



Algerian Journal Of Health Sciences

Numéro Spécial

Envenimation Scorpionique

Préambule

LARABA-DJEBBARI FATIMA

Articles Originaux

Aperçu sur les scorpions de l'Algérie

SADINE SALAH EDDINE, DJILANI SALMA, KERBOUA KHEIR EDDINE

Propriétés anti-oxydante et anti-inflammatoire de l'huile essentielle de *Salvia officinalis* sur les effets immunopathologiques induits par l'envenimation scorpionique

LADJEL-MENDIL AMINA, LARABA-DJEBARI FATIMA

Bienfaits du thé vert (*Camellia sinensis*) dans la pathogénie de l'envenimation scorpionique

MEGDAD-LAMRAOUI AMAL, ADI-BESSALEM SONIA, LARABA-DJEBARI FATIMA

Le Venin d'*Androctonus australis hector* Induit une Réponse de Type Immuno-Allergique : Comparaison avec un Modèle Expérimental d'Allergie

YOUSFI-CHAÏR IMÈNE, LARABA-DJEBARI FATIMA, HAMMOUDI-TRIKI DJELILA

Effet neuroprotecteur de la coenzyme Q10 sur les troubles neurologiques induits chez un modèle expérimental d'épilepsie

AHRAS-SIFI NESRINE AND LARABA-DJEBARI FATIMA

Caractérisation de l'activité cytotoxique des composants du venin de scorpion sur une lignée cellulaire cancéreuse

BÉCHOHRA LOUISA, LARABA-DJEBARI FATIMA AND HAMMOUDI-TRIKI DJELILA

Synthèse par chimie verte de nanoparticules d'argent et leur utilisation comme système de délivrance d'antigènes

NAIT MOHAMED FAEZ AMOKRANE, NOURI ABDELMOUNAIM, LARABA-DJEBARI FATIMA

Commentaires sur l'utilisation de l'immunothérapie antiscorpionique en Algérie

KERBOUA KHEIR EDDINE, SOUALHI ISLEM, DJILANI SALMA, DELMA EL KILANI, SADINE SALAH EDDINE, ATHMAN MOHAMMED AMINE, GHEZAL MOHAMMED, BECHOUNI TAMADHOR, GUEDDA HICHAM, ECHIKH MOHAMMED, ABIDI LAKHDAR, DJENNOUHAT KAMAL

Revue Générale

Immunotherapies and nano-vectorization: new trends on scorpion envenomation treatments

NAIT MOHAMED FAEZ AMOKRANE, NOURI ABDELMOUNAIM, LARABA-DJEBARI FATIMA

Mises au Point

Notions sur l'Immuno-allergologie de l'envenimation scorpionique

KERBOUA KHEIR EDDINE, DELMA KILANI, SOUALHI ISLEM, DJILANI SALMA

Prise en charge de l'envenimation scorpionique : Expérience de 30 ans à l'hôpital de Ouargla

DELMA KILANI, DOUACHE MÉRÉM, SOUALHI MED ISLEM, KERBOUA KHEIR EDDINE

Sérothérapie antiscorpionique : efficacité clinique, aspects pré cliniques, et perspectives d'une nanothérapie future

DJILANI SALMA, SADINE SALAH EDDINE, KERBOUA KHEIR EDDINE

Est ce qu'il y'a une place pour l'assistance cardiopulmonaire (ECMO) dans la prise en charge des envenimations scorpioniques graves ?

SOUALHI MOHAMED ISLEM, DELMA KILANI, KERBOUA KHEIREDDINE, ZBOUCHI MALIK, ACHOUR TOUFIK IAICHE

Lettre à l'Editeur

Notions sur l'Immuno-allergologie de l'Immunothérapie antiscorpionique pour les médecins Sahariens

DJENOUHAT KAMEL, KERBOUA KHEIR EDDINE, TAGUEMOUNT SIHEM

Recomandations Aux Auteurs



Présentation de la revue AJHS

L'Algerian Journal of Health Sciences (AJHS) est une revue scientifique d'accès libre en ligne et à comité de lecture national et international. Aucun paiement n'est exigé pour les travaux soumis. L'AJHS est régi par la convention « Creative Commons » Attribution-Non Commercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0).

AJHS est une revue semestrielle (deux numéros par an), dédiée à publier des articles innovants et de haute qualité, en Français, en Anglais ou en Arabe, permettant une meilleure compréhension des progrès en Sciences de la Santé.

La revue publie des mises au point, des articles originaux, des cas cliniques, des notes techniques, des communications brèves, des lettres à l'éditeur ainsi que des articles de synthèse/revue dans le domaine des Sciences de la Santé au sens large.

Des numéros spéciaux sont publiés selon les événements ou les séminaires ou workshops organisés par l'Agence Thématique de Recherche en Sciences de la Santé (ATRSS).

Étant l'organe de publication officiel de l'ATRSS, la revue est soutenue par la Direction Générale de la Recherche Scientifique et du Développement Technologique (DGRSDT) sous tutelle du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique (MESRS).

L'AJHS est publié sous sa version électronique sur le site de l'ATRSS à la page <https://ajhs.atrss.dz/ajhs-accueil.php>.

L'AJHS, avec son caractère pluridisciplinaire et transsectoriel, est au carrefour de nombreuses spécialités dans le domaine des Sciences de la Santé. La revue se veut un véritable forum de discussions et d'échanges entre les chercheurs concernés.

Les objectifs étant de :

- Publier à périodicité régulière les résultats récents des travaux de recherche qui lui sont soumis ;
- Fournir une information fiable et accessible aux chercheurs et utilisateurs;
- Valoriser et archiver les avancées significatives des savoirs scientifiques.

About AJHS

The Algerian Journal of Health Sciences (AJHS) is an international, open access and peer-reviewed journal. No payment is required for the research work submitted. AJHS is governed by the Creative Commons Attribution-Non Commercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0) convention.

AJHS is a biannual journal (two issues per year), dedicated to publishing innovative and high-quality articles, in French, in English or in Arabic, allowing a better understanding of progress in Health Sciences.

The journal publishes updates, original articles, clinical cases, technical notes, short communications, letters to the editor as well as review articles in the field of Health Sciences.

Special issues are published according to events or seminars or workshops organized by the Thematic Agency for Research in Health Sciences (ATRSS).

Being the official publication organ of ATRSS, the journal is supported by the Directorate General of Scientific Research and Technological Development (DGRSDT) under the supervision of the Ministry of Higher Education and Scientific Research (MESRS).

The AJHS is published electronically on the ATRSS website at <https://ajhs.atrss.dz/ajhs-accueil.php>.

The AJHS, with its multidisciplinary and cross-sectoral character, is at the crossroads of many specialties in the field of Health Sciences. It is therefore intended to be a real forum for discussions and exchanges between concerned researchers.

The scopes being to:

- Publish regularly the recent results of the submitted research work;
- Provide reliable and accessible information to researchers and users;
- Promote and archive significant advances in scientific knowledge.

ATRSS : Cité du Chercheur (Ex : IAP) Route de l'Aéroport Ahmed Ben Bella, Es-Sénia, Oran, Algérie.

BP 1801/08-31000 Oran El M'Naouar. Adresse électronique : ajhs@atrss.dz

Site de la revue : <https://ajhs.atrss.dz>

Algerian Journal of Health Sciences

Volume 2 • Supplément 1 (2020) • (AJHS N°3)

Numéro spécial
Envenimation Scorpionique



**Edition de l'Agence Thématique de Recherche en Sciences de la Santé
(ATRSS)**

<https://www.atrss.dz>

Algerian Journal of Health Sciences

Directeur de Publication

AOUFFEN Nabil : Université Oran1 - Algérie

Rédacteur en Chef

BOUZIANI Mustapha : Université Oran 1 - Algérie

Rédacteurs associés

AOUFFEN Nabil : Université Oran1 - Algérie

BOUDJEMA Abdallah : USTO- MB Oran - Algérie

BOUGHRARA Wefa : Ecole Supérieure en Sciences Biologiques d'Oran –Algérie

BOUZID Abdelmalek : Université Alger1 – Algérie

CHENTOUF Amina: Université Oran1 - Algérie

GOURINE Mouna : Université Oran1- Algérie

HAMITOUCHE Chafiaa : Institut Mines Télécom / IMT Atlantique, Brest- France

KHALED Meghit Boumediene: Université Sidi Belabbes- Algérie

MERGHOUB Taha: Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York- USA

MERZOUK Hafida : Université de Tlemcen- Algérie

ZAIDI Zoubida : Université Sétif1- Algérie

Secrétariat

LALAOUI Amel

ZIRMI DJEBBOURI Messaouda

Sommaire

Préambule

LARABA-DJEBBARI FATIMA

Articles Originaux

Aperçu sur les scorpions de l'Algérie	8
<i>SADINE SALAH EDDINE, DJILANI SALMA, KERBOUA KHEIR EDDINE</i>	
<i>SADINE SALAH EDDINE, DJILANI SALMA, KERBOUA KHEIR EDDINE</i>	<i>8</i>
Propriétés anti-oxydante et anti-inflammatoire de l'huile essentielle de <i>Salvia officinalis</i> sur les effets immunopathologiques induits par l'envenimation scorpionique	15
<i>LADJEL-MENDIL AMINA, LARABA-DJEBBARI FATIMA</i>	
<i>LADJEL-MENDIL AMINA, LARABA-DJEBBARI FATIMA</i>	<i>15</i>
Bienfaits du thé vert (<i>Camellia sinensis</i>) dans la pathogénie de l'envenimation scorpionique	25
<i>MEGDAD-LAMRAOUI AMAL, ADI-BESSALEM SONIA, LARABA-DJEBBARI FATIMA</i>	
<i>MEGDAD-LAMRAOUI AMAL, ADI-BESSALEM SONIA, LARABA-DJEBBARI FATIMA</i>	<i>25</i>
Le Venin d'<i>Androctonus australis hector</i> Induit une Réponse de Type Immuno-Allergique : Comparaison avec un Modèle Expérimental d'Allergie	34
<i>YOUSFI-CHAÏR IMÈNE, LARABA-DJEBBARI FATIMA, HAMMOUDI-TRIKI DJELILA</i>	
<i>YOUSFI-CHAÏR IMÈNE, LARABA-DJEBBARI FATIMA, HAMMOUDI-TRIKI DJELILA</i>	<i>34</i>
Effet neuroprotecteur de la coenzyme Q10 sur les troubles neurologiques induits chez un modèle expérimental d'épilepsie	43
<i>AHRAS-SIFI NESRINE AND LARABA-DJEBBARI FATIMA</i>	
<i>AHRAS-SIFI NESRINE AND LARABA-DJEBBARI FATIMA</i>	<i>43</i>
Caractérisation de l'activité cytotoxique des composants du venin de scorpion sur une lignée cellulaire cancéreuse	51
<i>BÉCHOHRA LOUISA, LARABA-DJEBBARI FATIMA AND HAMMOUDI-TRIKI DJELILA</i>	
<i>BÉCHOHRA LOUISA, LARABA-DJEBBARI FATIMA AND HAMMOUDI-TRIKI DJELILA</i>	<i>51</i>
Synthèse par chimie verte de nanoparticules d'argent et leur utilisation comme système de délivrance d'antigènes ...	64
<i>NAIT MOHAMED FAEZ AMOKRANE, NOURI ABDELMOUNAIM, LARABA-DJEBBARI FATIMA</i>	
<i>NAIT MOHAMED FAEZ AMOKRANE, NOURI ABDELMOUNAIM, LARABA-DJEBBARI FATIMA</i>	<i>64</i>
Commentaires sur l'utilisation de l'immunothérapie antiscorpionique en Algérie.....	71
<i>KERBOUA KHEIR EDDINE, SOUALHI ISLEM, DJILANI SALMA, DELMA ELKILANI, SADINE SALAH EDDINE, ATHMAN MOHAMMED AMINE, GHEZAL MOHAMMED, BECHOUNI TAMADHOR, GUEDDA HICHAM, ECHIKH MOHAMMED, ABIDI LAKHDAR, DJENNOUHAT KAMAL</i>	
<i>KERBOUA KHEIR EDDINE, SOUALHI ISLEM, DJILANI SALMA, DELMA ELKILANI, SADINE SALAH EDDINE, ATHMAN MOHAMMED AMINE, GHEZAL MOHAMMED, BECHOUNI TAMADHOR, GUEDDA HICHAM, ECHIKH MOHAMMED, ABIDI LAKHDAR, DJENNOUHAT KAMAL</i>	<i>71</i>

Revue Générale

Immunothérapies et nanovectorisation : nouvelles perspectives pour le traitement antiscorpionique.....	90
<i>NAIT MOHAMED FAEZ AMOKRANE, LARABA-DJEBBARI FATIMA</i>	
<i>NAIT MOHAMED FAEZ AMOKRANE, LARABA-DJEBBARI FATIMA</i>	<i>90</i>

Mises en Point

Notions sur l'Immuno-allergologie de l'envenimation scorpionique.....	98
<i>KERBOUA KHEIR EDDINE , DELMA KILANI, SOUALHI ISLEM, DJILANI SALMA</i>	
<i>KERBOUA KHEIR EDDINE , DELMA KILANI, SOUALHI ISLEM, DJILANI SALMA</i>	<i>98</i>
Prise en charge de l'envenimation scorpionique : Expérience de 30 ans à l'hôpital de Ouargla	105
<i>DELMA KILANI, DOUACHE MÉRÉIEM, SOUALHI MOHAMED ISLEM, KERBOUA KHEIR EDDINE</i>	
<i>DELMA KILANI, DOUACHE MÉRÉIEM, SOUALHI MOHAMED ISLEM, KERBOUA KHEIR EDDINE</i>	<i>105</i>
Sérothérapie antiscorpionique : efficacité clinique, aspects pré cliniques, et perspectives d'une nanothérapie future	112
<i>DJILANI SALMA, SADINE SALAH EDDINE, KERBOUA KHEIR EDDINE</i>	
<i>DJILANI SALMA, SADINE SALAH EDDINE, KERBOUA KHEIR EDDINE</i>	<i>112</i>
Est ce qu'il y'a une place pour l'assistance cardiopulmonaire (ECMO) dans la prise en charge des envenimations scorpioniques graves ?.....	118
<i>SOUALHI MOHAMED ISLEM, DELMA KILANI, KERBOUA KHEIREDDINE, ZBOUCHI MALIK, IAICHE ACHOUR TOUFIK</i>	
<i>SOUALHI MOHAMED ISLEM, DELMA KILANI, KERBOUA KHEIREDDINE, ZBOUCHI MALIK, IAICHE ACHOUR TOUFIK</i>	<i>118</i>

Lettre à l'Editeur

Notions sur l'Immuno-allergologie de l'Immunothérapie antiscorpionique pour les médecins Sahariens.....	122
<i>DJENNOUHAT KAMEL, KERBOUA KHEIR EDDINE, TAGUEMOUNT SIHEM</i>	
<i>DJENNOUHAT KAMEL, KERBOUA KHEIR EDDINE, TAGUEMOUNT SIHEM</i>	<i>122</i>

Recommandation aux Auteurs

Contents

Preamble

LARABA-DJEBBARI FATIMA

Original Articles

Overview on scorpions of Algeria	8
<i>SADINE SALAH EDDINE, DJILANI SALMA, KERBOUA KHEIR EDDINE</i>	8
Antioxidant and Anti-Inflammatory properties of Essential Oils of <i>Salvia officinalis</i> on immunopathological effects induced by scorpion envenomation	15
<i>LADJEL-MENDIL AMINA, LARABA-DJEBARI FATIMA</i>	15
Medicinal benefits of green tea (<i>Camellia sinensis</i>) on the envenomation pathogenesis	25
<i>MEGDAD-LAMRAOUI AMAL, ADI-BESSALEM SONIA, LARABA-DJEBARI FATIMA</i>	25
Androctonus australis hector Venom Induced Immuno-Allergic Type Response: Comparison with an Experimental Model of Allergy	34
<i>YOUSFI-CHAÏRIMÈNE, LARABA-DJEBARI FATIMA, HAMMOUDI-TRIKI DJELILA</i>	34
Neuroprotective effect of Coenzyme Q10 against neurological disorders induced in an experimental model of epilepsy	43
<i>AHRAS-SIFINESRINE AND LARABA-DJEBARI FATIMA</i>	43
Cytotoxic activity characterization of scorpion venom components on cancer cell line	51
<i>BÉCHOHRA LOUISA, LARABA-DJEBARI FATIMA AND HAMMOUDI-TRIKI DJELILA</i>	51
Green synthesis of silver nanoparticles and their application as antigen delivery system	64
<i>NAIT MOHAMED FAEZ AMOKRANE, NOURI ABDELMOUNAIM, LARABA-DJEBARI FATIMA</i>	64
Commentary on scorpion antivenom immunotherapy in Algeria	71
<i>KERBOUA KHEIR EDDINE, SOUALHI ISLEM, DJILANI SALMA, DELMA EL KILANI, SADINE SALAH EDDINE, ATHMAN MOHAMMED AMINE, GHEZAL MOHAMMED, BECHOUNI TAMADHOR, GUEDDA HICHAM, ECHIKH MOHAMMED, ABIDI LAKHDAR, DJENNOUHAT KAMAL</i>	71

Review

Immunotherapies and Nano-vectorization: new trends on scorpion envenomation treatments	90
<i>NAIT MOHAMED FAEZ AMOKRANE, LARABA-DJEBARI FATIMA</i>	90

Updates

Some Immuno-allergy aspects of Scorpion envenoming syndrome	98
<i>KERBOUA KHEIR EDDINE, DELMA KILANI, SOUALHI ISLEM, DJILANI SALMA</i>	98
Scorpion envenomation management: Experience of 30 years at the Hospital of Ouargla	105
<i>DELMA KILANI, DOUACHE MÉRÉMIEM, SOUALHI MOHAMED ISLEM, KERBOUA KHEIR EDDINE</i>	105
Antiscorpionic serotherapy: clinical efficacy, preclinical aspects, and prospects for future nanotherapy	112
<i>DJILANI SALMA, SADINE SALAH EDDINE, KERBOUA KHEIR EDDINE</i>	112
Is there a place for cardiopulmonary assistance (ECMO) in the management of severe scorpionic envenomations?...	118
<i>SOUALHI MOHAMED ISLEM, DELMA KILANI, KERBOUA KHEIREDDINE, ZBOUCHI MALIK, IAICHE ACHOUR TOUFIK</i>	118

Letter to the Editor

Some Immuno-allergy aspects of Anti-scorpion Immunotherapy for Saharan Doctors	122
<i>DJENNOUHAT KAMEL, KERBOUA KHEIR EDDINE, TAGUEMOUNT SIHEM</i>	122

Instructions for Authors

ÉDITORIAL

L'envenimation par les scorpions représente un réel problème de santé publique et une urgence médicale, principalement pour les enfants et les personnes âgées. Elle sévit dans de nombreuses régions du monde et particulièrement dans les zones rurales tropicales.

La pathogenèse induite lors d'une piqûre de scorpion est multifactorielle ; elle est caractérisée par un syndrome de détresse respiratoire aiguë, une réponse inflammatoire systémique suivie d'une défaillance multi-viscérale pouvant être fatale dans les cas les plus sévères.

La connaissance approfondie de cette pathogenèse tant du point de vue fondamental que clinique est un prérequis pour l'optimisation de l'immunothérapie en tant que traitement spécifique et le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour une meilleure prise en charge des patients envenimés.

Par ailleurs, tout en se préservant de cet accident souvent fatal, l'Homme peut tirer profit des composants des venins dont les vertus pharmacologiques ne sont plus à démontrer.

Ce numéro spécial dédié à «l'Envenimation scorpionique » n'a pas la prétention de couvrir la totalité des aspects relatifs à ce vaste sujet, il témoigne cependant de l'intérêt qu'accordent les secteurs de la santé et de la recherche scientifique de notre pays à cette problématique. Il permet également une meilleure visibilité des équipes de recherche et des chercheurs qui œuvrent autour de cette problématique pour une prise en charge optimale des personnes dans les régions à risque.

Les étudiants de graduation et post-graduation, les enseignants-chercheurs, les hospitalo-universitaires, trouveront dans ce modeste numéro, certaines réponses aux nombreuses questions que tout un chacun pourrait se poser sur cette problématique complexe.

Pr Laraba-Djebbari Fatima



Disponible en ligne
<https://www.atrss.dz/ajhs>



Article Original

Aperçu sur les Scorpions de l'Algérie

Overview on Scorpions of Algeria

Sadine Salah Eddine^{*1,2}, **Djilani Salma**³, **Kerboua Kheir Eddine**⁴

¹Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la terre, Université de Ghardaïa, BP 455 Ghardaïa 47000, Algeria.

²Laboratoire de Recherche sur la Phœniciculture, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université KASDI Merbah-Ouargla, 30000, Algeria.

³Laboratoire de Recherche en Pharmacie Galénique et Industrielle, Université d'Alger, 16000, Algeria.

⁴Laboratoire de Médecine Saharienne, Faculté de Médecine, Université Kasdi Merbah-Ouargla, 30000, Algeria

RESUME

Introduction : Depuis le travail de Vachon sur les scorpions de l'Afrique du Nord publié en 1952 à l'Institut Pasteur d'Algérie qui semblait fixer une limite finale aux connaissances de la faune scorpionique algérienne à un nombre de 24 espèces et sous-espèces et jusqu'en l'an 2000, les recherches sur cette faune demeuraient faibles voire nulles. L'objectif de ce travail est de recenser toutes les espèces répertoriées à ce jour en Algérie. **Matériels et méthodes :** Afin d'actualiser cette liste, une révision morphologique est effectuée sur un ancien matériel de scorpions déposé au niveau du Muséum National d'Histoire Naturelles- Paris (France) ainsi que sur un autre matériel capturé récemment durant la période 2012-2019. **Résultats :** Un certain nombre de sous-espèces est élevé au rang d'espèce, tandis que d'autres sont mises en synonyme. Par conséquent, la liste actuelle de la faune scorpionique algérienne comporte 46 espèces et sous-espèces réparties en 14 genres et trois familles (Buthidae, Euscorpiidae et Scorpionidae). Cette liste des espèces scorpioniques de l'Algérie, atteste d'une diversité très importante estimée à 1,8% des espèces connues dans le monde, avec 24 espèces récemment découvertes dont une grande partie est endémique (58%) et que les espèces potentiellement dangereuses pour l'homme sont estimées à 20%. **Conclusion :** Nos résultats sur la diversité scorpionique algérienne peuvent être considérés comme une donnée de base pour les travaux des autres spécialistes tels que les épidémiologistes dans le cadre de l'envenimation scorpionique, les biochimistes pour la qualité et la diversité des venins et les immunologistes pour développer des immunothérapies adéquates.

MOTS CLES: Scorpion, envenimation, espèce, endémique, Algérie

ABSTRACT:

Background: Since the important work of Vachon on the scorpions of North African published in 1952 at the Pasteur Institute of Algeria, seems fix a limit to the knowledge of the Algerian scorpionic faunato a number of 24 species and subspecies and up to 2000, research on this fauna remained very weak. This study aims to identify all the species recorded to date in Algeria. **Material and Methods:** In order to update this list, a morphological revision is carried out on an old scorpion material deposited in Muséum National d'Histoire Naturelles- Paris (France) and other material recently captured during the period 2012-2019. **Results:** A certain number of subspecies is raised to the rank of species, while others are synonymous. Therefore, the current list of Algerian scorpion fauna contains 46 species and subspecies divided into 14 genera and three families (Buthidae, Euscorpiidae et Scorpionidae). This

scorpion list, attests to a very important diversity estimated 1.8% of the world's known species, with 24 recently discovered species, a large part of them are endemic (58%). However, potentially dangerous species for humans are estimated at 20%. **Conclusion** : Our results on Algerian scorpion diversity can be considered as a basic data for the other specialists such as epidemiologists in case of scorpion sting envenomation, biochemists for the quality and diversity of venoms and immunologists to develop adequate immunotherapy.

KEYWORDS: Scorpion, envenomation, species, endemic, Algeria

* Auteur Corredpondant. Tel.: +213 660 396 971; fax: /
Adresse E-mail: sse.scorpion@yahoo.fr / sadine@univ-ghardaia.dz

Date de soumission : 08/07/2020
Date de révision : 14/07/2020
Date d'acceptation : 25/07/2020

1. Introduction

Les scorpions sont les Arthropodes Chélicérates les plus anciennement connus. Ils font leur apparition en milieu aquatique au Silurien, dont les premiers sont fossiles aquatiques ou du moins amphibiens, datant de 425 à 450 millions d'années [1].

Dans le monde, plus de 2500 espèces de scorpions ont été décrites par les zoologistes [2]. Ils possèdent de grandes répartitions, car il s'agit d'animaux lents, à déplacements réduits, très attachés des biotopes [3,4].

Le travail de Vachon publié en 1952 à l'Institut Pasteur d'Algérie sur les scorpions de l'Afrique du Nord semble fixer une limite finale aux connaissances de la faune scorpionique algérienne à un nombre de 24 espèces et sous-espèces. En 1992, El-Hennawy [5], dans son catalogue sur les scorpions des pays arabes basé sur des recherches bibliographiques a cité 24 espèces pour l'Algérie. En 2000, Fet [6], dans son catalogue des scorpions du monde a ajouté deux espèces à cette liste, il s'agit de: *Compsobuthus berlandi* Vachon, 1950 [7] et *Scorpio punicus* Fet, 2000 [6].

Le présent travail a deux principaux objectifs : le premier consiste à actualiser la liste systématique des espèces scorpioniques de l'Algérie y compris le changement des statuts de certaines espèces et sous-espèces suite à une révision morphologique de l'ancien matériel de scorpions déposé au niveau du Muséum National d'Histoire Naturelles- Paris (France) par le docteur Lourenço R.W. et une exploitation rationnelle d'un matériel récemment capturé durant la période de 2012-2019. Le deuxième objectif consiste à présenter les espèces scorpioniques dangereuses ou d'importance médicale, afin de faciliter le travail d'autres spécialistes tels que les épidémiologistes dans le cadre de l'envenimation scorpionique, les

biochimistes pour la qualité et la diversité des venins et les immunologistes pour développer des immunothérapies adéquates.

2. Matériels et Méthodes

Ce travail est scindé en deux parties : un travail bibliographique qui consiste à feuilleter les protologues de toutes les espèces de l'Algérie au niveau du Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris et un travail de recherche en collaboration scientifique entre le département des Sciences Agronomique de l'Université de Ghardaïa (Algérie) et le département « Systématique et évolution » du Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris (France). Cette collaboration consiste à exploiter le matériel animal capturé durant la période 2012-2019. Le matériel animal est collecté des différentes régions du territoire national (Figure 1).

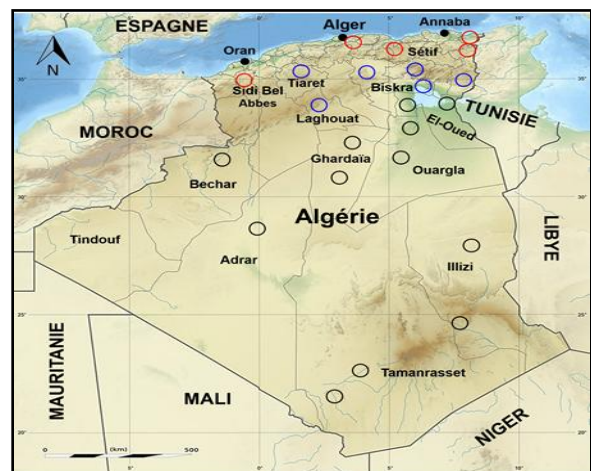


Figure 1 : Répartition des régions échantillonnées.

Régions telliennes en cercles rouges ; Régions steppiennes en cercles bleues ; Régions sahariennes en cercles noirs.
https://www.researchgate.net/profile/Salah_Sadine

L'identification de ces scorpions est basée sur des critères morphologiques simples en utilisant les clés

d'identification de Vachon [3,8] telles que les trichobothries ou soies, la disposition des carènes, la forme de la vésicule à venin ainsi que l'aiguillon, la forme des pattes mâchoires, l'extrémité des pattes ambulatoires, le nombre de dents des peignes et la disposition oculaire (des yeux). Lorsque ces caractères s'avèrent insuffisants à l'identification, les spécimens sont envoyés au MNHN-Paris (France) pour identification ou confirmation.

3. Résultats

La révision de l'ancien matériel de scorpions déposée au niveau du MNHN-Paris (France) et d'autre matériel récemment capturé, nous a permis de dresser une liste actualisée de la faune scorpionique algérienne contenant 46 espèces et sous-espèces réparties en 14 genres et trois familles (*Buthidae*, *Euscorpidae* et *Scorpionidae*). Les résultats sont récapitulés sur le **Tableau 1**.

Tableau 1 : Liste des espèces scorpioniques inventoriées en Algérie

Famille Buthidae C.L. Koch, 1837
Genre <i>Androctonus</i> Ehrenberg, 1828
<i>A. aeneus</i> (Koch, 1839)
<i>A. amoreuxi</i> (Audouin, 1826)
<i>A. australis</i> (Linnaeus, 1758)
<i>A. eburneus</i> (Pallary, 1928)
<i>A. hoggarensis</i> (Pallary, 1929)
Genre <i>Buthacus</i> Birula, 1908
<i>B. ahaggar</i> (Lourenço, Kourim & Sadine, 2017)
<i>B. algerianus</i> (Lourenço, 2006)
<i>B. arenicola</i> (Simon, 1885)
<i>B. armasi</i> (Lourenço, 2013)
<i>B. birulai</i> (Lourenço, 2006)
<i>B. elmenia</i> (Lourenço & Sadine, 2017)
<i>B. foleyi</i> (Vachon, 1948)
<i>B. samiae</i> (Lourenço & Sadine, 2015)
<i>B. spinatus</i> (Lourenço, Bissati & Sadine, 2016)
Genre <i>Butheoloides</i> Hirst, 1925 (01 espèce)
<i>B. schwendingeri</i> (Lourenço, 2002)
Genre <i>Buthiscus</i> Birula, 1905 (01 espèce)
<i>B. bicalcaratus</i> (Birula, 1905)
Genre <i>Buthus</i> Leach, 1815 (08 espèces)
<i>B. apiatus</i> (Lourenço, El Bouhissi & Sadine, 2020)
<i>B. aures</i> (Lourenço & Sadine, 2016)
<i>B. boussaadi</i> (Lourenço, Chichi & Sadine, 2018)
<i>B. paris</i> (C.L. Koch, 1839)
<i>B. pusillus</i> (Lourenço, 2013a)
<i>B. saharicus</i> (Sadine, Bissati & Lourenço, 2016)
<i>B. tassili</i> (Lourenço, 2002)
<i>B. tunetanus</i> (Herbst, 1800)
Genre <i>Cicileus</i> Vachon, 1948 (03 espèces)
<i>C. exilis</i> (Pallary, 1928)
<i>C. hoggarensis</i> (Lourenço & Rossi, 2015)
<i>C. montanus</i> (Lourenço & Rossi, 2015)
Genre <i>Compsobuthus</i> Vachon, 1949 (02 espèces)
<i>C. berlandi</i> (Vachon, 1950)
<i>C. tassili</i> (Lourenço, 2010)

Suite Tableau 1 :

Genre <i>Hottentotta</i> Birula, 1908 (03 espèces)
<i>H. franzwerneri</i> (Birula, 1914)
<i>H. gentili</i> (Pallary, 1924)
<i>H. hoggarensis</i> (Lourenço & Leguin, 2014)
Genre <i>Lissothus</i> Vachon, 1948 (01 espèce)
<i>L. chaambi</i> (Lourenço & Sadine, 2014)
Genre <i>Leiurus</i> Ehrenberg, 1828 (02 espèces)
<i>L. hoggarensis</i> (Lourenço, Kourim & Sadine, 2018)
<i>L. quinquestriatus</i> (Ehrenberg, 1828)
Genre <i>Orthochirus</i> Karsch, 1891 (02 espèces)
<i>O. innesi</i> (Simon, 1910)
<i>O. tassili</i> (Lourenço & Leguin, 2011)
Genre <i>Pseudolissothus</i> Lourenço, 2001 (01 espèce)
<i>P. pusillus</i> (Lourenço, 2001)
Famille Euscorpidae Laurie, 1896
Genre <i>Euscorpis</i> Thorell, 1876 (03 espèces)
<i>E. italicus</i> (Herbst, 1800)
<i>E. flavicaudisflavicaudis</i> (DeGeer, 1778)
<i>E. flavicaudis galitae</i> (Caporiacco, 1950)
Famille Scorpionidae Latreille, 1802
Genre <i>Scorpio</i> Linnaeus, 1758 (04 espèces)
<i>S. maurus</i> (Linnaeus, 1758)
<i>S. maurus trarasensis</i> (Bouisset & Larrouy, 1962)
<i>S. punicus</i> (Fet, 2000)
<i>S. tassili</i> (Lourenço & Rossi, 2016)

Cette liste compte 24 espèces récemment découvertes depuis l'an 2000 à ce jour. L'évolution de ces découvertes est résumée dans la **Figure 2**.

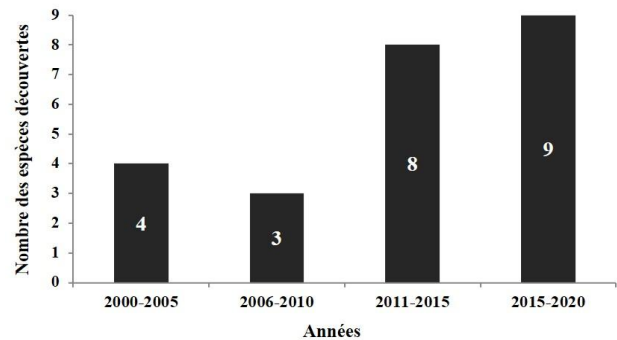


Figure 2 : Evolution du nombre de nouvelles espèces de scorpions découvertes entre 2000 et 2020

4. Discussion

La liste actualisée des espèces scorpioniques de l'Algérie compte 46 espèces et sous-espèces, atteste d'une diversité très importante estimée à 1,8 % des espèces connues dans le monde [2]. Vue la difficulté et le risque lié à la manipulation des scorpions et la vastitude du territoire d'étude, ce genre de travaux demeure limité sur quelques pays de l'Afrique du Nord à savoir : l'Egypte avec une liste de 35 espèces [9] et le Maroc avec 61 espèces et sous-espèces réparties en 12 genres et deux familles [10].

En termes d'endémisme, l'Algérie compte au minimum 26 espèces endémiques soit 58% de la richesse nationale. Cependant, au Maroc les scorpions sont à plus de 70% d'endémisme [10]. Par ailleurs, en Egypte l'endémisme ne représente que 17% (6 espèces) [09].

L'évolution en nombre des espèces nouvelles en Algérie durant la dernière décennie est très importante ; cela est dû essentiellement aux efforts laborieux réalisés sur le terrain ainsi qu'à l'étroite collaboration conduite avec le MNHN-Paris France, qui nous a facilité d'une part l'accès à la collection ancienne et d'autre part, l'échange et la maîtrise des techniques d'identification des scorpions.

Néanmoins, la liste des 24 espèces découvertes durant les deux dernières décennies demeure loin d'être la plus exhaustive, vue la possibilité de trouver d'autres espèces. Nous estimons ainsi, que la diversité scorpionique algérienne à l'heure actuelle, ne représente que 70% du nombre réel à découvrir.

Il est à noter, que les scorpions sont tous venimeux, mais ils ne sont pas tous mortels pour l'Homme. Plusieurs auteurs ont déclaré que le problème de scorpionisme est dû à un nombre limité d'espèces [11], qui serait de l'ordre de 50 [12].

En Algérie, nous estimons que 20% des espèces scorpioniques sont potentiellement dangereuses pour l'Homme, essentiellement celles qui appartiennent aux genres suivants : *Androctonus*, *Buthiscus*, *Buthus* et *Leiurus*. La liste de ces espèces est détaillée ci-dessous.

Liste des espèces scorpioniques considérées dangereuses et d'importance médicale en Algérie

4.1. *Androctonus aeneas* Koch, 1839

C'est un scorpion de couleur brun sombre à noir (Figure 3), pouvant mesurer jusqu'à 8cm de longueur, avec une extrémité plus claire, des pattes ambulatoires et des pinces [3,13]. Cette espèce est classée comme la plus grande espèce noire en Algérie [14].

A. aeneas occupe la bande horizontale centrale du pays, de Tébessa et Khenchela à l'Est, jusqu'à Naâma à l'Ouest [3,15]. Il a été signalé également dans la steppe algérienne (M'Sila) [16] et à Sidi Bel Bel Abbes (Nord-ouest) [17] et même au Sahara dans la région d'El-Oued [18] et de Ghardaïa [19].

Bien que la toxicité de cette espèce n'est pas encore testée, il est soupçonné d'être potentiellement dangereux pour l'Homme.



Figure 3 : *Androctonus aeneas*

4.2. *Androctonus amoreuxi* (Audouin, 1826)

Il s'agit d'un scorpion de grande taille, considéré comme la plus grande espèce en Algérie [19], pouvant atteindre 12cm de longueur, avec une queue beaucoup plus fine à partir du 3^{ème} anneau (Figure 4).

A. amoreuxi présente une répartition très vaste [3]. Il se trouve tout au long d'une bande horizontale de l'Est vers l'Ouest [14]. Il est très abondant dans le Sahara septentrional algérien (El-Oued, Ouargla et Ghardaïa) [14,18,19].

Cette espèce est classée moins dangereuse par rapport aux autres espèces du genre *Androctonus*. Cependant, plusieurs cas d'envenimation scorpionique par cette espèce ont été enregistrés à El-Oued et à Ghardaïa.



Figure 4 : *Androctonus amoreuxi* [14]

4.3. *Androctonus australis* (Linnaeus, 1758)

Il s'agit d'une espèce de grande taille, pouvant mesurer plus de 10 cm, facile à identifier par sa queue plus épaisse (Figure 5), de teinte jaune paille, avec des parties du corps (pinces et derniers anneaux de la queue) plus ou moins assombries [3].

A. australis est l'espèce la plus répandue dans le Sahara septentrional algérien, ayant une large répartition surtout à proximité des habitations [14].

Récemment, plusieurs auteurs ont signalé la présence de cette espèce au Centre, Nord et jusqu'à l'extrême Sud de l'Algérie surtout dans la région de M'Sila [16] et à Sidi Bel Bel Abbes [17]. Quelques spécimens d'*A. australis* ont été capturés dans la région de Ablessa à Tamanrasset [20].



Figure 5 : *Androctonus australis*

Cette espèce est non seulement la seule qui fréquente les milieux urbains [19], mais elle est classée la plus dangereuse à l'échelle mondiale [11] et responsable d'un fort taux de mortalité chez l'être humain [21].

4.4. *Androctonus hoggarensis* (Pallary, 1929)

C'est une espèce de grande taille, pouvant mesurer plus de 10 cm de longueur. En général, sa coloration varie entre vert sombre et brun chocolat (Figure 6), mais les pattes ambulatoires sont jaunes-rougeâtres [13]. Cette espèce est endémique en Algérie ; elle a été signalée plusieurs fois à Tamanrasset [20]. Elle est inconnue du point de vue toxicité et répartition géographique, mais, comme toutes les espèces du genre *Androctonus*, elle doit être dangereux pour l'Homme.



Figure 6 : *Androctonus hoggarensis*

4.5. *Buthiscus bicalcaratus* Birula, 1905

Ce scorpion a une taille pouvant atteindre 7 cm de longueur, de couleur jaune claire avec de gros yeux médians [3,22]. Les pinces sont globuleuses par rapport aux espèces du genre *Buthacus* (Figure 7).

B. bicalcaratus est une espèce désertique. Sa distribution est limitée au Sud de l'Algérie [3]. Elle est classée comme assez rare [19], car elle préfère des biotopes mixtes d'Erg et de palmeraies [18,19].

La morbidité de cette espèce demeure méconnue. Cependant, au Mali, elle est classée parmi les espèces dangereuses avec une piqûre douloureuse [23,24].



Figure 7: *Buthiscus bicalcaratus* [19]

4.6. *Buthus tunetanus* (Herbst, 1800)

Scorpion de taille moyenne entre 5 et 7 cm, de couleur jaune paille avec un abdomen plus sombre mais sans bandes latérales bien caractérisées (Figure 8) [3].

B. tunetanus appartient au complexe des espèces *Buthus occitanus* [25]. Ce complexe compte en Algérie 8 espèces réparties sur tout le territoire national, dont la plus répandue est *B.tunetanus* d'El-Oued et Ouargla au Sud [18,19], M'Sila au centre [16] et Sidi Bel Abbes au Nord-ouest [17].

B. occitanus a une dangerosité variable [11]. En Algérie, cette espèce a été anciennement classée en deuxième position après *Androctonus australis* en matière de morbidité. Notons que 75% des espèces de ce complexe sont nouvellement découvertes en Algérie, la morbidité de ces espèces reste à confirmer.



Figure 8 : *Buthus tunetanus* [19]

4.7. *Leiurushoggarensis*

C'est une espèce de grande taille pouvant mesurer 9,5 cm de longueur. De couleur jaune à jaune orangé avec un 5^{ème} anneau de couleur noire, il est doté de longues pinces très fines (Figure 9) [26].



Figure 9 : *Leiurus hoggarensis*

L. hoggarensis est une nouvelle espèce découverte très récemment dans la région de Tamanrasset, mais on suppose qu'elle pourrait être trouvée à Adrar et à Illizi.

Cette espèce appartient au genre *Leiurus* classé dangereux pour l'Homme qui inclut la fameuse espèce *L. quinquestriatus* [11].

Vu la complexité taxonomique des scorpions notamment sur le plan morphologique, les risques liés à la manipulation de cet animal ainsi que leurs mœurs discrètes, nous supposons que cette liste demeure loin d'être la plus exhaustive. Nous estimons que la diversité scorpionique algérienne à l'heure actuelle, ne représente que 70% du nombre réel à découvrir.

Conclusion

Au terme de ce travail sur la faune scorpionique de l'Algérie, nous pouvons conclure, d'une part, que la diversité scorpionique de l'Algérie est très importante (46 espèces), elle est estimée à 1,8% des espèces décrites à travers le monde. D'autre part, la liste des espèces morbi-mortelles pour l'Homme représente plus de 14% des espèces potentiellement dangereuses signalées au monde. A travers ces deux listes pionnières, nous pensons avoir fourni des données de base en matière de diversité scorpionique algérienne afin de faciliter le travail d'autres spécialistes tels que les épidémiologistes qui travaillent sur l'envenimation scorpionique, les biochimistes qui s'intéressent à la diversité des venins) et les immunologistes oeuvrant à développer des immunothérapies polyvalentes et monovalentes avec un pouvoir para-spécifique qui peut couvrir les venins relevant de cette faune scorpionique.

Conflits d'intérêt

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêt

Remerciements

Nous tenons à remercier Dr. Alioua Y. Arachnologiste au Département des Sciences Agronomiques, Université de Ghardaïa pour la révision du manuscrit.

Références

1. Cloudsley-Thompson, J.L. (1992). Scorpions. *Biologist*, 39, 206 – 210
2. <https://www.ntnu.no/ub/scorpion-files/> (consulté le 27,07, 2020)
3. Vachon, M. (1952). Etude sur les scorpions, Publ. Inst. Pasteur Algérie, Algérie, 482 p
4. Polis, G.A. Ecology; Polis, G.A. (Ed.) The biology of scorpions, Stanford University Press, Stanford, 1990, 247-293
5. El-Hennawy, H.K. (1992). A catalogue of the scorpions described from the Arab countries (1758-1990) (Arachnida: Scorpionida), *Serket*, 4, 95-153
6. Fet, V., Sissom, W.D., Lowe, G. & Braunwalder, M.E. Catalog of the Scorpions of the World (1758-1998); NY Entomol. Soc. 2000, 690p
7. Vachon, M. (1950). À propos d'un nouveau scorpion de Mauritanie : *Compsobuthus berlandi* n. sp. *Bull. Mus. natn. Hist. nat., Paris*, 22, 456-461

8. Vachon, M. (1974). Etude des caractères utilisés pour classer les familles et les genres de Scorpions (Arachnides). La trichobothriotaxie en arachnologie. Sigles trichobothriaux et types de trichobothriotaxie chez les Scorpions. *Bull. Mus. natn. Hist. nat., Paris*, 140, 857–958
9. Bardy, A., Younes, M., Sarhan, M.M.H., Saleh, M. (2018). On the scorpion fauna of Egypt, with an identification key (Arachnida: Scorpiones). *Zoology in the Middle East*, 64, 75-87
10. Touloun, O. (2019). Liste actualisée et commentée de la faune scorpionique du Maroc (Arachnida : scorpiones). *Revista Ibérica de Aracnologia*, 34: 126-132
11. Goyffon, M. et Billiard, P. (2007). Envenimations. Le scorpionisme en Afrique. *Med. Trop.*, 67, 439-446
12. Lourenço, W.R. (2018). The evolution and distribution of noxious species of scorpions (Arachnida: scorpiones). *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 24, 1-12
13. Lourenço, W. R. (2005). Nouvelles considérations taxonomiques sur les espèces du genre *Androctonus* Ehrenberg, 1928 et description de deux nouvelles espèces (Scorpiones, Buthidae). *Rev. Suisse Zool.*, 112, 145-171
14. Sadine, S.E. La faune scorpionique du Sahara septentrional algérien : Diversité et Ecologie. Thèse de Doctorat ès sciences, Université Kasdi Merbah-Ouargla. Algérie, 2018
15. Sadine, S.E., Alioua, Y., Chenchouni, H. (2012). First data on scorpion diversity and ecological distribution in the National Park of Belezma, Northeast Algeria. *Serket*, 13, 27-37
16. Chichi, S. Diversité et structure de la faune scorpionique dans la région de M'Sila. Mémoire de Master en Ecologie et Environnement. Université Ziane Achour-Djelfa. Algérie, 2015
17. Ouici, H., El Bouhissi, M., Sadine, S.E., Abidi, H. (2020). Preliminary study and ecological comments on scorpion diversity in Sidi Bel Abbes region, North-west Algeria. *Serket*, 17, 87-96
18. Sadine, S.E., Bissati, S., Ould El-Hadj, M.D. (2011). Premières données sur la diversité scorpionique dans la région du Souf (Algérie). *Arachnides*, 61, 2-10
19. Sadine, S.E. Contribution à l'étude de la faune scorpionique du Sahara septentrional Est algérien (Ouargla et El Oued). Mémoire de Magister. Option Zoophytatrie., Université de Ouargla. Algérie, 2012
20. Kourim, M.L. Organisation des peuplements de scorpions dans la région de Tamanrasset (Algérie). Mémoire de Master Protection des végétaux, Université de Ghardaïa. Algérie, 2017
21. Chippaux, J.P., Goyffon, M. (2008). Epidemiology of scorpionism: a global appraisal. *Acta Tropica*, 107, 71-79
22. Vachon, M. (1955). Le Scorpion jaune des pays Ajjer : *Androctonus amoreuxi* (Aud. et Sav., 1812 et 1826) (= *Prionurus eburneus* Pallary, 1928). *Arch. Inst. Pasteur d'Algérie*, 33, 54-58
23. Dabo, A., Golou, G., Traoré, M.S., Diarra, N., Goyffon, M., Doumbo O. (2011). Scorpion envenoming in the North of Mali (West Africa): Epidemiological, clinical and therapeutic aspects. *Toxicon*, 58, 154–158
24. Goyffon, M., Dabo, A., Coulibaly, S.K., Togo G., Chippaux, J. P. (2012). Dangerous scorpion fauna of Mali. *J. venom. anim. toxins incl. trop. dis*, 18, 361-368
25. Sadine, S.E., Bissati, S., Lourenço, W.R. (2016). The first true deserticolous species of *Buthus* Leach, 1815 from Algeria (Scorpiones: Buthidae); Ecological and biogeographic considerations. *C. R. Biol.*, 339, 44–49
26. Lourenço, W. R., Kourim, M. L., Sadine, S.E. (2018). Scorpions from the region of Tamanrasset, Algeria. Part II. A new African species of the genus *Leiurus* Ehrenberg, 1828 (Scorpiones: Buthidae). *Rivista Aracnologica Italiana*, 16, 3-14 .



Disponible en ligne
<https://www.atrss.dz/ajhs>



Original Article

Antioxidant and Anti-Inflammatory properties of Essential Oils of *Salvia officinalis* on Immunopathological effects induced by Scorpion Envenomation

Propriétés Anti-oxydante et Anti-Inflammatoire de l'Huile Essentielle de Salvia officinalis sur les effets Immunopathologiques induits par l'Envenimation Scorpionique

LADJEL-MENDIL Amina, LARABA-DJEBARI Fatima*

USTHB, Faculty of Biological Sciences, Laboratory of Cellular and Molecular Biology, BP 32 El-Alia, Bab Ezzouar, Algiers, Algeria

ABSTRACT

Introduction: Scorpion envenomation induces several complex clinical signs affecting various organs and systems at once, mainly the nervous and cardio-respiratory systems as well as systemic inflammatory response that can lead to death. Immunotherapy associated with symptomatic treatment remains the only means to combat this serious public health problem. The objective of this work is to explore the potential role of essential oils of *Salvia officinalis* on pathogenesis induced after scorpion envenomation. **Materials and Methods:** Animals were injected with a sublethal dose (0,5 mg/kg) of scorpion venom and treated with *Salvia* essential oils (0,5 %) (v/v). **Results:** Obtained results showed that the venom alone induced an inflammatory response in heart, lungs and liver tissues characterized by an inflammatory cell infiltration (eosinophil and neutrophil) associated with hyperleukocytosis (60%). The scorpion venom induced also significant alterations in the histological architecture of these organs (heart, lungs and liver), an oxidative stress characterized by free radical overproduction (increase of NO concentration), a massive release of lipid peroxidation metabolites (MDA) and an inhibition of catalase activity with an increase in glutathione level. The use of *Salvia* essential oils allowed to an important reduction of immuno-inflammatory markers marked by significant decrease (80%) of eosinophil and neutrophil infiltration. Histological analysis confirmed the reduction of edema-forming and inflammatory cell recruitment in heart, liver and pulmonary parenchyma compared to envenomed mice. *Salvia* essential oils seemed to be more effective against oxidative stress (70 %) caused by scorpion envenomation. **Conclusion:** the *Salvia* species may represent natural, safe and effective treatment of scorpion envenomation. In recent decades, with the increase of pharmacological knowledge about the beneficial effects of sage especially *Salvia officinalis*, the herbal medicines with anti-oxidant, and anti-inflammatory effects have found to be effective in the development of novel natural drugs to prevent, control and treat health problems as well as more serious and complicated diseases.

KEY WORDS: Scorpion envenomation, pathological disorders, Essential Oils of *Salvia officinalis*, oxidative stress, inflammation



RESUME

Introduction: l'envenimation scorpionique induit des signes cliniques complexes affectant simultanément différents organes et systèmes, principalement les systèmes nerveux et cardiorespiratoire, ainsi qu'une réponse inflammatoire systémique pouvant entraîner la mort. L'immunothérapie associée au traitement symptomatique reste le seul moyen de lutter contre ce grave problème de santé publique. L'objectif de ce travail est d'explorer le rôle potentiel des huiles essentielles de *Salvia officinalis* dans la pathogenèse induite après envenimation scorpionique.

Matériels et Méthodes: Les animaux ont reçu une dose subléthale (0,5 mg / kg) de venin de scorpion *Androctonus australis hector* (Aah) et ont été traités avec des huiles essentielles de *Salvia officinalis* (0,5 %) (v/v). **Résultats:** Les résultats obtenus ont montré que le venin seul induit une réponse inflammatoire au niveau du cœur, du poumon et du foie, caractérisée par une infiltration des cellules inflammatoires (eosinophiles et neutrophiles), associée à une hyperleucocytose (60%). Le venin de scorpion induit également des altérations significatives sur l'architecture tissulaire de ces trois organes, un stress oxydatif caractérisé par une surproduction de radicaux libres (augmentation de la concentration du NO), une libération massive de métabolites de la peroxydation lipidique (MDA) et une inhibition de l'activité de la catalase avec une augmentation du taux de glutathion. L'utilisation des huiles essentielles de *Salvia* a permis une réduction importante des marqueurs immuno-inflammatoires (80%) caractérisée par une diminution significative (80%) de l'infiltration des eosinophiles et neutrophiles. L'analyse histologique a confirmé la réduction de l'oedème formé et le recrutement des cellules au niveau du cœur, poumons et foie comparé avec les souris envenimées. Les huiles essentielles de *Salvia* semblent être très efficaces contre le stress oxydatif (70%) induit par l'envenimation scorpionique. **Conclusion:** *Salvia officinalis* peut représenter un traitement naturel, sûr et efficace de l'envenimation scorpionique. Au cours des dernières décennies, avec l'avancement des connaissances pharmacologiques sur les effets bénéfiques de la sauge, en particulier de *Salvia officinalis*, les médicaments à base de plantes avec des effets anti-oxydants et anti-inflammatoires se sont révélés efficaces dans le développement de nouveaux médicaments naturels destinés à prévenir, contrôler et traiter les problèmes de santé graves et complexes.

Mots clés: Envenimation scorpionique, Huiles essentielles de *Salvia Officinalis*, stress oxydatif, inflammation

* Auteur correspondant. Tel.: +21323306777; Fax: +21323306779
Adresse E-mail: flaraba@hotmail.com/flaraba@usthb.dz

Received on: 03/07/2019
Revised on: 30/06/2020
Accepted on: 09/07/2020

1. Introduction

Scorpion envenomation is a real medical emergency and life hazard problem in many countries; it is a potential cause of morbidity and mortality, especially among children. Neurotoxins are the most active components of the scorpion venom responsible for the toxic effects induced after scorpion envenomation. They induce a massive release of neurotransmitters during stimulation of sympathetic and parasympathetic of autonomic nervous system which can lead to cardio-respiratory failure and even to death. The pathophysiological disturbances caused by scorpion venoms are not exclusively assigned to the released neurotransmitters. The activation and the release of inflammatory mediators may also play a potential role in the induced pathogenesis. Several studies showed that the biological disorders following scorpionic envenomation are due to an inflammatory response characterized by the release of various inflammatory mediators, including cytokines, reactive oxygen species, and nitric oxide (NO) [1-3].

It has been also reported that scorpion venom can affect the immune system by mobilizing leukocytes and other inflammatory cells [4-7].

Previous studies have demonstrated that the activation of systemic inflammatory response induced by *Androctonus australis hector* (Aah) venom leads to a massive production of inflammatory mediators [5,8]. These inflammatory mediators are expressed in response to the toxins; they play an important role in the pathogenesis of envenomation and appear to have a deleterious effect on patients and on experimental animal exposed to the scorpion venom [8, 9].

The oxidant and antioxidant balance is an important determinant of immune cell function, not only for maintaining the integrity and functionality of membrane, cellular proteins, and nucleic acids but also for the control of signal transduction and gene expression in immune cells [9]. The inflammatory cells produce reactive oxygen species that react with

NO to form NO-derived inflammatory oxidants that damage tissues.

The anti-scorpion therapy is based on two approaches: i) a symptomatic treatment, adapted to the type of clinical symptoms observed and ii) the immunotherapy as a specific treatment. The use of the phytotherapy could be also associated.

Treatment of scorpion envenomation by plants remains right now unexplored. The validation of the usefulness of various species could form the basis for their use as alternative treatments.

Salvia officinalis L. (sage), is an aromatic plant belonging to the Lamiaceae family. It grows spontaneously along the entire Mediterranean basin; it is quite common in Algeria.

S. officinalis is used for the consumption of fresh foods as a tasty flavoring food either in the form of dried leaves or essential oil, in herbal medicine and in the cosmetic industries [10].

Essential Oils of *Salvia officinalis* is known as the Functional novel Natural Medicine. Salvia Essential oils are considered important for drug development, as they are endowed of pharmacological activity and used in Asia, Middle East, China and India. Salvia has been used in traditional medicine against oxidative stress, free radical damages, angiogenesis, inflammation, bacterial and virus infection [11].

The present study was undertaken to explore the benefits of the essential oils of *Salvia officinalis* as a preventive and symptomatic treatment against scorpion envenomation.

2. Materials and methods

A. Materials

1. Biological Samples

1.1. Venom

Androctonus australis hector (Aah) venom was obtained from Laboratory of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences of USTHB. It was lyophilized and stored at 4°C.

1.2. Essential oils

Essential oils of *Salvia officinalis* was obtained by hydrodistillation for 3h using a Clevenger-type apparatus, according to the procedure described in the European Pharmacopoeia.

1.3. Animals

NMRI mice (20 ± 2 g body weight) were obtained from the animal breeding facility of Faculty of Biological Sciences, USTHB. They were housed in controlled temperature and humidity rooms, and received food and water *ad libitum*, with a natural cycle of light and darkness. Animals were used according to the European Community rules of the Ethical Committee for Animal Welfare. The experiments were achieved in line with the current guidelines for the care of laboratory animals.

2. Non biological Materials

The chemicals and reagents used were purchased from Sigma (St. Louis, USA) or Merck (Darmstadt, F.R.G) and were of analytical grade.

B. Methods

1. Essential oils of *Salvia officinalis* toxicity

Any therapeutically active substance is potentially toxic; everything will depend on the daily dose and route of administration.

Ranges of different essential oil concentrations of sage, ranging from 0.1% to 10% (v/v), were tested to determine the optimal, safe and effective dose against the effects of a sublethal dose of Aah venom. The obtained results showed that the dose of 0.5% (v/v) is the optimal dose that justifies its use in this study.

2. Experimental Protocol of envenomation

Animals of experiments were divided into three groups (10 mice per group). The first group served as control was injected with saline solution (NaCl 0.9% by s.c. route); Group 2 received a sublethal dose of Aah venom (0.5 mg/kg body weight by s.c. route); Group 3 corresponds to the treated animals with Essential Oils of *Salvia officinalis*.

Animals were humanely sacrificed at 24 hours after envenomation. Blood was then collected and sera were obtained after centrifugation at 3000 g for 10 min and kept at 4°C until use. Organs and tissues (heart, lungs and liver) were homogenized in physiological saline solution. Homogenates were centrifuged at 4000 g for 20 min and supernatants were used as tissue extract for the various

experiments. Biomarkers of inflammatory response and oxidative stress were evaluated at 24 h after envenomation.

3. Anti-inflammatory effect of Essential Oils of *Salvia officinalis*

3.1. Peripheral blood cell counts

Blood samples were collected in EDTA tubes 24 h after Aah venom injection. A hemocytometer (ADVIA, Hematology system) was used for cell count.

3.2. Evaluation of inflammatory cell infiltration

Neutrophil accumulation and activation were estimated by evaluating myeloperoxidase (MPO) activity as previously described (Coelo et al., 2007). Samples were mixed with orthodianisidine (0.167 mg/ml) and H₂O₂ (0.4 mM) in phosphate buffer. Absorbance was read at 460 nm.

The extent of eosinophil accumulation in the biological samples was measured by assaying eosinophil peroxidase activity (EPO) as previously described [12]. Samples were mixed with Tris-HCl buffer containing OPD (10 mM) and H₂O₂ (0.4 mM). Absorbance was read at 490 nm using an ELISA reader after incubation for 1 h at room temperature in the dark.

4. Anti-oxidant effect of Essential Oils of *Salvia officinalis*

Pro-oxidant (malondialdehyde, nitrite) and antioxidant (catalase, glutathione) markers were measured in tissue homogenates (Heart, lungs and liver) and in sera.

4.1. Measurement of malondialdehyde (MDA)

The Measurement of MDA concentration is carried out using the thiobarbituric acid (TBA) at (100°C) in acid medium and in presence of SDS. The absorbances were determined at 532 nm. The results were expressed in nM/100 mg of tissue.

4.2. Measurement of nitric oxide (NO)

Nitric oxide concentrations in serum and in brain, heart, liver, and lungs tissues were determined by assaying its breakdown products, nitrate and

nitrite, using the Griess method. Aliquots of sample deproteinized [13] were incubated with equal volumes of Griess reagent. The absorbance was measured by spectrophotometry at 543 nm.

