, autochtones et informées, est délégué et prend en charge la tâche de la collecte de scorpions, de jour comme de nuit. Par contre, la capture individuelle s'effectue de manière aléatoire, en différents endroits représentatifs des zones d'étude.

A cet effet, plusieurs sorties ont été effectuées à travers les différentes stations sélectionnées. Celles-ci ont été choisies au hasard, soit soupçonnées d'héberger les scorpions, soit également à travers l'analyse de la situation épidémiologique de l'envenimation scorpionique de 2009-2019, qui a été un facteur dirigeant dans le choix des sites, notamment en ciblant l'incidence élevée de cas de piqûres de scorpions.

Les scorpions sont collectés dans divers habitats délicats, par exemple des endroits vides, sous des pierres, des restes d'arbres et de plantes secs et des troncs de palmiers tombés.

IV.1.2 Capture des scorpions:

Dans la plupart des cas, l'arrestation a eu lieu de huit heures du soir à trois heures du matin. C'est le moment pour le scorpion de devenir actif. L'excavation est facilitée par l'utilisation d'un projecteur ultraviolet, qui est utilisé pour détecter les scorpions pendant la nuit.

Il détecte les scorpions de loin ou de près grâce à une fonction de réflexion. Peu importe la couleur, sera un jaune vif sous la lumière UV. D'autre part, le piège est utilisé en piégeant dans des endroits isolés ou des forêts de palmiers. Cette opération vise à capturer complètement les scorpions en utilisant des boîtes à parois souples à l'intérieur, pour empêcher l'animal de grimper ou de s'échapper. Ce conteneur a été enfoui à plus de 35 cm dans le sol.

IV.1.2.1 Matériels:

L'équipement utilisé pour la capture des scorpions est le suivant:

Pinces:

- Pinces de longueur 30cm: pour la capture des grands scorpions.
- Pinces de longueur moyenne de 15 à 20 cm pour la capture des petits scorpions.

Boîtes de ramassage:

En général, elles sont scellées, et bien ventilées, en matériau inoxydable solide et de dimensions différentes, ce qui assure une bonne sécurité des personnes.

Gants et bottes:

Ce sont des protections individuelles, et elles sont généralement en caoutchouc ou en cuir. Les gants mesurent au moins 30 cm de long devant couvrir la main et l'avant-bras.

IV.2 Identification et classification morphologique:

Cette identification est basée sur des caractéristiques morphologiques à savoir: Les trichobothries ou soies, les carènes, la vésicule et aiguillon, la patte mâchoire, la patte ambulatoire, les peignes et les yeux en utilisant une loupe binoculaire avec lumière permise de déterminer les caractéristiques de l'ultra-morphologie [1].

IV.3 Extraction de venin:

Pendant la période de l'extraction de venin de scorpions, on a utilisé le matériel suivant:

IV.3.1 Matériel:

On utilise dans le ramassage des scorpions le matériel suivant :

- **Excitateur électrique:** c'est un appareil qui contient deux pôles électriques, utilisé pour stimuler la sécrétion du venin au moyen d'un courant électrique constant de 12 volts.
- **Pinces:** elles sont utilisées pour fixer le scorpion sur les piliers de l'appareil de stimulation, et il est très important de se protéger contre le risque de piqûre de scorpion et le courant électrique. On utilise généralement une pince de longueur 20 à 30 cm pour la capture individuelle, mais parfois, lorsqu'on trouve des scorpions beaucoup plus petits on utilise un autre type des pinces de longueur de 15 cm.
- **Verre à montre:** c'est le matériel utilisé pour conserver le venin extrait.

IV.3.2 Méthode de collecte de venin par excitation électrique du scorpion :

La traite des scorpions par excitation électrique consiste à soumettre le scorpion à un courant électrique de 12v, pendant un certain temps. L'exposition de la partie inférieure du scorpion et les anneaux de sa queue à cette excitation -provoque une contraction de la musculature de la glande à venin [2]. Le venin obtenu est de couleur blanchâtre, jaunit et devient opalescent et visqueux au cours du temps. Ce venin contient un dépôt de substances insolubles et des débris cellulaires. Il est stocké sous forme déshydratée car son caractère hygroscopique peut être à l'origine d'une grande perte de la toxicité [3].

IV.3.2.1 Quantité de venin:

Les scorpions utilisés dans ce travail sont : le scorpion *Androctonus australis* Hector *Aah*, *Androctonus amoreuxi* *Am* et *Buthacus arenicola*. Ceux-ci ont été échantillonnés dans les zones suivantes: Hassi Khalifa, Reguiba et Debila dans la région d'Oued Souf.

Les quantités de venin extraites des scorpions varient d'une région à l'autre, les tableaux suivants expliquent que:

Région	<i>Androctonus australis Hector Aah</i>		<i>Androctonus amoreuxi Am</i>		<i>Buthacus arenicola</i>	
	Nombre de scorpions	Poids unitaire du venin en g	Nombre de scorpions	Poids unitaire du venin en g	Nombre de scorpions	Poids unitaire du venin en g
<i>Reguiba</i>	15	0,026				
<i>Debila</i>	30	0.028/0,023	20	0.022	10	0.01
<i>Hassi Khalifa</i>	15	0,025				

Tableau IV.1: Poids unitaire du venin de scorpion en g avec le nombre de scorpions de trois différentes espèces

Poids unitaire moyen du venin d'une même espèce de scorpion (<i>Androctonus australis Hector</i>) en g		
Région	Jeune(Aah)	adulte (Aah)
<i>Debila</i>	0,028	0.023

Tableau IV.2: Poids unitaire moyen du venin en g de l'espèce *Androctonus australis Hector* de différents âges.

IV.3.2.2 Conservation du venin:

Le processus d'extraction du venin a été réalisé par électro-stimulation. Le venin recueilli a été transféré dans des flacons secs, lyophilisé et conservé à -20 ° C jusqu'à son utilisation.

IV.4 Analyses du venin:

IV.4.1 Matériels:

- Une balance sensible de type ALS 220-4N, de précision (0,001 mg)
- Centrifugeuse.
- Filtre de 0,45 μm .
- micropipette (10-100 μl).
- seringue
- Chromatographie:

IV.4.2 Instrumentation et conditions chromatographiques:

Des mesures spectrophotométriques ont été effectuées sur un spectrophotomètre UV-1800 Shimadzu (double faisceau) équipé de cuves en quartz de 1 cm. Bain à ultrasons (J.P. SELECTA, s.a.). Un système de chromatographie liquide haute performance, Shimadzu LC 20 AL équipé d'un injecteur universel (Hamilton 25 μL) SPD 20A, détecteur UV-VIS SPD 20A (Shimadzu) a été utilisé.

IV.4.3 Réactifs et produits chimiques:

- Eau distillée ultra pure.
- Une solution tampon de $\text{pH} = 8,5$.

$m_{\text{NaH}_2\text{PO}_4} + m_{\text{Na}_2\text{HPO}_4} + m_{\text{KCl}}$ (dans un litre d'eau distillée ultra pure + V_{NaOH})

- Acétonitrile.
- Acide acétique.
- Acétonitrile (ACN) grade HPLC

IV.4.4 Purification de la fraction toxique des venins du scorpion:

Le venin du scorpion est un mélange complexe de protéines, contenant une partie toxique de toxines et une partie non toxique.

Nous préparons des solutions selon les venins, chaque région séparément. Chaque mélange se compose de venin dissout avec la solution tampon préparée ($\text{pH} = 8,5$) dans les volumes suivants:

Chaque 10 μl de venin dissout dans un volume de 190 μl de solution tampon, et ce dans le but de détruire toutes les particules indésirables de l'étude et de préserver la fraction toxique, puis nous mettons les solutions préparées dans une centrifugeuse sous

l'influence de 3000 tours par minute pendant une demi-heure afin de précipiter les enzymes et molécules cellulaires brisé et fondu. Ensuite, nous filtrons à l'aide d'un filtre de 0,45 μm pour toutes les solutions, et nous obtenons les fractions toxiques des venins de scorpions pour les trois zones.

IV.4.5 Analyse chromatographique de la fraction toxique par HPLC:

Dans cette étude, la méthode HPLC de chromatographie haute performance a été choisie, qui est une technique analytique permettant au processus de séparation ou de purification de plusieurs composés au sein d'un mélange afin de déterminer la qualité, la nature et le rapport de concentration des éléments étudiés.

IV.4.5.1 Mode d'injection pour HPLC:

La colonne utilisée dans la technique d'analyse pour séparer les toxines de la fraction toxique est C18, longueur d'onde de 230 nm.

Mélange de séparation utilisé:

60% eau distillée + 0,1% TFA.

40% d'acétonitrile + 0,1% de TFA.

Des échantillons contenant 200 μg de chaque fraction toxique dilués dans 80 μl d'eau distillée ont migré dans une colonne C 18 en chromatographie liquide sous haute pression (HPLC, Waters), en utilisant un gradient d'acétonitrile, pendant 35 minutes à un débit de 1 $\text{ml} \cdot \text{mn}^{-1}$. L'absorbance de l'éluant a été lue à 230 nm.

IV.4.5.2 Conditions opératoires :

Les conditions opératoires sont regroupées dans le tableau suivant :

Paramètre chromatographique	Condition chromatographique
Débit d'élution	2 ml/ min
Volume d'injection	20 μl
Longueur d'onde de détection UV	230 nm
Temps d'analyse	30 min
Colonne chromatographique	(25 cm x 46 nm) C18 RP-HPLC

Tableau IV.3 : Conditions chromatographiques d'injection Fraction toxique pour HPLC

IV.4.5.3 Plan général d'analyse de venin:

Le schéma figuré ci-dessous représente les principales différentes étapes d'analyse:

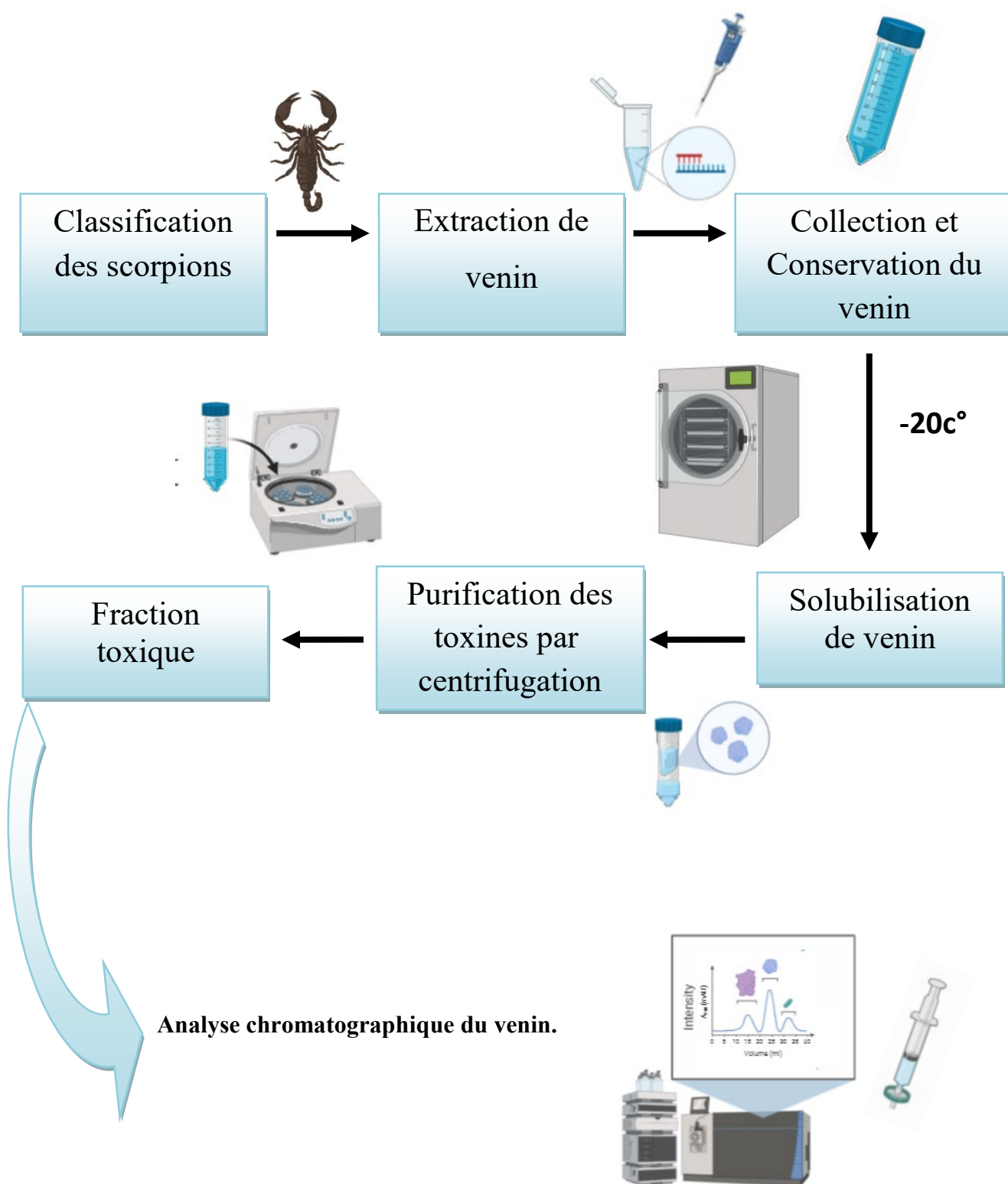


Figure IV.8: Schéma général de séparation de fraction toxique du venin.

