Université Sidi Mohammed Ben Abdellah
Faculté des Sciences et Techniques
www.fst-usmba.ac.ma

Année Universitaire : 2015-2016

Master Sciences et Techniques : CMBA
Chimie des Molécules Bio Actives

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES
Pour l'Obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

Etudes biochimique et toxicologique des venins des scorpions *Androctonus mauretanicus* (Am) et *Buthus occitanus* (Bo)

Présenté par :

BOUROUAH Oussama

Encadrées par :

Pr : MISBAHI Houria (FST)

Dr : OUKKACHE Naouel (IPM)

Soutenu Le 16 juin 2016 devant le jury composé de :

-Pr : H. MISBAHI (FST)
-Pr : N. OUKKACHE (IPM)
-Pr : O. SQALI (FST)
-Pr : N. IDRISSI KANDRI (FST)

Stage effectué à : L'Institut Pasteur du Maroc

REMERCIEMENT

Au Professeur H. MISBAHI

Vous m'avez fait l'honneur de m'avoir encadrée dans ce mémoire Vous m'avez consacrée votre temps précieux et votre aimable sollicitude sans réserve. Vous m'avez toujours recueilli avec gentillesse et sympathie Veuillez trouver ici, l'expression de mes vifs remerciements et de mon estime.

Au Docteur N. OUKKACHE

Vous m'avez fait l'honneur de m'encadrer et de me guider dans ce travail avec bienveillance et rigueur

Pour m'avoir assurée tous les conditions afin que je puisse effectuée ce stage dans les meilleures conditions

Veuillez trouver ici, le témoignage respectueux de ma profonde reconnaissance et admission.

Au Docteur F. CHGOURY

Je tiens à vous exprimer toute ma reconnaissance en acceptant de me guider tout au longue de l'élaboration de ce travail, vous avez été pour moi un soutien constant

Veuillez trouver ici, Cher Docteur l'expression de mes vifs remerciements et de mon estime.

Et aux honorables membres du jury

Je vous remercie vivement pour l'honneur que vous me faites en siégeant dans ce jury

Votre jugement sera d'une grande valeur dans l'appréciation de ce travail

Veuillez trouver à travers ce modeste travail la manifestation de ma plus haute estime et de mes sentiments les plus respectueux.

LISTE DES ABREVIATIONS

Am : *Androctonus mauretanicus*

APS : PerSulfate d'Ammonium

Bo : *Buthus occitanus*

BSA: Bovin Serum Albumin

Ca: Calcium

CAPM : Centre Antipoison du Maroc

CH_3COOH : Acide acétique

Cl: Chlore

CnBr : Bromure de Cyanogène

DO : Densité optique

Da *:* Dalton

DL_{50} : Dose létale 50

ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

$F(ab')_2$: Fragment antibody binding

H_2O_2: Peroxyde d'hydrogène

H_2SO_4: Acide sulfurique

HCl: Acide chlorhydrique

IgG: Immunoglobulines G

IP: Intrapéritonéal

IV : Intraveineuse

K: Potassium

Na: Sodium

Na_2CO_3: Carbonate de sodium

NaCl : Chlorure de sodium

$NaHCO_3$: Hydrogénocarbonate de sodium

Nm : nanomètres

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OP : ortho-phényle-diamine dihydrochloride

PAGE : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

PM : Poids moléculaires

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

TEMED : N'N'N'-tétraméthyl éthylène diamine

Tris : Trishydroxyméthylaminométhane

UV : ultra-violet

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Incidence mondiale des piqûres de scorpion 4
Figure 2 : Espèce *Androctonus mauretanicus* (Am) 5
Figure 3 : Zone de répartition de *l'Androctonus mauretanicus* (Am) (Lourenço et coll., 2009) 5
Figure 4 : Espèce de scorpion de *Buthus occitanus* (Bo) 6
Figure 5 : Zone de répartition de *Buthus occitanus* (Bo) au niveau du Maroc 6
Figure 6 : Anatomie externe du scorpion *(www.terrario-centre.forumsactifs.com)* 7
Figure 7 : Mode d'action du venin de scorpion (Martin-Eauclaire et coll., 1995) 8
Figure 8 : Collecte du venin par stimulation manuelle (Fig. 1A) et électrique (Fig. 1B) 11
Figure 9 : structure du bleu de Coomassie (M.A. Rauf et coll., 2004) 12
Figure 10 : les deux voies d'injections : Voie intraveineuse (A), Voie intrapéritonéale (B). 16
Figure 11 : Schéma du principe du test Elisa double Sandwich 20
Figure 12 : Concentration en protéines des venins *Androctonus mauretanicus* (Am) et *Buthus occitanus (Bo)* calculée par la méthode Bradford 24
Figure 13 : Chromatogramme du venin de scorpion *Androctonus mauretanicus (Am)* obtenu par la filtration moléculaire de venin 25
Figure 14 : Chromatogramme du venin de scorpion *Buthus occitanus (Bo)* obtenu par la filtration moléculaire de venin 26
Figure 15 : Profil électrophorétique verticale du venin Am et Bo sur le gel de polyacrylamide en présence de SDS. 27
Figure 16 : courbe de la détermination de la DL_{50} de venin *l'Androctonus mauretanicus* (Am) par deux voies d'injection intraveineuse (IV) et intrapéritonéale (IP) par le Logiciel Graph PadPrism 4 28
Figure 17 : courbe de la détermination de la DL_{50} de venin *Buthus occitanus* (Bo) par deux voies d'injection intraveineuse (IV) et intrapéritonéale (IP) par le Logiciel Graph PadPrism 4. 29
Figure 18 : Profil chromatographique d'affinité des fragments $F(ab')_2$ anti-venin *Androctonus mauretanicus* (Am) produits chez les chevaux 30
Figure 19 : Profil chromatographique d'affinité des fragments $F(ab')_2$ anti-venin *Buthus occitanus* (Bo) produits chez le chevaux 31
Figure 20 : Profil chromatographique d'affinité des anticorps anti-venin *Androctonus mauretanicus* (Am) produits chez les lapins. 31
Figure 21 : Profil chromatographique d'affinité des anticorps anti-venin *Buthus occitanus* produits chez les lapins. 32
Figure 22 : Résultat ELISA déterminé par le logiciel GraphPad Prism : Courbe étalon de la gamme du venin *Androctonus mauretanicus (Am)* 33
Figure 23 : Résultat ELISA déterminée par le logiciel GraphPad Prism : Courbe étalon de la gamme du venin *Buthus occitanus* (Bo) 34
Figure 24 : Courbe d'étalonnage de BSA (DO. 595 nm) 40

Figure 25 : Calcul de la DL_{50} par deux voies d'injection intraveineuse (IV) et intrapéritonéale (IP) du scorpion *Androctones mauretanicus* (Am) par le Logiciel Graph PadPrism 4 44
Figure 26 : Calcul de la DL_{50} par deux voies d'injection intraveineuse (IV) et intrapéritonéale (IP) du scorpion *Buthus occitanus* (Am) par le Logiciel Graph PadPrism 4 44
Figure 27 : Courbe étalon du la gamme d'essai (1) 45
Figure 28 : Courbe étalon du la gamme d'essai (2) 45
Figure 29 : Courbe étalon du la gamme d'essai (3) 45
Figure 30 : Courbe étalon du la gamme d'essai (4) 45
Figure 31 : Courbe étalon du la gamme d'essai (5) 46
Figure 32 : Courbe étalon du la gamme d'essai (6) 46
Figure 33 : Courbe étalon du la gamme d'essai (7) 46
Figure 34 : Courbe étalon du la gamme d'essai (8) 46
Figure 35 : Courbe étalon du la gamme d'essai (1) 47
Figure 36 : Courbe étalon du la gamme d'essai (2) 47
Figure 37 : Courbe étalon du la gamme d'essai (3) 47
Figure 38 : Courbe étalon du la gamme d'essai (4) 47
Figure 39 : Courbe étalon du la gamme d'essai (5) 48
Figure 40 : Courbe étalon du la gamme d'essai (6) 48
Figure 41 : Courbe étalon du la gamme d'essai (7) 48
Figure 42 : Courbe étalon du la gamme d'essai (8) 48
Figure 43 : Courbe étalon du la gamme d'essai (9) 49

LISTE DES TABLES

Tableau 1 : Symptomalogie de l'envenimation scorpionique 9
Tableau 2 : Préparation de la courbe étalon BSA 13
Tableau 3 : Composition des gels d'électrophorèses (Gel de migration et Gel de concentration) 15
Tableau 4 : Protocole de détermination de la DL_{50} de venin *Androctonus mauretanicus (Am)* par deux voies d'injection intraveineuse (IV) et intrapéritonéale (IP). 16
Tableau 5 : Protocole de détermination de la DL_{50} de venin *Buthus occitanus* (Bo) par deux voies d'injection intraveineuse (IV) et intrapéritonéale (IP). 17
Tableau 6 : Différents essais du test ELISA Double Sandwich pour le venin du scorpion l'*Androctonus mauretanicus* (Am) 21
Tableau 7 : Différents essais du test ELISA Double Sandwich pour le venin du scorpion *Buthus occitanus* (Bo) 21
Tableau 8 : Estimation par la méthode de Bradford du venin des deux espèces Am et Bo 24
Tableau 9 : Rendement de la filtration moléculaire du venin de scorpion *Androctonus mauretanicus (Am)* 25
Tableau 10 : Rendement de la filtration moléculaire du venin de scorpion *Buthus occitanus* (Bo) 26
Tableau 11 : Détermination de la DL_{50} de venin *Androctonus mauretanicus* (Am) par deux voies (IV) et (IP). 28
Tableau 12 : Détermination de la DL_{50} de venin *Buthus occitanus* (Bo) par deux voies (IV) et (IP). 28
Tableau 13 : Calcul de la DL_{50} par deux voies d'injection intraveineuse (IV) et intrapéritonéale (IP) par le Logiciel Graph PadPrism 4 29
Tableau 14 : le pourcentage de fixations des anti-venins (F(ab')2 Anti-Am, F(ab')2 Anti-Bo, Anti-Bo (IgG), Anti-Am (IgG) 32
Tableau 15 : Limites de détection et de quantification de venins de scorpions *Androctonus mauretanicus (Am)* 33
Tableau 16 : Limites de détection et de quantification de venin de scorpion *Buthus occitanus* (Bo) 34
Tableau 17 : Les densités optiques de la gamme étalon de BSA (2-12µg) à 595 nm 40
Tableau 18 : Différentes DO obtenues dans la chromatographie de gel de filtration du venin *Androctonus muretanicus* (Am) 41
Tableau 19 : Différentes DO obtenues dans la chromatographie de gel de filtration du venin *Buthus occitanus* (Bo) 41
Figure 20 : Différentes DO obtenues dans la chromatographique d'affinité des fragments F(ab')2 anti-venin *Androctonus mauretanicus* produits chez les chevaux 42
Figure 21 : Différentes DO obtenues dans la chromatographique d'affinité des fragments F(ab')2 anti-venin *Buthus occitanus* produits chez les chevaux. 42

Tableau 22 : Différentes DO obtenues dans la chromatographique d'affinité des anticorps anti-venin *Androctonus mauretanicus* produits chez les lapins. 42
Figure 23 : Différentes DO obtenues dans la chromatographique d'affinité des anticorps anti-venin *Buthus occitanus* produits chez le lapin 43

Sommaire

LISTE DES ABREVIATIONS
LISTE DES TABLES
LISTE DES FIGURES
INTRODUCTION GENERALE 1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE 3
I. Scorpions 4
I-1. Généralités 4
I-2. Répartition de scorpions 4
I-2-1. Répartition des scorpions dans le Monde 4
I-2-2. Répartition des scorpions en Afrique et au Maroc 4
I-3. Anatomie externe des scorpions 6
I-4. Épidémiologie de l'envenimation scorpionique 7
I-4-1. Épidémiologie de l'envenimation scorpionique dans le Monde 7
I-4-2. Épidémiologie de l'envenimation scorpionique au Maroc 7
II. Composition du venin du scorpion 7
III. Mode d'action du venin de scorpion 8
IV. Symptomatologie et grades cliniques de l'envenimation scorpionique 9
V. Traitements 9
V-1. Traitements symptomatiques 9
V-2. Traitements spécifiques : L'immunothérapie antiscorpionique 9
MATERIELS & METHODES 10
PARTIE 1 : Caractérisation biochimique et toxique des venins de scorpions Androctonus mauretanicus (Am) et Buthus occitanus (Bo) 11
I. Matériel biologique 11
I-1. Venins 11
I-2. Anti-venins 11
II. Méthodes 11
II-1. Dosage des protéines 11
II-1-1. Estimation à 280 nm 11
II-1-2. Méthode Bradford 12
II-1-2-a. Principe de la méthode 12
II-1-2-b. Tampons, solutions et réactifs 12

II-1-2-c. Protocole expérimental 12
II-2. Fractionnement du venin de scorpion *Am* et *Bo* par chromatographie gel de filtration ... 13
II-2-1. Principe 13
II-2-2. Tampons, solutions et réactifs utilisés 13
II-2-3. Équipement 13
II-2-4. Protocole expérimental 13
II-3. Lyophilisation 13
II-3-1. Principe 13
II-3-2. Protocole expérimental 14
II-4. Analyse élecrophorétique des venins de scorpions *Am* et *Bo* et les fractions purifiées 14
II-4-1. Principe 14
II-4-2. Tampons, solutions et réactifs utilisés 14
II-4-3. Matériel 14
II-4-4. Protocole expérimental 15
II-4-4-a. Précipitation des protéines par l'acétone 15
II-4-4-b. Préparation du gel 15
II-5. Etude de la toxicité du venin de scorpion *Androctonus mauretanicus* (Am) et *Buthus occitanus*(Bo) 16
II-5-1. Principe 16
II-5-2. Protocole expérimental 16
PARTIE 2 : Mise au point d'un Test ELISA bispécifique pour le dosage du venin des scorpions Androctonus mauretanicus et Buthus occitanus chez les patients envenimés 18
I. Production des anticorps polyclonaux anti-venins de scorpions Am et Bo chez les chevaux et chez les lapins. 18
II. Purification des différents anti-venins de scorpions Am et Bo par la chromatographie d'affinité 18
II-1. Principe 18
II-2. Tampons, solutions et réactifs utilisés 18
II-3.Équipement 18
II-4. Dosage de la concentration en protéines des venins de scorpions Am, Bo et les différents anticorps des lapins (IgG) et chevaux (Fab'2) 18
II-5. Préparation de la colonne d'immunoaffinité 19
II-6. Protocole de purification 19
III- Mise au point de la méthode ELISA « double Sandwich » : Détermination des conditions optimales 19
III-1. Principe 19
III-2. Tampons, solutions et réactifs utilisés 20
III-3.Équipement 20
III-4. Protocole expérimental 20
III-5. Evaluation de la sensibilité du test ELISA 22
RESULTATS & DISCUSSION 23

PARTIE 1 : Caractérisation biochimique et toxique des venins de scorpions Androctonus mauretanicus (Am) et Buthus occitanus (Bo) 24
I. Concentration des protéines du venin des scorpions Am et Bo 24
II. Fractionnement du venin des scorpions *Androctonus muretanicus* et *Buthus occitanus* par chromatographie gel de filtration 25
III. Analyse élecrophorétique des venins de scorpions Am et Bo et les fractions purifiées 27
IV. Etude de la toxicité du venin de scorpion Am et Bo 27
PARTIE 2 : Mise au point d'un Test ELISA bispécifique pour le dosage du venin des scorpions Androctonus mauretanicus et Buthus occitanus chez les patients envenimés 30
I. Purification des différents anti-venins de scorpions *Androctonus mauretanicus* et *Buthus occitanus* par chromatographie d'affinité 30
II. Mise au point de la méthode ELISA « double Sandwich » : détermination des conditions optimales 32
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 36
Annexes 40

INTRODUCTION GENERALE

Les envenimations scorpioniques constituent par leur gravité un problème majeur de santé publique avec une incidence mondiale dépassant 1,2 millions et approximativement 3250 décès par an (Chippaux et coll., 2008 ; Lourenço et coll., 2015). C'est principalement les pays des zones tropicales et intertropicales qui supportent le fardeau de cette pathologie accidentelle. Les mortalités par piqûre de scorpions sont, même, plus importantes que celle dues aux morsures de serpents

Au Maroc, comme dans beaucoup de pays chauds, les envenimations scorpioniques constituent un accident à la fois fréquent et grave pendant la saison estivale et représente un vrai problème de santé publique par sa fréquence (Oukkache et coll., 2013 et 2015). Selon les données épidémiologiques du Centre Antipoison du Maroc (CAPM) elles sont la première cause d'intoxication avec un pourcentage allant jusqu'à 50 % (Soulaymani R, et coll., 2005). Les régions les plus touchées par ce fléau sont : El Kelaa des Sraghna, Marrakech, El jadida, Azilal et aussi la région de Fès-Boulmane avec une incidence de 0,27 ‰ et une létalité de 0,018 ‰.

Les espèces majeures et les plus dangereuses au Maroc sont le scorpion noir *Androctonus mauretanicus* (Am) et le scorpion jaune *Buthus occitanus* (Bo). Ils sont responsables de la majorité des piqûres.

La petite quantité de venin inoculée par ces deux espèces lors de la piqûre peut provoquer de nombreux symptômes au cours de l'envenimation qui résultent essentiellement de la dysfonction cardiaque, avec un œdème pulmonaire et/ou un état de choc qui, en dehors d'une prise en charge précoce et adéquate, peut causer la mort (Oukkache et coll., 2013 ; Soulaymani R et coll.2005 ; Ghalim et coll., 2000).

Le seul traitement spécifique est une immunothérapie passive efficace et adaptée à la gravité de l'envenimation. Ainsi, le dosage préalable et la caractérisation des toxines circulantes chez les patients envenimés faciliteraient le développement d'antivenins ciblés.

Notre étude a, donc, pour objectif la caractérisation biochimique et l'étude de la toxicité des deux venins des scorpions les plus dangereux au Maroc l'*Androctonus mauretanicus* (Am) et le *Buthus occitanus* (Bo).

Dans un premier temps nous avons fait une étude toxicologique du venin des deux espèces Am et Bo. Une étude biochimique des deux venins a été, également, menée par l'électrophorèse afin de déterminer les toxines responsables de la fatalité des morsures par les deux scorpions.

Vu que la sévérité de l'envenimation scorpionique et la quantité du venin inoculé sont étroitement liées, le but de la deuxième partie de notre travail était la mise au point d'un test ELISA bispécifique. Ce test permet de doser le venin des scorpions Am et Bo dans le sang des personnes envenimées et donc oriente vers une meilleure prise en charge, par immunothérapie, des patients.