4.3. Measurement of the glutathione

The determination of the reduced glutathione content (GSH) in homogenate tissues was carried out by using the 5,5 dithiobis 2 acid nitrobenzoic (DTNB). Its reduction by the glutathione leads to the compound formation that absorbs at 405 nm, 2-nitro-5-thiobenzoic acid (TNB). The concentration of GSH was deduced from a molar extinction coefficient of 13.6 mM⁻¹ cm⁻¹. Results were expressed in mM per 100 mg of tissue.

4.4. Measurement of the catalase activity

The measurement of catalase activity is based on its capacity to transform H₂O₂ in phosphates buffer pH 7. The reduction in the absorbance was measured during 3 min at 240 nm. The enzymatic activity was expressed in UI/100 mg of tissues.

5. Histological analysis

Heart, lungs and liver collected from animals were immersed in formal fixative solution (10%) for 48 h. It was embedded in paraffin, sliced (7 µm) and stained with hematoxylin and eosin for microscopic examination (Motic Digital Microscope PAL System).

6. Statistical analysis

All results were expressed as the mean ± SD. The statistical significance of differences between groups was analyzed by a Student *t*-test. Data were considered statistically significant if *p*-values were <0.05.

3. Results

1. Evaluation of anti-inflammatory effect of Essential Oils of *Salvia officinalis*

The injection of scorpion venom by subcutaneous route to animals induces an important inflammation response characterized by hyperleukocytosis marked

by a significant increase of leukocytes and lymphocytes associated with an important decrease of monocytes, neutrophils and eosinophils in the peripheral blood of injected mice with Aah venom compared to the controls(NaCl) (**Figure 1**).

Evaluation of MPO and EPO activities, markers of inflammation is used as an index of activation and infiltration of neutrophils and eosinophils into the inflammatory sites. The MPO and EPO activities in tissue homogenates of injected mice with Aah venom were significantly higher compared to that of controls (NaCl) (**Figure 2**).

The treatment of animals with the essential oils of sage limits the leukocytosis caused by Aah venom. Indeed, the use of essential oils after envenomation normalizes the rate of total leucocytes but also the levels of studied cell populations (lymphocytes, monocytes, neutrophils, eosinophils, and basophils).

Previous study showed a significant reduction in total leukocytes following the use of a *Salvia officinalis* in rats with turpentine oil-induced inflammation. Similarly, reduction of enzymatic activities of myeloperoxidase and eosinophil peroxidase has been observed in treated animals with essential oils of *Salvia officinalis*.

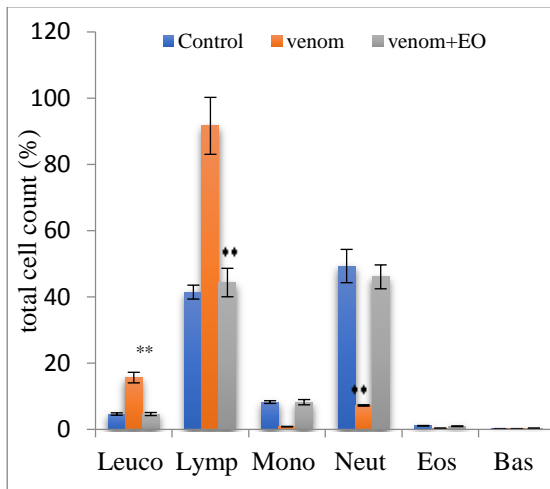
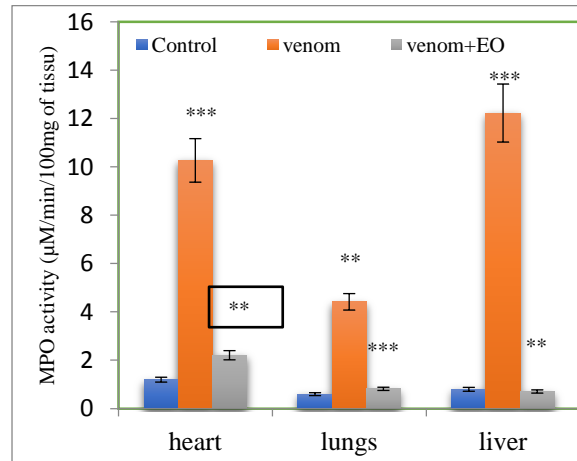


Figure 1: Leukocyte count in the peripheral blood 24 h after injection of venom (0.5 mg/kg by s.c. route) in the presence and absence of treatment with Essential Oils of *Salvia officinalis*

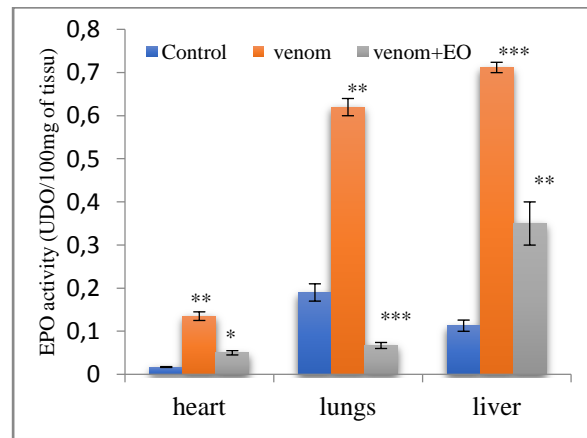
Values represent the means ± S.D. (n = 3). *p ≤ 0.05; **p ≤ 0.01

2. Evaluation of anti-oxidant effect of Essential Oils of *Salvia officinalis*

The study of the effects of Essential Oils of *Salvia officinalis* after scorpion envenomation on oxidative balance was carried out by the cellular pro- and antioxidant balance analysis (**Figures 3 and 4**). This study was realized after envenomation of mice by subcutaneous injection of sublethal dose of Aah venom (0.5 mg/kg) and treatment by Essential Oils of *Salvia officinalis* (0.5 %).



(A)



(B)

Figure 2: Determination of myeloperoxidase MPO (A) and eosinophil peroxidase EPO (B) activities, 24 h after injection of venom (0.5 mg/kg by s.c. route) in the presence and absence of treatment with Essential Oils of *Salvia officinalis*.

Values represent the means ± S.D. (n = 3). *p ≤ 0.05; **p ≤ 0.01;***p ≤ 0.001

2.1. Effect of Essential Oils of *Salvia officinalis* on lipidic peroxidation

In order to evaluate the extent of the lipidic peroxidation caused by Aah venom on various tissues, a specie reactivate of the thiobarbituric, malondialdehyde acid (MDA), was measured in heart, lung and liver tissues of envenomed mice by a sublethal dose of venom injected by subcutaneous route.

Obtained results showed an increase in the MDA levels in heart, lung and liver homogenates of envenomed mice compared to that of animal controls (**Figure 3 A**).

Salvia officinalis appeared to significantly reduces MDA levels [14]. Obtained results showed that the use of Essential Oils of *Salvia officinalis* in the treatment of envenomed animals by Aah venom is able to reduce the MDA level in the studied organs.

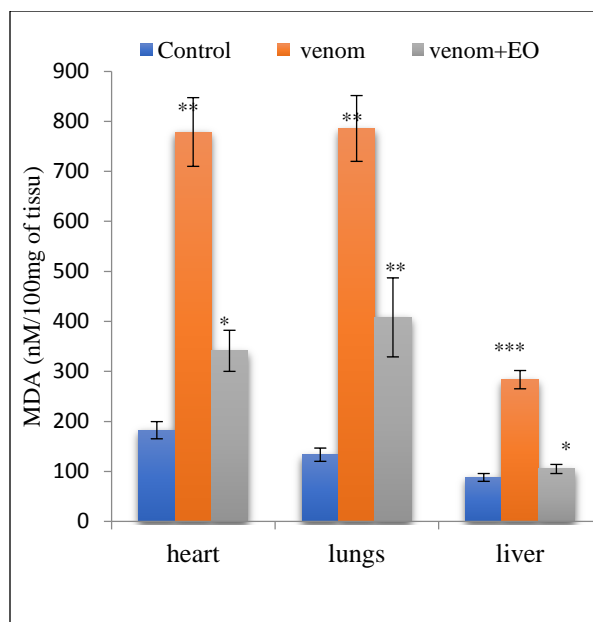
2.2. Effect of Essential Oils of *Salvia officinalis* on nitric oxide release

The nitric oxide (NO) is free radical synthesized after L-arginine conversion into NO, by NO synthases (NOS). It plays an important role in several physiological and physiopathological processes, as it is one of the oxidative stress markers.

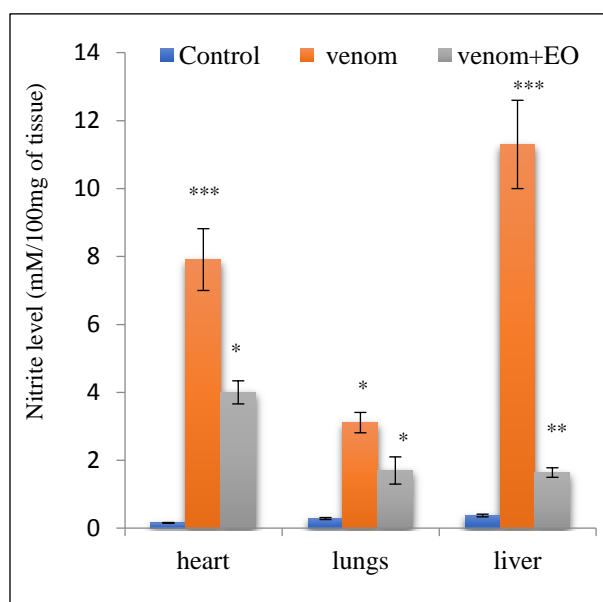
The obtained results showed a significant increase in NO levels in tissue supernatants of mice after 24 hours following the envenomation compared to the control (**Figure 3B**). However, the treatment of mice with essential oil decreased the NO level in the tissue compartments compared to those of envenomed animals. These results could be explained by the antioxidant effect of one of the phenolic constituents of the essential oils of *Salvia* [15].

2.3. Effect of Essential Oils of *Salvia officinalis* on catalase activity

The catalase is an antioxidant enzyme present in various tissues; it is responsible for the hydrogen peroxide conversion into water and oxygen [16]. The evaluation of the catalase activity in mice after 24 hours of envenomation showed a reduction in this activity compared to the control (**Figure 4A**).



(A)



(B)

Figure 3: Evaluation of oxidative stress biomarkers: MDA (A) and Nitrite (B), 24 h after injection of venom (0.5 mg/kg by s.c. route) in the presence and absence of treatment with Essential Oils of *Salvia officinalis*
 Values represent the means \pm S.D. (n= 3)
 *p \leq 0.05; **p \leq 0.01; ***p \leq 0.001

The decrease of catalase activity could be explained by an excessive production of hydrogen peroxide during the oxidative stress induced by *Aah* venom. Indeed, in the presence of high levels of H₂O₂ the catalase activity was inhibited [16]. Other studies reported an important increase in hydrogen peroxide release by the macrophages stimulated *in vitro* with the *Tityusserrulatus* or *Androctonus australis hector* venoms [17-19].

The treatment of animals with the essential oils of *Salvia officinalis* causes a significant increase in catalase activity. The increase of catalase activity was observed after treatment of animals with *Salvia officinalis* tea for 14 days [20].

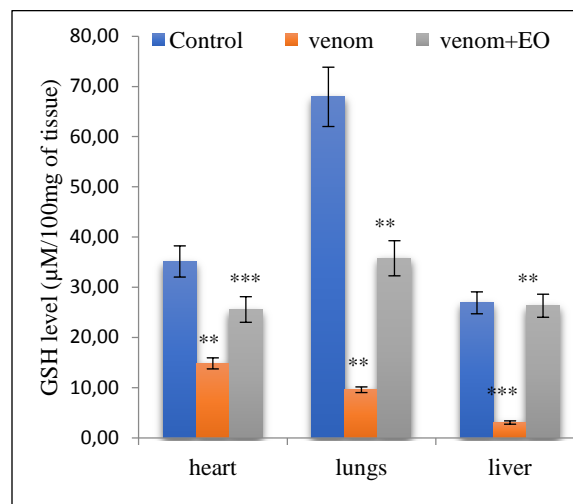
3. Effect of Essential Oils of *Salvia officinalis* on glutathione levels

The non-enzymatic antioxidant balance evaluated by the measurement of glutathion (GSH) in the tissue supernatants of envenomed mice with *Aah* venom showed a decrease in GSH levels compared to the control. The treatment of animals with the essential oils of *Salvia officinalis* seems to improve the cellular antioxidant potential by increasing the rate of GSH in the studied organs compared to the envenomed animals (Figure 4B).

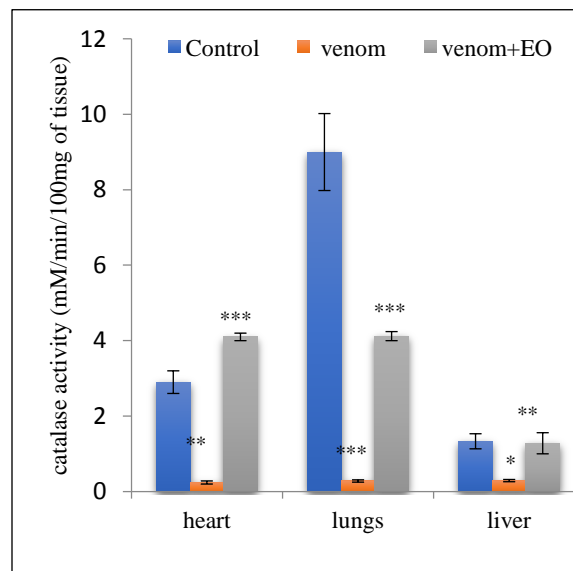
4. Effects of *Aah* venom on heart, lung and hepatic tissues

Histological analysis revealed severe structural alterations in myocardium, pulmonary and hepatic tissues of injected animals with sublethal doses of *Aah* venom. These alterations were characterized by: i) a disorganization of hepatic tissue architecture with dilated portal vein, irregular hepatocytes, hemorrhagic edema, congestion, hemorrhage and cell infiltration; ii) alteration of myocardic tissue characterized by hemorrhage, interstitial edema, necrosis of myocardiocytes and fibber hypertrophy associated with inflammatory cell infiltration; iii) pulmonary tissue damage characterized by hemorrhage, interstitial edema and thickening of interalveolar septa. Thickened and altered alveolar walls exhibited abnormal accumulation of inflammatory cells (Figure 5).

Administration of *Salvia officinalis* essential oils after *Aah* venom injection seems to restore the hepatic, cardiac and pulmonary tissue damage induced by venom and to reduce the leukocyte infiltration observed in tissues of envenomed animals.



(A)



(B)

Figure 4: Evaluation of oxidative stress biomarkers: glutathione GSH (a) and catalase CAT (b); 24 h after injection of venom (0.5 mg/kg by s.c. route) in the presence and absence of treatment with Essential Oils of *Salvia officinalis*. Values represent the means ± S.D. (n=3). *p ≤ 0.05; **p ≤ 0.01; ***p ≤ 0.001.

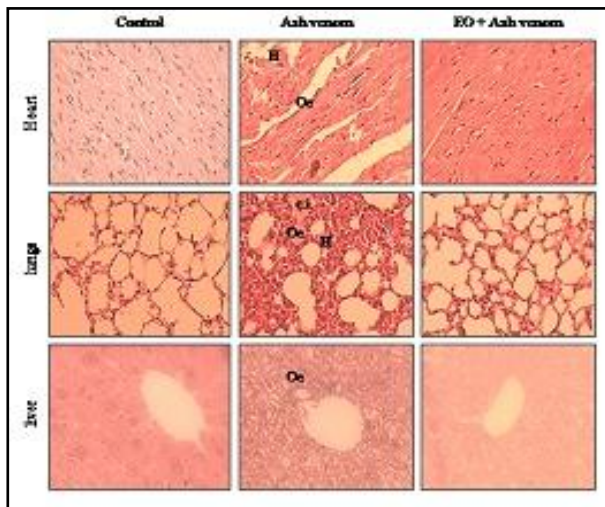


Figure 5: Histology analysis of myocardium, pulmonary and hepatic tissues of animal controls, envenomed animals with *Aah* venom and envenomed animals with *Aah* venom and treated with *Salvia officinalis* essential oil (EO)
 H: hemorrhage, Oe : edema, c.i. : cell infiltration.
 Coloration Hematoxylin-eosin. X400

4. Discussion

Scorpionic envenomation is a real threat in many countries of the world, in particular in Northern Africa, Central and Southern America, the Middle East and India. Anti-venom therapy is based on two approaches: symptomatic and specific treatment (immunotherapy). In this study, a phytotherapeutic approach using *Salvia officinalis* as a symptomatic treatment was evaluated against scorpion envenomation based on its beneficial anti-inflammatory and anti-oxidant properties. The essential oil of *Salvia officinalis* was used as pharmacologically active molecules after experimental scorpionic envenomation. The obtained results showed that envenomed animals with a sublethal dose of *Aah* venom causes a significant inflammatory response characterized by serum hyperleukocytosis associated with intense activation and infiltration of inflammatory cells in tissue.

The migration of leukocytes from the vascular system to the injured area is a key event in inflammation [8]. Previous studies reported that the scorpion envenoming induces activation of the inflammatory cascade and release of immunological mediators responsible for leukocyte recruitment [5, 9].

Aah venom induces also an installation of oxidative stress characterized by an overproduction of free radicals (NO), a massive release of a lipid

peroxidation metabolite (MDA), an inhibition of catalase activity associated with basal glutathione levels.

The increase of NO level was also reported after experimental envenomation by *Androctonus australis hector*, *Tityuszulianus* and of *T. serrulatus* venoms [21]. The overproduction of free radicals (NO) could be explained by the activation of NO synthase after neurotoxin binding on their cellular targets.

The increase of MDA levels indicates the alteration of cell membrane by the membrane lipid oxidation. This disorder could be due to the action of reactive species of oxygen and NO, which are released during the oxidative process after scorpion envenomation.

These species (ROS) can interact and exert their toxic effects by causing the lipid peroxidation which is the cause of the alteration of the integrity of cellular membranes [22, 23].

A disturbance of antioxidant system is observed. It is characterized by a production of glutathion (GSH) and by a decrease of the catalase activity, suggesting their involvement in the molecular mechanisms of cellular detoxification in response to the venom components.

The use of essential oils of *Salvia officinalis* after scorpionic envenomation showed almost total protection of animals against the deleterious effects caused by *Aah* venom. Indeed, oral administration of these oils has reduced the inflammatory response and oxidative stress in all tissue compartments of envenomed animals. It was reported that *Salvia officinalis* essential oils have a significant inhibitory effect on the migration of inflammatory cells to perivascular tissues by reducing the expression of adhesion molecules, the synthesis of inflammatory mediators and the release of cytokines [24]. Similarly, *Salvia officinalis* essential oils, mainly its carnosic acid and carnosol components, are able to inhibit significantly the migration of neutrophils and eosinophils to inflammatory sites [25, 26].

A reduction of oxidative stress was also observed, characterized by an improvement of the enzymatic and non-enzymatic antioxidant capacity by reactivating the catalase activity and increasing the cellular GSH levels. Similarly, basal NO and MDA levels were also observed. *Salvia officinalis* reduces the level of malondialdehyde probably due to the decrease of OH radicals [20]. This plant characterized by a high level of flavonoids, which

could have a role in the reduced lipid peroxidation by decreasing superoxide radicals resulting from stress in rats [27].

The protective effect of essential oils may be due to their content of phenolic compounds such as thujone, cineole and camphor that can be purified and useful for repairing tissue damage induced by oxidative stress [28].

The treatment of envenomed animals with *Salvia officinalis* essential oil seems to have an interesting effect in the reduction of inflammatory and oxidative responses induced by scorpion experimental envenomation. These results are likely to be exploited in a phytotherapy-based anti-envenoming treatment.

Conclusion

Androctonus australis hector scorpion venom is able to increase the sympathetic nervous system activity and provoke a systemic inflammatory response characterized mainly by an increase of leukocyte cell count in the peripheral blood and their recruitment in site of injury, associated with tissue damage and oxidative stress. The pathophysiology of these events is complex; it seems to be mediated by the massive release of inflammatory mediators and reactive oxygen species. The use of essential oils of *Salvia officinalis* could be beneficial to improve the treatment in the future mainly in severely envenomed patients by scorpion venom.

Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflict of interest

References

1. Fukuhara, Y., Reis, M., Dellalibera-Joviliano, R., Cunha, F., Donadi, E. (2003). Increased plasma levels of IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- α in patients moderately or severely envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. *Toxicon*, 41(1): 49-55
2. Hammoudi-Triki, D., Ferquel, E., Robbe-Vincent, A., Bon, C., Choumet, V., Laraba-Djebari, F. (2004). Epidemiological data, clinical admission gradation and biological quantification by ELISA of scorpion envenomations in Algeria: effect of immunotherapy. *Transactions of the Royal Society*

- of *Tropical Medicine and Hygiene*, 98(4): 240-250
3. Raouraoua-Boukari, R., Sami-Merah, S., Hammoudi-Triki, D., Martin-Eauclaire, M-F., Laraba-Djebari, F. (2012). Immunomodulation of the inflammatory response induced by *Androctonus australis hector* neurotoxins: biomarker interactions. *Neuroimmunomodulation*, 19(2): 103-110
4. Magalhães, M.M., Pereira, M.E.S., Amaral, C.F., Rezende, N.A., Campolina, D., Bucarechi, F., Gazzinelli, R.T., Cunha-Melo, J.R. (1999). Serum levels of cytokines in patients envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. *Toxicon*, 37(8): 1155-1164
5. Adi-Bessalem, S., Hammoudi-Triki, D., and Laraba-Djebari, F. (2008). Pathophysiological effects of *Androctonus australis hector* scorpion venom: tissue damages and inflammatory response. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 60(4-5): 373-380
6. Sami-Merah, S., Hammoudi-Triki, D., Martin-Eauclaire, M-F., Laraba-Djebari, F. (2008). Combination of two antibody fragments F (ab')₂/Fab: An alternative for scorpion envenoming treatment. *International immunopharmacology*, 8(10): 1386-1394
7. Ait-Lounis, A., and Laraba-Djebari, F. (2012). TNF- α involvement in insulin resistance induced by experimental scorpion envenomation. *PLoS neglected tropical diseases*, 6(7): 1740
9. Petricevich, V.L. (2010). Scorpion venom and the inflammatory response. *Mediators of inflammation*, 903295
10. Rioba, N.B., Musyoka, F. (2015). Effects of nitrogen, phosphorus and irrigation frequency on essential oil content and composition of sage (*Salvia officinalis* L.). *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 2(1): 21-29
11. Altindal, D., and Altindal, N. (2016). Sage (*Salvia officinalis*) Oils, in *Essential oils in food preservation, flavor and safety*, Elsevier. 715-721
12. Van Oosterhout, A.G., Van de Pol, M., Ten Velde, GP., Twijnstra, A.. (1996). Neurologic disorders in 203 consecutive patients with small

- cell lung cancer: results of a longitudinal study. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 77(8): 1434-1441
13. Sun, T., Xie, W. and Xu, P. (2004). Superoxide anion scavenging activity of graft chitosan derivatives. *Carbohydrate Polymers*, 58(4): 379-382
 14. Ghiringhelli, F., Apetoh, L., Tesniere, A., Aymeric, L., Ma, Y., Ortiz, C., Vermaelen, K., Panaretakis, T., Mignot, G., Ullrich, E. (2009). Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1 β -dependent adaptive immunity against tumors. *Nature medicine*, 15(10): 1170
 15. Zupkó, I., Hohmann, J., Rédei, D., Falkay, G., Janicsák, G., Máthé, I. (2001). Antioxidant activity of leaves of Salvia species in enzyme-dependent and enzyme-independent systems of lipid peroxidation and their phenolic constituents. *Planta Medica*, 67(04): 366-368
 16. Théron, P., and Bonnefont-Rousselot, D. (2005). Systèmes antioxydants endogènes. Radicaux libres et stress oxydant. Paris, Lavoisier: 87-111
 17. Petricevich, V.L., and Lebrun, I. (2005). Immunomodulatory effects of the Tityus serrulatus venom on murine macrophage functions in vitro. *Mediators of inflammation*, (1): 39-49
 18. Petricevich, V.L., Cruz, A.H., Coronas, F.I., Possani, L.D. (2007). Toxin gamma from Tityus serrulatus scorpion venom plays an essential role in immunomodulation of macrophages. *Toxicon*, 50(5): 666-675
 19. Laraba-Djebari, F., Adi-Bessalem, S., and Hammoudi-Triki, D. (2015). Scorpion venoms: pathogenesis and biotherapies. *Scorpion Venoms*, 63-85.
 20. Sá, C., Ramos, A., Azevedo, M., Lima, C., Fernandes-Ferreira, M., Pereira-Wilson, C. (2009). Sage tea drinking improves lipid profile and antioxidant defences in humans. *International journal of molecular sciences*, 10(9): 3937-3950
 21. Petricevich, V.L., and Peña, C.F. (2002). The dynamics of cytokine and nitric oxide secretion in mice injected with Tityus serrulatus scorpion venom. *Mediators of inflammation*, 11(3): 173-180
 22. Babior, B.M. (1999). NADPH oxidase: an update. *Blood*, 93(5): 1464-1476
 23. Babior, B.M. (2000). Phagocytes and oxidative stress. *The American journal of medicine*, 109(1): 33-44
 24. Siveen, K., and Kuttan, G. (2011). Immunomodulatory and antitumor activity of Aerva lanata ethanolic extract. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 33(3): 423-432
 25. Poeckel, D., Greiner, C., Verhoff, M., Rau, O., Tausch, L., Hörnig, C., Steinhilber, D., Schubert-Zsilavec, M., Werz, O. (2008). Carnosic acid and carnosol potentially inhibit human 5-lipoxygenase and suppress pro-inflammatory responses of stimulated human polymorphonuclear leukocytes. *Biochemical pharmacology*, 76(1): 91-97
 26. de Melo, G.A.N., Fonseca, J.P., Farinha, T.O., do Pinho, R.J., Damiatilde, M.J., Grespan, R., da Silva, E.L., Bersani-Amado, C.A., Cuman, R.K.N. (2012). Anti-inflammatory activity of Salvia officinalis L. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(35): 4934-4939
 27. Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Celik, S., Bektaşoğlu, B., Berker, K., Özyurt, D. (2007). Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*, 12(7): 1496-1547
 28. Dashipour, A., Razavilar, V., Hosseini, H., Shojaee-Aliabadi, S., German, J.B., Ghanati, K., Khakpour, M., Khaksar, R. (2015). Antioxidant and antimicrobial carboxymethyl cellulose films containing Zataria multiflora essential oil. *International journal of biological macromolecules*, 72: 606-613



Disponible en ligne
<https://www.atrss.dz/ajhs>



Original Article

Medicinal benefits of Green Tea (*Camellia sinensis*) on the Envenomation Pathogenesis

*Bienfaits du Thé Vert (*Camellia sinensis*) dans la Pathogénie de l'Envenimation Scorpionique*

Megdad-Lamraoui Amal, Adi-Bessalem Sonia, Laraba-Djebari Fatima*

USTHB, Faculty of Biological Sciences, Laboratory Cellular and Molecular Biology, Department Cellular and Molecular Biology, BP32, EL Alia, Bab Ezzouar 16111, Algiers, Algeria.

ABSTRACT

Introduction: Green tea and its polyphenolic catechins have shown beneficial effects in several inflammatory pathogenesis. It is one of the most frequently consumed beverages in North African countries such as Algeria, which is characterized by a high incidence of scorpion envenomation. The aim of this study was to investigate the effects of the green tea against cardiac and hepatic inflammatory response and oxidative stress induced by scorpion venom. **Materials and Methods:** Green tea was administered to mice in drinking water for 4 weeks before the injection of a sublethal dose of venom. The inflammation response and oxidative stress were assessed twenty-four hours after the envenomation by the evaluation of some inflammatory and oxidative stress markers, histological alterations and metabolic enzyme levels. **Results:** The results showed that scorpion venom induced tissue inflammatory response characterized by inflammatory cell infiltration and by an increase in levels of reactive oxygen/nitrogen species and a decreased antioxidant defense. Significant alterations of the cardiac and the hepatic tissues such as edema and hemorrhages associated with increased levels of metabolic enzymes were also observed. The administration of green tea infusions decreased nitric oxide and thiobarbituric acid-reactive substances levels and reduced the incidence of heart and liver tissue alteration and metabolic enzyme levels. These results indicate that green tea exhibits potent protective effects against scorpion venom induced cardiac and hepatic toxicity probably by increasing antioxidant defense. **Conclusion:** The antioxidant properties are due to the synergistic properties of green tea extracts such as catechins, which are increasingly recognized as being potentially important for medicinal benefits.

Key words: Scorpion venom, cardiac and hepatic tissues, inflammation response, oxidative stress, green tea.

RESUME

Introduction: Le thé vert et ses catéchines polyphénoliques ont montré des effets bénéfiques dans le confort ou traitement de plusieurs pathologies inflammatoires. C'est l'une des boissons les plus consommées dans les pays d'Afrique du Nord tels que l'Algérie qui est concernée par une forte incidence d'envenimation scorpionique. Le but de cette étude est d'étudier l'effet du thé vert sur la réponse inflammatoire induite au niveau cardiaque et hépatique et le stress oxydant par le venin de scorpion. **Matériels et Méthodes :** Dans cette étude, le thé vert a été administré, à des souris dans l'eau de boisson pendant 4 semaines avant l'injection d'une dose subléthale de venin. La réponse inflammatoire et le stress oxydant ont été évalués 24 heures après l'envenimation par l'évaluation de certains marqueurs de la réponse inflammatoire et du stress oxydant, par une analyse histopathologique ainsi que par l'estimation du taux de quelques paramètres métaboliques. **Résultats:** Les résultats ont montré que la réponse inflammatoire induite par le venin de scorpion se caractérise par une infiltration de cellules inflammatoires, une augmentation des taux des espèces réactives oxygénées et azotées, une diminution de la défense anti-oxydante ainsi



que par des altérations tissulaires importantes (œdèmes et hémorragies), associées à une augmentation des taux d'enzymes métaboliques au niveau sérique. L'administration du thé vert a diminué la réponse inflammatoire, le stress oxydant, les altérations tissulaires cardiaques et hépatiques ainsi que le taux des enzymes métaboliques. **Conclusion :** L'effet immuno-protecteur du thé vert semble être dû à l'augmentation de la défense anti-oxydante par l'apport de molécules telles que les catéchines connues par leur intérêt thérapeutique et protecteur contre les désordres immuno-inflammatoires.

Mots clés: Venin de scorpion, tissu cardiaque et hépatique, réaction inflammatoire, stress oxydant, thé vert.

* Auteur correspondant. Tel.: +213 6 151 6276; fax: +0-000-000-0000.
Adresse E-mail: flaraba@hotmail.com

Received on: 03 juillet 2019
Revised on: 07 juin 2020
Accepted on: 05 juillet 2020

1. Introduction

There is currently great interest in the use of phytochemicals from foods and beverages as preventive or curative compounds [1-3]. Green tea provided from the *Camellia sinensis* plant is one of the most popular beverages in several areas of the world such as North Africa and Middle East. The beneficial impact of its regular consumption against various diseases has been reported [4]. Many of these beneficial effects of green tea are related to its significant antioxidant and anti-inflammatory properties reported in numerous human, animal, and *in vitro* studies [5]. These studies reported the contribution of green tea in the prevention of heart and liver diseases and its various physiological and pharmacological properties such as anti-hypertensive effect, antibacterial and antiviral activities, anti-fibrotic properties, and neuroprotective powerful [6-8]. Green tea also prevents some forms of cancer [9], protects against nephrotoxicity and delays memory regression [10, 11]. In this study, we evaluate the role of green tea in protecting against cardiac and hepatic tissue injuries after scorpion envenomation. The cardiac and hepatic inflammatory response and oxidative stress are key processes in scorpion envenoming syndrome and could be a cause of death after scorpion envenomation [12,13]. Inflammatory events were assessed by measuring markers of the influx of inflammatory cells to the cardiac and the hepatic tissues and the oxidative stress status. Furthermore, this study was supported by histological analysis and assessment of enzyme activities reflecting tissue injuries.

2. Materials and methods

2.1. Venom

The venom from the *Androctonus australis hector* scorpion was provided by the Laboratory of Cellular and Molecular Biology (Biochemistry of

Biomolecules: Mode of Action, Immunotherapy and Immunodiagnostic team, code: C0610502) of the *Biological Sciences Faculty at the University of Science and Technology Houari Boumediene (USTHB)*.

2.2. Animals

N.M.R.I. mice (20 ± 2 g body weight) were obtained from the animal breeding division of the Biological Sciences Faculty of the USTHB. They were group-housed under controlled temperature and light-dark cycle conditions. Animal care and experimental procedures were performed according to the 2010/63/EU Directive of the European Parliament.

2.3. Green tea

The dried leaves of green tea issued from the plant *Camellia sinensis* (5, 10 or 50 g) were soaked in 500 ml of boiling distilled water for 5 minutes. The obtained extract was filtered and the leaves underwent a further extraction step by the addition of 500 ml of boiling distilled water. The obtained second extract was filtered and then mixed with the first one. It was subsequently stored at 4 °C.

2.4. Chemicals and reagents

The chemicals and reagents are of a high analytical quality. They are provided from Sigma Aldrich (United States of America) and Merck (Germany).

2.5. In vivo experiments

Mice of group 1 and 2 received green tea (0.5 and 1%, respectively) as the only source of drink for 15 and 30 days, while the third group was given green tea extract (5%) by gavage twice daily during 30 days. On the fifteenth and the thirtieth day, the mice received a subcutaneous injection of physiological saline (NaCl control group) or a sublethal dose (0.5

mg /kg) of the *Androctonus australis hector* venom. Mice were sacrificed within 24 hours of NaCl or venom injection. At necropsy, blood, heart and the liver were collected. The organs were weighed, and then processed for further analysis in the assays outlined below.

2.6. Evaluation of inflammatory cell infiltration

The neutrophil myeloperoxidase as well as eosinophil peroxidase in inflamed mice heart and liver were measured. The estimation of the activity of the myeloperoxidase was carried out according to the protocol of Krawisz et al. (1984) [14], whereas the dosage of eosinophil peroxidase activity was carried out according to the method of Van Oosterhout et al. (1996) [15].

2.7. Evaluation of the heart and the liver redox status

In order to evaluate the redox status in the cardiac and the hepatic tissues, a study of the pro- and antioxidant balance was undertaken. The nitric oxide (nitrites) assay was performed according to the method of Sun et al. (2003) [16], whereas, the levels of the peroxidation marker of membrane lipids (malondialdehyde) were carried out according to the method of Ohkawa et al. (1979)[17].

The study of the antioxidant defense system was undertaken by the estimation of catalase antioxidant activity, according to Aebi (1984) [18]. The reduced glutathione was estimated by the Ellman modified method (Zhang, 2000) [19].

2.8. Tissue alterations analysis and metabolic enzyme measurements

The hearts and livers taken after mice sacrifices were immediately immersed in 10 % formalin for 48h. They were then dehydrated in alcohol baths and impregnated with paraffin. The sections were made and stained with hematoxylin and eosin. They were observed under a photonic (Motic) microscope connected to a camera. Measurements of the serum enzymatic activities of creatine phosphokinase, lactate dehydrogenase, alanine aminotransferase and alkaline phosphatase were performed according to manufacturer's instructions (Spinreact) using an automatic apparatus (HITACHI 902 ISE).

2.9. Statistical analysis of results

The statistical analysis of the results was carried out

by the Student's *t*-test. The results are shown as mean and standard error of the mean (mean \pm S.E.M).

3. Results

3.1. Effects of green tea on inflammatory cell infiltration induced by scorpion venom

The results showed significant decrease (dose- and time-dependent) of neutrophil and eosinophil infiltration in the cardiac and the hepatic tissues compared to the envenomed mice (**Figure 1: a, b, c and d**).

Indeed, myeloperoxidase activity decreased when green tea at 0.5 and 1 % during 15 and 30 days compared to the estimated values obtained in the cardiac and in the hepatic tissues of envenomed mice (**Figure 1a and 1c**).

It was noted that the doses of 1 and 5 % administered during 30 days are the most effective in preventing eosinophil cell infiltration in the cardiac tissue ($P < 0.01$) (**Figure 1b**).

In the liver tissue, the best preventive effects of green tea were observed at 0.5 and 1% ($P < 0.01$) (**Figure 1d**).

3.2. Beneficial effects of green tea on the imbalance between the pro and the antioxidant system induced by scorpion venom

Nitrite contents produced in the cardiac and the hepatic tissues of the pretreated envenomed mice with green tea showed a decrease in this reactive nitrogen specie level in dose-and time- dependent manner. The pretreatment of the mice during the 30-days appears to be more preventive than those carried out during 15 days (**Figure 2c and 2d**).

Indeed, lower levels of nitrites were noted in the cardiac and the hepatic tissues with green tea at 1 % ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively) (**Figure 2a and 2b**). Green tea also reduces lipid peroxidation caused by scorpion venom in the heart and the liver. The most interesting results are those obtained within the 30 days-pretreatment period (**Figure 2c and 2d**).

The status of the anti-oxidant defense system in the cardiac tissue was assessed in the homogenates by the evaluation of catalase activity and the glutathione level (**Figure 3a and 3b**).

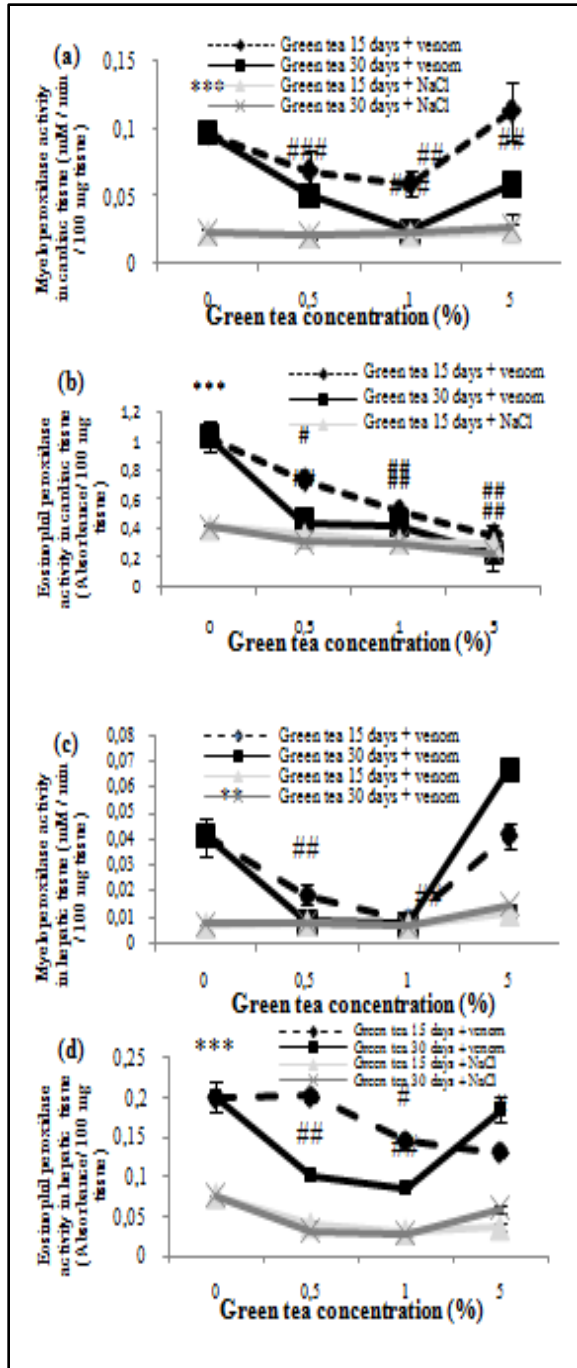


Figure 1: Effects of green tea on myeloperoxidase and eosinophil peroxidase activities reflecting infiltration of neutrophils and eosinophils, respectively, into the cardiac (a, b) and the hepatic (c, d) tissues, induced by a sublethal dose of *Androctonus australis Hector* venom (0.5 mg / kg), 24 hours after the injection (Mean ± S.E.M., n=3; Student t test; ***P<0.001; Groups of envenomed mice compared to the control (NaCl alone). #P<0.05; ## P<0.01; ### P<0.001; Groups pretreated with green tea compared to the group of mice receiving the venom alone).

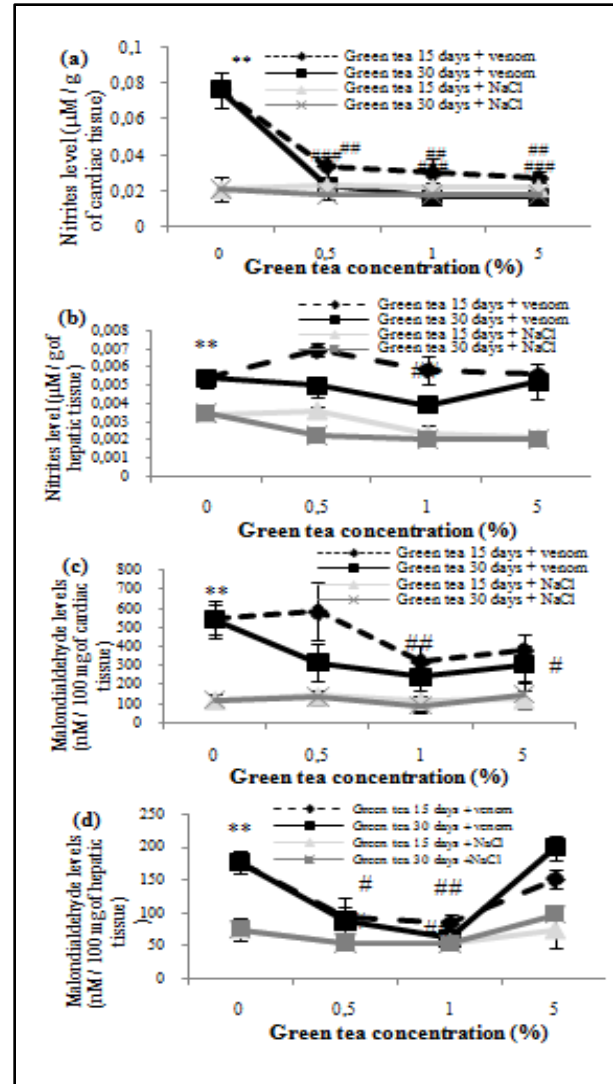


Figure 2: Effects of green tea on the variation of the levels of nitrites (a, b) and malondialdehyde (c, d) in the cardiac and the hepatic tissues after experimental envenomation with a sublethal dose of *Androctonus australis Hector* venom (0.5 mg / kg), 24 hours after its injection (Mean ± S.E.M., n=3; Student t test; ** P < 0.01; *** P < 0.001 Groups of envenomed mice compared to the control (NaCl alone). #P<0.05; ## P<0.01; ### P < 0.001; Groups pretreated with green tea compared to the group of mice receiving the venom alone).

Mice receiving green tea displayed important protective effects against the depletion of the antioxidant system. The study of the non-enzymatic antioxidant system state in envenomed mice showed significant increase in the reduced glutathione levels in the cardiac (P < 0.001) and the hepatic (P < 0.05) tissues of pretreated animals with 0.5 and 1% of green tea during 15 and 30 days prior to experimental envenomation compared to those of envenomed mice. However, green tea at 5% was less effective in

preventing the non-enzymatic antioxidant system alteration (Figure 3a and 3b). On the other hand, the recorded catalase activity was more important in presence of green tea at 5% than that observed in envenomed mice (Figure 3c and 3d).

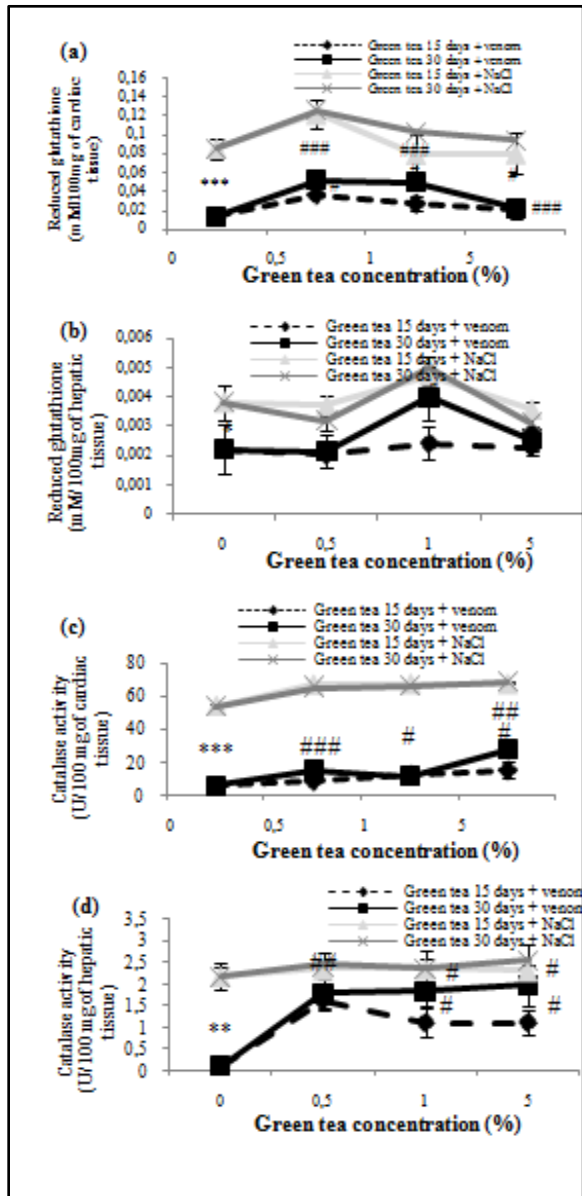


Figure 3: Effects of green tea on the non enzymatic (a, b) and the enzymatic (c, d) antioxidant system in the cardiac and the hepatic tissues after experimental envenomation with a sublethal dose of venom (0.5 mg / kg), 24 hours after its injection. (Mean \pm S.E.M., n=3 ; Student t test; ** P < 0.01 ; *** P < 0.001 Groups of envenomed mice compared to the control (NaCl alone). #P<0.05; ## P<0.01; ### P < 0.001; Groups pretreated with green tea compared to the group of mice receiving the venom alone).

3.3. Evaluation of the green tea effects on histological damage and organ dysfunction induced by scorpion venom

The anatomopathological analysis of heart and liver tissues of the envenomed mice revealed edema, hemorrhage, congested center-lobe vein and massive leukocyte infiltration into these tissues 24h after venom injection (Figure 4b and 4e). Histopathological analysis of the myocardium and the hepatic tissue of mice receiving green tea prior to experimental envenomation revealed fewer alterations in pretreated animal's tissues during the 30-day period than those receiving the same pretreatment during 15 days.

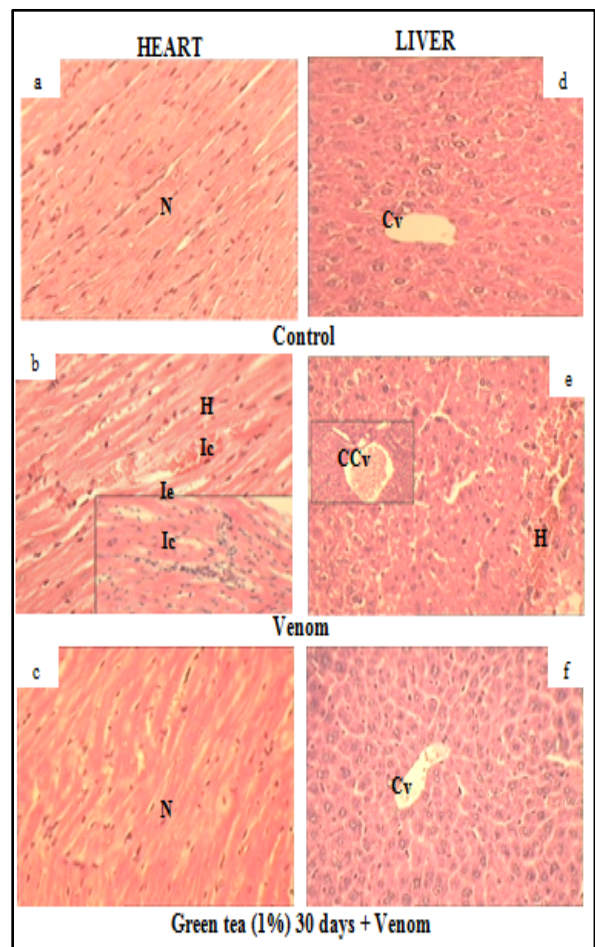


Figure 4: Effects of green tea concentration (1%) and time consumption period (30 days) on changes in myocardium and liver parenchyma structure induced by a sublethal dose of *Androctonus australis Hector* venom (0.5 mg / kg). Ic: Inflammatory cells, H: Hemorrhage; N: Nucleus, Ie: Interstitial edema, Cv: Center-lobe vein, CCv: Congested center-lobe vein (Hematoxylin-eosin staining; magnification: \times 400).

Indeed, hemorrhagic edema and infiltration of inflammatory cells were observed in the myocardium and the liver parenchyma of mice receiving green tea during the 15-day period (data not shown) whereas no alterations were observed in the tissues of pretreated mice during 30-days with green tea at 1% compared to the envenomed animals (Figure 4c and 4f). The administration of green tea at 1% during 15 or 30 days appears to be more effective in the reduction of the level of creatine phosphokinase, lactate dehydrogenase, alanine aminotransferase and alkaline phosphatase in the sera of envenomed mice (Figure 5a, b, c and d).

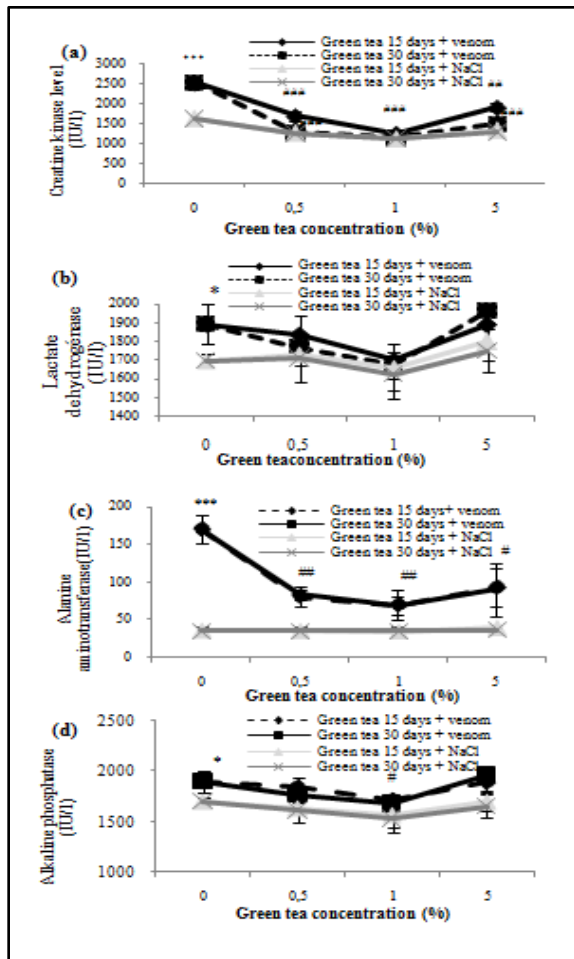


Figure 5: Effects of green tea concentration on the variation in seric levels of creatine kinase (a), lactate dehydrogenase (b), alanine aminotransferase (c) and alkaline phosphatase (d) after experimental envenomation with a sublethal dose of scorpion venom (0.5 mg / kg), 24 hours after its injection.

(Mean \pm S.E.M., n=3 ; Student t test; * P < 0.05 *** P < 0.001 ; Groups of envenomed mice compared to the control (NaCl alone). ### P<0.01; #### P < 0.001; Groups pretreated with green tea compared to the group of mice receiving the venom alone).

4. Discussion

Several studies carried out over the past years have shown that the polyphenolic fractions isolated from green tea inhibit oxidative stress and possess anti-inflammatory activity [5, 20]. The administration of green tea to mice for one month prior to the administration of the venom showed that this plant has a preventive effect against the increased infiltration of the inflammatory cells in cardiac and hepatic tissues induced by the scorpion venom. This effect depends on the dose or the consumption time of the *Camellia sinensis* infusions.

The triggering of the immune-inflammatory response during scorpion envenomation is accompanied by the antioxidant system dysfunction [21, 22]. Several studies have demonstrated the beneficial effect of green tea or its polyphenolic extracts commonly known as flavanols or catechins in the reduction of oxidative or nitrosative stress [23]. Donà et al. reported in 2003 [24] that the green tea polyphenols are potent inhibitors of neutrophil activity, and suggest their use as pharmacological agents in preventive therapy for person at risk for inflammatory diseases. Di Paola et al. (2005) [25] also reported that green tea decreased the induced infiltration of neutrophil levels into lung tissue in experimental model of pulmonary inflammation by carrageenan. The infiltration decrease in inflammatory cells can be attributed to the inhibitory effect of the involved enzymes or cytokines in immune-inflammatory responses such as COX-2 and TNF- α by green tea [26,27]. Polyphenols are also able to modulate the activity, expression and/or secretion of various mediators involved in the immune-inflammatory response. For example, they reduce the expression of adhesion molecules, allowing a decrease in the adhesion and recruitment of blood cells to tissues inflammatory foci [25]. The obtained results in this study showed that, in addition to its effect on the reduction of inflammatory cell infiltration, green tea can also prevent the installation of oxidative and nitrosative stress caused by scorpion venom in cardiac and hepatic tissues by decreasing the nitric oxide levels, lipid peroxidation as well as an improvement in antioxidant systems (catalase and reduced glutathione).

The previous study conducted by Tedeschi and collaborators in 2004 [28] showed that green tea and its extracted polyphenols present an inhibitory effect on the activity of the inducible NO synthase. Other studies have shown that the administration of green tea polyphenols induces a decrease in lipid peroxidation due to its antioxidant activity [29].

Green tea catechins can act as free radical scavenger sensors, reducing the tissue damage [30]. In addition to these effects, green tea flavonoids can chelate iron and copper and prevent their participation in the reactions of Fenton and Haber-Weiss reaction types [31].

The anti-inflammatory and the antioxidative effects of green tea resulted in a remarkable prevention of the immune-inflammatory disorders induced by *Androctonus australis Hector* scorpion venom in the myocardium and the liver parenchyma. The prevention of these disorders was dose- and time-dependent on green tea consumption. This effect was observed at different concentrations (0.5, 1 and 5 %). However, the protective effects of green tea were observed mainly at 1% administered during 30 days when compared with envenomed mice consuming no green tea.

Conclusion

The present study suggests that *Camellia sinensis* has a beneficial preventive effect against cardiac and hepatic inflammatory disturbances and oxidative stress induced after scorpion envenomation. However, further studies are needed to identify biological active molecules in order to accurately describe the molecular mechanism(s) responsible for this anti-inflammatory and antioxidant effect.

Conflicts of interest

The authors do not declare any conflict of interest.

References

1. Wolfram, S. (2007). Effects of green tea and EGCG on cardiovascular and metabolic health. *J Am Coll Nutr*, 26(4): 373S-388S.
2. Parsaei, P., Karimi, M., Asadi, S.Y., Rafieian-Kopaei, M. (2013). Bioactive components and preventive effect of green tea (*Camellia sinensis*) extract on post-laparotomy intra-abdominal adhesion in rats. *Int J Surg*, 11(9): 811-815
3. Abd El-Rahman, S. S., Shehab, G., Nashaat, H. (2017). Epigallocatechin-3-Gallate: The prospective targeting of cancer stem cells and preventing metastasis of chemically-induced mammary cancer in rats. *Am J Med Sci*, 354(1): 54-63
4. Chacko, S. M., Thambi, P. T., Kuttan, R., Nishigaki, I. (2010). Beneficial effects of green tea: a literature review. *Chin. Med*, 5(1): 1-9
5. Tipoe, G. L., Leung, T. M., Hung, M. W., and Fung, M. L. (2007). Green tea polyphenols as an anti-oxidant and anti-inflammatory agent for cardiovascular protection. *Cardiovascular and Haematological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Cardiovascular and Hematological Disorders)*, 7(2): 135-144
6. Friedman, M. (2007). Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas. *Mol Nutr Food Res*, 51(1): 116-134
7. Feily, A., Saki, J., Maraghi, S., Moosavi, Z., Khademvatan, S., Siahpoosh, A. (2012). In vitro activity of green tea extract against *Leishmania major* promastigotes. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 50(3): 233-6
8. Lee, H., Bae, J. H., Lee, S. R. (2004). Protective effect of green tea polyphenol EGCG against neuronal damage and brain edema after unilateral cerebral ischemia in gerbils. *J Neurosci Res*. 77(6): 892-900
9. Bode, A. M., Dong, Z. (2009). Epigallocatechin 3-gallate and green tea catechins: United they work, divided they fail. *Cancer Prev Res*, 2(6): 514-517
10. Unno, K., Takabayashi, F., Yoshida, H., Choba, D., Fukutomi, R., Kikunaga, N., Khishido, T., Oku, N., Hoshino, M. (2007). Daily consumption of green tea catechin delays memory regression in aged mice. *Biogerontology*, 8(2): 89-95
11. Khan, N., Adhami, V. M., Mukhtar, H. (2009). Green tea polyphenols in chemoprevention of prostate cancer: preclinical and clinical studies. *Nutr Cancer*, 61(6): 836-841

12. Lamraoui, A., Adi-Bessalem, S., Laraba-Djebari, F. (2015). Immunopathologic effects of scorpion venom on hepato-renal tissues: Involvement of lipid derived inflammatory mediators. *Exp Mol Pathol*, 99(2): 286-296
13. Sifi, A., Adi-Bessalem, S., Laraba-Djebari, F. (2017). Role of angiotensin II and angiotensin type-1 receptor in scorpion venom-induced cardiac and aortic tissue inflammation. *Exp Mol Pathol*, 102(1): 32-40
14. Krawisz, J. E., Sharon, P., Stenson, W. F. (1984). Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity: assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology*, 87(6): 1344-1350
15. Van Oosterhout, A. J., Van Ark, I., Hofman, G., Van Der Linde, H. J., Fattah, D., Nijkamp, F. P. (1996). Role of interleukin-5 and substance P in development of airway hyperreactivity to histamine in guinea-pigs. *Eur Respir J*, 9(3): 493-499
16. Sun, J., Zhang, X., Broderick, M., Fein, H. (2003). Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess reaction assay. *Sensors*, 3(8): 276-284
17. Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, 95(2): 351-358
18. Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. In *Methods in enzymology: Elsevier* (Vol. 105, pp. 121-126). Academic Press
19. Zhang, Y. (2000). Role of glutathione in the accumulation of anticarcinogenic isothiocyanates and their glutathione conjugates by murine hepatoma cells. *Carcinogenesis*, 21(6): 1175-1182
20. Chatterjee, P., Chandra, S., Dey, P., & Bhattacharya, S. (2012). Evaluation of anti-inflammatory effects of green tea and black tea: A comparative in vitro study. *Adv Pharm Technol Res*, 3(2): 136
21. Dousset, E., Carrega, L., Steinberg, J. G., Clot-Faybesse, O., Jouirou, B., Sauze, N., Devaux, C., Autier, Y., James, Y., Martin-Eauclaire, M.F., Guieu, R. (2005). Evidence that free radical generation occurs during scorpion envenomation. *Comp Biochem Phys C*, 140(2): 221-226
22. Lamraoui, A., Adi-Bessalem, S., Laraba-Djebari, F. (2014). Modulation of tissue inflammatory response by histamine receptors in scorpion envenomation pathogenesis: involvement of H4 receptor. *Inflammation*, 37(5): 1689-1704
23. Bogdanski, P., Suliburska, J., Szulinska, M., Stepien, M., Pupek-Musialik, D., Jablecka, A. (2012). Green tea extract reduces blood pressure, inflammatory biomarkers, and oxidative stress and improves parameters associated with insulin resistance in obese, hypertensive patients. *Nutr. Res*, 32(6): 421-427
24. Donà, M., Dell'Aica, I., Calabrese, F., Benelli, R., Morini, M., Albini, A., Garbisa, S. (2003). Neutrophil restraint by green tea: inhibition of inflammation, associated angiogenesis, and pulmonary fibrosis. *J Immunol*, 170(8): 4335-4341
25. Di Paola, R., Mazzon, E., Muià, C., Genovese, T., Menegazzi, M., Zaffini, R., Suzuki, H., Cuzzocrea, S. (2005). Green tea polyphenol extract attenuates lung injury in experimental model of carrageenan-induced pleurisy in mice. *Respir Res*, 6(1): 1-13
26. Yang, C. S., Chen, L., Lee, M. J., Balentine, D., Kuo, M. C., Schantz, S. P. (1998). Blood and urine levels of tea catechins after ingestion of different amounts of green tea by human volunteers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 7(4): 351-354
27. Peng, G., Dixon, D. A., Muga, S. J., Smith, T. J., Wargovich, M. J. (2006). Green tea polyphenol

- (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits cyclooxygenase-2 expression in colon carcinogenesis. *Molecular Carcinogenesis: Published in cooperation with the University of Texas MD Anderson Cancer Center*, 45(5): 309-319
28. Tedeschi, E., Menegazzi, M., Yao, Y., Suzuki, H., Förstermann, U., Kleinert, H. (2004). Green tea inhibits human inducible nitric-oxide synthase expression by down-regulating signal transducer and activator of transcription-1 α activation. *Mol Pharmacol*, 65(1): 111-120
29. Frei, B., Higdon, J. V. (2003). Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: evidence from animal studies. *J Nutr* 133(10): 3275S-3284S
30. Kondo, K., Kurihara, M., Miyata, N., Suzuki, T., Toyoda, M. (1999). Scavenging mechanisms of (-)-epigallocatechin gallate and (-)-epicatechin gallate on peroxy radicals and formation of superoxide during the inhibitory action. *Free Radic Biol Med.*, 27(7-8): 855-863
31. Dufresne, C. J., Farnworth, E. R. (2001). A review of latest research findings on the health promotion properties of tea. *J Nutr Biochem*, 12(7): 404-421



Disponible en ligne
<https://www.atrss.dz/ajhs>



Original Article

Androctonus australis hector Venom Induced Immuno-Allergic Type Response: Comparison with an Experimental Model of Allergy

Le Venin d'Androctonus australis hector Induit une Réponse de Type Immuno-Allergique : Comparaison avec un Modèle Expérimental d'Allergie

Yousfi-Chaïr Imène, Laraba-Djebari Fatima*, Hammoudi-Triki Djelila

University of Sciences and Technology Houari Boumediene, Faculty of Biological Sciences, Laboratory of Cellular and Molecular Biology, Algiers, Algeria.