IV.5 Test de la dose létale de 50% de fraction toxique:

La DL_{50} est la quantité d'une matière, administrée en une seule fois, qui cause la mort de 50 % (la moitié) d'un groupe d'animaux d'essai. La DL_{50} est une façon de mesurer le potentiel toxique à court terme (toxicité aiguë) d'une matière.

Les toxicologues peuvent utiliser de nombreuses sortes d'animaux, mais ils utilisent le plus souvent des rats et des souris. La DL_{50} est généralement exprimée en quantité de produits chimiques administrée (ex. : milligrammes) par 100 grammes (pour de plus petits animaux) ou par kilogramme (pour de plus grands sujets d'essai) de poids corporel. La DL_{50} peut être mesurée par diverses voies d'administration, les plus courantes étant la voie cutanée (application sur la peau) et la voie orale (donnée par la bouche).

IV.5.1 Quelques termes relatifs à la dose de toxicité:

DL_{01} dose létale pour 1 % de la population des animaux d'essai.

DL_{100} dose létale pour 100 % de la population des animaux d'essai.

DL_{min} la dose la plus faible causant la létalité.

DT_{min} la dose la plus faible causant un effet toxique.

IV.5.2 Détermination de la dose létale médiane (DL_{50}):

La puissance létale des venins, mesurée par DL_{50} résolution de signification (en microgrammes de venin séché par souris), a été évaluée comme suggéré par l'Organisation Mondiale de Santé OMS. Des groupes de souris (22-20 g) ont été utilisées par dose de venin. Les doses de venin ont été diluées dans 150 mM NaCl et ont été injectées dans des volumes de 500 μ l par voie intraveineuse [4]. Le taux de mortalité était vérifié 24 h après l'injection.

La DL_{50} est calculée en utilisant la méthode arithmétique de Karber [5,6], qui est comme suit:

$$DL_{50} = DL_{100} \sum a^*b/n$$

Où, DL_{50} = dose létale médiane

DL_{100} = dose minimale requise pour tuer 100%

a = différence de dose

b = mortalité moyenne

n = Groupe population.

IV.6 Neutralisation du venin et mesure de la concentration du complexe Venin– F (ab ') 2:

Dans le monde entier, l'antivenin demeure le principal traitement contre l'envenimation scorpionique. Par ailleurs, il existe toujours des inquiétudes quant à l'efficacité et à l'innocuité de bon nombre de ceux actuellement disponibles [7]. La dose d'antivenin nécessaire pour traiter un patient pour la plupart des antivenins n'est pas clairement définie et est souvent basée sur des études in vitro et in vivo réalisées par le fabricant et sur l'expérience cumulée de cliniciens traitant régulièrement des cas. Dans de nombreux pays et pour certains cas où des patients ne répondant pas rapidement au traitement, il y a eu une tendance à augmenter les doses d'antivenin en raison des préoccupations concernant son efficacité [8]. Cependant, de nombreux effets de l'envenimation sont irréversibles et le rétablissement du patient dépend de la récupération ou de la réparation des tissus ou organes endommagés.

Le sérum est disponible depuis des décennies et a été utilisé pour déterminer si des quantités suffisantes de sérum antivenin ont été administrées [9] [10]. On a supposé que si aucun venin libre n'était détectable, une quantité suffisante d'antivenin avait été administrée [11] [12]. Si le venin est encore mesurable après l'administration d'un sérum antivenin, on pense que cela représente un venin libre et qu'une quantité insuffisante d'antivenin a été administrée. Nous avons précédemment utilisé la même technique in vitro pour montrer que l'ajout de concentrations croissantes d'antivenin au venin donne une diminution exponentielle du venin libre mesurable [13]. La concentration d'antivenin à laquelle le venin n'est plus détectable peut alors être convertie en une dose requise pour neutralisation. Cette approche semble bien fonctionner avec les sérums antivenimeux pour lesquels il y a probablement un excès d'antivenin par rapport au venin, car le sérum antivenin commercial est très concentré [14] [15]. Cependant, la persistance du venin ou, dans certains cas, venin détectable, ne semble pas toujours associé avec persistance de l'envenimation, comme la coagulopathie. L'explication à cela est que le venin détecté comme le venin «libre» est en fait un venin lié ou un venin-antivenin (VAV) complexes où le rapport antivenin / venin est faible (1–1) pour que le

complexe VAV puisse toujours se lier à la microplaque de dosage immunoenzymatique (Figure .IV.8) [20].

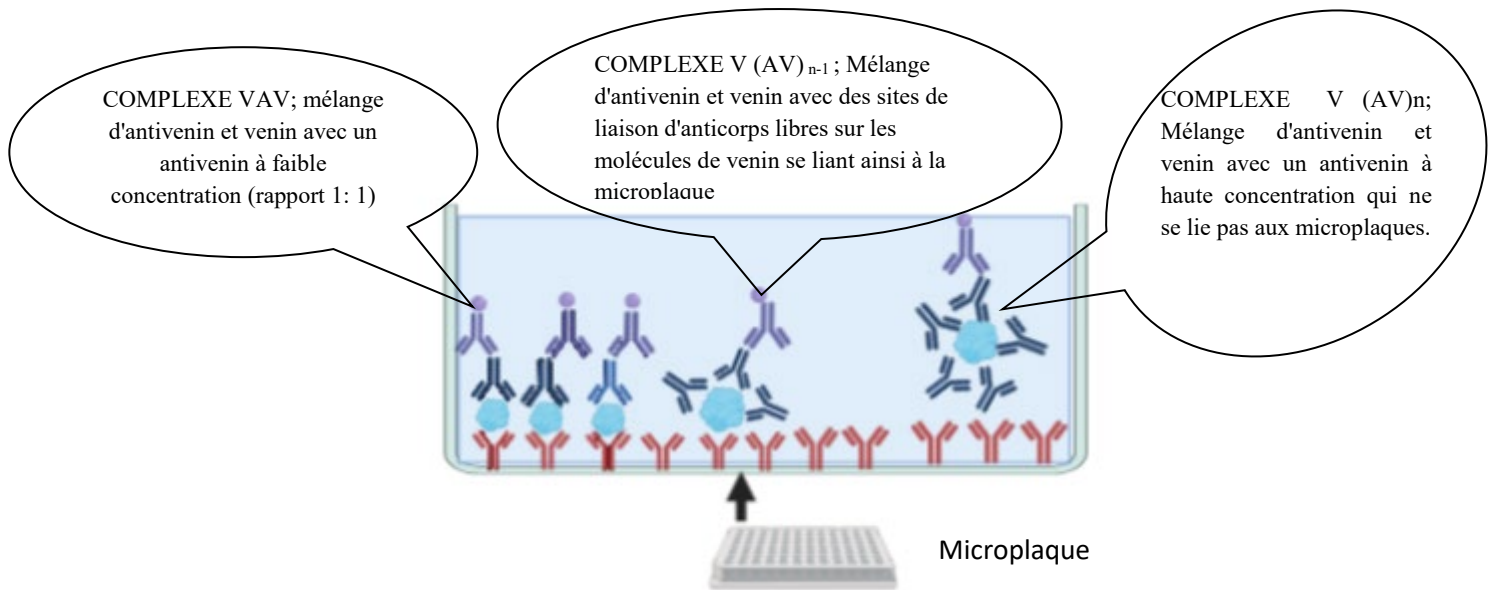


Figure IV-9: Complexe d'antivenin et venin dans les puits de microplaque de dosage immunoenzymatique.

IV.6.1 Antivenin:

L'antivenin est préparé par l'Institut Pasteur d'Algérie en flacons de 5ml (lot n ° 40313/4 Fabriqué: Mai 2013 Expiration: Avr 2017). Cette préparation a été obtenue à partir du sérum de chevaux hyperimmunisés avec du venin de scorpion d'*Androctonus australis* Hector. L'antivenin commercial algérien a été produit par l'Institut Pasteur d'Algérie, chaque 1 ml de sérum contient des immunoglobulines F (ab ')₂ neutralisées au minimum 1500 unités toxiques de venin sec Aah. L'antivenin commercial est d'origine équine [21].



Figure IV.10 Antivenin commercial algérien.

IV.6.2 Venin:

Des scorpions de trois différentes espèces à savoir: (Aah, Am et Buthacus arenicola) ont été collectés dans la région de Oued Souf en Algérie. Le venin a été obtenu par stimulation électrique de quatre-vingt dix scorpions. Le venin brut a été dissout dans de l'eau bidistillée stérile et centrifugé à 13 000 x g pendant 10 min à 4 ° C. Le précipité a été jeté et le surnageant a été maintenu à 20 ° C jusqu'à ce que cela soit nécessaire. Le venin est collecté et conservé à -20 ° C séparément dans des petites ampoules selon la zone de captivité, l'âge du scorpion et l'espèce [22].

IV.6.3 Réactifs:

- sérum albumine bovine (BSA)
- la tétraméthylbenzidine (TMB), tous les réactifs utilisés étaient de qualité analytique.
- Le tampon carbonate est 0,1 M, pH 9,5.
- La solution de blocage est de 0,5% de BSA dans une solution saline tamponnée au phosphate (PBS) à pH 7,4.
- Tampon de lavage ; une solution à 0,02% de Tween 20 dans du PBS.
- Tampon de dilution (PBS 0.1tween 20 + 1%BSA).

IV.6.4 Équipements:

- **Microplaques** utilisées ce sont des plaques qui se composent de 96 puits. Elles sont fabriquées généralement en plastique ou en verre pour se donner aux matières la possibilité de se fixer sur les parois.
- **Lecteur de plaques** (lecteur de microplaques RI 2100C) : c'est un appareil utilisé pour la lecture de l'absorption du rayonnement ultraviolet dans les puits de la plaque. Celui-ci indique le degré de la réaction où l'absorbance est calculé à 492 nm.
Toutes les procédures ont été effectuées à température ambiante.
- **Etuve:** C'est un dispositif destiné à assurer la température requise pour la réaction.
- **Laveur:** C'est un appareil destiné à laver la plaque plusieurs fois au cours d'un processus.

IV.6.5 Mesure de la concentration du complexe Venin– F (Ab ')₂:

Les étapes du test immunoenzymatique sont résumées ci-dessous :

Tous les réactifs utilisés étaient de qualité analytique.

- La sensibilisation (coating) consiste à fixer dans chaque puits de microplaque 100 µl d'anticorps du cheval dans une solution de Carbonate-bicarbonate 0,1M pH 9,5 (différentes dilutions ont été utilisées).
- L'incubation des plaques à 4°C pendant une nuit.
- Le lavage de la microplaque cinq fois par le Tampon du lavage.
- Le blocage avec 200µl de Tampon de blocage puis incubation de la microplaque à 37°C pendant 2h.

Après, cinq cycles de lavage, 100 µl de la solution du venin Aah est ajouté dans un tampon.

- L'incubation pendant 1 h à 37°C, suivie de cinq cycles de lavages par le tampon du lavage.
- L'ajout de 100 µl de la solution d'anticorps primaire anti-venin de scorpion.
- L'incubation pendant 1 h à 37°C, suivie de cinq cycles de lavage.
- Le dépôt de 100 µl/puits du conjugué anti-cheval marqué à la peroxydase dilués au 1/1000 dans le tampon.
- L'incubation pendant une heure à 37°C, suivie de cinq cycles de lavage.
- L'ajout de la solution de TMB à raison de 100 µl/puits
- L'incubation de 10 à 30 min
- La réaction a été arrêtée par une solution d'acide sulfurique (H₂SO₄) 1M à raison de 100 µl par puits.
- La lecture des DO à 492 nm au niveau de lecteur.