Ce manuscrit est divisé en trois parties décrivant les travaux effectués :

- une partie théorique qui consiste en une revue bibliographique sur les scorpions, les neurotoxines existant dans le venin et leur action sur l'organisme.
- et une partie expérimentale consacrée au travail expérimental réalisé sur les venins des scorpions, Am et Bo (étude toxicologique et biochimique), ainsi qu'à la description de la mise au point du test ELISA (caractérisation et dosage du venin dans le sang)
- Enfin la discussion des résultats obtenus est rapportée dans la dernière partie.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Scorpions

I-1. Généralités

Les scorpions présentent encore la particularité de figurer au nombre des animaux terrestres les plus anciennement connus (500 millions d'années), leur forme a très peu évolué depuis leur faune terrestre. Ils sont l'exemple-type des animaux dits « panchronique » (Legros et coll., 1997 ; Hutt et coll., 1998).

Les scorpions sont des animaux nocturnes. Ils s'éveillent au crépuscule et connaissent leur maximum d'activité entre 21h et 24h. De nature craintif, inoffensifs et peu agressifs, ils ne piquent que lorsqu'ils se sentent menacés. Ils ont une marche très lente et vont tout droit en tâtonnant. Actifs au printemps et en été, ils entrent en hibernation dès le début de l'automne.

I-2. Répartition de scorpions

I-2-1. Répartition des scorpions dans le Monde

A l'échelle mondiale, l'incidence de l'envenimation scorpionique est essentiellement limitée à quatre régions fortement endémiques : Amérique du Sud à l'Est des Andes, Mexique, Afrique du nord, Proche et Moyen-Orient **(Figure 1),** (Chippaux et coll., 2008).

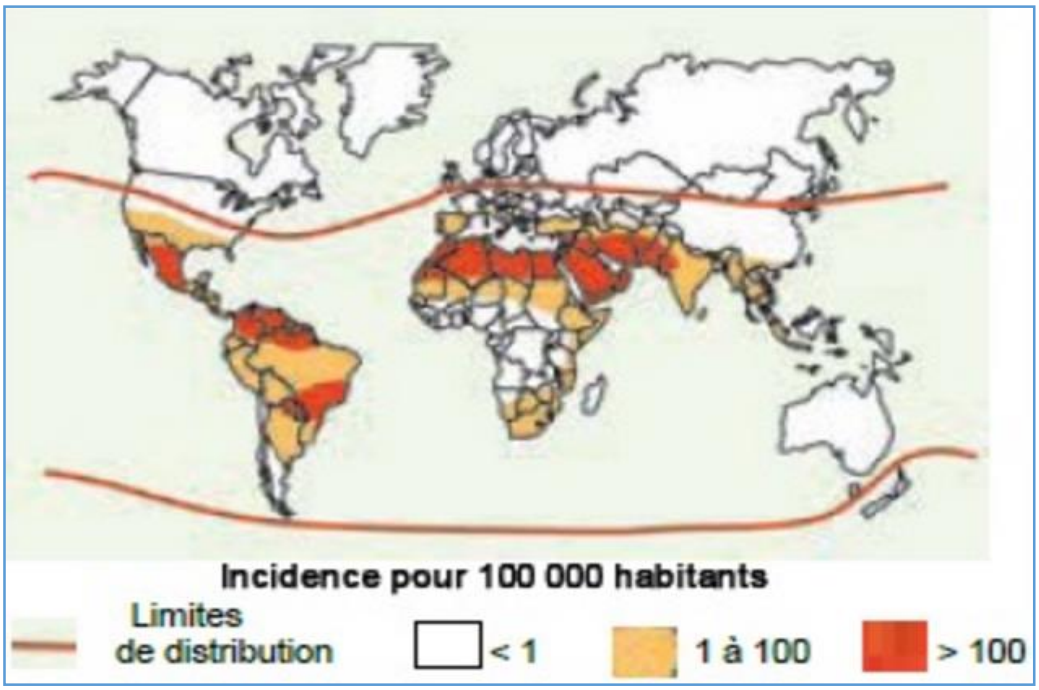

Figure 1 : Incidence mondiale des piqûres de scorpion

I-2-2. Répartition des scorpions en Afrique et au Maroc

Au niveau de l'Afrique, la famille des Buthidés est représentée par quatre genres de scorpions : *Androctonus*, *Leiurus*, *Hottenta*, *Buthus*et *Parabuthus*. Le genre *Androctonus* comprend plusieurs espèces de scorpions dangereuses qui couvrent un vaste territoire du Maroc à l'ouest de la péninsule arabique (Ozkan et coll., 2006 ; Lourenço et coll., 2009).

En Afrique du Nord, il faut distinguer le secteur Marocain du secteur Algérien et Tunisien. L'espèce de scorpion la plus dangereuse en Algérie et en Tunisie est l'*Androctonus australi.*

Au Maroc le scorpion noir *Androctonus mauretanicus* est l'espèce la plus redoutable et la plus répondue.

Une classification a été établie par M. Vachon en 1952 : 3 familles, 7 genres et 27 espèces et sous-espèces de scorpions ont été identifiés au Maroc :

❖ Les Espèces de scorpions noires

- *Androctonus mauretanicus* : C'est une espèce de grande taille, pouvant atteindre au stade adulte 9 cm, espèce endémique de l'atlas marocain de teinte uniforme sombre, brun foncé à noir **(figure 2)**, vivant dans la plaine du Haouz, le plateau d'Ouarzazate, et le Haut Atlas (**figure 3).**

Figure 2 : Espèce *Androctonus mauretanicus* (Am)

Figure 3 : Zone de répartition de *l'Androctonus mauretanicus* (Am) (Lourenço et coll., 2009)

- *Androctonus aeneas*
- *Buthus frantzwerneri gentilini*

❖ Les Espèces de scorpions jaunes

- *Buthus occitanus* : Il a une taille de 8 cm, avec une couleur uniformément jaune paille a brun foncé avec tout au plus quelques bandes colorés sur l'abdomen et sur le dernier anneau de la queue **(figure 4)**. Il se rencontre dans les régions de culture d'oliviers, et occupe aussi bien les plaines que les montagnes (Rif et Atlas) **(figure 5)**.

Figure 4 : Espèce de scorpion de *Buthus occitanus* (Bo)

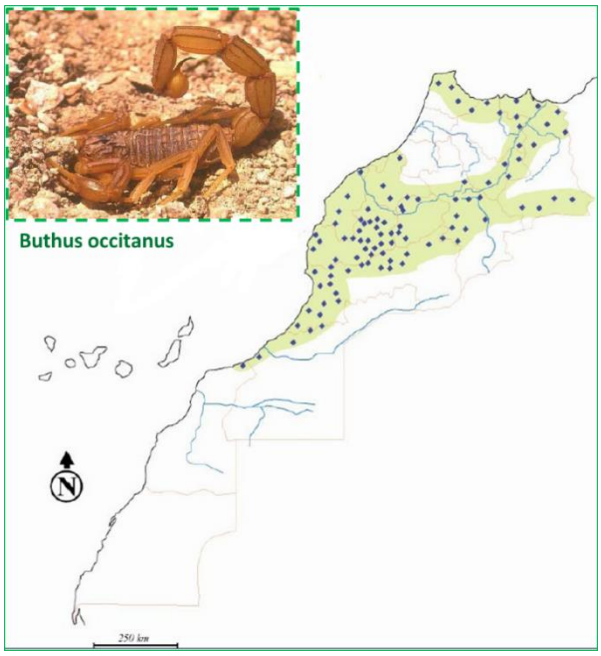

Figure 5 : Zone de répartition de *Buthus occitanus* (Bo) au niveau du Maroc
(www.institut-numerique.org/2-repartition-des-scorpions-au-maroc)

- *Scorpio maurus*
- *Buthus atlantis*

I-3. Anatomie externe des scorpions

Le corps du scorpion est composé de trois parties : Prosoma ou céphalothorax, Mesosoma et Métasoma.

Le dernier segment du Métasoma portant le telson qui renferme la vésicule à venin, pourvue d'un canal excréteur situé à l'intérieur d'un aiguillon, s'abouchant à un orifice sub-terminal où s'évacue le contenu physiologique : le venin. **(Figure 6)**

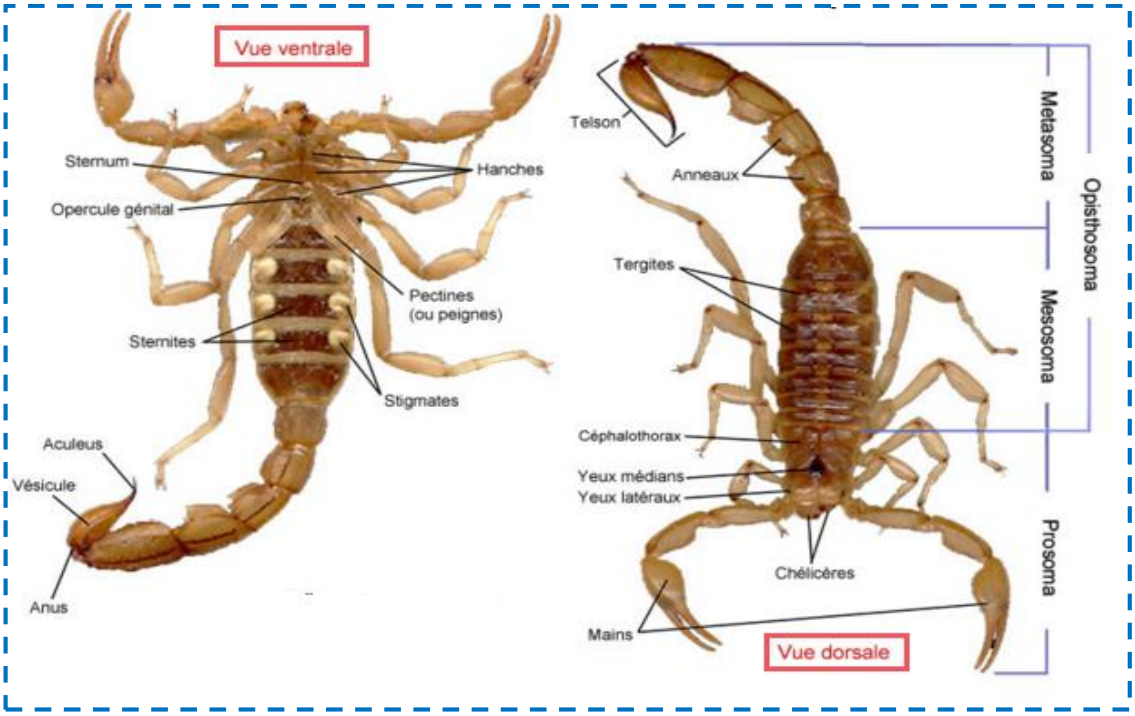

Figure 6 : Anatomie externe du scorpion *(www.terrario-centre.forumsactifs.com)*

I-4. Épidémiologie de l'envenimation scorpionique

I-4-1. Épidémiologie de l'envenimation scorpionique dans le Monde

L'épidémiologie du scorpionisme à travers le monde est mal connue. Il existe des variations géographiques considérables à la fois au niveau de l'incidence et de la gravité. Le nombre de piqûres de scorpions enregistré annuellement est de 1,5 million avec 2600 décès (Chippaux. JP, 2012).

I-4-2. Épidémiologie de l'envenimation scorpionique au Maroc

Au Maroc, le scorpionisme représente un véritable problème de santé publique avec une incidence annuelle d'environ 50 piqûres pour 100.000 habitants (Soulaymani. R et coll., 2002 ; 2003) et une mortalité de 0,27 pour 100.000 habitants. Les régions occupant le centre-sud du Maroc sont les plus touchées par cette problématique, principalement les régions de Marrakech-Tensift-Al Haouz, Doukkala-Abda, Chaouia-Ouardigha, Tadla-Azilal et une grande partie du Souss-Massa-Draa (Tamim. OK et coll, 2014).

La majorité des piqûres de scorpions surviennent à domicile (77 %) et pendant la nuit (67 %). Toutes les tranches d'âges sont touchées par cette problématique, mais les enfants de moins de 15 ans sont les plus exposés aux accidents mortels dans 90 % des cas (Soulaymani. R et coll, 2002).

Les espèces *Androctonus mauritanicus* (Am) et *Buthus occitanus* (Bo) sont les plus dangereuses au Maroc et sont responsables de la grande majorité d'accidents d'envenimement avec 83 % pour Am et 14 % pour Bo (Ghalim et coll, 2000).

II. Composition du venin du scorpion

Les envenimations par piqûres de scorpions sont caractérisées par l'inoculation du venin. Ce dernier peut être obtenu soit par macération du telson, soit par stimulation manuelle ou électrique de l'animal. Il se présente comme un liquide clair, opalescent, visqueux, thermostable et résistant à la déshydratation (Inceoglu et coll., 2003 ; Kawachi et coll., 2013 ; Ortiz et coll., 2015).

Des travaux scientifiques ont montré que le venin de scorpion est de composition variable contenant des molécules très différentes telles que des enzymes (phospholipases et hyaluronidases), des mucopolysaccharides, des neurotransmetteurs, de l'histamine et essentiellement des neurotoxines.

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 :

- Les toxines actives sur le canal sodium (Na^+)
- Les toxines actives sur le canal potassium (K^+)
- Les toxines actives sur le canal chlore (Cl^-)
- Les toxines actives sur le canal calcium (Ca^{2+})

III. Mode d'action du venin de scorpion

Les toxines longues agissant sur les canaux Sodium des cellules excitables sont responsables des symptômes de l'envenimation, elles augmentent la perméabilité de la membrane en Na+ entraînant sa dépolarisation intense et une prolongation du potentiel d'action, d'où une modification de la conformation des canaux Ca^{2+} provoquant une augmentation de sa concentration cytoplasmique suivie d'une libération du contenu de vésicules synaptiques dans la fente synaptique par exocytose **(figure 7)**.

De ce fait, les neurotoxines présentes dans le venin sont un puissant activateur du système nerveux autonome engendrant une libération massive des neurotransmetteurs issus des terminaisons nerveuses sympathiques et parasympathiques et des glandes surrénales. Cette décharge est la principale responsable des effets physiopathologiques du venin dont le résultat est une défaillance multi-viscérale des organes, incluant une insuffisance cardiorespiratoire associée à une défaillance neurologique (Martin-Eauclaire et coll., 1995 ; Clot-Faybesse et coll., 1999).

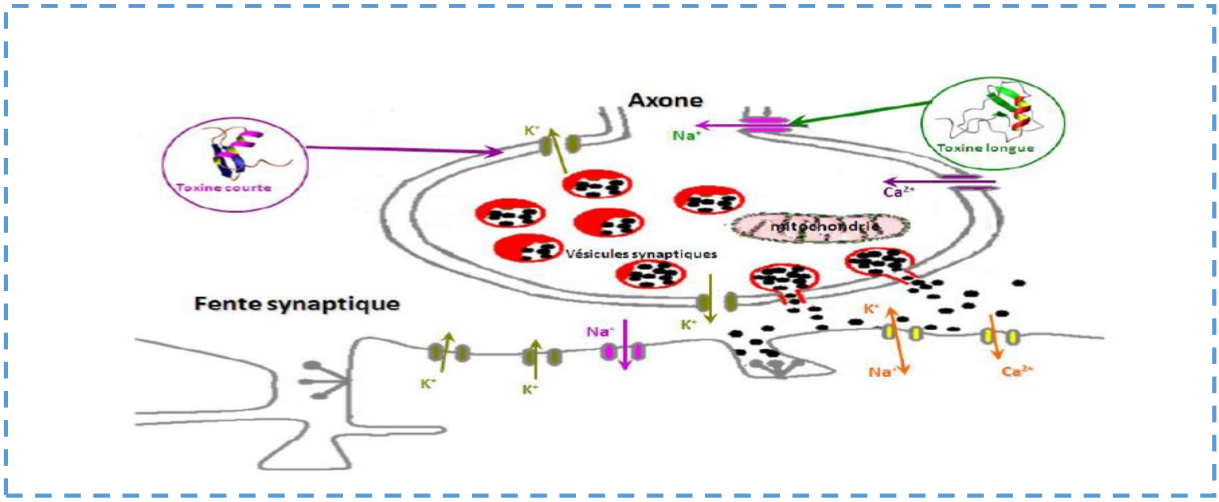

Figure 7 : Mode d'action du venin de scorpion (Martin-Eauclaire et coll., 1995)

IV. Symptomatologie et grades cliniques de l'envenimation scorpionique

Lors d'une piqûre, une très petite quantité de venin est inoculée. Cependant, elle est responsable de l'apparition de signes divers à cause de ses différents composants. Ces Symptômes observés lors d'une envenimation peuvent être classés en quatre grades en fonction de la classification d'Abroug (Abroug et coll., 1994) **(Tableau 1)** :

Tableau 1 : Symptomalogie de l'envenimation scorpionique

Grades	Signes cliniques	Effets
0	Locaux	Douleur, rougeur, prurit au site de la piqûre ou du membre intéressé
1	Fonctionnels sans gravité	Sensation du malaise, douleur diffuse, agitation, sueurs, vomissements, diarrhées, sialorrhées, encombrement bronchique
2	Annonciateurs de gravité	Trouble du rythme cardiaque, trouble de conduction, hypotension, confusion, obnubilation, cyanose, dyspnée, hypertonie, convulsion
3	Défaillance vitale	Coma, état de choc, détresse respiratoire

V. Traitements

La sévérité des symptômes et la mortalité notamment chez l'enfant, font qu'une envenimation scorpionique est une urgence médicale qui nécessite des traitements spécifiques et symptomatiques appropriés et précoces :

V-1. Traitements symptomatiques

Les traitements symptomatiques consistent en l'administration de médicaments tels que des antalgiques pour calmer la douleur, de vasodilatateurs, d'antihistaminiques ou d'anticholinergiques et d'antipyrétiques (Gueron M et coll., 1993 ; Ismail M et coll., 1994).

V-2. Traitements spécifiques : L'immunothérapie antiscorpionique

L'immunothérapie, bien que controversée, est actuellement le seul traitement spécifique (Krifi MN et coll, 1999 ; Ghalim N et coll, 2000 ; Hammoudi-Triki D et coll, 2004), elle correspond à des fragments F(ab')2 ou Fab d'immunoglobulines spécifiques pour la neutralisation des toxines circulantes du venin (Martin-Euclaire et coll, 2006; Oukkache N et coll., 2008).

MATERIELS & METHODES

PARTIE 1 : Caractérisation biochimique et toxique des venins de scorpions *Androctonus mauretanicus* (Am) et *Buthus occitanus* (Bo)

I. Matériel biologique

I-1. Venins

Le venin des scorpions Am et Bo est obtenu par stimulation manuelle ou électrique (Oukkache N et coll., 2013 ; Ozkan et coll., 2004) du post abdomen de l'animal gardé en captivité dans le scorpionarium de l'unité animalière de l'Institut Pasteur du Maroc **(figure 8)**. Le venin collecté est centrifugé à 10 000 tr/min pour éliminer les débris puis lyophilisé et stocké à -20°C jusqu'à utilisation.