ABSTRACT

Introduction: The physiopathology of scorpion envenoming is very complex, and can induce several perturbations reaching different systems, including nervous, cardiovascular, immune and respiratory systems. Envenoming by *Androctonus australis hector* (*Aah*) scorpion is characterized by various symptoms, including pain and cardiovascular and respiratory disturbances. In the most severe cases of envenomation, pulmonary edema could be responsible of death. **Materials and Methods:** This study was carried out as a comparative analysis of the immuno-inflammatory response of envenomed mice with that of an experimental model of allergy. In a purpose of assessing the damage caused by *Aah* venom or its components on the respiratory system, we update an allergic model in mice using a pretreatment with ovalbumin (OVA) for a period of 15 days intra-peritoneally and then intra-nasally. On the other hand, three groups of mice were envenomed by the whole *Aah* venom, its toxic fraction (FtoxG-50), or its non toxic fraction (F1) subcutaneously. **Results:** The inflammatory response was assessed by evaluating the pulmonary vascular permeability, measuring the levels of IgE in sera, and histo-pathological study of lung parenchyma. Our results showed an enhancement in pulmonary vascular permeability, with important changes in the lung parenchyma, including wall thickening, accompanied with IgE synthesis, observed in mice pretreated with ovalbumin. The same results were obtained with envenomed groups of mice. **Conclusion:** The inflammatory pattern of the experimental model of allergy was comparable to those of envenomed groups. The scorpion venom may play an important role in mediating inflammatory response allergic type, in activating immune and non-immune cells and mediators that trigger the allergic disorder. Thus, it should be interesting to investigate the properties of venom components, to learn about the mechanisms by which they stimulate effector cells and inflammatory mediators, which could be used in a therapeutic side.

KEYWORDS: Allergy, Experimental model of mice, Ovalbumin, Lung, Scorpion venom.

RESUME

Introduction: La physiopathologie de l'envenimation des scorpions est très complexe et peut induire plusieurs perturbations atteignant différents systèmes, notamment les systèmes nerveux, cardiovasculaire,

immunitaire et respiratoire. L'envenimation du scorpion d'*Androctonus australis hector* (*Aah*) se caractérise par divers symptômes, notamment des douleurs et des troubles cardiovasculaires et respiratoires. Dans les cas d'envenimation les plus sévères, l'œdème pulmonaire peut être la cause du décès. **Matériels et Méthodes** : Cette étude a été réalisée comme analyse comparative de la réponse immuno-inflammatoire de souris envenimées avec celle d'un modèle expérimental d'allergie. Dans le but d'évaluer les dommages causés par le venin d'*Aah* ou ses composants sur le système respiratoire, nous avons optimisé un modèle allergique chez la souris en utilisant un prétraitement à l'ovalbumine (OVA) pendant une période de 15 jours par voie intra-péritonéale puis intra-nasale. D'autre part, trois groupes de souris ont été envenimés par le venin total d'*Aah*, sa fraction toxique (FtoXG-50) ou sa fraction non-toxique (F1) par voie sous-cutanée. **Résultats** : La réponse inflammatoire a été évaluée par la mesure de la perméabilité vasculaire pulmonaire, la quantification des niveaux sériques d'IgE, et l'étude histo-pathologique sur parenchyme pulmonaire. Nos résultats montrent une augmentation de la perméabilité vasculaire pulmonaire, avec des changements importants dans la structure du parenchyme pulmonaire, avec un épaississement des parois alvéolaires, accompagnés d'une synthèse d'IgE, observés chez des souris prétraitées avec de l'ovalbumine. Les mêmes résultats ont été obtenus avec des groupes de souris envenimées. **Conclusion** : Le profil inflammatoire du modèle expérimental d'allergie était comparable à ceux des groupes envenimés. Le venin de scorpion peut jouer un rôle important dans la médiation d'une réponse inflammatoire de type allergique, dans l'activation des cellules immunitaires et non immunitaires et des médiateurs qui déclenchent le trouble allergique. Ainsi, il serait intéressant d'étudier les propriétés des composants du venin, afin de mieux comprendre les mécanismes par lesquels il stimule les cellules effectrices et les médiateurs inflammatoires qui pourraient être utilisés dans le domaine thérapeutique.

MOTS CLÉS : Allergie, Modèle expérimental de souris, Ovalbumine, Poumon, Venin de scorpion.

* Corresponding author. Tel.: +213-661-516-276 ; fax: +213-21-336-077.
E-mail Address: flaraba@hotmail.com

Received on: 20 June 2020
Revised on: 23 June 2020
Accepted on: 03 July 2020

1. Introduction

In the lungs, edema is one of the most frequent complications in scorpionic accidents, and the principal cause of death in the majority of cases. The pulmonary edema can be induced by two types of factors: a cardiogenic factor directly related to a cardiac dysfunction of the left ventricle, and a non-cardiogenic factor caused by the release of inflammatory mediators [1].

Cardiogenic origin of edema could be due to an ischemia state related to catecholamine and acetylcholine discharge, or biventricular failure leading to left ventricular dysfunction [1,2]. The non-cardiogenic or lesional edema could be due to an increase in membrane permeability resulting from the alveolar capillary membrane lesion and activation of inflammatory cascade by mediators, such as prostaglandins, leukotriens, histamine and cytokines [3].

The bioactive substances of scorpion venom are neurotoxic peptides, present in small amounts, but responsible for almost all the toxicity of *Aah* venom, due to their capacity to act on the voltage-gated sodium channels of excitable cells; thus, they can induce various disturbances, such as the depolarization of the axonal membranes, and a

consequent release of neuromediators, which have deleterious effects on different organs [4-6]. In the lung, the physio-pathological effects of the envenomation seem to be related to the alteration of the alveolo-capillary barrier, resulting a pulmonary vascular permeability increase and remarkable leukocyte infiltration, accompanied by the activation of the inflammatory cascade, with significant lesions of the pulmonary parenchyma [7,8]. These manifestations occurring in the lung following the envenomation suggests other disorders affecting this organ, which could be similar to an allergic type disorder.

Allergy is a hypersensitivity reaction, initiated by adaptive immunological mechanisms. It can be antibody- or cell-mediated. In the majority of cases, the antibody typically responsible for an allergic reaction belongs to the IgE isotype, and these individuals may be referred to as suffering from an IgE-mediated allergy [9,10]. The present study was designed to better understand the mechanisms involved in the immuno-reactivity of the respiratory tract, a comparison was then established between envenomed groups of mice with the whole venom of *Aah*, or one of its components, and an experimental model of allergy induced with ovalbumin.

2. Material and Methods

1. Scorpion venom and its fractions

F1 and FtoxG-50 fractions were isolated from *Aah* venom by gel filtration through Sephadex G50 column as previously described, and were provided from the Laboratory of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences of USTHB [11].

2. Animals

Adult male NMRI mice with an average weight of 20 ± 2 g were purchased from the animal breeding of the Pasteur Institute of Algeria. They were housed in temperature and humidity controlled rooms and received food and water *ad libitum* before being used for study. The experiments were achieved in line with the current guidelines for the care of laboratory animals [12].

3. Experimental protocol

In a purpose of assessing the damages caused by *Aah* venom, or its components on the respiratory system, we developed an allergic murine model using a pretreatment with ovalbumin (OVA) for a period of 15 days [13-15]. First, mice received intra-peritoneally (i.p. route) doses of 10 µg each of OVA, in a solution containing 0.133 mg of Al(OH)₃ on the first, second and third day of pretreatment. The OVA was then administered intra-nasally, without adjuvant, at doses of 2 µg each on the sixth, seventh, fourteenth and fifteenth day of the pretreatment. In a second set of experiment, three groups of mice were envenomed by a sublethal dose of the whole *Aah* venom (10 µg/20 mg of body weight), its toxic fraction (FtoxG-50) (8 µg/20 mg of body weight), or its non-toxic fraction (F1) (8 µg/20 mg of body weight) subcutaneously, and are considered as positive controls of envenomation [16,17]. The negative control is represented by a group of mice injected with physiological saline solution (0.9% NaCl).

4. Determination of pulmonary vascular permeability

In all groups, the lungs were removed at the end of each experiment to determine the pulmonary water content by a method already described and modified [18]. Briefly, the lungs were excised, weighed and dried to a constant weight in an oven at a temperature of 37°C. The difference between wet and dry weight of the lung provided the water content, and was expressed as a percentage of wet lung tissue.

5. Evaluation of IgE concentration in the serum

The IgE level in serum sample was determined by an enzyme-linked immune-sorbent assay method [19]. A 96-well microplate was sensitized with a monoclonal antibody anti-mouse IgE at a concentration of 5 µg/mL dissolved in a 0.1 M carbonate buffer, pH 9.6 at a rate of 100 µL/well, and then incubated overnight at 4°C. After washing with PBS, the non-specific sites are saturated with 3% skimmed milk prepared in PBS for 3 h at 37°C. The serum samples are deposited in triplicate at the rate of 100 µL per well, and the microplate was incubated overnight at 4°C. A solution containing 2 µg/mL of biotinylated anti-IgE antibodies was then deposited. After an incubation of 90 min at 25°C, the streptavidin-peroxidase was added. The peroxidase substrate, composed of a 0.01 M phosphate buffer, pH 7.4 containing 10 µL of H₂O₂ and 1 mg/mL of O-phenylenediamine (OPD), was added to each well, and the microplate was incubated at room temperature for 30 min. After stopping the reaction by adding 50 µL of 30% H₂SO₄. The absorbance was read at 490 nm. The result is expressed in ng/mL.

6. Characterization of histo-pathological effects

The analysis of tissue integrity was performed on the lungs of control, envenomed and pretreated animals. The lungs were carefully removed after the sacrifice of mice, and immediately immersed in formalin at 4% for 48h, then dehydrated in ethyl alcohol, and impregnated in paraffin before making blocks. Sections of 4 µm thick were made using a rotary microtome, and then spread on glass slides. The sections were subjected to topographic staining with Hematoxylin-Eosin, and observed under light microscopy at $\times 400$ magnification.

7. Statistical analyses

The data were reported as mean \pm standard error of the mean (S.E.M.). The statistical significance of differences between groups was analyzed by a Student *t* test. Differences were considered significant if probability values (P) were 0.05 or less.

3. Results

1. Determination of pulmonary vascular permeability

The extent of pulmonary edema was estimated by determining the water content of the lungs in mice envenomed with *Aah* venom, its toxic fraction (FtoxG-50), or its non-toxic fraction (F1). These levels was compared to this obtained with the experimental modal of allergy. The results are expressed as a percentage of wet weight (**Figure 1**).

The results obtained show an increase in the pulmonary water content in the mice envenomed with the whole venom or one of its fractions, by comparing with those of the negative control. Indeed, fairly large values were recorded for the lungs of mice after envenomation with the fraction F1 ($85.859 \pm 8.54 \%$), the closer result to those obtained with OVA-treated mice ($90.5 \pm 4.7 \%$). The increase in these reports reflects the formation of exudate in the lungs and confirms the formation of pulmonary edema (Figure 1).

2. Evaluation of IgE concentration in the serum

The IgE level was measured in the sera of mice after subcutaneous injection of a sublethal dose of the whole venom, its toxic fraction (FtoxG-50) or its non-toxic fraction (F1), and then compared to the level obtained with OVA-treated mice (Figure 2). The inflammatory profile of the allergic model was marked by a high production of IgE in the serum compartment, with a concentration of $34.1 \pm 3.11 \text{ ng/mL}$. When compared to envenomed groups of mice, the higher concentration of IgE was registered in mice injected with F1 fraction ($31.2 \pm 6.54 \text{ ng/mL}$), which is greater than that induced by *Aah* venom ($28.4 \pm 3.78 \text{ ng/mL}$) or FtoxG-50 fraction ($26.8 \pm 1.26 \text{ ng/mL}$) (Figure 2).

3. Characterization of histo-pathological effects

Inflammatory response was also assessed by evaluating the pulmonary edema and the alterations of lung parenchyma (Figure 3). Anatomopathological analysis of the lungs of mice having received a sublethal dose of the venom or one of its fractions, highlighted a damage affecting the alveolar and inter-alveolar space, representing by a complete disorganization of the structure of the pulmonary parenchyma, with edema, hemorrhagic areas, infiltration of inflammatory cells as well as thickening of the intra-alveolar walls comparing with control (Figure 3a). This tissue damage was most important for the injected animals with toxic fraction (Figure 3d). Our data showed a similar profile comparing the allergic model of mice (Figure 3b) with envenomed groups of animals (Figure 3c, 3d and 3e).

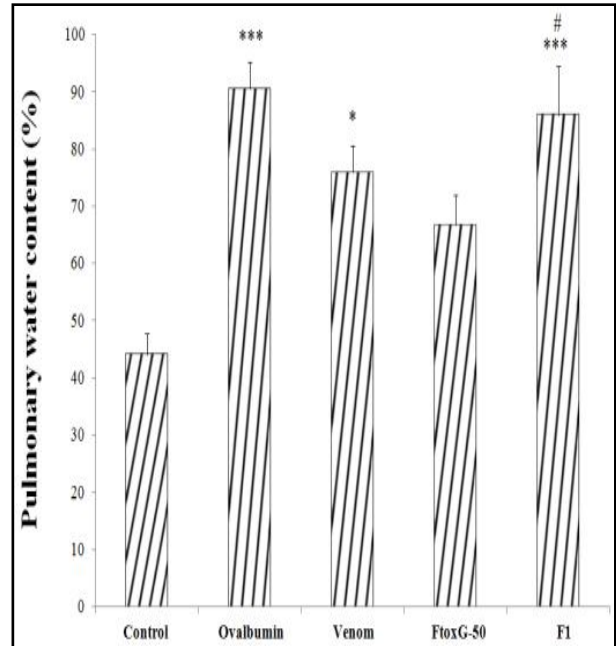


Figure 1: Estimation of pulmonary edema by calculating the wet weight of the lungs of mice 4 h after experimental envenomation with the whole venom of *Aah* (0.5 mg/kg), the FtoxG-50 fraction (0.4 mg/kg) or the F1 fraction (0.4 mg/kg), by comparing with an allergic model (mean \pm standard deviation, n = 4).

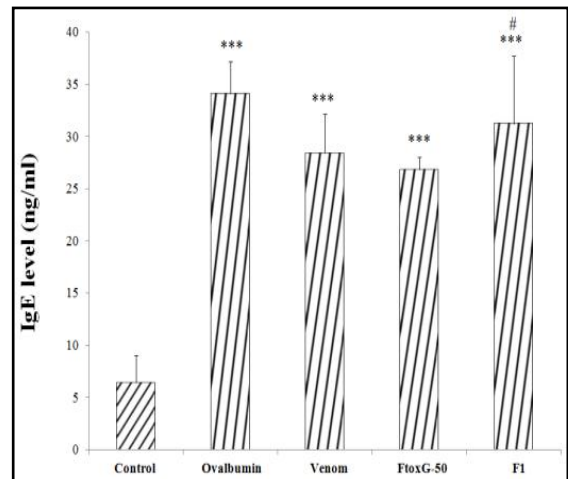


Figure 2: Evaluation of serum IgE concentrations, 4 h after experimental envenomation with the whole venom of *Aah* (0.5 mg/kg), the FtoxG-50 fraction (0.4 mg/kg) or the F1 fraction (0.4 mg/kg), by comparing with an allergic model (mean \pm standard deviation, n = 4).

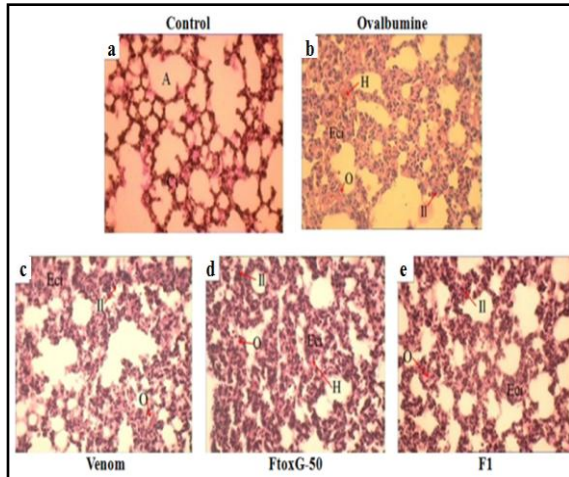


Figure 3: Light photomicrographs of the lungs of mice treated with ovalbumin (b), or injected with *Aah* venom (c), FtoxG-50 fraction (d) or F1 fraction (e) showed an increase in cellular infiltration and an obstruction of airways comparing with control (a).

Alveolus (A), hemorrhage (H), edema (O), leukocyte infiltration (II). Thickening of the inter-alveolar partitions (Eci). Hematoxylin-eosin stained. $\times 400$ magnification.

4. Discussion

The increase in vascular permeability is an early event observed in venom-induced inflammation [20,21]. It is accompanied by heart failure, cardio-respiratory disorders, inflammatory cells infiltration with high levels of cellular enzymatic activity and pro-inflammatory cytokines (IL-1, IL-6 and TNF α) [17,22,23].

Pulmonary edema is associated with acute left ventricular dysfunction and damage, caused by cardiogenic components. It could also result from an increase in capillary lung permeability by non-cardiogenic components [24,25]. The latter appears to be related to an increase of pulmonary vascular permeability that accompanies activation of the inflammatory cascade [25].

The mast cell has been known to be an important cell type involved in IgE-mediated immediate hypersensitivity and allergic disorders [26-28]. Mast cells are activated through their IgE-bound high affinity IgE receptors (Fc ϵ RI), and release the preformed pro-inflammatory mediators [9]. They are also activated by the tachykinin substance P (SP), to induce various effects, such as regulation of neurotransmission, pain, inflammation, cell growth and differentiation and oncogenesis [29].

It has been demonstrated that mast cells are involved in the lung edema induced by scorpion venoms of different species [30,31]. They are also involved in the inflammatory response caused by other types of venoms, such as snake, bee, spider or wasp venoms [21,32-36]. The contribution of neuropeptides, in particular substance P, and the role of tachykinin (NK1) receptor in the lung injury induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom has been also demonstrated [37].

We have previously evaluated the increase in microvascular permeability, the edema formation, the cellular recruitment, the structural lung disorganization and the role of tachykinin molecules in mast cell activation following the administration of *Aah* venom or its components [38].

The allergic reaction is an immune system's response to the inoculation of an allergen. This immune response is initiated during exposure to the allergen, then its recognition by the immune system, and completed by the production and interaction of IgE with effector cells, mainly mast cells, which released mediators that activate other inflammatory cells, responsible for various manifestations, including vasodilation, hemodynamic variations, bronchoconstriction and increased mucus secretion [39-41].

The particularity of hypersensitivity response compared to normal immune response is the IgE production. This isotype of antibody binds to the Fc ϵ RI receptors on the surface of resident mast cells and blood basophils, which initiates a complex intracellular signaling cascade that leads to degranulation and the release of pharmacologically active mediators, such as histamine, lipid metabolites and cytokines. The principal effects of these products are vasodilatation, increased vascular permeability, and smooth muscle contraction, which may act locally or systemically [9,42,43].

We have previously demonstrated that the phenomenon of plasma extravasation after the administration of *Aah* venom, its toxic fraction or non-toxic fraction, promotes the installation of pulmonary edema, following the alteration of the functions of the lung, and the increase in vascular permeability to serum proteins. These damages are accompanied by a massive leukocyte infiltration in the broncho-pulmonary space, and the alteration of the lung parenchyma. We have also underlined the important role of mast cells in mediating the inflammatory response through their NK1 receptors [38]. In this study, the pulmonary immune-reactivity

induced by the constituents of *Aah* venom was compared to that of an experimental model of allergy developed in the laboratory.

The comparative analysis of the immuno-inflammatory response of envenomed mice with an experimental model of allergy showed that the edema induced by *Aah* venom or its components is almost similar to that observed with the experimental model of allergy. *Aah* venom seems to trigger an inflammatory reaction allergic type with high levels of IgE production.

Broncho-pulmonary hyper-responsiveness is a complex phenomenon involving multiple cell populations, including neutrophils, lymphocytes, macrophages, eosinophils, possibly stromal cells and bronchial epithelium. The cell interactions allow mast cells to orchestrate inflammatory innate reactions and complex adaptive immunity, including the pathogenesis of allergies.

One of the parenchymal tissues most sensitive to the action of scorpion venoms is the lung. Its structure is characterized by a large alveolar surface, a high blood flow and an ease in the exchanges between the alveolar air and the vascular compartment, allowing a rapid absorption and excretion of toxic agents. These characteristics could therefore explain the severity of the lung damage observed after scorpion envenoming [44]. The sequestration of polynuclear cells in the lungs and the release of free radicals, reported in several studies, seem to be responsible for lesions of the pulmonary parenchyma of envenomed animals [7,45].

Our results highlight the role of *Aah* venom components in inducing changes in the structure of the lung parenchyma, added to the variation in vascular permeability, and thus the accumulation of inflammatory cells and their products in the broncho-pulmonary space. The production of high levels of IgE suggests that the mast cell signaling could be involved through their FcεRI receptor. This inflammatory pattern is almost similar to the manifestations observed with allergic model, which suggests that *Aah* venom components could induce an inflammatory response allergic type.

The comparative analysis of the immuno-inflammatory response of envenomed mice with an experimental model of allergy constitutes a fundamental tool for a better understanding of the pathophysiology of venomous pathogens. However, the effects of the immuno-allergic response affecting

the broncho-pulmonary space as well as the production of IgE, seem to be accentuated under the action of the non toxic fraction (F1). The presence of allergenic biomolecules in this fraction is to be explored.

Conclusion

In summary, the obtained results indicate that *Aah* venom may play an important role in mediating inflammatory response allergic type, in activating cell types, such as mast cells, and mediators that trigger the allergic disorder. Thus, it should be interesting to investigate the properties of venom components, to elucidate the mechanisms by which they stimulate effector cells and inflammatory mediators, which could be used in therapeutic purposes.

Conflicts of interest

Authors do not declare any conflict of interest.

References

1. Amaral, C.F., Rezende, N.A. (1997). Both cardiogenic and non-cardiogenic factors are involved in the pathogenesis of pulmonary oedema after scorpion envenoming. *Toxicon*;35(7):997-998
2. Teixeira, A.L., Fontoura, B.F., Freire-Maia, L., Machado, C.R., Camargos, E.R., Teixeira, M.M. (2001). Evidence for a direct action of *Tityus serrulatus* scorpion venom on the cardiac muscle. *Toxicon*,39(5) 703-709
3. Andrade, M.V., Caraméz, M.P., Abreu, E.M., Dolnikoff, M., Omar, E.D., Velasco, I.T., & Cunha-Melo, J.R. (2004). Lung compliance, plasma electrolyte levels and acid-base balance are affected by scorpion envenomation in anesthetized rats under mechanical ventilation. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology*, 138(1): 97–104
4. Deshpande, S.B., and Alex, A.B. (2000). "On the management of scorpion stings." *Heart*,83(5): 585-6
5. Di Tommaso, A., Juste, M.O., Martin-Eauclaire, M.F., Dimier-Poisson, I., Billiard, P., Aubrey, N. (2012). Diabody mixture providing full protection against experimental scorpion envenoming with crude *Androctonus australis* venom. *J. Biol. Chem.*;287(17):14149-14156
6. Bush, S. P., Ruha, A. M., Seifert, S. A., Morgan, D. L., Lewis, B. J., Arnold, T. C., Clark, R. F., Meggs,

- W. J., Toschlog, E. A., Borron, S. W., Figge, G. R., Sollee, D. R., Shirazi, F. M., Wolk, R., de Chazal, I., Quan, D., García-Ubbelohde, W., Alagón, A., Gerkin, R. D., & Boyer, L. V. (2015). Comparison of F(ab')₂ versus Fab antivenom for pit viper envenomation: a prospective, blinded, multicenter, randomized clinical trial. *Clinical toxicology*, *53*(1), 37–45
7. Adi-Bessalem, S., Laraba-Djebari, F. (2013). Lipid-derived inflammatory mediators: Their role in pathogenesis of scorpion envenomation, *Toxicon*, *75*, 219
8. Martin-Eauclaire, M.F., Adi-Bessalem, S., Hammoudi-Triki, D., Laraba-Djebari, F., Bougis, P.E. (2019). Serotherapy against Voltage-Gated Sodium Channel-Targeting α Toxins from *Androctonus Scorpion* Venom. *Toxins*; *11*(2):63
9. Kawakami, T., Kashiwakura, J., Kawakami, Y. (2014). Histamine-releasing factor and immunoglobulins in asthma and allergy. *Allergy Asthma Immunol. Res.*; *6*(1):6-12
10. Baur, X., Akdis, C. A., Budnik, L. T., Cruz, M. J., Fischer, A., Förster-Ruhrmann, U., Göen, T., Goksel, O., Heutelbeck, A. R., Jones, M., Lux, H., Maestrelli, P., Munoz, X., Nemery, B., Schlünssen, V., Sigsgaard, T., Traidl-Hoffmann, C., & Siegel, P. (2019). Immunological methods for diagnosis and monitoring of IgE-mediated allergy caused by industrial sensitizing agents (IMExAllergy). *Allergy*, *74*(10), 1885–1897
11. Laraba-Djebari, F., Legros, C., Crest, M., Céard, B., Romi, R., Mansuelle, P., Jacquet, G., Van Rietchoten, J., Gola, M., Rochat, H., Bougis, P.E., Martin, M.F. (1996). Eauclaire, Purification, characterization and genomic organization of KTX2 from *Androctonus australis*, a new inhibitor of voltage and calcium activated K⁺ channel. *Toxicon*, *34*(3):331
12. Mac Arthur Clark, J.A., Sun, D. (2018). Guidelines for the ethical review of laboratory animal welfare People's Republic of China National Standard GB/T 35892-2018 [Issued 6 February 2018 Effective from 1 September 2018]. *Animal Model Exp. Med.*; *3*(1):103-113
13. Shardonofsky, F.R., Venzor, J., Barrios, R., Leong, K., Huston, D.P. (1999). Therapeutic efficacy of an anti-IL-5 monoclonal antibody delivered into the respiratory tract in a murine model of asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *104*, (1), 215-221
14. Shi, J. P., Wang, S. Y., Chen, L. L., Zhang, X. Y., Zhao, Y. H., Du, B., Jiang, W. Z., Qian, M., & Ren, H. (2016). P2Y₆ contributes to ovalbumin-induced allergic asthma by enhancing mast cell function in mice. *Oncotarget*, *7*(38), 60906–60918
15. Kishta, O. A., Sabourin, A., Simon, L., McGovern, T., Raymond, M., Galbas, T., Majdoubi, A., Ishido, S., Martin, J. G., & Thibodeau, J. (2018). March1 E3 Ubiquitin Ligase Modulates Features of Allergic Asthma in an Ovalbumin-Induced Mouse Model of Lung Inflammation. *Journal of immunology research*, *2018*, 3823910
16. Sami-Merah, S., Hammoudi-Triki, D., Martin-Eauclaire, M.F., Laraba-Djebari, F. (2008). Combination of two antibody fragments F(ab')₂/Fab: An alternative for scorpion envenoming treatment, *International Immunopharmacology*, *8*(10): 1386-1394
17. Adi-Bessalem, S., Mendil, A., Hammoudi-Triki, D., Laraba-Djebari, F. (2012). Lung immunoreactivity and airway inflammation: their assessment after scorpion envenomation. *Inflammation*; *35*(2):501-508
18. Deshpande, S.B., Bagchi, S., Rai, O.P., Aryya, N.C. (1999). Pulmonary oedema produced by scorpion venom augments a phenyldiguanide-induced reflex response in anaesthetized rats. *J. Physiol.*; *521*(2): 537-544
19. Mehta, A.K., Singh, B.P., Arora, N., Gaur, S.N. (2010). Choline attenuates immune inflammation and suppresses oxidative stress in patients with asthma. *Immunobiology*, *215*(7):527-534
20. Amaral, C.F., Barbosa, A.J., Leite, V.H., Tafuri, W.L., de Rezende, N.A. (1994). Scorpion sting-induced pulmonary oedema: evidence of increased alveolocapillary membrane permeability. *Toxicon*, *32* (8):999-1003
21. Rattmann, Y. D., Pereira, C. R., Cury, Y., Gremski, W., Marques, M. C., & da Silva-Santos, J. E. (2008). Vascular permeability and vasodilation induced by the *Loxosceles intermedia* venom in rats: involvement of mast cell degranulation, histamine and 5-HT receptors. *Toxicon*, *51*(3), 363–372
22. Hammoudi-Triki, D., Lefort, J., Rougeot, C., Robbe-Vincent, A., Bon, C., Laraba-Djebari, F., & Choumet, V. (2007). Toxicokinetic and toxicodynamic analyses of *Androctonus australis* hector venom in rats: optimization of antivenom therapy. *Toxicology and applied pharmacology*, *218*(3), 205–214

23. Adi-Bessalem, S., Hammoudi-Triki, D., Laraba-Djebari, F. (2008). Pathophysiological effects of *Androctonus australis hector* scorpion venom: Tissue damages and inflammatory response. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 60, Issues 4–5: Pages 373-380
24. Gueron, M., Adolph, R.J., Grupp, I.L., Gabel, M., Grupp, G., Fowler, N.O. (1980). Hemodynamic and myocardial consequences of scorpion venom. *Am. J. Cardiol*;45(5):979-986
25. Amaral, C.F., de Rezende, N.A., Freire-Maia, L. (1993). Acute pulmonary edema after *Tityus serrulatus* scorpion sting in children. *Am. J. Cardiol*.;71(2):242-245
26. Galli, S.J., Grimbaldeston, M., Tsai, M. (2008). Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of immunity. *Nat. Rev. Immunol*.;8(6):478-486
27. Dougherty, R.H., Sidhu, S.S., Raman, K. (2010). Accumulation of intraepithelial mast cells with a unique protease phenotype in T(H)2-high asthma. *J. Allergy Clin. Immunol*.;125(5):1046-1053.e8.
28. Andersson, C.K., Bergqvist, A., Mori, M., Mauad, T., Bjermer, L., Erjefält, J.S. (2011). Mast cell-associated alveolar inflammation in patients with atopic uncontrolled asthma. *J. Allergy Clin. Immunol*.;127(4):905-12.e127
29. Rosso, M., Muñoz, M., Berger, M. (2012). The role of neurokinin-1 receptor in the microenvironment of inflammation and cancer. *ScientificWorldJournal*:381434
30. De-Matos, I.M., Talvani, A., Rocha, O.O., Freire-Maia, L., Teixeira, M.M. (2001). Evidence for a role of mast cells in the lung edema induced by *Tityus serrulatus* venom in rats. *Toxicon*.;39(6):863-867
31. Dutta, A., Deshpande, S.B. (2011). Indian red scorpion venom-induced augmentation of cardio-respiratory reflexes and pulmonary edema involve the release of histamine. *Toxicon*.;57(2):193-198
32. Konno, K., Hisada, M., Naoki, H., Itagaki, Y., Kawai, N., Miwa, A., Yasuhara, T., Morimoto, Y., & Nakata, Y. (2000). Structure and biological activities of eumenine mastoparan-AF (EMP-AF), a new mast cell degranulating peptide in the venom of the solitary wasp (*Anterhynchium flavomarginatum micado*). *Toxicon*, 38(11), 1505–1515
33. Ferreira, T., Camargo, E. A., Ribela, M. T., Damico, D. C., Marangoni, S., Antunes, E., De Nucci, G., & Landucci, E. C. (2009). Inflammatory oedema induced by *Lachesis muta muta* (Surucucu) venom and LmTX-I in the rat paw and dorsal skin. *Toxicon*, 53(1), 69–77
34. Yshii, L. M., Souza, G. H., Camargo, E. A., Eberlin, M. N., Ribela, M. T., Muscará, M. N., Hyslop, S., & Costa, S. K. (2009). Characterization of the mechanisms underlying the inflammatory response to *Polistes lanio lanio* (paper wasp) venom in mouse dorsal skin. *Toxicon*, 53(1), 42–52
35. Galvão Nascimento, N., Sampaio, M.C., Amaral Olivo, R., Teixeira, C. (2010). Contribution of mast cells to the oedema induced by *Bothrops moojeni* snake venom and a pharmacological assessment of the inflammatory mediators involved. *Toxicon*.;55(2-3):343-352
36. Wei, J.F., Wei, X.L., Mo, Y.Z., He, S.H. (2010). Induction of microvascular leakage and histamine release by promutoxin, an Arg49 phospholipase A2. *Toxicon*;55(4):888-896
37. Matos, I.M., Souza, D.G., Seabra, D.G., Freire-Maia, L., Teixeira, M.M. (1999). Effects of tachykinin NK1 or PAF receptor blockade on the lung injury induced by scorpion venom in rats. *Eur. J. Pharmacol*.;376(3):293-300
38. Chair-Yousfi, I., Laraba-Djebari, F., Hammoudi-Triki, D. (2015). *Androctonus australis hector* venom contributes to the interaction between neuropeptides and mast cells in pulmonary hyperresponsiveness. *Int. Immunopharmacol*.;25(1):1 9-29
39. Eckl-Dorna, J., Villazala-Merino, S., Campion, N. J., Byazrova, M., Filatov, A., Kudlay, D., Karsonova, A., Riabova, K., Khaitov, M., Karaulov, A., Niederberger-Leppin, V., & Valenta, R. (2019). Tracing IgE-Producing Cells in Allergic Patients. *Cells*, 8(9), 994
40. Rönnberg, E., Ghaib, A., Ceriol, C., Enoksson, M., Arock, M., Säfholm, J., Ekoff, M., & Nilsson, G. (2019). Divergent Effects of Acute and Prolonged Interleukin 33 Exposure on Mast Cell IgE-Mediated Functions. *Frontiers in immunology*, 10, 1361.
41. Kim, M. J., Je, I. G., Song, J., Fei, X., Lee, S., Yang, H., Kang, W., Jang, Y. H., Seo, S. Y., & Kim, S. H.

- (2020). SG-SP1 Suppresses Mast Cell-Mediated Allergic Inflammation via Inhibition of FcεRI Signaling. *Frontiers in immunology*, 11, 50
42. Kim, H.S., Kawakami, Y., Kasakura, K., Kawakami, T. (2020). Recent advances in mast cell activation and regulation. *Faculty Rev-196*
43. Vitallé, J., Terrén, I., Orrantia, A., Bilbao, A., Gamboa, P. M., Borrego, F., & Zenarruzabeitia, O. (2020). The Expression and Function of CD300 Molecules in the Main Players of Allergic Responses: Mast Cells, Basophils and Eosinophils. *International journal of molecular sciences*, 21(9), 3173
44. Djélila Hammoudi-Triki, Elisabeth Ferquel, Annie Robbe-Vincent, Cassian Bon, Valérie Choumet, Fatima Laraba-Djebari, Epidemiological data, clinical admission gradation and biological quantification by ELISA of scorpion envenomations in Algeria: effect of immunotherapy, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, Volume 98, Issue 4, 2004, Pages 240-250, ISSN 0035-9203, [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(03\)00062-2](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(03)00062-2).
45. Vera L. Petricevich, Anselmo Hernández Cruz, Fredy I.V. Coronas, Lourival D. Possani, Toxin gamma from *Tityus serrulatus* scorpion venom plays an essential role in immunomodulation of macrophages, *Toxicon*, Volume 50, Issue 5, 2007, Pages 666-675, ISSN 0041-0101, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.06.001>



Disponible en ligne
<https://www.atrss.dz/ajhs>



Original Article

Neuroprotective effect of Coenzyme Q10 against Neurological Disorders induced in an Experimental Model of Epilepsy

Effet Neuroprotecteur de la Coenzyme Q10 sur les Troubles Neurologiques induits chez un modèle Expérimental d'Epilepsie

Ahras-Sifi Nesrine and Laraba-Djebari Fatima*

USTHB, Faculty of Biological Sciences, Laboratory of Cellular and Molecular Biology, BP32, El Alia, Bab Ezzouar, 16111 Algiers, Algeria

ABSTRACT

Introduction: Epilepsy is a common neurological disorder characterized by recurrent seizures and a neurodegenerative process. Neuroinflammation, oxidative stress and mitochondrial dysfunction may play an important role in the pathophysiology of seizures. In this study, a neurodegenerative model of seizure was developed using Kaliotoxin (KTx), a potassium channel blocker neurotoxin isolated from scorpion venom. The role of the coenzyme Q10 (CoQ10), which is an essential cofactor of the electron transport chain in mitochondria against KTx-disorders was investigated. **Subjects and Methods:** Naval Medical Research Institute (NMRI) mice were injected with KTx by intracerebroventricular (i.c.v) route prior or no the use of CoQ10 administered by *per os* (p.o) route. **Results:** Binding of KTx to its biological target the Kv channels, causes seizures, activation of inflammatory response and oxidative stress characterized by an increase of cyclooxygenase 2 (COX-2) expression, Nitric oxide (NO) and Malondialdehyde (MDA) levels associated to a decrease of GSH level. The neuroinflammatory response is accompanied by cerebral alterations. The administration of CoQ10 before KTx injection seems to be able to reduce the observed alterations, probably by reducing oxidative stress characterized by an increase of anti-oxidant markers (GSH level and the catalase activity). **Conclusions:** The developed model using KTx could help to the understanding of the molecular pathway involved in the neuropathological processes related to K⁺ channel dysfunctions. The CoQ10 seems to have a neuroprotective effect against the induced disorders by KTx by enhancing the mitochondrial function. These findings suggested the therapeutic potential of the CoQ10 in neurodegenerative disorders. The CoQ10 treatment could be a new therapeutic approach in brain alterations due to seizure.

KEY WORDS: Seizure, neurodegeneration, neurotoxin, mitochondria, coenzyme Q10.

RÉSUMÉ

Introduction: L'épilepsie est un trouble neurologique caractérisé par des crises récurrentes et un processus neurodégénératif. La neuro-inflammation, le stress oxydatif et le dysfonctionnement mitochondrial semblent jouer un rôle important dans la physiopathologie des crises. Dans cette étude, un modèle neurodégénératif de convulsions a été développé en utilisant la kaliotoxine (KTx), une neurotoxine purifiée à partir du venin de scorpion. Le rôle de la coenzyme Q10 (CoQ10), un cofacteur essentiel de la chaîne respiratoire mitochondriale a été étudié chez ce modèle.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



Sujets et méthodes : Des souris de l'Institut naval de recherche médicale (Naval Medical Research Institute, NMRI) ont reçu une injection de KTx par voie intracérébro-ventriculaire (i.c.v) avec ou sans prétraitement en utilisant la CoQ10 administrée par voie *per os* (p.o). **Résultats :** La liaison de KTx à sa cible biologique, les canaux potassiques Kv, provoque des convulsions. Cette fixation induit une activation de la cascade neuro-inflammatoire et du stress oxydatif. En effet, une augmentation de l'expression de la cyclo-oxygénase 2 (COX-2) et des taux de monoxyde d'azote (NO) et de malondialdéhyde (MDA) associés à une diminution du taux de GSH a été observée. Cette augmentation se traduit par d'importantes lésions cérébrales. L'administration du CoQ10 avant l'injection de KTx semble pouvoir réduire les lésions cérébrales, en améliorant la balance oxydative. **Conclusions :** Ce modèle pourrait servir comme outil afin d'explorer les mécanismes impliqués dans les processus neuropathologiques liés aux dysfonctionnements du canal Kv. La CoQ10 semble avoir un effet neuroprotecteur en améliorant la fonction mitochondriale. La CoQ10 pourrait constituer une nouvelle approche thérapeutique dans les troubles neurodégénératifs liés aux convulsions.

MOTS CLES: Convulsion, neurodégénérescence, neurotoxine, mitochondrie, coenzyme Q10.

* Corresponding Author: Fatima Laraba-Djebari : tel : 00 213 21 24 79 13
fax : 00 213 21 24 72 17 ; e-mail : flaraba@hotmail.com

Received on : 03 juillet 2019
Revised on : 10 juin 2020
Accepted on : 17 juin 2020

1. Introduction

The epilepsy is considered as one of the most common neurological disorders worldwide, with a prevalence of 0.5–1% of the population [1]. The epilepsy is very complex neurological disorder characterized by recurrent seizures resulting from excessive activation of cerebral neurons due to ion channel dysfunction [2].

Despite the development of conventional and novel antiepileptic drugs, one-third of adult epileptic patients do not respond to antiepileptic drugs or surgical treatment and therefore suffer from intractable epilepsy [3, 4]. Understanding the pathophysiology of seizure relies largely on the use of epileptic models, such as, the use of ion channel modulators [5-7].

The Kaliotoxin is a potassium channel blocker neurotoxin, with high affinity to the voltage-gated potassium channels (Kv1.1 and Kv1.3). This neurotoxin was isolated from *Androctonus australis hector* scorpion venom. It has an excitotoxic effect when it is injected in mice by intra-cerebro-ventricular route [8]. Indeed, the voltage-dependent potassium channels (Kv) are found in all excitable cells; they contribute to the regulation of the membrane potential and they are involved in the repolarization phase [9]. Many studies have shown that dysfunction of Kv channels can lead to various forms of epilepsy [10]. However, the pathological

mechanisms involved in the process of epileptogenesis are still poorly understood [11-13].

Various hypotheses have been raised to explain the pathogenesis of epilepsy, in particular the involvement of oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neuroinflammation. The oxidative stress is emerging as a mechanism that plays an important role in the etiology of seizure-induced neuronal death [14]. It plays a crucial role in neuroinflammation and mitochondrial dysfunction induced brain damage during epileptic seizures [15, 16].

In the inner mitochondrial membrane, Coenzyme Q10 (ubiquinone), is essential for electron transfer activities during oxidative phosphorylation [17]. Recent studies reported that lipid peroxidation in epileptic patients is accompanied by a reduction in CoQ10 that aggravates the brain alterations [18, 19]. The CoQ10 was known for its key role in mitochondrial bioenergetics [20]. Indeed, the CoQ10 plays a vital role in ATP production [21]. The CoQ10 also has membrane-stabilizing properties and acts as an antioxidant in both mitochondrial and lipid membranes [22]. The neuroprotective effects of the CoQ10 have been reported in multiple models of neurodegeneration, and were investigated as a promising neuroprotective in Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and other neurodegenerative disorders; including Huntington's disease and epilepsy [23].

Therefore, the aim of this study was to investigate the potential neuroprotective effect of CoQ10 on brain alteration in an experimental model of seizure induced by a K⁺-channel blocker neurotoxin.

2. Subjects and Methods

2.1. Experimental animals

The male NMRI mice (9–10 weeks old) were used for experiments. The animals were housed in plastic perspex cages under controlled conditions (ambient temperature of $21 \pm 2^\circ\text{C}$, natural light–dark cycle) for acclimation. Standard rodent chow and water *ad libitum* were provided. All experiments were done at the same time of day (between 9:00 and 12:00 AM) to minimize circadian influence on seizure susceptibility. Animals were used according to the European Community rules of the Ethical Committee for animal Welfare [24]. All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used.

2.2. Chemicals and drugs

The Kaliotoxin (KTx) was isolated from *Androctonus australis hector* scorpion venom [8]. The CoQ10 was obtained from Nutri-santé Laboratory (France). Both KTx and CoQ10 were dissolved in sterile saline (0.9% NaCl). All other chemicals were of pure analytical grad and were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

2.3. Experimental procedure

Mice were randomly divided into four experimental groups of 7 mice each. The first group (the normal control group) consisted of mice that received only vehicle (0.9% NaCl) by intra-cerebro-ventricularly (i.c.v.) route. The second group (KTx group, animal model of seizure) mice were injected by KTx (25 ng/25 g) by i.c.v. route. The third group (CoQ10 group): Mice received CoQ10 (100 mg /kg) *per os* (o.p) route 5 et 1 h before sterile saline (0.9% NaCl) i.c.v. injection. The fourth group (KTx and CoQ10-treated group): Mice received CoQ10 (100 mg /kg; o.p) 5 et 1 h before KTx (25 ng/ 25g; i.c.v).

After 24 hours, animals were sacrificed and four brains tissues for each group were obtained and

immediately frozen at -80°C for the different biochemical determinations. The three other brains were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS (pH 7.5) during 24 h at room temperature for histological and immunohistochemical studies.

2.4. Estimation of nitrites

The accumulation of nitrites (NO_2^-) in the supernatant is an indicator of the production of nitric oxide (NO). The nitrites were determined with a colorimetric assay with Greiss reagent (0.1% N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride, 1% sulfanilamide, and 2.5% phosphoric acid). Equal volumes of the supernatant and the Greiss reagent were mixed. The mixture was incubated for 20 min at room temperature and the absorbance was measured at 540 nm. The concentration of nitrites in the supernatant was determined from a sodium nitrite standard curve and was expressed as micromoles of per milligram of tissue ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ tissue) [25].

2.5. Determination of lipid peroxides

The amount of malondialdehyde (MDA), a measure of lipid peroxidation in cerebral cortex was determined by the spectrophotometry as thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) at 532 nm according to the method described by Esterbauer [26]. Molar extinction coefficient of chromophore ($1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) was used and concentration was expressed as millimoles of MDA formed per milligram of tissue (mmol/mg tissue).

2.6. Determination of glutathione

The level of reduced glutathione (GSH) in cerebral cortex was measured in brain tissue using Ellman method [27]. Tissue GSH levels were expressed as millimoles of per milligram tissue weight (mmol/mg tissue). Molar extinction coefficient of chromophore ($1.36 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) was used.

2.7. Determination of catalase activity

The catalase activity was assayed according to Aebi [28], wherein breakdown of hydrogen peroxide (H_2O_2) is measured at 240 nm using spectrophotometer. The results were expressed as the enzyme concentration required for the decomposition of 1 mol of H_2O_2 per min per milligram of tissue (U/mg tissue).

2.8. Histological Assessment

The haematoxylin and the eosin (H&E)-stained, deparaffinized sections (3 μ m thick) were observed through a light microscope equipped with a camera (Leica Microsystems, Germany).

2.9. Immunohistochemical detection brain COX-2 expression

The deparaffinized sections (3% H₂O₂ in PBS for 10 min) were pre-blocked for 30 min with 5% bovine serum albumin (BSA). Then the sections were incubated overnight at 4 °C with primary rabbit antibodies specific to COX-2 (1:100 dilution) (Dako, Denmark).

The sections were washed with phosphate buffered saline (PBS), incubated for 10 min with biotinylated secondary antibody and stained with 3,3'-diaminobenzidine (DAB) solution (Dako, Denmark). Finally, the slides were counterstained with haematoxylin for 5 min and examined using a video camera installed on a light microscope (Leica Microsystems, Germany).

2.10. Statistical analysis

Data were analyzed by unpaired Student's *t* test. P values of less than 0.05 were considered to indicate a statistically significant difference. Microsoft Excel software was used.

3. Results

3.1. Effect of CoQ10 on oxidative stress in the KTx induced seizure

The kaliotoxin (KTx) induced oxidative stress in brain homogenates as reflected by a significant increase in MDA ($p < 0.01$) and NO ($p < 0.001$) concentrations associated with significant reductions in GSH ($p < 0.01$) level compared with the normal control group (**Figure 1**).

These deleterious effects associated with KTx-induced seizures were restored by CoQ10 treatment as compared with the untreated KTx animal group. The CoQ10 appears to contribute to the amelioration of antioxidant status in treated animals with the KTx.

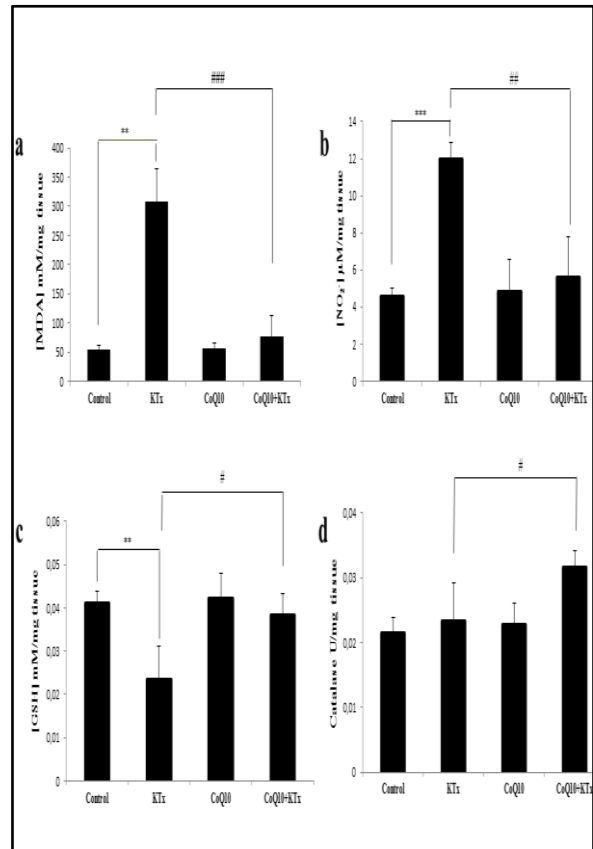


Figure 1: Effect of CoQ10 on KTx-induced oxidative stress parameters: (a) MDA (mM/mg tissue), (b) NO (μ M/mg tissue), (c) GSH (mM/mg tissue), and (d) catalase (U/mg tissue) in brain tissue homogenates.

Values are means \pm SD (n=4); Student's *t* test; * Compared with normal control group. # Compared with KTx animal group

3.2. Effect of CoQ10 on histopathological alterations induced by KTx

Histological analysis of the cerebral cortex of the group injected animals with KTx showed several alterations characterized by cerebral oedema, inflammatory cell infiltrate and neuronal pyknosis (**Figure 2b**). However, sections obtained from the treated animals with CoQ10 prior to the KTx injection, revealed an attenuation of pathological changes, with an almost normal histological structure comparable to that of the control group (**Figure 2d**).

3.3. Effect of CoQ10 on the brain tissue COX-2 expression induced by KTx

The KTx administration enhanced the expression of COX-2 in the cerebral cortex area compared to that of control group (Figure 3b). However, CoQ10 markedly decreased the brain tissue COX-2 expression induced by KTx, thereby restoring normal expression (Figure 3d).

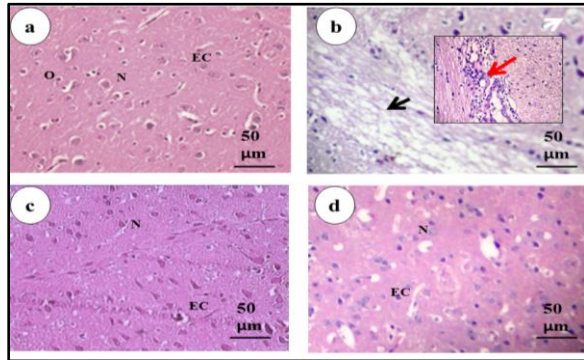


Figure 2: Effect of CoQ10 treatment on tissular alterations induced by KTx-seizure. (a) Control group showing of the cerebral cortex area. (b) KTx group showing neuronal necrosis (white arrow), oedema (black arrow) and inflammatory infiltrate (red arrow). (c) CoQ10 group displaying normal histological structure as a control group. (d) CoQ10 + KTx treated animals showing mitigated histopathological alterations with almost normal cerebral cortex structure.

The bar = 50 μm. N: neuron; EC: endothelial cell; O: oligodendrocyte (H-E staining).

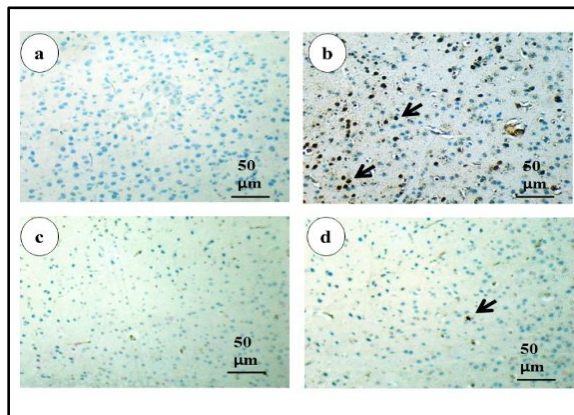


Figure 3: Effect of CoQ10 on KTx-induced changes in immunohistochemical staining of brain COX-2 expression. (a) Control group (b) KTx-treated group (c) CoQ10 group (d) CoQ10+KTx group. Immunohistomarking with the anti-COX-2 antibody is indicated with the black arrow. KTx induces an increase in the expression of COX-2. Treatment with CoQ10 decreases COX-2 expression.

5. Discussion

In the present study, convulsive dose of KTx caused neuroinflammation and oxidative damage [29]. Indeed, a relationship between free radical and seizure has been established. Reactive oxygen species (ROS) have been involved in the development of seizures and seizure-induced neurodegeneration [30]. This study supports the hypothesis that oxidative stress occurs in the cerebral cortex during seizures, which indicates that brain damage induced by the oxidative process that plays a crucial role in the physiological consequences of seizures. We observed in this study, an increase of MDA level and a depletion of the GSH level an antioxidant parameter in brain homogenates. This could be explained by the excitotoxicity associated with excessive neurotransmitter release and oxidative stress leading to free radical damage [31, 32].

This oxidative process can induce damage on all intracellular organelles (e.g., endoplasmic reticulum, mitochondria) leading to cell death [33]. Due to their high content of polyunsaturated phospholipids, the mitochondria are especially sensitive to lipid peroxidation. Mitochondrial dysfunction and neuroinflammation have been well reported to play a critical role in the pathophysiology of epilepsy [34]. Under normal conditions, there is a steady state balance between the production of ROS and their scavenging by the cellular antioxidant system. However, when ROS production is excessive, the intrinsic antioxidant scavenging capacity is submerged, resulting in oxidative stress and cellular oxidative damage [35].

Our results showed that treatment with CoQ10 before KTx-induced seizures reduced lipid peroxidation and increase antioxidant parameters in the brain of animals injected with KTx, resulting in an overall decrease in oxidative stress. CoQ10 is a membrane stabilizer and an essential cofactor of the electron transport chain in the mitochondrial respiratory chain [36]. It accumulates in the mitochondria and restores the loss in mitochondrial transmembrane potential, which results in the reduction of mitochondrial ROS generation and thus protect the mitochondria and cellular components from the oxidative damage [37].

Moreover, pre-treatment with CoQ10 prior to neurotoxin injection induced a decrease in COX-2 expression. This treatment appears to inhibit the expression of the COX-2 [38]. The COX-2 is the

inducible form of cyclooxygenase enzymes, it is the first enzyme involved in the biotransformation of arachidonic acid in response to different stimuli such as pro-inflammatory cytokines that are released by astrocytes and microglial cells [39]. Overexpression of COX-2 in the brain has been reported following convulsions induced in epilepsy models and in patients with epilepsy [40]. This positive response is due to the induction of the COX-2 by pro-inflammatory cytokines, in particular IL-1B which induce the activation of NFκB (Nuclear Factor -KappaB) and MAPK (MAPkinases) signaling pathways, which will lead to the gene transcription coding for the most innate immunity proteins, such as pro-inflammatory cytokines (IL-1β, IL-6 and TNF-α), chemokines (CCL2, IL-8, etc.), prostaglandins, cyclooxygenase-2 (COX-2) and the inducible NO synthase (iNOS), which can explain the increase in the level of NO and COX-2 expression after KTx convulsions [41, 42]. However, in this study we did not investigate whether the treatment with coenzyme Q10 altered the seizures induced by KTx.