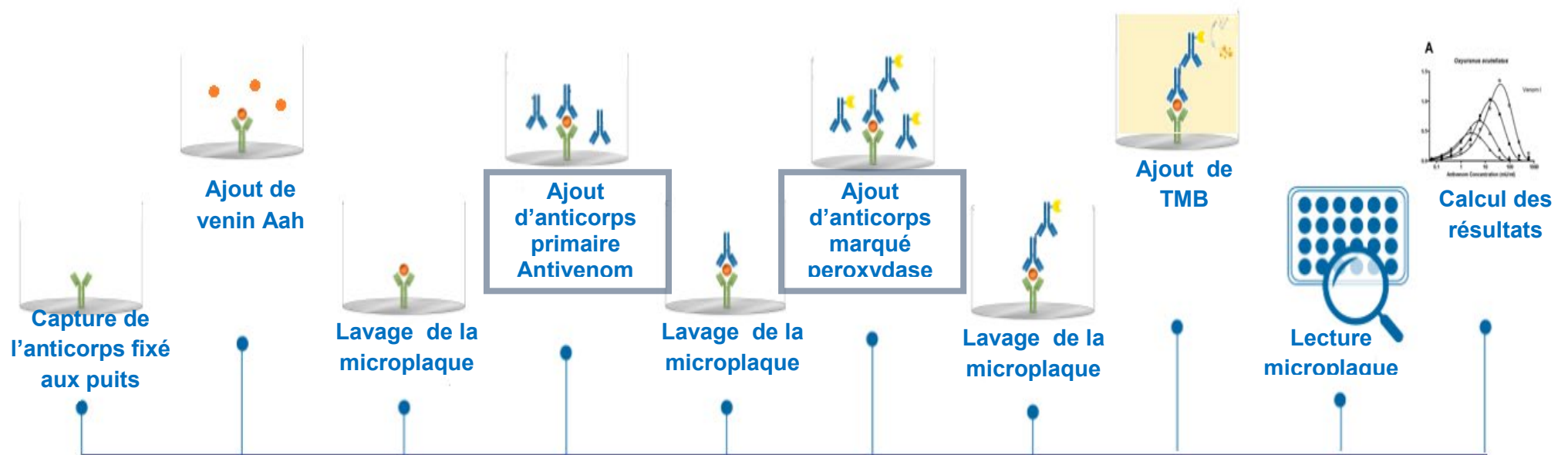


Figure IV.11: Etapes du test immunoenzymatique.

IV.7 Méthode d'analyse:

Les données d'absorbance du VAV par rapport à la concentration de sérum antivenin ont été ajustées à différentes courbes afin d'obtenir le meilleur ajustement pour les données, y compris la différence de deux courbes de liaison, avec Bmax la liaison maximale et Kd la constante de dissociation:

$$Y = \frac{B_{\max_1} * X}{Kd_1 + X} - \frac{B_{\max_2} * X}{Kd_2 + X}$$

Et la différence de deux courbes exponentielles:

$$Y = y_{\max_1} * (1 - e^{-K_1 X}) - y_{\max_2} * (1 - e^{-K_2 X})$$

Ces modèles / courbes ont été utilisés empiriquement pour trouver le point d'absorbance maximale par interpolation et les paramètres n'avaient aucune interprétation biologique. Les données ont été analysées par régression non linéaire en utilisant Prism 7 pour ajuster les courbes au modèle le plus approprié. La meilleure courbe d'ajustement a ensuite été utilisée pour déterminer la concentration de sérum anti-venin où la courbe VAV était un maximum pour chacune des concentrations de venin. Dans certains cas, les données n'ont pas pu être ajustées car il n'y avait pas de maximum clair et dans ces cas, la ligne était tracée directement entre les points expérimentaux.

Les concentrations de sérum anti-venin pour le pic de VAV ont été tracées par rapport à la concentration de venin et ces données ont été analysées par régression linéaire pour estimer la pente avec des intervalles de confiance à 95% (IC à 95%). Toutes les analyses et tracés ont été effectués dans Prism 7 pour Windows [GraphPad Software]

IV.7.1 Régression non linéaire:

L'intérêt de la régression non linéaire est d'adapter un modèle aux données.

Un modèle mathématique est une description d'un état ou d'un processus chimique ou biologique. L'utilisation d'un modèle peut aider à réfléchir aux processus ou mécanismes chimiques et physiologiques, afin qu'on puisse concevoir de meilleures expériences et comprendre les résultats. Lorsqu'on ajuste un modèle à ses données, on obtient les valeurs les mieux adaptées que l'on peut interpréter dans le contexte du modèle.

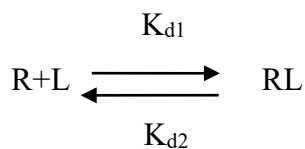
Un modèle mathématique n'est ni une hypothèse ni une théorie. Contrairement aux hypothèses scientifiques, un modèle n'est pas vérifiable directement par une expérience.

Car tous les modèles sont à la fois vrais et faux. La validation d'un modèle n'est pas qu'il est «vrai» mais qu'il génère de bonnes hypothèses vérifiables pertinentes pour des problèmes importants [23].

L'objectif en utilisant un modèle n'est pas nécessairement de décrire parfaitement le système. Un modèle parfait peut avoir trop de paramètres pour être utile. L'objectif est plutôt de trouver un modèle aussi simple que possible qui se rapproche de la description du système. On veut qu'un modèle soit suffisamment simple pour pouvoir l'adapter aux données, mais suffisamment compliqué pour bien ajuster les données et donner des paramètres qui aident à comprendre le système, à tirer des conclusions scientifiques valides et à concevoir de nouvelles expériences.

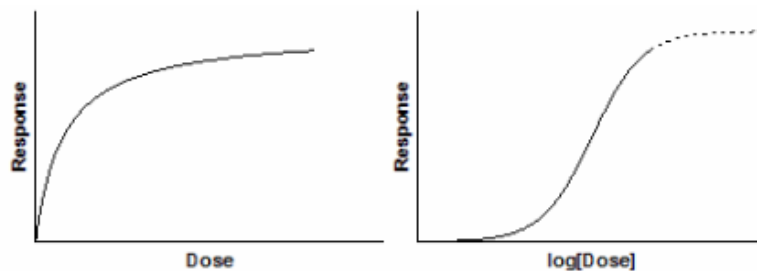
Liaison d'équilibre:

Lorsqu'un ligand interagit avec un récepteur, ou lorsqu'un substrat interagit avec une enzyme, la liaison suit la loi de l'action de masse.



On mesure la quantité de liaison, qui est la concentration du complexe RL, donc trace cela sur l'axe Y. On fait varier la quantité de ligand ajouté, que nous pouvons supposer est identique à la concentration de ligand libre, L, de sorte que forme l'axe X. Une algèbre simple conduit à cette équation [24]:

$$\text{Specific binding} = Y = \frac{B_{\max} \cdot X}{K_d + X}$$



REFERENCES:

- [1] Vachon M, Etude sur les scorpions. Institut Pasteur d'Algérie. 1952 Alger.479p.
- [2] Mirinda. F; Rochat. H; Lissitzky. S. "Sur les neurotoxines de deux espèces de scorpion nord-africains". (1964). *Toxicon* 2, 51- 138.
- [3] Martin. M.F and Rochat. H. «Use of high performance liquid venom chromatography to demonstrate quantitative variation in components of from the scorpion A.a.h". (1987). *Toxicon* 25,569-573.
- [4] Turner R. Screening methods in pharmacology: Library of Congress Catalog Card Number 64-24674, Academic Press New York and London, 1965.
- [5] Chinedu E, Arome D, Ameh FS. A new method for determining acute toxicity in animal models. *Toxicology international*. 2013; 20(3):224.
- [6] Oukkache N, Chgoury F, Lalaoui M, Cano AA, Ghalim N. Comparison between two methods of scorpion venom milking in Morocco. *Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*. 2013; 19(1):5.
- [7] Lalloo, D.G., Theakston, R.D., et al., 2002. The African challenge. *Lancet* 359 (9316), 1527.
- [8] Isbister, G.K., 2010. Antivenom efficacy or effectiveness: the Australian experience. *Toxicology* 268 (3), 148–154.
- [9] Theakston, R.D, 1983. The application of immunoassay techniques including enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), to snake venom research. [Review] *Toxicon* 21 (3), 341–352.
- [10] O’Leary, M.A., Isbister, G.K., et al., 2006. Enzyme immunoassays in brown snake (*Pseudonaja* spp.) envenoming: detecting venom, antivenom and venom–antivenom complexes. *Toxicon* 48 (1), 4–11.
- [11] Isbister G.K., White, J., et al., 2011. Clinical effects and treatment of envenoming by *Hoplocephalus* spp. snakes in Australia: Australian Snakebite Project (ASP-12). *Toxicon* 58 (8), 634–640.
- [12] Isbister, G.K., O’Leary, M.A., et al., 2007. Efficacy of antivenom against the procoagulant effect of Australian brown snake (*Pseudonaja* sp.) venom: in vivo and in vitro studies. *Toxicon* 49 (1), 57–67.

- [13] O’Leary, M.A., Isbister, G.K., Commercial monovalent antivenoms in Australia are polyvalent. *Toxicon* 2009, 54 (2), 192–195.
- [14] S.Kulawickrama, M.A.O’Leary, W.C.Hodgson, S.G.A.Brown, T.Jacoby, K.Davern, G.K.Isbister, Development of a sensitive enzyme immunoassay for measuring taipan venom in serum, *Toxicon*, Volume 55, Issue 8, July 2010, Pages 1510-1518)
- [15] Allen, G.E., Brown, S.G., et al., Clinical effects and antivenom dosing in brown snake (*Pseudonaja* spp.) envenoming – Australian Snakebite Project (ASP-14). *PLoS One* 7, 2012, (12), e53188.
- [16] Isbister, G.K., O’Leary, M.A., et al, Tiger snake (*Notechis* spp.) envenoming: Australian Snakebite Project (ASP-13). *Med. J. Aust*, 2012. (3), 197.
- [17] Ho, M., Silamut, K., et al., 1990. Pharmacokinetics of three commercial antivenoms in patients envenomed by the Malayan pit viper, *Calloselasma rhodostoma*, in Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 42 (3), 260–266.
- [18] Phillips, R.E., Theakston, R.D., et al., 1988. Paralysis, rhabdomyolysis and haemolysis caused by bites of Russell’s viper (*Vipera russelli pulchella*) in Sri Lanka: failure of Indian (Haffkine) antivenom. *Q. J. Med.* 68 (257), 691–715.
- [19] M.A. O’Leary, G.K. Isbister, Detection of venom–antivenom (VAV) immune complexes in vitro as a measure of antivenom efficacy, *Toxicon* 77 (2014) 125–132.
- [20] Lot N°:40313/4; fabrication route de petit staaoueli dely ibrahime-Alger, fab mai 2013, exp Avril 2018.
- [21] Zlotkin E, Gordon D. Detection, purification and receptor binding assays of insect selective neurotoxins derived from scorpion venoms. *Neurochemical techniques in insect research*: Springer; 1985: pp. 243-95.
- [22] R. Levins, *Am. Scientifique* 54: 421-31, 1966.
- [23] GraphPad Prism 7 User Guide, 2020,308p.

CHAPITRE V

Résultats

et

discussions

V.1 Analyse chromatographique de la fraction toxique:

V.1.1 Résultats:

Les six figures ci-après illustrées montrent les profils obtenus par analyse chromatographique des venins solubles dans une colonne C18 Phase inverse. Pour plus de clarté, les composants résolus par cette technique ont été divisés en trois sections distinctes;

Section (I): Les figures (V.1, V.2 et V.3) représentent l'analyse chromatographique des venins collectés à partir de l'espèce *Androctonus australis hector* dans les régions de Debila, Reguiba et Hassi Khalifa.

Section (II) : les figures (V.4, V.5 et V.1) représentent l'analyse chromatographique des venins de scorpions de trois différentes espèces *Androctonus australis hector*, *Buthacus arenicola* et *Androctonus Amoreuxi* capturées dans la région de Debila.

Section (III) : les figures (V-1 et V-6) représentent l'analyse chromatographique de venin des scorpions *Androctonus australis hector* de deux différents âges (adulte et jeune). Une analyse approfondie de ces six séparations révèle des caractéristiques différentes.

L'analyse des chromatogrammes est liée étroitement au temps de rétention de chaque toxine. Le travail accompli sur les scorpions d'espèces *Androctonus australis hector*, *Buthacus arenicola* et *Androctonus Amoreuxi*, montre un profil de fraction toxique quasiment similaire pour un temps de rétention de 5 minutes, mais les concentrations relatives semblent variables quel que soit l'espèce, l'âge de scorpion ainsi que la région d'appartenance de ces arachnides. Au-delà de cet intervalle, on observe une variation remarquable des fractions toxiques pour les trois sections I, II et III.