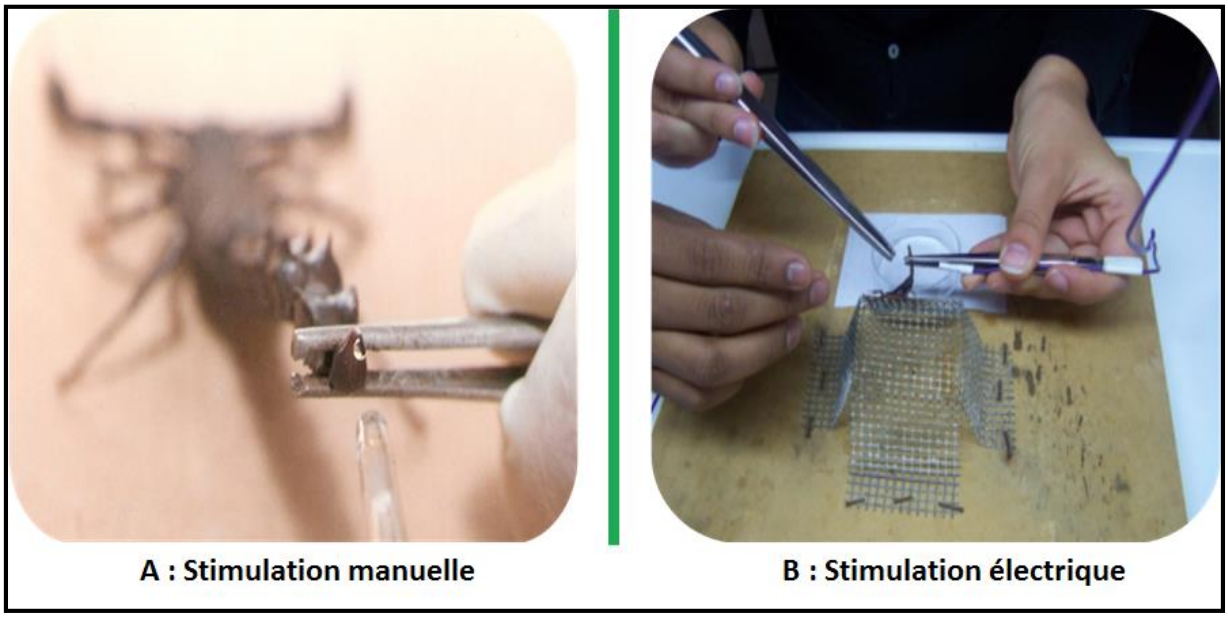

Figure 8 : Collecte du venin par stimulation manuelle (Fig. 1A) et électrique (Fig. 1B)

I-2. Anti-venins

Les anti-venins que nous avons utilisés dans notre étude sont :

- Anti-venin polyvalent anti-Am et anti-Bo produits chez les chevaux : $F(ab')_2$
- Anti-venin monospécifique anti-Am produits chez les lapins (IgG)
- Anti-venin monospécifique anti-Bo produits chez les lapins (IgG)

II. Méthodes

II-1. Dosage des protéines

II-1-1. Estimation à 280 nm

La longueur d'onde 280 nm est une densité optique à laquelle absorbent les acides aminées aromatiques tels que les tyrosines, phénylalanines et tryptophanes.

Cette estimation a été effectuée par le spectrophotomètre UV/Visible (Jenway, Série 67 Modèle 6715), avec des cuves en quartz de trajet optique de 1 cm. Nous avons évalué la concentration en protéines selon l'expression suivante :

$D.O_{280nm}$ = 1 correspond à une concentration en protéines de 1 mg/ml (Stoscheck, C.M., 1990).

II-1-2. Méthode Bradford

II-1-2-a. Principe de la méthode

La méthode de Bradford, a initialement été décrite par Dr. Marion Bradford en 1976. C'est une technique qui permet de quantifier les protéines contenues dans un mélange. Son principe repose sur la fixation du colorant bleu de Coomassie G-250 « réactif Bradford » sur les résidus arginine, tryptophane, tyrosine, histidine, et phénylalanine **(Figure 9).**

Les différents dosages de protéines ont été réalisés avec le réactif Bradford commercial « *Dye Assay (Bradford Reagent, Biotechnology*)»

Ce test quantitatif a été réalisé à l'aide d'une gamme étalon de BSA (*Bovin Serum Albumin*) à des concentrations croissantes entre (0-15µg/ml) permettant d'avoir la courbe d'étalonnage.

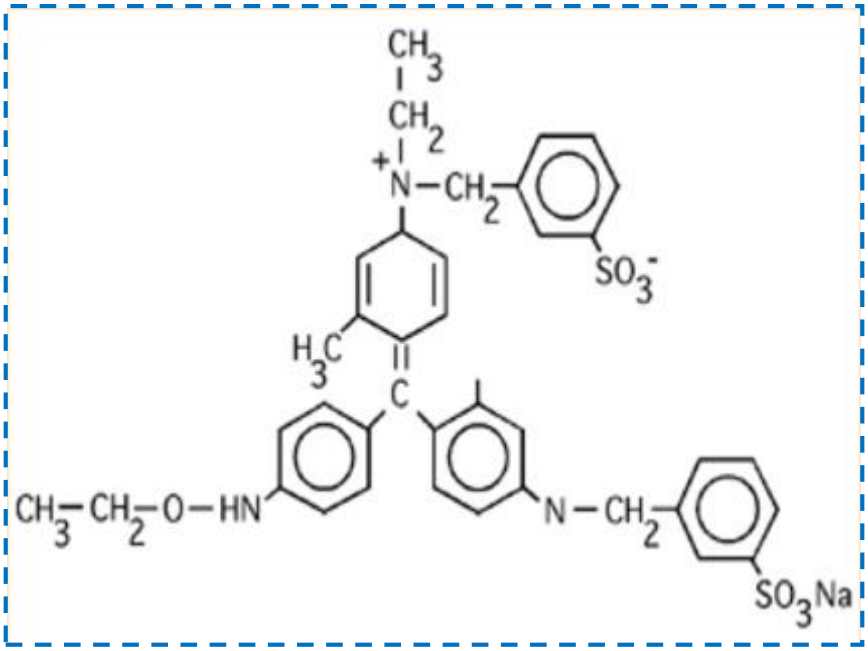

Figure 9 : structure du bleu de Coomassie (M.A. Rauf et coll., 2004)

II-1-2-b. Tampons, solutions et réactifs

Nous avons utilisé :

* BSA (albumine de sérum bovin) à une concentration de 0,1 mg/ml

* Réactif Bradford commercial « *Dye Assay* (*Bradford Reagent, Biotechnology*) »

II-1-2-c. Protocole expérimental

- Nous avons préparé une gamme étalon de BSA à des concentrations allant de 0 à 12µg **(Tableau 2)**.

- Des solutions de venin à différentes dilutions, ont été préparées dans des tubes de 5 ml. Le volume final des échantillons était de 800 µl.
- 200 µl du Bradford sont ajoutés dans chaque tube (gamme BSA et venins à doser).
- Les mélanges ont été incubés à température ambiante pendant 5 minutes.
- Nous avons mesuré l'absorbance à 595 nm dans des cuves en verre par Spectrophotomètre (Jenway, Série 67 Modèle 6715).

Tableau 2 : Préparation de la courbe étalon BSA

BSA (µg)	0	2	4	6	8	10	12
BSA (µl)	0	20	40	60	80	100	120
Eau distillé (µl)	800	780	760	740	720	700	680
Bradford (µl)	200						

II-2. Fractionnement du venin de scorpion *Am* et *Bo* par chromatographie gel de filtration

II-2-1. Principe

La filtration sur gel ou chromatographie d'exclusion permet la séparation des molécules à analyser selon leur masse moléculaire. En utilisant un gel de Dextran sous forme de perle (Sephadex), les molécules au-dessus de la limite d'exclusion du gel ne peuvent pas pénétrer dans les grains du gel et sont éluées les premières. Les molécules les plus petites, par contre, pénètrent plus ou moins profondément suivant leur dimension et leur forme. Elles sont donc éluées du gel de Sephadex dans l'ordre de leur masse moléculaire décroissante (Oukkache et coll., 2008, Chgoury F et coll., 2015).

II-2-2. Tampons, solutions et réactifs utilisés

* Gel Séphadex G-50 médium (Sigma) (billes de 50 à 150 µ de diamètre, limite d'exclusion 1500 à 30 000 daltons) : il constitue la phase stationnaire de la chromatographie de filtration sur gel.

* Tampon d'élution (phase mobile de la chromatographie en filtration sur gel) : acétate d'ammonium 0,1 M (SIGMA-ALDRICH).

II-2-3. Équipement

La chaine à basse pression AKTA Prime est composée d'une colonne en verre (1,6 x 100 cm), d'une pompe péristaltique (débit 1 ml/min), d'un détecteur de densité optique (longueur d'onde à 280 nm), d'un collecteur de fractions réglé (volume/min), d'un enregistreur de profils chromatographiques ou chromatogrammes (Muni d'un logiciel d'analyse UNICORNS 5,1).

II-2-4. Protocole expérimental

20 grammes du gel sont gonflées dans un excès d'eau distillée (500 ml) pendant une nuit, puis filtrés sur verre fritté et dégazés avant d'être transférés dans la colonne en verre pour s'entasser, puis lavés et équilibrés avec le tampon d'élution (Acétate d'ammonium 0,1 M). Une fois la ligne de base rectiligne est atteinte, une quantité de protéines du venin est déposée délicatement au sommet du gel (préalablement équilibré) à travers une boucle d'injection (de 2 ml). Par la

suite, des fractions de 3 ml sont collectées d'une manière parallèle à leur profil chromatographique détecté au niveau de l'enregistreur.

La densité optique des différentes fractions est mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 280 nm. Les tubes correspondants à une fraction (ou pic) ont été fusionnés, lyophilisés afin de déterminer les quantités en protéines.

II-3. Lyophilisation

II-3-1. Principe

La lyophilisation est une sublimation qui permet de transformer l'eau de la solution dans laquelle se trouve l'échantillon, préalablement congelé, de l'état solide à l'état vapeur.

II-3-2. Protocole expérimental

La lyophilisation se fait en deux étapes :

1. Les échantillons sont congelés à une température de -20°C pendant deux jours dans des flacons adaptés à la lyophilisation.
2. Les échantillons sont soumis à la lyophilisation jusqu'à élimination complète du solvant en passant par les étapes de dessiccations primaire et secondaire (Lyophilisateur Christ, Scomédica).

II-4. Analyse élecrophorétique des venins de scorpions *Am* et *Bo* et les fractions purifiées

II-4-1. Principe

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de Dodecyl Sulfate de Sodium (SDS-PAGE) est une méthode générale permettant la séparation des constituants d'un mélange protéique sous l'action d'un champ électrique. La séparation des protéines s'effectue par électrophorèse verticale sur gel de polyacrylamide en présence de Dodecyl sulfate de sodium (SDS = $C_{12}H_{25}NaO_4S$) qui rend la charge globale des protéines négative. Ainsi, les protéines sont séparées uniquement selon leur masse moléculaire. La détermination du poids moléculaires (PM) se fait à l'aide des marqueurs de poids moléculaire.

Le gel d'électrophorèse est composé en deux gels superposés :

- Un **gel de concentration** (*Stacking gel*), c'est la partie supérieure du gel, qui est généralement à 5-4 % d'acrylamide avec un pH se situant vers 6,5.
- Un **gel de migration** (*Running gel*) c'est le gel où va s'effectuer la séparation des molécules en fonction du PM. Son pH se situe vers 8,7 et sa concentration en acrylamide est de l'ordre de 6 à 20 %, en fonction de la taille des protéines à analyser.

II-4-2. Tampons, solutions et réactifs utilisés

* La solution d'acrylamide- bis acrylamide à 30%
* *Lower Buffer* : solution composée de Tris-HCl 1,5M (pH 8,8), le SDS ($C_{12}H_{25}NaO_4S$) 10 %.
* *Upper Buffer* : solution composée de Tris-HCl 1M (pH 6,8), le SDS ($C_{12}H_{25}NaO_4S$) 10%.
* Dodecyl Sulfate de Sodium (SDS) ($C_{12}H_{25}NaO_4S$) à 10 %.
* Le persulfate d'ammonium (APS) à 10%.
* N'N'N'-tétraméthyl éthylène diamine (TEMED).

* Tampon échantillon : Tris ($C_4H_{11}NO_3$)50 mM à pH 6,8, β-mercaptoéthanole (C_2H_6OS) 5%, SDS ($C_{12}H_{25}NaO_4S$) 25%, glycérol ($C_3H_8O_3$) 10%, bleu de bromophénole 0,02%.
* Solution de coloration (ou révélation) : 0,25% de bleu de Coomassie, 50% de Méthanol (CH_3OH), 45% d'eau distillée et 10% d'acide acétique (CH_3COOH).
* Solution de décoloration (fixation) 10% acide acétique(CH_3COOH), 30% Méthanol (CH_3OH) 60% l'eau distillée.

II-4-3. Matériel

- Cuves à électrophorèse (APELEX).
- Plaques en verre.
- Espaceurs avec un diamètre de 0,8 mm.
- Peigne avec un diamètre de 0,8 mm.
- Générateur de courant (CONSORT).

II-4-4. Protocole expérimental

II-4-4-a. Précipitation des protéines par l'acétone

Avant d'analyser le venin de scorpion et l'ensemble des fractions éluées par chromatographie d'exclusion, nous avons commencé par la concentration des protéines par précipitation dans l'acétone (www.piercenet.com)

1. Dans un tube de 1,5 ml, sont introduit :
    - 1 volume de l'échantillon en µl
    - 4 volumes d'acétone en µl
2. Les échantillons sont gardés à une température de -20°C pendant 1 heure.
3. Centrifugés à 13.000 tours/min pendant 10 min.
4. Le culot a été récupéré et suspendu dans le tampon échantillon avec un volume de 5µl à 15 µl.

II-4-4-b. Préparation du gel

D'abord tout le matériel a été désinfecté avec de l'alcool. Sur un support équilibré les plaques en verre sont montées en parallèle avec les espaceurs. L'étanchéité du montage a été vérifiée en faisant couler de l'eau distillée.
Le gel de séparation (ou de migration) a été introduit jusqu'aux 2/3 du volume des plaques puis une fine couche d'eau a été ajoutée pour homogénéiser la surface du gel. Le tout est laissé reposer jusqu'à la polymérisation du gel.

Nous avons placé ensuite un peigne d'électrophorèse, déposé le gel de concentration (1/3) et laissé polymériser.

Juste après sa polymérisation, le peigne est retiré et la cuve d'électrophorèse est remplie avec le tampon de migration pour déposer les échantillons des deux venins des scorpions (Am-Bo) et les marqueurs de poids moléculaires.
Après le système élecrophorétique est connecté au générateur,le gel récupéré à la fin de la migration, a été coloré avec le bleu de Coomassie pendant une nuit.

Le gel contenant les protéines a été transvasé dans la solution de décoloration, lavé dans plusieurs bains jusqu'à apparition des bandes de protéines.

Les composants des gels utilisés sont rassemblés dans le **tableau 3**.

Tableau 3 : Composition des gels d'électrophorèses (Gel de migration et Gel de concentration)

	Gel de migration (ml) (15%)	Gel de concentration (ml) (5%)
Acrylamide-bisacrylamide 30 %	6 ml	0,66 ml
Lower Buffer	3	-
Upper Buffer	-	1.26
APS 10%	0,08 ml	0,08 ml
TEMED	0,02 ml	0,02 ml
Eau distillée	3 ml	3,08 ml

II-5. Etude de la toxicité du venin de scorpion *Androctonus mauretanicus* (Am) et *Buthus occitanus*(Bo)

II-5-1. Principe

L'activité de venin a été déterminée en calculant la Dose létale 50 (DL_{50}) selon une méthode conforme aux recommandations de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS, 1981).

La DL_{50} est la dose qui tue 50% d'une population homogène de souris Swiss.

On injecte des doses croissantes du venin et la mortalité est enregistrée après 48 heures. Deux voies d'injection ont été utilisées : intraveineuse (IV) et intrapéritonéal (IP) **(figure 10)**. (Oukkache et coll., 2013).

L'analyse des différents résultats a été faite par le logiciel *Prism 4.*

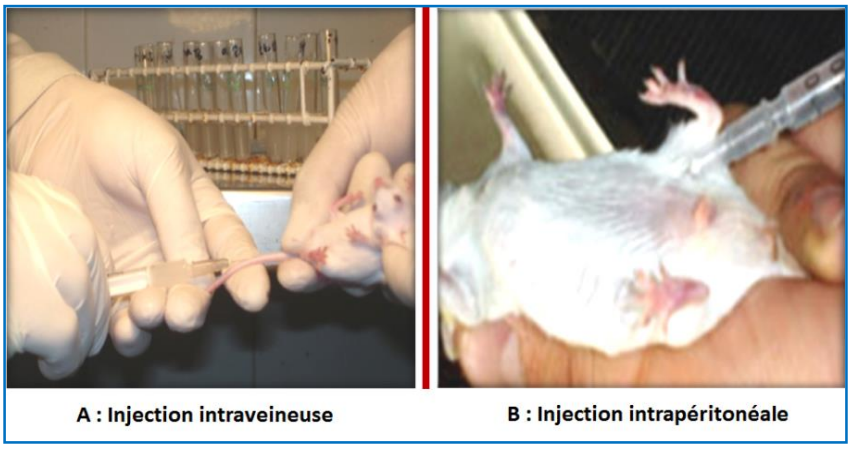

Figure 10 : les deux voies d'injections : Voie intraveineuse (A), Voie intrapéritonéale (B).

II-5-2. Protocole expérimental

Tableau 4 : Protocole de détermination de la DL_{50} de venin *Androctonus mauretanicus (Am)* par deux voies d'injection intraveineuse (IV) et intrapéritonéale (IP).

Voie d'injection	Groupe	µg du venin /souris	µl du venin /souris	Volume (µl) par groupe	µl de solution physiologique (NaCl 0.9%)	Volume total (µl)
Intraveineuse	1	20	4	24	2976	3000
	2	17.5	3.5	21	2979	3000
	3	15	3	18	2982	3000
	4	12.5	2.5	15	2985	3000
	5	10	2	12	2988	3000
Intrapéritonéale	1	50	10	60	2940	3000
	2	45	9	54	2946	3000
	3	40	8	48	2952	3000
	4	30	6	36	2964	3000
	5	20	4	24	2976	3000

Tableau 5 : Protocole de détermination de la DL_{50} de venin *Buthus occitanus* (Bo) par deux voies d'injection intraveineuse (IV) et intrapéritonéale (IP).