Conclusion

In conclusion, these results showed that KTx is able to induce neurological disorders by blocking the Kv ion channel. This developed model using KTx could help to the understanding of the molecular pathway involved in the neuropathological processes related to K⁺ channel dysfunctions. The CoQ10 seems to have a neuroprotective effect by enhancing the mitochondrial function. The mitochondrial function may be a new pathway to explore in neurodegenerative diseases and CoQ10 treatment could be a new therapeutic approach in brain alterations due to seizures.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Pariente, G., Wainstock, T., Sheiner, E. (2019). Perinatal outcome of women with epilepsy: Results from a population-based cohort study. *Am J Obstet Gynecol*, 220, 1: 166
2. Zhang, S., Zhu, Y., Cheng, J., Tao, J. Ion Channels in Epilepsy: Blasting Fuse for Neuronal Hyperexcitability. *Epilepsy-Advances in Diagnosis and Therapy*; Al-Zwaini, I.J., Ban Abdul-Hameed, M.A: London, United Kingdom, 2019; 1-12
3. Schmidt, D., Löscher, W. (2005). Drug resistance in epilepsy: putative neurobiologic and clinical mechanisms. *Epilepsia*, 46, 6: 858-877
4. Dalic, L., Cook, M. J. (2016). Managing drug-resistant epilepsy: challenges and solutions. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 12: 2605
5. Sarkisian, M. R. (2001). Overview of the current animal models for human seizure and epileptic disorders. *Epilepsy Behav*, 2, 3: 201-216
6. Löscher, W. (1999). Animal models of epilepsy and epileptic seizures. *Antiepileptic drugs*, 19-62
7. Carvalho, F. F., Nencioni, A. L. A., Lebrun, I., Sandoval, M. R. L., Dorce, V. A. (1998). Behavioral, electroencephalographic, and histopathologic effects of a neuropeptide isolated from *Tityus serrulatus* scorpion venom in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 60,1: 7-14
8. Laraba-Djebari, F., Legros, C., Crest, M., Ceard, B., Romi, R., Mansuelle, P., Rochat, H. (1994). The kaliotoxin family enlarged. Purification, characterization, and precursor nucleotide sequence of KTX2 from *Androctonus australis* venom. *J. Biol. Chem*, 269, 52: 32835-32843
9. Mourre, C., Chernova, M. N., Martin-Eauclaire, M. F., Bessone, R., Jacquet, G., Gola, M., Crest, M. (1999). Distribution in rat brain of binding sites of kaliotoxin, a blocker of Kv1. 1 and Kv1. 3 α-subunits. *J. Pharmacol. Exp. Ther*, 291, 3: 943-952
10. Villa, C., Combi, R. (2016). Potassium channels and human epileptic phenotypes: an updated overview. *Front cell neurosci*, 10: 81
11. Monaghan, M. M., Menegola, M., Vacher, H., Rhodes, K. J., Trimmer, J. S. (2008). Altered expression and localization of hippocampal A-type potassium channel subunits in the pilocarpine-induced model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience*, 156, 3: 550-562
12. Robbins, C. A., Tempel, B. L. (2012). Kv1. 1 and Kv1. 2: similar channels, different seizure models. *Epilepsia*, 53: 134-141

13. Łukawski, K., Andres-Mach, M., Czuczwar, M., Łuszczki, J. J., Kruszyński, K., Czuczwar, S. J. (2018). Mechanisms of epileptogenesis and preclinical approach to antiepileptic therapies. *Pharmacological Reports*, 70, 2: 284-293
14. Pearson-Smith, J., Patel, M. (2017). Metabolic dysfunction and oxidative stress in epilepsy. *Int. J. Mol. Sci*, 18, 11: 2365
15. Ho, Y. H., Lin, Y. T., Wu, C. W. J., Chao, Y. M., Chang, A. Y., Chan, J. Y. (2015). Peripheral inflammation increases seizure susceptibility via the induction of neuroinflammation and oxidative stress in the hippocampus. *J. Biomed. Sci*, 22,1: 1-14
16. Puttachary, S., Sharma, S., Stark, S., Thippeswamy, T. (2015). Seizure-induced oxidative stress in temporal lobe epilepsy. *Biomed Res. Int*, 3: 745613
17. Ebadi, M., Govitrapong, P., Sharma, S., Muralikrishnan, D., Shavali, S., Pellett, L., Eken, J. (2001). Ubiquinone (coenzyme q10) and mitochondria in oxidative stress of Parkinson's disease. *Neurosignals*, 10, 3-4: 224-253
18. Geronzi, U., Lotti, F., Grosso, S. (2018). Oxidative stress in epilepsy. *Expert Rev. Neurother*, 18, 5: 427-434
19. Alcazar-Fabra, M., Trevisson, E., Brea-Calvo, G. (2018). Clinical syndromes associated with Coenzyme Q10 deficiency. *Essays Biochem*, 62, 3: 377-398
20. Tsui, H. S. The roles of the Coq10 chaperone protein, cardiolipin, and endoplasmic reticulum-mitochondria contact sites in coenzyme Q biosynthesis and function. université de Californie à Los Angeles, 2019
21. Kumar, A., Kaur, H., Devi, P., Mohan, V. (2009). Role of coenzyme Q10 (CoQ10) in cardiac disease, hypertension and Meniere-like syndrome. *Pharmacol. Ther*, 124, 3: 259-268
22. Rauchova, H., Drahotka, Z., Lenaz, G. (1995). Function of coenzyme Q in the cell: some biochemical and physiological properties. *Physiol. Res*, 44: 209-209
23. Spindler, M., Beal, M. F., Henchcliffe, C. (2009). Coenzyme Q10 effects in neurodegenerative disease. *Neuropsychiatr. Dis. Treat*, 5: 597
24. Veissier, I., Butterworth, A., Bock, B., Roe, E. (2008). European approaches to ensure good animal welfare. *Appl. Anim. Behav. Sci*, 113, 4: 279-297
25. Antweiler, R. C., Patton, C. J., Taylor, H. E. (1996). Automated, colorimetric methods for determination of nitrate plus nitrite, nitrite, ammonium and orthophosphate ions in natural water samples. *U.S. Geol. Surv. Open File Rep*, 93, 638:23
26. Cheeseman, K. (1994). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Meth. Enzymol*, 186: 406-413
27. Khan, H., Khan, M. F., Khan, B. A., Wahab, A., Jan, S. U., Mukhtair, M., Farid, A. (2012). Oxidation of glutathione (GSH) in blood plasma due to oxidative stressors: A case study of silver. *Afr. J. Pharm. Pharmacol*, 6, 21: 1502-1507
28. Aebi, H. (1984) Catalase in vitro, *Methods in enzymology*, Elsevier: 121-126
29. Sifi, N., Martin-Eauclaire, M. F., Larabadijebari, F. (2016). K⁺ channel blocker-induced neuroinflammatory response and neurological disorders: immunomodulatory effects of astaxanthin. *J. Inflamm. Res*, 65, 8: 623-634
30. Frantseva, M. V., Velazquez, J. P., Tsoraklidis, G., Mendonca, A. J., Adamchik, Y., Mills, L. R., Burnham, M. W. (2000). Oxidative stress is involved in seizure-induced neurodegeneration in the kindling model of epilepsy. *Neuroscience*, 97, 3: 431-435
31. Savolainen, K. M., Loikkanen, J., Eerikäinen, S., Naarala, J. (1998). Interactions of excitatory neurotransmitters and xenobiotics in excitotoxicity and oxidative stress: glutamate and lead. *Toxicol. Lett*, 102: 363-367
32. Waldbaum, S., Patel, M. (2010). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: a contributing link to acquired epilepsy?. *J. Bioenerg. Biomembr*, 42, 6: 449-455
33. Pletjushkina, O. Y., Lyamzaev, K. G., Popova, E. N., Nepryakhina, O. K., Ivanova, O. Y., Domnina, L. V., Skulachev, V. P. (2006). Effect of oxidative stress on dynamics of mitochondrial reticulum. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 1757, 5-6: 518-524
34. Kunz, W. S. (2002). The role of mitochondria in epileptogenesis. *Curr. Opin. Neurol*, 15(2), 179-184

35. Lin, Y., Han, Y., Xu, J., Cao, L., Gao, J., Xie, N., Chi, Z. (2010). Mitochondrial DNA damage and the involvement of antioxidant defense and repair system in hippocampi of rats with chronic seizures. *Cell. Mol. Neurobiol*, 30, 6: 947-954
36. Chew, G. T., Watts, G. F. (2004). Coenzyme Q10 and diabetic endotheliopathy: oxidative stress and the 'recoupling hypothesis'. *Qjm*, 97, 8: 537-548
37. Chaturvedi, R. K., Beal, M. F. (2008). Mitochondrial approaches for neuroprotection. *Ann. N. Y. Acad. Sci*, 1147: 395-412
38. Tsai, K. L., Huang, Y. H., Kao, C. L., Yang, D. M., Lee, H. C., Chou, H. Y., Chiu, T. H. (2012). A novel mechanism of coenzyme Q10 protects against human endothelial cells from oxidative stress-induced injury by modulating NO-related pathways. *J. Nutr. Biochem*, 23, 5: 458-468
39. Minghetti, L. (2004). Cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory and degenerative brain diseases. *J. Neuropathol. Exp. Neurol*, 63, 9: 901-910
40. Desjardins, P., Sauvageau, A., Bouthillier, A., Navarro, D., Hazell, A. S., Rose, C., Butterworth, R. F. (2003). Induction of astrocytic cyclooxygenase-2 in epileptic patients with hippocampal sclerosis. *Neurochem. Int*, 42, 4: 299-303
41. Block, M. L., Hong, J. S. (2005). Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Prog. Neurobiol*, 76, 2: 77-98
42. Kaminska, B., Mota, M., Pizzi, M. (2016). Signal transduction and epigenetic mechanisms in the control of microglia activation during neuroinflammation. *Biochim iophys Acta*, 1862, 3: 339-351



Disponible en ligne
<https://www.atrss.dz/ajhs>



Original Article

Cytotoxic activity Characterization of Scorpion Venom Components on Cancer Cell line

Caractérisation de l'activité Cytotoxique des Composants du Venin de Scorpion sur une lignée Cellulaire Cancéreuse

Béchohra Louisa, Laraba-Djebari Fatima* and Hammoudi-Triki Djelila

USTHB, Faculty of Biological Sciences, Laboratory of cellular and Molecular Biology, BP32, El Alia, Bab Ezzouar, 16111 Algiers, Algeria

ABSTRACT

Introduction: Scorpion venom is a rich source of bioactive peptides and toxins with therapeutic effects against different diseases including cancer. The present study was designed to elucidate the cytotoxic activity of isolated fraction F3 from *Androctonus australis hector* (Aah) scorpion venom and investigate the involved mechanism in colorectal tumor cell line HCT116. **Materials and Methods:** The MTT assay and clonogenic assay were performed to assess cytotoxicity and inhibition of cell growth respectively. Cell apoptosis induction was detected by Hoechst 33258 staining and caspase 3 activity. In addition, ROS (Reactive oxygen species) and RNS (reactive nitrogen species) generation were measured by fluorescent dye (DCFH-DA) and Griess assay. The obtained results revealed a remarkable and concentration-dependent cytotoxic effect of F3 fraction against HCT116 cells (Inhibitory concentration $50 = 13.46 \mu\text{g/mL}$) which was in accordance with a significant decrease in colony surviving fractions ($\text{SF}_{\text{IC}_{50}} = 5.43 \pm 2.12 \%$). **Results:** The morphologic alterations confirmed the cell growth inhibition. The Aah venom components displayed nuclear alterations characterized by chromatin condensation, membrane blebbing, cell shrinkage and compartmentalization of the dead cells into apoptotic bodies in accordance with the decrease of cell viability indicating the involvement of apoptosis in this cytotoxicity. Otherwise, the F3 fraction induces the expression of caspase 3, a key protease required for the execution of apoptosis. Enhancement in the intracellular levels of ROS and RNS were also observed in colorectal tumor cells and could be considered as a key early signal to F3 fraction-induced apoptosis. **Conclusion:** Hence F3 fraction could serve as potential therapeutic agents due to their apoptotic effects on cancer cells.

Keywords: Scorpion venom, colorectal tumor cell line, ROS, Cytotoxicity, Apoptosis.

RESUME

Introduction: Le venin de scorpion constitue une riche source de peptides et de toxines bioactives ayant des effets thérapeutiques contre différentes maladies, dont le cancer. La présente étude a été conçue pour étudier l'effet cytotoxique de la fraction F3 isolée du venin de scorpion d'*Androctonus australis hector* (Aah) et son mécanisme d'action au niveau des cellules de l'adénocarcinome colorectale HCT116. **Matériels et Méthodes:** Le test MTT et le test de clonogénéité ont été effectués pour évaluer respectivement la cytotoxicité et l'inhibition de la croissance



cellulaire. L'induction de l'apoptose cellulaire a été détectée par coloration Hoechst 33258 et l'activation de la caspase 3. De plus, la génération de ROS (espèces réactives de l'oxygène) et de RNS (espèces réactives du nitrogène) a été mesurée par des tests fluorescents et colorimétriques. **Résultats:** Les résultats obtenus ont révélé un effet cytotoxique de la fraction F3 sur les cellules HCT116 avec une concentration inhibitrice $50 = 13.46 \mu\text{g/mL}$ associé à l'inhibition de la prolifération cellulaire (fraction de survie $IC_{50} = 5.43 \pm 2.12 \%$). Des altérations nucléaires sont observées dans les cellules traitées, caractérisées par une condensation de la chromatine, un rétrécissement cellulaire et une compartimentation des cellules mortes en corps apoptotiques indiquant l'implication de l'apoptose dans cette cytotoxicité. Par ailleurs, la fraction F3 induit l'expression de la caspase 3, une protéase clé requise pour l'exécution de l'apoptose. Cette fraction est responsable d'une production excessive de ROS et de RNS au niveau des cellules tumorales colorectales et serait responsable du déclenchement de l'apoptose. **Conclusion:** Par conséquent, la fraction F3 semble être une ressource naturelle pour l'identification d'agents thérapeutiques nouveaux doués d'activités anticancéreuses.

Mots-clés: Venin de scorpion, Cancer colorectal, ROS, Cytotoxicité, Apoptose.

* Corresponding author: .Fatima Laraba-Djebari
E-mail address: flaraba@hotmail.com

Received on: 03 July 2019
Revised on: 10 June 2020
Accepted on: 03 July 2020

1. Introduction

Cancer is the second disease leading to death in the world, and is responsible for an estimated 9.6 million deaths in 2018 [1]. In Algeria, nearly 42000 new cases are registered each year and the highest cause of cancer mortality is breast and colorectal cancers in women and lung and colorectal cancers in men (National plan cancer 2015-2019). Chemotherapy and radiation therapy are two main strategies currently used to treat the disease. However, the effectiveness of chemotherapy is frequently diminished due to the multidrug-resistance phenotype and the induction of severe adverse effects in the patients [2, 3]. Therefore, there is a growing interest in finding new more potent, selective, and better tolerated anticancer remedies [4, 5].

Arthropods venoms are a rich source of pharmacologically active molecules capable of interfering in human cellular physiology; the highlights are venomous arthropods, such as scorpions, bees, wasps, spiders, ants and frogs. The substances found in the venom of these animals present great potential as anti-tumor agents [4, 6]. Despite their dangerous stings that lead in severe cases to patient death, scorpions have become a valuable source of biologically active molecules. Scorpion venoms are highly complex mixtures of peptides, enzymes, mucoproteins, free amino acids, nucleotides, lipids, amines, heterocyclic components, inorganic salts and probably other unknown substances [7-10]. The venom compounds may

interact with each other to modulate the function of ion channels, which is usually responsible for the known symptoms of envenoming. In addition to its use as a biological research tool, venom peptides have been identified as a potential agent for identification and cancer treatment [7, 8, 11, 12].

Indeed, numerous studies demonstrated the capacity of scorpion venoms and their proteins/small peptides to induce cytotoxicity and cell tumor proliferation and metastasis inhibition in various type of cancer setting through different mechanisms [7, 8, 11, 13]. The venom of *Heterometrus bengalensis* and its protein bengaline induces apoptosis or the autophagy of leukemic cell lines [14-16]. The neopladin 1 and neopladin 2, purified peptides of the scorpion venom *Tityus discrepans* cause the activation of extrinsic pathway of apoptotic cell death in SKBR3 breast cancer cells [17]. Chlorotoxin and chlorotoxin-like isolated from the venom of *Leiurus quinquestriatus* and of *Androctonus australis* respectively inhibit the invasion of glioblastoma cells after blockage of the chlorine channel by interaction with metalloprotease-2 [18, 19]. In addition, Mauriporine peptide and the neurotoxin Acra 3, isolated from *Androctonus mauritanicus* and *crassicauda* venoms species leads to necrosis of prostate and murine neuronal tumor cells [20, 21]. Furthermore, other peptides with antitumor activity associated with analgesic (BmK AGAP-SYPU2) or antimicrobial activity have also been isolated (AamAP-1 and AamAP-2, TsAP-1 and TsAP-2) [22-24].

Our study focused on the search of anticarcinogenic therapies from natural sources. Along the same lines as our previous published work where we have demonstrated the effectiveness of F3 fraction isolated from Aah venom on the human adenocarcinoma tumor cell line NCI-H358 [25]. The cytotoxic and cell inhibition proliferation effect of F3 fraction were investigated on one of the most killing cancers in Algeria. Additionally, we explored the mechanism involved in cell death when the colorectal tumor cells were challenged with venom components.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT), dimethylsulfoxide (DMSO), N-acetylcysteine (NAC), 2, 7- dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA-H2) and Griess reagent were purchased from Sigma Aldrich. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) and fetal bovine serum (FBS) were purchased from Thermo Fisher Scientific Inc. Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS 10x) and penicillin/streptomycin (10 000 U/mL) were purchased from Life Technologies. Laemmli sample buffer and nitrocellulose membrane (0.2 μ m) were purchased from Biorad Laboratories. Cisplatin and oxaliplatin were provided by Mylan (France). Saturosporine was purchased from Santa Cruz Biotechnologies.

2.2. Scorpion venom and its toxic fractions

F3 fraction isolated from Aah venom by gel filtration through Sephadex G50 column as previously described was provided from Laboratory of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences of USTHB [26].

2.3. Cell culture

The human colorectal carcinoma cells (HCT116) was acquired from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). HCT116 cells were cultured in DMEM medium completed with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin. These cells were grown at 37°C in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂. Experiments were performed on cells within 20 passages.

2.4. Inhibition of Cell Viability Assay

The cytotoxicity of F3 fraction on exponentially growing tumor and normal cells were determined using MTT assay as described previously. HCT 116 cells were seeded at 10 000 cells per well in Cellstar 96-well plates and incubated for 24 h. Thereafter, cells were exposed to F3 fraction at different concentration (5–40 μ g/mL) in media for 24 h. The medium was removed and replaced with MTT solution (0.5 mg/mL) in media and incubated for an additional one hour. Subsequently, the medium was aspirated, and the purple formazan crystals were dissolved in DMSO. The absorbance due to the dissolved purple formazan was then obtained at 550 nm [27]. Cell viability was expressed as a percent of the control culture value and the IC₅₀ was calculated from nonlinear regression using the program GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software, USA).

2.5. Morphological assessment

Cells were seeded into 6-well plates at the density of 500 000 cells/well and allowed to adhere overnight. After 24 h of treatment with the F3 fraction (IC₇₅, IC₅₀ and IC₂₅), morphological characteristics were observed and the images were captured under an inverted phase contrast microscope (HundWetzlar, Germany) at x20 [25].

2.6. Clonogenic assay

Tumor cells were seeded in 12-well plates (500 cells/well) before treatment with the different concentrations of the F3 fraction. The plates were incubated under standard condition for 8-10 days and stained with crystal violet (0.5% w/v). The Plating Efficiency (PE) represents (Number of formed colony/Number of plated cells) x100. The Surviving Fractions (SF) were calculated as following: (PE of treated cells/PE of control cells) x100 [28].

2.7. Apoptosis assessment

2.7.1. Fluorescence microscopic analysis of cell death

The detection of apoptotic cells including nuclear chromatin condensation and apoptotic bodies was performed with Hoechst 33258 staining [29]. Cells were incubated for 24h with the following concentrations of F3 fraction (IC₇₅= 7.35 μ g/mL,

IC₅₀= 13.46 µg/mL and IC₂₅= 25.20 µg/mL) and were pretreated or not with N acetylcystein (NAC). Thereafter, cells were washed with PBS, fixed and stained with Hoechst 33258 (10 µg/mL) for 20 min in obscurity. Nuclear changes were observed under fluorescence microscopy x40 (Zeiss Axioplan, Germany) [25].

2.7.2. Western blot analysis

Western blot analysis was performed as previously described [30]. HCT116 cells were lysed in hot Laemmli buffer and denatured. Protein extracts were loaded on a 15% (50 µg of protein) SDS PAGE gel. Western blotting was performed using primary antibodies raised against caspase 3 (sc-7272) and β-Actin (ab75186). Immunoblotting were analyzed using the appropriate peroxidase-coupled secondary antibodies (GE Healthcare Life Sciences). All blots were revealed by chemiluminescence (ECL, Bio-Rad) and the proteins bands were visualized via enhanced chemiluminescence imaging (PXi, Syngene).

2.8. Intracellular reactive oxygen species (ROS) measurement

HCT116 tumor cells were seeded in black 96-well plates and incubated for 24 h. Cells pretreated or not with the NAC were exposed to different concentrations of F3 fraction for 4h and 24h. Thereafter, media were discarded, and 10 µM DCFH-DA was added [31]. The DCF fluorescence was measured with Victor X2 Multilabel Plate Reader (Perkin Elmer, USA).

2.9. Reactive nitrogen species (RNS) assay

Nitrite production was investigated in the supernatants of cultured cells using NO assay [32]. Media of treated cells with F3 fraction for 24h were collected and centrifuged at 500x g for 5 min at 4°. Nitrites were evaluated in supernatants with Griess reagent. The absorbance was read at 540 nm and the nitrite levels were determined after extrapolation to standard NaNO₂ and expressed in µM.

2.10. Statistical analysis

All the data presented are mean ± SD. Data analysis were carried out with one-way ANOVA with post hoc analysis by Tukey post hoc using GraphPad Prism version 5.01 for Windows (GraphPad SoftwareInc, San Diego, CA, USA). Differences

were considered statistically significant versus respective controls when p < 0.05.

3. Results

3.1. F3 fraction induced cytotoxicity and morphological changes

The impact of F3 fraction on colorectal tumor cell viability and proliferation was assessed by the MTT reduction assay. The MTT assay is considered as an indicator of mitochondrial activity and has been usually applied for determination of cell cytotoxicity. F3 fraction was found to reduce cell viability of tumor cells in a potent and dose-dependent manner (**Figure 1a**). The survival rate of HCT116 after exposure to 5, 10, 20, 30 and 40 µg/mL of F3 fraction was 83.40, 60.89, 36.07, 23.43 and 14.37 percent respectively. Indeed, F3 fraction displayed potent activity with the half inhibitory concentration (IC₅₀) value of 13.46 µg/mL against colorectal cancer cells (HCT116).

The morphological changes in HCT116 cells after treatment for 24h with increasing concentrations of F3 fraction (IC₇₅= 7.35 µg/mL, IC₅₀= 13.46 µg/mL and IC₂₅= 25.20 µg/mL) are represented in **Figure 1b**. Untreated cells showed an elongated shape while treated cells showed cellular shrinkage, round or irregular shape and condensed cytoplasm. Indeed, the highest concentrations F3 fraction IC₂₅ led to detached and round-shaped dead cells in the transformed cell line.

3.2. Effect of F3 fraction on tumor cells proliferation

The effectiveness of cytotoxic fraction F3 (IC₇₅, IC₅₀ and IC₂₅) was tested over a longer treatment period with the clonogenic assay in the two transformed cell lines. A significant reduction in colony formation was observed in treated cells with IC₇₅ and IC₅₀ doses and a complete inhibition of cell proliferation with IC₂₅ concentration for HCT116 in comparison to untreated cells (**Figure 2a**). In addition, a significant decrease in surviving fraction percentages was noted in treated tumor cells (p < 0.001) (**Figure 2b**).

3.3. Effect of F3 fraction on morphological apoptotic changes of tumor cells

To determine whether the cytotoxicity and growth inhibitory activity of Aah fraction 3 was related to the

induction of apoptosis, morphological assay of cell nucleus was conducted (Figure 3).

In untreated HCT116 control cells was observed a uniformly blue fluorescence stain of nucleus. After incubation with different concentrations of F3 fraction, both tumor cells showed nuclear changes associated with apoptosis such as chromatin condensation, nuclear fragmentation, and apoptotic bodies.

3.4. Effect of F3 fraction on proapoptotic caspase 3 activation

Caspases (cysteine-aspartic proteases) are central components of the intrinsic apoptotic pathway that lead to apoptotic cell death. Western blot analysis of HCT116 cells extracts revealed caspase 3 cleavage products, detected after 24h of F3 fraction treatment (Figure 4a). This product is strongly increased with IC25 as observed in immunoblotting and densitometry analysis compared to proapoptotic molecule staurosporine used as positive control (Figure 4a and 4b). This result indicates the activation of caspase 3 in HCT116.

3.5. Evaluation of oxidative stress in tumor cells treated with F3 fraction

The determination of DCF fluorescence as a measure of intracellular ROS generation in colorectal cells was conducted by using H2DCFDA probe. As shown in Figure 5, a remarkable increase in ROS formation

was observed on F3 fraction treatment for 4 and 24h in colorectal cancer cell line. It is evident from the histograms that highly significant ROS production was registered with the concentration IC25 at all-timetreatments ($p < 0.001$). F3 fraction enhanced the ROS levels approximately 1 and 2.5 folds for HCT116 cells at both 4 h and 24 h post-treatment with respect to control cells.

Interestingly, addition of NAC, a ROS scavenger, one hour prior treatment with venom fraction F3, significantly reduced the above-mentioned venom fraction-induced effects in HCT116 tumor cells, suggesting that F3 fraction probably modulated its cytotoxic action by enhancing cellular ROS.

3.6. Determination of nitrite oxide concentration in culture media

The concentration of nitrite oxide released from treated and control tumor cells were measured by analyzing nitrite level in their culture media. F3 fraction induce enhancement in nitric oxide level in HCT116 cells in a dose–response effect (Figure 6). In HCT116 cells, nitrite level in control was 2.14 μM whereas in treated cells with the highest concentrations of F3 fraction was 4.75 μM for IC50 and 8.31 μM for IC25. In this cell line, increment of NO at dose of IC75 $\mu\text{g/ml}$ of venom fraction was insignificant as compared to control.

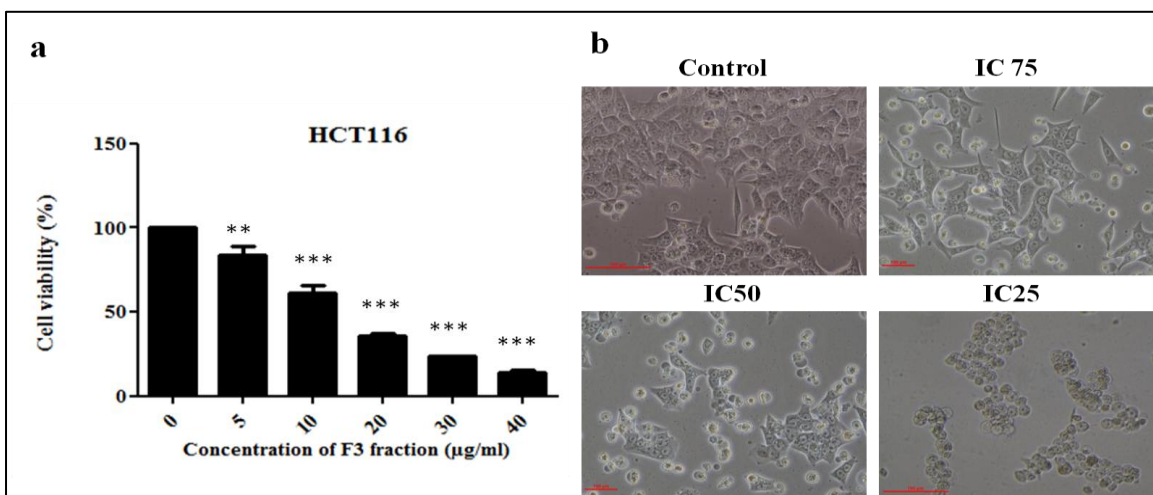


Figure 1: Cell survival rate decrease of HCT116 cells after 24 h of treatment with different concentrations of F3 fraction (5-40 $\mu\text{g/ml}$), according to MTT reduction assay (a). The data are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments in triplicate. Significances are shown in comparison to control cells (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). Different concentration of F3 fraction (IC75, IC50 and IC25) induced morphological changes in human colorectal carcinoma cells (b). Cells were photographed under phase-contrast inverted microscopy (x20)

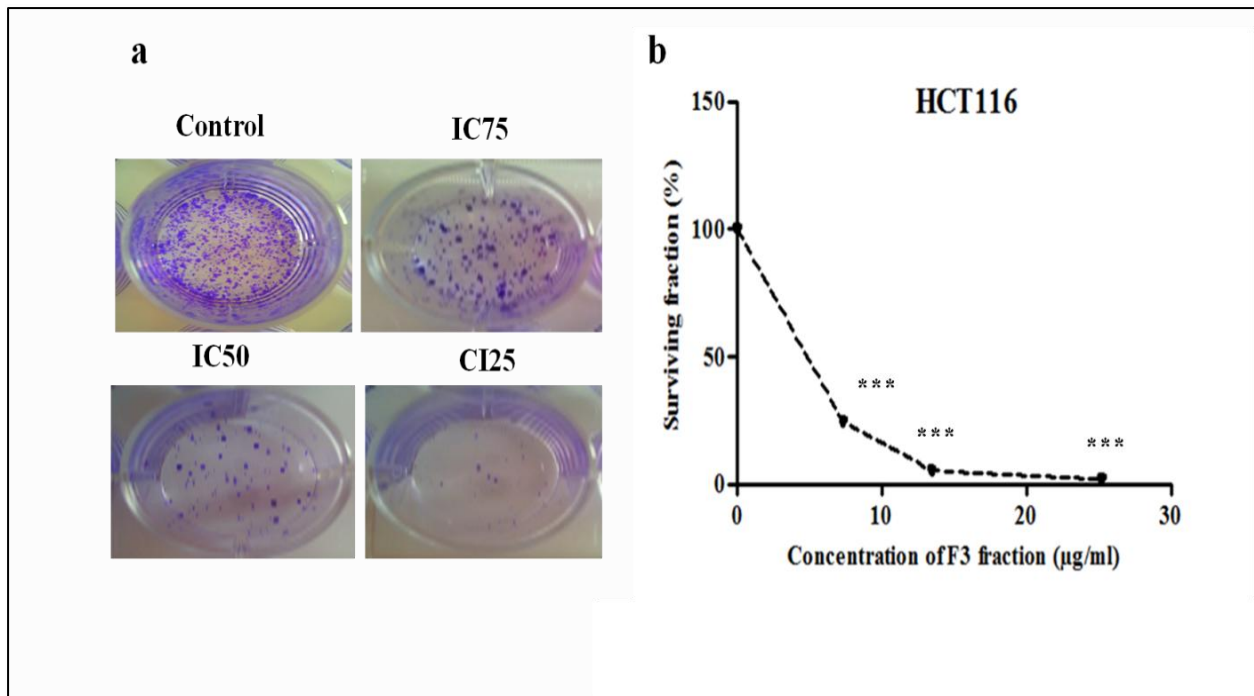


Figure 2: Decrease of colony number (a) and inhibition of surviving fraction (b) after colorectal tumor cells exposure to IC75, IC50 and IC25 concentrations of F3 fraction. The data are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments in triplicate. Significances are shown in comparison to control cells (** $p < 0.001$)

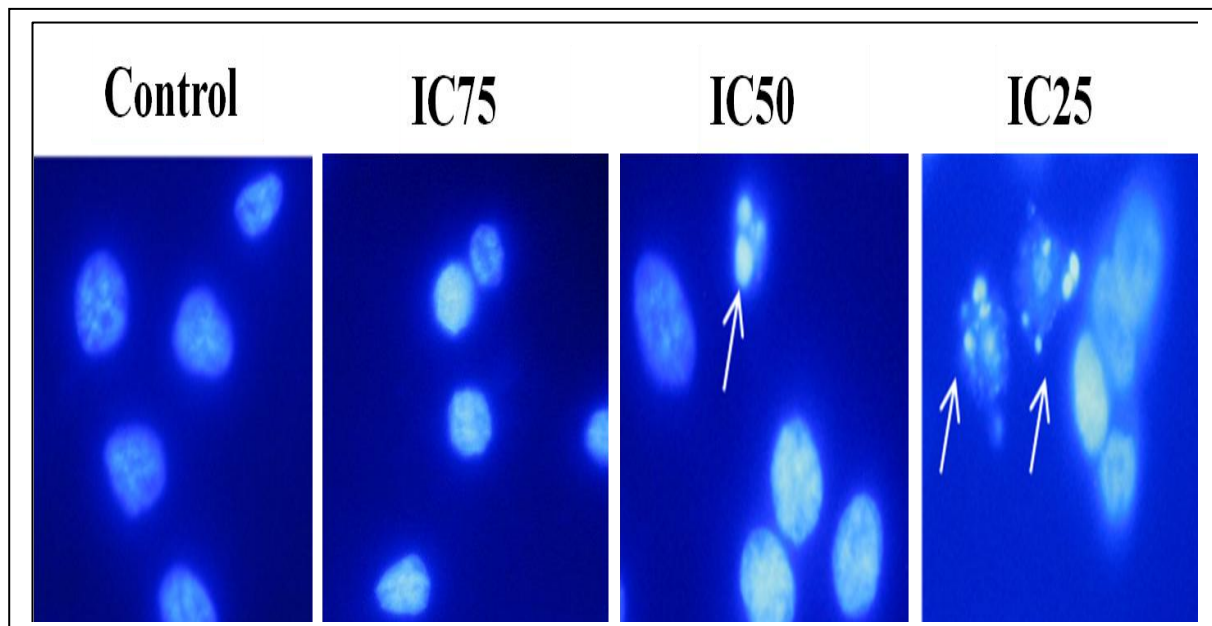


Figure 3: Cells were stained with Hoechst 33258 and visualized by fluorescence microscopy (x40). Control cells appeared to be intact with normal blue nuclei. While, cells treated with increasing concentrations of F3 fraction exhibited typical features of apoptosis such as chromatin condensation and formation of apoptotic bodies in HCT116 colorectal cell line

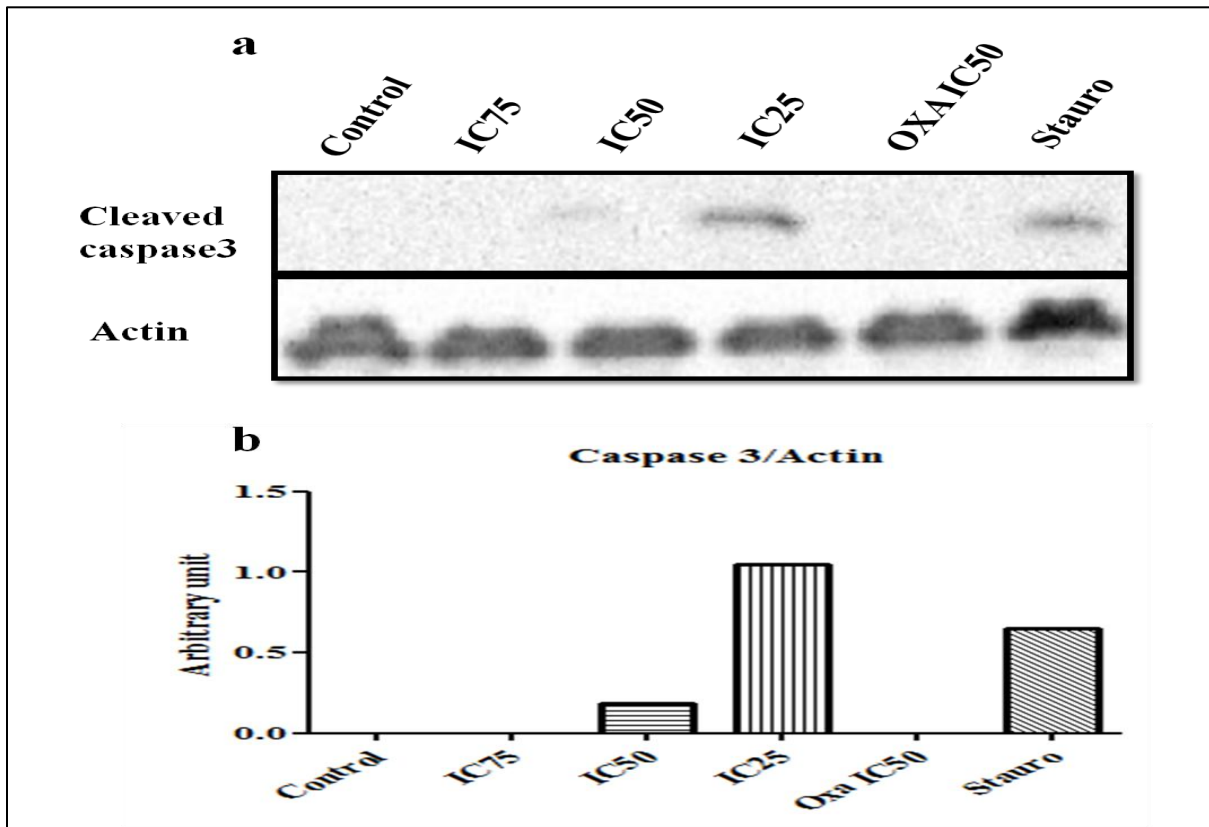


Figure 4: Protein expression of cleaved caspase 3 in HCT116 cells were analyzed by Western blot (a). Evidence that increasing concentration of F3 fraction and apoptotic molecule staurosporine triggered caspase 3 expression unlike chemotherapeutic agent oxaliplatin. The densitometry analysis of protein bands (actin as loading control) on immunoblotting profile reveals a dose dependent expression of caspase 3 in HCT116 (b)

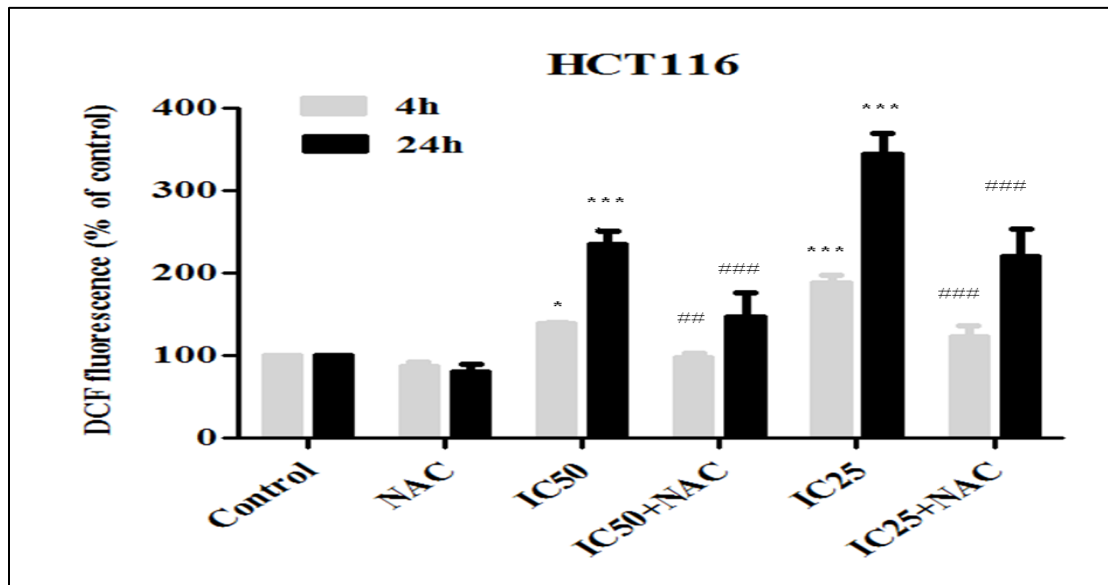


Figure 5: Quantitative analyses of the reactive oxygen species (ROS) generation after scorpion venoms treatment on HCT116 cancer cell lines. A significant increase in ROS formation was observed in colorectal cancer cell line (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; vs. Control) and statistical differences in NAC pretrated cells compared to F3 fraction groups (## $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)

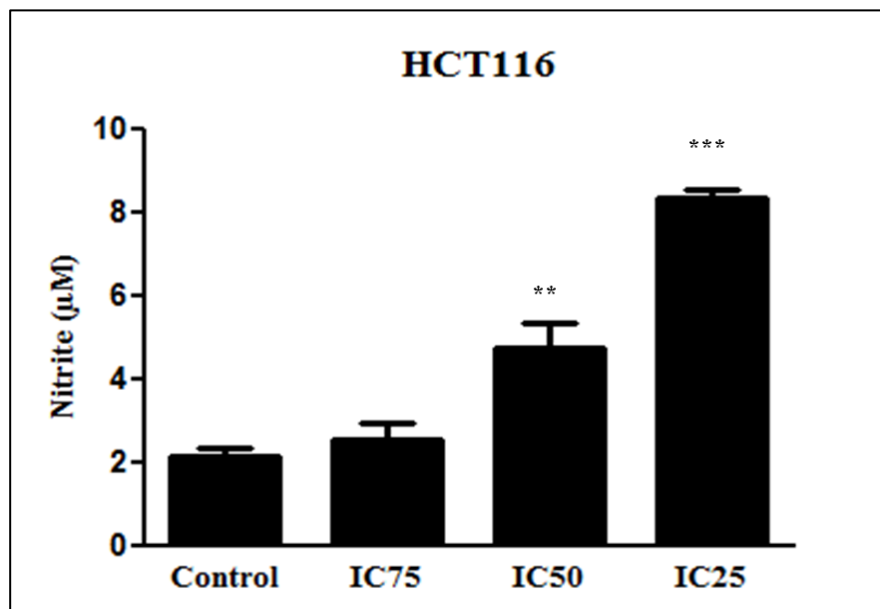


Figure 6: Nitric oxide production was determined by nitrite measurement in the cells supernatant. Increased level of NO in a concentration-dependent manner was noted in HCT116 cells media. The results were expressed as the mean \pm SD of three independent experiments carried out in triplicate. The indicated significances are shown in comparison to control (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)

4. Discussion

Scorpion venom contains numerous compounds, which may be adapted for cancer therapy. The major components of venom are neurotoxins peptides and non disulphide bridged peptides (NDBPs) which act on ionic channel blocking, disruption of the cell membrane integrity and damage to internal cell organelles. These properties make good prospects for studies on drugs and adjuvants in cancer treatment [12, 33]. This study is an attempt to elucidate the mechanism of cytotoxicity induced by peptidic fraction isolated from North African scorpion Aah on human colorectal carcinoma cells.

The induction of cytotoxic effect is a key mechanism capable of inhibiting the uncontrolled cell growth that is a hallmark of cancer development [34]. In order to establish an appropriate dose of F3 fraction, the cytotoxicity was measured and IC50 values were determined colorectal cancer cell lines. The current study demonstrated that F3 fraction significantly reduced HCT116 cells viability in dose dependent manner with an IC50 = 13.46 $\mu\text{g}/\text{mL}$. F3 Aah fraction seems more potent on colorectal carcinoma cell line than non-small cancer cell lung (IC50= 27.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

without significantly affecting human normal lung fibroblast (MRC5) [25]. The variation in response to F3 Aah fraction on growth of the two cancer types after 24 h exposure might be a result of the complex composition of the venom and/or the targets expressed on cancer cells [25].

The cytotoxicity was confirmed via the morphological changes observed under inverted microscope. Several studies revealed the selectivity of different species of scorpion venom and their peptides in tumor cells as Cuban *Rhopalurus junceus* towards Hela and A549 cells and Mauriporine from *Androctonus mauritanicus* against prostate tumor cells (PC3) [20, 35]. Also, *Androctonus australis* venom possess the ability to reduce the volume of Ehrlich ascites carcinoma

bearing mice and to inhibit proliferation of early stage hepatocarcinoma induced *in vivo* by Fumonisin B1 mycotoxin through its non-toxic fraction 1 (F1) [13, 36].

The obtained results revealed the proliferation cell inhibition of HCT116 after treatment with Aah F3 fraction in dose dependent manner as demonstrated with reduction of cell surviving fractions with

prominent effect against colorectal tumor cells. A similar pattern of inhibition in cell motility and colony formation was observed with Egyptian scorpion venom *Androctonus australis* confirming that the action of venom was not restricted to one type of cell line, but may display a wide range of anticancer properties, as evidenced by the phenotypic changes observed in the cell lines analyzed in the present study [36, 37]. Therefore, based on these findings and published works, it appeared that F3 fraction possesses selective cytotoxic property towards colorectal and lung cancer cell lines without affecting non tumorigenic cells [25].

Isaad et al. (2018) previously reported major modifications related to actin dynamics and their involvement in Aah venom-mediated cytotoxicity in human epithelial lung tumor cells (A549) [38]. On another hand, the actin cytoskeleton rearrangement needed several proteins of the cytoskeleton such as actin and keratins to mediate the morphological modifications of the apoptotic cells and the regulation of apoptotic signaling [39].

Apoptosis is a well-regulated and programmed death process involved in physiological and pathological conditions. Defective apoptosis has been recognized as a fundamental factor in the development and progression of cancer. Restore of appropriately induce apoptosis may establish antitumor therapy based on triggering selective death of cancer cells [40].

The results of scorpion F3 fraction-induced apoptosis in colorectal tumor cells were morphologically observed through fluorescent staining Hoechst 33258. Nuclear damage and margination were clearly seen in treated HCT116 cells in comparison with the control cells. Severe apoptotic bodies could be clearly visualized from the photographs with high fraction concentration (IC25). This mode of cell death was reported to be induced by different scorpion venoms and their components in several cancer types [7]. Using the comet assay and FACS, Das Gupta et al. (2010) have shown that the venom of *Heterometrus bengalensis Koch* and its protein, Bengaline can lead to apoptosis by DNA fragmentation in U937 and K562 cell lines [14, 16]. Similarly, venoms of three species of *Androctonus crassicauda*, *Leiurus quinquestriatus* and *Odontobuthus bidentatus* are able to induce DNA breakage and apoptosis in the

ileocecal adenocarcinoma (HCT-8), breast mammary glands (MDA-MB-231) and hepatic carcinoma (HepG2) cell lines respectively [34, 41].

In fact, this feature was stated previously for the isolated proteins from *Tityus discrepans* Neopladine 1 and 2 which induce extrinsic apoptosis as FasL and Bcl-2 are expressed and the effect was found proportional to time when tested on SKBR3 cells [17, 42]. In the same way, Bengaline protein selectively induces apoptosis on U937 leukemic cells through mitochondrial pathway and inhibition of heat shock proteins (HSP 70 and 90) [14].

Caspases are a family of protease enzymes playing essential roles in programmed cell death including apoptosis [43]. Our results showed that caspase 3 was dose-dependent overexpressed, suggesting the activation of this catalytic enzyme and DNA fragmentation. Dezhianian et al. (2020) showed in recent study that the *Hottentotta schach* scorpion venom extracts could inhibit the growth of MCF-7 cells by inducing the apoptosis through caspase 3 activation [44]. Furthermore, other studies demonstrated that the activity of this protease enzyme expression were upregulated after *Odontobuthus doriae* or *Androctonus crassicauda* scorpion venom breast tumor cells treatment. They also conclude that scorpion venoms activate the expression of caspase 3 enzyme and the inhibition of DNA synthesis to cause selective cell apoptosis in MCF7 cells [44, 45]. Caspase 3 and P21 activities were also increased in Human Kyse-510 cell line [46].

Generation of RONS (Reactive oxygen nitrogen species) within living cells is due to the mitochondrial electron transport system, NADH oxidase, cytochrome P450, xanthine oxidoreductase (XOR) and nitric oxide synthase (NOS) which all play a role in various crucial developmental processes, such as cell differentiation and cell signaling pathways. Recently, RONS have gained enormous attention due to their widespread application in the diverse fields of biology and medicine including cancer treatment [47, 48].

Treatment of cancer cells with venom creates a stressful environment. Once treated with scorpion venoms, cells undergo further elevation of cytotoxicity. These stressful events in the tumor cells results in triggering of the generation of free radicals

and hence reactive oxygen species formation begins [34, 41]. In the present study, a significant extent of ROS and nitrite production under the influence of F3 fraction were detected in HCT116 tumor cells when stained with the specific dye for ROS and Griess assay for RNS (nitrite). Our results are in agreement with the *in vivo* studies establishing that Aah venom as ROS (in term of H₂O₂) and NO inducer in lung tissues of the envenomed mice [49, 50]. In addition, ROS is also known to promote DNA mutations, lipid peroxidation, and protein oxidation [40]. Alikhani et al. (2020) reported the involvement of RONS in DNA damage induction in HepG2 hepatic tumor cells after incubation with *Odontobuthus bidentatus* leading to apoptotic cell death [41].

Conclusion

In summary, this study demonstrated that F3 fraction Aah venom has cytotoxic effects, inducing apoptosis and inhibiting the colorectal tumor cells growth by inducing RONS generation and oxidative stress. Thus, further studies are needed to elucidate its mechanism of action and develop new apoptosis-inducing compounds from natural origin.

Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest

References

1. Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D., Piñeros, M., Znaor, A., and Bray, F. (2019). Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018. *Int. J. Cancer.*, *144*, 8: p 1941-1953
2. Chow, M.J., Licona, C., Pastorin, G., Mellitzer, G., Ang, W.H., and Gaidon, C. (2016). Structural tuning of organoruthenium compounds allows oxidative switch to control ER stress pathways and bypass multidrug resistance. *Chem. sci.*, *7*, 7: p 4117-4124
3. Li, X., Lewis, M.T., Huang, J., Gutierrez, C., Osborne, C.K., Wu, M.-F., Hilsenbeck, S.G., Pavlick, A., Zhang, X., and Chamness, G.C. (2008). Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J. Natl. Cancer Inst.*, *100*, 9: p 672-679
4. Gomes, A., Bhattacharjee, P., Mishra, R., Biswas, A.K., Dasgupta, S.C., Giri, B., Debnath, A., Gupta, S.D., Das, T., and Gomes, A. (2010). Anticancer potential of animal venoms and toxins. *Indian J. Exp. Biol.*, *48*, 2: p 93-103
5. Vidimar, V., Meng, X., Klajner, M., Licona, C., Fetzer, L., Harlepp, S., Hébraud, P., Sidhoum, M., Sirlin, C., and Loeffler, J.P. (2012). Induction of caspase 8 and reactive oxygen species by ruthenium-derived anticancer compounds with improved water solubility and cytotoxicity. *Biochem. Pharmacol.*, *84*, 11: p 1428-1436
6. Heinen, T.E. and da Veiga, A.B.G. (2011). Arthropod venoms and cancer. *Toxicon*, *57*, 4: p 497-511
7. Ortiz, E., Gurrola, G.B., Schwartz, E.F., and Possani, L.D. (2015). Scorpion venom components as potential candidates for drug development. *Toxicon*, *93*: p 125-135
8. Ding, J., Chua, P.-J., Bay, B.-H., and Gopalakrishnakone, P. (2014). Scorpion venoms as a potential source of novel cancer therapeutic compounds. *Exp. Boil. Med.*, *239*, 4: p 387-393
9. Ahmadi, S., Knerr, J.M., Argemi, L., Bordon, K.C., Pucca, M.B., Cerni, F.A., Arantes, E.C., Çalışkan, F., and Laustsen, A.H. (2020). Scorpion venom: detriments and benefits. *Biomedicines*, *8*, 5: p 118
10. Laraba-Djebari, F., Adi-Bessalem, S., and Hammoudi-Triki, D. Scorpion venoms: pathogenesis and biotherapies. Scorpion Venoms; Gopalakrishnakone, P., Possani, L.D., F. Schwartz, E., Rodríguez de la Vega, R.C: Springer Netherlands, Netherland, 2015, 4, p 63-85
11. Sarfo-Poku, C., Eshun, O., and Lee, K.H. (2016). Medical application of scorpion venom to breast cancer: A mini-review. *Toxicon*, *122*: p 109-112
12. Ghosh, A., Roy, R., Nandi, M., and Mukhopadhyay, A. (2019). Scorpion venom-toxins that aid in drug development: a review. *Int. J. Pept. Res. Ther.*, *25*, 1: p 27-37

13. Bekkari, N. and Laraba-Djebari, F. (2015). Beneficial effects of *Androctonus australis hector* venom and its non-toxic fraction in the restoration of early hepatocyte-carcinogenesis induced by FB1 mycotoxin: involvement of oxidative biomarkers. *Exp. Mol. Pathol.*, 99, 2: p 198-206
14. Gupta, S.D., Gomes, A., Debnath, A., Saha, A., and Gomes, A. (2010). Apoptosis induction in human leukemic cells by a novel protein Bengalin, isolated from Indian black scorpion venom: through mitochondrial pathway and inhibition of heat shock proteins. *Chem-biol.Interact.*, 183, 2: p 293-303
15. Gupta, S.D., Halder, B., Gomes, A., and Gomes, A. (2013). Bengalin initiates autophagic cell death through ERK–MAPK pathway following suppression of apoptosis in human leukemic U937 cells. *Life sciences*, 93, 7: p 271-276
16. Gupta, S.D., Debnath, A., Saha, A., Giri, B., Tripathi, G., Vedasiromoni, J.R., Gomes, A., and Gomes, A. (2007). Indian black scorpion (*Heterometrus bengalensis* Koch) venom induced antiproliferative and apoptogenic activity against human leukemic cell lines U937 and K562. *Leuk.Res.*, 31, 6: p 817-825
17. D'Suze, G., Rosales, A., Salazar, V., and Sevcik, C. (2010). Apoptogenic peptides from *Tityus discrepans* scorpion venom acting against the SKBR3 breast cancer cell line. *Toxicon*, 56, 8: p 1497-1505
18. Deshane, J., Garner, C.C., and Sontheimer, H. (2003). Chlorotoxin inhibits glioma cell invasion via matrix metalloproteinase-2. *J. Biol. Chem.*, 278, 6: p 4135-4144
19. Rjeibi, I., Mabrouk, K., Mosrati, H., Berenguer, C., Mejdoub, H., Villard, C., Laffitte, D., Bertin, D., Ouafik, L.H., and Luis, J. (2011). Purification, synthesis and characterization of AaCtx, the first chlorotoxin-like peptide from *Androctonus australis* scorpion venom. *Peptides*, 32, 4: p 656-663
20. Almaaytah, A., Tarazi, S., Mhaidat, N., Al-Balas, Q., and Mukattash, T.L. (2013). Mauriporin, a novel cationic α -helical peptide with selective cytotoxic activity against prostate cancer cell lines from the venom of the scorpion *Androctonus mauritanicus*. *Int. J. Pept. Res. Ther.*, 19, 4: p 281-293
21. Caliskan, F., Ergene, E., Sogut, I., Hatipoglu, I., Basalp, A., Sivas, H., and Kanbak, G. (2013). Biological assays on the effects of Acra3 peptide from Turkish scorpion *Androctonus crassicauda* venom on a mouse brain tumor cell line (BC3H1) and production of specific monoclonal antibodies. *Toxicon*, 76: p 350-361
22. Almaaytah, A., Zhou, M., Wang, L., Chen, T., Walker, B., and Shaw, C. (2012). Antimicrobial/cytolytic peptides from the venom of the North African scorpion, *Androctonus amoreuxi*: biochemical and functional characterization of natural peptides and a single site-substituted analog. *Peptides*, 35, 2: p 291-299
23. Guo, X., Ma, C., Du, Q., Wei, R., Wang, L., Zhou, M., Chen, T., and Shaw, C. (2013). Two peptides, TsAP-1 and TsAP-2, from the venom of the Brazilian yellow scorpion, *Tityus serrulatus*: evaluation of their antimicrobial and anticancer activities. *Biochimie*, 95, 9: p 1784-1794
24. Shao, J.-H., Cui, Y., Zhao, M.-Y., Wu, C.-F., Liu, Y.F., and Zhang, J.H. (2014). Purification, characterization, and bioactivity of a new analgesic-antitumor peptide from Chinese scorpion *Buthus martensii* Karsch. *Peptides*, 53: p 89-96
25. Bechohra, L., Laraba-Djebari, F., and Hammoudi-Triki, D. (2016). Cytotoxic activity of *Androctonus australis hector* venom and its toxic fractions on human lung cancer cell line. *J. Venom. Anim. Toxins. Incl Trop. Dis.*, 22: p 29
26. Laraba-Djebari, F. and Hammoudi, D. (1998). [Use of toxic fraction isolated from Algerian *Androctonus australis hector* scorpion venom for the assessment of anti-venom serum]. *Arch. Inst. Pasteur Alger*, 62: p 254-66
27. Carmichael, J., DeGraff, W.G., Gazdar, A.F., Minna, J.D., and Mitchell, J.B. (1987). Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.*, 47, 4: p 936-942

28. Franken, N.A., Rodermond, H.M., Stap, J., Haveman, J., and Van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat. Protoc.*, 1, 5: p 2315-2319
29. Henry, C.M., Hollville, E., and Martin, S.J. (2013). Measuring apoptosis by microscopy and flow cytometry. *Methods*, 61, 2: p 90-97
30. Sohm, F., Gaiddon, C., Antoine, M., Boutillier, A.L., and Loeffler, J.P. (1999). The retinoblastoma susceptibility gene product/Sp1 signalling pathway is modulated by Ca²⁺/calmodulin kinases II and IV activity. *Oncogene*, 18, 17: p 2762-2769
31. Wang, H. and Joseph, J.A. (1999). Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic. Biol. Med.*, 27, 5: p 612-616
32. Ding, A.H., Nathan, C.F., and Stuehr, D.J. (1988). Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J. Immunol.*, 141, 7: p 2407-2412
33. Gomez Rave, L.J., Munoz Bravo, A.X., Sierra Castrillo, J., Roman Marin, L.M., and Corredor Pereira, C. (2019). Scorpion venom: New promise in the treatment of cancer. *Acta. Biol. Colomb.*, 24, 2: p 213-223
34. Al-Asmari, A.K., Riyasdeen, A., and Islam, M. (2018). Scorpion venom causes apoptosis by increasing reactive oxygen species and cell cycle arrest in MDA-MB-231 and HCT-8 cancer cell lines. *J. Evid-Based. Integr. Med.*, 23: p 2156587217751796
35. Díaz-García, A., Morier-Díaz, L., Frión-Herrera, Y., Rodríguez-Sánchez, H., Caballero-Lorenzo, Y., Mendoza-Llanes, D., Riquenes-Garlobo, Y., and Fraga-Castro, J.A. (2013). In vitro anticancer effect of venom from Cuban scorpion *Rhopalurus junceus* against a panel of human cancer cell lines. *J. of Venom Res.*, 4: p 5
36. Nafie, M.S., Daim, M.M.A., Ali, I.A., Nabil, Z.I., Tantawy, M.A., and Abdel-Rahman, M.A. (2020). Antitumor efficacy of the Egyptian Scorpion Venom *Androctonus Australis*: in vitro and in vivo study. *J. Basic. Appl. Zool.*, 81, 1: p 1-10
37. Al-Asmari, A.K., Riyasdeen, A., Abbasmanthiri, R., Arshaduddin, M., and Al-Harhi, F.A. (2016). Scorpion (*Androctonus bicolor*) venom exhibits cytotoxicity and induces cell cycle arrest and apoptosis in breast and colorectal cancer cell lines. *Indian J. Pharmacol.*, 48, 5: p 537
38. Issaad, N., Ait-Lounis, A., and Laraba-Djebari, F. (2018). Cytotoxicity and actin cytoskeleton damage induced in human alveolar epithelial cells by *Androctonus australis* hector venom. *Toxin Reviews*, 37, 1: p 67-74
39. Ndozangue-Touriguine, O., Hamelin, J., and Bréard, J. (2008). Cytoskeleton and apoptosis. *Biochem. Pharmacol.*, 76, 1: p 11-18
40. Kulbacka, J., Saczko, J., Chwilkowska, A., Choromańska, A., and Skolucka, N. Apoptosis, free radicals and antioxidant defense in antitumor therapy. Antioxidant enzyme ;El-Missiry, M.A.:Egypt, 2012, p 265-302
41. Alikhani, H.K., Bidmeshkipour, A., and Zargan, J. (2020). Cytotoxic and apoptotic induction effects of the venom of Iranian scorpion (*Odontobuthus bidentatus*) in the Hepatocellular carcinoma cell line (HepG2). *Int. J. Pept. Res. Ther.*, 26, 3: p 1-10
42. Ahluwalia, S. and Shah, N. (2014). Animal venom for treating breast cancer. *Int. J. Pharm. Sci.*, 6, 9: p 24-30
43. Shalini, S., Dorstyn, L., Dawar, S., and Kumar, S. (2015). Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ.*, 22, 4: p 526-539
44. Dezanian, S., Zargan, J., Goudarzi, H.R., Haji Noormohamadi, A., Mousavi, M., Keshavarz Alikhani, H., and Johari, B. (2020). In-vitro Study of Hottentotta Schach Crude Venom Anticancer Effects on MCF-7 and Vero Cell Lines. *Iran J. Pharm. Sci.*, 19, 1: p 192-202
45. Zargan, J., Umar, S., Sajad, M., Naime, M., Ali, S., and Khan, H.A. (2011). Scorpion venom (*Odontobuthus doriae*) induces apoptosis by depolarization of mitochondria and reduces S-phase population in human breast cancer cells

- (MCF-7). *Toxicology in vitro*, 25, 8: p 1748-1756
46. Xiao, K., Zhou, J., Wang, Z., Fu, W.H., and Lu, X.Y. (2012). Effect of the venom of the scorpion *Heterometrus liangi* on the expression of P21 and caspase-3 gene in human KYSE-510 cell. *Adv. Mat. Res.*, 345: p 399-404
47. Battelli, M.G., Polito, L., Bortolotti, M., and Bolognesi, A. (2016). Xanthine oxidoreductase-derived reactive species: physiological and pathological effects. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2016:3527579
48. Ahn, H.J., Kim, K.I., Hoan, N.N., Kim, C.H., Moon, E., Choi, K.S., Yang, S.S., and Lee, J.S. (2014). Targeting cancer cells with reactive oxygen and nitrogen species generated by atmospheric-pressure air plasma. *PloS one*, 9, 1
49. Lamraoui, A., Adi-Bessalem, S., and Laraba-Djebari, F. (2014). Modulation of tissue inflammatory response by histamine receptors in scorpion envenomation pathogenesis: involvement of H4 receptor. *Inflammation*, 37, 5: p 1689-704
50. Khemili, D., Laraba-Djebari, F., and Hammoudi-Triki, D. (2020). Involvement of Toll-like Receptor 4 in Neutrophil-Mediated Inflammation, Oxidative Stress and Tissue Damage Induced by Scorpion Venom. *Inflammation*, 43, 1: p 155-167

Original Article

Green Synthesis of Silver Nanoparticles and their Application as Antigen Delivery System

Synthèse par Chimie Verte de Nanoparticules d'Argent et leur Utilisation comme Système de Délivrance d'Antigènes

Nait mohamed Faez Amokrane, NOURI Abdelmounaim, Laraba-Djebari Fatima*

USTHB, Faculty of Biological Sciences, Laboratory of Cellular and Molecular Biology, BP 32 El-Alia, Bab Ezzouar, Algiers, Algeria.