Les chromatogrammes de la section I concerne les scorpions ayant la même catégorie d'âges et appartenant à la même espèce et qui vivent dans des zones différentes, leurs venins présentent les mêmes fractions toxiques avec différentes concentrations.

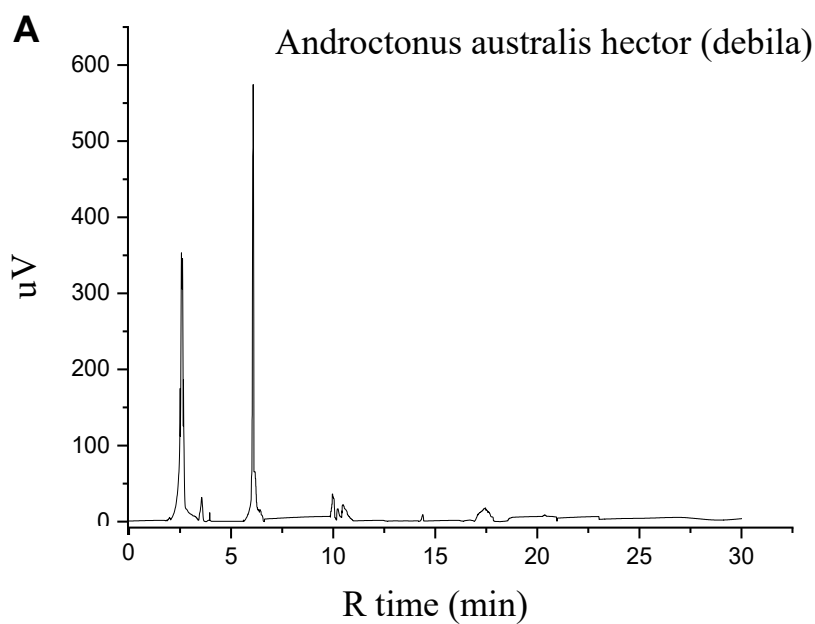


Figure V.1: Chromatogramme HPLC (A) de venins collectés à partir de l'espèce *Androctonus australis hector* de la région de Debila.

pics	Retention Time (min)	Height (uV)	Area	Area %
pic 1	2,58715	326,57004	54,37516	43,66769
pic 2	3,55057	27,62141	3,04545	2,44574
pic 3	6,0742	542,40452	37,19982	29,8745
pic 4	9,98668	31,93005	4,54701	3,65162
pic 5	10,51135	14,36918	6,14438	4,93444
pic 6	17,40857	2,94188	19,2138	15,42601
Total		945,8371	124,5256	84,57399

Tableau V.1: Résultats du chromatogramme de HPLC de venins de l'espèce *Androctonus australis hector* de la région de Debila

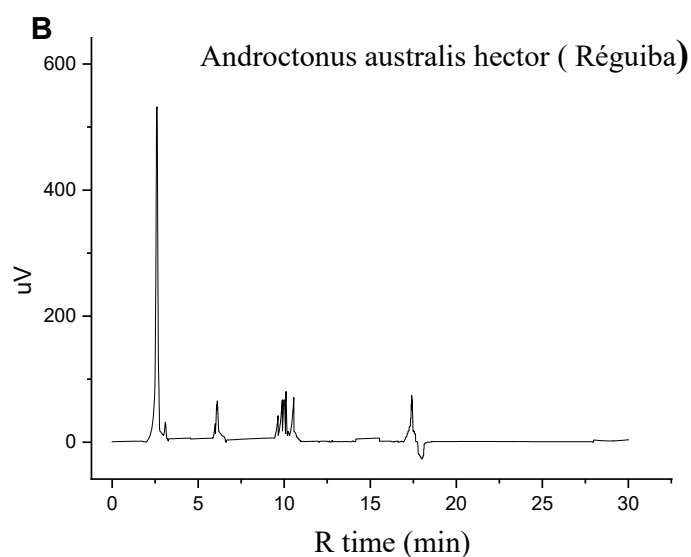


Figure V.2: Chromatogramme HPLC (B) de venins collectés à partir de l'espèce *Androctonus australis hector* de la région de Reguiba.

pics	Temps de rétention (min)	Altitude (uV)	Surface	Surface %
pic 1	2,59828	473,75429	57,38078	43,75483
pic 2	2,59854	57,48285	24,70903	18,84149
pic 3	6,09591	51,81748	9,25793	7,05949
pic 4	9,94873	45,98102	22,9301	17,48499
pic 5	10,51495	48,01615	7,21358	5,5006
pic 6	17,40857	54,63582	9,65018	7,3586
Total		731,6876	131,1416	100

Tableau V. 2: Résultats de Chromatogramme (B) de la HPLC de venins collectés à partir de l'espèce *Androctonus australis hector* de la région de Reguiba.

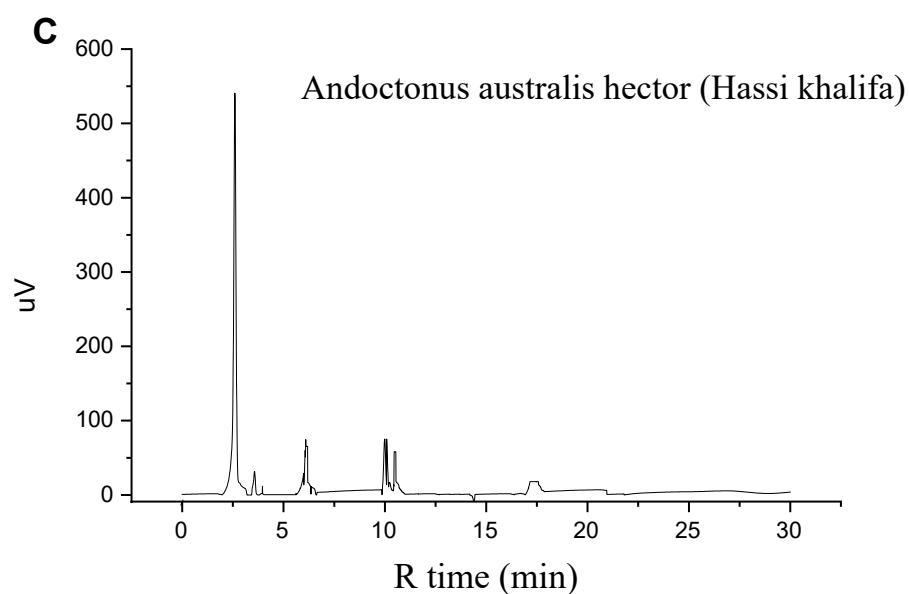


Figure V. 3: Chromatogramme HPLC (C) de venins collectés à partir de l'espèce *Androctonus australis hector* de la région de Hassi Khalifa

pics	Temps de rétention (min)	Altitude (uV)	Surface	Surface %
pic 1	2,59691	514,89567	72,29586	61,38228
pic 2	3,55846	28,21565	3,23004	2,74244
pic 3	6,11116	62,25144	12,79469	10,86324
pic 4	10,03067	58,95086	14,31658	12,15539
pic 5	10,50138	61,54467	6,61119	5,61318
pic 6	17,38714	16,52609	8,53133	7,24347
Total		742,3844	117,7797	100

Tableau V.3: Résultats de Chromatogramme (C) de venin de scorpion (Hassi Khalifa).

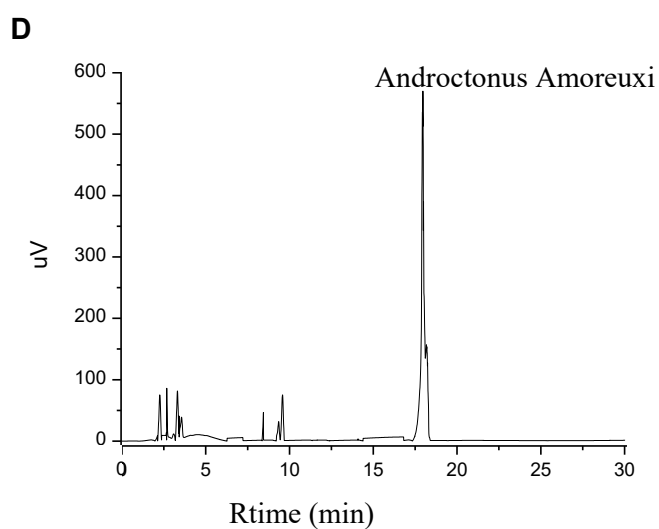


Figure V. 4: Chromatogramme de la HPLC (D) de venins collectés à partir de l'espèce *Androctonus Amoreuxi*.

pics	Temps de rétention (min)	Altitude (uV)	Surface	Surface %
pic 1	2,25542	71,67877	8,49899	5,23718
pic 2	2,68311	67,99279	2,00459	1,23525
pic 3	3,30859	75,36976	9,23725	5,6921
pic 4	9,58435	72,73762	8,46907	5,21875
pic 5	17,94854	377,00598	40,37097	24,87709
pic 6	17,98438	183,85282	75,36814	46,44277
pic 7	18,21186	77,06139	8,85436	5,45616
pic 8	-	-	-	-
pic 9	-	-	-	-
pic 10	-	-	-	-
pic 11	-	-	-	-

Tableau V. 4: Résultats de Chromatogramme (D) de la HPLC de venins collectés à partir de l'espèce *Androctonus Amoreuxi*.

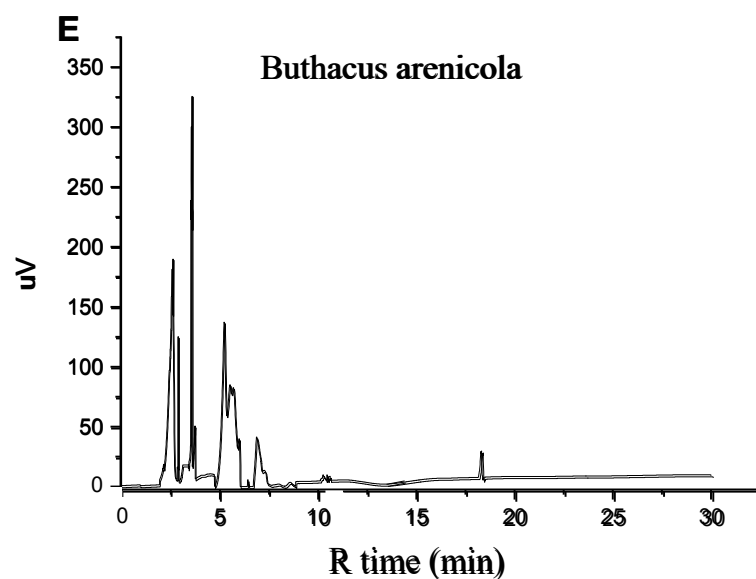


Figure V. 5: Chromatogramme HPLC (E) de venins collectés à partir de l'espèce *Buthacus arenicola*.

Pics	Temps de rétention (min)	Altitude (uV)	Surface	Surface %
pic 1	2,48355	116,80024	30,11032	19,21179
pic 2	2,6067	77,7584	16,32303	10,4052
pic 3	2,6067	94,94954	9,85077	6,28525
pic 4	2,87507	114,44301	0,11655	0,07436
pic 5	3,54392	280,57888	16,77189	10,70125
pic 6	3,5803	408,42667	3,06385	1,95488
pic 7	5,19463	87,64927	15,50037	9,88996
pic 8	5,3855	46,24067	32,2301	20,56431
pic 9	5,6711	47,73593	20,86807	13,3148
pic 10	6,92629	34,96111	9,6981	6,18784
pic 11	18,28629	22,2399	2,21044	1,41036

Tableau V. 5: Résultats de Chromatogramme (E) HPLC de venins collectés à partir de l'espèce *Buthacus arenicola*.

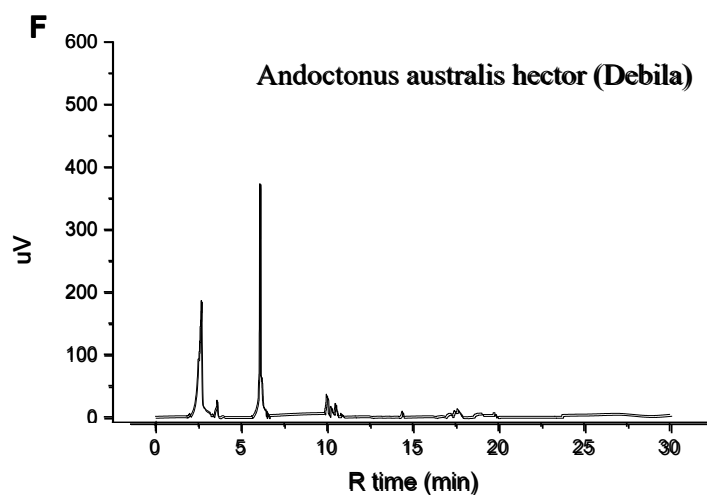


Figure V. 6: Chromatogramme HPLC (F) de venins collectés à partir de l'espèce *Androctonus australis hector* à bas âge.