Voie d'injection	Groupe	µg du venin /souris	µl du venin /souris	Volume (µl) par groupe	µl de solution physiologique (NaCl 0.9%)	Volume total (µl)
Intraveineuse	1	40	6.667	40	2960	3000
	2	37.5	7.5	45	2955	3000
	3	35	7	42	2958	3000
	4	32	6.5	39	2961	3000
	5	30	6	36	2964	3000
	6	27.5	5.5	33	2967	3000
	7	25	5	30	2970	3000
	8	20	4	24	2976	3000
Intrapéritonéale	1	100,0	20	120	2880	3000
	2	96,0	19.2	115.2	2884.8	3000
	3	92,0	18.4	110.4	2889.6	3000
	4	88,0	17.6	105.6	2894.4	3000
	5	84,0	16.8	100.8	2899.2	3000
	6	80,0	16	96	2904	3000
	7	76,0	15.2	91.2	2908.8	3000

PARTIE 2 : Mise au point d'un Test ELISA bispécifique pour le dosage du venin des scorpions *Androctonus mauretanicus* et *Buthus occitanus* chez les patients envenimés

I. Production des anticorps polyclonaux anti-venins de scorpions Am et Bo chez les chevaux et chez les lapins.

Deux types d'anticorps polyclonaux ont été produits :

1) Chez des chevaux (des anticorps $F(ab'_2)$)
2) Chez les lapins (des IgG) selon des calendriers d'immunisations bien déterminés.

II. Purification des différents anti-venins de scorpions Am et Bo par la chromatographie d'affinité

II-1. Principe

Cette technique est basée sur une affinité structurale entre la phase stationnaire et certaines molécules. Les interactions entre les molécules affines et la phase stationnaire sont des liaisons de faibles énergies. Dans la plupart des cas, on va réaliser la phase stationnaire en fixant un ligand sur un support solide. L'élution pourra être réalisée en utilisant une phase mobile qui contient le même ligand que celui fixé sur la partie solide de la phase stationnaire. Par compétition entre les ligands libres et les ligands fixés sur la phase stationnaire, les molécules adsorbées pourront se lier au ligand libre et ainsi être éluées de la colonne (Guesdon et coll., 1976).

II-2. Tampons, solutions et réactifs utilisés

* phase stationnaire : le Gel Sépharose 4B activé au bromure de cyanogène (CnBr).
* Acide chlorhydrique (HCl) 1mM.
* Tampon de couplage : Bicarbonate de sodium ($NaHCO_3$)0,1 M, pH =8.
* Tampon de blocage : Tris ($C_4H_{11}NO_3$) 1M, pH=8.
* Tampon de lavage de la colonne : Tris ($C_4H_{11}NO_3$) 100 mM, pH=8, chlorure de sodium (NaCl) 0,5N.
* Solution d'élution : acide acétique (CH_3COOH) 0,1M, pH=2,1.
* Solution de la neutralisation de pH des anticorps purifiés : Tris ($C_4H_{11}NO_3$) 1M, pH=8.

II-3.Équipement

- Colonne d'immunoaffinité : deux seringues de 5 ml
- Centrifugeuse (SIGMA3K 200)
- Pipettes en plastique de 5 ml

II-4. Dosage de la concentration en protéines des venins de scorpions Am, Bo et les différents anticorps des lapins (IgG) et chevaux (Fab'2)

La quantification des protéines des venins de scorpions (Am et Bo) et des différentes types d'antivenins polyclonaux anti-Am et anti-Bo a été faite par la méthode Bradford Et l'estimation de la quantité des protéines évaluée en mesurant l'absorbance à 280 nm, (voir paragraphe II.1 de la partie matériel et méthodes).

II-5. Préparation de la colonne d'immunoaffinité

0,5 gramme du gel Sépharose 4B activé au bromure de cyanogène a été gonflé dans l'acide chlorhydrique (HCl) 1mM pendant 15 min sous agitation douce, puis le surnagent a été éliminé par centrifugation (13000 tr/min pendant 10 min). Après le blocage des sites non fixés (des bras du gel) par la solution de blocage, 3,3 mg de solution des protéines de venin ont été couplés au gel activé, préalablement ajouté au tampon de couplage, pour une incubation durant nuit à une température de 4°C.

Après centrifugation (13000 tr/min pendant 10 min), la DO du surnagent a été mesurée à une longueur d'onde de 280 nm (pour calculer le rendement de fixation des protéines sur le gel). Finalement le gel est lavé après transvage dans la colonne.

II-6. Protocole de purification

La purification des différents types d'anticorps a été effectuée selon le procédé suivant :

- Lavage de la colonne (couplée au venin Am ou Bo) par la solution de lavage.
- Incubation de l'anti-venin correspondant anti-Am ou anti-Bo : 1 ml pour les fragments Fab'2 et 2 ml pour les IgG, pendant une heure sous agitation.
- Récupération du surnagent et mesure de sa D.O à 280 nm, afin de déterminer le rendement de fixation des anticorps.
- Élution par la solution d'acide acétique (sur des tubes d'essais) avec des fractions de 0,5 ml contenant 0,5 ml de la solution de neutralisation.
- Mesure des D.O des différents éluats.
- Lavage de la colonne jusqu'à son équilibration.
- Aliquotage et conservation des anticorps purifiés à une température de -20°C.

III- Mise au point de la méthode ELISA « double Sandwich » : Détermination des conditions optimales

III-1. Principe

La technique ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) est une technique immuno-enzymatique de détection qui permet de visualiser une réaction antigène-anticorps grâce à une réaction colorée produite par l'action sur un substrat d'une enzyme (exemple peroxydase) préalablement fixée à l'anticorps (conjugué).

Ce test a pour le but d'évaluer la concentration du venin des scorpions Am et Bo chez les patients, sur des plaques de microtitration (96 puits à fond plat) préalablement sensibilisées par des anticorps anti-Am ou anti-Bo.

Après l'ajout du venin, le complexe Fab'2-venin est révélé par l'addition d'un anticorps primaire anti-venin Am ou Bo et d'un anticorps secondaire marqué à la peroxydase. L'oxydation de divers substrats permet d'obtenir un composé chromogénique comme produit final. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration du venin (**Figure 11**).

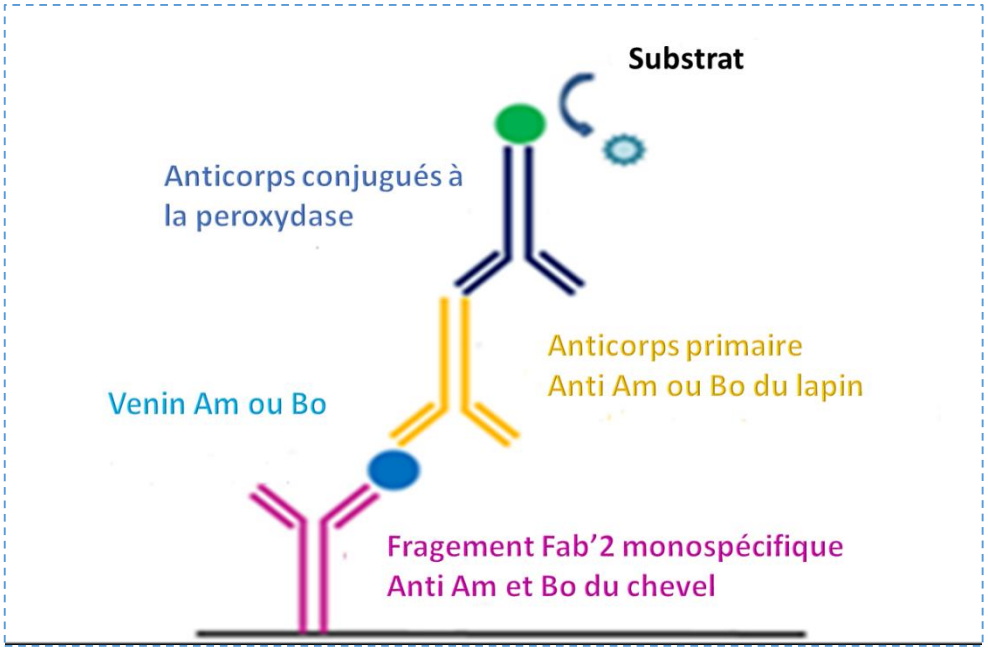

Figure 11 : Schéma du principe du test Elisa double Sandwich

III-2. Tampons, solutions et réactifs utilisés

*Tampon de sensibilisation : carbonate/bicarbonate (Na_2CO_3/$NaHCO_3$) à 0,1M, pH=9,5.

* Tampon de lavage : 50mM Tris-HCl pH=8, 150mM chlorure de sodium (NaCl), 0,05% Tween20

* Tampon de blocage : 50mM Tris-HCl pH=8, 5mg/ml Gélatine, 0,2% Tween 20

* Solution de véhicule : 50mM Tris-HCl pH=8, 0,5M chlorure de sodium (NaCl), Gélatine à 1mg/ml, 0,05% Tween 20

* Solution de révélation : composé de tampon de phosphate à pH=7,4 (Na_2HPO_4, $12H_2O$ à 0,2M, NaH_2PO_4, $2H_2O$ à 0,2M), ortho-phényle-diamine dihydrochloride (OPD) à 15 mg et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à 30 %.

III-3.Équipement

- Laveur ELISA (Mindray MW-12A)
- lecteur ELISA (Mindray MR-96A)
- Plaques de microtitration à fond plat à 96 puits (Maxisorp)

III-4. Protocole expérimental

Les étapes du test ELISA sont résumées ci-dessous :

- La sensibilisation (*coating*) consiste à fixer dans chaque puits de plaque ELISA (Nunc-Maxisorp) 100 µl des fragments d'anticorps F(ab')2 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 plaque ELISA cinq fois s par le Tampon du lavage.
- Le blocage avec 200µl de Tampon de blocage puis incubation de la plaque à 37°C pendant 2h.

- Après, cinq cycles de lavage, 100 µl de la solution du venin Am ou Bo sont ajoutés dans un tampon de véhicule.
- 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-Am ou anti-Bo produit chez le lapin.
- L'incubation pendant 1 h à 37°C, suivie de cinq cycles de lavage.
- Le dépôt de 100 µl/puits du conjugué « Anticorps marqués à la peroxydase dilués au 1/2500 dans le tampon de véhicule.
- L'incubation pendant une heure à 37°C, suivie de cinq cycles de lavage.
- L'ajout de la solution de révélation à raison de 100 µl/puits
- L'incubation de 10 à 30 min
- La réaction a été arrêtée par une solution d'acide sulfurique (H_2SO_4) 1M à raison de 100 µl par puits.
- La lecture des DO à 492 nm (à filtre 630 nm) au niveau du lecteur ELISA.

Le détail des essais effectués sur les venins figure dans les **tableaux 6 et 7**

Tableau 6 : Différents essais du test ELISA Double Sandwich pour le venin du scorpion l'*Androctonus mauretanicus* (Am)

Essai	Sensibilisation de la plaque par F(ab')$_2$ anti-Am (µg/ml)	Anticorpsprimaire : Anti-Am (µg/ml)	Anticorps secondaire	Gamme d'Antigène (dilutions en cascade)
1	5	5	Dilution (1/2500) dans d'un volume 10ml	10000 mg/ml avec une dilution de 1/3
2	5	3		10000 mg/ml avec une dilution de 1/3
3	3	5		10000 mg/ml avec une dilution de 1/3
4	5	10		10000 ng/ml avec une dilution de 1/3
5	3	10		1000 ng/ml avec une dilution de 1/3
6	6	10		1000 ng/ml avec une dilution de 1/3
7	3	10		5000 ng/ml avec une dilution 1/3
8	10	10		1000 ng/ml avec une dilution 1/3
9	3	10		10000 ng/ml avec une dilution 1/3

Tableau 7 : Différents essais du test ELISA Double Sandwich pour le venin du scorpion *Buthus occitanus* (Bo)

Essai	Sensibilisation de la plaque par F(ab')$_2$ anti-Am (µg/ml)	Anticorpsprimaire : Anti-Am (µg/ml)	Anticorps secondaire	Gamme d'Antigène (dilutions en cascade)
1	20	10	Dilution (1/2500) dans d'un	5000 mg/ml avec une dilution de 1/3
2	10	20		10000 mg/ml avec une dilution de 1/3
3	20	20		5000 mg/ml avec une dilution de 1/3
4	10	20		10000 ng/ml avec une dilution de 1/3
5	10	20		5000 ng/ml avec une dilution de 1/3
6	10	10		1000 ng/ml avec une dilution de 1/3
7	10	20		1000 ng/ml avec une dilution 1/3

8	20	10	volume 10ml	5000 ng/ml avec une dilution 1/3
9	10	3		10000 ng/ml avec une dilution de 1/3
10	20	20		40000 ng/ml avec une dilution 1/3

III-5. Evaluation de la sensibilité du test ELISA

L'évaluation de la sensibilité du test ELISA est faite par le logiciel GraphPad Prism 4 pour les paramètres suivants :

❖ Limite de détection

La plus petite quantité ou concentration d'une analyse à examiner dans un matériau d'essai, pouvant être détectée et considérée comme différente de la valeur du blanc (avec une probabilité donnée), mais non nécessairement quantifiée.

❖ Limite de quantification

La limite de quantification est la plus petite grandeur d'une analyse à examiner dans un matériau d'essai pouvant être déterminée quantitativement dans des conditions expérimentales décrites dans la méthode avec une variabilité définie (coefficient de variation déterminé).

RESULTATS & DISCUSSION

PARTIE 1 : Caractérisation biochimique et toxique des venins de scorpions *Androctonus mauretanicus* (Am) et *Buthus occitanus* (Bo)

I. Concentration des protéines du venin des scorpions Am et Bo

L'**annexe I** présente la gamme et la courbe étalon à partir desquelles nous avons obtenu les résultats présentés dans le **tableau 8.**

Tableau 8 : Estimation par la méthode de Bradford du venin des deux espèces Am et Bo

Venin	DO. 595 nm	Quantité en protéines (µg)	Facteur de dilution			Concentration en protéines (mg/ml)	Concentration moyenne en protéines (mg/ml)
Am	0,342	9,621566883	1,25	4000	0,001	48,10783442	**46,9221669**
	0,211	5,500463743	1,25	8000	0,001	55,00463743	
	0,096	1,882701444	1,25	16000	0,001	37,65402888	
Bo	0,354	9,999072514	1,25	4000	0,001	49,99536257	**44,6151881**
	0,175	4,367946849	1,25	8000	0,001	43,67946849	
	0,1	2,008536655	1,25	16000	0,001	40,17073309	

D'après ces résultats, le venin de scorpion Am à une concentration en protéines de 47mg/ml et celle du venin de scorpion Bo est de 45 mg/ml.

Donc, le venin de scorpion Am est plus riche en protéines que le venin de scorpion Bo (**Figure 12)**.

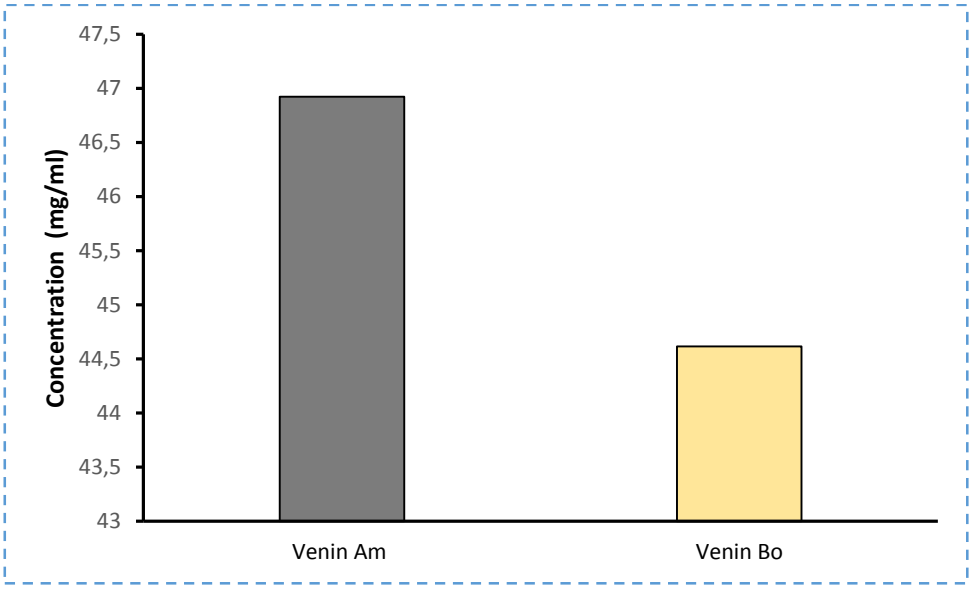

Figure 12 : Concentration en protéines des venins *Androctonus mauretanicus* (Am) et *Buthus occitanus (Bo)* calculée par la méthode Bradford

II. Fractionnement du venin des scorpions *Androctonus muretanicus* et *Buthus occitanus* par chromatographie gel de filtration

❖ Fractionnement du venin *Androctonus mauretanicus*

94 mg de protéines du venin de scorpion Am ont été fractionnées selon leur poids moléculaire sur gel Sephadex G50 médium par une solution d'acétate d'ammonium 0,1 M pH 8,5. Deux fractions ont été éluées : Am1 et Am2 **(Figure 13)**.