ABSTRACT

Introduction: Scorpion envenomation is a major health problem in tropical and subtropical regions, especially in North Africa where *Androctonus australis* is one of the most deadly species, with a mean of 115000 stung patients each year. New therapies are now studied to prevent the pathophysiology of scorpion envenomation to improve immunotherapy, so far the only specific treatment to treat envenomed patients. For this purpose, the aim of the study is to develop a silver nanovector adsorbing *Androctonus australis hector* (*Aah*) venom to be used as a nanoformulation stimulating the host immune system. **Materials and Methods:** Silver nanoparticles (AgNps) were synthesized by green synthesis, using a leave extract of *Eucalyptus globulus* as reducing agent. AgNps were characterized by Scanning Electron Microscopy for the size, X-Ray Diffractometry and FTIR for structural characterization. AgNps were then used as a vaccine formulation adsorbing *Aah* venom and tested in mice in a single injection protocol. Specific IgG titers, myeloperoxidase (MPO) and eosinophil peroxidase (EPO) activities have been evaluated during the immunization protocol. **Results:** Physic-chemical characterization of AgNps revealed a relatively spherical shape of Nps, not exceeding 200 nm. Evaluation of MPO and EPO activities showed a low pro-inflammatory profile of AgNps while the nanovaccine adsorbing *Aah* venom shown an increase in MPO activity, marker of neutrophil polynuclear infiltration. Evaluation of specific antivenom IgG titers revealed the activation of the humoral response resulting in an antibody titer of 1/16000, 15 days after AgNps-*Aah* injection. **Conclusion:** AgNps adsorbing *Aah* venom is an easy and promising nanovector for the antigen delivery and activation of immune cells after a single immunization.

KEYWORDS: Silver nanoparticles, Green synthesis, *Androctonus australis hector*, scorpion venom, immunogenicity.

RESUME

Introduction: L'envenimation scorpionique est un problème de santé publique dans les régions tropicales et subtropicales, surtout en Afrique du Nord où l'espèce la plus dangereuse, *Androctonus australis*, est responsable de presque 115'000 cas de piqûres annuelles. A ce jour, de nouvelles thérapies sont étudiées pour améliorer la prise en charge et le traitement des patients envenimées. L'objectif de cette étude est de développer un nanovecteur d'argent et le venin d'*Androctonus australis hector* (*Aah*) à utiliser comme nanoformulation capable de stimuler le système immunitaire de l'hôte. **Matériels et Méthodes :** Les nanoparticules d'argent (AgNps) ont été

synthétisées par synthèse verte, en utilisant un extrait aqueux de feuilles d'*Eucalyptus globulus* comme agent réducteur. Les nanoparticules AgNps ont été caractérisées par microscopie électronique à balayage (MEB) pour évaluer leur taille et forme et par diffractométrie aux rayons-X et FTIR afin de procéder à une caractérisation structurale. Les nanoparticules AgNps ont ensuite été utilisées dans une formulation vaccinale adsorbant le venin d'*Aah* et testées chez la souris dans un protocole vaccinal à injection unique. Les titres d'IgG spécifiques antivenin, les activités myéloperoxydase (MPO) et éosinophile peroxydase (EPO) ont été évalués durant le protocole vaccinale.

Résultats : La caractérisation physico-chimique des nanoparticules synthétisées par chimie verte a permis de confirmer la formation de nanoparticules de taille inférieure à 200 nm et de nature d'argent. L'évaluation des activités MPO et EPO a permis de montrer un profil pro-inflammatoire faible concernant les animaux ayant reçu les nanoparticules AgNps alors que le nanovaccin adsorbant le venin d'*Aah* a montré une relative augmentation de ces activités sériques, marqueur d'infiltration polynucléaire neutrophile et éosinophile. L'évaluation des titres d'IgG spécifique antivenin d'*Aah* a révélé une activation de la réponse immunitaire humorale aboutissant à un titre d'anticorps de 1/16000, 15 jours après l'injection d'AgNps-*Aah*. **Conclusion :** Les nanoparticules AgNps-*Aah* constituent un système de délivrance antigénique de synthèse facile capable d'activer le système immunitaire après une seule immunisation.

MOTS CLÉS : Nanoparticules d'argent, synthèse verte, *Androctonus australis hector*, venin, immunogénicité

* Corresponding author. Tel.: +21321336076; fax: +21321336077.

E-mailAddress: flaraba@hotmail.com/flaraba@usthb.dz

Received on: 30/06/2020

Revised on: 05/07/2020

Accepted on: 13/07/2020

1. Introduction

Scorpion envenomation is a major public health problem observed in five continents [1]. Each year millions of scorpion stings occur with minor problems resulting in localized pain and minimal systemic involvement, however some patients can present severe envenomation leading to death [2]. Scorpions are spread especially in rural and peri-urban areas of tropical and subtropical regions of Maghreb, Middle East and Central/South America. Among the most deadly species of scorpions, *Androctonus australis hector* (*Aah*), *Androctonus amoreuxi* (*Aam*) and *Buthus occitanus tunetanus* (*Bot*) are found in Algeria. These species are responsible for the majority of envenomations and lethal accidents in humans [3, 4]. Immunotherapy is the only specific treatment for envenomation [5]. Antivenoms are obtained by hyperimmunization of horses and sheep with repeated venom injections. They can be monovalent, when animals are immunized against a single venom, or polyvalent against a mixture of venom of different species [5-7]. Several improvements of the actual immunotherapy have been done so far. Fab/F(ab')₂ fragment mixture, experimental monoclonal antibodies, nanobodies and IgY antibodies have been developed and tested in animals, but not yet in humans for lack of safety studies [8-13]. For this purpose, preventive therapies using adjuvants and nanoparticles as antigen delivery systems for scorpion venom are undertaken in order to boost the immune system against scorpion

envenomation. Formulations using MF-59 and Alum adjuvants with irradiated *Aah* venom have been tested in a vaccine protocol in rabbits, reach a protection of all injected animals up to 4 LD₅₀ of *Androctonus australis hector* venom, three months after the last injection [14]. A formulation of encapsulated irradiated *Aah* venom in calcium-alginate nanoparticles performed in rabbit and mice is able to induce an effective immunogenicity, a safety and immunoprotection of all injected animals of up to 6 LD₅₀ of *Androctonus australis hector* venom [15]. Recently, the neurotoxin *Aah I* have been encapsulated in chitosan-TPP nanoparticles, reducing its toxicity and eliciting a specific anti-toxin immunity in vaccinated mice [16]. In the present study, we aimed to develop a new nanocarrier based on silver nanoparticles adsorbing *Androctonus australis hector* venom. These nanoparticles synthesized by an easy green synthesis are used in a one-shot immunization protocol, to study the preliminary activation of the host immune system.

2. Materials and methods

1. Venom and chemical products

Lyophilized *Androctonus australis hector* venom and chemical products were provided by the Laboratory of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, USTHB, Algiers, Algeria.

2. Animals

NMRI animals (20 +/- 2 g) were provided by the Faculty of Biological Sciences animal facility and housed in a controlled room temperature, with food and water *ad-libitum*. Experiments were carried out according to the Federation for Laboratory Animal Science Associations (FELASA) rules of the ethics for animal welfare.

3. Green synthesis of silver nanoparticles

Leaves of *Eucalyptus globulus*, previously dried at room temperature, were powdered using a mortar. The powder (50 g) was dissolved in 500 ml boiled deionized water for 2 hours, then filtered. Leave extract (6 ml) was then added to 100 ml of 0.01 mM aqueous AgNO₃ solution (EMD Millipore, Billerica, MA, USA), gently stirred and incubated at room temperature. The obtained solution was then centrifuged at 13⁷000g for 20 minutes and the AgNp pellets were washed three times with distilled water. AgNps were resuspended in ethanol 70% (EMD Millipore), dried at 75°C for 120 minutes and stocked for physic-chemical analysis.

4. Adsorption of AgNps with Aah venom

Adsorption of *Aah* venom on AgNps have been done in accordance to Asgary et al., 2016 [17]. Briefly, AgNps (0.3 mg) were added to 10 µl of *Aah* venom for each injection.

5. Scanning Electron Microscopy

The morphology of AgNps was studied by scanning electron microscopy (SEM) at Sonatrach Research and Development Center, Boumerdes, Algeria. Images were captured at 100000 x magnification.

6. X-Ray Diffractometry

X-ray diffractometry (XRD) measurement of AgNps was carried out using an X-ray diffractometer (Rigaku D/max 2500V) at Sonatrach Research and Development Center, Boumerdes, Algeria.

7. Fourier-Transform Infrared Spectroscopy

Chemical interactions of silver nanoparticles were analyzed by an infrared spectrometer with Fourier transmission IR700. All spectra were recorded in the range 600-4000 cm⁻¹.

8. Experimental procedure

In this study, four groups of mice were used. The control group of animals was injected with saline solution (NaCl 0.9%) by subcutaneous (s.c.) route.

The second group of mice was injected with AgNps alone by s.c. route. The third group received an injection of AgNps-*Aah* and the fourth group was injected with a sublethal dose of *Aah* venom antigen alone. All mice received the injection at day 1 and were humanely sacrificed at day 7 and 15 after injection, for plasma recovery.

9. Evaluation of myeloperoxidase activity (MPO)

Myeloperoxidase activity was evaluated as a biomarker of inflammation. It was measured according to the intensity of the oxidation color of the ortho-dianisidine product. The reaction used chromogenic substrate H₂O₂ with O-dianisidine diluted in phosphate buffer (pH 5.8). The enzymatic activity was evaluated at 460 nm.

10. Evaluation of eosinophil peroxidase activity (EPO)

The eosinophil peroxidase was released by activated eosinophils after interaction with different mediators of the inflammatory cascade. It was measured using a method based on the oxidation of the substrate, the hydrogen peroxide by the extracellular EPO in media with a chromogen, O-Phenylenediamine (OPD) (Sigma Germany). The enzymatic activity was evaluated at 490 nm.

11. Evaluation of specific anti-Aah venom IgG titers by ELISA

ELISA was used to evaluate the specific IgG antibodies titer against *Aah* venom. A preparation of 5 µg/ml *Aah* venom in 0.1 M carbonate buffer pH 9.5 (100 µl) was incubated in 96-well plates overnight at 4°C. Non-specific sites were blocked with 100 µl of 0.1 M PBS, pH 7.4 containing 5% skim milk for 1 h at 37°C and washed five times with PBS-Tween 20. Sera were diluted in PBS 0.1 M and added to the plates and then incubated for 1 h at 37°C. After a washing step, anti-mouse IgG conjugated with peroxidase (Sigma) (diluted at 1/500) was added to the plate and incubated for another hour at 37°C. After a last washing, wells were filled with 100 µl of ortho-Phenylenediamine dihydrochloride solution (10mg/ml in phosphate buffer, pH 7.4, H₂O₂ 0.03%). After blocking the reaction by adding 50 µl of H₂SO₄ (2 N), absorbance values were read at 490 nm.

12. Statistical analysis

All the data were analyzed with one-way ANOVA statistical test and *P*-value < 0.05 was considered a significant difference between groups.

3. Results

3.1 Morphological analysis of AgNps by SEM

The morphological analysis of silver nanoparticles by scanning electron microscopy shows a spherical shape and a size between 50 and 110 nm (Figure 1).

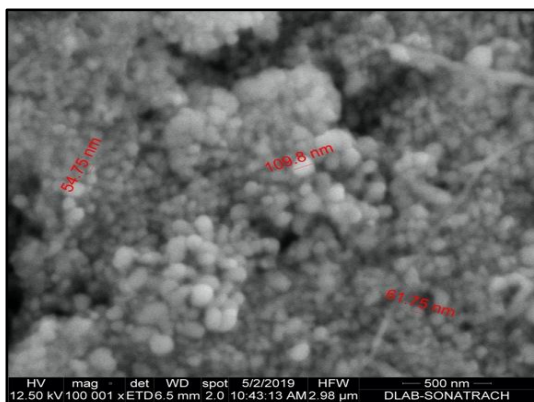


Figure 1: Scanning Electron microscopy of AgNps

3.2 XRD analysis of AgNps

X-ray diffraction patterns of AgNps synthesized from an extract of *E. globulus* leaves was observed (Figure 2). The obtained diffraction peaks are characteristic of silver nanoparticles and were found at 2θ values corresponding to 20, 32.2, 46.1, 54.9, 57.5 and 67.5 respectively attributed to the crystallographic planes 4000, 3100, 4500, 2900, 1500 and 1000. Other peaks have been observed corresponding to impurities, probably due to the residues of *Eucalyptus* extracts after green synthesis (Figure 2).

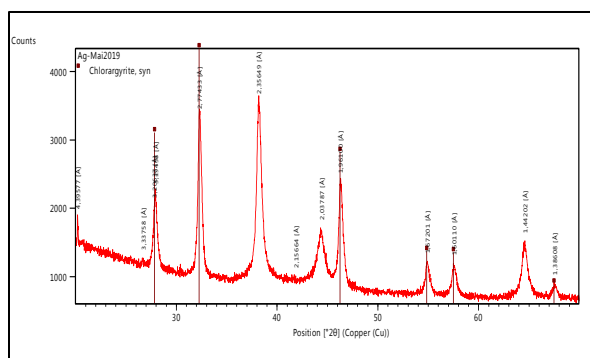


Figure 2: XRD analysis of AgNps

3.3 FTIR analysis of AgNps

FTIR spectroscopy was used to identify functional groups existing in silver nanoparticles, after green synthesis. Two characteristic peaks were observed.

The first peak at 1640 cm^{-1} absorbance is the silver nanoparticles-OH bond bending, which gives them a spherical form. The second characteristic peak is found at 3462 cm^{-1} absorbance, attributed to the stretching of hydroxyl groups (Figure 3).

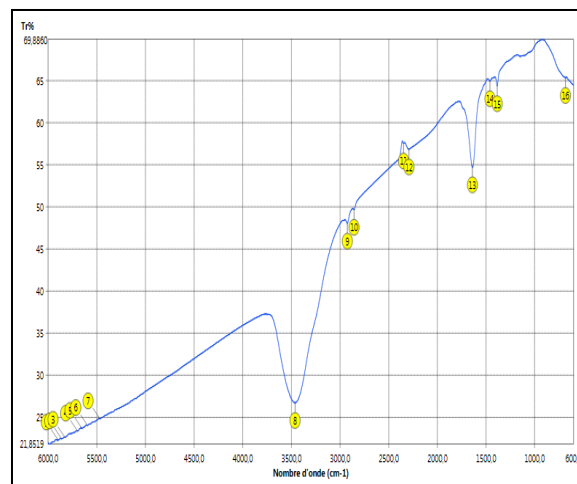


Figure 3: FTIR analysis of AgNps

3.4 Evaluation of myeloperoxidase activity

After injections (d1) a significant difference ($P=0.0075$) on the myeloperoxidase activity was found in sera of mice receiving AgNps-Aah and Aah alone compared to those of animals receiving free Nps (AgNps) and saline (0.1231 vs 0.069 vs 0.033 mM $\text{H}_2\text{O}_2/\text{min/ml}$). A decrease of MPO activity is observed at day 7 and day 15 in control groups, less important in sera of mice receiving the nanovaccine injection (AgNps-Aah) (0.033 and 0.039 vs 0.0886 mM $\text{H}_2\text{O}_2/\text{min/ml}$) (Figure 4).

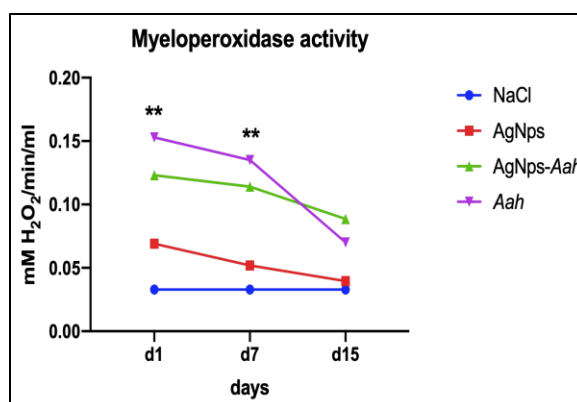


Figure 4: Evaluation of MPO activities in the sera of mice, 1, 7 and 15 days after the nanovector injection. Activities are expressed as mM of used $\text{H}_2\text{O}_2/\text{min/ml}$ of sera

3.5 Evaluation of eosinophil peroxidase activity

During the immunization protocol, there are no differences of levels of EPO activities in sera of groups receiving saline solution and AgNps injection (0.0180 vs 0.0181 mM H₂O₂/min/ml) ($P=0.0069$). Group receiving the nanoformulation adsorbing *Aah* venom shows a EPO activity at day1 (0.0379 mM H₂O₂/min/ml) lesser than the venom control group (0.061 mM H₂O₂/min/ml), decreasing almost at control values at day7 and day15 (0.0250 mM H₂O₂/min/ml) (Figure 5).

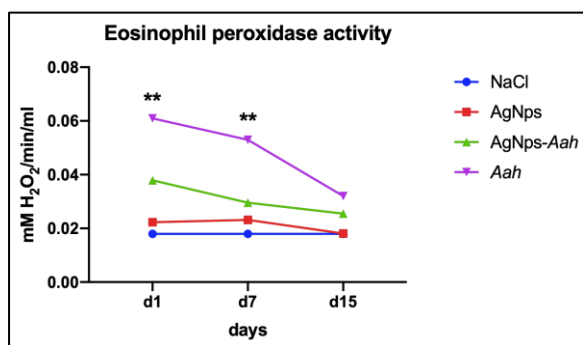


Figure 5: Evaluation of EPO activities in the sera of mice, 1, 7 and 15 days after the nanovector injection. Activities are expressed as mM of used H₂O₂/min/ml of sera

3.6 Evaluation of specific antivenom IgG titers

Specific IgG titers obtained against *Aah* scorpion venom were evaluated at d7 and d15 after the injection of AgNps-Aah on mice. Results showed a specific anti-Aah IgG titer of 1/16000 reached after 15 days post-injection, resulting on the activation of humoral immune cells secreting specific IgG after antigen presentation by APCs (Figure 6).

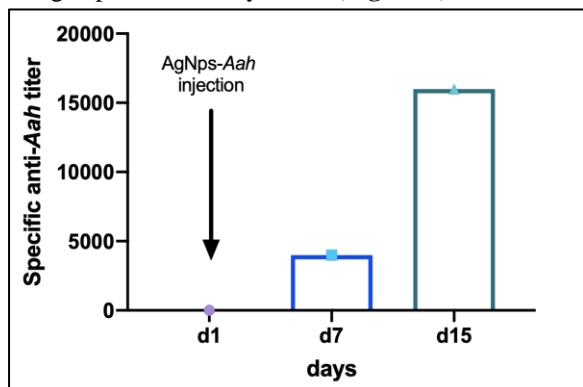


Figure 6: Specific IgG titers obtained after 7 and 15 days of AgNps-Aah injection

4. Discussion

In this study, we evaluated the preliminary safety and immunogenicity of a nanoparticulate vector for *Aah* venom delivery using silver nanoparticles synthesized by green chemistry. The use of nanoparticles as a vector in an immunization protocol can lead to a better antigen presentation, extended injection intervals and reduced doses of antigens [18]. The method of AgNps synthesis used in this study was chosen based on a previous study on green synthesis of silver nanoparticles as adjuvant in the veterinary rabies vaccine [17].

The physico-chemical characterization of silver nanoparticles synthesized revealed their spherical shape and sizes between 60 and 150nm, with an obtained structural characterization by XRD showing 2θ values corresponding to 20, 32.2, 46.1, 54.9, 57.5 and 67.5 similar to Sandjenbam et al., 2013, where they found crystalline peaks at 2θ values of 38.158, 44.358, 64.528 and 77.498 on silver nanoparticles synthesized with five leaf extracts (*Pinus desiflora*, *Diopyros kaki*, *Ginkgo biloba*, *Magnolia Kobus* and *Platanus orientalis*) [19]. Results with *Capsicum annuum L.* extract showed that amine groups of proteins played a stabilization and reducing role during the synthesis of silver nanoparticles [20]. These properties positively influence their interaction with immune cells because of the spherical shape and size of nanoparticles that can be easily endocytosed by antigen presenting cells, starting a specific immune response [21,22]. For this purpose, AgNps adsorbing *Androctonus australis hector* venom were used in an experimental protocol of a single injection in mice as an antigen delivery system. The evaluation of the systemic inflammation showed that a few hours after the first injection, an increase of MPO and EPO activities in sera of mice receiving AgNps-Aah was recorded resulting from a degranulation of azurophilic endosomes of polynuclear neutrophils and eosinophils in the extracellular medium. This could be explained by the spherical shape of AgNps as well as their small size which favors their phagocytosis by antigen presenting cells (APCs) but also because of nanoparticles adsorbed *Aah* venom, with possible residual toxicity [23]. Once internalized, AgNps induced not only the antigen presentation by APCs but also the synthesis of pro-inflammatory cytokines such as IL-1β and IFN-γ [24,25]. More interestingly, mice receiving AgNps alone did not display any important MPO or EPO activity, demonstrating a safety profile of these nanoparticles, largely used for their known antibacterial activity [26]. The single injection of AgNps-Aah induced specific IgG titer of 1/16000 at 15 days after the injection. This can be

explained by of the activation of humoral B-cells secreting specific antibodies, that probably need an injection boost to reach more important IgG titers and a long term protection against *Androctonus australis hector* envenomation [15].

Conclusion

Taken together, our preliminary results revealed that green synthesis using *E. globulus* leaves extract as reducing agent lead to the development of a safe antigen delivery system based on silver nanoparticles, promising for the design of an immunization protocol that can be further used against scorpion envenomation.

Acknowledgments

Authors would like to thank Charaf Eddine Louchene, MSc, for his precious assistance during animal experimentations.

Conflicts of interest

Authors do not declare any conflict of interest.

References

1. Isbister, G.K. and Bawaskar, H.S. (2014). Scorpion Envenomation. *N. Engl. J. Med.*, 371, (5): 457–463
2. Chippaux, J.-P. and Goyffon, M. (2008). Epidemiology of scorpionism: A global appraisal. *Acta Trop.*, 107, (2): 71–79
3. Hammoudi-Triki, D., Ferquel, E., Robbe-Vincent, A., Bon, C., Choumet, V. and Laraba-Djebari, F. (2004). Epidemiological data, clinical admission gradation and biological quantification by ELISA of scorpion envenomations in Algeria: effect of immunotherapy. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 98, (4): 240–250
4. Adi-Bessalem, S., Hammoudi-Triki, D., and Laraba-Djebari, F. (2008). Pathophysiological effects of *Androctonus australis hector* scorpion venom: Tissue damages and inflammatory response. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 60 (4–5): 373–380
5. Martin-Eauclaire, M.F., Adi-Bessalem, S., Hammoudi-Triki, D., Laraba-Djebari, F., and Bougis, P.E. (2019). Serotherapy against Voltage-Gated Sodium Channel-Targeting α Toxins from *Androctonus Scorpion* Venom, *Toxins (Basel)*, 11 (2): 63
6. Sergent, E. (1939). Anti-Scorpionic Serotherapy. *Arch. Inst. Pasteur d'Algerie*, 17, (3)
7. Ghalim, N., El-Hafny, B., Sebti, F., Heikel, J., and Lazar, N. (2000). Scorpion envenomation and serotherapy in Morocco. *Am J Trop Med Hyg.*, 62 (2): 277-83
8. Sami-Merah, S., Hammoudi-Triki, D., Martin-Eauclaire, M.F., and Laraba-Djebari, F. (2008). Combination of two antibody fragments F(ab')₂/Fab: An alternative for scorpion envenoming treatment, *Int. Immunopharmacol.*, 8, (0): 1386–1394
9. Hmila, I. (2010). A bispecific nanobody to provide full protection against lethal scorpion envenoming. *FASEB J.*, 24, (9): 3479–3489
10. Hmila I. (2012). Pre-clinical studies of toxin-specific Nanobodies: Evidence of in vivo efficacy to prevent fatal disturbances provoked by scorpion envenoming, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 264, (2): 222–231
11. Ben Abderrazek, R. (2009). Identification of potent nanobodies to neutralize the most poisonous polypeptide from scorpion venom, *Biochem. J.*, 424, (2): 263–272
12. Sifi, A., Adi-Bessalem, S., and Laraba-Djebari, F. (2018). Development of a new approach of immunotherapy against scorpion envenoming: Avian IgYs an alternative to equine IgGs. *Int. Immunopharmacol.*, 61, 256–265
13. Abroug, L., Ouanes-Besbes, N., Tilouche, and S. Elatrous, “Scorpion envenomation: state of the art,” *Intensive Care Med.*, vol. 46, no. 3, pp. 401–410, Mar. 2020.
14. Abroug, F., Ouanes-Besbes, L., Tilouche, N., and Elatrous, S. (2020). Scorpion envenomation: state of the art, *Intensive Care Med.*, 46, (3): 401–410
15. Nouri, A. and Laraba-Djebari, F. (2015). Enhancement of long-lasting immunoprotective effect against *Androctonus australis hector* envenomation using safe antigens: Comparative role of MF59 and Alum adjuvants, *Vaccine*, 33, (43): 5756–5763

15. Nait Mohamed, F. A. and Laraba-Djebari, F. (2016). Development and characterization of a new carrier for vaccine delivery based on calcium-alginate nanoparticles: Safe immunoprotective approach against scorpion envenoming., *Vaccine*, 34, (24): 2692–2699
16. Rebbouh, F., Martin-Eauclaire, M.F., and Laraba-Djebari, F. (2020). Chitosan nanoparticles as a delivery platform for neurotoxin II from *Androctonus australis hector* scorpion venom: Assessment of toxicity and immunogenicity, *Acta Trop.*, 205
17. Asgary V. (2016). Green synthesis and evaluation of silver nanoparticles as adjuvant in rabies veterinary vaccine, *Int. J. Nanomedicine*, 11, 3597–3605
18. Akagi, T., Shima, F., and Akashi, M. (2011). Intracellular degradation and distribution of protein-encapsulated amphiphilic poly(amino acid) nanoparticles., *Biomaterials*, 32, (21): 4959–67
19. Sanjenbam, P., Gopal J.V., and Kannabiran, K. (2014). Anticandidal activity of silver nanoparticles synthesized using *Streptomyces* sp.VITPK1, *J. Mycol. Med.*, 24, (3): 211–219
20. Li, S. (2007). Green synthesis of silver nanoparticles using *Capsicum annuum* L. Extract, *Green Chem.*, 9, (8): 852–85
21. Song, J.Y. and Kim, B.S. (2009). Rapid biological synthesis of silver nanoparticles using plant leaf extracts, *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 32, (1): 79–84
22. Zhao, L. (2014). Nanoparticle vaccines, *Vaccine*, 32, (3): 327–337
23. Xu, Y., Tang, H., Liu, J., Wang, H., Y. L.-T. (2013). Evaluation of the adjuvant effect of silver nanoparticles both in vitro and in vivo,” *Toxicol. Lett.*, 19, (1): 42-8
24. Ahn, S. (2003). Controlled cellular uptake and drug efficacy of nanotherapeutics, *Sci. Rep.*, 3, 771–782
25. Li, W.R., Xie, X.B., Shi, Q.S., Zeng, H.Y., Ou-Yang Y.S., and Ben Chen Y. (2010). Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 85, (4): 1115–1122



Available online
<https://www.atrss.dz/ajhs>



Article Original

Commentaires sur l'Utilisation de l'Immunothérapie Antiscorpionique en Algérie

Commentary on Scorpion Antivenom Immunotherapy in Algeria

Kerboua Kheir Eddine^{1*}, Soualhi Islem², Djilani Salma³, Delma El kilani², Sadine Salah Eddine⁴, Athman Mohammed Amine², Ghezal Mohammed², Bechouni Tamadhor¹, Guedda Hicham⁵, Echikh Mohammed⁶, Abidi Lakhdar⁷, Djennouhat Kamal⁸

¹Laboratoire de Médecine Saharienne, Faculté de Médecine, Université Kasdi Merbah-Ouargla, Algérie

²Service de Réanimation, Etablissement Public Hospitalier Mohammed Boudiaf, Ouargla, Algérie

³Département de Soutien, Direction de Production, Institut Pasteur d'Algérie, Alger, Algérie

⁴Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la terre, Université de Ghardaïa, Ghardaïa, Algérie.

⁵Unité de Cardiologie, Service de Médecine Interne, Etablissement Public Hospitalier Mohammed Boudiaf, Ouargla, Algérie

⁶Laboratoire des Urgences Médico-chirurgicales, Etablissement Public Hospitalier Mohammed Boudiaf, Ouargla, Algérie

⁷Service des Urgences Médico-chirurgicales, Etablissement Public Hospitalier Mohammed Boudiaf, Ouargla, Algérie

⁸Laboratoire d'Immunologie, Faculté de Médecine, Université Benyoucef Benkhedda, Alger, Algérie

RESUME

Suite au décès de l'enseignante-chercheur *Aicha Aouisset* par envenimation scorpionique (ES/CIM-10 T63.2) à Ouargla et les perturbations sociétales que cet événement a pu engendrées dans cette zone énergétique et stratégique, la Direction Générale de la Recherche Scientifique et du Développement Technologique (DGRSDT) a ordonné une investigation scientifique sur le phénomène de scorpionisme en Algérie. Nous avons mené une étude opérationnelle par séjour au Sahara dans le chef-lieu d'Ouargla durant la période Avril 2019-Octobre 2020. L'Analyse Corrective Comparée a été utilisée pour déceler les points critiques de notre stratégie de lutte antiscorpionique comparée aux pays ayant réduit drastiquement la mortalité par ES. Nous avons réalisé des analyses techniques de la documentation adoptée ainsi que des analyses biologiques des échantillons sanguins des piqués scorpioniques (PS) et de l'Immunothérapie antiscorpionique utilisée (Ipascorp[®]). L'étude clinico-biologique des 600 PS recrutés au niveau de l'EPH-Ouargla a montré que la fréquence du syndrome d'envenimation systémique n'était présent que chez 3,5% des PS. La principale étiologie associée à la sévérité de l'ES était l'atteinte cardiaque à 80% suivie de l'œdème aiguë pulmonaire lésionnel à 20%. Aucune réaction allergique immédiate à l'Ipascorp[®] n'a été signalée et seulement 0,5% d'hypersensibilité retardée a été noté. Ce travail a pu concevoir des outils de type « Matrice d'Aide à la Décision » nécessaire au montage des stratégies de prévention primaire et secondaire et « la Table de Scorpions » indispensable au calcul de la posologie de l'Ipascorp[®]. L'introduction de « la dose de neutralisation effective » de l'Immunothérapie dans la conduite à suivre ainsi que l'intervention thérapeutique guidée par les deux biomarqueurs « glycémie et taux de lymphocytes » a pu redresser le taux de survie de 66,66% à 80% dans l'ES-stade 3. Ces données non seulement sont essentielles aux décideurs et aux thérapeutes mais aussi à la recherche pharmacologique et expérimentale.

MOTS CLES: Envenimation scorpionique, Immunothérapie passive, Ipascorp[®], DL₅₀, Algérie

ABSTRACT:

Following the death of the researcher Aicha Aouisset by scorpion envenomation (SE/CIM-10 T63.2) in Ouargla and the societal disturbances that this event caused in this strategic area, the Directorate General of Scientific Research and Technological Development (DGRSDT) ordered a scientific investigation into the phenomenon of scorpionism in Algeria. We conducted an operational study in Ouargla during the period April 2019-October 2020. The Comparative Corrective Analysis was used to detect the critical points in our national strategy of antiscorpionic control compared to the countries having reduced drastically mortality from SE. We performed technical analyzes of the official documentation as well as biological analyzes of the blood samples from stung patients (SP) and the antiscorpionic immunotherapy Ipascorp[®]. The study of the 600 SP admitted at the EPH-Ouargla showed that the frequency of the systemic envenomation syndrome was only present in 3.5% of SP. The main etiology associated with the severity of the SE was cardiac injury (80%) followed by acute pulmonary edema (20%). No immediate allergic reaction to Ipascorp[®] has been reported and only 0.5% delayed hypersensitivity has been noted. This work was able to design some tools such as "Decision Support Matrix" which is important to conceive the primary and secondary prevention strategies and "the Scorpion Table" that is essential for calculating the dosage of Ipascorp[®]. The introduction of the "effective neutralization dose" of Immunotherapy in the SE management as well as the therapeutic intervention guided by the two biomarkers "blood glycemia and lymphocyte levels" have helped to improve the survival rate from 66.66% to 80% within SE-stage 3 patients. These data are not only essential for decision-makers and Saharan doctors but also for pharmacological and experimental research.

KEYWORDS: Scorpion envenomation, Passive Immunotherapy, Ipascorp[®], LD₅₀, Algeria,

* Auteur Corredpondant. Tel.: +213 659 806 740; fax: +0-000-000-00.
Adresse E-mail: kheireddinekerboua@yahoo.fr

Date de soumission : 16/07/2020
Date de révision : 22/07/2020
Date d'acceptation : 31/08/2020

1. Introduction

L'obtention du premier Prix Nobel de médecine pour la France par Alphonse Laveran en Algérie a poussé le gouvernement colonial d'Algérie de s'investir dans la recherche en médecine au plus près du malade avec la création dans la même année du premier laboratoire de recherche en médecine à Beni-Ounif de Féguig, au Sahara, dirigé par Dr. Henry Foley depuis 1907 [1]. Le deuxième Laboratoire de recherche en médecine saharienne fut créé à Biskra en 1922 et inauguré en avril 1928 par le membre de l'Académie des Sciences, le Professeur F. Mesnil [1]. Cet investissement scientifique fédérant les efforts des services de Santé Militaire et les compétences de l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA) a été couronné par plus de 30 innovations en médecine humaine et animale. Pour ne citer que celles de grandes ampleurs internationales, l'identification du pou dans la transmission du typhus par le médecin Henry Foley et l'innovation de l'Immunothérapie (IT) antiscorpionique par Etienne Sargent au début des années 1930s, inspiré par les travaux mexicains de Vergara Lope, De La Pena et Venzor entre 1905 et 1938 [2]. Les avancées dues à l'équipe pasteurienne

des frères Sergents (Etienne et Edmon) ont été décisives pour le développement des antivenins scorpioniques. Elles remontent à la période précédant la seconde guerre mondiale, avant que ne soit connue la structure des immunoglobulines (1959), bien antérieure aux premières études cliniques sur les antivenins (années 60), à l'isolement des toxines létales de scorpion et à la description de leur mode d'action (années 70 et 80), à l'identification des mécanismes de l'intolérance (années 60 à 80), à la pharmacocinétique des toxines de scorpion (années 90) et à celle des antivenins (années 90 et 2000).

Par la suite, l'IPA a introduit des modifications dans les années 50s sur cette IT antiscorpionique grâce au Dr Lucien Balozet, suivi par le renforcement des procédés d'immunisation et l'introduction de la technique de dialyse par Irunberry et Pilo-Moron dans les années 60s et 70s, l'introduction de la technique de pepsinisation et de purification par Dr. Koubi dans les années 80s. La période de 1995 a connu un changement de procédure de fabrication qui a abouti au développement de l'actuelle génération d'antivenins. Entre autres, l'hyperimmunisation des

chevaux avec du venin pur (sans détoxification et avec un minimum d'adjuvants), la digestion enzymatique des IgG pour obtenir des F(ab')₂ et la purification poussée des fragments anticorps. En 2010 l'immunologiste Abbadi M.C. a mis au point un nouveau procédé de production de cette IT en introduisant l'appareil de cytophérèse. Actuellement, chaque lot d'IT antiscorpionique préparée à l'IPA est validé pour un pouvoir de neutralisation minimal de 15 DL₅₀ du venin de l'*Androctonus australis* par millilitre [3,4].

Depuis 2002, la mortalité par scorpionisme en Algérie est passée de 100 à 50 décès sur 50 000 piqures annuellement et reste maintenue à ce taux malgré le grand investissement déployé par l'Etat pour combattre ce fléau. L'indicateur de létalité utilisé en Algérie « Le Taux de létalité (TL) » ne traduit pas fidèlement les résultats des stratégies nationales de la prise en charge des envenimés graves car il utilise comme dénominateur tous les piqués scorpioniques malgré que plus de 95% d'entre eux ne représentent que des stades 1 et non pas des situations cliniques d'une vraie envenimation scorpionique (ES). Globalement, ce TL est de 0,1 en Algérie, mais recalculé sur l'ensemble des envenimés graves seulement, pour mesurer l'efficacité du protocole thérapeutique appliqué, il s'élève aux alentours de 30% malgré l'utilisation de l'IT antiscorpionique passive dont l'efficacité dépassait les 90% durant les 12 années de l'expérience algérienne d'Etienne Sergent [1, 2].

De ce fait, une solution scientifique fiable s'imposait en urgence contre le scorpionisme en Algérie sur deux fronts : (i) Réduire le taux de mortalité des patients ayant la possibilité d'être évacués vers les hôpitaux de deuxième ligne dotés de services de soins intensifs et de réanimation toute en réduisant l'incidence de l'insuffisance cardiaque chez les survivants (ii) Réduire le taux de mortalités des patients dans le grand désert qui ne peuvent pas bénéficier d'une évacuation à temps vers les hôpitaux de deuxième ligne et dont la survie dépendra du développement d'une alternative thérapeutique fiable qui peut être administrée aux victimes dans le grand désert sans la limitation de la chaîne de froid.

Ce travail s'intéressait uniquement au premier front et s'applique aux patients de grades 2 et 3 et surtout ceux traités dans les hôpitaux de 2^{ème} ligne. Il visait à identifier les manquements qui contribueraient à cette persistance de mortalité chez les envenimés graves

hospitalisés et de proposer et évaluer des actions correctives soutenues scientifiquement.

2. Matériels and Méthodes

1. Patients et Matériels

La population étudiée dans les 4 mois de l'année 2019 était représentée par tous les piqués scorpioniques admis au niveau des urgences médico-chirurgicales (UMC) de l'Etablissement Public Hospitalier (EPH) Mohammed Boudiaf-Ouargla du 16 juin au 23 octobre. Par contre, la population étudiée durant les 3 mois de l'année 2020 était surtout composée des envenimés scorpioniques sévères de stade 2 et 3 recrutés du 14 Mai au 14 Juillet.

L'IT étudiée est celle fabriquée à l'IPA (Ipascorp®) qui est le seul antivenin disponible en Algérie. Elle est fournie par l'IPA sous forme monovalente (issue d'une immunisation des chevaux avec du venin d'*Androctonus australis* seulement) à un titre de neutralisation de 15 DE₅₀ par ml, sous une présentation liquide avec un volume de 05 ml, soit un pouvoir neutralisant affiché de 75 DE₅₀ contre le venin d'*A. australis*.

Les scorpions étaient collectés des différentes régions d'Ouargla et acheminés au Laboratoire de Médecine Saharienne (LMS) de la Faculté de Médecine à l'Université Kasdi Merbah Ouargla pour élevage et extraction du venin et hémolymphe.

Les prélèvements sanguins de tous les piqués scorpioniques étudiés ont été conservés dans la bio banque à -40°C du laboratoire LMS pour des études ultérieures de la veninémie, biodisponibilité médicamenteuse et analyse des indicateurs du syndrome de la réponse inflammatoire systémique (SIRS).

Les réactifs chimiques et biologiques nécessaires à la réalisation de cette étude étaient obtenus auprès du laboratoire LMS.

2. Méthodes

Notre travail a été élaboré selon une approche opérationnelle par séjour au Sahara dans le chef-lieu de Ouargla programmée pour la période Avril 2019 jusqu'au Octobre 2020. Ce travail de terrain a été réalisé en Trois phases :

Phase 1 : nous avons procédé à l'Analyse Corrective Comparée (ACC), axée sur les points suivants :

a. Analyse opérationnelle, médicale et technique de la prise en charge des 600 victimes de PS recrutés durant la période allant du 17-06-2019 au 23-10-2019 au niveau des UMC et services de soins intensifs de l'EPH Mohammed Boudiaf de Ouargla, en vue de comprendre le phénomène de scorpionisme en Algérie et détecter les facteurs impliqués dans la persistance de la mortalité par scorpionisme dans le but d'être exploités pour améliorer la performance de la stratégie nationale de lutte anti-scorpionique.

b. Revue scientifique des expériences des pays qui ont réduit considérablement le taux de mortalité par scorpionisme et tirer les solutions les plus adaptées au contexte algérien.

c. Proposition d'actions correctives justifiées par les pratiques médicales et soutenues par les recherches scientifiques et les expériences pratiques des autres pays touchés par ce fléau.

Phase 2 : Etudier les caractéristiques des envenimés scorpioniques chez les piqués scorpioniques pris en charge au niveau de l'EPH-Ouargla durant les 4 mois de l'année 2019. Etant donné que le syndrome d'envenimation scorpionique (ES) est défini par la manifestation des symptômes provoqués par l'activation du système nerveux autonome parasympathique et/ou sympathique, les patients exprimant uniquement des signes locaux de douleurs, paresthésie, engourdissement ou brûlures ne sont pas considérés comme des envenimés dans cette étude car leurs scorpions piqueurs ne leurs injectaient que le pré-venin riche en sérotonine et sels potassiques.

Cette phase était axée sur les points suivants :

- a. Calcul de la fréquence de la vraie ES chez les PS.
- b. Dresser le tableau clinique des envenimés graves.
- c. Calcul du taux de mortalité réel dans la catégorie des envenimés graves, un paramètre qui constitue une nécessité absolue pour les chercheurs et les décideurs.
- d. Déterminer la cause principale responsable de la mortalité élevée afin d'orienter les protocoles thérapeutique et guider la recherche fondamentale dans le développement des modèles animaux et de développement pharmacologique.
- e. Mettre au point des biomarqueurs prédictifs de l'ESsévère ou même de mortalité.
- f. Recenser les réactions allergiques immédiates et tardives à l'IT antiscorpionique chez les 600 patients

ayant reçu au moins une dose par voie intramusculaire (*i.m.*) grâce à un système de veille mis en place au niveau des UMC avec l'aide des étudiants en médecine de la Faculté de Médecine de Ouargla et les médecins urgentistes affectés à la salle de triage.

g. Extraction du venin des différentes espèces mortelles et étude de la réaction croisée (pouvoir de paraspécificité) de l'IT de l'IPA (Ipascorp®).

Phase 3 : Conception et évaluation des solutions scientifiques à intégrer dans le protocole thérapeutique chez les ES recrutés durant la période du 14-04-2020 au 14-07-2020.

Le logiciel SPSS (IBM version 17) a été utilisé dans les analyses statistiques. La comparaison de moyenne a été réalisée pour les valeurs continues, le *Khi-Deux* pour les valeurs discontinues et les courbes ROC pour la détermination des seuils des biomarqueurs. La valeur $p < 0,05$ a été retenue comme valeur seuil pour juger la significativité de nos conclusions scientifiques.

3. Résultats et Discussion

Etape 1 : Analyse opérationnelle

Cette première étape visait à étudier les points problématiques majeurs dans la stratégie nationale de lutte antiscorpionique. Le fléau du scorpionisme sévit en Algérie depuis toujours, dans les rapports des missions Flatters au Sahara Algérien, on peut lire que les chefs des tribus d'El-Hjirats à Ouargla demandaient aux officiers de cette mission des médicaments pour sauver leurs populations des PS [3]. L'Algérie connaît annuellement entre 45 000 et 50 000 cas de PS avec une mortalité au alentour de 50 cas [4].

Ce problème de santé publique qui concerne surtout le sud des Hauts Plateaux et le Sahara constitue une priorité nationale pour le gouvernement algérien. Malgré que la première cause de scorpionisme dans les zones les plus touchées soit la construction urbaine sur les gîtes de scorpions et les plans d'extension urbaine mal étudiés qui ne laissent pas les scorpions s'installer en *extra muros*; d'autres facteurs favoriseraient ce fléau comme le déséquilibre écologique de la biodiversité animale contre la famille des Scorpionida dont les prédateurs sont les espèces utiles à l'agriculture. Malheureusement, cette faune diurne et nocturne a été détruite dans les zones les plus concernées. En somme, le scorpionisme résulte de la superposition

spatio-temporelle de multiples facteurs relevant non seulement de l'animal lui-même (le scorpion) mais aussi de l'homme. Ceci crée le risque de scorpionisme qui ne peut pas se traduire en accident que lorsque d'autres éléments se surajoutent à cette équation scorpionique si complexe. De même, l'accident scorpionique ne se transforme en maladie scorpionique qu'après la réunion d'autres anomalies et manquements relatifs à différents domaines allant de la psycho-sociologie des populations jusqu'aux approches de la prise en charge des PS, passant par les plans de prévention primaire et secondaire. La figure 1 explique l'inter-connectivité des différents éléments et leurs sciences et théories explicatives pour puiser des solutions soutenues scientifiquement.

A l'issue de notre mission d'analyse au niveau de l'hôpital principal de Ouargla, nous nous sommes rendu compte que le phénomène de la persistance de mortalité est multifactoriel impliquant de nombreux organismes étatiques faisant intervenir différents acteurs à de multiple échelles. Ceci nous a permis de dresser la liste des principaux acteurs impliqués dans les actions hiérarchisées contre le scorpionisme en Algérie. La figure 2 montre ces différents intervenants qui pourraient être affectés de manquements ou de dysfonctionnements sur les trois niveaux : tactique, opérationnel et stratégique. Nous avons constaté que l'IT antiscorpionique pourrait être affectée sur ces trois niveaux.

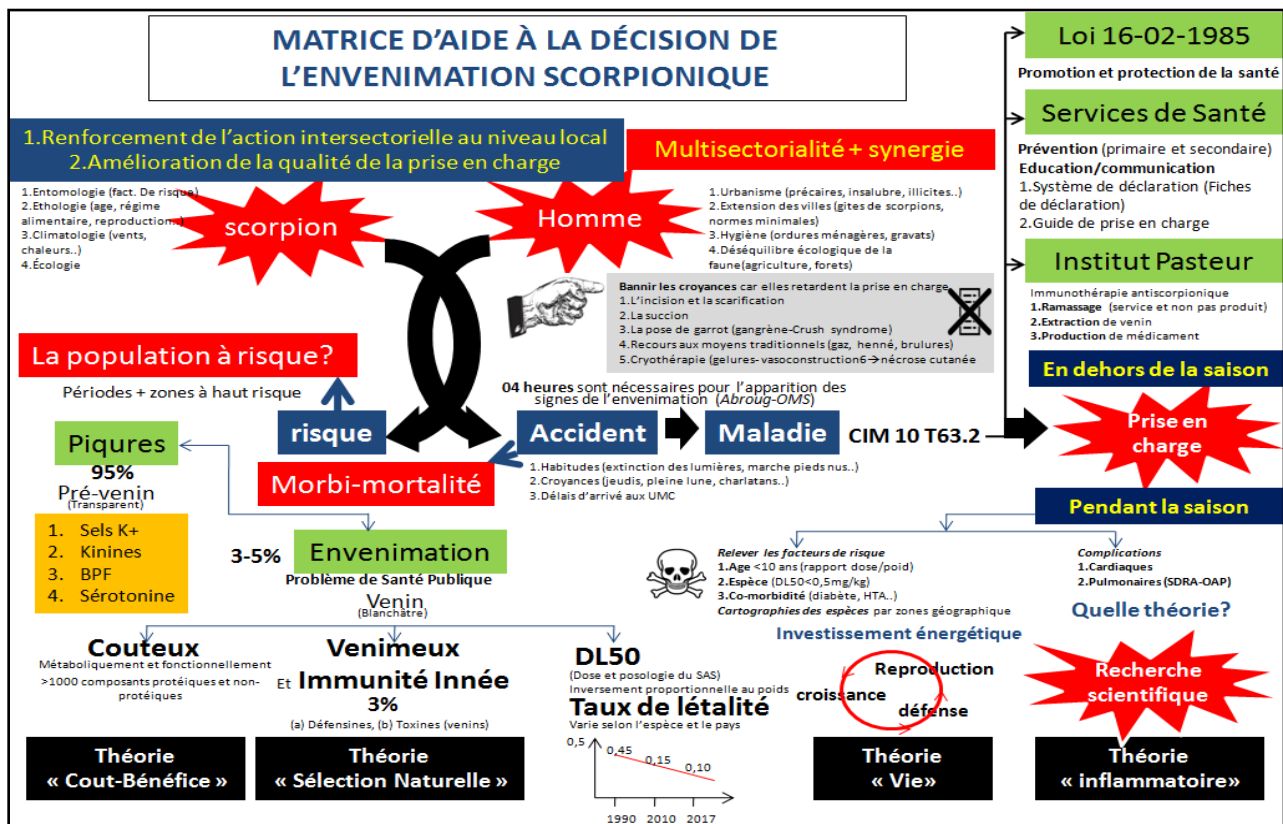


Figure 1 : Matrice d'aide à la décision dans l'élaboration de stratégies nationales de lutte antiscorpionique montrant les différents éléments intriqués dans la recrudescence du scorpionisme en Algérie.

Cette figure explique comment le risque scorpionique est créé suite à la superposition des facteurs liés à l'homme et au scorpion et quand est ce risque se transforme en accident tout en montrant les facteurs associés à la transformation de l'accident en maladie rare (CIM 10 T63.2). La diversité des facteurs expliquant l'ampleur du scorpionisme en Algérie et concernant autant le scorpion que l'humain avec leurs interactions complexes. L'habitat et l'urbanisme défaillant autant que la disparition des prédateurs de scorpions sont des aspects importants, mais la colonisation des sites par les scorpions – sujet très bien étudié au Brésil – a une part de responsabilité considérable : les scorpions se nourrissent de cafards et l'on conçoit l'impact que cela peut avoir dans les zones périurbaines et les cités mal gérées. Egalement, les mesures de la prévention primaire et secondaire et les taches des différents acteurs nationaux dans la stratégie nationale de lutte antiscorpionique ainsi que les conseils et les gestes à bannir sont résumés dans la figure. De même, les différentes théories expliquant pourquoi la maladie d'envenimement systémique se manifeste uniquement chez un petit pourcentage des blessés scorpioniques et les indicateurs principaux à prendre en considération dans la prise en charge.

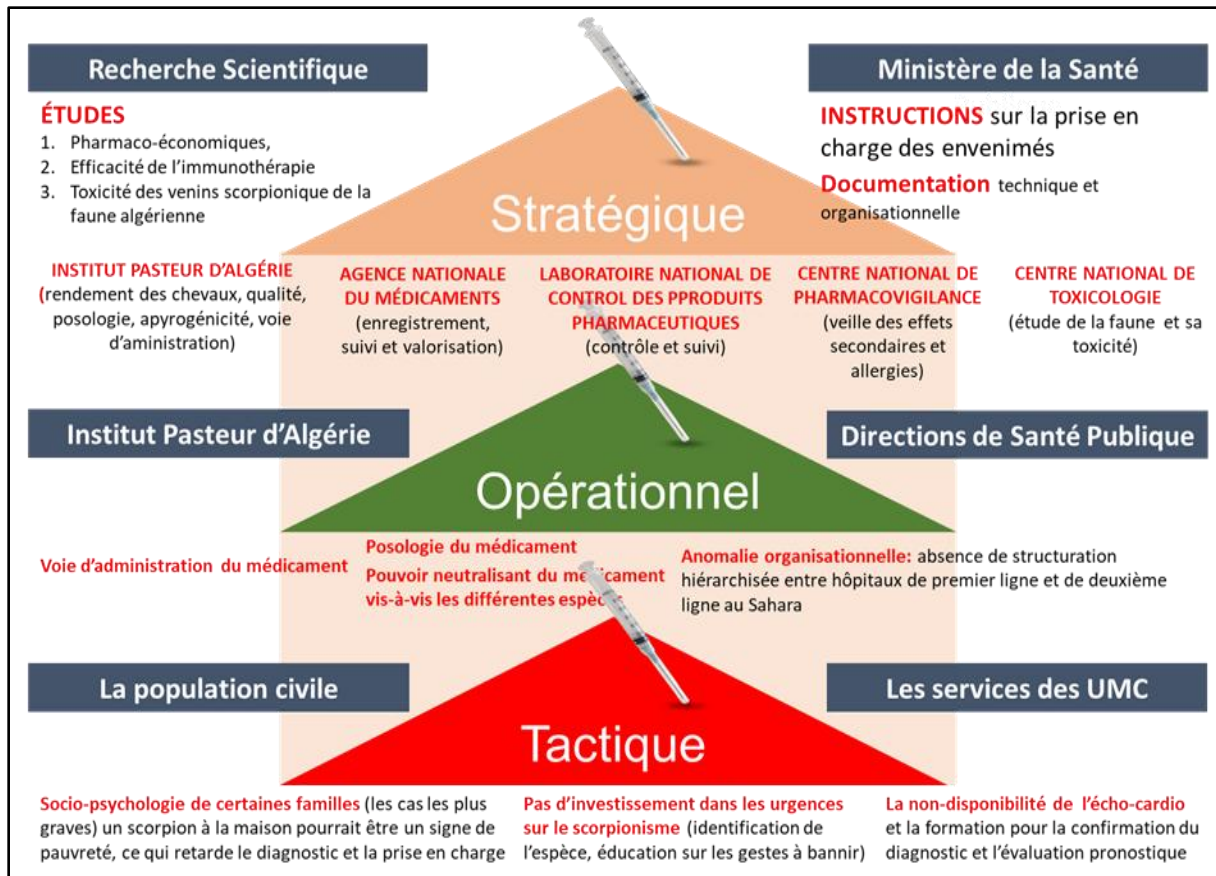


Figure 2 : Différents acteurs de la lutte antiscorpionique en Algérie.

Cette figure montre les différents acteurs impliqués dans la réussite de la stratégie nationale de lutte antiscorpionique où tout manquement aboutira à une défaillance fatale depuis le niveau tactique en contact avec les blessés scorpioniques et leurs thérapeutes, passant par le niveau opérationnel qui doit garantir la disponibilité de traitement étiologique répondant à toutes les exigences de la voie d'administration et du pouvoir neutralisant et paraspécifique ainsi que la répartition des tâches médicales entre les établissements de santé de première ligne et de deuxième ligne, jusqu'au niveau stratégique qui est assuré par les institutions hospitalo-universitaires.

En outre, notre analyse sur l'efficacité de l'utilisation de l'IT en Algérie s'est déroulée en deux analyses documentaires, une analyse de laboratoire et une analyse organisationnelle de santé publique :

1. Analyse de la qualité de l'immunothérapie antiscorpionique préparée à l'IPA

La règle en vigueur dans l'ES est de recommander d'utiliser un antivenin polyvalent. Cependant, le protocole d'immunisation des animaux producteurs doit être rigoureux car le venin de scorpion est faiblement immunogène. Actuellement, les protocoles recommandés utilisent du venin pur à faible dose, injecté simultanément en une dizaine de points de l'animal immunisé. Les rappels sont fréquents (une fois par mois en moyenne) pendant une longue période (15 à 18 mois) afin d'obtenir un titre de neutralisation suffisant. Ce dernier est

supérieur à 30 DE₅₀ par ml et atteint souvent 50 DE₅₀ par ml [5].

Pour les antivenins monovalents, la qualité de ce type d'IT passive se mesure par son pouvoir neutralisant effectif et son pouvoir paraspécifique. Pour l'IT de l'IPA, la plupart des études réalisées dans des laboratoires militaires américains et français et quelques laboratoires universitaires français ont démontré sa qualité par quatre différentes méthodes (**Tableau 1**) [6-10]. Brièvement, ces études démontrent que 1 ml de l'IT monovalente préparée à l'IPA par l'immunisation des chevaux de race arabe par le venin brute de l'*Androctonus australis* possède un pouvoir neutralisant >9DL₅₀ du venin d'*Androctonus australis* [7], 9DL₅₀ du venin du *Leiurus quinquestriatus* [10] et seulement 6 à 8 DL₅₀ du venin du *Buthus occitanus* [7]. En utilisant une autre méthode, 1 ml de l'IT monovalente de l'IPA possède un pouvoir neutralisant de 1-1,2 mg du venin

d'*A.australis*, mais seulement 0,4mg de celui du *Buthacus arenicola* et du *Buthus occitanus* [8]. Par ailleurs, 200µL de l'IT neutralise 100µg de celui de l'*A. australis* et 50µg du *B.occitanus* [9]. Le médecin français M. Goyffon a montré en 1984, que 01ml de l'IT algérienne neutralise 0,09 (0,07-0,11) mg de venin de *Leiurus quinquestriatus*. 0,17 (0,14-0,19) mg de venin d'*A. australis* et. 0,11 (0,09-0,13) mg de venin de *B. occitanus* [10].

Ces données nous ont permis de recalculer approxi-

mativement les doses de l'IT à injecter selon l'espèce de scorpion et de concevoir la table de calcul des doses nécessaires dans les établissements de santé des zones à risque (**Figure 3**). A titre d'exemple ; sachant que 1 ml de l'IT monovalente préparée à l'IPA par le venin de l'*Androctonus australis* neutralise >9 DL₅₀ du venin de l'*Androctonus australis*, alors qu'il ne neutralise que 6 DL₅₀ de celui du *Buthus occitanus*. 1 ml de ce médicament est moins efficace de 35% contre cette deuxième espèce.