Pics	Temps de rétention (min)	Altitude (uV)	Surface	Surface %
pic 1	2,59012	135,88	44,70383	37,62236
pic 2	3,55492	15,14642	2,23996	1,88513
pic 3	6,08624	368,4138	24,85011	20,91364
pic 4	9,98916	26,32511	3,48388	2,932
pic 5	10,09866	6,80018	9,49144	7,98791
pic 6	13,58838	-	-	-
Total		549,2859	84,76922	71,34104

Tableau V. 6: Résultats de Chromatogramme (F) de la HPLC de venins collectés à partir de l'espèce *Androctonus australis hector* à bas âge.

V.1.2 Discussion:

Les chromatogrammes A, B et C des figures 1, 2 et 3 des venins obtenus à partir des scorpions d'*Androctonus australis hector*, capturés dans trois différentes régions, respectivement Debila, Reguiba et Hassi khalifa, ont montré que selon le temps de rétention, on observe, pour chaque chromatogramme, six pics ayant des surfaces différentes. Cela explique que la composition du venin de cette espèce est la même mais avec une différence dans la concentration. Cette différence est due à l'effet du milieu ainsi que l'environnement dans lequel le scorpion vit.

Les spectres A, D et E représentent le venin obtenu respectivement à partir d'*Androctonus australis hector*, *Androctonus Amoreuxi* et *Buthacus arenicola* de la région de Debila. Les profils chromatographiques sont présentés sur les figures 1, 2 et 3. Le nombre de pics et le temps de rétention des fractions toxiques se diffèrent du venin à un autre. Le venin d'*Androctonus australis hector* a montré 6 pics principaux tous élués en moins de 20 minutes (figure 1.A). Le venin d'*Androctonus Amoreuxi* a montré 7 pics qui sont élués en moins de 18 minutes (figure 4.D). Le venin de *Buthacus arenicola* a montré 11 pics, élués en moins de 19 minutes (figure 5. E). Au vu des résultats obtenus par analyses chromatographiques, on peut conclure que la composition des venins varie selon l'espèce du scorpion. Le venin extrait de diverses espèces contient une masse de composants bioactifs (fraction toxique) [2], [3], qui apparaît à 230 nm.

V.2. Dose létale médiane (DL50):

V. 2. 1 Résultat et Discussion:

Le venin de scorpion comprend une structure courte de polypeptides de toxine contenant des protéines simples de faible masse moléculaire qui ont des effets létaux et paralysés [3-5]. La toxicité du venin diffère en tenant compte de trop nombreux facteurs tels que le genre, l'espèce, l'âge, la physiologie, la nutrition ainsi que le milieu du scorpion. Les principales difficultés sont liées à la standardisation de la qualité du venin [6]. Pour développer un sérum antivenin qui neutralise au maximum les effets toxiques des venins, nous avons besoin d'un venin de haute gamme à forte activité toxique (DL50) (contenant une grande quantité de toxines). Les résultats sont décrits dans le tableau V-7. Les doses létales (LD₅₀) des venins des scorpions *Androctonus australis hector*, *Androctonus Amoreuxi* et *Buthacus arenicola* sont respectivement estimées à 0.35 mg/20g, 0.48mg /20g, et 0.90 mg/20g. La valeur de la dose létale médiane a montré que la toxicité était élevée pour le venin provenant d'*Androctonus australis hector* et est modérée pour celui obtenu d'*Androctonus Amoreuxi* et elle est faible pour le venin obtenu à partir du *Buthacu sarenicola*.

scorpions	<i>Androctonus australis hector</i>	Androctonus Amoreuxi	Buthacus arenicola
DL₅₀ en mg / 20 g	0,35	0,48	0,90

Tableau V.7: Valeurs de la dose létale médiane.

V.3 Mesure de concentration de Complexe Venin-Antivenin:

V. 3. 1 Résultat:

Le complexe de dosage unique venin / antivenin détectera l'antivenin associé à une fine plaque recouverte d'un anticorps qui fixe le venin, et est détecté par l'anticorps de cheval marqué qui se lie à l'antivenin (Figure V.7: A, B et C) in vitro. Cela délivre une quantité d'antivenin et de liaison au venin pour des concentrations croissantes d'antivenin. La courbe augmente avec l'augmentation de la liaison de l'antivenin au venin libre jusqu'à un point où la quantité accrue de l'antivenin cesse de lier le complexe à la microplaque, car il n'y a plus de sites de liaison d'anticorps libres sur les particules de toxine. Les pics de venin / antivenin sont la concentration à laquelle chaque composant de venin est régulièrement lié à au moins une molécule antivenin. Cela nous donne une meilleure efficacité d'antivenin. De plus, il permet de mesurer le venin lié in vivo et de contrôler si le venin identifié à l'aide du test de venin libre est lié ou non. Pour des concentrations minimales d'antivenin, ce dernier se fixe aux molécules de venin en une fraction de une à une pour former des complexes.

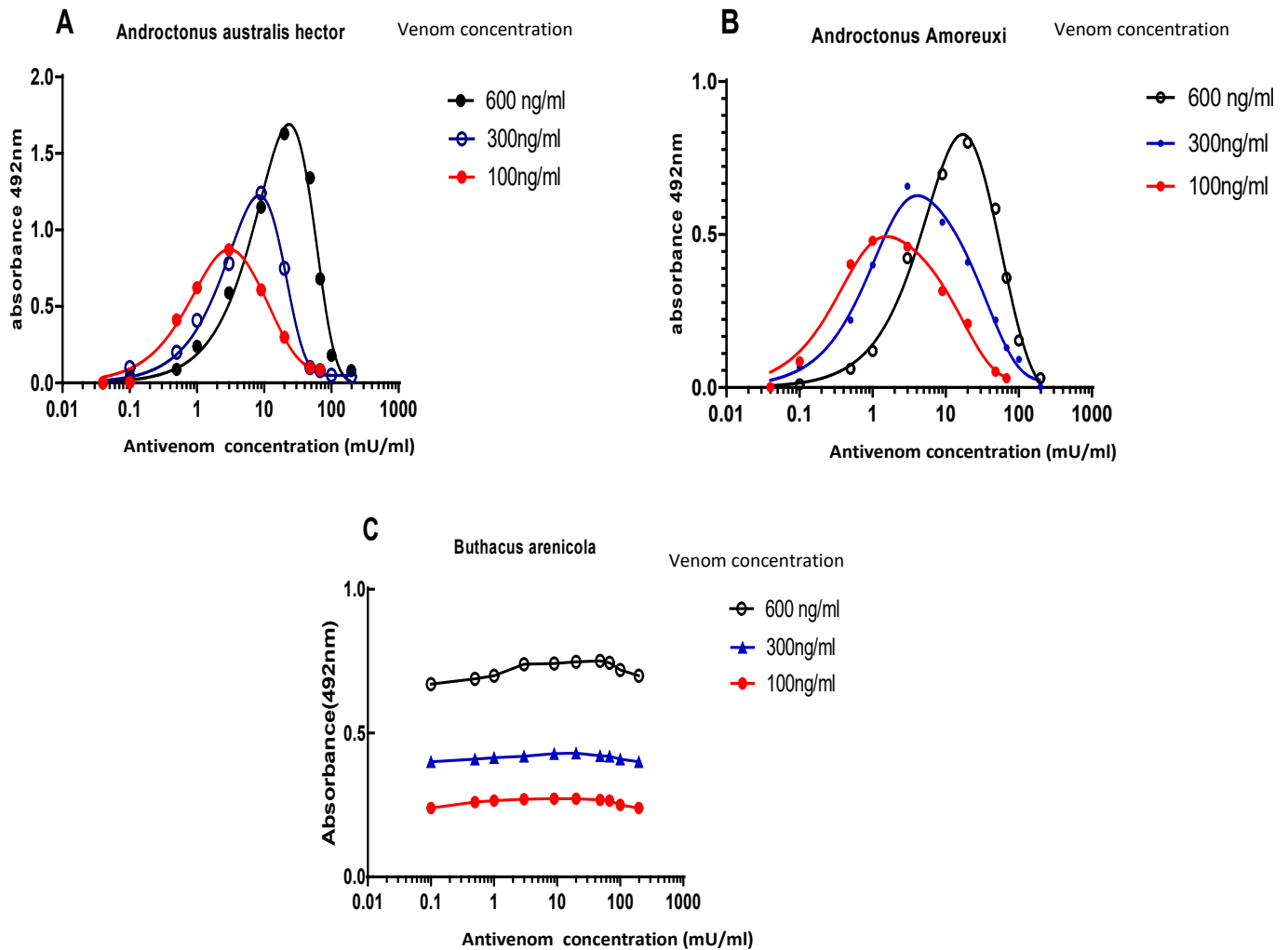


Figure V.7: Courbes de la mesure de l'absorbance complexe en fonction de la concentration d'antivenin, à trois concentrations de venin (ng / ml) A *Androctonus australis hector*, B *Androctonus Amoreuxi* et C *Buthacus arenicola* collectés tous à Debila.

V.3.2 Discussion:

Le complexe venin / antivenin immobile a toujours des sites de liaison libres sur la molécule de venin, ce qui permet à l'antivenin supplémentaire de se lier avec des concentrations élevées pour former $(\text{venin} / \text{antivenin})_n$ où n est le nombre maximal de sites de liaison d'anticorps sur une molécule de venin. Cependant, au moins un site de liaison doit rester libre et exposé pour que le complexe venin-anti-venin se lie aux anticorps d'antivenin de scorpion sur la microplaque. En d'autres termes, le venin antivenin V (AV) n ne peut pas se lier à la microplaque. C'est la raison pour laquelle, tout d'abord, à mesure que la concentration d'antivenin augmente et que le pourcentage d'antivenin dans le mélange augmente, une quantité croissante de venin-anti-venin est identifiée.

Le pic maximum ou complexe venin antivenin se produit lorsqu'une liaison supplémentaire de l'antivenin entraîne une diminution des sites de liaison d'anticorps libres sur les molécules de venin, entraînant une diminution de la liaison à la microplaque. Le pic de complexe VAV se produit lorsqu'il y a une moyenne principalement dans le mélange venin $(\text{antivenin})_{n-1}$, ce qui signifie qu'il y a au moins une (01) molécule d'antivenin impliquée dans chaque molécule de venin.

Il s'agit d'une description plutôt simple de ce qui se passe parce que le venin est constitué de différentes toxines et que chaque toxine est susceptible d'avoir un nombre différent d'épitopes (sites de liaison d'anticorps) en fonction de la taille de la toxine et de l'antigénicité. De plus, l'antivenin est un mélange d'anticorps polyspécifiques avec des anticorps dirigés contre différentes toxines et différents épitopes de toxines avec des affinités variables. Cependant, la formation par étapes de complexes $V (AV)_k$ (où $1 < k$ for Figure.7 A et B, et $k=0$ pour figure 7.C) s'applique au comportement de l'ensemble de la population de venin (toxines) et de molécules antivenin, indépendamment du fait que les venins contiennent des dizaines de protéines différentes, chacune avec plusieurs épitopes, et que les anti-venins sont eux-mêmes polyspécifiques. Pour la plupart des couples antivenin-venin, la gamme d'affinité pour le premier et le deuxième site de liaison n'est pas grande, autrement le pic VAV ne serait pas aussi bien défini dans la majorité des cas. Nous considérons donc une moyenne d'ensemble de couples d'antivenin / venin pour une plage de n et k . La remarque que les courbes venins / anti-venins des composants séparés du venin ne

diffèrent pas trop de celles du venin entier justifie cette opinion (Figure V.7, A & B). Dans certains cas, une courbe différente d'antivenin venin n'a pas été atteinte (figure V.7 C). Néanmoins, les courbes retournent vers zéro, montrant que le venin peut être complètement neutralisé par l'antivenin. Le venin avec l'antivenin de scorpion a donné un large pic, suggérant peut-être une faible affinité de ce venin pour l'antivenin de scorpion.

Les données ont été ajustées empiriquement à la différence de deux exponentielles courbes pour permettre de déterminer le point d'absorbance maximale par interpolation. Dans la mesure de la valeur venin / antivenin, l'indication forte du mélange antivenin / venin est régulière, ce qui signifie que chaque molécule de venin est impliquée dans la plus petite molécule d'antivenin. Alors, cela peut être utilisé comme marqueur d'efficacité, ce qui signifie que toutes les molécules de venin (toxines) sont liées à au moins à un anticorps, de sorte qu'elles ne peuvent pas se distribuer sur leur site d'action et / ou peuvent être éliminées.