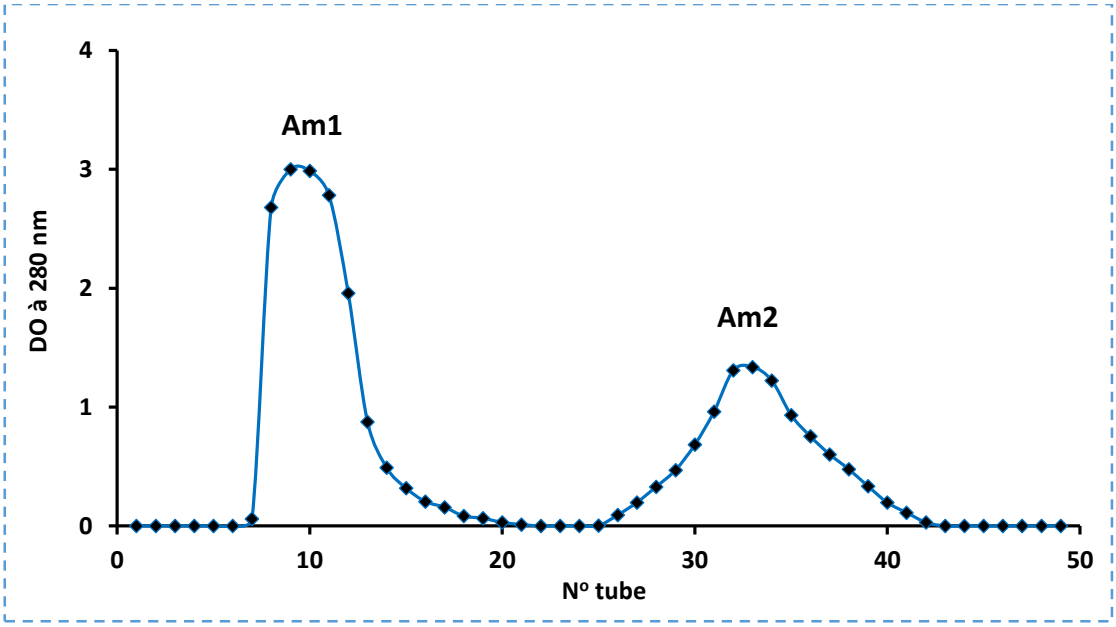

Figure 13 : Chromatogramme du venin de scorpion *Androctonus mauretanicus (Am)* obtenu par la filtration moléculaire de venin

Le rendement du fractionnement du venin de scorpion Am a été évalué en tenant compte des concentrations des protéines obtenues par estimation à 280 nm. Les résultats ont montré que la fraction Am1 représente 47.73 % des protéines du venin et la fraction Am2 représente 20.64 % **(Tableau 9)**.

Tableau 9 : Rendement de la filtration moléculaire du venin de scorpion *Androctonus mauretanicus (Am)*

	Volume (ml)	D.O (280 nm)	Quantité en protéines (mg)	Rendement de la purification de chaque fraction (%)	Rendement total (%)
Venin Am	1	0.835	83.5		
Fraction Am1	28	2.847	79.716	47.73	68.37
Fraction Am2	48	0.718	34.464	20.64	

❖ Fractionnement du venin de scorpion *Buthus occitanus*

90 mg de protéines du venin de scorpion Bo ont été soumis à un fractionnement grossier (selon le poids moléculaire) sur gel Sephadex G50 médium par une solution d'acétate d'ammonium 0,1 M pH 8,5. Deux fractions ont été obtenues : Bo1 et Bo2. **(Figure 14)**.

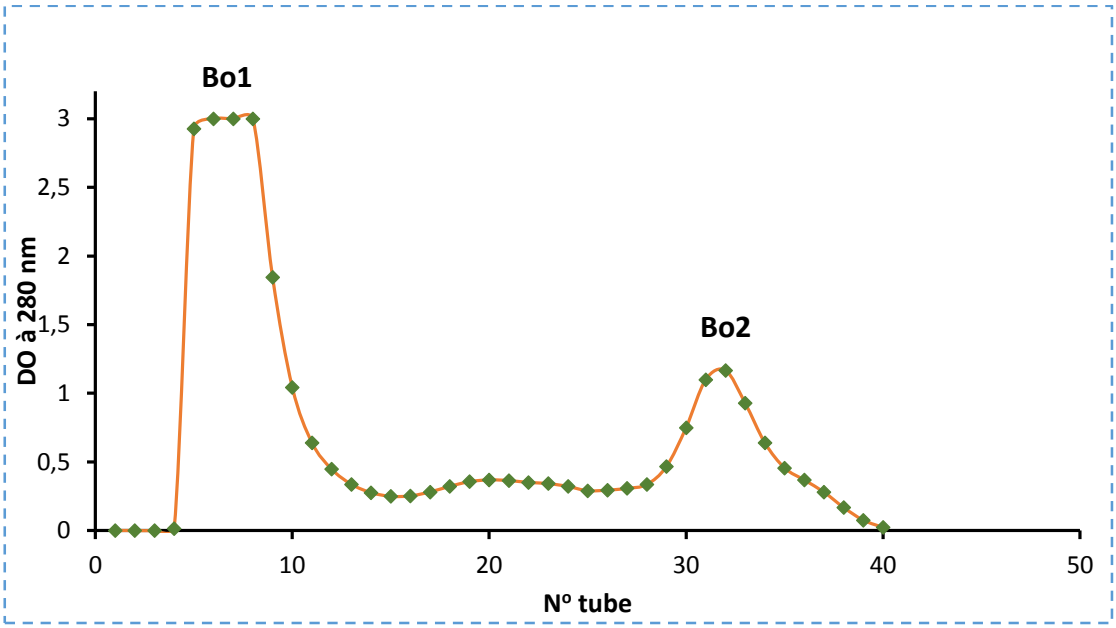

Figure 14 : Chromatogramme du venin de scorpion *Buthus occitanus (Bo)* obtenu par la filtration moléculaire de venin

Le rendement du fractionnement du venin de scorpion Bo a été calculé en se référant aux concentrations des protéines obtenues par estimation à 280 nm. Les résultats ont montré que la fraction Bo1 représente 33.76 % des protéines du venin, et la fraction Bo2 est de l'ordre du 18,14 % des protéines du venin **(Tableau 12)**.

Tableau 10 : Rendement de la filtration moléculaire du venin de scorpion *Buthus occitanus* (Bo)

	Volume (ml)	D.O (280 nm)	Quantité de protéines (mg)	Rendement de la purification de chaque fraction (%)	Rendement total (%)
Venin Bo	1	0.711	71.1		
Fraction Bo1	24	3	72	33.76	51.9
Fraction Bo2	41	0.315	12.9	18.14	

III. Analyse élecrophorétique des venins de scorpions Am et Bo et les fractions purifiées

L'analyse électrophorétique sur gel de polyacrylamide en présence de SDS et dans des conditions réductrices, montre que les protéines de la fraction Am1 et Bo1 ont un poids moléculaire supérieur ou égal à 30 KDa, alors que les protéines de la fraction Am2 et Bo2 possèdent des poids moléculaires inférieurs à 14 KDa **(figure 15)**.

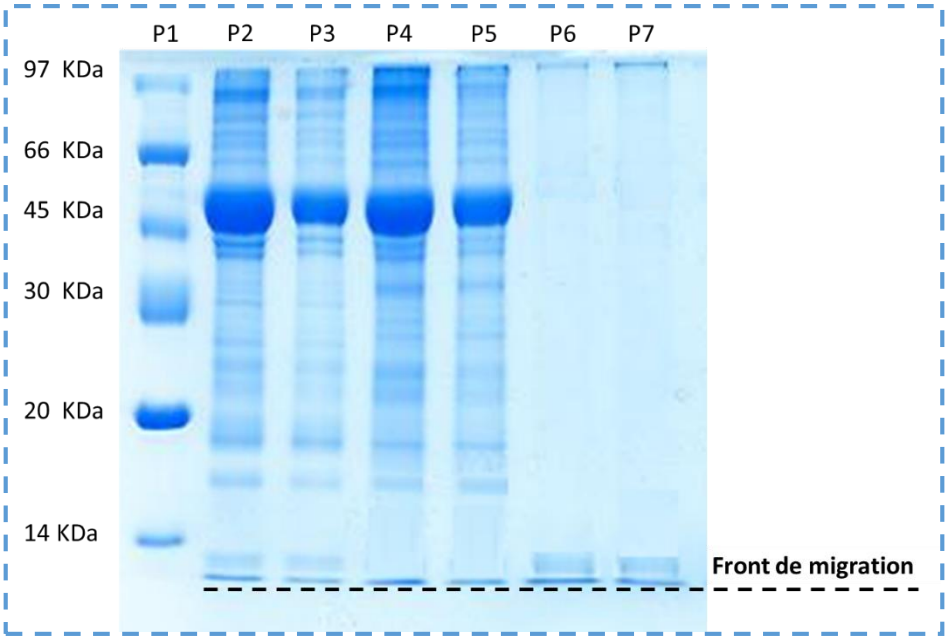

Figure 15 : Profil électrophorétique verticale du venin Am et Bo sur le gel de polyacrylamide en présence de SDS.

La piste 1 : correspond aux marqueurs standards de poids moléculaire. Piste 2 : Venin de scorpion Am à 10 µg. Piste 3 : Venin de scorpion Bo à 10 µg. Piste 4 : Fraction Am1 du venin Am à 10 µg. Piste 5 : Fraction Bo1 du venin Bo à 10 µg. Piste 6 : Fraction Am2 du venin Am à 20 µg. Piste 7 : Fraction Bo2 du venin Bo à 20 µg

En effet, le fractionnement du venin de scorpion *Centruroïdes limpidus* (Mexique) a donné quatre fractions. Seule la fraction ayant un faible poids moléculaire (4 à 8 KDa) est responsable de la toxicité du venin (Emma et coll., 1999).

Des travaux sur le scorpion *Occitanus mardochei* ont montré également que la fraction toxique à un poids moléculaire de 9,5 kDa et qui est aussi responsable de la toxicité du venin. Quant au venin de scorpion Iurus dufoureius (Turkey), il est composé des protéines ayant des poids moléculaires comprises entre 6.5 et 20 KDa (Ozcan O et coll, 2007). Ces protéines de

faible poids moléculaire sont des neurotoxines sont responsables de la quasi-totalité de la toxicité et de la symptomatologie clinique observées lors d'une envenimation scorpionique.

IV. Etude de la toxicité du venin de scorpion Am et Bo

Après injection des doses croissantes du venin Am et Bo par voie intraveineuse (IV) et intrapéritonéale (IP) à des groupes de cinq souris, nous avons obtenu les résultats ci-dessous (**tableaux 11, 12)**.

Tableau 11 : Détermination de la DL_{50} de venin *Androctonus mauretanicus* (Am) par deux voies (IV) et (IP).

Voie d'injection	Groupe	µg du venin /souris	Mortalité 24 heures	Mortalité (%)
Intraveineuse	1	20	5	100
	2	17.5	5	100
	3	15	5	100
	4	12.5	3	60
	5	10	0	0
Intrapéritonéale	1	50	5	100
	2	45	5	100
	3	40	4	80
	4	30	4	80
	5	20	0	0

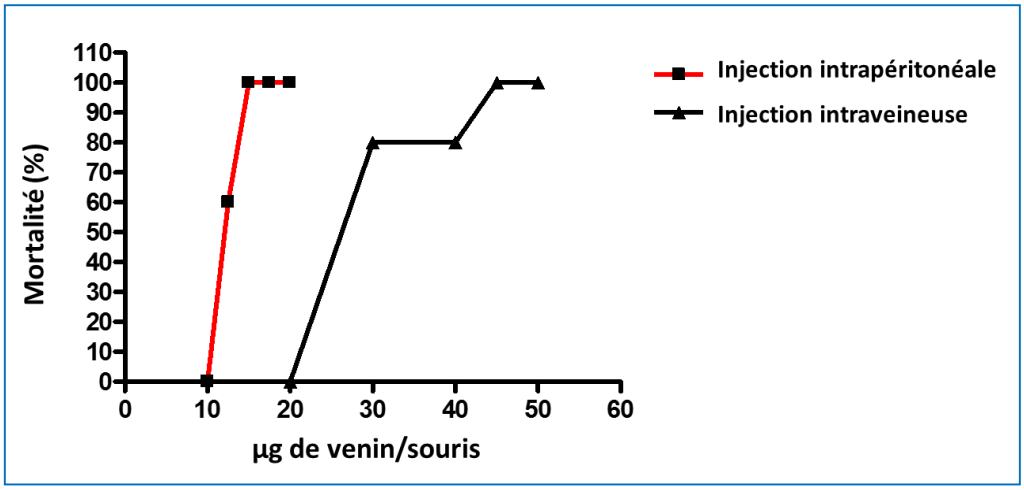

Figure 16 : courbe de la détermination de la DL_{50} de venin *l'Androctonus mauretanicus* (Am) par deux voies d'injection intraveineuse (IV) et intrapéritonéale (IP) par le Logiciel Graph PadPrism 4

Tableau 12 : Détermination de la DL_{50} de venin *Buthus occitanus* (Bo) par deux voies (IV) et (IP).

Voie d'injection	Groupe	µg du venin /souris	Mortalité 24 heures	Mortalité (%)
	1	40	5	100
	2	37.5	3	60

Intraveineuse	**3**	35	3	60
	4	32	2	40
	5	30	2	40
	6	27.5	2	40
	7	25	0	0
	8	20	0	0
Intrapéritonéale	**1**	100	5	100
	2	96	4	80
	3	92	3	60
	4	88	2	40
	5	84	2	40
	6	80	1	20
	7	76	1	20
	8	72	0	0
	9	70	0	0

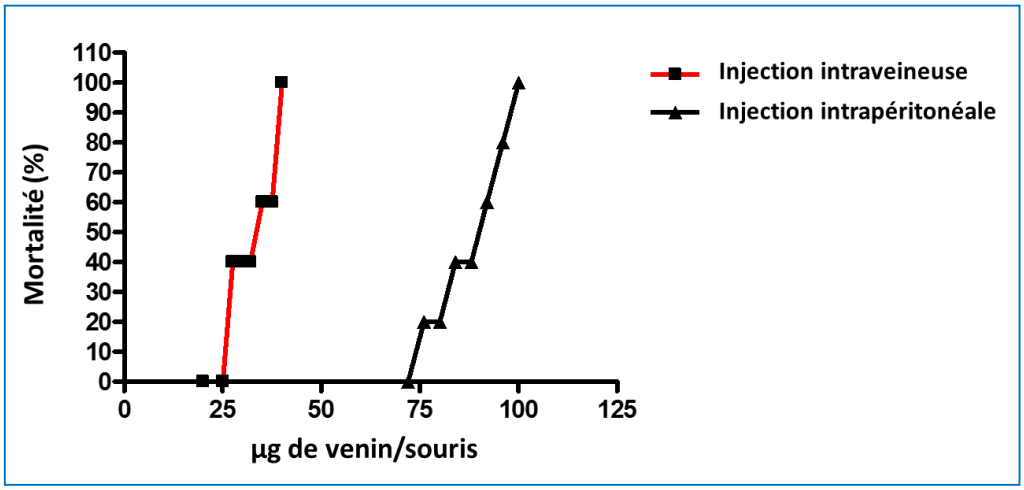

Figure 17 : courbe de la détermination de la DL_{50} de venin *Buthus occitanus* (Bo) par deux voies d'injection intraveineuse (IV) et intrapéritonéale (IP) par le Logiciel Graph PadPrism 4.

Les DL_{50} des deux venins Am et Bo ont été déterminées par le logiciel « **Graph PadPrism 4** » **(Annexe IV).**

Tableau 13 : Calcul de la DL_{50} par deux voies d'injection intraveineuse (IV) et intrapéritonéale (IP) par le Logiciel Graph PadPrism 4

Venin	**DL_{50} (µg de venin/souris)**	
	voie intraveineuse (IV)	**voie intrapéritonéale (IP)**
Am	12.46	26.73
Bo	32.63	88

Pour les deux venins on remarque que la DL_{50} (IP) est supérieure à la DL_{50} (IV). Ce phénomène serait dû aux toxines dont le poids moléculaire est faible ce qui favorise leur diffusion rapide et complète dans la circulation sanguine et par la suite la rapidité de l'apparition des symptômes.

Le venin Am s'est avéré plus toxique que le venin Bo par les deux voies d'injection (IV et IP) : la DL_{50}(Am) est inférieure à DL_{50}(Bo) aussi bien par IV que par IP.

Cette observation est en parfaite cohérence avec les résultats des dosages des protéines des deux venins : le venin Am est plus riche en protéines à faible poids moléculaire que le venin Bo. Des résultats similaires ont été observés après évaluation de la DL_{50} du venin de scorpion *Tityus trivittatus* (Argentine) chez la souris (Adolfo R. de Roodt et coll, 2010).

PARTIE 2 : Mise au point d'un Test ELISA bispécifique pour le dosage du venin des scorpions *Androctonus mauretanicus* et *Buthus occitanus* chez les patients envenimés

I. Purification des différents anti-venins de scorpions *Androctonus mauretanicus* et *Buthus occitanus* par chromatographie d'affinité

Les anti-venins polyclonaux anti-Am et anti-Bo préparés chez le cheval et chez le lapin ont été purifiés par chromatographie sur colonne d'affinité à raison de 1ml pour les fragments F(ab')2 et 2 ml pour les anti-venins monospécifiques préparés chez le lapin. Après incubation d'une heure, nous avons commencé par éluer la fraction non retenue des anticorps, par la suite la fraction d'anti-venin est éluée par la solution d'acide acétique pH. Les profils chromatographiques montrent la fraction des anticorps éluée **(Figures 18, 19, 20, 21).**
Nous avons calculé le rendement de fixation des anticorps par estimation de la charge en acides aminés aromatiques (D.O à 280 nm) de la fraction non retenue. Les rendements des quatre chromatographies ont montré un pourcentage élevé (supérieur à 90 %) de la fixation des anticorps sur le ligand (venin Am et venin Bo) de la colonne d'immuno-affinité **(Tableau 20)**.