Tableau 1 : Etudes de la potence de l'immunothérapie de l'IPA

Auteur (s)	Sérum antiscorpionique algérien	Efficacité selon la notice IPA	Efficacité prouvée
PRÉCIPITINES William G. Glenn & W. Whittemore et Lieut.-Col. H. L Kreegan 1962 [6] W. Whittemore et Lieut.-Col. H. L Kreegan 1961 [7] (l'estimation de pouvoir neutralisant)	Antivenin: commercialisé par IPA Venin: <i>A. australis</i> Antivenin: Ampoule 10 mL Venin: <i>A. australis</i> & <i>Buthus occitanus</i>	1mL neutralise 1mg du venin de l' <i>A australis</i>	Nombre de système de précipitines : Antivenin algérien précipite 4 lignes de A.a contre un avec le sudafricain et le brésilien 1) PD50 (médián protective dose): 1 ml neutralise >9 DL₅₀ (A.a), 6<8 DL₅₀ (B.o) (si on multiplie xDL50 de l'A.a → 1mL neutralise 0,4mg) 2) l'antivenin turque (<i>A. crassicauda</i>): >17DL₅₀ (>> antivenin algérien vis-à-vis A.a) malgré que <i>Androctonus Crassicauda</i> est moins venimeux que l' <i>Aandroctonus auralis</i>
Lucien Balozet 1971[8] (La méthode de IPSEN)	8 mois d'immunisation avec 400-500 telsons de l' <i>A. australis</i>		La méthode de IPSEN : pouvoir neutralisant contre le venin d' <i>A.australis</i> = 1-1,2mg/ml , mais contre le <i>Buthacus arenicola</i> et <i>Buthus occitanus</i> seulement 0,4mg/ml et aucune protection contre le Tityus.
P&H Rochet et J. Van Rietschoten 1980 [9] (meilleure méthode dans l'estimation de pouvoir neutralisant)	Antivenin: Batch N°4220 (moins concentré en protéines que le tunisien et le marocain) Venin: <i>A. australis</i> (Chellala ou Mechria), <i>Buthus occitanus</i> (Mecheria)	1mL neutralise au moins 25DL₅₀ (contre 10DL ₅₀ pour le SAS tunisien et 40-50 pour le SAS marocain)	La Courbe De Neutralisation de venin de l'A..a et B.o est la plus faible pour le sérum algérien suivi par le Tunisien. Le marocain est le meilleur malgré produit par la partie toxinique de l'espèce marocaine (α (mg venin/ml antivenin) Algérie=0,54 , tunisie=1,04, marroc=1,74 200µL SAS neutralise 100µg deA;a et 50µg de B.o (si on multiplie x5 → 1mL neutralise 0,5mg)
M. Goyffon 1984 [10] Méthode de Litchfield & Wilcoxon (1949)	Ampoule 10mL , lot N°4369 VENIN/ DL ₅₀ <i>L. quinquestriatus</i> =0,48mg/kg <i>A. australis</i> =0,55mg/kg, <i>B. occitanus</i> 0,9mg/kg	1mL neutralise 25DL₅₀ (selon Koubi, in litt.) contre le tunisien 1mL neutralise 10DL ₅₀	Le SAS turque est plus efficace contre A. a d'Algérie car produit par des telson d'une autre espèce d' <i>Androctonus</i> (cassicauda) (protection paraspécifique est supérieure que l'antivenin homologue) Le SAS tunisien est meilleur contre le venin du L quinquistratus car produit par le mélange de A. a. et B.o. le SAS algérien e turque sont comparables contre le venin de le B.o SAS algérien plus de 0,3 mL pour neutraliser 3DL₅₀ de L. quinquestriatus alors que le tunisien plus potent (moins de 0,3mL) (si on multiplie x3,3 → 1mL neutralise 10DL₅₀)

IPA : Institut Pasteur d'Algérie. A.a : *Androctonus .australis*, B.a : *Buthacus arenicola*, B.o: *Buthus occitanus*, DL₅₀ : Dose Létale Médiane, PD₅₀ : Dose Protectrice Médiane, SAS : ancienne dénomination de l'Immunothérapie antiscorpionique et veut dire sérum antiscorpionique.

Donc, pour atteindre la dose effective (DE) on doit rajouter au moins 0,35 ml à ce patient. Mais la réaction Anticorps-toxine n'est pas linéaire ce qui impose de doubler les doses. Nous tenons à préciser que l'utilisation de cette table d'identification des espèces permet de s'abstenir thérapeutiquement devant les sujets piqués par l'*Orthochirus innesi* et d'économiser du temps et d'argent pour améliorer la prise en charge des vrais ES.

Cette table d'identification et de posologie supporte les compétences en identification des espèces toxiques pour l'homme par les personnels médicaux et paramédicaux, chose déjà maîtrisée par nos voisins tunisiens depuis les années 80s [10].

De nombreuses études ont montré les avantages et limites des antivenins monovalents et polyvalents. Si le premier présente généralement une capacité

neutralisante plus élevée contre le venin qui a servi à le fabriquer, la paraspécificité est réduite, ce qui explique une faible neutralisation des venins des autres espèces de scorpion. L'identification correcte

du scorpion est une étape cruciale et la victime ou ses parents doivent apporter de l'aide de sa reconnaissance dans la table de scorpion ou bien en apportant l'individu scorpionique aux UMC.

TABLE DE SCORPIONS & DE CALCULE DE LA POSOLOGIE							
Genre	<i>Androctonus</i>			<i>Buthus</i>		<i>Buthacus</i>	
Espèce	<i>australis</i>	<i>ameurexi</i>	<i>aneas</i>	<i>tunetanus</i>	<i>arenicola</i>	<i>innesi</i>	<i>punicus</i>
Localisation*	endémique en Algérie	Sahara et Hauts plateaux	Sahara Sud-est	Littoral Hauts plateaux Sahara	Sahara-zones non urbaines	endémique Oasis	Littorale et Hauts plateaux + Sahara
DL ₅₀ (mg/kg)	0,32	0,5	1,21	0,9	3,25		9,37
Dose affichée de l'Ipascorp® (IM, 15 DL ₅₀ /mL)	4 à 6 ampoules de 75 DL ₅₀ **			6 à 8 ampoules de 75 DL ₅₀ **		Traitement symptomatique	
	Si par voie IM/SC: Viser une dose neutralisante de plus de 300 DL ₅₀ **						
	Si par voie IV: Viser une dose neutralisante de 150 DL ₅₀ **						
* Veuillez SVP nous transmettre l'identification du scorpion, sa zone géographique et le phénotype clinique du patient dans la fiche de renseignement pour accélérer les recherches scientifiques							

Figure 3 : Table de scorpion pour identification des scorpions et réajustement des doses de l'Ipascorp® à injecter.

Les doses mentionnées dans la figure (**) sont des les doses affichées. Dans les calculs des ampoules Ipascorp® à injecter, deux phénomènes pharmacologique sont pris en considération (i) Le phénomène de la perte de la moitié de la substance active de l'IT par la voie intramusculaire et de deux tiers par la voie sous-cutanée qui était bien étudié par Vasquez et al. 2010 [11], (ii) La méthode calcul du pouvoir neutralisant Ipascorp® par une incubation préalable de l'antivenin avec du venin avant son injection au souris ce qui surestime le pouvoir neutralisant par 100% comme l'a déjà montré Krifi et al. 1995 [12]. Prenant ces deux points en considération, le pouvoir réel de neutralisation de l'Ipascorp® est la moitié du pouvoir affiché. Le pouvoir neutralisant effectif est la moitié du pouvoir réel la biodisponibilité par la voie intraveineuse est la moitié de la dose injectée. Donc, pour atteindre un pouvoir neutralisant effectif minimal nous serons obligés de multiplier la dose indiquée sur la notice par 4. Exemple, sin on vise une cible thérapeutique de neutralisation effective de 75 DL₅₀ par Ipascorp® en utilisant la voie *i.m.* nous serons obligé d'injecter 4 ampoules d'Ipascorp®. NB : la méthode « Ipsen » est ancienne mais garde son intérêt dans les laboratoires sahariens. Aussi le terme « précipitine » est peu utilisé et représente le complexe anticorps antigène précipité dans un milieu semi-solide. Notons que l'étape de l'identification de scorpion piqueur a un intérêt pharmaco-économique colossal car certains scorpions ne sont pas toxiques pour l'homme et leurs victimes ne nécessitent pas une prise en charge spécialisée. Le coût de la prise en charge d'un piqué scorpionique en stade 0/1 est aux alentours de 60 milles dinars algériens.

Nous avons étudié la paraspécificité de l'IT monovalente de l'IPA préparée uniquement par le venin de l'*Androctonus australis* contre les venins des autres espèces mortelles en Algérie.

Nos résultats par la technique d'Ouchterlony confirment que l'Ipascorp® possède les trois qualités de l'immunothérapie passive: (i) Excellente Potencegrâce aux arcs de précipitation montrant un bon pouvoir neutralisant, (ii) pouvoir paraspécifique par la précipitation des protéines des venins des autres espèces, (iii) Bonne valence immunologique car nous avons pu mettre en évidence les quatre systèmes anticorps-antigènes (Figure 4).

Les 4 arcs antigéniques que nous avons trouvés avec le scorpion algérien *Androctonus australis*, montrent la présence de 4 types d'anticorps (Ac) dans le l'IT Ipascorp® (Figure 4). L'étude de la valence de l'antivenin par El Ayeb et Delori a décrit la présence de 4 épitopes d'une même toxine de ce scorpion nécessitant 4 types d'Acs pour une bonne neutralisation immunopharmacologique [13].

Malheureusement notre technique révèle aussi une mauvaise pepsinisation de l'IT car une thérapie bien pepsinisée ne donne aucun arc par la technique d'Ouchterlony. Ceci pourrait être à l'origine des réactions allergiques de type 3 et perturber la pharmacocinétique de l'Ipascorp® par la diminution de la vitesse de diffusion et la capacité de distribution tissulaire [14]. Toute de même, l'évaluation de la paraspécificité par les tests de précipitation

(Ouchterlony, immunoélectrophorèse) ou même ELISA) doit être complétée par des tests de neutralisation pour pouvoir prédire l'efficacité de l'antivenin, et fournir une réponse qualitative en identifiant les antigènes du venin reconnus par les anticorps contenus dans l'antivenin. En effet, le venin contient aussi des protéines non létales –voire non toxiques– et l'animal immunisé développe des anticorps indistinctement contre toutes les protéines toxiques ou non.

2. Analyse organisationnelle de santé publique concernant l'administration de l'Immunothérapie antiscorpionique

Cette étape visait l'évaluation de l'efficacité de l'approche organisationnelle dans la prise en charge des PS.

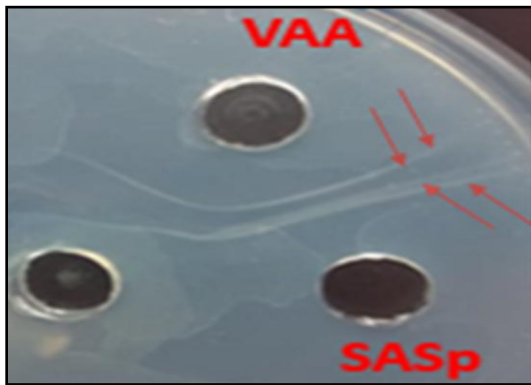


Figure 4 : Les quatre systèmes Anticorps-antigènes de l'immunothérapie IpscCorp® avec le venin de l'Androctonus australis.

Les flèches rouges indiquent les systèmes anticorps-antigène. VAA : venin de l'Androctonus australis, SASp : IpscCorp®.

Durant notre mission à l'Hôpital principal de Ouargla, nous avons constaté le manque d'approche organisationnelle permettant aux établissements de santé de première ligne (dépourvus de services de soins intensifs) de maximiser les chances de guérisons de leurs patients évacués aux Hôpitaux de deuxième ligne dotés de services de soins intensifs et de réanimation. Les PS évacués des structures sanitaires distantes de plus d'une heure de route impose le screening des vrais cas d'envenimation par de simple test de la glycémie qui permet d'identifier plus de 50% des cas et si possible le taux de lymphocytes par la numération formule sanguine (voir la section « Etape 3 »). Ensuite, l'acharnement thérapeutique par de multiples injections de l'IT antiscorpionique au niveau des établissements de première ligne et/ou durant l'évacuation. Un

conditionnement fiable du PS se résume à l'injection de l'hémisuccinate d'hydrocortisone (HHC) pour un double objectif thérapeutique : l'immunosuppression de l'éventuel syndrome de la réponse inflammatoire systémique (SIRS) et l'immunosuppression des réponses immuno-allergiques contre les protéines de cheval, ceci est suivi de l'injection *i.m.* et/ou sous-cutanée de l'IT antiscorpionique à pouvoir neutralisant affiché d'au moins 200 DL₅₀ dans ce cas de la non disponibilité de la formulation *i.v.* [15].

3. Analyse documentaire de l'Immunothérapie antiscorpionique

a. Utilisation de l'IT antiscorpionique.

Le pouvoir neutralisant d'une immunothérapie donnée peut varier selon les lots de fabrication et le producteur ainsi que les espèces de scorpions utilisées dans sa fabrication. L'Institut Pasteur d'Algérie (IPA) fabrique l'IT antiscorpionique IpscCorp® sous un conditionnement de 5 ml par ampoule à injecter en *i.m.*, contenant des fragments d'immunoglobulines F(ab)₂ avec un pouvoir neutralisant affiché de 15DL₅₀ du venin d'*Androctonus australis* dans chaque millilitre. Le pouvoir neutralisant nécessaire dans la prise en charge d'un envenime sévère est de 150 DL₅₀ par voie *i.v.* [16, 17].

Les 4 règles de base de toute IT passive (anciennement appelée sérothérapie) publiées dans la première thèse de Doctorat en médecine sur l'évaluation de l'IT réalisée à Touggourt en 1940 sont : (i) Rapidité d'injection du sérum antiscorpionique, (ii) Fortes doses sans limite supérieure (iii) Répétition d'injection selon l'évolution clinique et non pas selon un intervalle déterminé théoriquement [18]. De ce fait, la précocité de l'administration de l'antivenin est une nécessité évidente, en raison de la pharmacocinétique du venin de scorpion et de sa rapide distribution dans l'organisme. Il n'est cependant pas nécessaire d'administrer des doses élevées d'antivenin puisque la quantité de venin injecté par le scorpion est faible. Le rôle de l'antivenin est de précipiter le venin présent dans le compartiment vasculaire, puis le venin qui y retourne à partir des autres compartiments de l'organisme au fur et à mesure qu'il est éliminé du compartiment vasculaire grâce à l'action de l'antivenin. Ce phénomène de « vase communicant », répondant également à une loi d'action de masse, fonde aujourd'hui le principe de

l'IT. La cinétique des antiscorpioniques a été établie par les travaux de Pépin-Covatta et al. (1996), Sevcik et al. (2007, 2015), Krifi et al. (2005) et Vázquez et al. (2005, 2010) [11, 19-23].

En Algérie, Dr. Lucien Balozet conscient que la concentration plasmatique maximale n'est atteinte qu'au bout de deux jours quand on utilise la voie *i.m* contre une heure seulement par voie *i.v* [15,24,25], préconisait l'injection de grandes quantités, de l'ordre de 60 à 80 mL en *i.m* [26]. Malgré que l'efficacité de la voie *i.m*. dans la prise en charge des ES est souvent mise en question, la non disponibilité d'IT antiscorpionique injectable par voie *i.v* en Algérie ne doit pas être considérée une impasse incontournable.

La règle générale serait : « (i) L'obligation d'identifier l'espèce ou au moins le genre du scorpion, (ii) Identifier les cas d'envenimation sévères par l'association des deux biomarqueurs l'hyperglycémie et l'hyperlymphocytose, (iii) L'injection intraveineuse de 200 mg d'HHC (iv) Aux stades graves, après l'injection des deux premières ampoules qui permettent de vérifier l'absence de réactions allergiques immédiates (20min), l'IT antiscorpionique doit être administrée à fortes doses sans limitation d'intervalles de temps» (Figures 3 & 5).

b. Pouvoir neutralisant de l'IT antiscorpionique

La seule IT antiscorpionique passive disponible dans les établissements de santé en Algérie durant notre travail était l'Ipascorp®. Le grand étendu des populations sahariennes affecte leur prise en charge médicale. La communication écrite de l'information technique et médicale est d'importance capitale surtout dans certaines zones éloignées ou la prise en

charge des PS peut se faire uniquement par le corps paramédical. L'unité préférée dans l'expression et la communication du pouvoir neutralisant est unité conventionnelle de « Dose Efficace Médiane DE₅₀ » telle que définie par Litchfield et Wilcoxon basée sur la détermination du volume de sérum antiscorpionique qui permet d'obtenir 50% de survie chez les souris blanches de 20g [27], sinon, en nombre de DL₅₀ neutralisées par un 1ml comme le faisait Dr. Koubi dans la notice de l'IT de l'IPA dans des années 80s. Notons que la pré-incubation de l'immunothérapie avec le venin de scorpion pour calculer son pouvoir neutralisant génère une surestimation de la DE₅₀ par 100%. A titre d'exemple, une DE₅₀ affichée de 75DL₅₀ possède un

pouvoir neutralisant effectif de 37,5 DL₅₀ [12]. Par ailleurs, la limitation d'utiliser la voie *i.m*. devant tous les scénarios cliniques, même chez les patients présentant des arrêts cardiaques ou des troubles de rythme graves, reste problématique. Les études expérimentales et cliniques des différentes voies d'administration de l'IT ont révélé deux limitations de la voie *i.m*. et la voie sous-cutanée (*s.c*.) comparativement à la voie *i.v*. : (i) la perte de substance active à 75 en *s.c*. et 50% en *i.m*. et d'autre part (ii) le retard de sa biodisponibilité [11]. En somme, la méthode de calcul de la DE₅₀ ainsi que la biodisponibilité médicamenteuse de la voie *i.m*. doivent être expliquées aux thérapeutes pour qu'ils puissent calculer la dose effective qui serait de l'ordre de 25% de du pouvoir neutralisant affiché.

En plus, la notice mentionne que cette IT est active contre d'autre venins mais ne spécifie pas sa potence et sa paraspécificité contre les venins des autres espèces mortelles en Algérie comme le *Buthus tunetanus*, *Leirus quinquestratus* et *Buthacus arenicola* (Figure 3). Les doses mortelles de venins des trois espèces d'intérêt médical en Algérie sont connues depuis 1935 [28].

Nos résultats durant ce travail nous permettent de proposer la conduite suivant le modèle d'Etienne Sergent de l'année 1947 [29,30]. (Voir les détails dans la section « Phase 3 ») :

1. Si le patient présent des signes d'envenimation systémique provoqués par le système parasympathique (hypersudation et/ou vomissements et/ou Hyper-salivation et/ou priapisme) on procède ainsi :

- Injecter de l' HCC en *i.v*. suivi de l'injection intramusculaire de deux ampoules de l'Immunothérapie Ipascorp®, de préférence en une seule injection afin d'assurer une couverture thérapeutique d'un pouvoir neutralisant effective de 37,5 DL₅₀ (voir le calcul de la dose neutralisante dans la figure 3 et sa légende).

Lancer le bilan biologique de la glycémie et le taux de lymphocytes par Numération Formule Sanguine (NFS) et assurer la prise de tension chaque 10 minutes par scope ou tensiomètre manuel avec l'auscultation pulmonaire à la recherche de début d'un OAP (râles crépitants).

2. Si le bilan montre une hyperglycémie et/ou une augmentation de lymphocytes $\geq 4 \times 10^9/L$ (ou $4 \times 10^3/\mu L$), injecter immédiatement deux autres ampoules Ipascorp® (de préférence dans la même seringue). Ainsi, l'intervention thérapeutique assurera une couverture thérapeutique d'un pouvoir neutralisant effectif de $75 DL_{50}$ (voir le calcul de la dose neutralisante dans la figure 3 et sa légende).

3. Si le patient commence à développer une hypotension, préparer la seringue électrique avec la Dobutamine, appeler le médecin réanimateur et injecter deux autres ampoules d'Ipascorp® (de préférence dans la même seringue) pour atteindre l'objectif thérapeutique d'un pouvoir neutralisant effectif de $112,5 DL_{50}$ (voir le calcul de la dose neutralisante dans la figure 3 et sa légende).

4. Si le patient commence à développer un OAP avec pression artérielle conservée ou élevée, préparer les diurétiques par *i.v.*, appeler le médecin réanimateur et injecter deux autres ampoules de l'Ipascorp® (de préférence dans la même seringue) pour atteindre l'objectif thérapeutique d'un pouvoir neutralisant effectif de $112,5 DL_{50}$ (voir le calcul de la dose neutralisante dans la figure 6 et sa légende).

5. Devant les scénarios cliniques catastrophiques chez l'enfant de type arrêt cardiaque ou troubles du rythme grave, ou défaillance hémodynamique grave après 6 heures de l'administration de la Dobutamine à des doses au-delà de $10 \mu g/Kg/min$ les médecins traitants doivent envisager la voie expérimentale parentérale de l'IT antiscorpionique sur un consentement éclairé signé par les parents/tuteurs de l'enfant envenimé tout en considérant que le pouvoir neutralisant effective de chaque ampoule de l'Ipascorp® par cette voie serait $37,5 DL_{50}$.

Pour le stade 2, après avoir stabilisé le patient au niveau des UMC, assurer un monitoring biologique par glycémie et taux de lymphocytes chaque 8 heures. Il ne peut pas être libéré qu'après la normalisation de ces deux biomarqueurs.

Pour le stade 3, après son transfert au niveau du service de réanimation, en plus de l'évaluation régulière par écho-cœur, assurer un monitoring biologique par glycémie et taux de lymphocytes chaque 8 heures afin d'anticiper le phénomène de « vase communicant » qui nécessite le recours à

deux injections supplémentaires de Ipascorp®, de préférence en une seule injection.

Les PS présentant des tableaux typiques de stade 2 ou au niveau des hôpitaux de première ligne doivent recevoir un minimum de 4 ampoules d'Ipascorp® en *i.m.* avant leurs évacuations vers les hôpitaux de deuxième ligne».

Pour des raisons historiques nous citons ci-après la Conduite à suivre (2ème partie) de l'Instruction pour l'emploi du sérum antiscorpionique, Jointe à chaque ampoule de sérum en 1947 [30]:

1. Si les symptômes sont graves d'emblée, injecter, le plus tôt possible après la pique, au minimum 20 centimètres cubes (2 ampoules) de sérum, qu'il s'agisse d'un enfant ou d'un adulte.

Surveiller le malade pendant plusieurs heures. Si les symptômes ne s'amendent pas en moins d'une heure, répéter l'injection aux mêmes doses, et au besoin à plusieurs reprises. Même si l'état du sujet est redevenu normal après la première injection de sérum, surveiller le malade pendant plusieurs heures et se tenir prêt à faire une nouvelle injection de sérum en cas de réapparition des symptômes graves, survenant parfois plusieurs heures après une amélioration trompeuse.

2. Si les symptômes ne sont pas graves d'emblée, tenir en surveillance attentive pendant plusieurs heures la personne piquée, et si les symptômes d'envenimement s'accroissent, agir comme ci-dessus.

3. Même après un long délai après la pique de scorpion (de 9 à 24 heures), le sérum peut agir dans certains cas.

Etape 2 : Revue des expériences des pays ayant réduit fortement la mortalité par scorpionisme

1. L'expérience coloniale en Algérie

Elle constitue la première expérience mondiale réussie contre le scorpionisme et qui était le socle des stratégies des pays ayant réduit fortement la mortalité par scorpionisme, à leur tête l'Arabie Saoudite et le Mexique. L'expérience algérienne coloniale menée par les médecins des Services de Santé Militaire et coordonnée par l'IPA sur les 12 années, du 1936 au 1948 (l'année de la mort du *Dr. Etienne Sergeant*). Sur 3089 observations de PS traitées par l'IT, dont 655 cas mettant la vie en danger et 148 de gravité extrêmes : 592 ont guéris, soit 90,3% de réussite et le taux de réactions allergiques de type 3 (maladie

sérique) était à 2,7%. Le tableau 2 ci-dessous montre les deux premiers essais cliniques du Dr. *Dr. Etienne Sergent* de cette thérapie en Algérie. La recommandation annoncée par le Dr. *Dr. Etienne Sergent* de cette expérience princeps était « les cas de morts étaient dus au non-respect de l'instruction d'emploi de sérum antiscorpionique jointe à chaque ampoule, à savoir injection tardive et/ou doses insuffisantes » [29,31-42].

2. L'expérience saoudienne : de 5% à zéro décès en 1994

Cette expérience a été menée par le pharmacien M. Smail qui avait décidé de créer au début des années 90s un comité national de 11 spécialistes et dont la principale conclusion tirée était « si nous continuons à suivre les recommandations de la notice du fabricant nous n'obtiendrons rien dans le terrain » [43]. L'efficacité de l'IT rapportée par les saoudiens est due aux fortes doses d'antivenin utilisées en plus du changement de la voie d'administration (**Tableau 3**) [43]. Il est important de mentionner que M. Smail, après l'examen des notices des sérums antiscorpioniques (SAS), déclara en 1993 qu'à l'exception de l'Institut Lister (qui a arrêté la production de cette IT antiscorpionique), les informations disponibles dans les notices n'apportent que peu pour le thérapeute car la majorité des cas ne mentionnent pas les DL_{50} des venins de scorpions toxiques sensés être neutralisés, sa signification dans le scorpionisme humain et la quantité d'antivenin nécessaire à injecter [24].

3. L'expérience mexicaine : de 300 à zéro décès par an

Lourival D. Possani et ses collaborateurs ont décidé de donner avant l'année 1994 l'IT passive par voie *i.v.* à 20 293 sur 38 068 patients et aucun patient n'est décédé. Une ampoule de $F(ab)'_2$ neutraliserait 150 DL_{50} des venins scorpioniques mexicains. Cet antivenin est préparé avec du venin de trois espèces différentes de scorpion pour se protéger contre tous les scorpions dangereux du Mexique. Ce miracle mexicain a été réalisé en jouant simultanément sur 4 paramètres de l'IT antiscorpionique : la voie *i.v.*, IT à base de fragments $F(ab)_2$, augmenter la potence de l'ampoule afin de neutraliser 150 DL_{50} et sa polyvalence contre trois espèces différentes (**Tableau 3**) [17].

Toute de même, nous tenons à signaler que ces deux derniers pays ont commencé à enregistrer des décès dans ces deux dernières décennies mais qui restent nettement faibles comparés à la situation algérienne [5, 44].

Etape 3 : Conception et évaluation des solutions scientifiques appliquées à Ouargla

Sur 600 piqués scorpioniques recrutés durant les quatre mois de l'été 2019 (17-06-2020 au 23-10-2019) au niveau de l'EPH Ouargla, seulement 21 ont développé des signes d'ES (une fréquence de 3,5%) dont 9 patients avec complications sévères du système parasympathique (stade 3), soit un pourcentage de 1,5 % qui nécessitait des soins intensifs avec hospitalisation au niveau du service réanimation. Malheureusement 3 de ces 9 patients sont décédés donnant un taux de mortalité de 33,33%. Ce taux reste anormalement élevé comparativement aux résultats obtenus par Etienne Sergent entre 1936 et 1948 en Algérie [29,31-42]. Ceci nous a poussé à réfléchir comment améliorer notre protocole d'intervention chez les ES (**Figure 5**).

Le taux de survie des patients admis en stade 2 était de 100% ce qui est réconfortant pour les thérapeutes car la prise en charge est essentiellement assurée par les médecins sahariens des services UMC.

L'atteinte cardiaque était la principale atteinte chez les envenimés de stade 3 à 77,77 % et cause le décès chez 2/3 des cas critiques (**Tableau 4**). La moyenne de la fraction d'éjection du ventricule gauche (FEVG) chez les patients avec atteinte cardiaque était de $38,2 \pm 2,16$. L'écho-cœur de ces patients révélait des hypo-kinésies régionales de 3 segments ou plus indiquant ainsi que la myocardite ne serait pas l'unique explication de l'atteinte cardiaque dans l'ES mais d'autres étiologies comme l'ischémie d'origine inflammatoire et l'effet des catécholamines sont à envisager dans la recherche pharmacologique et fondamentale. La majorité de nos patients ont gardé des séquelles de FE altérée car ils n'ont pas normalisé leurs FE à J4 et J5 et ont nécessité un suivi et une thérapeutique de l'insuffisance cardiaque. La cardiologie de l'ES chez nos patients fera l'objet d'une publication séparée.

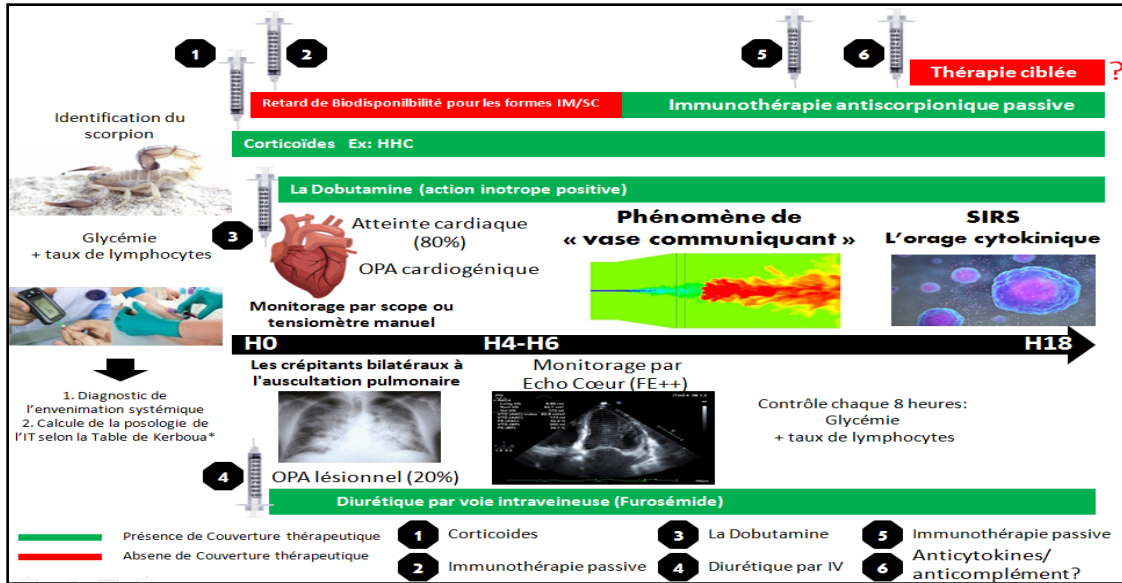


Figure 5 : Principales étapes des interventions thérapeutiques guidées par les biomarqueurs mises au point par notre équipe dans la médecine personnalisée des cas sévères d'envenimation scorpionique.

La figure montre les couvertures thérapeutiques des différentes molécules durant les premières 18 heures critiques dans la prise en charge des envenimés scorpioniques graves en précisant les phénomènes physiopathologiques à l'origine des cibles pharmacologiques. L'absence de la forme galénique en injection intraveineuse de l'immunothérapie passive (IT) provoque un retard de biodisponibilité médicamenteuse de quelques heures augmentant ainsi le délai d'action de l'IT, nous visons dans notre protocole à combler cette absence de couverture thérapeutique par l'injection intraveineuse de la corticothérapie et, selon les cas par certaines drogues à action inotrope positive ou des diurétiques. De même, l'injection intramusculaire de l'IT avec un objectif thérapeutique d'une neutralisation effective de 50 à 150 DL₅₀ pour les patients présentant la symptomatologie du syndrome d'envenimation scorpionique systémique et dont la glycémie et le taux des lymphocytes sont élevés. Le phénomène de « vase communicant » est considéré dans notre protocole en appliquant la loi d'action de masse par l'injection de doses supplémentaires de l'IT une fois le détachement des toxines des tissus et leur recirculation sanguine sont détectés par une élévation de la glycémie et des taux de lymphocytes. Cependant ce même phénomène pourrait être à l'origine du SIRS en cas d'absence de quantité optimale d'anticorps neutralisants dans la circulation du patient. A ce stade, la thérapie expérimentale à base d'anti-IL1/anti-TNFα/anti-IL6 ou thérapie ciblant le système du complément est fortement souhaitable pour sauver le patient devant l'impasse thérapeutique. L'atteinte neurologique n'est rapportée dans cette figure car elle est très rare chez nos patients. H : heure, OAP : œdème pulmonaire aigue, SIRS : Syndrome de la réponse inflammatoire systémique, IM : intramusculaire, SC : sous-cutanée, IT : Immunothérapie, FE : Fraction d'éjection ventriculaire gauche, HHC : l'hémisuccinate d'hydrocortisone. * : voir la figure 3.

Tableau 2 : La situation algérienne avant et après la mise au point de l'IT scorpionique à Bou Saada et à Biskra [31]

Année (s)	Région	Cas sérieux	Morts	Observation
1929-1935	El-Kantara		12	L'immunothérapie antiscorpionique non encore disponible
1936-1937	El-Kantara	51	0	Sauvés grâce à l'immunothérapie antiscorpionique
1932; 1933, 1934	Bou Saada		22	L'immunothérapie antiscorpionique non encore disponible
1936, 1937	Bou Saada	32	01	Sauvés grâce à l'immunothérapie antiscorpionique

L'atteinte pulmonaire non cardiogénique de type OAP lésionnel n'était qu'à 22,2% et ne représentait que 1/3 des causes de décès. L'atteinte neurologique de type convulsion a été signalé chez 33,33% qui est souvent associée à l'hyperthermie alors que le nystagmus n'a été retrouvé que chez 1/9.

Face à la gestion de flux massif des PS (plus d'une dizaine par jour) qui pourrait affaiblir les capacités d'intervention de l'équipe médicale et paramédicale des UMC surtout qu'ils s'occupent des toutes les UMC et non pas des PS seulement, le screening des patients à l'arrivée aux UMC avec le diagnostic fiable de l'ES systémique sont déterminantes pour réussir la prise en charge. A cet effet, nous avons

introduit deux étapes (i) l'identification de scorpion grâce à la « Table de Kerboua » qui permet non seulement d'écartier les cas piqués par des scorpions non mortels mais aussi de déterminer la posologie de l'IT Ipascorp® guidée par l'espèce de scorpion (**Figure 3**) ; (ii) la mise au point de biomarqueurs facilitant le diagnostic de l'ES. En effet, l'application de la courbe ROC a permis d'identifier l'hyperlymphocytose comme indicateur de l'ES systémique. La valeur de $5,5 \cdot 10^9/L$ permet d'identifier les patients nécessitant une prise en charge intensive avec une spécificité de 94,6% et une sensibilité de 75% ($p=0,006$) (**Figure 6**).

Tableau 3 : Résultats des expériences des pays ayant réduit la mortalité par scorpionisme à zéro

Pays	Auteur (s)	Pouvoir neutralisant du sérum (SAS)	patients ayant reçu le SAS (n)	Décès (n)	Conclusions
Mexique	Manuel Dehesa-Davila et Lourival D Possani 1994 [17]	Une ampoule lyophilisée Alacramyn® produit par macérât de glande des 4 espèces de Centruroides F(ab)2 neutralisant 150 DL50	20293	Aucun (00) (alors qu'il était 400-1000/an)	Cette réussite est attribuée à la haute potence du SAS (titres élevés) et sa polyvalence
Arabie Saoudite	Ismail M 1994 [43]	Aumoins 5x1mL des ampoules commercialisées diluées dans 20-50mL de sérum salé injecté doucement en I.V. et répété si nécessaire jusqu'aux 20x1mL	18000 sur 9 mois dans 18 régions sanitaires	Aucun (00)	Résultats impressionnant: de 5% de décès à 00% sauf une fillette de 12 mois chez laquelle on n'a pas suivi le protocole. Cette réussite est expliquée « N'a pas suivi la notice du fabricant »

Tableau 4 : Profile clinico-épidémiologique des patients atteints d'envenimation systémique :

Caractéristiques clinico-épidémiologique	Année 2019 (17-06 au 23-10)	Année 2020 (14-04 au 14-07) *
Stade 2**		
Sexe ratio (M:F)	10 :3	5 :2
Enfant (%)	15,38 (2/13)	42,85 (3/7)
Hypersudation (%)	100 (11/11)	80 (4/5)
Vomissements (%)	54,5 (6/11)	60 (3/5)
Hyperthermie(%)	36,4 (4/11)	20 (1/5)
Hypersalivation(%)	9,1 (1/11)	20 (1/5)
Survie (%)	100	100
Stade 3		
Sexe ratio (M:F)	5 :4	4 :1
Enfant (%)	66,66 (6/9)	40 (2/5)
Atteinte cardiaque (%)	77,77 (7/9)	80 (4/5)
OAP lésionnel (%)	22,2 (2/9)	20 (1/5)
Atteinte neurologique associée (%)	33,3 (3/9)	0
Survie (%)	66,66 (6/9)	80 (4/5)

* l'année de l'introduction de l'IT guidée par les biomarqueurs.** : Données manquantes par absence de dossiers: 2 patients en 2019 et 2 patients en 2020.OAP : œdème aigue pulmonaire ;

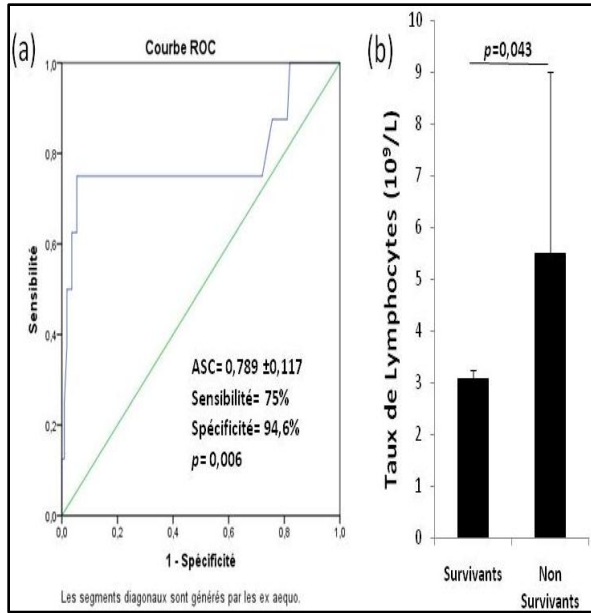


Figure 6 : Valeur clinique des taux de lymphocytes dans le syndrome d'envenimation systémique.

La courbe ROC a été appliquée sur 13 envenimés systémiques et 18 piqués scorpioniques en stade 1. (a) Le taux des lymphocytes $\geq 5,55 \times 10^9/L$ sur un prélèvement initial pris le moment de l'arrivée du patient permet de distinguer le stade 3 avec une Sensibilité de 75% et une Spécificité de 94,6% avec un $p=0,006$. (b) Les non survivants de l'envenimation scorpionique ont des taux élevés de lymphocytes à l'admission comparés aux survivants. ASC : Aire Sous la Courbe.

Nous continuons à améliorer la précision de ce résultat avec le recrutement continu des envenimés durant l'été 2020 à cause des facteurs de confusion comme l'âge du patient, la durée entre la piqure et le prélèvement sanguin ainsi que les antécédents pathologiques de la victime.

Par ailleurs afin de maximiser la fiabilité et la précision du diagnostic biologique de l'ES sévère, nous avons associé l'hyperglycémie, l'indicateur biologique de l'activation du système nerveux autonome, avec l'hyperlymphocytose. Notons que l'hyperglycémie a été retenue comme marqueur de l'ES scorpionique par le Dr Etienne Sergent depuis 1940 [45]. Nous n'avons pas pu l'objectiver chez PS de stade 0/1 alors qu'elle était détectée chez 60% des ES en stade 2 et 73% des patients en stade 3, insinuant que nous pouvons identifier plus de 50% des cas d'ES systémique rien que par un simple test de la glycémie.

Sur la base de ces données une nouvelle conduite a été adoptée pour les cas d'ES systémique au niveau des UMC et du service de réanimation (Figure 5) (voir section Pouvoir neutralisant de l'IT antiscorpionique)

L'introduction de l'intervention thérapeutique guidée par ces biomarqueurs a permis d'augmenter le taux de survie chez les ES critiques (stade 3) à 80% (Tableau 4). Le seul cas de décès durant la période d'étude de 2020 n'est survenu qu'après 4 jours d'une stabilisation parfaite du patient et le décès était provoqué probablement par une défaillance cardiaque provoquée par le phénomène de « vase communicant » après la neutralisation toxinique du compartiment vasculaire et la clearance sanguine des fragments $F(ab)'_2$ (Figure 5). De même la conduite proposée à l'issue de ce travail a pu reconforter l'équipe médicale, paramédicale ainsi que les patients et la population civile de manière spectaculaire surtout avec l'introduction des deux outils de screening, à savoir la l'identification des scorpions et les deux biomarqueurs qui ont nettement améliorer la prise en charge des PS et la communication avec les patients et leurs parents sur la présence ou l'absence de passage de venin dans le compartiment circulatoire et l'absence de gravité pour certains scorpions comme l'*Orthochirus innesi* et le *Scorpio punicus*.

Par ailleurs, aucun cas d'allergie immédiate à l'IT anticorponique (IpscCorp®) n'a été signalé chez les 600 piqués traités et seulement 0,5% (3/600) sont revenus au bout de 24 à 48 heures aux UMC pour des réactions de type rash cutané au niveau de l'avant-bras et un cas au niveau du pied (hypersensibilité retardée à l'antivenin) et qui n'ont nécessité aucun traitement par corticothérapie. Nous signalons un cas d'allergie au venin scorpionique de type rush cutané au niveau de l'avant-bras rapidement réversible sous HCC chez une patiente adulte piquée par le scorpion non mortel *Orthochirus innesi* qui est endémique dans les oasis et les zones agricoles.

Conclusion & Perspectives

L'immunothérapie est le seul traitement étiologique de l'envenimation scorpionique mais son efficacité dépend de la précocité d'injection, la dose et la voie d'administration et la posologie basée sur la répétition d'injection sans limitation de doses ou de temps entre deux injections avec un objectif thérapeutique de neutralisation effective de $75DL_{50}$ (équivalent de 150 à 200 DL_{50} affichée). Chaque pays à risque est dans l'obligation d'établir les DL_{50} des venins de ses scorpions mortels et le pouvoir paraspécifique ainsi que les doses effectives médianes (DE_{50}) de toute immunothérapie utilisée dans le protocole thérapeutique contre les différents

venins de sa faune scorpionique. La persistance de mortalité enregistrée par la stratégie algérienne de lutte contre le scorpionisme serait due essentiellement à l'adoption des approches thérapeutiques non soutenues par des études cliniques contrôlées et de théories scientifiques actualisées.

L'introduction de l'approche organisationnelle de la hiérarchisation des soins médicaux au profit des PS depuis les établissements de santé de première à ceux de deuxième ligne est devenue une nécessité avec un screening des vrais envenimés par le dosage de la glycémie et le taux des lymphocytes afin de réajuster les doses de l'immunothérapie à injecter. De même, l'introduction de la prise en charge orientée par l'espèce de scorpion avec formation du personnel paramédical des services UMC sur l'identification des espèces facilitant ainsi une prise en charge rationnelle et pharmaco-économique. Des travaux scientifiques contrôlés, expérimentaux et cliniques, sont requis pour confirmer la valeur de l'immunothérapie antiscorpionique et réajuster nos protocoles thérapeutiques sur la base des données clinico-biologiques réelles de nos patients en Algérie

Conflits d'intérêt

Tous les auteurs déclarent qu'ils ne reçoivent aucune rémunération ou privilège sur les médicaments ou les organismes cités dans ce papier.

Contribution des auteurs : K.E. K. a mené l'étude et a rédigé l'article ainsi que le calcul de la paraspécificité de l'immunothérapie, les doses létales médianes (DL_{50}) et les doses effectives médianes (DE_{50}); S.D. a fourni l'immunothérapie antiscorpionique brute et pepsinisée; I.S., M.A.H. et E.D. assuraient la prise en charge des envenimés scorpioniques sévères en soins intensifs et fournissaient les données démographiques et clinico-biologiques nécessaires à cette étude; S.E.S. a identifié les individus de scorpions et a fourni l'appareil d'extraction de venin et le matériel de ramassage des scorpions; T.B. a assuré les contraintes des patients piqués scorpioniques; L.A. a organisé la prise en charge des patients au niveau des UMC; I.S., et H.G. ont fait les écho-cœurs chez les envenimés scorpioniques sévères; M.G. a assuré l'enregistrement des renseignements cliniques des patients; M.C. a assuré la conservation des échantillons biologiques durant les gardes; K.D. a supervisé le travail et il a apporté les corrections nécessaires.

Remerciements

Les auteurs de ce travail adressent leurs vifs remerciements à tous les patients et leurs parents pour la participation dans cette étude pilote en Algérie. Nos remerciements s'adressent aussi aux personnels de santé et administration de l'EPH-

Ouargla et celui de la Faculté de Médecine de Ouargla pour leurs précieuses collaborations durant la réalisation de ce travail. Nous tenons à remercier particulièrement : **Le corps paramédical : Service des UMC de l'EPH Ouargla** (Brik asma, Dehbi Thouiba, Tabbal Kaouther, Elhella Youcef, Erramli Noureddine, Korichi Ali, Benhnia Hadjer, Benadji Donia Achouak, Baba-ami said, Benkrima Bouyacer, Bouziane Chaima); **Pharmacie des UMC de l'EPH Ouargla** (Frouhat Ibrahim, Hafsi Abdekader, Benaichaoui Siman, Khanfar Khaled); **Laboratoire des UMC de l'EPH Ouargla** (Sehili safe, Guedoir Khaoula, Abidli Boubaker); **Service de Réanimation de l'EPH Ouargla** (Guenoun Djamel, Benmoussa Mostafa, Bedra Assia, Khemiss Bachir, Tadjine Abdelhak, Akchiche Azzeddine, Zahi Boubaker, Tabbeche Maroua, Badaoui Souhila, Ghueziz Kheira, Bassi Saida, Bourebha Alatra, Boumadda Abderraouf). **Le corps médical : Service des UMC de l'EPH Ouargla** (Dr. Bouafia Karima, Dr. Ait Mansour Houda, Dr. Lamsara Chadia, Dr. Frigaa Ibtissem, Dr. Bedri Houda, Dr. Senani Amra, Dr. Settou Insaf, Dr. Khalifaoui Safa, Dr. Bouchoukh Wafa, Dr. Belatrach Fatima, Dr. Berrai Imane, Dr. Menakh Afaf, Dr. Bouzelague Amira, Dr. Zouad Aicha, Dr. Zeghachou Soumia, Dr. Sedour Zineb, Dr. Zeghichi Afaf, Dr. Larit Khaoula, Dr. Zouad A, Dr. Dr. Lemsara CH, Dr. Lamri A, Benzouada ramla, Dr. Benalia Nassima, Dr. Benachour Marwa, Dr. Msadek Nourelhouda, Dr. Si Merabat Somia, Dr. Belhacine Somia, Dr. Kanfi Imane, Dr. Lahoual Ali, Boulesbaa Mohamed, Dr. Sassi Mounir, Dr. Maameri Abdelfattah, Dr. Lahlal Ali, Dr. Beddiar Rafik); **Service de Réanimation de l'EPH Ouargla** (Dr. Moussaoui Siham, Dr. Abdelmalek, Dr. Douech, Dr. Bensassi); **La Faculté de Médecine de l'Université de Ouargla** et à leurs têtes Monsieur le Doyen le Professeur Echahma Abdel Madjid, le vice-doyen Lyes Bradai, le secrétaire général Anis et le chef des moyens généraux Rabhi; **la bibliothèque de l'Institut Pasteur d'Algérie** et à leur tête madame Ait Ouamer et mademoiselle Sonia; **Laboratoire de Médecine Saharienne** de la Faculté de Médecine de l'Université de Ouargla : toutes les étudiantes et à leur tête Benchikh Asma; **Les étudiants en quatrième année** de médecine de l'année 2019-2020; **L'Annexe Pasteur-Ouargla** : l'agent d'extraction du venin Mr. Mohammed Ali.

Financement

La Direction Générale de la Recherche Scientifique et du Développement Technologique (DGRSDT)

Références

1. Sergent, E.(1934) Venin de scorpion dans le chapitre Envenimement, Notice sur l'Institut Pasteur d'Algérie. Tome I: *Recherches scientifiques, enseignement et missions, applications pratiques. 1900-1934, Edition: Imprimerie La Typo-Litho & Jules Carbonel Réunies, Alger, 119*
2. Sergent, E. et Parrot, P. (1964) Envenimements (Venin de scorpion) in Apport de de l'Institut Pasteur d'Algérie à la connaissance humaine du Sahara (1900-1960). Edition J. Fiasson
3. Brosselard, M.H. (1889) Les deux missions Flatters au pays des Touareg Azdjer et Hoggar (2e éd.) édition Jouvet et G^{le}, Paris, 32-34
4. Hellal, H., Guerinik, M., Griene, L., Laid, Y., Mesbah, S., Merad, R., Alamir, B. (2012). Données épidémiologiques sur l'envenimation scorpionique en Algérie, *Bull. Soc. Pathol. Exot.*,105, 189-19
5. Chippaux, J.P. (2012). Emerging options for the management of scorpion stings. *Drug Des Devel Ther.*,6:165-173
6. Glenn, W.G., Whittemore, W., Lieut.-Col. Kreegan, H.L. (1962). Intergeneric Relationships among Various Scorpion Venoms and Antivenins, *Science*, 434-435
7. Whittemore, W., Lieut.-Col. Kreegan, H.L., Borowitz, JI. (1961). Studies of scorpion antivenins. 1. Paraspecificity. *Bull. World Health. Organ.*25,185-8
8. Balozet, L. (1971). Scorpionism in the Old World, Chapter 56 -Venomous Animals and their Venoms, *Venomous Invertebrates*, Edition Academic Press, 971, 349-371
9. Delori, P, Van Riets~Hoten, T., Rochat, H. (1981). Scorpion Venoms And Neurotoxins: An Immunological Study, *Toxicon*, 393,107
10. Goyffon, M. (1984). Scorpionisme et sérums antiscorpioniques *Revue Arachnologique*, 5, 4,311-319
11. Vázquez, H., Olvera, F., Paniagua-Solís, J., Alagón, A, Sevcik, C. (2010). Pharmacokinetics in rabbits and anti-sphingomyelinase D neutralizing power of Fab, F(ab')(2), IgG and IgG(T) fragments from hyper immune equine plasma. *Int Immunopharmacol.*10, 4, 447-454
12. Krifi, MN., Ayeb, ME., Dellagi, K. (1996) New procedures and parameters for better evaluation of *Androctonus Australis garzonii* (Aag) and *Buthus occitanus tunetanus* (Bot) scorpion envenomations and specific serotherapy treatment. *Toxicon.* 34, 2, 257-66
13. El Ayeb, M., Bahraoui, EM., Granier, C., Delori, P., Van Rietschoten, J., Rochat, H. (1984). Immunochemistry of scorpion alpha-toxins: purification and characterization of two functionally independent IgG populations raised against toxin II of *Androctonus australis Hector*. *Mol Immunol.* 21, 3, 223-232
14. H.Laustsen,A., Gutiérrez, J.M., Knudsen, C., Johansen, K. H., Bermúdez-Méndez,E.; Jürgensen, J.A.; Ledsgaard,L ; Martos-Esteban,A.; Øhlenschläger, M.; R.Andersen, M.; Lomonte, B. ; Engmark, M. ; Pucca, M. B. (2018).Pros and cons of different therapeutic antibody formats for recombinant antivenom development, *Toxicon.* 146, 151-175
15. Saganuwan S.A. (2018). Determination of median effective dose (ED50) of scorpion antivenom against scorpion envenomation using a newly developed formula. *Animal models and experimental medicine*, 1(3), 228–234
16. Lien de l'Instruction ministérielle : <http://www.sante.gov.dz/images/Prevention/Instruccion-n-06-du-07.05.2020-relative--la-prvention-et--la-prise-en-charge-des-cas-denvenimation-scorpionique---Campagne-2020-.pdf> (Consulté le 16-07-2020)
17. Dehesa, M., Possani, D. (1994). Scorpionism and serotherapy in Mexico, *Toxicon*, (32) 9, 1015–101
18. Chaix, E. (1940) Les envenimements par piqûres de Scorpions dans l'annexe de Touggourt; intérêt de la sérothérapie (Alger : 1-46) (Thèse Faculté de Médecine)
19. Pépin-Covatta, S., Lutsch, C., Grandgeorge, M., Lang, J., Scherrmann, JM. (1996). Immunoreactivity and pharmacokinetics of

- horse anti-scorpion venom F(ab')₂-scorpion venom interactions. *Toxicol Appl Pharmacol.*141(1):272-277
20. Sevcik, C., Salazar, V., Díaz, P., D'Suze, G. (2007). Initial volume of a drug before it reaches the volume of distribution: pharmacokinetics of F(ab')₂ antivenoms and other drugs. *Toxicon.* 50(5):653-665
 21. Krifi, MN., Savin, S., Debray, M., Bon, C., El Ayeb, M., Choumet, V. (2005). Pharmacokinetic studies of scorpion venom before and after antivenom immunotherapy. *Toxicon.*;45(2):187-198
 22. Vázquez, H., Chávez-Haro, A., García-Ubbelohde, W., Mancilla-Nava, R., Paniagua-Solís, J., Alagón, A., Sevcik, C. (2005). Pharmacokinetics of a F(ab')₂ scorpion antivenom in healthy human volunteers. *Toxicon.* 46, 797-805
 23. Sevcik, C. and D'Suze, A. (2015). New Insights on the Pharmacokinetics of Venoms and Antivenoms. In: Gopalakrishnakone P., Possani L., F. Schwartz E., Rodríguez de la Vega R. (eds) *Scorpion Venoms. Toxinology*, 4. Springer, Dordrecht
 24. Ismail, M., Abd-Elsalam, MA., Al-Ahaidib, MS. (1998). Pharmacokinetics of ¹²⁵I-labelled *Walterinnesia aegyptia* venom and its distribution of the venom and its toxin versus slow absorption and distribution of IGG, F(AB')₂ and F(AB) of the antivenin. *Toxicon.* 36, 93-114
 25. El-Asheer, OM., Hammad, E.E.M., Mohamad, IL., Saad, K., Aziz, NA. (2019). A randomized comparative study between intravenous and intramuscular scorpion antivenom regimens in children. *Toxicon.* 159, 45-49
 26. Balozet, L. (1955). Venins de scorpions et sérum antiscorpionique [Scorpion venoms and antiscorpion serums]. *Arch Inst Pasteur Alger.* 33(2):90-100
 27. Litchfield and Wilcoxon, A. (1949). simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 96, 99-113
 28. Sergent, E. (1935). Etude du venin des scorpions d'Algérie (Doses minima mortelles pour les animaux de laboratoires). *Arch. Inst. Pasteur d'Algérie.* (13) 1, 39-41
 29. Sergent, E. (1940). Sérothérapie antiscorpionique (Quatrième note) Nouvelles observations de l'année 1940, *Arch. Inst. Pasteur d'Algérie.*19, 291-303
 30. Sergent, Ed. (1949). Envenimements et intoxication (Toxicité du venin des différents scorpions nord-africains), Notice sur l'Institut Pasteur d'Algérie. Tome II: Recherches scientifiques, enseignement et missions, applications pratiques. 1935-1949, Edition: Imprimerie La Typo-Litho & Jules Carbonel Réunion, Alger. 287-304
 31. Sergent, E. (1938). Venin de scorpion et sérum antiscorpionique. *Arch. Inst. Pasteur d'Algérie.* (14) 3, 258-277
 32. Sergent, E. (1938). Sérum antiscorpionique (Note préliminaire). *Bull/ Acad. Med.* 119, 9, 254-257
 33. Sergent, E. (1939). Sérothérapie antiscorpionique (Deuxième note) Nouvelles observations (1937), *Arch. Inst. Pasteur d'Algérie.* 17,3, 412-419
 34. Sergent, E. (1940). Sérothérapie antiscorpionique (Troisième note) Nouvelles observations (1938), *Arch. Inst. Pasteur d'Algérie.* 18,2, 248-274
 35. Sergent, E. (1942). Sérothérapie antiscorpionique (Cinquième note) Observations reçues pendant l'année 1941, *Arch. Inst. Pasteur d'Algérie.* 20, 117-212
 36. Sergent, E. (1943). Sérothérapie antiscorpionique (Sixième note) Observations médicales reçues pendant l'année 1942, *Arch. Inst. Pasteur d'Algérie.* 21,3, 186-202
 37. Sergent, E. (1944). Sérothérapie antiscorpionique (Septième note) Observations médicales reçues pendant l'année 1943, *Arch. Inst. Pasteur d'Algérie.* 22,1, 18-39
 38. Sergent, E. (1945). Sérothérapie antiscorpionique (Huitième note) Observations médicales reçues pendant l'année 1944, *Arch. Inst. Pasteur d'Algérie.* 23,2, 111-114

39. Sergent, E. (1946). Sérothérapie antiscorpionique (Neuvième note) Observations médicales reçues pendant l'année 1945, Arch. Inst. Pasteur d'Algérie. 24,2, 112-115
40. Sergent, E. (1947). Sérothérapie antiscorpionique (Dixième note) Observations médicales reçues pendant l'année 1946, Arch. Inst. Pasteur d'Algérie. 25,2, 94-97
41. Sergent, E. (1948). Sérothérapie antiscorpionique (Onzième note) Observations médicales reçues pendant l'année 1947, Arch. Inst. Pasteur d'Algérie. 26,3, 256-258
42. Sergent, E. (in memoriam) (1949) -Douze années de sérothérapie antiscorpionique. Arch.
43. Inst. Pasteur., 76,1, 50-52.- Document algérien (Service information du cabinet du Gouverneur Général de l'Algérie) Série sociale, N°31 du 25 mai 1950
44. Ismail, M. (1994). The treatment of the scorpion envenoming syndrome, the saudi experience with serotherapy, Toxicon. 32, 1019-1026
45. Chippaux, J.P. and Goyffon, M. (2008). Epidemiology of scorpionism: a global appraisal. Acta. Trop.107(2):71-79
46. Sergent, E. (1940). Recherches sur la glycémie chez les cobays envenimés par le venin de scorpion. Arch. Inst. Pasteur d'Algérie, (18) 2, 239-247.



En ligne
<https://www.atrss.dz/ajhs>



Review

Immunotherapies and Nano-vectorization: New Trends on Scorpion Envenomation Treatments

Immunothérapies et Nanovectorisation : Nouvelles Perspectives pour le Traitement Antiscorpionique

Nait mohamed Faez Amokrane, Laraba-Djebari Fatima*

¹USTHB, Faculty of Biological Sciences, Laboratory of Cellular and Molecular Biology, BP 32 El-Alia, Bab Ezzouar, Algiers, Algeria.

ABSTRACT

Scorpion envenomation is a real medical emergency and life hazard in many countries of the world, especially in rural tropical areas of Africa, Asia and America. Children and elderly are the most affected persons. In this non exhaustive report, we present recent contributions in the scorpion envenomation treatments. From recent advances of antivenom immunotherapy, an immunopreventive treatment combined with immunotherapy could be for interest, since envenomation remains an important health problem. Venom neurotoxins (3-7 kDa) can easily diffuse in tissues and blood circulation and their rapid action on ions channels of excitable cells lead to the dangerous pathophysiology of scorpion envenomation. According to the small molecular weight, their vectorization with biocompatible nanoparticles to antigen presenting cells could induce a protective immunity against scorpion envenomation. The present review will report the latest development of clinical and experimental scorpion immunotherapies as well as approaches using nanoparticles as vectors, to improve the classical immunotherapy and vaccine protocols against venoms or toxins.

KEYWORDS: scorpion envenomation, treatments, nanoparticles, vector, biocompatibility.

RESUME

L'envenimation scorpionique est une urgence médicale dans de nombreuses régions tropicales and subtropicales, notamment en Afrique, Asie et Amérique latine. Les enfants ainsi que les personnes âgées sont les personnes les plus vulnérables. Dans cet article de synthèse, nous relaterons un certain nombre de contribution en rapport avec l'optimisation des traitements de l'envenimation scorpionique. Compte tenu des résultats prometteurs portant sur l'amélioration de l'efficacité de l'immunothérapie antivenimeuse, l'immunoprevention serait d'un grand apport aussi bien dans la prévention des personnes des régions à haut risque, ce traitement pourrait être aussi associé à l'immunothérapie. L'apport de la nanovectorisation utilisant des vecteurs biocompatibles spécifiques aux cellules immunitaires pourrait induire une immunoprotection efficace contre la physiopathologie induite par les venins de scorpions. La présente revue discutera des dernières avancées en matière d'immunothérapies antiscorpionique ainsi que des études récentes utilisant des nanoparticules comme vecteurs spécifiques, visant à améliorer l'immunothérapie classique mais aussi des protocoles vaccinaux contre les venins ou les toxines.

MOTS CLES : envenimation scorpionique, traitements, nanoparticules, vecteur, biocompatibilité



1. Introduction

Nanotechnology is an expanding field, which includes the development of human-made materials in the 10–200 nanometer size range. This reduced scale results in significant changes of typical physical and chemical properties of materials, makes them very attractive for novel and innovative applications in various fields. Nanotechnology has been employed in medicine for therapeutic drug delivery and development of several treatments for various diseases and biological disorders. Indeed, nanomaterials have been used successfully in magnetic and fluorescent bioimaging, as carriers for drugs, and even as medicines themselves (e.g., antimicrobial agents).