Ce rapport venin / antivenin est mesuré sur une plage de concentrations de venin, car la pente semble constante (figure V.8). Les résultats sont présentés dans le tableau 1; remarquablement, ces valeurs comprises entre 0,038 et 0,018 U sont nécessaires pour 1 µg de venin. Bien que «neutraliser» ne soit pas défini, on peut dire que la fixation d'au moins une molécule d'antivenin à une molécule de venin, même si elle n'est pas proche de l'active position de la molécule, est suffisante pour l'empêcher de sortir de la circulation et la solidifier jusqu'à son élimination par le système réticulo-endothélial ou par les phagocytes en circulation.

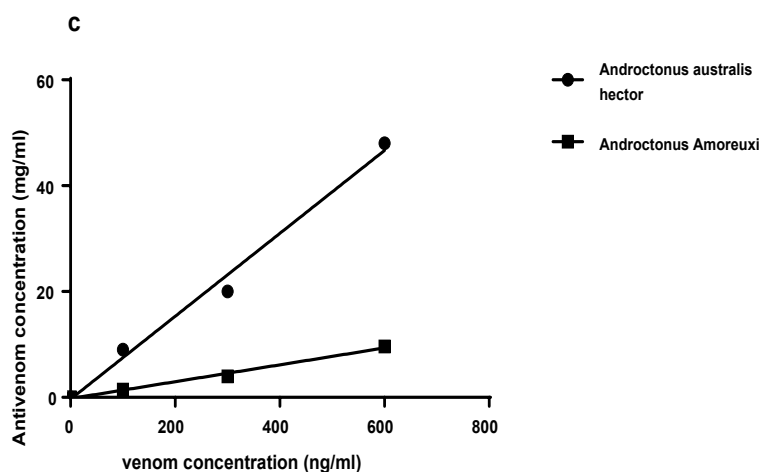


Figure: V.8. Concentration de l'antivenin à laquelle l'absorption maximale du complexe s'est produite, par rapport à la concentration du venin pour deux types de venin de scorpion (*Androctonus australis hector* et *Androctonus Amoreuxi* collectés à Debila).

Venom	antivenin (U/ μ g)	95% (U/ μ g)
<i>Androctonus australis hector</i>	0.0387	0.0221-0.0554
<i>Androctonus Amoreuxi</i>	0.0188	0.0144-0.0231

Tableau V.8 : Rapport entre la concentration de sérum antivenin commercial algérien et la concentration de venin à l'absorption maximale du complexe.

REFERENCES:

- [1] Possani LD, Fletcher PL, Fletcher M, Rode GS, Mochca-Morales J, Lucas S, Coronas FV, Martin BM: Structural and functional characteristics of toxins purified from the venom of the Brazilian scorpion *Tityusserrulatus* Lutz and Mello. *MemInstButantan* 1992, 54:35–52.
- [2] Schwartz EF, Camargos TS, Zamudio FZ, Silva PL, Bloch C, Caixeta F, Schwartz C, Possani LD: Mass spectrometry analysis, amino acid sequence and biological activity of venom components from the Brazilian scorpion *Opisthacanthuscayaproum*. *Toxicon* 2008, 51(8):1499–1508
- [3] Rodríguez-Ravelo R, Coronas F, Z Zamudio F, González-Morales L, Espinosa López G, Urquiola A R and Possani L D, The Cuban scorpion *Rhopalurusjunceus* (Scorpiones, Buthidae): component variations in venom samples collected in different geographical areas, *Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 2013, 19:13.
- [4] Gutiérrez, J.M.; Calvete, J.J.; Habib, A.G.; Harrison, R.A.; Williams, D.J.; Warrell, D.A. Snakebite envenoming. *Nat. Rev. Dis. Primer* 2017, 3, 17063.
- [5] Gopalakrishnakone P, Cheah J, Gwee MCE: Black scorpion (*Heterometruslongimanus*) as a laboratory animal: maintenance of a colony of scorpion for milking of venom for research, using a restraining device. *Lab Anim* 1995, 29(4):456–8.
- [6]. Wee MCE, Wong PTH, Cheah LS, Gopalakrishnakone P, Low KSY: The black scorpion *Heterometruslongimanus*: pharmacological and biochemical investigation of the venom. *Toxicon* 1993, 31(10):1305–14.
- [7] M.A. O’Leary, G.K. Isbister, Detection of venom–antivenom (VAV) immunocomplexes in vitro as a measure of antivenom efficacy, *Toxicon* 77 (2014) 125–132.
- [8] Laustsen, A.H.; Gutiérrez, J.M.; Knudsen, C.; Johansen, K.H.; Bermúdez-Méndez, E.; Cerni, F.A.; Jürgensen, J.A.; Ledsgaard, L.; Martos-Esteban, A.; Øhlenschläger, M.; et al. Pros and cons of different therapeutic antibody formats for recombinant antivenom development. *Toxicon* 2018, 146, 151–175.

[9] Laustsen, A.H.; Engmark, M.; Clouser, C.; Timberlake, S.; Vigneault, F.; Gutiérrez, J.M.; Lomonte, B. Exploration of immunoglobulin transcriptomes from mice immunized with three-finger toxins and phospholipases A2 from the Central American coral snake, *Micrurus nigrocinctus*. PeerJ 2017, 5, e2924.

CONCLUSION GÉNÉRALE

CONCLUSION GÉNÉRALE:

L'envenimation scorpionique par sa fréquence et sa gravité pose un problème majeur de santé publique nécessitant une collaboration multidisciplinaire.

Le sud algérien notamment la région d'El Oued est une zone de forte incidence où les espèces les plus fréquentes étant *Androctonus australis* Hector, *Androctonus amoreuxi* et *Buthacus arenicola*.

Etant donné que le venin de scorpion constitue la matière première nécessaire à la préparation du sérum antiscorpionique, nous nous sommes focalisées notre étude sur les dites espèces.

Les résultats obtenus par les analyses chromatographiques des fractions toxiques ont montré que :

- Les scorpions capturés dans des zones différentes pour la même espèce ne présentent pas les mêmes compositions des toxines.
- De même, la composition des toxines se diffère d'une espèce à une autre.

Ceci a permis de conclure que le milieu dans lequel le scorpion vit ainsi que l'espèce de scorpion sont deux facteurs influant sur l'efficacité de l'anti-venin.

Les résultats de neutralisation du sérum antiscorpionique SAS a montré que ce sérum présente un pouvoir protecteur para-spécifique qui peut être important pour le scorpion d'espèce Aah. Mais si ce sérum était polyvalent, il serait plus efficace et plus important. L'efficacité d'un sérum antiscorpionique paraît dépendre plus de la variété des antigènes utilisés que de leur purification préalable. L'existence de cet effet paraspécifique permet d'envisager la fabrication systématique d'un sérum polyvalent, à partir du mélange de venins contenant les trois types antigéniques des espèces spécialement étudiées de cette région.

Dans une perspective plus lointaine, il serait plus intéressant encore d'étudier la possibilité de fabrication d'un sérum d'antivenin plus efficace à partir d'une sélection de venin avec conservation du pouvoir antigénique selon les espèces des scorpions les plus dangereux de la même zone.

ISSN 0974-4169(Print)
0974-4150(Online)

www.ajrconline.org



RESEARCH ARTICLE

The Verification of the Efficacy of the Polyspecific Antisorpionic Serum against Three Scorpion in El Oued Region

Souhaila Meneceur¹, Mohammed Ridha Ouahrani², Salah Eddine Laouini², Rachida Zouari Ahmed¹, Abderrhmane Bouafia^{2*}

¹Department of Chemistry, Faculty of Exact Sciences, University of Echahid Hamma Lakhdar, El-Oued, 39000, Algeria

²Department of Process Engineering, Faculty of Technology, University of Echahid Hamma Lakhdar, El Oued 39000, Algeria

*Corresponding Author E-mail: abdelrahmanebouafia@gmail.com

ABSTRACT:

In Algeria and like many other countries of the world and in the absence of other effective therapeutic remedies. Antidepressant serum remains the only way to neutralize these toxins and fight these disorders despite sometimes-unsatisfactory results. In order to contribute subsidize to the improvement of these results; we considered it useful to study the factors influencing the composition and the concentration of the toxins to know the behavior of the antiscorpionic serum on these toxins. To do this, we tested the ability of polyspecific antisorpionic serum and determined whether enough antivenom was administered. Comparative titrations were performed separately on the venoms of female scorpions (*Androctonus australis hector*, *Buthacus arenicola* and *Androctonus Amoreuxi*) caught in three different geographical region in El Oued: Debila, Reguiba and Hassi Khalifa.

KEYWORDS: Scorpion; venom; *Androctonus australis Hector*; *Buthacus arenicola*; *Androctonus Amoreuxi*; antivenom.

INTRODUCTION:

Scorpion envenomation is a grave medical problem and a real danger in a number of countries around the world, mostly in central and southern America, northern Africa, the Middle East and India¹⁻⁵. This specific pathology represents one of the most significant public health difficulties in Algeria and more particularly in the regions of the Highlands and the South for example the region of Oued Souf where, every year, several thousand people are stung by the scorpions, of which about ten die on average.

Although anti-scorpionic serum is the only remedy against scorpion envenomation, its administration is currently much questioned and this, given its ineffectiveness in many cases. For an effective contribution to the improvement of the therapeutic management of people envenoms, and to decrease the rate of lethality, it is clear to develop studies of the venoms in their compositions and modes of action because they are the resource essential manufacturing of SAS⁶⁻⁸.

Antivenom remains to date the only definitive behavior for envenomation⁹⁻¹². The sustainability of antivenom source has been excessive contest worldwide with financial restraint being mentioned as the major causes especially in developing countries¹³. Then, the current therapeutic procedures for antivenomic must be optimized for the pharmacokinetics of venoms/toxins

and how this serum might modify the clinical pharmacokinetic profile of venoms/toxins should be promoted, which is essential for better adaptation serum dosages of antivenom. Various methods of treating scorpion fever are treated, ranging from symptomatic treatment to antivenom serum. Advocates of the latter refer to the use of inappropriate antioxidants and doses¹⁴⁻¹⁹. On the other hand numerous clinicians have questioned the effectiveness of antivenom therapy²⁰⁻²⁴. Thus, this study evaluated the efficacy of antivenom produced in Algeria three different venom obtained three scorpions species.

RESULTS AND DISCUSSION:

Analysis of the toxic fraction:

Fig.1 shows a map corresponding to three areas where the ninety scorpions were collected for the treated venom as described in the materials and methods section, after which the samples were subjected to chromatographic analysis.

Median lethal dose (LD₅₀):

Scorpion venom comprises a small structure of neurotoxin polypeptides containing simple, low-molecular-mass proteins that have lethal and paralytic effects. Venom toxicity differs allowing to numerous factors such as genus, species, age, physiology, feeding state and region of the scorpion. Analysis of the toxic fraction Fig.1 shows a map corresponding to three zones in which ninety scorpions were collected for the treated venom, as described in the materials and methods section, after which the samples were analyzed to chromatographic.

Previously, the main difficulties were related to the standardization of venom quality²⁵. To develop an antivenom serum that neutralizes as far as possible the toxic effects of venoms, we necessarily have a high class of venom with a high toxic activity (LD₅₀). The procedure of venom collecting effect on activity²⁶. The results were described in Table 1. The LD₅₀ of the native venoms of *Androctonus australis hector*, *Androctonus Amoreuxi* and *Buthacus arenicola* were respectively estimated at 0.35mg/20g, 0.48mg/20g, and 0.90mg/20g. The value of median lethal dose highlighted that toxicity was high for venom obtained from *Androctonus australis hector* and *Androctonus Amoreuxi* presented moderate toxicity. The lower value founded for venom obtained from *Buthacus arenicola*.

High performance liquid chromatography (HPLC):

Fig.2 shows the HPLC spectra obtained by chromatographic separation of soluble venoms in a C18 reverse phase column. For a better transparency, the

different compounds determined by this technique have been alienated in Fig.1: (A) *Androctonus australis hector* from the region of Debila, (B) *Androctonus australis hector* scorpions from the region of reguiba and (C) venom obtained from *Androctonus australis hector* from Hassi khalifa region. The spectra D and E presented the venom obtained from *Androctonus Amoreuxi*, and *Buthacus arenicola* respectively of Debila region. Near analysis of these venom exposes similar characteristics. The most important components are related to the major components and time of elution, but the relative concentrations appear to be variable.