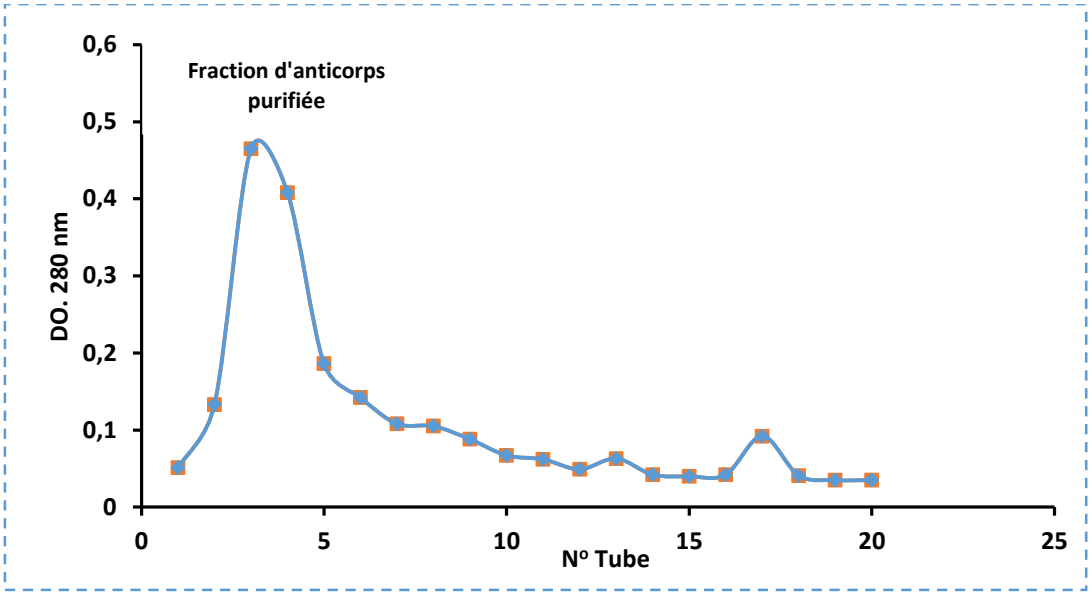

Figure 18 : Profil chromatographique d'affinité des fragments F(ab')$_2$ anti-venin *Androctonus mauretanicus* (Am) produits chez les chevaux
NB : voir les différentes DO obtenues dans **l'annexe III**

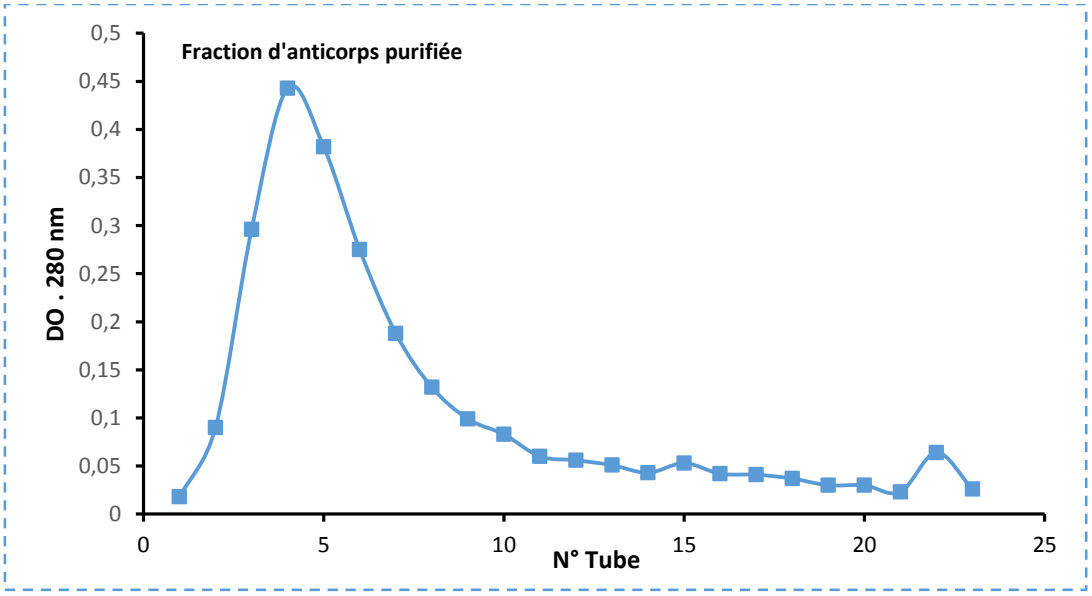

Figure 19 : Profil chromatographique d'affinité des fragments F(ab')$_2$ anti-venin *Buthus occitanus* (Bo) produits chez le chevaux
NB : voir les différentes DO obtenues dans **l'annexe III**

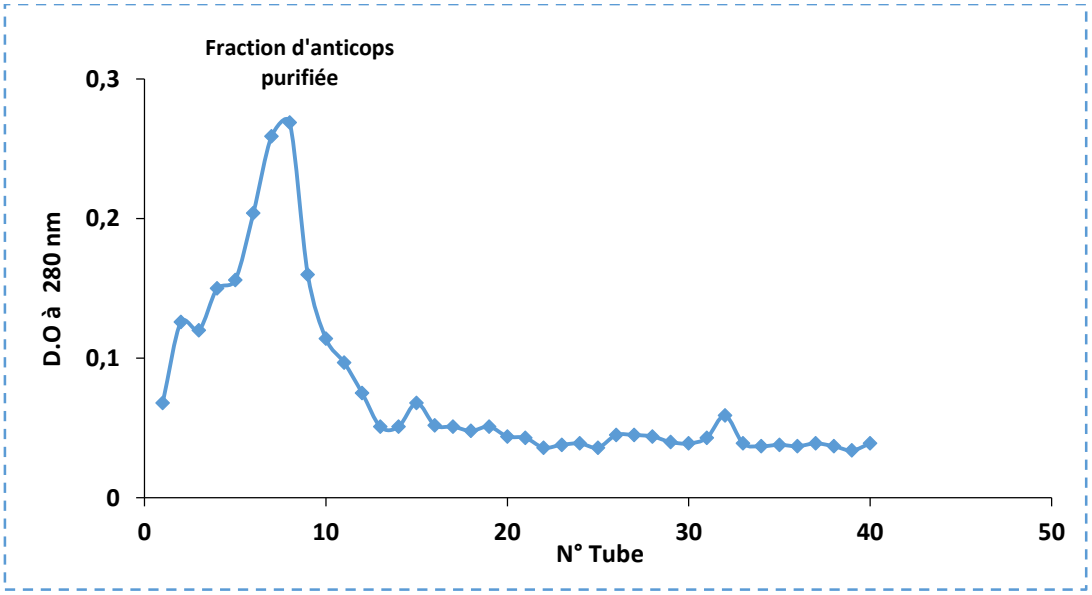

Figure 20 : Profil chromatographique d'affinité des anticorps anti-venin *Androctonus mauretanicus* (Am) produits chez les lapins.
NB : voir les différentes DO obtenues dans **l'annexe III**

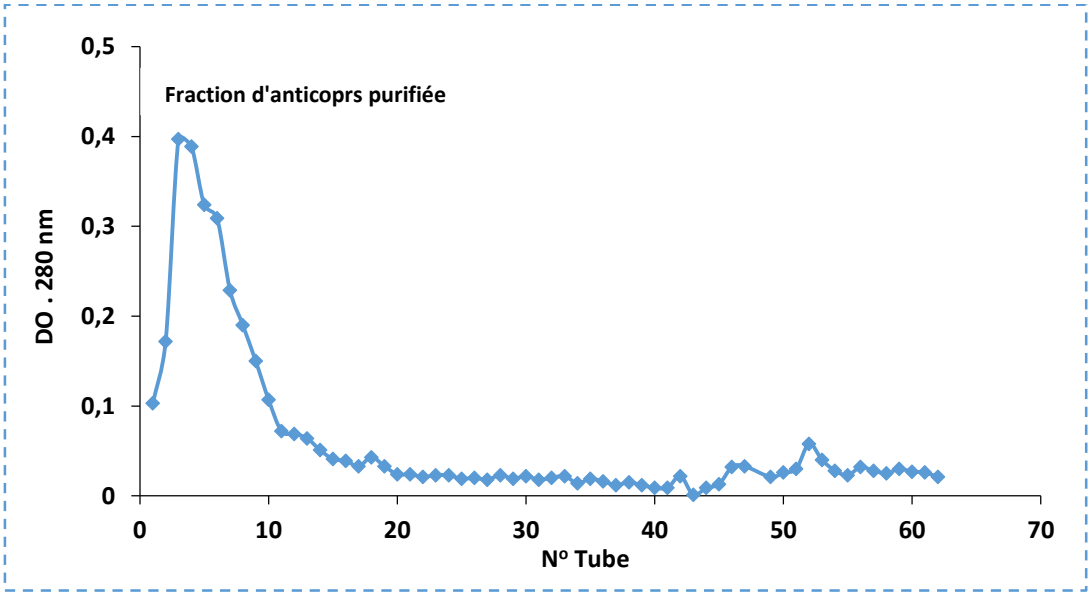

Figure 21 : Profil chromatographique d'affinité des anticorps anti-venin *Buthus occitanus* produits chez les lapins.
NB : voir les différentes DO obtenues dans **l'annexe III**

Tableau 14 : le pourcentage de fixations des anti-venins (F(ab')2 Anti-Am, F(ab')2 Anti-Bo, Anti-Bo (IgG), Anti-Am (IgG)

Sérums	D.O (280 nm) de fraction non retenue	D.O des anticorps avant chromatographie	Rendement de fixation (%)
F(ab')2 Anti-Am	6.34	30.6	93.66

F(ab')2 Anti-Bo	1.296	22.8	94.31
Anti-Bo (IgG)	1.943	64.4	96.98
Anti-Am (IgG)	1.98	68.5	97.11

II. Mise au point de la méthode ELISA « double Sandwich » : détermination des conditions optimales

L'objectif de la mise au point du test ELISA bispécifique est la détermination de la sérothérapie adéquate et des doses optimales à administrer par la quantification du venin de scorpion dans le sang des patients envenimés.

L'analyse par le logiciel GraphPad Prism nous a donné les conditions optimales pour le venin des deux espèces Am et Bo, qui sont :

- *Androctonus mauretanicus* (Am) **(Figure 20)**

- Pour l'étape de la sensibilisation : la concentration des F $(ab')_2$ monospécifique aux venins de scorpions Am produits chez les chevaux qui a donné un bon résultat est de **3 µg/ml**.

- Pour la gamme étalon de venin : La gamme utilisée est entre une concentration de 0 à

10 000 ng/ml.

- Pour les anticorps primaires « IgG totaux monospécifiques aux venins de scorpions Am et Bo produits chez les lapins » : La concentration minimale donnant des bons résultats est de **10 µg/ml**.

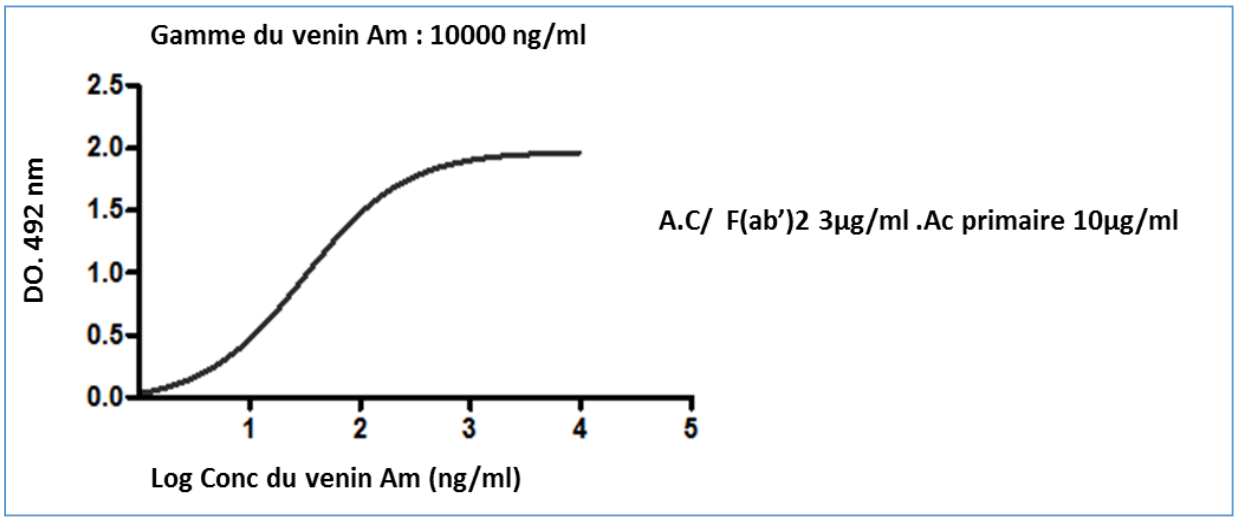

Figure 22 : Résultat ELISA déterminé par le logiciel GraphPad Prism : Courbe étalon de la gamme du venin *Androctonus mauretanicus (Am)*

La sensibilité de notre test a été déterminée par l'évaluation de deux paramètres :

La limite de détection (LLD) et la limite de quantification (LLQ).

LLD et LLQ des concentrations en protéines des venins de scorpions Am a été déduite par extrapolation sur la courbes d'étalon du la gamme du venin Am **(Tableau 17)**.

Tableau 15 : Limites de détection (LLD) et de quantification (LLQ) de venins de scorpions *Androctonus mauretanicus (Am)*

Venin		DO. 492nm	Log (ng/ml)	Conc(ng/ml)
Am	LLD	0,49350357	1,033035	10,7903368
	LLQ	0,65684524	1,207579	16,1279437

- *Buthus occitanus* (Bo) **(Figure 21)**

- Pour l'étape de la sensibilisation : la concentration des F(ab')$_2$ monospécifique aux venins de scorpions Bo produits chez les chevaux qui a donné un bon résultat est de **20 µg/ml**.

- Pour la gamme étalon de venin : La gamme utilisée est entre une concentration de 0 à

40 000 ng/ml.

- Pour les anticorps primaires « IgG totaux monospécifiques aux venins de scorpions Am et Bo produits chez les lapins » : La concentration minimale donnant des bons résultats est de **20 µg/ml**.

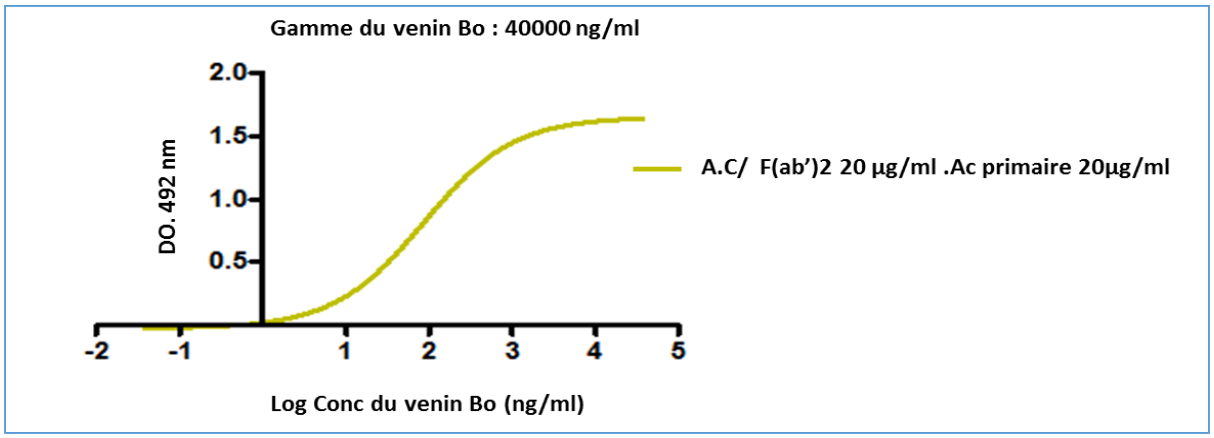

Figure 23 : Résultat ELISA déterminée par le logiciel GraphPad Prism : Courbe étalon de la gamme du venin *Buthus occitanus* (Bo)

LLD et LLQ des concentrations en protéines des venins de scorpions Bo a été déduite par extrapolation sur la courbe d'étalon de la gamme du venin Bo **(Tableau 18)**.

Tableau 16 : Limites de détection (LLD) et de quantification (LLQ) de venin de scorpion *Buthus occitanus* (Bo)

Venin		DO. 492nm	Log (ng/ml)	Conc(ng/ml)
Bo	LLD	0,37718377	1,305773	20,2196205
	LLQ	0,46627922	1,453844	28,4343955

Le test ELISA nous a permis de déterminer les concentrations limites de détection et de quantification des deux venins Am et Bo dans le sang des patients envenimés. Ces concentrations sont de l'ordre de nanogrammes.

Des résultats similaires ont été obtenus par Krifi MN et ses collaborateurs (2001), après une étude sur les venins des scorpions *Buthus occitanus tunetanus* et *Anroctonus australis garzonii* (Krifi MN et coll, 2001).

La méthode Elisa a été également utilisée par Díaz, P et ses collaborateurs pour évaluer les différentes toxines du venin de scorpion *Tityus discrepans* (Diaz.P et coll, 2014).

D'autres études d'immuno-réactivité croisée sur les venins de scorpions *Androctonus mauretanicus* (Maroc) et *Androctonus australis hector* (Tunisie), ont été aussi réalisées par des tests Elisa (Chgoury F et coll, 2015).

Conclusion

Le venin Am s'est avéré plus toxique que le venin Bo. Cette toxicité est attribuée à la richesse d'Am en protéines de faible poids moléculaire en comparaison avec Bo.

La caractérisation biochimique des deux venins par le procédé de chromatographie d'exclusion moléculaire, a mis en évidence la présence de deux fractions dans chaque venin dont la première est majoritaire.

L'analyse électrophorétique en conditions réductrices a révélé deux bandes très denses et majoritaires de faible poids moléculaire (inférieur à 14 KDa). Ces peptides seraient responsables des effets toxiques des venins scorpionique, selon la littérature.

Un test immunodiagnostic ou Elisa bispécifique aux venins de scorpions Am et Bo a été mis au point et a permis la détermination des concentrations limites de détection et de quantification pour chacun des deux venins.

Ce test faciliterait la mise en place d'une immunothérapie efficace et permettrait ainsi, d'améliorer la prise en charge des envenimés.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

~A~

Abroug F, Nouira S, scorpioniques Saguiga H. envenimations: avancees chimiques, physiopathologiques et Thérapeutiques [Monographie]. 1994; 1-68.

Adolfo R. de Roodt, Fredy I.V. Coronas, Nestor Lagoc, Marı´a E. Gonza´ lez ,Rodrigo D. Laskowicza, Juan C. Beltramino, Silvina Saavedra, Rau´l A. Lo´ pez, Gustavo J. Reati, Miriam G. Vucharchuk, Eduardo Baza´n, Liliana Varni, Oscar D. Salomo´n, Lourival D. General biochemical and immunological characterization of the venom from the scorpion *Tityus trivittatus* of Argentina. Toxicon 55,2010; 307–319

~C~

Chgoury F, Benabderrazek R, Tounsi H, Oukkache N, Hmila I. Effectiveness of the Androctonus Australis Hector Nanobody NbF12-10 Antivenom to Neutralize Significantly the Toxic Effect and Tissue Damage Provoked by Fraction of Androctonus mauretanicus (Morocco) Scorpion Venom. Biochem Pharmacol (Los Angel) 2015; 4: 174. doi:10.4174/2167-0501.1000174.

Chippaux Jean-Philippe. Emerging options for the management of scorpion stings. Drug Des Devel Ther. 2012; 6: 165–173.

Chippaux JP, Goyffon M.Epidemiology of scorpionism: a global appraisal.Acta Tropica 2008; 107:71-9.

Clot-Faybesse O,Guieu R,Rochat H,Devaux C.Toxicity during early development of the mouse nervous system of a scorpion neurotoxin active on sodium channels.Life science 1999:185-192.

~D~

Díaz. P, G. D'Suze, C. Sevcik. Ability of horse anti-Tityus discrepans F(ab')2 ELISA assay to recognize Tityus discrepans venom toxins. Toxicon 88; 2014. 88-92.

~E~

Emma S. Calderón-Aranda Gilles Rivière b ,Valérie Choumet b ,Lourival D. Possani c , Cassian Bon b. Pharmacocinétique de la fraction toxique de limpidus Centruroides de venin expérimentalement chez des lapins empoisonnés et les effets de l' immunothérapie spécifique avec F (ab ')2. Toxicon Mai 1999, Pages 771-782.