Scorpion envenomation is a severe syndrome which lead to a complex pathogenesis causing important morbidity and mortality in Maghreb regions [1,2]. The toxicity of scorpion venoms is mainly due to their neurotoxins that can bind to the sodium voltage-gated channels thus causing multi-organs failure and death [3-5]. Specific immunotherapy associated with symptomatic treatments according to the degree of severity remains the currently used approach to treat stung patients. The efficiency of this immunotherapy against scorpion envenomation presents some limits due mainly to the delay taking between the sting and the antivenom administration to patients of at-risk regions. For this reason, many experimental immunotherapies using next generation of antibodies are in development to improve the existing therapy.

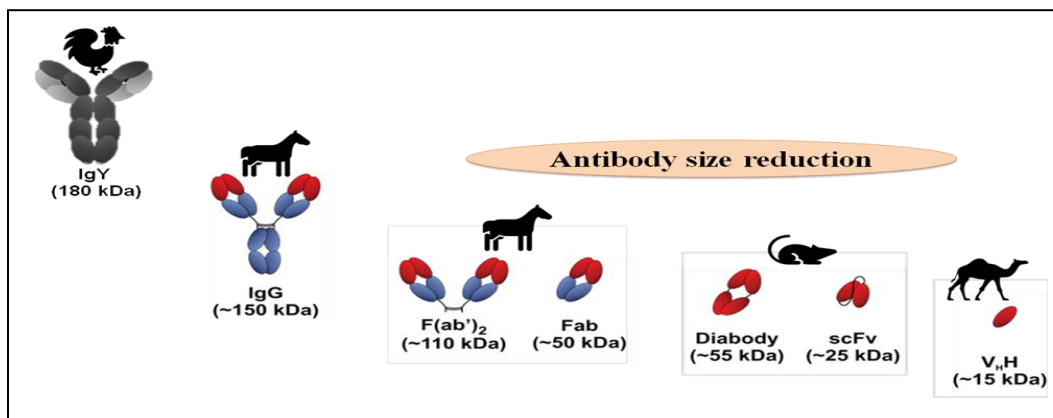


Figure 1: Antibody engineering (according to Laustsen et al., 2018)

IgY: chicken IgY antibody. IgG: whole IgG antibody. F(ab')₂: pepsin-digested IgG antigen-specific region. Fab: papain-digested antigen-specific region. Diabody: non-covalent dimers of scFv fragments. scFv: single-chain variable fragments. V_H: single-domain antigen-

2. Specific antivenom immunotherapies

1.1. Classical immunotherapy

Passive immunotherapy (or classical immunotherapy) is right now the only specific treatment against scorpion stings. It is based on the acquisition of specific immunity induced in equine animal producers after repeated administration of the venom. The first produced scorpion antiserum was produced by Todd in 1909 in Cairo [6]. In Algeria, Dr Etienne Sergent made many efforts about classical immune therapy by removing animal proteins such as albumin

in order to obtain a less immunogenic products and to increase human compatibility or tolerance [7]. The improvement of the classical immunotherapy efficacy could be based on the optimization of immunization protocols, considering the type of antigen (venom vs. toxins), adjuvant type, immunization dose and its frequency and animal choice (horse vs. camelid, sheeps or chicken) [8,9]. In 1998, Laraba-Djebari and 74Hammoudi used the toxic fraction FtoxG50 isolated from the whole venom of *Androctonus australis hector* as antigen and the neutralizing properties of antibodies appeared to be higher after animal immunization with multiple injections of

toxic fraction than those obtained with the whole venom [10]. High toxicity of the venom and its toxic fraction could also limit the efficiency of immune serum preparation. Animal producers may have chronic injuries due to the toxic administration during the immunization schedule having an impact on the quality and efficiency of the antivenoms [2].

For this purpose, attenuation of antigens to lower its toxicity and enhance its immunogenicity was tested. Immunization with attenuated *Aah* venom by gamma irradiation assayed in mice yielded immunoprotection against 10 lethal doses 50,6 months after the last immunization [11]. The choice of the used adjuvants in immunization protocols is also an important factor to be considered. The use of saponin as an alternative to Freund's complete adjuvant, lead to important specific neutralizing antibody titers in rabbits, with fewer local reactogenicity [8].

The choice of neutralizing molecule in scorpion envenomation treatment is also important to improve the classical immunotherapy. To better neutralize the small components of venoms such as neurotoxins (60-70 kDa) and to reduce reactogenicity, produced equine IgG (150 kDa) were hydrolyzed by pepsin to obtain F(ab')₂ (110 kDa) or by papain to obtain Fab (50 kDa) (Figure 1). The effectiveness of antibodies is linked to their neutralizing capacity but also to their tolerance and their pharmacokinetic. Several factors such as the antibody form, the route of injection and the time delay before their administration can limit the clinical efficacy of this specific treatment [4]. The effects of different antibody forms Fab, F(ab')₂ fragments or their synergistic action were also tested in order to enhance the efficacy of immunotherapy against *Aah* scorpion venom [12,13].

The efficiency of these preparations were tested against the venom of *Androctonus australis hector* (*Aah*), its whole toxic fraction FToxG50 or its main toxin *Aah II*, Pathohistological analyses demonstrated that treatment with a mixture of Fab and F(ab')₂ was the more effective treatment, in terms of inhibiting myocardial and pulmonary damage (hemorrhage, interstitial and intra-alveolar edema, leukocyte infiltration). This study reports that immunotherapy was significantly improved when the mixture of the two antibody fragments was tested [13]. The development of next generation immunotherapies, more effective than the classical one, is needed to improve patient care [14].

2.2. Recombinant antibodies, nanobodies and immunotherapy advances

Different experimental approaches undertaken in mice have been considered to improve the existing immunotherapy. The expression of isolated toxins from scorpion venom has been performed in different systems to improve and design a possible recombinant antibody (Ab). Several recombinant antibodies were generated in order to neutralize toxin *Aah II* of *Androctonus australis hector* [15]. Synthetic peptides mimicking *Aah II* toxin or *TsV II* toxin of scorpion venoms used to immunize animals, lead to neutralizing antibodies, but with very low titers [16,17].

Despite the neutralizing potential of the recombinant antibodies, their therapeutic importance was diminished by their murine origin. New forms of molecules (rFab, scFv) have also been developed for therapeutic use. The structures of small fragments scFv (monomeric, dimeric, trimeric, and tetrameric) are formed by two variable domains (VL and VH) of immunoglobulin, these molecules showed pharmacological and biological activities similar to the initial antibody both *in-vitro* and *in-vivo* [18]. The use of natural toxoid (*Amm VIII* from *Androctonus mauretanicus/mauretanicus* venom) to induce neutralizing antibodies against most scorpion venom toxins, particularly *Aah II* toxin lead to an immunoprotective effect in mice up to 42 LD 50 against this toxin [19].

KAah 1, a natural peptide isolated from *Aah* venom is able to induce the production of specific antibodies having cross-reactivity with *Aah II* toxin and can neutralize up to 5 LD 50 of *Aah* venom toxic fraction FtoxG50 [20].

Experimental nanobodies (Nbs) produced in hyper immunized camels, have been also introduced to neutralize *Androctonus australis hector* venom. The bispecific Nb (NbF12-10) seemed to be more efficient against scorpion envenoming in preclinical studies than classic based therapy [21]. NbF12-10 was designed against *Aah I/Aah II* toxins. A subsequent intravenous injection of 85 µg of NbF12-10 protected all mice subcutaneously injected with a lethal dose of *Aah* venom (32.4 µg of crude venom/20 g of mice). However, *in-vivo* monitoring of radiolabeled nanobodies and F(ab')₂ fragments revealed that the nanobody-based molecules were cleared from blood faster than the F(ab')₂ antivenom due to the lower molecular mass of nanobodies. Moreover, a major difference was observed in the

organ accumulation of antibodies. Monovalent nanobodies and the bispecific construct accumulated mainly in the kidneys, whereas F(ab')₂ fragments were predominantly retained in the liver [22,23].

2.3. Chicken immunoglobulin (IgY)

Three immunoglobulin classes, analogues to the mammalian immunoglobulin classes have been shown to exist in chicken, IgA, IgM and IgY (IgG). [24,25]. IgY is the major low molecular weight serum immunoglobulin in oviparous (egg laying) animals [26]. The overall structure of IgY is similar

to the mammalian IgG, with two light (L) and two heavy (H) chains. The use of IgY as an alternative antivenom has been proposed since 1990 [27]. More recently, an efficient and purified IgY antivenom against *Aah* scorpion venom was produced in laying hens characterized by an inability to react with mammalian complement make them an attractive alternative to equine antivenoms [9]. The optimization and the improvement of a preventive treatment such as vaccine against the pathophysiology induced by scorpion envenomation remains a real challenge. Research and assessment of new adjuvants that can boost the immunogenicity of scorpion venom antigens is nowadays envisaged [8,28-30]

Table 1: Recent studies highlighting some nanovectors delivery against various antigens

Nanovector	Antigen agent	Antigen formulation	Experimental model	Reference
Calcium alginate	<i>Aah</i> venom	Encapsulation	Mice, Rabbits	Nait Mohamed and Laraba-Djebari, 2016
Poly (D, L-lactide)	<i>Aah, Bot</i> venom	Encapsulation	Mice	Ayari-Riyabi et al., 2016
Bacterial Ghosts	Tumor antigens	Encapsulation	Dendritic Cells	Dobrovolskienė et al., 2018
Bacterial Ghosts	<i>Acinetobacter baumannii</i> antigens	Encapsulation	Mice	Pulido et al., 2018
Silver Nps	<i>Bothrops jararacussu</i> venom	Adsorption	Prokaryotic cells	Oliveira et al., 2019
PEGylated GNP	NKCT1 toxin	Adsorption	Human Myelogenous Leukemic Cells	Bhowmik et al., 2013
PLGA-Dopamin	BSA	Conjugation	RAW 264.7 cells	Lee et al., 2017
Fe-amine-functionalized PEG	CTX	Conjugation	Human Tumors cells	Veisich et al., 2009

3. Preclinical vaccine approach

One of the first experiments based on the use of scorpion *Centruroides noxius* venom detoxified by chemical modification (glutaraldehyde polymerization) was performed [31].

The use of detoxified venom of *C. noxius* led to the protection of rabbits against 50 LD 50 of the toxic fraction of the crude venom of *C. noxius* (1 LD 50 : 0.26 mg/kg); however the time and the effectiveness of the protection were limited. Other studies report the attenuation of the venom toxicity by entrapping it in liposomes [32]. The detoxification of *A. australis* venom using γ -radiation mixed with Alum adjuvant was also performed and led to a substantial reduction in the venom toxicity (LD 50 25 times higher than the LD 50 value obtained with untreated venom) with an important middle-term

immunoprotection against 4 LD 50 in mice [28]. The immunization with irradiated *Aah* venom associated with Alum induces a low inflammatory response without any major adverse effects.

This safe formulation presents also the same immunoprotective effect against scorpion envenomation [30]. An effective immune response activation is also observed when the oil-in-water adjuvant MF59, was associated with *Aah* venom, leading to a best specific immune response compared to Alum adjuvant [8,29]. To better target specific immune cells like dendritic cells, nanovectors were recently used as specific antigen delivery systems. Designing a nanovector for antigen delivery presents both theoretical and practical challenges. Nanoparticles (Nps) must be nontoxic, biocompatible, vectorize a large amount of antigen

with a high affinity for the targeted tissues. They have to cross biological barriers and protect the antigens until their site of action [33]. Biodegradable particles have great potential for application as vectors of biologically active molecules. Encapsulated antigens have been shown to have good potential for system release and adjuvating (Table 1). These particles allow to the controlled release of the

antigen that can reduce the number of immunization doses or develop single-dose vaccines [34]. Natural polymeric nanoparticles such as calcium alginate or chitosan, are able to: i) stabilize the antigens by protecting them from the biological environment; ii) increase their bioavailability; iii) improve the targeting of antigen presenting cells (APCs), mainly the dendritic cells [35,36]. Encapsulated scorpion

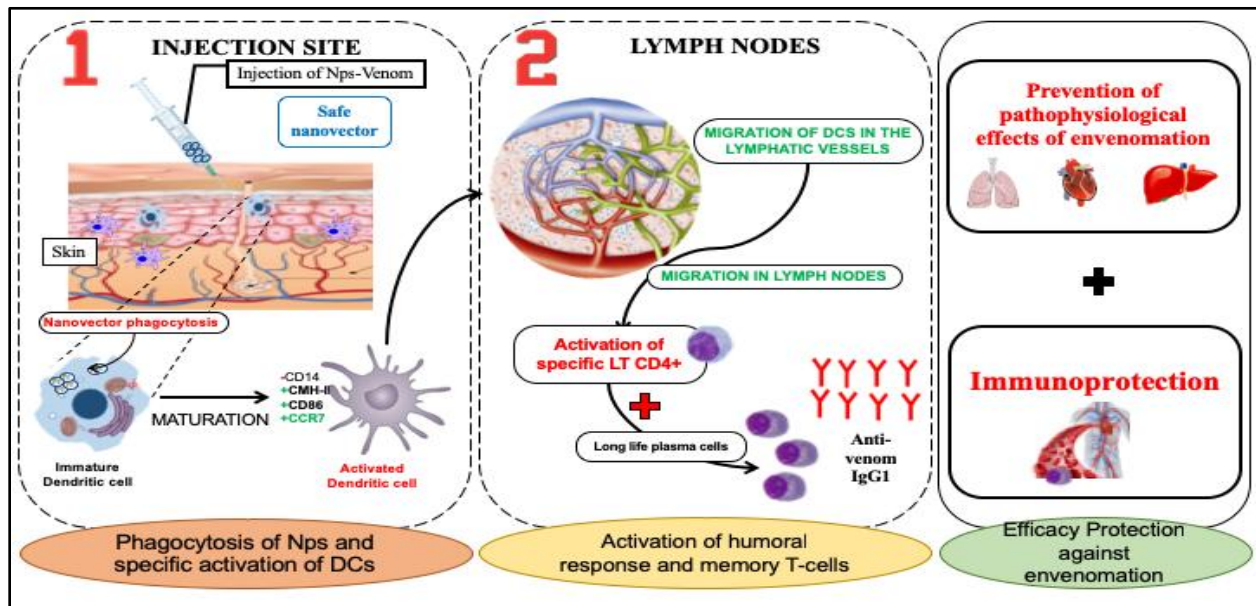


Figure 2: Induced immune response after nanovector phagocytosis for immunoprotection (Smith et al., 2013, Heath et al., 2013, Nait Mohamed and Laraba-Djebari. 2016)

Tityusserrulatus venom in sphingomyelin-cholesterol liposomes and their use in murine immunization yield to specific antibodies with high protection [37]. Immunization of mice with encapsulated *T. serrulatus* scorpion venom lead to a protective effect against toxic fraction *Tst*-G50 up to 3 LD50 [38]. The Animal immunization with encapsulated *Androctonus australis hector* venom in calcium-alginate or poly (D, L-lactide) polymer nanoparticles used vectors induced a strong and efficient antigen delivery [39-41]. Once injected subcutaneously, the synthesized nanoformulations encapsulating irradiated *Aah* venom were phagocytized by the dendritic cells and then activated and migrated into the lymph nodes. The activation of venom-specific LT CD4+ induces the formation of high-affinity memory and long-lived circulating plasma cells and specific synthesis of IgG1. This innovative vaccine protocol allowed to a strong effective

immunoprotection up to 6 LD 50 of *Aah* venom, preventing pathophysiological effects caused in the heart, liver and lungs by the envenomation [41-43], Figure 2). *T. serrulatus* venom-loaded in chitosan nanoparticles seems to successfully mimicking the slow protein release identified for the BSA-loaded hitosan nanoparticles. The released *T. serrulatus* venom depended on the venom loading, displaying the flexibility and feasibility of these particles to modulate the antigen delivery. The nanoconjugation of scorpion toxins such as chlorotoxin (CTX) isolated from *Leiurus quinquestriatus* scorpion venom with an amine-functionalized polysilane and super magnetic iron oxide nanoparticles preferentially binds to glioma cells, as compared with non-neoplastic cells or normal brain cells [44]. Moreover, the CTX-conjugates deactivated membrane-bound MMP2 and caused an increase in the internalization of lipid rafts.

Conclusion

Immunotherapy as a specific treatment is recommended after scorpion stings in most at-risk regions. However, to be more efficient, this therapy needs to be improved, optimized, and standardized considering its limitations (delay, antibody format, soluble or freeze-dried, dose, route of injection). Therefore, nanovectorization could be a promising alternative not only to enhance classical immunotherapy but also as an active immunotherapy for developing a long lasting protection against scorpion envenomation in at risk regions.

Funding

This research did not receive any external funding.

Conflicts of interest

Authors do not declare any conflict of interest.

References

- Goyffon, M. (2002). Le scorpionisme. *Rev. Française des Lab*, 2: 41–48
- Laraba-Djebari, F., Adi-Bessalem, S., Hammoudi-Triki, D. (2015). Scorpion Venoms: Pathogenesis and Biotherapies. *Scorpion Venoms Springer*, 63–85
- Chippaux, J.P., Goyffon, M. (2008). Epidemiology of scorpionism: A global appraisal. *Acta. Trop.* 107, 71–79
- Hammoudi-Triki, D., Ferquel, E., Robbe-Vincent, A., Bon, C., Choumet, V., Laraba-Djebari, F. (2004). Epidemiological data, clinical admission gradation and biological quantification by ELISA of scorpion envenomations in Algeria: effect of immunotherapy. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 98, 240–250
- Bahloul, M., Chaari, A., Dammak, H., Samet, M., Chtara, K., Chelly, H., Ben Hamida, C., Kallel, H., Bouaziz, M. (2013). Pulmonary edema following scorpion envenomation: Mechanisms, clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Int. J. Cardiol.*, 162, 86–91
- Todd, C. (1909). An anti-serum for scorpion venom. *J. Hyg. (Lond)*, 9, 69–85
- Sergent E. (1938). Venin de scorpion et sérum antiscorpionique. *Arch Inst Pasteur d'Algérie*
- Nouri, A., Nait Mohamed, F.A., Laraba-Djebari, F. (2018). New and safe formulation for scorpion immunotherapy: Comparative study between saponin and FCA adjuvants associated to attenuated venom. *Vaccine*. 1.
- Sifi, A., Adi-Bessalem, S., Laraba-Djebari, F. (2018). Development of a new approach of immunotherapy against scorpion envenoming: Avian IgYs an alternative to equine IgGs. *Int. Immunopharmacol.*, 61, 256–265
- Laraba-Djebari, F., Hammoudi, D. (1998). Use of toxic fraction isolated from Algerian *Androctonus australis hector* scorpion venom for the assessment of anti-venom serum. *Arch. Inst. Pasteur d'Algerie*, 62, 254–66
- Abib, L., Laraba-Djebari, F. (2003). Effect of gamma irradiation on toxicity and immunogenicity of *Androctonus australis hector* venom. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 81, 1118–1124
- Laraba-Djebari, F., Hammoudi-Triki, D. (1999). Purification Et Caracterisation Des Fragments F(Ab')₂ a Partir D'Un Serum Anti-Scorpionique Isolation and Characterization of F(Ab₄)₂ From an Anti- Venom of Scorpion. *Arch. Inst. Past. Algerie*, 63
- Sami-Merah, S., Hammoudi-Triki, D., Martin-Eauclaire, M.-F. (2008). Laraba-Djebari, F. Combination of two antibody fragments F(ab')₂/Fab: An alternative for scorpion envenoming treatment. *Int. Immunopharmacol.* 8, 1386–1394
- Martin-Eauclaire, M.-F., Adi-Bessalem, S., Hammoudi-Triki, D., Laraba-Djebari, F., Bougis, P.E. (2019). Serotherapy against Voltage-Gated Sodium Channel-Targeting α Toxins from *Androctonus Scorpion* Venom. *Toxins (Basel)*, 11, 63
- Bahraoui, E., Pichon, J., Muller, J.M., Darbon, H., Elayeb, M., Granier, C., Marvaldi, J., Rochat, H. (1988). Monoclonal antibodies to scorpion toxins. Characterization and molecular mechanisms of neutralization. *J. Immunol.*, 141, 214–220
- Bahraoui, E., Granier, C. (1986). Specificity and neutralizing capacity of antibodies elicited by a synthetic peptide of scorpion toxin. *J. Immunol.*

136(9):3371-7

17. Alvarenga, L., Diniz, C., Granier, C. (2002). Induction of neutralizing antibodies against Tityus serrulatus scorpion toxins by immunization with a mixture of defined synthetic epitopes. *Toxicon*, 40(1):89-95
18. Mousli, M., Devaux, C., Rochat, H., Goyffon, M., Billiald, P. (1999). A recombinant single-chain antibody fragment that neutralizes toxin II from the venom of the scorpion *Androctonus australis hector*. *FEBS Lett.*, 442, 183–188
19. Alami, M., Céard, B., Legros, C., Bougis, P. (2006). Genomic characterisation of the toxin Amm VIII from the scorpion *Androctonus mauretanicus mauretanicus*. *Toxicon*, 47(5):531-6
20. Srairi-Abid, N., Kaabi, H., Mlayah-Bellalouna, S., Mejri, T. (2008). Immunological characterization of a non-toxic peptide conferring protection against the toxic fraction (AahG50) of the *Androctonus australis hector* venom. *Toxicon*
21. Hmila, I., Saerens, D., Abderrazek, R. Ben, Vincke, C., Abidi, N., Benlasfar, Z., Govaert, J., El Ayeb, M., Bouhaouala-Zahar, B., Muyldermans, S. (2010). A bispecific nanobody to provide full protection against lethal scorpion envenoming. *FASEB J.*, 24, 3479–3489
22. Hmila, I., Cosyns, B., Tounsi, H., Roosens, B., Cavelliers, V., Abderrazek, R. Ben, Boubaker, S., Muyldermans, S., El Ayeb, M., Bouhaouala-Zahar, B. (2012). Pre-clinical studies of toxin-specific Nanobodies: Evidence of in vivo efficacy to prevent fatal disturbances provoked by scorpion envenoming. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 264, 222–231
23. Laustsen, A.H., María Gutiérrez, J., Knudsen, C., Johansen, K.H., Bermúdez-Méndez, E., Cerni, F.A., Jürgensen, J.A., Ledsgaard, L., Martos-Esteban, A., Øhlenschläger, M. (2018). Pros and cons of different therapeutic antibody formats for recombinant antivenom development. *Toxicon*, 146, 151–175
24. Burns, R.B., Maxwell, M.H. (1981). Probable occurrence of IgE in the adult domestic fowl (*Gallus domesticus*) after horse serum stimulation. *Vet. Res. Commun.*, 5, 67–72,
25. Chen, C.H., Lehmeier, J.E., Cooper, M.A. X.D. (1982). Evidence for an igd homologue on chicken lymphocytes ' specific for heavy and light chain isotypes and analyzed. *J. Immunol.*, 129, 2580–2585
26. Michael, S., Meenatchisundaram, G., Parameswari, T., Subbraj, R.S., Michael, A., Meenatchisundaram, S., Parameswari, G., Subbraj, T., Selvakumaran, R., Ramalingam, S. (2010). Chicken egg yolk antibodies (IgY) as an alternative to mammalian antibodies A. *Indian J. Sci. Technol.*, 3, 468–474
27. Thalley, B.S., Carroll, S.B. (1990). Rattlesnake and scorpion antivenoms from the egg yolks of immunized hens. *Nat. Biotechnol.*, 8, 934–938
28. Lila, B.-A., Laraba-Djebari, F. (2011). Enhanced immune sera and vaccine: Safe approach to treat scorpion envenoming. *Vaccine*, 29, 8951–8959
29. Nouri, A., Laraba-Djebari, F. (2015). Enhancement of long-lasting immunoprotective effect against *Androctonus australis hector* envenomation using safe antigens: Comparative role of MF59 and Alum adjuvants. *Vaccine*, 33, 5756–5763
30. Bachsais, N., Boussag-Abib, L., Laraba-Djebari, F. (2017). Safety and efficiency of active immunization with detoxified antigen against scorpion venom: side effect evaluation. *Inflamm. Res.*, 66, 765–774
31. Possani, L.D., de Castro, J.F., Juliá, J.Z. (1981). Detoxification with glutaraldehyde of purified scorpion (*Centruroides noxius Hoffmann*) venom. *Toxicon*, 19, 323–329
32. Chávez-Olórtegui, C., Kalapothakis, E., Moreira Ferreira, A.M.B., Ferreira, A.P., Ribeiro Diniz, C. (1997). Neutralizing capacity of antibodies elicited by a non-toxic protein purified from the venom of the scorpion *Tityus serrulatus*. *Toxicon*, 35, 213–221
33. Winau, F., Westphal, O., Winau, R. (2004). Paul Ehrlich—in search of the magic bullet. *Microbes Infect.* 6(8):786-9
34. Eldridge, J., Gilley, R., Staas, J., Moldoveanu, Z. (1989). Biodegradable microspheres: vaccine delivery system for oral immunization. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 146:59-66
35. Panyam, J., Labhasetwar, V. (2003).

- Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55(3):329-47
36. Zhao, L., Seth, A., Wibowo, N., Zhao, C.-X., Mitter, N., Yu, C., Middelberg, A.P.J. (2014). Nanoparticle vaccines. *Vaccine*, 32, 327–337
37. Chavez-Olortegui, C., Amara, D.A., Rochat, H., Diniz, C., Granier, C. (1991). In vivo protection against scorpion toxins by liposomal immunization. *Vaccine*, 9, 907–910
38. Fonseca, S.G., Ferreira, A.M.M., Diniz, C.R., Chávez-Olórtegui, C. (1997). Induction of neutralizing antibodies in mice immunized with scorpion toxins detoxified by liposomal entrapment. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 30, 883-886
39. Naser, M., Rezvan, Y., Hossein, Z. (2015). A New Antigen Delivery Vehicle Candidate: Orthochirus iranensis Scorpion Venom Entrapped in Chitosan Nanoparticles. *Br. J. Pharm. Res.*, 7, 264–275
40. Ayari-Riabi, S., Trimaille, T., Mabrouk, K., Bertin, D., Gimes, D., Benlasfar, Z., Zaghmi, A., Bouhaouala-Zahar, B., Elayeb, M. (2016). Venom conjugated polylactide applied as biocompatible material for passive and active immunotherapy against scorpion envenomation. *Vaccine*, 34, 1810-1815
41. Nait Mohamed, F.A., Laraba-Djebari, F. (2016). Development and characterization of a new carrier for vaccine delivery based on calcium-alginate nanoparticles: Safe immunoprotective approach against scorpion envenoming. *Vaccine*, 34, 2692-2699
42. Smith, D., Simon, J., Jr, J.B. (2013). Applications of nanotechnology for immunology. *Nat. Rev. Immunol.* 13(8):592-605
43. Heath, W., Carbone, F. (2013). The skin-resident and migratory immune system in steady state and memory: innate lymphocytes, dendritic cells and T cells. *Nat. Immunol.* 14(10):978-85
44. Veisheh, O., Gunn, J.W., Kievit, F.M., Sun, C., Fang, C., Lee, J.S.H., Zhang, M. (2009). Inhibition of tumor-cell invasion with chlorotoxin-bound superparamagnetic nanoparticles. *Small*, 5, 256–264



En ligne
<https://www.atrss.dz/ajhs>



Mise au point

Notions sur l'Immuno-Allergologie de l'Envenimation Scorpionique

Some Immuno-allergy aspects of Scorpion Envenoming Syndrome

Kerboua Kheir Eddine^{1*}, Delma Kilani², Soualhi Islem², Djilani Salma³

¹Laboratoire de Médecine Saharienne, Faculté de Médecine, Université Kasdi Merbah-Ouargla, Algérie

²Service de Réanimation, Etablissement Public Hospitalier Mohammed Boudiaf, Ouargla, Algérie

³Département de Soutien, Direction de Production, Institut Pasteur d'Algérie, Alger, Algérie

RESUME

Durant ces deux dernières décennies, les théories immunologiques axées essentiellement sur la réaction allergique au venin scorpionique et le syndrome de la réponse inflammatoire systémique (SIRS) tentaient de combler les lacunes de la théorie nerveuse autonome dans la physiopathologie de l'envenimation scorpionique (ES). Une revue des évidences cliniques et expérimentales s'impose pour éclairer les médecins urgentistes des zones endémiques en leur apportant des éléments nécessaires à la compréhension de ces théories immunobiologiques dans le but d'améliorer la prise en charge. La preuve de concept du déclenchement du SIRS dans les stades sévères de l'ES chez l'homme a été vérifiée par plusieurs équipes à travers le monde et le concept thérapeutique axé sur le ciblage pharmacologique des éléments de l'immunité innée a fait ses épreuves dans les modèles expérimentaux. Ainsi, la médecine transrationnelle du SIRS est-elle de vigueur pour réduire le taux de mortalité par ES.

MOTS CLES: Envenimation scorpionique, SIRS, Médecine saharienne, Immunologie des toxines, Allergie au venin.

ABSTRACT:

During the last two decades, immunological theories focusing on the allergic reaction to scorpion venom and the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) were more and more utilized to complete the autonomous nervous theory within the pathophysiology of scorpion envenomation (SE). A review of clinical and experimental evidence is needed to enlighten Saharan doctors by providing them with the basic elements regarding these immunobiological theories in order to enhance SE management. The proof of concept of triggering SIRS in severe stages of SE in humans has been implemented by several teams around the world and the therapeutic concept focused on the pharmacological targeting of innate immunity has succeeded in experimental models. It remains therefore, to invest in transational medicine to reduce the mortality rate due to SE.

KEYWORDS: Scorpion envenoming syndrome, SIRS, Saharan medicine, Toxins Immunology, Allergy to venom.

* Auteur Corredpondant. Tel.: +213 659 806 740
 Adresse E-mail: kheireddinekerboua@yahoo.fr

Date de soumission : 18/06/2020
 Date de révision : 29/06/2020
 Date d'acceptation : 05/08/2020



1. Introduction

L'envenimation scorpionique (ES) est un accident relativement fréquent qui constitue un sérieux problème de santé publique dans les zones tropicales et subtropicales des cinq continents ; l'Amérique du Sud et Centrale, Afrique du Nord, Moyen Orient et en Inde. Le nombre estimé de piqûres par scorpions est de 1,2 million/an avec 0,27% de létalité [1,2]. Les différentes théories expliquant l'envenimation scorpionique ne sont pas exclusives et se complètent. L'envenimation est le résultat d'une réponse complexe de l'organisme à la pénétration du venin, à la fois du système nerveux autonome dans deux de ses composantes (sympathique ou parasympathique) et de la réponse inflammatoire qui peut être violente due aux réponses immunitaires tant inné qu'adaptative [3,4]. Il faut donc interpréter ces différentes réponses en fonction des mécanismes de défense développés par le patient ainsi que de la composition du venin ou à la nature des toxines ou enzymes qu'il contient.

Beaucoup de questions d'ordre immunologique sont souvent posées par les médecins urgentistes et les médecins réanimateurs concernant l'envenimation scorpionique [5,6]. Pour ne citer que les plus fréquentes : Le système immunitaire est-il plus dangereux pour le patient que le venin lui-même au cours d'une ES? La sévérité de la piqure scorpionique est-elle engendrée plutôt par l'envenimation systémique grave ou par l'activation incontrôlée du système immunitaire inné, *via* le syndrome de la réponse inflammatoire systémique (SIRS) ? Malgré que le venin circulant disparaisse une heure après une bonne immunothérapie, les patients ayant des œdèmes pulmonaires ne récupèrent que 48 heures plus tard ; La persistance des symptômes d'envenimation après l'élimination du venin s'explique-elle par le maintien des mécanismes de défense qui perdurent plusieurs jours après l'élimination du venin? Quelle est la réalité de l'anaphylaxie dans l'ES? Ce papier visait à répondre à ces questions en expliquant les différentes théories immuno-pharmacologiques validées dans l'ES.

2. Composition du venin

En effet, différentes composantes biochimiques du venin comme les amines biogènes, oligopeptides, les peptides neurotoxiques déterminent la physiopathologie de l'ES [7,8]. Du point de vue

physiopathologique la partie la plus importante est la partie toxinique qui représente 3-4% du venin total, mais d'autres composants du venin sont nécessaires au passage sanguin des toxines et leur diffusion dans les tissus comme les métalloprotéinases. La physiopathologie de l'ES s'articule autour de trois théories [9] : (i) La théorie de toxicité directe, constatée par des altérations histo-pathologiques dans le cœur, rein et pancréas qui sont accompagnées par des perturbations biologiques décelables par de simples tests sanguins comme les LDHs et la troponine, (ii) La théorie adrénérurgique axée sur l'action indirecte du venin sur le cœur suite à la décharge adrénérurgique qui cause la myocardite adrénérurgique (iii) La théorie inflammatoire, la théorie la plus récente, est basée sur la perturbation de la balance cytokinique; essentiellement l'élévation des cytokines proinflammatoires comme le TNF α , IL1- β et IL6 et la diminution des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL10 et le TGF β [2,5].

3. L'immuno-pharmacologie de la théorie autonome

Les espèces scorpioniques de l'ancien monde (l'Asie et l'Afrique) synthétisent des α -toxines (α NaScTx), qui se lient au site 3 du récepteur sodique sur la surface extracellulaire du canal et inhibent le processus d'inactivation rapide [10,11]. Par contre, celles du nouveau monde possèdent des β -toxines (β -NaScTx), qui se lient au site 4 du récepteur et renforcent son activation en décalent le seuil d'activation du canal vers des potentiels membranaires plus négatifs [12]. Le syndrome de l'ES responsable de la mortalité se résume dans l'œdème aigu pulmonaire réfractaire (OAP), le choc cardiogénique et la défaillance multi-viscérale et qui est le plus souvent expliquée par « la tempête autonome » [13]. Les α -toxines bloquent les canaux sodiques voltage-dépendants générant ainsi des effets parasympathiques suivis de manifestations sympathiques [14]. La stimulation du système nerveux autonome parasympathique a des effets moins sévères que les réponses sympathiques. Ils apparaissent et disparaissent rapidement après la piqûre et provoquent des bronchospasmes, bronchorrhées, salivation, myosis, diarrhée, bradycardie et diaphorèse. Par contre, les effets sympathiques sont plus sévères en raison des effets supplémentaires des catécholamines en circulation,

surtout l'épinéphrine et la noradrénaline. Cette phase peut persister plus de 18 heures en raison de la libération de catécholamines qui provoqueraient des lésions myocardiques, l'OAP et le choc cardiogénique [15].

La théorie neurologique autonome suggère les deux approches thérapeutiques utilisées actuellement : (i) Entraver les toxines scorpioniques d'atteindre les canaux sodiques du système nerveux autonome en utilisant des biomolécules immunologiques à pouvoir neutralisant ou (ii) par l'utilisation de médicaments sympatholytiques comme les α 1-bloquants qui agissent comme agonistes inverses au niveau des récepteurs alpha-1 adrénergiques [2]. La première approche, malgré qu'elle ait fait ses preuves au Mexique et en Arabie Saoudite, son utilisation reste encore controversée par certains essais cliniques et méta-analyses [16]. La deuxième approche qui utilise les α 1 bloquant comme la prazosine a permis de diminuer le taux de mortalité en Inde de 26% en 1961 à 6% en 1980 et à <1% actuellement [17]. Il a été prouvé que la guérison d'une piqûre de scorpion s'accélère par l'administration simultanée de l'immunothérapie (IT) anti-scorpionique et de la prazosine en comparaison à la prazosine seule [17].

Mais aussi, on a démontré que les patients traités avec la combinaison de l'IT et la prazosine présentaient des profils clinico-biologiques similaires à ceux traités avec la prazosine seule.

4. La théorie immuno-inflammatoire

Cette théorie s'est conceptualisée dans la réponse à la question «pourquoi seulement moins de 5% des piqués scorpioniques développent-ils le syndrome scorpionique ? ». En effet, malgré que la gravité de l'envenimation scorpionique est proportionnelle à la quantité de venin circulant (veninémie) [9,13], un bon nombre d'envenimés sévères qui ont des taux élevés de veninémie survivent l'ES, si ce n'est la présence de système de régulation chez les survivant qui leur permet de compenser les effets physiopathologiques provoqués par l'envenimation [1,18,19].

Elle s'est façonnée par analogie à la théorie infectieuse constatée au 19 siècle, où l'agent infectieux peut contaminer tous les enfants d'une même famille mais ne pourrait être fatale que chez les plus faibles.

L'envenimation se traduit par des symptômes cliniques et biologiques inflammatoires. Sous cette optique, la théorie inflammatoire stipule que les toxines scorpioniques exercent une sélection négative sur les sujets ayant des défauts intrinsèques de régulation et/ou d'activation immunitaire de même manière que les toxines bactériennes et les protéines anaphylactoides des insectes et de pollens [20,21]. Abdoonet al. a démontré qu'il existe un rapport direct entre l'augmentation des taux des cytokines plasmatiques et la gravité de l'ES, aussi bien à l'admission en réanimation que 6 heures plus tard [22 , 23].

Le niveau d'implication de ces médiateurs cytokiniques varie selon l'espèce scorpionique. La perte de la balance cytokinique aboutit au syndrome de la réponse inflammatoire systémique (SIRS) et à la défaillance multi-viscérale (DMV) [3]. Cette conceptualisation représente la théorie la plus récente, expliquant le mieux l'OAP lésionnel non cardiogénique et l'hyperglycémie rencontrés dans l'ES. De même, elle trouve tout son intérêt dans les stades graves où la DMV serait provoquée par le SIRS qui est une réponse immune innée non contrôlée suivant le modèle de la théorie du Chaos ou de petites perturbations physiologiques aboutissent à des tempêtes pathologiques [3, 23].

Cette théorie a largement été construite par des équipes méditerranéennes, notamment par Sofer et al. [24]. En 2016, les travaux de l'immunologiste Lucia Helena Faccioli de l'Université de Sao Paulo-Brésil ont démontré comment la mortalité par scorpionisme dépend d'une organelle cellulaire impliquée dans l'initiation de l'inflammation, appelée inflammasome, et comment une simple manipulation pharmacologique des leucotriènes LTB4 et de la prostaglandine PGE2 par des anti-inflammatoires non-stéroïdiens permet de reverser l'OAP chez la souris envenimée [25-27] (**Figure 1**).

Dans le contexte algérien, cette approche trouve tout son intérêt chez de patients qui développent l'OPA lésionnel non cardiogénique qui impliquerait les PGE2 pour la perméabilisation capillaire et dont l'arsenal thérapeutique reste limité en dehors des diurétiques par voie intraveineuse (*i.v.*).

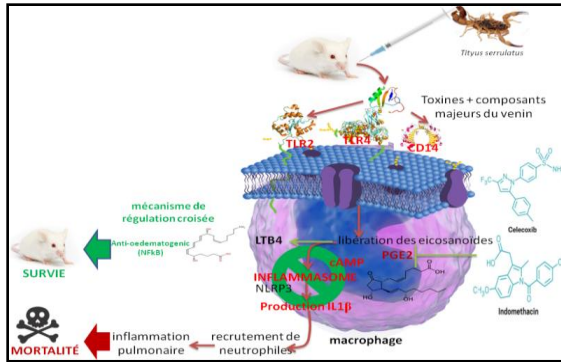


Figure 1. Théorie inflammatoire de l'envenimation scorpionique et ses points d'impacts pharmacologiques qui pourraient favoriser la survie de l'envenimé

Les toxines et certains composants majeurs du venin stimulent des récepteurs de l'immunité innée de type PRR à la surface des cellules immunitaires comme le CD14, TLR2 et le TLR4. Cette stimulation aboutit à des cascades de signalisation intracellulaires médiées par les eicosanoïdes (PGE2) qui stimulent l'inflammasome pour augmenter la libération de la cytokine proinflammatoire IL1 β . L'IL1 β initie la cascade inflammatoire responsable de l'augmentation de la perméabilisation de l'endothélium alvéolaire et, *in fini*, l'œdème pulmonaire. L'utilisation des anti-inflammatoires non stéroïdiens permet de contrôler la voie des PGE2 et de favoriser celle des LTB4 qui initie à leur tour un mécanisme de régulation médié par le facteur de transcription NF κ B à la place de la voie inflammatoire de l'inflammasome. (PRR: Pattern Recognition Receptor; TLR: Toll-like Receptor; PGE: Prostaglandine; IL: Interleukine)

5. Réactions d'hypersensibilité au venin scorpionique

Elles représentent l'une des problématiques majeures dans la science de l'envenimation scorpionique [28]. La théorie de l'hypersensibilité au venin de scorpions (ou d'autres arthropodes venimeux) émane de la réaction individuelle et sans proportionnalité avec la quantité d'allergènes (donc de la veninémie). Dans notre expérience, nous avons constaté quelques réactions allergiques de type rush cutané chez les piqués scorpioniques par l'*Orthochirus innesi*, une espèce toxique pour l'homme.

Une étude allergologique par tests cutanés et dosages des IgE spécifiques réalisées au profit des envenimés algériens par l'*Androctonus australis* a conclu que le nombre des réponses inflammatoires médiées par les IgE serait sous-estimé. Le tableau clinique de l'œdème, nausées, réactions cardiovasculaires, hypotension et état de choc pourrait être dû aux mécanismes immunologiques et toxiques. Les auteurs de cette étude proposaient que l'anaphylaxie explique

quelques cas de mortalité, mais la caractérisation des composantes allergéniques reste toujours en investigation scientifique [29]. Le diagnostic clinique de l'anaphylaxie n'est pas une mince tache dans l'envenimation scorpionique car les symptômes d'envenimation et d'anaphylaxie se chevauchent [29,30].

Ceci peut entraîner une prise en charge tardive et inappropriée avec un résultat médiocre du traitement, y compris la mort. En effet, un envenimé scorpionique présentant une insuffisance respiratoire aiguë, œdème de la muqueuse et obstruction des voies respiratoires supérieures mais en absence de symptômes de type œdème rapide au site de piqûre, nausée, diarrhée, sensation de tête légère et spasmes musculaires [31]. Ceci ne permet pas de distinguer la réaction toxique de la réaction anaphylactique.

L'anaphylaxie au venin, comme toute allergie de type 1 médiée par les IgE, nécessite un premier contact avec l'allergène pour induire la production des IgE spécifiques qui précèdent la phase d'état ou clinique qui se déclenche suite à un second contact avec le même allergène. Malgré que Leynadier et al. ont démontré la sensibilisation antérieure au venin scorpionique chez les patients algériens, la question de diagnostic de l'allergie au venin scorpionique chez certains patients lors du premier contact avec le venin en absence de tout antécédent de piqure scorpionique reste posée [29].

Ce type d'anaphylaxie est possible grâce aux réactions croisées des IgE produites lors des piqûres antérieures d'insectes ou d'autres arachnides.

La phylogénétique au sein des Arthropodes montre le lien entre les Insecta qui sont souvent les hyménoptères avec les arachnides représentés par les araignées et les Scorpionida [32].

Beaucoup d'études cliniques ont montré que les venins d'abeilles et de fourmis peuvent générer des réponses à IgE responsables de réactions allergiques au venin scorpionique *via* des réponses immunes croisées [32-34] (**Figure 2**). Cette figure trouve son importance chez les patients qui ne présentent pas d'antécédent de contact antérieur avec les protéines des venins scorpioniques et qui, malgré cela, manifestent des signes d'anaphylaxie lors de ce premier contact avec le venin scorpionique.

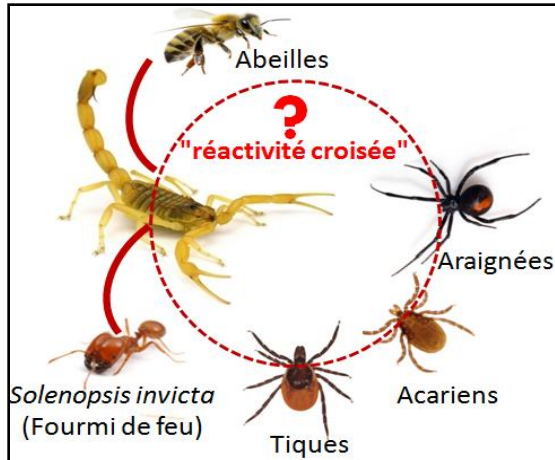


Figure 2. Sources potentielles de protéines allergéniques responsables de l'éventuelle réaction croisée des IgE spécifiques chez les envenimés scorpioniques.

Conclusion

L'immunologie explique une grande partie de la physiopathologie de l'envenimation scorpionique sévère et permettrait le développement d'outils diagnostiques et d'armes thérapeutiques contre le scorpionisme. Le SIRS impliqué dans la défaillance multi-viscérale chez l'envenimé scorpionique ainsi que les réactions d'hypersensibilité restent les points les plus discutés par les experts de l'ES. L'avenir de l'ES semble dépendre de la valorisation clinique de la recherche translationnelle de la théorie immuno-inflammatoire qui représente actuellement la révolution conceptuelle dans la science de l'ES.

Conflits d'intérêt

Les auteurs ne déclarent aucun conflit d'intérêt.

Remerciements

Les auteurs adressent leurs vifs remerciements à la Direction Générale de la Recherche Scientifique et du développement Technologique (DGRSDT) pour la confiance et le soutien inlassable dans leurs investigations scientifiques sur le scorpionisme en Algérie.

Références

1. Laïd, Y., Boutekdjiret, L., Oudjehane, R., Laraba-Djebari, F., Hellal, H., Guerinek, M., Griene, L., Alamir, B., Merad, Chippaux, JP. (2012) Incidence and severity of scorpion stings in

- Algeria ;*J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.*18,4 Botucatu
2. Chippaux, JP. (2012). Emerging options for the management of scorpion stings, *Drug Design, Development and Therapy.* 6, 165–173
3. Devaux, C., Jouirou, B., Naceur, Krifi, M., Clot-Faybesse, O., El Ayeb, M., Rochat, H. (2004). Quantitative variability in the biodistribution and in toxinokinetic studies of the three main alpha toxins from the *Androctonus australis* scorpion venom. *Toxicon.* 43(6):661-669
4. Shamooun, Z., Peterfy, R.J., Hammoud, S. (2020). Scorpion Toxicity. [Updated 2020 Jun 25]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430928/>
5. Petricevich, V.L. (2010). Scorpion Venom and the Inflammatory Response. *Mediators Inflamm.* 903295
6. Bouhaouala-Zahar, B., Ben Abderrazek, R., Hmila, I., Abidi, N., Muyltermans, S., El Ayeb, M. (2011). Immunological aspects of scorpion toxins: current status and perspectives; *Inflamm Allergy Drug Targets.* 10(5):358-68
7. Abd El-Aziz, F.E.A., El Shehaby, D.M.; Elghazally, SA.; Hetta HF. (2019). Toxicological and epidemiological studies of scorpion sting cases and morphological characterization of scorpions (*Leiurus quinquestriatus* and *Androctonus crassicauda*) in Luxor, Egypt. *Toxicol. Rep.* 6:329-335
8. Ricardo, C., de la Vega, R., Vidal, N., Possani, L. D. (2013) Chapter 59 - Scorpion Peptides ; *Handbook of Biologically Active Peptides* (Second Edition) 423-429
9. Abroug, F., Ouanes-Besbes, L., Tilouche, N. (2020). Scorpion envenomation: state of the art. *Intensive Care Med.* 46, 401–410
10. Catterall, W.A. (1991). Structure and function of voltage-gated sodium and calcium channels. *Curr. Opin. Neurobiol.* 1, 5-13
11. Catterall, WA. (2000). From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels, *Neuron.* 26 (1) :13-25

12. Catterall, WA., Cestèle, S., Yarov-Yarovoy, V., Yu, FH., Konoki, K., Scheuer, T. (2007). Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins; *Toxicon*. 49(2):124-41
13. Kumaraswamy, R., Gadari, C., Madhavi, S., Mathada, K. (2014). Autonomic dysfunctions in patients with scorpion sting: early predictors of severe disease; *Int J Adv Med*. 1(3):241-246
14. Mazzei de Dàvila, CA., Dàvila, DF., Donis, JH., de Bellabarba, GA., Villarreal, V., Barboza, JS. (2002). Sympathetic nervous system activation, antivenin administration and cardiovascular manifestations of scorpion envenomation; *Toxicon*. 40(9):1339-46
15. Ditttrich, K., Ahmed, R., Ahmed, QA. (2002). Cardiac arrest following scorpion envenomation; *Ann Saudi Med*. 22(1-2):87-90
16. Abroug, F., Ouanes-Besbes, L., Ouanes, I., Dachraoui, F., Fkih Hassen, M., Haguiga, H., Elatrous, S., Brun-Buisson, C. (2011). Meta-analysis of controlled studies on immunotherapy in severe scorpion envenomation, *Emergency Medicine Journal*. 28(11):963-9
17. Dabas, A. (2019). Scorpion Envenomation to Therapeutics. *Indian Pediatr*. 56: 323-324
18. Amaral, CF., Rezende, NA. (1997). Both cardiogenic and non-cardiogenic factors are involved in the pathogenesis of pulmonary oedema after scorpion envenoming. *Toxicon*. 35(7):997-998
19. El Hafny, B., Ghalim, N. (2002). Evolution clinique et taux circulants du venin dans les envenimations scorpioniques au Maroc [Clinical evolution and circulating venom levels in scorpion envenomations in Morocco]. *Bull. Soc. Pathol. Exot*. 95(3):200-204
20. Nicholson, LB. (2016). The immune system; *Essays in Biochemistry*. 60, 275–301
21. Alcaïs, A., Abel, L. and Casanova, JL. (2009) Human genetics of infectious diseases: between proof of principle and paradigm; *Clin Invest*. 119(9):2506-2514
22. Bahloul, M., Turki, O., Chaari, A., Bouaziz, M. (2018). Incidence, mechanisms and impact outcome of hyperglycaemia in severe scorpion-envenomed patients; *Ther. Adv. Endocrinol. Metab*. 9(7): 199–208
23. Abdoon, N. A., Ali, A. A., Alnema, A. A., Hag-Ali, M., Fatani, A. J. (2006). Effect of selected anti-inflammatory drugs on the lethal actions of *Leiurus quinquestriatus* venom. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis*. 12 (3) Botucatu
24. Sofer, S., Gueron, M., White, RM., Lifshitz, M., Apte, RN. (1996). Interleukin-6 release following scorpion sting in children. *Toxicon*. 34(3):389-392
25. Zoccal, K., Sorgi, C., Hori, J. (2016). Opposing roles of LTB4 and PGE2 in regulating the inflammasome-dependent scorpion venom-induced mortality. *Nat. Commun*. 7, 10760
26. Zoccal, K. F., da Silva Bitencourt, C., Wanderley Garcia Paula-Silva, F., Artério Sorgi, C., de Castro Figueiredo Bordon, K., Candiani Arantes, E., Faccioli, L. H. (2014). TLR2, TLR4 and CD14 Recognize Venom-Associated Molecular Patterns from *Tityus serrulatus* to Induce Macrophage-Derived Inflammatory Mediators, *PLoS One*. 9(2): e88174
27. Zoccal, K.F., Gardinassi, L. G., Sorgi, C.A., Meirelles, A.F.G., Bordon, K.C.F., Glezer, I., Cupo, P., Matsuno, A. K., Bollela, V. R., Arantes, E.C., Guimarães, F.S., Faccioli, L.H. (2018). CD36 Shunts Eicosanoid Metabolism to Repress CD14 Licensed Interleukin-1 β Release and Inflammation ; *Front Immunol*. 9: 890
28. Naseem, SR., Altamemi, S., Ullah, I. (2016). Scorpion sting envenomation or anaphylaxis? Report of a child with overlapping clinical picture following scorpion sting (G76). 101 - Suppl 1; Royal College of Paediatrics and Child Health, Abstracts of the Annual Conference, 26–28 April 2016, ACC, Liverpool

29. Leynadier, F., Hassani, Y., Chabane, M.H., Benguedda, A.C., Abbadi, M.C., Guerin, L. (1997). Allergic reactions to North African scorpion venom evaluated by skin test and specific IgE; *J. Allergy Clin. Immunol.* 99, 6, Part 1, 851–853
30. Demain, J.G., and Goetz, D.W. (1995). Immediate, late, and delayed skin test responses to *Centruroides vittatus* scorpion venom. *J. Allergy Clin. Immunol.* 95:135-7
31. Castillo, A., Attaluri, P. (2018). Acute respiratory failure following scorpion stings: Anaphylaxis or severe systemic envenomation? *The Southwest Respiratory and Critical Care Chronicles.* 6(22):47–50
32. Nugent, JS., More, DR, Hagan, L.L., Demain, JG., Whisman, BA., TM. (2004). Cross-reactivity between allergens in the venom of the common striped scorpion and the imported fire ant. *J. Allergy Clin. Immunol.* 114(2):383-6
33. Klotz, J.H., Pinnas, J.L., Klotz, S.A., Schmidt, J.O. (2009). Anaphylactic Reactions Anaphylactic Reactions to Arthropod Bites and Stings; *American Entomologist.* 55,3:134-139
34. Desoubeaux, G., Bailly, É., Andres, C.R., Guiguen, C., Chandenier, J. (2015). Management of the cutaneous reaction induced by scorpion sting: Thinking about treatment and means of prevention; *La Presse Médicale.* 44, 4P1: 466-468



Disponible en ligne
<https://www.atrss.dz/ajhs>



Mise au point

Prise en charge de l'Envenimation Scorpionique : Expérience de 30 ans à l'Hôpital de Ouargla

Scorpion Envenomation Management: Experience of 30 years at the Hospital of Ouargla

Delma Kilani^{1*}, Douache Mériem¹, Soualhi Mohamed Islem¹, Kerboua Kheir Eddine²

¹Service de Réanimation, Etablissement Public Hospitalier Mohammed Boudiaf, Ouargla, Algérie

²Laboratoire de Médecine Saharienne, Faculté de Médecine, Université Kasdi Merbah-Ouargla, Algérie

RESUME

L'envenimation scorpionique en Algérie pose un problème de santé publique, responsable d'environ une cinquantaine de décès chaque année, des enfants dans la plupart des cas, dont beaucoup peuvent être évités si la prise en charge est donnée sans retard, et de manière efficace. La formation des médecins généralistes, prenant en charge ce fléau, dans la gestion des complications des envenimations scorpioniques est le garant de la victoire contre le scorpionisme. La compréhension de la physiopathologie de l'œdème aigu du poumon, et la bonne manipulation de la Dobutamine, administrée par la seringue électrique, avec l'utilisation de l'Immunothérapie antiscorpionique, de bonne qualité, sont les clés de la réussite. Notre expérience de trois décennies, dans l'établissement Public Hospitalier d'Ouargla, ville du sud Algérien, connue par la gravité de ses piqûres de scorpions, nous autorise à présenter notre expérience, dans le domaine de la réanimation, à nos jeunes médecins.

MOTS CLES: Envenimation scorpionique, œdème aigu du poumon, sérumantiscorpionique, Dobutamine, Ouargla

ABSTRACT:

Scorpionic envenomation in Algeria poses a public health problem, responsible for almost fifty deaths each year, children in most cases, many of which can be avoided if care is given without delay in an efficient manner. The training of general practitioners, taking charge of this scourge, in the management of complications of scorpionic envenomation, is the guarantee of the victory against scorpionism. Understanding the pathophysiology of acute lung edema, and the proper handling of Dobutamine, administered by the electric syringe, with the use of a high quality scorpion antivenom, are the keys to success. Our three decades of experience in the Public Hospital of Ouargla, a city in southern Algeria known for the severity of its scorpion bites, allows us to present our experience in the field of resuscitation to our young doctors.

KEYWORDS: Scorpion envenomation, acute lung edema, antiscorpionic serum, Dobutamine, Ouargla

* Auteur Corredpondant .

Adresse E-mail:kilani.delma@gmail.com

Date de soumission : 19/07/2020

Date de révision : 25/07/2020

Date d'acceptation : 30/08/2020

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License



1. Historique

Durant les trois dernières décennies, nous avons été confrontés au problème de l'envenimation scorpionique à Ouargla, une ville du sud-Est algérien, réputée pour la dangerosité de ses scorpions, et appartenant au triangle de la mort, avec les villes de Boussaâda et Biskra.

Au début des années quatre-vingt-dix, les missions médicales russe, vietnamienne et indienne, ont assuré la couverture médicale des villes du sud. Elles utilisaient alors des cocktails thérapeutiques à base de Morphinique (Péthédine), Prométhazine et Chlorpromazine. Le Diazépam était réservé aux cas d'agitation. La morphine faisait partie de l'arsenal thérapeutique de l'œdème aigu du poumon (OAP) pour son action vasodilatatrice, malgré son effet dépresseur sur la respiration. On enregistrait beaucoup de décès en raison de complications iatrogènes (dépressions respiratoires et hypotension entraînés par les médicaments), de manque de moyens de réanimation et aussi de compétences humaines. L'héptaminolchloridrateet la Coramine - Glucose, étaient utilisés pour leur action dite analeptique cardiaque, faute de drogues cardiotoniques, car la dopamine et la dobutamine n'étaient pas encore disponibles dans les pharmacies. La ventilation artificielle était presque inexistante, on faisait appel alors, au peu d'appareils d'anesthésie disponible. La seringue électrique, le monitoring cardiaquet et l'oxymétrie de pouls, étaient inconnus dans les régions touchées par l'envenimation scorpionique.

A l'échelle nationale, on déplorait chaque année plus 50 000 piqués déclarés, et plus de 50 décès (**Figure 1**). Durant ces années, les décès n'étaient pas systématiquement déclarés et l'enterrement ne nécessitait pas d'autorisation. La population faisait appel plus à la médecine traditionnelle comme la pierre noire, la scarification, ou la *Roquia*.

Le service de réanimation de l'EPH d'Ouargla, a été créé en 1988 ; il a une capacité de 13 lits d'hospitalisation, et prend en charge les cas du stade 3 compliqués d'OAP. Les stades 1 et 2 sont pris en charge au niveau du service des urgences. Les statistiques de ce service de réanimation durant les trois décennies, selon les données de la DSP d'Ouargla sont présentées dans la figure 2.

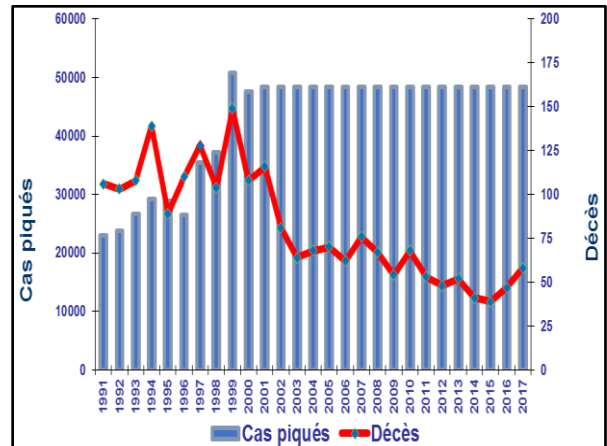


Figure 1 : Données nationales sur le nombre de piqués et décès par scorpion de 1991-2017

La ville d'Ouargla enregistrait environ deux mille piqués par an dont 15 à 20 décès, notamment les sujets des âges extrêmes. Dans les années quatre-vingt-dix, selon les statistiques du Ministère de la Santé de la Population et de la Réforme Hospitalière (MSPRH), le scorpion piquait en dehors des habitations plus qu'à l'intérieur (i.e. champs, chantiers) (Communication personnelle). Ensuite, dans les années deux mille, il piquait plus à l'intérieur des maisons car il trouvait sa nourriture de fait de la dégradation de l'hygiène du milieu, et aussi parce qu'on construit les maisons sur ses gîtes naturels.

L'immunothérapie antiscorpionique (IT) n'avait pas une bonne réputation auprès du personnel médical et aussi auprès de la population, car accusée d'être responsable de chocs anaphylactiques mortels, probablement en rapport avec le processus de purification lors de l'industrialisation. Un protocole thérapeutique à base d'acide acétyl-salicylique a été proposé à l'hôpital d'Ouargla, sur la base des résultats d'une étude, ayant démontré une augmentation de la résistance à l'action du venin des souris sous aspirine [1]. Ce protocole a été très vite stoppé par le ministère de la santé, en raison du risque hémorragique qu'il pouvait entraîner [2].