This is already well documented by similar analyzes shown on other venoms, especially when the number of individuals used for the preparation of the pooled mixture is low²⁷⁻²⁹. As can be seen in Fig.1, the venom obtained from different species contained a mass of bioactive components. Although HPLC was able to isolate these fractions in a commendable manner, the yield obtained was not sufficient to allow us to use a purified component for the injection of a camel.

Venoms include some carefully related profiles based on key components and elution timing, but relative concentrations appear to be modifiable. This was previously well documented by similar analyzes conducted on other venoms, particularly when the number of individuals used for the preparation of the shared mixture was not important^{27,28}.

Venom-antivenom complex:

The complex of venom/antivenom assay will single detect bound antivenom for the microplate is coated with an anti-scorpion venom antibody which fixes the venom, and detection is by labeled anti-horse antibodies which bind horsy antivenom (Fig.2: A, B and C). In vitro, this delivers an amount of antivenom and venom binding for increasing concentrations of antivenom. The curve increases with the increasing binding of the antivenom to the free venom pending a point where increasing amounts of antivenom stop the binding of the venom-antivenom complex to the microplate, as there are no longer any binding sites of free antibodies on venom particles. The venom/antivenom peaks are the concentration at which each venom component is regularly bound to at least one antivenom molecule. This gives us a new amount of antivenom capacity. In addition, it allows an assay to measure the venom bound in vivo and to control if the venom identified post-antivenin using the free venom assay is bound. For minimum concentrations of antivenom, the antivenom fixes to the venom molecules in a one to one fraction to form complexes.

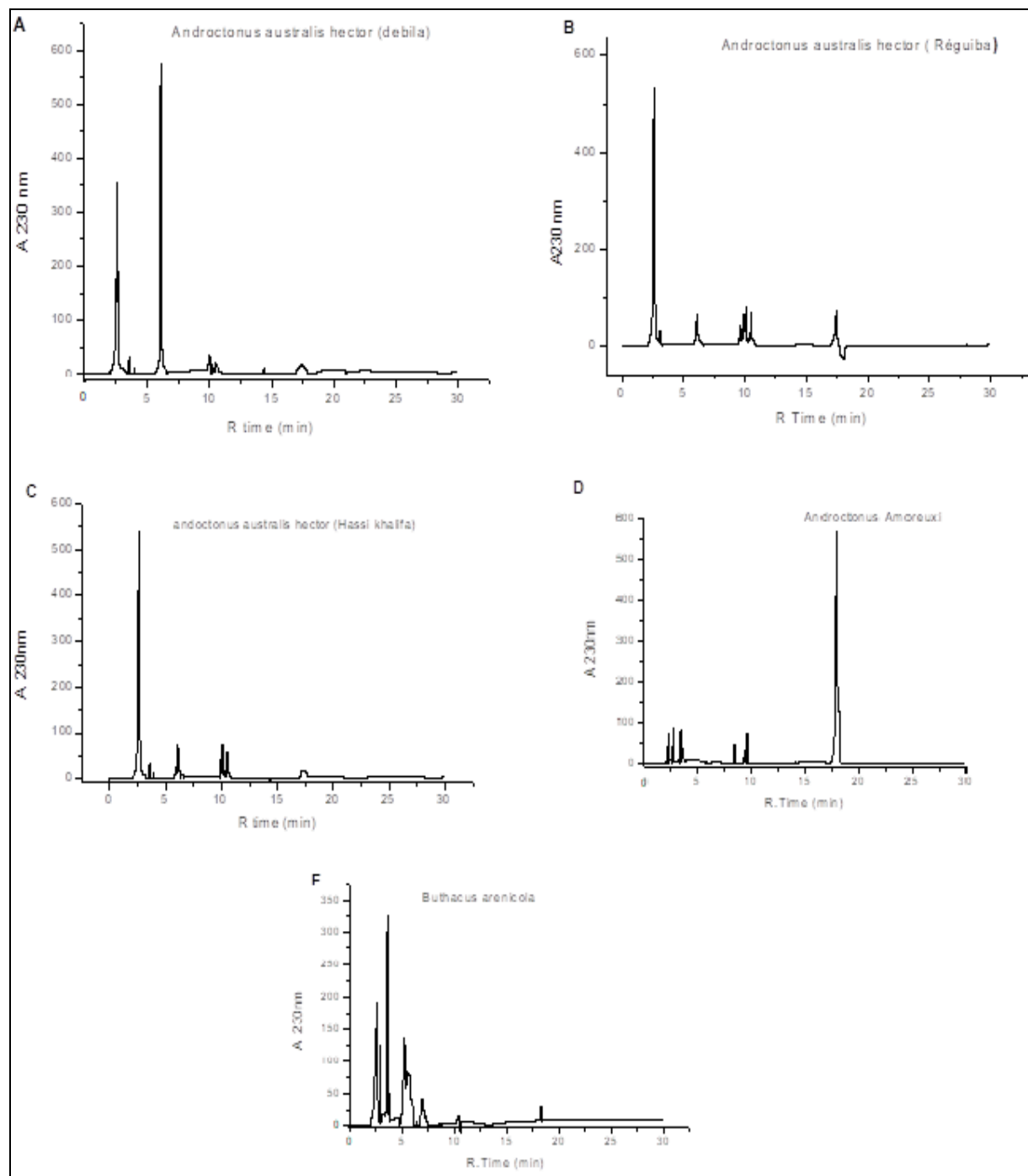


Fig.1. HPLC analysis of soluble venom from different geographical areas: A 0.02 mg protein portion from each toxic fraction of venom was separated into a C18 reverse-phase column eluted with a gradient from solution A 0.12% trifluoroacetic acid (TFA) in water to 60% solution and B 0.10% TFA in acetonitrile run for 30 minutes. (A, B, C) the venom of scorpions *Androctonus australis hector* collected in Debila, Reguiba and Hassi khalifa. (D, E) the venom of scorpions *Androctonus Amoreuxi* and *Buthacus arenicola* collected in Debila.

The venom/antivenom complex immobile has free binding locations on the venom molecule which lets more antivenom to bind with increasing concentrations to form (venom/antivenom)_n where n is the maximum number of antibody binding locations on a venom molecule. In another hand, at least one group sets the

free and open remains of need for the venom-venom complex to bind to the anti-venom scorpion antibodies of the microplate. This is the reason why, firstly, as the concentration of antivenom increases and the percentage of antivenom in the mixture increases, an increasing amount of venom venom is identified. Concentration of

the peak complex follows after further binding of the antivenom resulted in a decrease in free antibody binding sites on the venom molecules, resulting in a decrease in microplate binding. The complex peak occurs when there is regularly or mainly in the venom/antivenom 1 mixture, which means that there is at least one antivenom molecule involved in each venom molecule.

This is description it possible that of what occurs for the reason that venom consists of diverse toxins and every toxin is possible to have a different number of antibody binding places reliant on toxin size and antigenicity. Furthermore, antivenom is a polyspecific antibody to different toxins and different toxin epitopes with varying affinities. However, the stepwise formation of (venom/antivenom) k complexes (where $1 < k$ for Fig.2 A and B, and $k=0$ for figure C) relates to the behavior of the whole population of venom (toxins) and antivenom molecules, anyway of the fact the venoms comprise dozens of different proteins, each with some epitopes, and that the antivenom are themselves polyspecific. For most antivenom-venom couples, the variety of similarities for the first and second linkage sites is not great, so the venom / antivenom peak would not be so distinct in most cases. We therefore consider an average set of antivenom-venom pairs for a range of n and k . The remark that the venom / venom curves of separate components of the venom do not differ too much from those of the whole venom justifies this opinion (Fig.2, A

and B). In certain cases, a different antivenom-venom curve was not attained (Fig.2 C). However, the curves do return on the way to zero, showing that the venom can be completely neutralized by the antivenom; with scorpion antivenom provided a wide peak, possibly suggesting a low similarity of this venom for scorpion antivenom.

The data were adjusted to the difference of two exponential curves empirically to allow calculation of the maximum absorption point by interpolation. In the measure of the venom / antivenom value, the strong indication of the antivenom / venom mix is regular, which means that each molecule of venom is involved in the smallest molecule of antivenom. The efficacy marker can be applied because it means that all the venom molecules (toxins) are linked to at least one antibody, so that they can not be distributed at their place of action and / or can be eliminated. . This venom-to-venom ratio is restricted over a range of venom concentrations because the slope appears constant (Fig.3). The results are shown in Table 1; remarkably, these values between 0.038 and 0.018 U are necessary for 1 μ g of venom. While "neutralizing" is not defined, it can be said that the fixation of at least one molecule of antivenom to a molecule of venom, even if it is not close to the active position of the molecule, is sufficient to prevent it from getting out of the circulation and solidify it to elimination by the reticuloendothelial system or circulating phagocytes.

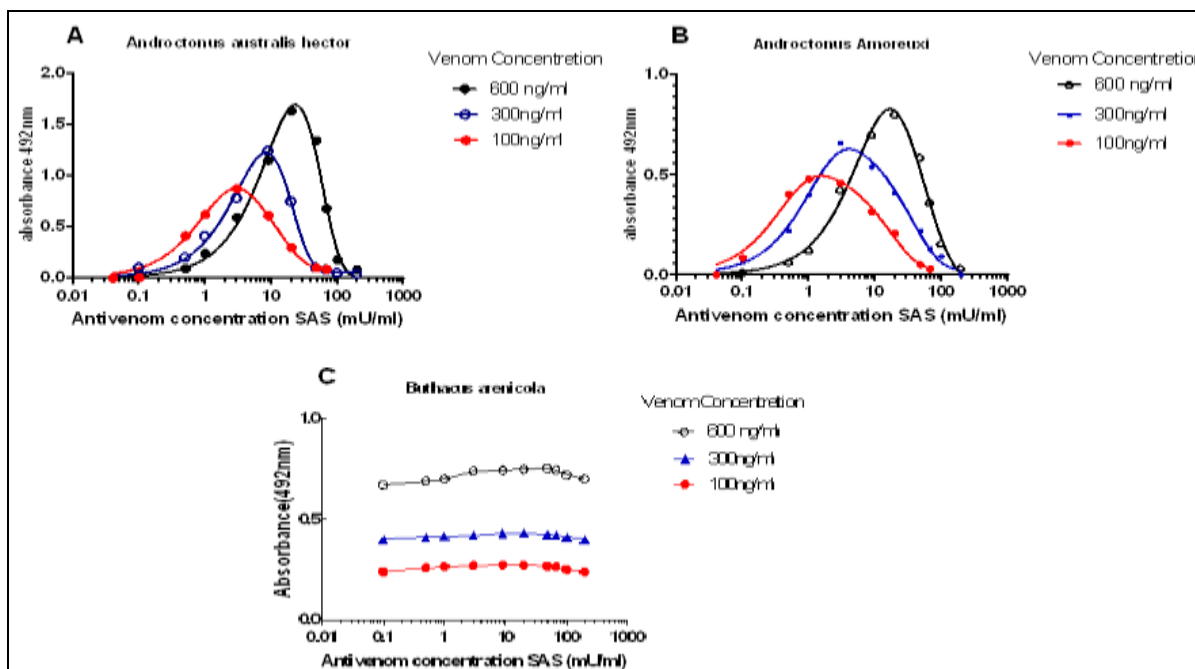


Fig.2. Logarithmic-linear plots of venom-antivenom (VAV) measurements versus antivenom concentration for mixtures of venom and antivenom, at three or concentrations of venom (ng/ml) – A: *Androctonus australis hector*, B: *Androctonus Amoreuxi*, C: *Buthacus arenicola* each collected in Debila. The plotted points are the average of three absorbances. For panels A and B the line is a predicted curve based on the subtraction of two exponential curves. For panel C a curve could not be fitted and the lines connect experimental points.

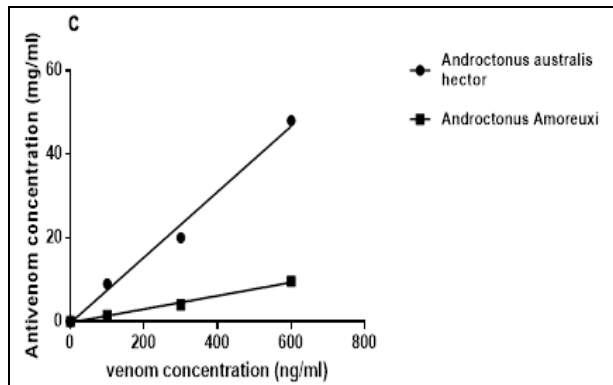


Fig.3. The plot of the antivenom concentration at which the maximum venom/ antivenom absorbance occurred against the concentration of venom for two species of scorpions venoms (*Androctonus australis hector* and *Androctonus Amoreuxi* collected in Debila).