~G~

Ghalim N, El hafny B, Sebti F, Jaafar H, Lazar N, Moustanir R, Benslimane H. Scorpion envenomation and serotherapy in Morocco. Am J Trop Med Hyg 2000; 62: 277-283.

Gueron M,Margulis G,Ilia R,Sofer S.The management of scorpion envenomation.Toxicon 1993;31:1071-1076.

Guesdon, J.L., Avrameas, S. Polyacrylamide agarose beads for the preparation of effective immunoabsorbent. J. Immun. Meth. 1976 ; 11, 129.

~H~

Hammoudi-Triki D, Ferbel E, Rob-vincent A, Bon C, Choumet V. Epidemiological data, clinical admission gradation and biological quantification by ELISA of scorpion envenomation in Algeria: effect of immunoterapy. Transaction of Royal Society of Tropical Medecine and Hygiene 2004; 98: 240-250.

Hutt M.J, Houghton P.J. A survey from the literature of plants used to treat scorpion stings. Journal of Ethnopharmacology 60 1998; 60: 97–110.

~I~

Inceoglu B,Lango J,Jing J,Chen I,Doymaz F,Pessanh Hammock BD.One scorpion,two venoms,prevenom of Parabuthus transvaalicusacts an alternative type of venom with distinct mechanism of action.Proc Nalt Acad Sci USA 2003;100:922-927.

Ismail M. the treatment of the scorpion-envenoming syndrome: the Saudi experience with serotherapy. Toxicon 1994. 32: 1019-1026.

~K~

Kawachi T,Miyashita M,Nakagawa Y,Miyagawa H.Isolation and charactérisation of an antiinsect B toxinfrom the venomof the scorpion *Isometrus maculatus* ; Biosci. Biotevnol. Biochem 2013;77 (1):205-207.

Krifi MN, Amri F, 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: 1627-34.

Krifi MN,Miled K,Marroufi A,El ayeb M.Effets of antivenom on Buthus occitanus tutetanus scorpion venom pharmacokinetics : towards an optimisation and anti-venom immunotherapy in rabbit. Toxicon 2001:1317-1326.

~L~

Legros C,Martin-Eauclaire MF. Les toxines de scorpion. CR Soc Biol 1997; 191:345-380.

Lourenço WR,Ythier E,Leguin EA.A new species of Compsobuthus vachon,1949 from Wester Africa (Scorpiones,Buthidae).Euscorpius-Occasional 2009;90.

Lourenço WR.What do we know about some of the most conspicuous scorpion species of the genus*Tityus*? A historical approach .Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases 2015;21:20.

~M~

MARION M. BRADFORD .A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. ANALYTICAL BIOCHEMISTRY 1976; 72, 248-254.

Martin-Eauclaire MF, Alami M, Giamarchi A, Missimilli V, Rosso JP, Bougis PE. A natural anatoxin, Amm VIII, induces neutralizing antibodies against the potent scorpion alpha-toxins. Vaccine 2006; 24: 1990-1996.

Martin-Eauclaire MF,Couraud F.Scorpion neurotoxins :effects and mechanisms.Handbook of Neurotoxicology 1995;5:46-55.

~O~

Ortiz E,Gurrola GB,Schwartz EF,Possani LD.Scorpion venom components as potential candidates for drug development.Toxicon 2015;93:125–135.

Oukkache N, Rosso JP, Alami M, Ghalim N, Saïle R, Hassar M, Bougis PE, Martin-Eauclaire MF. New analysis of the toxic compounds from the Androctonus mauretanicus mauretanicus scorpion venom. Toxicon, 2008 b; 51: 252-288.

Oukkache N, Chgoury N, Lalaoui M , Alagón Cano A , and Ghalim N. Comparison between two methods of scorpion venom milking in Morocco. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis. 2013; 19: 5.

Oukkache N,El Jaoudi R,Chgoury F,Rochat MT,Sabatier JM.Characterization of Am IT,an anti-insect β-toxin isolated from the venom of scorpion Androctonus mauretanicus.Acta physiologica Sonica 2015;25(67):295-304.

Ozcan Ozkan, Gulay Ciftci, Gokmen Zafer Pekmezci, Sırrı Kar,Hamdi Uysal, Kadri Zafer Karaer. Proteins, lethality and in vivo effects of Iurus dufoureius asiaticus scorpion venom. Toxicon 50 ,2004; 394–399.

Ozcan Ozkan, Gulay Ciftci, Gokmen Zafer Pekmezci, Sırrı Kar,Hamdi Uysal, Kadri Zafer Karaer. Proteins lethality and in vivo effects of Iurus dufoureius asiaticus scorpion venom. Toxicon 50 (2007) 394–399.

Ozkan O,Adiguzel S,Yakistiran S,Cesaretly Y,Orman M,Karaer KZ.*Androctonus crassicauda*(Olivier 1807)Scorpionism in the Sanliurfa provinces of Turkey.Turkiye Parazitoloji Degisi 2006;30(3):239-245.

~R~

Rauf M A, ASHRAF S N. Alhadrami. Photolytic oxidation of Coomassie Brilliant Blue with H_2O_2. Dyes and Pigments 2004; 66 197e200.

~S~

Soulaymani Bencheikh. R, Faraj. Z, Semlali. I, Ouammi. L, Badri. M. National strategy in the battle against scorpion stings and envenomations, Application and evaluation, Bull Société Pathol Exot 1990 Volume 96 2003; pp.317-319.

Soulaymani R,Soulaymani A,Semlali I,Tamim OK,Zemrour F,Eloufir R,Mokhtari A.Les piqures et les envenimations scorpioniques au niveau de la population de Khouribga(Maroc).Bulletin de la société de pathologie Exotique 2005;98(5):36-40.

Soulaymani-Bencheikh. R, Faraj. Z, Semlali. I, Khattabi. A, Skalli. S, Benkirane. R, Badri. **M**. Epidémiologie des piqûres de scorpion au Maroc, Rev Dépidémiologie Santé Publique, Volume 50 2002 ; pp. 341-347.

Stoscheck, C.M. Quantitation of protein. Methods Enzymol. 1990; 182, 50–69.

~T~

Tamim. OK, Tayebi. M, Nekkal. N, Soulaymani. A, El Oufir. R, Rhalem. N, Mokhtari. A, Soulaymani-Bencheikh. **R**. Le scorpionisme au Maroc: analyse du relevé mensuel, Research fr 2014 ; pp1-648.

~V~

Vachon M.Study of scorpions:biogeography of the scorpions of North Africa.Arch Inst Pasteur Alger 1952;28(2):194-216.

Annexes

Annexe I : Dosage des protéines par la méthode Bradford du venin des scorpions Am et Bo

Tableau 17 : Les densités optiques de la gamme étalon de BSA (2-12µg) à 595 nm

BSA (µg)	Absorbance à ƛ = 595 nm
2	0.092
4	0.163
6	0.239

8	0.296
10	0.351
12	0.411

À partir du tableau ci-dessous, on a tracé le courbe étalon de BSA : absorbance = f (quantités).

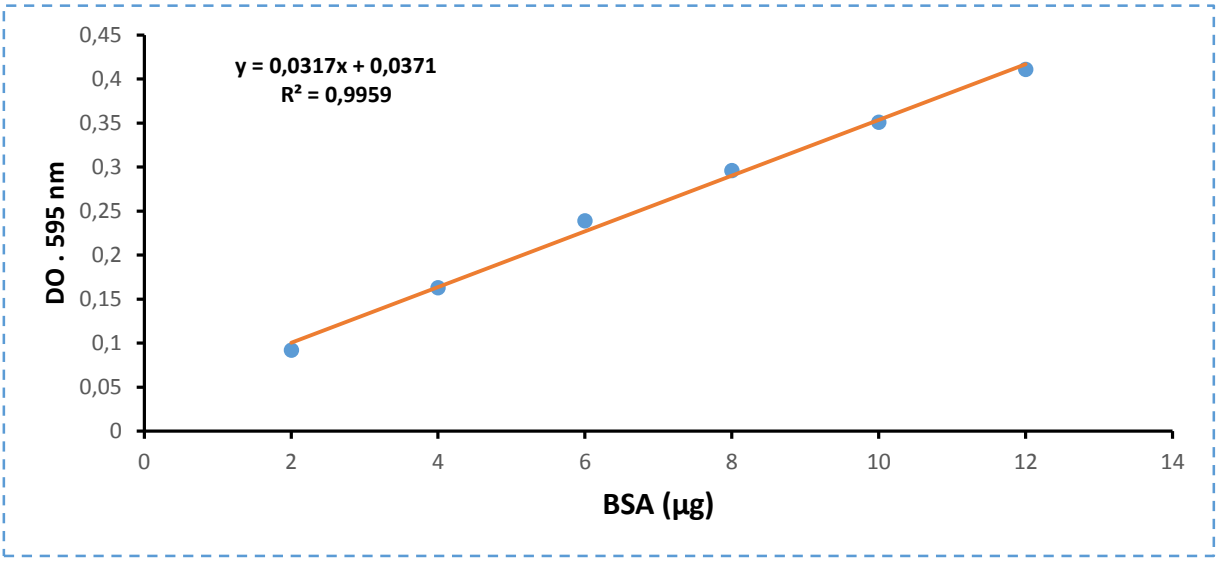

Figure 24 : Courbe d'étalonnage de BSA (DO. 595 nm)
En abscisse : la quantité en BSA (µg), en ordonnée : l'absorbance à 595 nm

On a obtenu un courbe étalon de BSA qui présente un coefficient de détermination R^2 de l'ordre 0.995 (valeur proche de 1), montrant l'existence d'une régression linéaire simple. Les concentrations en protéines des venins de scorpions Am et Bo ont été déduites par extrapolation.

Annexe II : Fractionnement du venin de scorpion *Androctonus muretanicus* et *Buthus occitanus* par chromatographie sur gel de filtration

❖ Fractionnement du venin *Androctonus mauretanicus*

Tableau 18 : Différentes DO obtenues dans la chromatographie de gel de filtration du venin *Androctonus muretanicus* (Am)

Tube	DO. 280 nm	Tube	DO. 280 nm	Tube	DO. 280 nm	Tube	DO. 280 nm

1	0	**14**	0,49	**27**	0,199	**40**	0,197
2	0	**15**	0,319	**28**	0,331	**41**	0,112
3	0	**16**	0,206	**29**	0,471	**42**	0,031
4	0	**17**	0,158	**30**	0,684	**43**	0
5	0	**18**	0,084	**31**	0,962	**44**	0
6	0	**19**	0,065	**32**	1,309	**45**	0
7	0,059	**20**	0,03	**33**	1,338	**46**	0
8	2,681	**21**	0,012	**34**	1,223	**47**	0
9	3	**22**	0	**35**	0,934	**48**	0
10	2,987	**23**	0	**36**	0,754	**49**	0
11	2,782	**24**	0	**37**	0,603		
12	1,959	**25**	0,004	**38**	0,477		
13	0,877	**26**	0,093	**39**	0,334		

❖ Fractionnement du venin de scorpion *Buthus occitanus*

Tableau 19 : Différentes DO obtenues dans la chromatographie de gel de filtration du venin *Buthus occitanus* (Bo)

Tube	DO. 280 nm	Tube	DO. 280 nm	Tube	DO. 280 nm	Tube	DO. 280 nm
1	0	**11**	0,64	**21**	0,364	**31**	1,1
2	0	**12**	0,447	**22**	0,35	**32**	1,167
3	0	**13**	0,337	**23**	0,342	**33**	0,928
4	0,014	**14**	0,276	**24**	0,321	**34**	0,639
5	2,929	**15**	0,249	**25**	0,29	**35**	0,456
6	3	**16**	0,252	**26**	0,294	**36**	0,368
7	3	**17**	0,281	**27**	0,307	**37**	0,28
8	3	**18**	0,322	**28**	0,335	**38**	0,168
9	1,845	**19**	0,356	**29**	0,466	**39**	0,075
10	1,044	**20**	0,369	**30**	0,75	**40**	0,023

Annexe III : Purification des différents anti-venins de scorpions *Androctonus mauretanicus* et *Buthus occitanus* par chromatographie d'affinité

Figure 20 : Différentes DO obtenues dans la chromatographique d'affinité des fragments F(ab')2 anti-venin *Androctonus mauretanicus* produits chez les chevaux

Tube	DO. 280 nm	Tube	DO. 280 nm	Tube	DO. 280 nm	Tube	DO. 280 nm

1	0,051	**6**	0,142	**11**	0,062	**16**	0,042
2	0,133	**7**	0,108	**12**	0,049	**17**	0,092
3	0,465	**8**	0,105	**13**	0,063	**18**	0,041
4	0,408	**9**	0,088	**14**	0,042	**19**	0,035
5	0,186	**10**	0,067	**15**	0,04	**20**	0,035

Figure 21 : Différentes DO obtenues dans la chromatographique d'affinité des fragments F(ab')2 anti-venin *Buthus occitanus* produits chez les chevaux.

Tube	DO. 280 nm	Tube	DO. 280 nm	Tube	DO. 280 nm	Tube	DO. 280 nm
1	0,018	7	0,188	13	0,051	19	0,03
2	0,09	8	0,132	14	0,043	20	0,03
3	0,296	9	0,099	15	0,053	21	0,023
4	0,443	10	0,083	16	0,042	22	0,064
5	0,382	11	0,06	17	0,041	23	0,026
6	0,275	12	0,056	18	0,037		

Tableau 22 : Différentes DO obtenues dans la chromatographique d'affinité des anticorps anti-venin *Androctonus mauretanicus* produits chez les lapins.

Tube	DO. 280 nm	Tube	DO. 280 nm	Tube	DO. 280 nm	Tube	DO. 280 nm
1	0,068	**11**	0,097	**21**	0,043	**31**	0,043
2	0,126	**12**	0,075	**22**	0,036	**32**	0,059
3	0,12	**13**	0,051	**23**	0,038	**33**	0,039
4	0,15	**14**	0,051	**24**	0,039	**34**	0,037
5	0,156	**15**	0,068	**25**	0,036	**35**	0,038
6	0,204	**16**	0,052	**26**	0,045	**36**	0,037
7	0,259	**17**	0,051	**27**	0,045	**37**	0,039
8	0,269	**18**	0,048	**28**	0,044	**38**	0,037
9	0,16	**19**	0,051	**29**	0,04	**39**	0,034
10	0,114	**20**	0,044	**30**	0,039	**40**	0,039

Figure 23 : Différentes DO obtenues dans la chromatographique d'affinité des anticorps anti-venin *Buthus occitanus* produits chez le lapin

Tube	DO. 280 nm	Tube	DO. 280 nm	Tube	DO. 280 nm	Tube	DO. 280 nm

1	0,103	**17**	0,033	**33**	0,022	**49**	0,021
2	0,172	**18**	0,043	**34**	0,014	**50**	0,026
3	0,397	**19**	0,033	**35**	0,019	**51**	0,03
4	0,389	**20**	0,024	**36**	0,016	**52**	0,058
5	0,324	**21**	0,024	**37**	0,012	**53**	0,04
6	0,309	**22**	0,021	**38**	0,015	**54**	0,028
7	0,229	**23**	0,023	**39**	0,012	**55**	0,023
8	0,19	**24**	0,023	**40**	0,009	**56**	0,032
9	0,15	**25**	0,019	**41**	0,009	**57**	0,028
10	0,107	**26**	0,02	**42**	0,022	**58**	0,025
11	0,072	**27**	0,018	**43**	0,001	**59**	0,03
12	0,069	**28**	0,023	**44**	0,009	**60**	0,027
13	0,064	**29**	0,019	**45**	0,013	**61**	0,026
14	0,051	**30**	0,022	**46**	0,032	**62**	0,021
15	0,041	**31**	0,018	**47**	0,033		
16	0,039	**32**	0,02	**48**	0,028		

Annexe IV : Détermination de la dose létale (DL_{50}) du venin de scorpion *Androctones mauretanicus* (Am) et *Buthus occitanus* (Bo)

Figure 25 : Calcul de la DL_{50} par deux voies d'injection intraveineuse (IV) et intrapéritonéale (IP) du scorpion *Androctones mauretanicus* (Am) par le Logiciel Graph PadPrism 4

		A
		Data Set-A
		Y
1	Sigmoidal dose-response (variable slope)	
2	Best-fit values	
3	BOTTOM	-5.965e-011
4	TOP	100.0
5	LOGEC50	1.096
6	HILLSLOPE	128.0
7	EC50	12.46
8	Std. Error	
9	BOTTOM	4.017e-009
10	TOP	2.492e-009
11	LOGEC50	3.280e-005
12	HILLSLOPE	3.050
13	95% Confidence Intervals	
14	BOTTOM	-5.110e-008 to 5.099e-008
15	TOP	100.0 to 100.0
16	LOGEC50	1.095 to 1.096
17	HILLSLOPE	89.21 to 166.7
18	EC50	12.45 to 12.47
19	Goodness of Fit	
20	Degrees of Freedom	1
21	R^2	1.000
22	Absolute Sum of Squares	1.614e-017
23	Sy.x	4.017e-009
24	Data	

		A
		Data Set-A
		Y
1	Sigmoidal dose-response (variable slope)	
2	Best-fit values	
3	BOTTOM	0.0
4	TOP	100.0
5	LOGEC50	1.427
6	HILLSLOPE	10.83
7	EC50	26.73
8	Std. Error	
9	LOGEC50	0.03664
10	HILLSLOPE	6.876
11	95% Confidence Intervals	
12	LOGEC50	1.310 to 1.544
13	HILLSLOPE	-11.04 to 32.71
14	EC50	20.44 to 34.97
15	Goodness of Fit	
16	Degrees of Freedom	3
17	R^2	0.9457
18	Absolute Sum of Squares	373.8
19	Sy.x	11.16
20	Constraints	
21	BOTTOM	BOTTOM = 0.0
22	TOP	TOP = 100.0
23	Data	
24	Number of X values	10

Figure 26 : Calcul de la DL_{50} par deux voies d'injection intraveineuse (IV) et intrapéritonéale (IP) du scorpion *Buthus occitanus* (Am) par le Logiciel Graph PadPrism 4

		A
		Data Set-A
		Y
1	Sigmoidal dose-response (variable slope)	
2	Best-fit values	
3	BOTTOM	0.0
4	TOP	100.0
5	LOGEC50	1.512
6	HILLSLOPE	7.244
7	EC50	32.51
8	Std. Error	
9	LOGEC50	0.01529
10	HILLSLOPE	2.032
11	95% Confidence Intervals	
12	LOGEC50	1.475 to 1.549
13	HILLSLOPE	2.272 to 12.22
14	EC50	29.83 to 35.44
15	Goodness of Fit	
16	Degrees of Freedom	6
17	R^2	0.8586
18	Absolute Sum of Squares	1067
19	Sy.x	13.34
20	Constraints	
21	BOTTOM	BOTTOM = 0.0
22	TOP	TOP = 100.0
23	Data	

		A
		Data Set-A
		Y
1	Sigmoidal dose-response (variable slope)	
2	Best-fit values	
3	BOTTOM	0.0
4	TOP	100.0
5	LOGEC50	1.944
6	HILLSLOPE	14.76
7	EC50	87.96
8	Std. Error	
9	LOGEC50	0.005319
10	HILLSLOPE	2.624
11	95% Confidence Intervals	
12	LOGEC50	1.931 to 1.957
13	HILLSLOPE	8.336 to 21.18
14	EC50	85.37 to 90.64
15	Goodness of Fit	
16	Degrees of Freedom	6
17	R^2	0.9396
18	Absolute Sum of Squares	470.9
19	Sy.x	8.859
20	Constraints	
21	BOTTOM	BOTTOM = 0.0
22	TOP	TOP = 100.0
23	Data	
24	Number of X values	16

Annexe V : Mise au point d'un Test ELISA bispécifique pour le dosage du venin des scorpions Androctonus mauretanicus (Am) et Buthus occitanus (Bo) chez les patients envenimés

1. Différentes essais des courbes étalons du la gamme du venin du scorpion l'*Androctonus mauretanicus* (Am) déterminée par le logiciel Graph PadPrism 4.

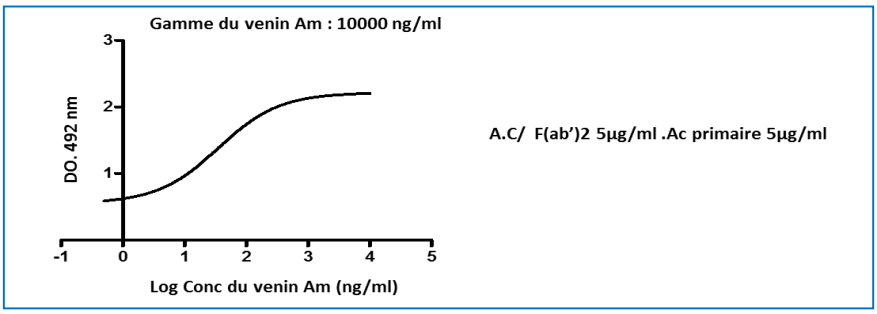

Figure 27 : Courbe étalon du la gamme d'essai (1)

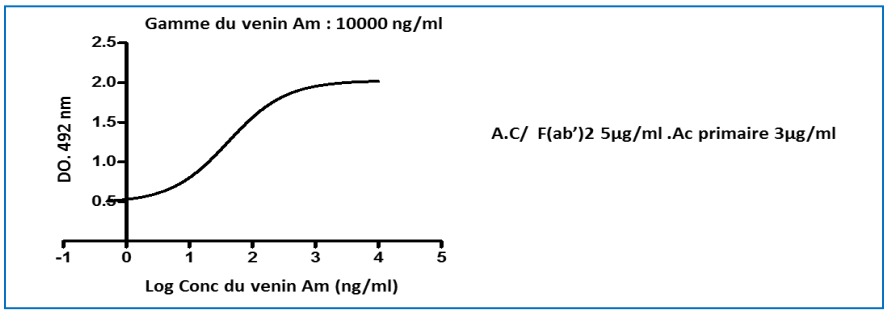

Figure 28 : Courbe étalon du la gamme d'essai (2)

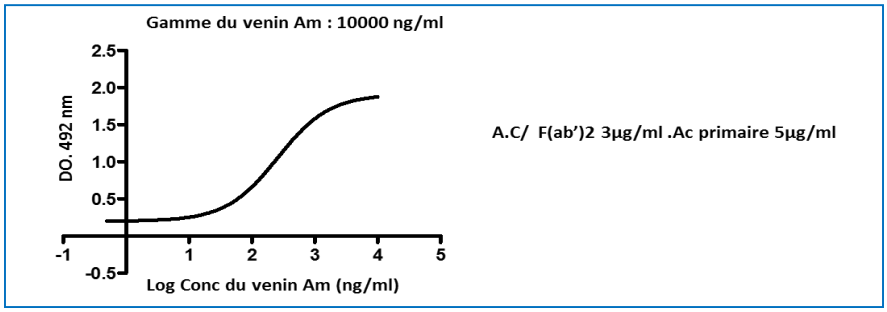

Figure 29 : Courbe étalon du la gamme d'essai (3)

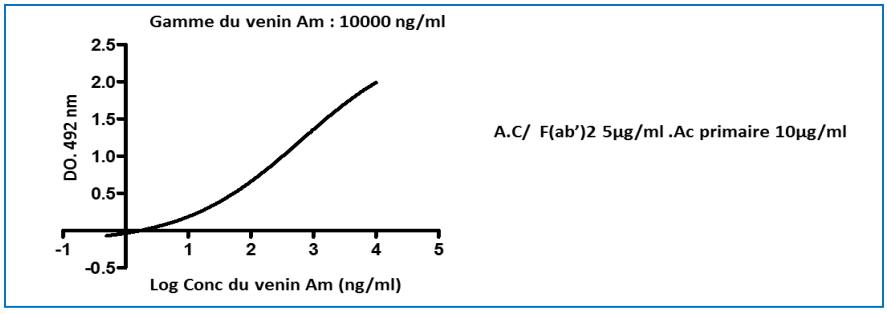

Figure 30 : Courbe étalon du la gamme d'essai (4)

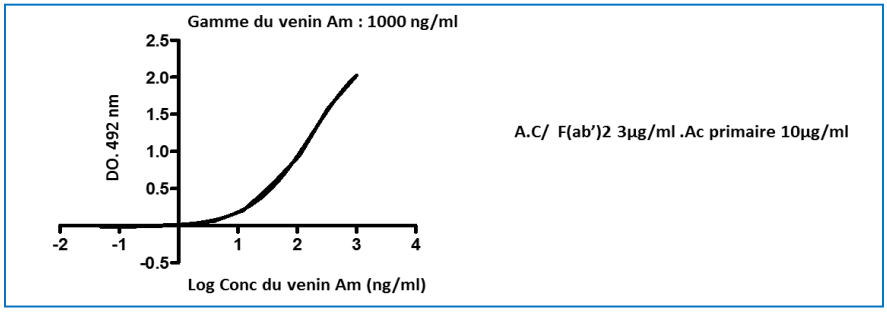

Figure 31 : Courbe étalon du la gamme d'essai (5)

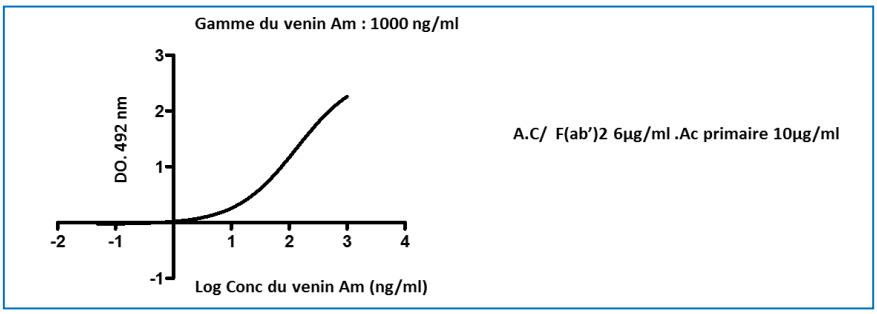

Figure 32 : Courbe étalon du la gamme d'essai (6)

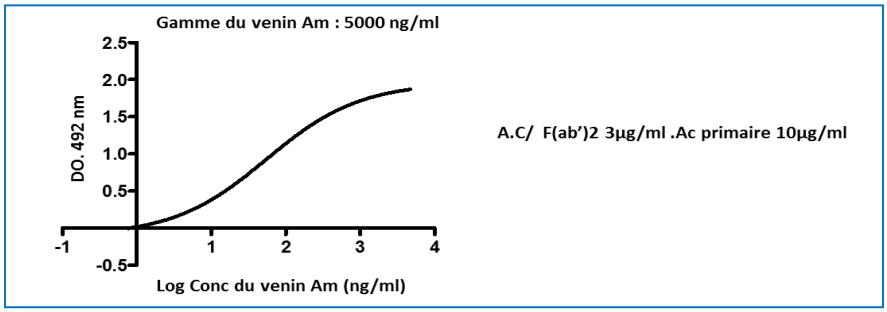

Figure 33 : Courbe étalon du la gamme d'essai (7)

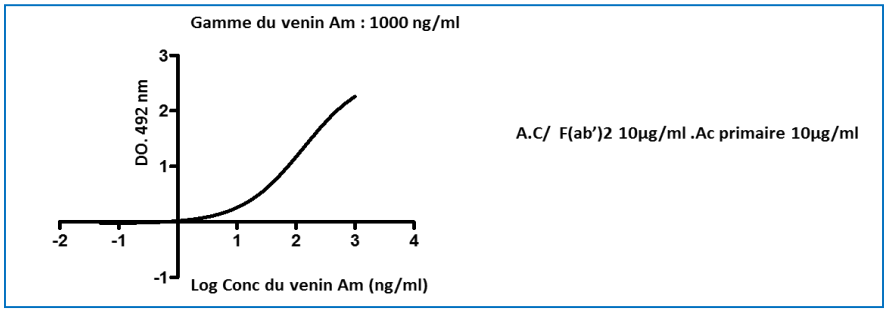

Figure 34 : Courbe étalon du la gamme d'essai (8)

2. Différentes essais des courbes étalons du la gamme du venin du scorpion Buthus occitanus (Bo) déterminée par le logiciel Graph PadPrism 4

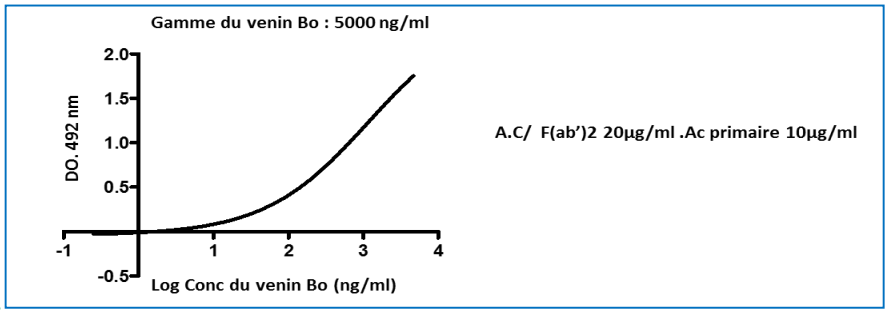

Figure 35 : Courbe étalon du la gamme d'essai (1)

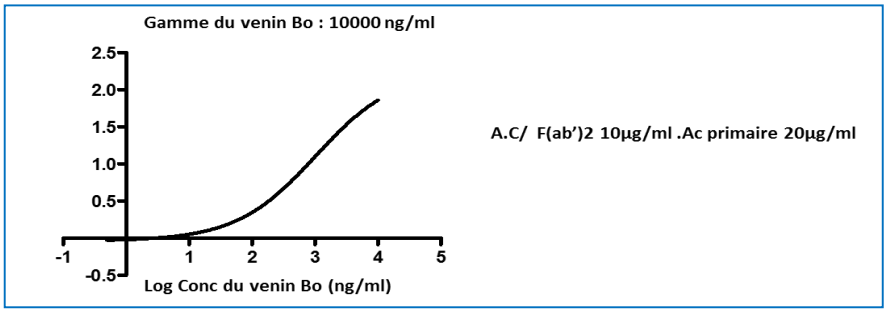

Figure 36 : Courbe étalon du la gamme d'essai (2)

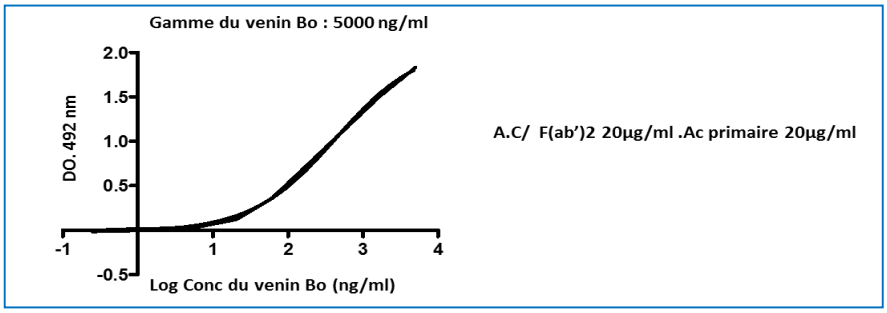

Figure 37 : Courbe étalon du la gamme d'essai (3)

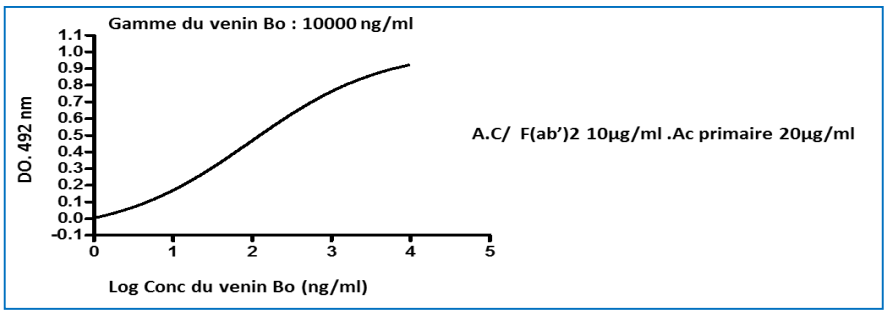

Figure 38 : Courbe étalon du la gamme d'essai (4)

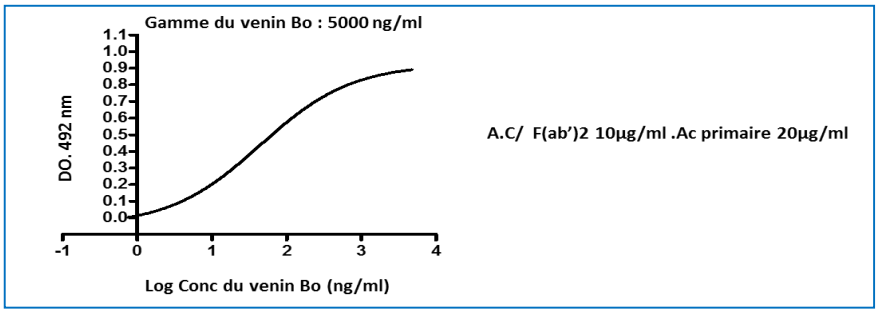

Figure 39 : Courbe étalon du la gamme d'essai (5)

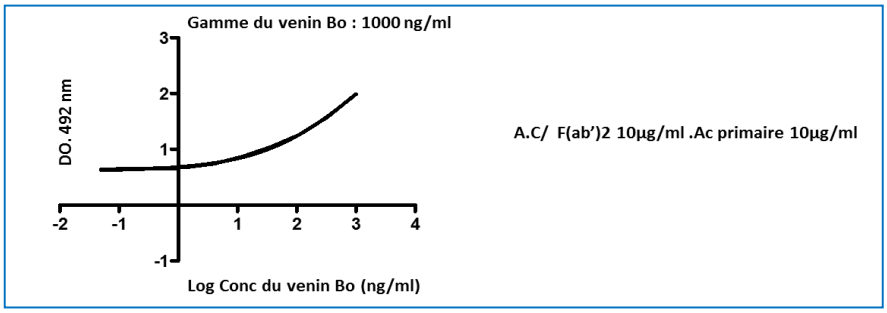

Figure 40 : Courbe étalon du la gamme d'essai (6)

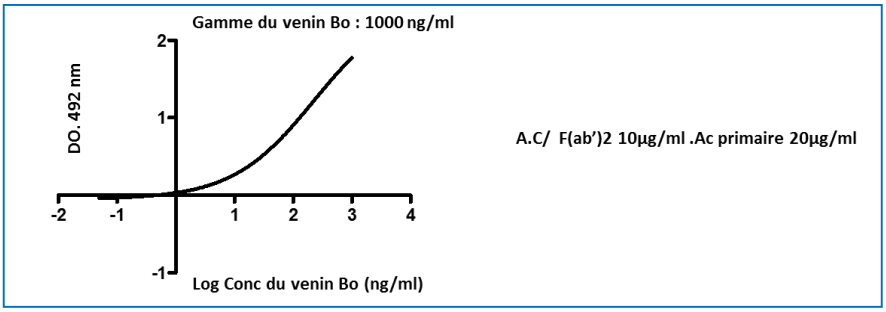

Figure 41 : Courbe étalon du la gamme d'essai (7)

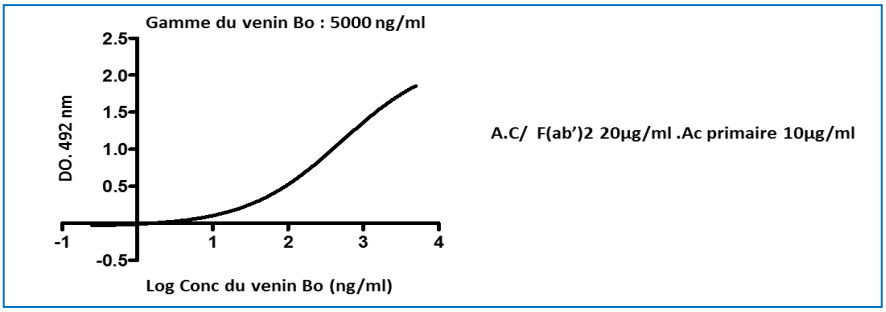

Figure 42 : Courbe étalon du la gamme d'essai (8)

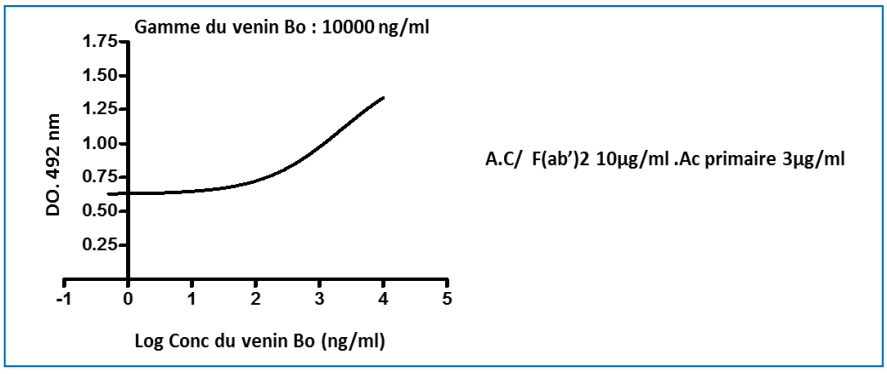

Figure 43 : Courbe étalon du la gamme d'essai 9