Table 1: The ratio of antivenom concentration to the concentration of venom at the maximum venom/antivenom absorbance for Algerian commercial antivenom (SAS.)

Venom	Slope (U/ µg)	95% (U/ µg)
<i>Androctonus australis hector</i>	0.0387	0.0221-0.0554
<i>Androctonus Amoreuxi</i>	0.0188	0.0144-0.0231

MATERIALS AND METHODS:

Venom:

Scorpions of three different species (*Aah*, *Aam* and *Buthacus arenicola*) were collected in the Oued Souf region of Algeria. The venom of AAH was obtained by electrical stimulation of ninety female scorpions from different geographical areas as follows³⁰: sixty from Debila, fifteen from Hassi Khelifa and the same number from Reguibia. The crude venom was dissolved in sterile double-distilled water and centrifuged at 13,000 × g for 10 min at 4°C. The precipitate was discarded and the supernatant kept at 20°C until needed. After a captive day, individual scorpions from each area and age were treated and pooled with venom excretion collected in small ampoules. The venom is stored at -20°C³¹.

Antivenin:

The universal anti-scorpion antivenom was kindly given by public hospital center of Debila, and prepared by the Institute Pasteur of Algeria in 5ml bottles (lot n° 40313/4 Manufactured: May 2013 Expiration: Apr 2017). This preparation was obtained from the serum of horses hyperimmunized with from the venom scorpion of *Androctonus australis Hector*. Algerian commercial antivenom was produced by Institute Pasteur of Algeria, including polyspecific scorpion, each 1ml of serum contains immunoglobulins F(ab '2 neutralized minimum 1500 toxic units of Aah dry venom. The commercial antivenom is of equine origin.

Determination of the median lethal dose (LD₅₀):

The lethal potency of venoms, as measured by LD₅₀ significance resolve (in micrograms of dried venom per mouse), was evaluated as suggested by the World Health

Organization. Meetings of for mice (22-20 g) were used per dose of venom. The venom doses were attuned with NaCl 150mM and final was injected in volumes of 500 µl through intravenous routes³². The rate mortality was verified 24 h after injection. The LD₅₀ is calculated using the arithmetical method of Karber^{33,34}, which is as follow:

$$LD_{50} = LD_{100} - \sum a. b/n$$

Where, LD₅₀ = Median lethal dose

LD₁₀₀ = Least dose required to kill 100%

a = Dose difference

b = Mean mortality

n = Group population.

High performance liquid chromatography analysis (HPLC)

The soluble venom from each locality and species was applied to the high-performance liquid chromatographic (HPLC) system. A high performance liquid chromatography system, Shimadzu LC 20 AL equipped with a universal injector (Hamilton 25µL) SPD 20A, UV-VIS detector SPD 20A (Shimadzu) was used.

Typically, 0.02mg dissolved in 2ml was applied each time. An analytical C18 reverse-phase column (dimensions of 250 × 10mm). Components were purified using a linear gradient from 0% solution. A [0.1% acetic acid in water] to 60% solution B (0.10% acetic acid in acetonitrile), run for 35 minutes²⁹. The detection was monitored by absorbance at 230nm with 0.5-unit sensitivity and eluted at 1ml/min.

Venom-antivenom complex (VAV) measurement:

Bovine serum albumin (BSA) and tetramethylbenzidine (TMB) were all purchased from Sigma. All reagents used were of analytical grade. Carbonate buffer is 0.1 M, pH 9.5. Blocking solution is 0.5% BSA in phosphate buffered saline (PBS) at pH 7.4. The above mixture was washed with a solution 0.02% Tween 20 in PBS. The microplates were used and the absorbance was calculated at 492nm (RI 2100C microplate Reader plate reader). All procedures were carried out at room temperature.

The different known concentration of venom in obstructive solution was added to sequential dilutions of antivenom in PBS (1/1000), such that the final venom concentration in the mixture was 100, 300, 600ng/ml. The mixture was permitted to stand for one hour, all experiments carried out in triplicate. Control solutions containing antivenom only were included to allow for subtraction of background absorbance. Microplates were covered with anti-scorpion venom IgG conjugated (0.1

M in carbonate buffer, pH=9.5) for 24 h at room temperature than at 4°C overnight. They were then splashed once for 5 minutes and blocking solution (100 µl) was useful for 1 h. Microplates were washed twice time for 5 minutes and an incubated mixture of venom/antivenom (100µl) was added for 1 hour. Finally, the microplates were washed three times for 5 minutes and a solution of labeled anti-horse IgG (100µl in blocking solution) was useful. After a more hour the microplates were washed 4 times, and TMB (10µl) was applied, followed by H₂SO₄ (50µl, 2 M) to stop the reaction³⁵.

CONCLUSION:

In this investigation, we have only presented the detection of venom/antivenom in vitro mixtures of venom and antivenom. The antivenom presented an important role in the actions of envenomation by scorpion stings. By comparing between three venom scorpion *Androctonus australis hector*, *Androctonus Amoreuxi* and *Buthacus arenicola*; the venom obtained from *Androctonus australis hector* showing the high toxicity value. The lower toxicity value founded for venom obtained from *Buthacus arenicola*. The antivenom used as antigen neutralize strongly the venom of *Androctonus australis hector* and *Androctonus Amoreuxi* but presented any reaction against *Buthacus arenicola*.

CONFLICTS OF INTEREST:

The authors declare that there are no conflicts of interest.

REFERENCES:

- Devaux C, Jouirou B, Krifi MN, Clot-Faybesse O, El Ayeb M, Rochat H. Quantitative variability in the biodistribution and in toxinokinetic studies of the three main alpha toxins from the *Androctonus australis hector* scorpion venom. *Toxicon*. 2004; 43(6):661-9.
- Krifi MN, Amri F, Kharat H, El Ayeb M. Evaluation of antivenom therapy in children severely envenomed by *Androctonus australis garzonii* (Aag) and *Buthus occitanus tunetanus* (Bot) scorpions. *Toxicon*. 1999; 37(11):1627-34.
- Namasivayan C, Selvaraj S, Kameshwari V, Nimmy A, Sundaramoorthy S. A Pharmacological Review on *Achyranthes aspera*. *Research Journal of Pharmacology and Pharmacodynamics*. 2019; 11(4):159-64.
- Jose N. Bee Venom Therapy (BVT). *Asian Journal of Nursing Education and Research*. 2015; 5(2):293-6.
- Prabhakaran A, Kumaravel P, Priya J, Melchias G, Edward A, Sridevi G. Investigation of antibacterial and haemolytic activity of Russell's viper and *Echis carinatus* venom. *Asian Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2014; 4(1):1-4.
- Sivakumar S, Manju P. Identification of new snake venom zinc Metalloproteinase inhibitor using docking studies from *Plectanthes amboinicus*. *Asian Journal of Research in Pharmaceutical Science*. 2017; 7(3):132-4.
- John L. Anti Snake Venom. *International Journal of Nursing Education and Research*. 2018; 6(4):423-4.
- Maheswari C, Venkatnarayanan R, Babu P, Kanadasamy C. In vivo Anti-Snake venom activity of methanol extract of leaves of *Orthosiphon stamineus* in mice. *Research Journal of Pharmacology and Pharmacodynamics*. 2014; 6(3):126-8.
- Warell D. Animal poisons in Masson's tropical diseases. Masson Pec. Bahr. Bell DR. eds. London; 1987.
- Ismail M, Abd-El salam M, Al-Ahaidib M. *Androctonus crassicauda* (Olivier), a dangerous and unduly neglected scorpion—I. Pharmacological and clinical studies. *Toxicon*. 1994; 32(12):1599-618.
- Sivaraman T, Sreedevi N, Meenatchisundaram S. Identification and Quantification of antivenom compounds from aqueous extract of *Cyclea peltata* root. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 2018; 11(4):1386-90.
- Astaraki P, Basati G, Abbaszadeh S, Mahmoudi GA. A Review of medicinal plants used for snakebites and scorpion stings in Iran: A systematic review. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 2020; 13(3):1565-9.
- Prasad R, Kumar A, Mishra OP, Singh TB, Singh A. Efficacy of Scorpion Antivenom in Grade III and IV Scorpion Envenomation. *The Indian Journal of Pediatrics*. 2018; 85(7):576-.
- Bond GR. Antivenin administration for *Centruroides* scorpion sting: risks and benefits. *Annals of emergency medicine*. 1992; 21(7):788-91.
- Ismail M. The treatment of the scorpion envenoming syndrome: the Saudi experience with serotherapy. *Toxicon*. 1994; 32(9):1019-26.
- Ismail M. Treatment of the scorpion envenoming syndrome: 12-years-experience with serotherapy. *International journal of antimicrobial agents*. 2003; 21(2):170-4.
- Tarasiuk A, Menascu S, Sofer S. Antivenom serotherapy and volume resuscitation partially improve peripheral organ ischemia in dogs injected with scorpion venom. *Toxicon*. 2003; 42(1):73-7.
- El-Amin E, Sultan O, Al-Magamci M, Elidrisy A. Serotherapy in the management of scorpion sting in children in Saudi Arabia. *Annals of tropical paediatrics*. 1994; 14(1):21-4.
- Freire-Maia L, Campos J, Amaral C. Approaches to the treatment of scorpion envenoming. *Toxicon*. 1994; 32(9):1009-14.
- Krifi MN, Savin S, Debray M, Bon C, El Ayeb M, Choumet V. Pharmacokinetic studies of scorpion venom before and after antivenom immunotherapy. *Toxicon*. 2005; 45(2):187-98.
- Bawaskar H, Bawaskar P. Treatment of cardiovascular manifestations of human scorpion envenoming: is serotherapy essential? *The Journal of tropical medicine and hygiene*. 1991; 94(3):156-8.
- Sofer S, Shahak E, Gueron M. Scorpion envenomation and antivenom therapy. *The Journal of pediatrics*. 1994; 124(6):973-8.
- Badr A, Abderrahman E, Hassan A, Mina AE, Rachid E, Yassir B. Epidemiological profile of snakebites cases recorded at the 3rd military hospital laayoune morocco between 2011 and 2017. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 2018; 11(5):1752-6.
- Mohammed ZI, Hassan AJ. Effect of Bee venom on gene expression of HSP70 and IL-1β in male rats induced by arthritis in comparison with Prednisolone drug. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 2019; 12(11):5269-74.
- Gopalakrishnakone P, Cheah J, Gwee M. Black scorpion (*Heterometrus longimanus*) as a laboratory animal: maintenance of a colony of scorpion for milking of venom for research, using a restraining device. *Laboratory animals*. 1995; 29(4):456-8.
- Gwee MC, Wong PT-H, Gopalakrishnakone P, Cheah L, Low KS. The black scorpion *Heterometrus longimanus*: pharmacological and biochemical investigation of the venom. *Toxicon*. 1993; 31(10):1305-14.
- Possani L, Fletcher P, Fletcher M, Rode G, Mochca-Morales J, Lucas S, et al. Structural and functional characteristics of toxins purified from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus* Lutz and Mello. *Mem Inst Butantan*. 1992; 54(2):35-52.
- Schwartz EF, Camargos TS, Zamudio FZ, Silva LP, Bloch Jr C, Caixeta F, et al. Mass spectrometry analysis, amino acid sequence and biological activity of venom components from the Brazilian scorpion *Opisthacanthus cayaporum*. *Toxicon*. 2008; 51(8):1499-508.
- Rodríguez-Ravelo R, Coronas FI, Zamudio FZ, González-Morales

- L, López GE, Urquiola AR, et al. The Cuban scorpion *Rhopalurus junceus* (Scorpiones, Buthidae): component variations in venom samples collected in different geographical areas. *Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*. 2013; 19(1):13.
30. Ozkan O, Kar S, Güven E, Ergun G. Comparison of proteins, lethality and immunogenic compounds of *Androctonus crassicauda* (Olivier, 1807) (Scorpiones: Buthidae) venom obtained by different methods. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 2007; 13(4):844-56.
31. Zlotkin E, Gordon D. Detection, purification and receptor binding assays of insect selective neurotoxins derived from scorpion venoms. *Neurochemical techniques in insect research*: Springer; 1985: pp. 243-95.
32. Oukkache N, Chgoury F, Lalaoui M, Cano AA, Ghalim N. Comparison between two methods of scorpion venom milking in Morocco. *Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*. 2013; 19(1):5.
33. Turner R. *Screening methods in pharmacology*: Elsevier. 2013.
34. Chinedu E, Arome D, Ameh FS. A new method for determining acute toxicity in animal models. *Toxicology international*. 2013; 20(3):224.
35. O'Leary MA, Isbister G. Detection of venom–antivenom (VAV) immunocomplexes in vitro as a measure of antivenom efficacy. *Toxicon*. 2014; 77:125-32.