Pendant les années quatre-vingt-dix, l'IT antiscorpionique a été abandonnée par les médecins de la ville d'Ouargla, par crainte d'effets secondaires, souvent non objectivés par des examens immunologiques. Depuis l'année deux mille, jusqu'à ce jour, l'administration de l'IT est devenue obligatoire pour tout piqué par scorpion.

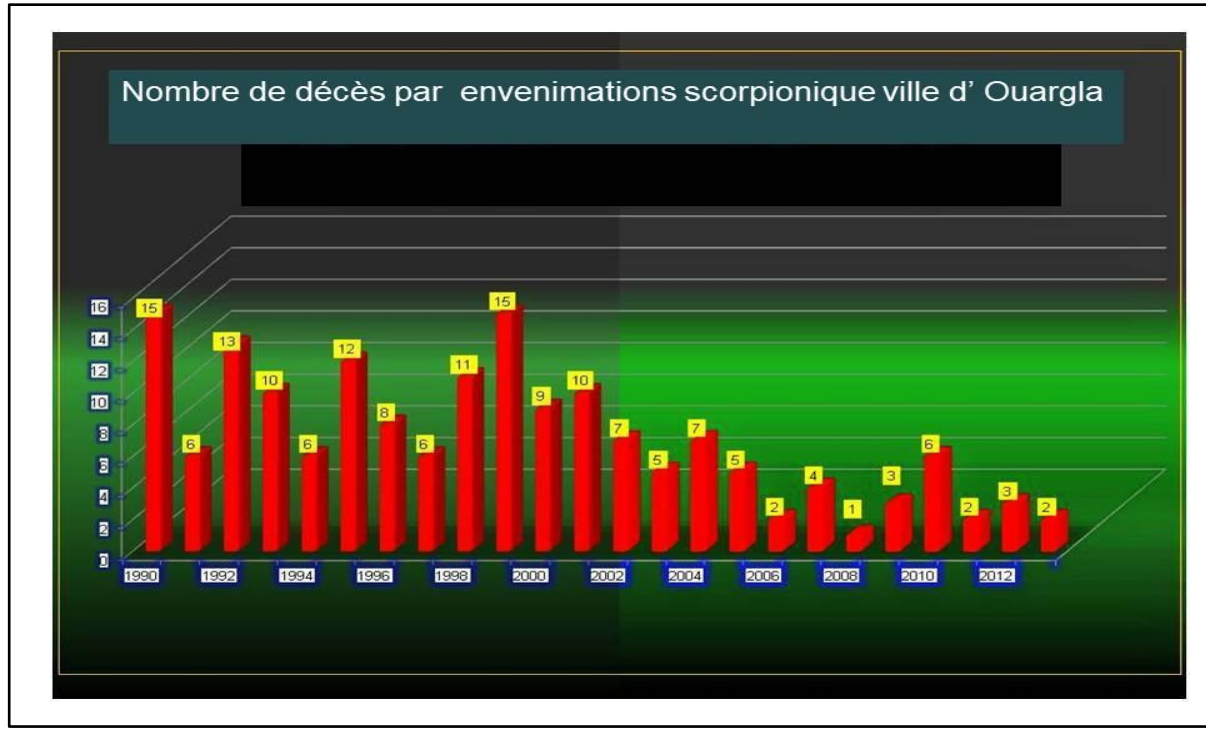


Figure 2 : Mortalité par envenimation scorpionique dans la ville d'Ouargla

Une piqure de scorpion, sans complication peut avoir comme explication, une piqure blanche, (sans inoculation de venin), le type de scorpion non dangereux, ou une quantité de venin inoculée faible. Certaines questions demeurent posées, sur l'absence de mortalité dans la ville de Hassi Messaoud, (à 80 km d'Ouargla), dans la ville de Béchar et d'autres, malgré l'implication de la même espèce de scorpion, *Androctonus australis*.

L'amélioration de la situation épidémiologique est expliquée par plusieurs facteurs dont l'affectation des médecins algériens, spécialistes et généralistes dans les régions de sud, la création des services de réanimation, et l'équipement de ces derniers en matériel de soins intensifs, tel que les seringues électriques et les respirateurs de haute performance. C'est aussi grâce à l'introduction de nouveaux médicaments, dans la prescription médicale et leur utilisation dans le traitement du choc cardiogénique, comme la dopamine et la Dobutamine. La compréhension de la physiopathologie des complications cardiaques de l'envenimation scorpionique a certainement aidé à mieux juguler ces détresses. En effet, lors d'une étude que nous avons menée pour analyser les modifications

échocardiographiques au cours des envenimations scorpioniques graves, nous avons démontré la nature cardiogénique de l'OAP et sa bonne réponse à la Dobutamine [3].

2. Signes cliniques

Le diagnostic de piqure de scorpion ne pose pas de problème, car la douleur est constante plus, ou moins intense, parfois irradiante, et persiste de quelques heures à plus d'une journée. Chez le petit enfant qui ne s'exprime pas, elle constitue un élément clé pour le diagnostic, surtout si elle est associée à un priapisme, qu'il faut rechercher systématiquement. En effet, le priapisme est un signe très évocateur de l'envenimation scorpionique (ES), dans cette tranche d'âge.

La physiopathologie de la douleur, est en rapport avec une action locale des biomolécules non toxiques (phospholipases, hyaluronidase, et sérotonine) contenues dans le venin du scorpion. Ceci explique la présence constante de la douleur au point de piqure qu'il y ait ou pas inoculation de venin (Piqués/envenimés). La persistance de la douleur au-delà de quatre heures (temps de mise en observation) en absence de signes généraux d'envenimation, ne

constitue pas un signe de gravité, et ne justifie pas l'hospitalisation. A la différence des morsures des vipères et des serpents, les signes locaux sont absents, et on ne retrouve ni œdème local ni nécrose. Aucune complication thromboembolique ou hémorragique n'a été rapportée dans les ESs des pays Nord-Africain [4].

Sachant que l'inoculation du venin chez le scorpion est aléatoire selon l'individu scorpionique et les circonstances de l'accident, on distingue deux formes cliniques de piqures de scorpion : les piqures blanches (sans inoculation de venin), et les piqures avec envenimation (Envenimés). Cette dernière forme clinique s'accompagne de signes généraux voir de détresse cardiorespiratoire. Au début, on ne peut pas distinguer un piqué (piqure blanche) d'un envenimé, de ce fait, il est de mise de considérer toute piqure de scorpion comme étant une envenimation et de lui administrer la sérothérapie.

A la différence de la piqure blanche où la douleur est isolée, les envenimés présentent un tableau clinique polymorphe très bruyant, réalisant un orage cathécholaminergique, par stimulation du système nerveux autonome sympathique adrénérique et parasympathique cholinergique.

C'est le système parasympathique qui s'exprime en premier, par des signes cholinergiques avec des troubles digestifs tels que les vomissements, sueurs profuses, priapisme, syndrome d'hypersécrétion bronchique et salivaire, et parfois un tableau de choc vagal avec bradycardie et hypotension artérielle. Le traitement de cette bradycardie est l'Atropine (parasympatholytique) donnée par voie intra veineuse.

Cette phase cholinergique ne dure pas longtemps, et cède souvent la place à une phase adrénérique avec tachycardie, pic hypertensif et troubles du rythme cardiaque. Nous avons constaté chez nos patients que ces pics hypertensifs sont transitoires et disparaissent rapidement, et c'est plutôt l'hypotension artérielle qui va dominer la scène et sera plus difficile à gérer, vu l'atteinte cardio vasculaire possible.

En 2014 et en raison de l'atteinte cardiaque qu'elle entraîne, l'envenimation scorpionique a été intégrée au registre des urgences cardiovasculaires. L'atteinte myocardique constitue le principal signe de gravité, elle est détectée par la présence de signes de bas débit cardiaque, pouls filant, oligurie, tachycardie, et aussi par les signes de surcharge pulmonaire, avec

apparition de dyspnée voir d'orthopnée. À l'auscultation pulmonaire, on notera la présence de râles crépitants généralisés réalisant la fameuse marée montante des râles crépitants, voire hémoptysie. L'hypotension artérielle est un signe tardif dans le diagnostic d'état de choc et les signes de bas débit doivent être recherchés systématiquement. Les râles crépitants doivent être recherchés dès l'admission de la victime. Cette recherche doit être répétée à distance si nécessaire. Leur présence signe la gravité, et impose l'hospitalisation en réanimation, l'administration de Dobutamine, et si l'état du patient le permet, la réalisation d'une échocardiographie, qui confirmera alors le diagnostic et permettra une meilleure surveillance cardiaque.

Le diagnostic de cette complication est à la portée de tout médecin, car basé sur une auscultation systématique de tout piqué, et la prise de sa pression artérielle. L'échocardiographie n'est ni nécessaire ni prioritaire. C'est une urgence diagnostic et thérapeutique.

Pour certains auteurs, les formes compliquées d'ES sont liées à un syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS) en rapport avec une augmentation des taux sériques d'interleukine 1 β (IL-1 β), d'interleukine 6 (IL-6) et de monoxyde d'Azote [5].

3. Stades cliniques

Il est important de classer la victime selon le tableau clinique qu'elle présente, en trois stades [6] (pour certains auteurs, classes à la place de stades):

Stade 1 : douleur locale, au point de piqure, isolée sans signes généraux, parfois intense, et irradiant vers tout un membre, paresthésies, lourdeur de membre, se prolongeant plus d'une journée. Elle répond au paracétamol par voie intraveineuse (*i.v.*). Il représente environ 98% des cas, la guérison est sans séquelles après traitement.

Stade 2 : En plus de la douleur locale décrite au stade 1, la victime présente des signes généraux tels que des sueurs profuses avec frissons, des vomissements, et parfois priapisme. Ce dernier ne nécessitant pas de conduite spécifique, et il peut constituer un élément clé pour le diagnostic de la piqure scorpionique (PS) chez l'enfant ne pouvant pas s'exprimer.

Stade 3 : C'est le stade des complications cardio respiratoires, caractérisé par l'instabilité

hémodynamique, la dyspnée, la désaturation et l'installation de l'OAP [6].

Le passage d'un stade vers un autre est imprévisible, et certaines victimes rentrent d'emblée dans un stade 3 avec OAP, malgré un temps post piqure court. Ceci peut être expliqué par le type de scorpion en question, la quantité de venin injecté, la sensibilité individuelle au venin, et peut être, le lieu du point de piqure par exemple intravasculaire tel le cou. C'est pourquoi il faut mettre toutes les victimes en observation de quelques heures, afin de détecter ce passage entre stades, et d'instaurer le traitement adéquat de ces complications [7].

L'agitation, fréquemment rencontrée est souvent en rapport avec une hypoxie cérébrale, par un encombrement bronchique, OAP ou par baisse du débit sanguin cérébral par hypotension artérielle. Pour traiter cette agitation, il faut traiter sa cause, en corrigeant l'éventuelle hypotension artérielle ou l'obstruction des voies aériennes par l'hypersécrétion ou l'OAP. Il faut surtout éviter l'administration des médicaments sédatifs déprimant la respiration tel que le diazépam. Le stade 3 représente environ 2% des cas, et constitue le stade des complications cardio respiratoires avec OAP et état de choc cardiogénique [3].

4. Prise en charge

Tout piqué par scorpion doit être hospitalisé et mis en observation, quel que soit la symptomatologie qu'il présente, et bénéficier d'un traitement médical standard, visant à calmer la douleur par du paracétamol le plus souvent, associé une IT de bonne qualité, c'est-à-dire bien purifiée, non allergisante, puissante d'action, avec un pouvoir neutralisant de DL₅₀ suffisamment élevé, diffusant rapidement (i.e. de faible poids moléculaire), et s'administrant de préférence par *i.v.* La corticothérapie a toujours été administrée par les praticiens de garde sans preuves fournies par des essais cliniques randomisés. Pour certains, elle peut atténuer les éventuels effets anaphylactiques de l'IT ; pour d'autres, c'est pour son effet anti inflammatoire et antalgique. Le tableau clinique d'allergie à l'IT peut être confondu à tort, avec celui de l'atteinte myocardique, et amener à son arrêt. Dans cette situation, ce sont les circonstances d'apparition de l'état de choc qui permettront de trancher. En effet, si cet état de choc s'installe juste après l'administration de l'IT, il doit faire évoquer l'allergie aux protéines de cheval, et amener à arrêter

sa perfusion et justifie l'injection d'Adrénaline diluée. De ce fait, toutes les unités prenant en charge les piqures de scorpion, doivent avoir à leur disposition l'Adrénaline, l'Atropine et la Dobutamine. Le traitement du choc anaphylactique fait appel à l'Adrénaline.

Il faut savoir que les victimes de l'ES ne développent pas d'immunisation contre le venin, et présenteront une symptomatologie à chaque fois qu'elles sont piquées. Le vaccin protégeant contre l'envenimation de scorpions n'est pas encore envisagé. Pour répondre à certaines questions sur l'IT, cette dernière est donnée chez la femme enceinte et ne nécessite pas la réduction dose chez l'enfant, avec possibilité de répétition de son administration en cas de forme sévère, parfois jusqu'à 6 ampoules.

La prise en charge du stade 2, en plus de l'IT et du traitement antalgique, fait appel au traitement symptomatique, tel que les antiémétiques, anti-spasmodiques et du Chlorpromazine. Une compensation des pertes hydro-électrolytiques peut-être indiquée si les pertes sont importantes, surtout chez l'enfant ou le sujet âgé.

Le traitement des complications cardiaques, confirmées par l'échocardiographie, ou cliniquement par la présence de râles crépitant, et/ou des signes de bas débit cardiaque (i.e. oligurie, pouls filant, temps de recoloration retardé), fait appel à la Dobutamine [8]. Tout médecin prenant en charge les ESs est appelé à connaître cette molécule et à maîtriser son utilisation par la seringue électrique (SAP). La Dobutamine est à administrer à forte dose, entre 15 à 20 mcg/Kg/mn, elle ne doit surtout pas être arrêtée hâtivement devant une amélioration clinique initiale, parfois trompeuse. Dans notre service, on a été amené à garder les patients sous Dobutamine jusqu'à 8 jours après preuve échocardiographique de retour à la normale de la fraction d'éjection systolique et de l'hypokinésie du ventricule gauche. Ces deux paramètres échographiques sont les principales anomalies rencontrées dans les formes sévères, et qu'il faut rechercher dans les comptes rendu de celui qui a réalisé l'examen échocardiographique (cardiologue ou autre).

Le traitement de cette atteinte myocardique est celui du choc cardiogénique, mais on a été confronté à des syndromes de détresse respiratoire aigüe de l'adulte (SDRA), faisant évoquer la possible nature lésionnelle de l'OAP post piqure de scorpion. En

effet, certaines victimes envenimées ont présenté un OAP avec atteinte myocardique confirmée par l'échocardiographie mais malgré un traitement efficace de l'atteinte myocardique (i.e. normalisation des paramètres échocardiographiques), la détresse respiratoire persistait et le patient continuait à déssaturer (SPO₂ basse). Cette situation fait évoquer la nature lésionnelle de l'OAP, probablement par action directe du venin, sur la membrane alvéolo capillaire. Le traitement fait appel à la ventilation artificielle en pression positive (PEEP) et à la corticothérapie. La nature mixte d'OAP cardiogénique et lésionnelle reste une possibilité à confirmer par d'autres études. Cependant, il faut dire que la nature cardiogénique de cet OAP reste la plus fréquente et la plus évoquée, et aussi plus facile à gérer.

L'insuffisance circulatoire, peut nécessiter parfois le recours à la noradrénaline ou l'adrénaline, par seringue électrique, afin de maintenir une hémodynamique correcte. De même, un remplissage prudent guidé par l'échocardiographie, peut corriger cette situation. En général, les diurétiques, ne sont pas utilisés, voir contre indiqués si la pression artérielle systolique est inférieure à 100mmHg, surtout en présence de troubles électrolytiques.

Nous avons constaté chez nos patients, que les pics hypertensifs sont transitoires ; ils sont rencontrés surtout au début de l'accident, et donc il faut être prudent dans l'utilisation des antihypertenseurs. La Nicardipine en injection IV est la molécule de choix dans cette indication car son action est de courte durée, et donc mieux maniable. L'hypotension est plus fréquente, dure plus longtemps, et relève de plusieurs mécanismes, hypovolémique, cardiogénique, ou vasoplégique. Il faut rapidement trouver sa cause, et la traiter, avant qu'une acidose lactique, de plus mauvais pronostic ne s'installe.

Enfin, la prévention reste le meilleur moyen de lutte contre les ESs, notamment par le ramassage à grande échelle, allant parfois jusqu'à 60 000 scorpions, visant le scorpion *Androctonus australis*, responsable de décès. Le ramassage permet de diminuer la densité scorpionique et de fournir à l'institut Pasteur d'Algérie la matière première pour la fabrication du sérum antiscorpionique. Par ailleurs, l'envenimation scorpionique est un problème de santé publique lié au sous-développement, car rencontré surtout dans les quartiers pauvres de la ville, sans goudronnage des

rues ni éclairage public, un état précaire des maisons, une hygiène du milieu dégradée, ce qui

constitue un milieu favorable pour le scorpion.

La responsabilité concerne donc plusieurs secteurs, impliqués dans cette pauvreté, l'habitat, les communes, l'éducation, et en dernier le secteur de la santé, d'où la notion de responsabilité multisectorielle.

Nous sommes dans l'attente d'un sérum anti scorpionique de qualité, bien purifié, de faible poids moléculaire (Fragments d'anticorps/Nano-body), s'administrant par voie veineuse, et en quantité suffisante, évitant à notre pays des importations coûteuses. Par ailleurs, les progrès dans le traitement du choc cardiogénique apporteront certainement un plus pour la prise en charge des envenimations scorpioniques.

Conflits d'intérêt

Les auteurs ne déclarent aucun conflit d'intérêt.

Références

1. Guieu, R., Kopeyan, C., Rochat, H. (1993). Utilization of aspirin, quinine and verapamil in the prevention and treatment of scorpion venom intoxication. *Life Sci.* 53(26):1935-1946
2. Oukkache, N., Malih, I., Chgoury, F. (2009). Modifications histopathologiques après envenimation scorpionique expérimentale chez la souris. *La Revue Médicopharmaceutique.* 53, 48-52
3. Delma, K. (2012). Echocardiographic changes during acute pulmonary edema subsequent to scorpion sting. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases.* 18, 4. 421-426
4. Hamouda, C. and Ben Salah, N. (2010). Envenimations scorpioniques en Tunisie. *Med. emergency.* 5, 24-32
5. Meki, A.R., Mohey El-Dean, Z.M. (1998). Serum interleukin -1 β , interleukin- 6, nitric oxide and α 1-antitrypsin in scorpion envenomed children. *Toxicon.* 36 : 1851-9
6. Guide National de prise en charge des envenimations: http://www.sante.dz/inst_env_scorp.pdf (dernière consultation: le 19-07-2020)

7. Elatrous, S., Besbes-Ouanes, L., Fekih Hassen, M., Ayed, S., Abroug, F. (2008). Les envenimations scorpioniques graves. *Med Trop* ; 68 : 359-366
8. Bawaskar, H.S., Bawaskar, P.H. (1992). Management of the cardiovascular manifestations of poisoning by the Indian red scorpion (*Mesobuthus tamulus*). *Br. Heart J.* 68 : 478-8



Disponible en ligne
<https://www.atrss.dz/ajhs>



Mise au point

Sérothérapie Antiscorpionique : Efficacité Clinique, Aspects Pré cliniques, et Perspectives d'une Nanothérapie Future

Antiscorpionic Serotherapy: Clinical Efficacy, Preclinical Aspects, and Prospects for Future Nanotherapy

Djilani Salma^{1,2*}, Sadine Salah Eddine^{3,4}, Kerboua Kheir Eddine⁵

¹Direction de Production, Institut Pasteur Algérie, 16000, Algérie.

²Laboratoire de Recherche en Pharmacie Galénique et Industrielle, Université d'Alger, 16000, Algérie.

³Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la terre, Université de Ghardaïa, BP 455 Ghardaïa 47000, Algérie.

⁴Laboratoire de Recherche sur la Phœniciculture, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université KASDI Merbah-Ouargla, 30000, Algérie.

⁵Laboratoire de Médecine Saharienne, Faculté de Médecine, Université Kasdi Merbah, Ouargla, 30000, Algérie.

RESUME

L'incidence mondiale du scorpionisme est estimée à plus de 1 million de cas d'envenimation par an, et près de 3000 décès associés. En Algérie, les statistiques de l'année 2019 font état de 46797 cas de piqûres, dont 39 décès. La problématique de la sérothérapie antiscorpionique est que les antivenins sont généralement des produits très anciens, et justifient très rarement d'une efficacité clinique prouvée par des essais contrôlés, elle a d'ailleurs été controversée pendant plusieurs années. Le sérum antiscorpionique algérien, un des rares produits dont l'efficacité clinique est établie, a fait l'objet d'observations cliniques à l'échelle nationale dès sa mise au point de 1936 à 1946 ; sur 3089 patients dont 655 cas graves, et 148 cas de gravité extrême, le taux de réussite était de 90,4% en absence de traitement symptomatique à l'époque.

Devant l'insuffisance notable des essais cliniques contrôlés sur ces produits, beaucoup de scientifiques se basent sur la capacité de neutralisation des antivenins sur les souris à l'effet de définir les doses appropriées nécessaires. Or, plusieurs facteurs limitent l'extrapolation directe de ce paramètre à une dose appropriée pour l'Homme. Une incubation préalable du venin et de l'antivenin avant leur administration à la souris écarte les conditions du test d'une envenimation accidentelle ; les fractions d'immunoglobuline f(ab')₂ ont une mauvaise diffusion du fait de leur poids moléculaire élevé (~100 KDa contre 3 à 7 KDa pour les toxines scorpioniques) et la dose létale médiane (DL₅₀) reste une donnée très variable.

Actuellement, les nouvelles approches de l'ingénierie des anticorps ont permis de développer des nouveaux fragments « Nanobodies » dénués de chaîne légère à partir des anticorps de camélidés. Ils sont peu immunogènes, et possèdent une meilleure affinité ainsi qu'un poids moléculaire beaucoup plus faible (11 à 15 KDa) leur conférant ainsi une très bonne diffusion tissulaire. Une perspective intéressante semble alors s'offrir à la sérothérapie antiscorpionique.

MOTS CLES : Sérothérapie, antivenin, envenimation, scorpionisme, nanobody.

ABSTRACT



Global incidence of scorpionism is estimated at more than 1 million cases of envenomation per year, with nearly 3.000 associated deaths. In Algeria, statistics of 2019 show 46797 cases of stings, including 39 deaths. The problem with antiscorpionic serotherapy is that antivenoms are generally very old products, so they rarely justify a clinical efficacy proven by controlled trials. Moreover, it has been controversial for several years. Algerian Antiscorpionic Serum, one of the few products with established clinical efficacy, has previously gone through clinical observations from all regions of the country, since its development from 1936 to 1946; Among 3089 patients, including 655 serious cases, and 148 cases of extreme severity, the success rate was 90.4% (No symptomatic treatment at that time).

Facing the notable insufficiency of controlled clinical trials, many scientists rely on the neutralizing capacity of antivenom in mice to define the appropriate doses needed. However, several parameters limit the direct extrapolation of this parameter to an appropriate dose for humans. A prior incubation of the venom and antivenom before administration to mice rules out the test conditions of accidental envenomation; $f(ab)_2$ immunoglobulin fractions have a poor diffusion due to their high molecular weight (~ 100 KDa versus 3 to 7 KDa for scorpionic toxins) and the lethal median dose (LD_{50}) remains a highly variable indicator.

Currently, new approaches to antibody engineering have allowed development of new "Nanobodies" fragments without light chains, from camelid antibodies. They are not very immunogenic, and have a better affinity and a much lower molecular weight (11 to 15 KDa) giving them a very good tissue diffusion. An interesting perspective seems to be offered to antiscorpionic serotherapy.

KEYWORDS: Serotherapy, antivenom, envenomation, scorpionism, nanobody.

* Auteur Corredpondant. Tel.:+213541509435 ; fax:/
AdresseE-mail :selmadjilani@gmail.com

Date de soumission : 07/07/2020
Date de révision : 15/08/2020
Date d'acceptation : 01/09/2020

1. Introduction

Chaque année, l'incidence mondiale du scorpionisme est estimée à plus de 1 million de cas d'envenimation et près de 3000 décès associés [1]. L'envenimation scorpionique représente un véritable problème de santé publique dans les pays tropicaux et subtropicaux, en particulier en Afrique du Nord, au Moyen-Orient, en Amérique latine et en Inde [2]. En Algérie, la lutte contre l'envenimation scorpionique fait intervenir plusieurs acteurs à travers un programme intersectoriel mis en œuvre au double plan de la prévention et de la prise en charge thérapeutique. Un des points forts de la stratégie du Ministère de la Santé, de la population et de la Réforme Hospitalière (MSPRH) est la surveillance épidémiologique rigoureuse. Les statistiques de l'année 2019 font état de 46797 cas de piqûres répartis sur 46 wilayas, dont 39 décès survenus dans 16 wilayas (source ; F. Aliane 2020, MSPRH). La stratégie repose également sur la standardisation de la prise en charge sur la base d'un consensus thérapeutique axé essentiellement sur le traitement symptomatique et la sérothérapie antiscorpionique.

L'utilisation des sérums antivenins dans le traitement des envenimations par piqûres de scorpion a longuement été controversée [3], mais l'expérience de nombreux pays (Algérie, Tunisie, Zimbabwe, Afrique du Sud, Moyen-Orient, Amérique du Sud, Mexique, et Inde) confirme l'efficacité de ces sérums antiscorpioniques [3-5]. L'avènement de cette thérapie dans la prise en charge des envenimés a entraîné une baisse spectaculaire de la mortalité pédiatrique dans ces régions [5].

2. Efficacité clinique

La prise en charge de l'envenimation scorpionique est rarement basée sur des essais cliniques contrôlés [5]. Une méta-analyse des essais réalisés jusque-là sur les modalités de prise en charge (symptomatique et sérothérapie) fait ressortir seulement deux études qui satisfont aux critères généraux des essais cliniques contrôlés. Ces essais confirment l'efficacité du produit Anascorp[®] ainsi que l'association de la prazosine à la sérothérapie antiscorpionique dans le cadre de la prise en charge de l'envenimation. Notons que cette molécule s'avère donner d'excellents résultats dans plusieurs autres études [6].

Cette problématique des antivenins est liée d'une part à l'ancienneté de ces produits (nés avant la mise en place des exigences réglementaires du développement clinique, et ne disposant pas d'AMM pour la plupart) et d'autre part, la comparaison d'un protocole à base d'un sérum antiscorpionique avec l'évolution naturelle de l'envenimation en l'absence de ce seul traitement spécifique est généralement inadmissible pour des raisons éthiques ou juridiques [7]. Seuls quelques produits justifient donc d'arguments cliniques, mais les protocoles d'utilisations restent différents, pourtant, les toxines produisent des effets similaires et les manifestations cliniques qui en découlent restent identiques malgré la spécificité des espèces en cause.

Le produit Anascorp[®], commercialisé depuis 1965, a été le premier sérum antiscorpionique approuvé par United States Food and Drug Administration (US-FDA) en 2011 [8]. Il s'agit de fragments F(ab')₂ d'origine équine spécifiques aux scorpions Centruroides. L'efficacité de ce produit a été évaluée dans le cadre d'une étude prospective randomisée en double aveugle et contrôlée par placebo, de quatre études ouvertes, et d'une étude rétrospective au niveau des États-Unis et au Mexique, où l'envenimation scorpionique est courante [9].

Au total, 1.534 patients âgés de moins d'un mois à 90 ans ont été traités. Le protocole de prise en charge préconisait une dose initiale de 3 flacons soit 450 DL₅₀ en perfusion intraveineuse à renouveler par flacon dose de 150 DL₅₀ dans les 30 à 60 min, en fonction de l'évolution de l'état du patient, autant de fois que nécessaire jusqu'à la disparition des symptômes. (DL₅₀: dose létale médiane ou quantité de venin causant la mort de 50 % d'une population de souris envenimée). Le taux de réussite (disparition des symptômes) dans l'essai randomisé était de 100% pour le groupe traité et de 14,3 % pour le groupe placebo. Dans l'ensemble, 95 à 100 % des patients ont été soulagés des signes associés à l'envenimation en moins de quatre heures après le début du protocole de traitement. Dans la base de données de contrôle historique, seulement 3,1% des patients avaient connu un soulagement des symptômes dans les 4 heures [8].

Cependant, une étude récente sur ce même produit comparant des cas d'envenimations de gravités différentes selon les groupes, a confirmé l'efficacité de ce protocole pour les stades les plus graves et a mis en exergue l'intérêt d'évaluer, à travers un essai contrôlé, un monitoring de la dose selon la gravité des signes cliniques des envenimés (évitant ainsi des

doses initiales aussi élevées pour les cas qui ne le nécessitent pas) [10].

Le produit Scorpifav[®], est un antivenin qui fut fabriqué en France et utilisé jusqu'en 2017 pour les militaires français dans les régions à risque, comme le Mali [1]. Il ne disposait pas d'autorisation de mise sur le marché (AMM) et était prescrit sous autorisations temporaires d'utilisation (ATU) nominatives délivrées sur demande par l'Agence Nationale de Sécurité des Médicaments en France (ANSM), permettant une surveillance accrue de son utilisation. Il est composé de fragments F(ab')₂ d'origine équine spécifiques aux scorpions *Androctonus australis hector*, *Leiurus quinquestriatus*, et *Buthus occitanus mardochei*. La posologie préconisée pour ce produit était de 10 ml (neutralisant au moins 50 DL₅₀ par ml pour chaque valence d'espèce) en perfusion intraveineuse soit une dose initiale de 500 DL₅₀, à renouveler selon l'évolution de l'état du malade toutes les 4 heures [11].

L'Ipascorp[®] (sérum antiscorpionique algérien) a été mis au point par Dr Etienne Sergent en 1936 au niveau de l'Institut Pasteur d'Algérie, ce produit est toujours utilisé dans la prise en charge de l'envenimation scorpionique en Algérie. Il se présente aujourd'hui sous forme de fragments F(ab')₂ spécifiques aux toxines du scorpion *Androctonus australis hector*.

L'efficacité clinique de ce produit a été évaluée par Dr Sergent à travers les observations cliniques qui lui parvenaient de tout le territoire algérien, des observations qu'il rapportait à son tour en continuité dans la revue 'Archives de l'Institut Pasteur d'Algérie'. En effet, durant la période 1936 à 1946, 3.089 patients ont été traités par ce sérum, dont 655 cas graves mettant la vie en danger (148 cas de gravité extrême parmi les 655 patients). 592 ont été guéris, soit 90,4% de réussite chez les patients gravement atteints. Le protocole se basait essentiellement sur un monitoring selon la gravité des cas. La quantité administrée pouvait atteindre 120 ml quelques fois. Plusieurs voies d'administrations ont été utilisées (sous-cutanée et intraveineuse) [12]. Sergent a pu aussi constater, déjà en 1943 à travers ses observations cliniques, que cette thérapie commençait à perdre son effet si elle est entreprise au-delà de la quatrième heure suivant la piqure [13].

Enfin, l'expérience de l'Arabie Saoudite reste édifiante ; un essai clinique conduit sur l'antivenin commercialisé dans le pays avec un nouveau protocole thérapeutique préconisant une dose de 5 à

20 ml de sérum, en fonction de l'état des patients, au lieu de l'ancienne dose qui était de 0,5 à 1 ml, a permis de réduire le nombre de décès à 1 seul sur les 2424 patients envenimés scorpioniques présentant des signes systémiques, qui avaient participé à l'étude [14]. Alors que ce taux était de 4 à 6,5 % avec l'ancien protocole thérapeutique selon une étude financée par le Ministère de la Santé Saoudien [14].

3. Aspects précliniques

L'efficacité de la sérothérapie antivenimeuse dépend fortement de la dose utilisée, de la voie d'administration et du temps de latence entre la piqure et l'administration de l'antivenin [4]. Ainsi, devant les insuffisances de la recherche clinique sur la sérothérapie antiscorpionique, beaucoup de scientifiques se basent sur la capacité de neutralisation des antivenins sur les souris à l'effet de définir les doses appropriées nécessaires à la standardisation des protocoles de prise en charge. Or, cette capacité de neutralisation renseignée sur l'évaluation préclinique de l'activité dans le cadre du contrôle de la qualité de ces produits [15,16]. Plusieurs facteurs limitent son extrapolation directe à une dose appropriée pour la prise en charge des envenimés :

1- D'abord l'essai en lui-même est un essai *in-vivo*, mais l'étape de neutralisation a lieu *in vitro*, puisqu'à des doses variables, venins et antivenins sont mélangés et incubés pendant plusieurs minutes (jusqu'à 30 min) avant que le mélange ne soit injecté à la souris à l'effet d'évaluer la toxicité de ce qui n'a pas été neutralisé et par conséquent pouvoir quantifier cette capacité totale de neutralisation. Une démarche tout à fait pertinente pour évaluer l'activité du produit [16].

Cette phase d'incubation préalable qui place la neutralisation dans les conditions optimales avant l'administration est loin de pouvoir être observée dans le cas d'une envenimation réelle. Krifi et al. avaient démontré en 1995 que la simple suppression de cette étape d'incubation réduisait la capacité de neutralisation de 78 DL₅₀ à 38 DL₅₀ pour le sérum antiscorpionique spécifique des toxines du venin d'*Androctonus australis garzonii* (Aug) et de 41 DL₅₀ à 17 DL₅₀ du même sérum bivalent pour les toxines du venin de *Buthus occitanus tunetanus* (Bot). En d'autres termes plus appropriés, l'étude a démontré qu'en cas d'injections séparées et simultanées, la dose protectrice (PD₅₀) de l'antivenin (Dose qui protège 50% des souris envenimées) est deux fois plus élevée que celle nécessaire lorsque le venin et

l'antivenin sont préincubés et injectés, la totalité des souris a été protégée par 1,5 PD₅₀ [17].

Ce facteur prend toute son importance à partir du moment où les propriétés pharmacocinétiques des toxines de venin de scorpion et des fragments d'immunoglobulines utilisés actuellement sont totalement différentes. Les toxines du venin de scorpion, qui ont un faible poids moléculaire (~3 à 7 KDa) diffusent rapidement dans les tissus, alors que les fragments F(ab')₂ des antivenins ont une diffusion plus lente (poids moléculaire ~100 KDa) [4].

2- Le délai d'administration : L'étude précédente montre aussi que lorsqu'il y a un délai entre l'administration du venin et de l'antivenin, des doses plus élevées sont nécessaires pour la neutralisation; 2 et 3,5 PD₅₀ d'antivenin étaient respectivement nécessaires pour protéger les souris lorsque le sérum antiscorpionique était administré à 4 et à 8 min après le venin. Pour un délai plus long (12 min), seules 60% des souris envenimées ont pu être sauvées malgré l'utilisation d'une dose jusqu'à 5 fois la PD₅₀ de cet antivenin [17].

Une étude similaire, réalisée par Balozet en 1964 sur le sérum antiscorpionique algérien rapporte les mêmes conclusions ; la dose létale médiane (DL₅₀) du venin d'*Androctonus australis hector*, déterminée avec la méthode utilisée à l'époque (telsons macérés) chez la souris était de 57 µg. Elle passe à 109 µg avec une administration simultanée mais séparée de 0,5 ml de sérum (0 min), puis à 70 µg après l'administration de l'antivenin à 5 min, à 60 µg à 10 minutes, pour finir à 57 µg à 15min, soit une activité nulle de cet antivenin à 15 min [13]. Malheureusement ces deux études n'ont pas testé des doses d'antivenins encore plus élevées jusqu'à l'observation d'un plateau (limitées à 5 DP₅₀ pour la première et à une dose fixe pour la deuxième).

3- La notion de la DL₅₀ (dose létale médiane) est un indicateur qui peut varier, et même fortement parfois, selon les conditions expérimentales, la méthode d'extraction du venin, et la région géographique, l'âge et l'alimentation des scorpions [18]. Par exemple, il est rapporté dans la littérature, que la DL₅₀ du venin du scorpion *Leirus quinquestriatus* varie de 0,23 mg/kg à 6,5 mg/kg [4]. Ceci se traduit par une variabilité élevée dans la prise en charge.

5. Perspectives futures : des nanobodies antiscorpioniques

Les principaux inconvénients des antivenins conventionnels (fragments Fab ou F(ab')₂ ou encore

IgG totale) sont liés d'une part à une mauvaise cinétique de diffusion et de distribution de ces fragments ainsi que leur affinité relativement faible vers les toxines scorpioniques et d'autre part, à leur processus de production lourd, faisant intervenir l'animal (cheval, mouton...) en vue de l'obtention des anticorps même à une échelle industrielle [19].

Les nouvelles approches de l'ingénierie des anticorps ont permis de développer de nouveaux fragments recombinants, dénués de chaîne légère, constitués d'un seul domaine "single domain antibodies" [19]. Leur site de liaison de l'antigène est constitué uniquement du domaine variable de la chaîne lourde de l'anticorps (variable domain of heavy chain antibody, (VHH)) [20]. Naturellement présents chez les Camélidés, ces VHH appelés Nanobodies (Nb), ont une taille nanométrique (~2.5×3×4 nm) et présentent des caractéristiques physico-chimiques meilleures au plan de la stabilité, de la solubilité et une meilleure pénétration des tissus, par rapport aux fragments d'anticorps conventionnels. Leur poids moléculaire faible (11 à 15 KDa) leur confère une très bonne diffusion tissulaire. De plus, leur structure permet une production facile par voie recombinante sur des modèles procaryotes (E. Coli) [20,21]. Le premier médicament Nb a été approuvé par la FDA en février 2019 (le Caplacizumab indiqué dans le traitement du purpura thrombotique thrombocytopénique) [22]. Plusieurs Nb anti-toxines de scorpion ont été développés dans le domaine de l'envenimation scorpionique (encore au stade de la recherche), les essais préliminaires réalisés pour l'heure, semblent montrer une capacité de neutralisation bien supérieure à celle des fragments conventionnels [19], offrant ainsi de meilleures perspectives à la sérothérapie antiscorpionique future.

Conclusion

Bien que l'intérêt de la sérothérapie dans la prise en charge de l'envenimation scorpionique soit bien établi, l'efficacité au plan clinique reste soumise à plusieurs variables dont principalement les doses administrées.

Cette analyse met le point sur la nécessité de coordonner un essai clinique multicentrique à l'effet de standardiser un protocole de prise en charge tenant compte de la diversité des données disponibles. Dans tous les cas, le monitoring de ces doses en fonction de l'état du patient semble inévitable.

Conflits d'intérêts

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêts

Références

1. Bomba A, Favaro P, Haus R, Aigle L, Jean F-X, Dauphin I, et al. Review of Scorpion Stings and Snakebites Treated by the French Military Health Service During Overseas Operations Between 2015 and 2017. *Wilderness & Environmental Medicine*. juin 2020;31(2):174- 80.
2. Bawaskar HS, Bawaskar PH. Efficacy and safety of scorpion antivenom plus prazosin compared with prazosin alone for venomous scorpion (*Mesobuthus tamulus*) sting: randomised open label clinical trial. *BMJ*. 5 janv 2011;342. c7136- c7136.
3. Theakston RDG, Warrell DA, Griffiths E. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. *Toxicon*. avr 2003;41(5):541- 57.
4. Abroug F, ElAtrous S, Nouria S, Haguiga H, Touzi N, Bouchoucha S. Serotherapy in scorpion envenomation: a randomised controlled trial. *The Lancet*. sept 1999;354(9182):906- 9.
5. Isbister GK, Graudins A, White J, Warrell D. Antivenom Treatment in Arachnidism: Antivenoms. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*. janv 2003;41(3):291- 300.
6. Rodrigo C, Gnanathanan A. Management of scorpion envenoming: a systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. *Syst Rev*. Déc 2017 ;6(1) :74.
7. Publication OFFSET de l'OMS n° 58, Caractérisation des venins et standardisation des sérums antivenimeux, progrès réalisés, Genève 1981, disponible sur le site <http://whqlibdoc.who.int/offset/WHO-OFFSET-58.pdf> (consulté le 15.06.2020).
8. "Résumé des caractéristiques produit" du produit anascorp®, disponible sur le site <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/approved-blood-products/anascorp> (consulté le 15.06.2020).
9. Shamooun Z, Peterfy RJ, Hammoud S, et al. Scorpion Toxicity. [Updated 2019 Jul 31]. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan-. Available from:

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430928/>
(consulté le 15.06.2020).
10. Coorg V, Levitan RD, Gerkin RD, Muenzer J, Ruha A-M. Clinical Presentation and Outcomes Associated with Different Treatment Modalities for Pediatric Bark Scorpion Envenomation. *J Med Toxicol.* mars 2017 ;13(1) :66- 70.
 11. “Résumé des caractéristiques produit” du produit scorpifav®, disponible sur le site https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/cablivi-epar-medicine-overview_en.pdf (consulté le 15.06.2020).
 12. Etienne Sergent, Séries d’annales périodiques trimestrielles « Archives de l’Institut Pasteur d’Algérie » de 1936 à 1946, disponibles au niveau de la Bibliothèque de l’Institut Pasteur d’Algérie.
 13. Wolfgang Bücherl, Eleanor E. Buckley, *Venomous Animals and their Venoms, Volume III*, Edition Elsevier, 2013 page 367-369, ISBN1483262898, 9781483262895.
 14. Ismail M. The treatment of the scorpion envenoming syndrome: The Saudi experience with serotherapy. *Toxicon.* sept 1994;32(9):1019- 26.
 15. Note for guidance on specifications: test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products (CPMP/ICH/365/96). ICH Topic Q 6 B. September 1999
 16. WHO Expert Committee on Biological Standardization, Sixty-seventh report, Antivenom Guidelines for the production, control and regulation of snake, antivenom immunoglobulins: Replacement of Annex 2 of WHO Technical Report Series. Series, No. 1004, 2017
 17. Krifi MN, Ayeb ME, Dellagi K. New procedures and parameters for better evaluation of *Androctonus Australis garzonii* (Aag) and *Buthus occitanus tunetanus* (Bot) scorpion envenomations and specific serotherapy treatment. *Toxicon.* févr 1996;34(2):257- 66.
 18. Belghith M, Boussarsar M, Haguiga H, Besbes L, Elatrous S, Touzi N, et al. Efficacy of Serotherapy in Scorpion Sting: A Matched-Pair Study. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology.* janv 1999;37(1):51- 7.
 19. Hmila I, Abdallah R BA-B, Saerens D, Benlasfar Z, Conrath K, Ayeb ME, et al. VHH, bivalent domains and chimeric Heavy chain-only antibodies with high neutralizing efficacy for scorpion toxin AahI’. *Molecular Immunology.* août 2008;45(14):3847- 56.
 20. Wagner H, Wehrle S, Weiss E, Cavallari M, Weber W. A Two-Step Approach for the Design and Generation of Nanobodies. *IJMS.* 2 nov 2018;19(11):3444.
 21. Bagheri M, Babaei E, Shahbazzadeh D, Habibi-Anbouhi M, Alirahimi E, Kazemi-Lomedasht F, et al. Development of a recombinant camelid specific diabody against the heminecrolysin fraction of *Hemiscorpius lepturus* scorpion. *Toxin Reviews.* 2 janv 2017;36(1):7- 11.
 22. Morrison C. Nanobody approval gives domain antibodies a boost. *Nat Rev Drug Discov.* juill 2019;18(7):485- 7.



En ligne
<https://www.atrss.dz/ajhs>



Mise au point

Y'a-t-il une Place pour l'Assistance Cardiopulmonaire (ECMO) dans la prise en charge des Envenimements Scorpioniques Graves ?

Is there a Place for Cardiopulmonary Assistance (ECMO) in the Management of Severe Scorpionic Envenomations?

Soualhi Mohamed Islem^{1*}, Delma Kilani¹, Kerboua Kheireddine², Zebouchi Malik³, Iaiche Achour Toufik⁴

¹ Anesthésie réanimation EPH Ouargla

² Laboratoire de Médecine Saharienne, Faculté de Médecine, Université Kasdi Merbah-Ouargla, Algérie

³ Anesthésie Réanimation CHU Beni Messous

⁴ Service Anesthésie Réanimation CHU Hussein Dey (Ex Parnet), Alger. Directeur du laboratoire de recherche en santé

RESUME

La gravité de l'envenimation scorpionique est liée au tropisme cardiaque du venin scorpionique qui va engendrer une myocardite toxique fulminante sur cœur sain. La prise en charge actuelle repose sur un traitement symptomatique en plus de l'immunothérapie antiscorpionique. Dans des situations avec atteinte sévère et réfractaire de la pompe cardiaque une assistance circulatoire extracorporelle avec membrane d'oxygénation (ECMO) peut avoir une place comme un moyen thérapeutique efficace et performant dans la prise en charge des envenimements scorpioniques graves dans le cadre d'une stratégie d'assistance cardio-pulmonaire dite : « bridge to recovery » qui signifie un pont vers la récupération.

MOTS CLES : Envenimation scorpionique, Myocardite fulminante, Myocardite adrénérique, SIRS, ECMO.

ABSTRACT:

The severity of the scorpionic poisoning is linked to the cardiac tropism of the scorpionic venom which will cause toxic fulminant myocarditis on a healthy heart. Current management is based on symptomatic treatment in addition to antiscorpionic immunotherapy. In situations with severe and refractory damage to the heart pump, extracorporeal circulatory assistance with an oxygenation membrane (ECMO) can have a place as an effective and efficient therapeutic in the management of severe scorpionic envenomations within the Cardiopulmonary supply strategy known as: "bridge to recovery".

KEYWORDS: Scorpionic poisoning, Fulminant myocarditis, Adrenergic myocarditis, SIRS, ECMO.

* Auteur Correspondant. Tel.:00213550659148
 AdresseE-mail: Soualhi.islem@gmail.com

Date de soumission : 21/06/2020
 Date de révision : 09/06/2020
 Date d'acceptation : 25/07/2020



1. Épidémiologie – Clinique

L'Algérie comme d'autres pays d'Afrique du nord est fortement touchée par l'envenimation scorpionique, elle représente un problème de santé publique. On enregistre plus de 50000 piqures/Année déclarées et une mortalité autour de 50 décès/ année. Les enfants de 5-14 ans occupent la première place en terme de mortalité [1].

Le venin scorpionique entraîne dans les formes graves de multiples défaillances d'organes (cœur, poumon et cerveau) [2-4] mais la principale cause de mortalité reste le choc cardiogénique réfractaire suite à une myocardite toxique fulminante. Cette dernière est définie comme une réaction inflammatoire cardiaque diffuse brutale et sévère qui peut mener au décès par un choc cardiogénique, une arythmie ventriculaire, ou une défaillance multi-viscérale [5]. D'autres manifestations peuvent se voir, notamment des effets sur le système nerveux autonome [4] parasympathique cholinergique (hyper salivation, sueurs profuses, larmoiement, myosis, diarrhées, vomissements, bradycardie, hypotension, hypersécrétion bronchique, priapisme) ou sympathique adrénergique (tachycardie, hypertension, agitation).

Les effets cardiovasculaires les plus fréquents englobent les troubles du rythme cardiaque à type de tachycardie atriale, extrasystoles ventriculaires, troubles de la repolarisation, rarement des blocs de branches [4]. L'insuffisance cardiaque aigue représente moins de 1% de l'ensemble des piqûres de scorpion et est la principale cause de mortalité. Cette proportion est probablement sous-estimée car le critère de sélection est une décompensation clinique telle qu'un œdème aigu du poumon (OAP), ou un choc cardiogénique avec bas débit. Il serait intéressant de faire de manière systématique une échographie cardiaque pour déterminer la véritable proportion des dysfonctions cardiaques.

Des complications neurologiques peuvent également survenir en rapport avec un stimulation du système nerveux périphérique : activité neuromusculaire incoordonnée (mouvements anormaux des membres et des muscles oculomoteurs réalisant un nystagmus, ainsi que des troubles respiratoires d'origine centrale).

2. Physiopathologie des envenimations scorpioniques graves

Le large éventail des manifestations cliniques est attribué principalement à l'activation du système nerveux autonome par les toxines scorpioniques (TS) via des troubles sympathiques et parasympathiques. En effet les α -toxines (α NaScTxS), qui caractérisent les venins des scorpions de la faune algérienne et nord-africaine se lient au site 3 du récepteur sodique sur la surface extracellulaire du canal et retardent l'inactivation des canaux sodiques et déclenchent une tempête autonome médiée par les catécholamines. Cette dernière se traduit par des phénomènes de transpiration, salivation, arythmies et troubles hémodynamiques [6].

L'équipe brésilienne de *Lúcia Helena Faccioli* a pu démontrer grâce à des études expérimentales et cliniques que les cellules de l'immunité innée exposées au venin scorpionique activent des voies pro-inflammatoires qui contribuent à l'expression de symptômes sévères, comme l'OAP lésionnel et la défaillance multi-viscérale [7]. Cette nouvelle facette pathologique de l'envenimation scorpionique pourrait expliquer la détérioration clinique de nos patients qui ne répondent pas à l'immunothérapie antiscorpionique conventionnelle (neutralisation des toxines scorpioniques). Elle pourrait également amorcer de nouvelles pistes thérapeutiques qui ciblent cette voie pro-inflammatoire.

3. Traitement actuel des envenimations scorpioniques graves

La prise en charge actuelle des envenimations scorpioniques graves repose sur l'immunothérapie, considérée jusqu'à présent comme le seul traitement spécifique. Tous les patients avec myocardite fulminante vont avoir besoin d'un support inotrope (dobutamine, adrénaline) pour maintenir une perfusion d'organe satisfaisante. Le levosimendan qui est un sensibilisateur calcique des myofilaments cardiaques augmente la contractilité (effet inotrope)

sans augmenter la consommation en oxygène et sans augmenter le calcium intracellulaire (effet lusitrope) et par son action sur l'ouverture des canaux K⁺ il a un effet vasodilatateurs des muscles lisses (vasodilatation systémique, coronaire et des artères pulmonaires) ce qui va baisser la pré et post charge cardiaque et augmenter le débit coronaire [2]. Une seule dose est administrée sur 24 heures, la concentration efficace est atteinte au bout de 4 heures et ses métabolites sont actifs et gardent des pics sériques jusqu'à sept jours [3]. Le levosimendan pourrait donc avoir un intérêt comme support inotrope pour les envenimations scorpioniques mais il n'a pas encore été testé. L'utilisation de Nitroglycérine peut être nécessaire pour baisser la précharge et post charge et réduire l'œdème pulmonaire [4]. Par ailleurs, les benzodiazépines sont administrées en cas de convulsions, et l'atropine dans les bradycardies sévères. Enfin, la prazosin est utilisée en cas d'hypertension artérielle, car elle réduit les résistances périphériques sans modifier le débit ou la fréquence cardiaque [4].

4. ECMO (extracorporeal membrane oxygenation) et envenimation scorpionique

Le traitement symptomatique (pharmacologique, support ventilatoire, et optimisation hémodynamique) est un pilier de la prise en charge des envenimations scorpioniques auquel on propose d'inclure une suppléance cœur poumon type ECMO.

L'ECMO veino-artérielle est la technique de référence de l'assistance cardiaque mécanique. Les bénéfices attendus sont multiples [8]:

- Rétablissement du transport d'oxygène normal chez un patient incapable de l'assurer par insuffisance cardiaque aigue.
- Oxygénation optimale du sang et décarboxylation efficace dans les situations d'insuffisance respiratoire aiguë.
- Prévention des complications liées aux traitements : volo /barotraumatismes pulmonaires, excès de demande énergétique

cardiaque par surdosage en inotropes, ou aggravation des défaillances viscérales par surdosage en vasopresseurs.

- Rétablissement de la normothermie et optimisation de l'épuration de substances.

L'ECMO utilise un appareillage mobile, constitué principalement d'une pompe centrifuge avec un débitmètre, d'un mélangeur de gaz, d'un oxygénateur à membrane qui assure l'oxygénation et la décarboxylation ; et d'une console d'affichage.

L'ECMO a plusieurs impératifs à savoir une anticoagulation efficace et une prévention des hémorragies graves avec comme objectifs un TCA 2-2,5 fois la normale, un TP supérieur à 50%, un taux de plaquettes supérieur à 150.000g/l, un taux de Fibrinogène supérieur à 2g/dl et d'hémoglobine supérieur à 12 g/dl. Ces mesures sont prises afin d'éviter la thrombose du circuit.

Il est actuellement admis que l'ECMO pourrait occuper une place considérable dans la prise en charge des envenimations scorpioniques. En effet, le taux de survie après mise en place d'une ECMO veino-artérielles dans les états de chocs cardiogéniques avec une *stratégie de suppléance cardio-pulmonaire dite : « bridge to recovery »* [9] dans des centres référents est supérieure à 41% toutes pathologies confondues [10] ; alors que la survie à court terme pour le sous-groupemyocardites fulminantes est de 70 % à 80% [11]. Par ailleurs, quelques expériences positives ont été rapportées dans la littérature concernant l'atteinte cardiaque suite à une envenimation scorpionique avec un taux de survie de 100% [12], ce qui reconforte notre argumentaire pour l'utilisation de l'ECMO dans la prise en charge des envenimations scorpioniques en Algérie.

Notre expérience locale avec les envenimations scorpioniques montre que la majorité des décès surviennent dans les premiers jours post envenimation et que la fonction cardiaque s'altère brutalement dans les premières minutes et commence à se rétablir dans les premières 72 heures. La non réponse au traitement symptomatique associé à

l'immunothérapie est un critère péjoratif pour nos patients.

L'ECMO semble très prometteuse dans ce type de myocardites fulminantes réfractaires car elle intervient le plus souvent sur un cœur sain et chez des patients sans comorbidités. Elle sera probablement utilisée pour une courte période (moins de trois jours) ce qui facilitera sa gestion médicale et paramédicale et réduira aussi le risque de complications liées à cette technique qui sont principalement des troubles de la coagulation de type hémorragique ou thrombotique. Ces complications sont faibles dans les premiers jours et le risque de décès est de 1 à 3 % par jour d'ECMO [13].

Conclusion

L'ECMO pourrait révolutionner la prise en charge de l'envenimation scorpionique grave en Algérie comme outil thérapeutique de sauvetage et dont les indications précises restent à définir ainsi qu'une réflexion collective pour son coût, sa disponibilité et l'organisation des soins avec une telle technologie.

Conflits d'intérêt

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêt

Références

1. Mesbah, R., Merad, B., Alamir. (2012). Données épidémiologiques sur l'envenimation scorpionique en Algérie. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 105:189-193
2. Rognoni, A., Lupi, A., Lazzero, M., Bongo, A. S., & Rognoni, G. (2011). Levosimendan: from basic science to clinical trials. *Recent patents on cardiovascular drug discovery*, 6(1), 9–15
3. Antila, S., Kivikko, M., Lehtonen, L., Eha, J., Heikkilä, A., Pohjanjousi, P., & Pentikäinen, P. J. (2004). Pharmacokinetics of levosimendan and its circulating metabolites in patients with heart failure after an extended continuous infusion of levosimendan. *British journal of clinical pharmacology*, 57(4), 412–415
4. Isbister, G. K., & Bawaskar, H. S. (2014). Scorpion envenomation. *The New England journal of medicine*, 371(5), 457–463
5. Kociol, R.D., Cooper, L.T., Fang, J.C., Moslehi, J.J., Pang, P.S., Sabe, M.A. Shah, R.V., Sims, D.B., Thiene, G. (2020). Recognition and Initial Management of Fulminant Myocarditis: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*; 141:e69–e92
6. Aashima, D. (2019). Scorpion envenomation to therapeutics. *Indian Pediatrics* 56:223-224
7. Reis, M. B., Zoccal, K. F., Gardinassi, L. G., & Faccioli, L. H. (2019). Scorpion envenomation and inflammation: Beyond neurotoxic effects. *Toxicol*, 167, 174–179
8. Le Bel, S. Assistances circulatoires et cardiopathies de l'enfant. DIU réanimation des cardiopathies congénitales 2020. <http://www.arcothova.com/wp-content/uploads/2020/02/Cours-assistances-S-Lebel.pdf> (consulté le 13/06/2020)
9. Rao, P., Khalpey, Z., Smith, R., Burkhoff, D., & Kociol, R. D. (2018). Venoarterial Extracorporeal Membrane Oxygenation for Cardiogenic Shock and Cardiac Arrest. *Circulation. Heart failure*, 11(9), e004905
10. Thiagarajan, R.R., Barbaro, R.P., Rycus, P.T., McMullan, D.M., Conrad, S.A., Fortenberry, J.D., Paden, M.L., & ELSO member centers (2017). Extracorporeal Life Support Organization Registry International Report 2016. *ASAIO journal*, 63(1), 60–67
11. Asaumi, Y., Yasuda, S., Morii, I., Kakuchi, H., Otsuka, Y., Kawamura, A., Sasako, Y., Nakatani, T., Nonogi, H., Miyazaki, S. (2005). Favourable clinical outcome in patients with cardiogenic shock due to fulminant myocarditis supported by percutaneous extracorporeal membrane oxygenation. *Eur. Heart J.*, 26:2185–2192
12. Abdallah, M., Ben Halima, N. (2019). Fatal scorpionic myocarditis: Interest of circulatory assistance (ECMO). *Archives of Cardiovascular Diseases Supplements*. 11,3, e324
13. Dalton, H.J. (2017). Factors associated with bleeding and thrombosis in children receiving extracorporeal membrane oxygenation. *American Journal of Respiratory and critical care medicine*, 196(6):762-771



Disponible en ligne
<https://www.atrss.dz/ajhs>



Lettre à l'Editeur

Notions sur l'Immuno-Allergologie de l'Immunothérapie Antiscorpionique pour les Médecins Sahariens

Some Immuno-Allergy Aspects of Anti-scorpion Immunotherapy for Saharan Doctors

Djenouhat Kamel^{1*}, Kerboua Kheir Eddine², Taguemount Sihem¹

¹Laboratoire d'Immunologie, Faculté de Médecine, Université Alger 1 Benyoucef Benkhedda, Alger, Algérie

²Laboratoire de Médecine Saharienne, Faculté de Médecine, Université Kasdi Merbah-Ouargla, Algérie

* Auteur Corredpondant. Tel.: +213 23 860440; fax: +213 23 860440.
 AdresseE-mail: djenouhatkamel@gmail.com

Date de soumission : 20/06/2020

Date de révision : 03/07/2020

Date d'acceptation : 23/07/2020

Cher Editeur,

Beaucoup de thérapeutes sahariens se doutent de l'innocuité de l'Immunothérapie (IT) antiscorpionique et son potentiel allergisant. Souvent, dans notre pratique quotidienne de prise en charge des piqures scorpioniques on commence par l'injection intraveineuse d'au moins 200 mg d'hémisuccinate d'hydrocortisone avant l'administration de l'IT afin de combattre l'inflammation ainsi que de prévenir les réactions allergiques aux protéines de cheval ou des impuretés chimiques contenues dans les ampoules de l'IT. Malgré les sensibilisations répétées lors des cycles de formation continue des médecins et infirmiers sahariensmettant l'accent que durant la tempête autonome qui caractérise les stades sévères de l'envenimation scorpionique, la décharge adrénérergique semble jouer le rôle de l'antidote de l'anaphylaxie, d'où la nécessité de recommandations écrites dont le but de cette lettre.

1. Allergie immédiate à l'IT antiscorpionique

Beaucoup d'études cliniques rapportent que dans les deux heures qui suivent l'injection de l'IT

antiscorpionique, le patient présentera des démangeaisons, une urticaire, une toux sèche, de la fièvre, des nausées, des vomissements, une diarrhée, une tachycardie et une colique abdominale. Uneminorité de ces patients peut présenter des symptômes plus graves, tels que l'hypotension, un bronchospasme et un œdème de Quincke. Théoriquement, les réactions d'anaphylaxie à l'antivenin sont peu probables dans l'envenimation scorpionique (ES) pour les trois raisons suivantes : (i) Son incidence et sa gravité ont considérablement diminué depuis que les immunoglobulines G (IgG) sont fragmentées et purifiées. Néanmoins, une médiocre purification ou fabrication de l'antivenin (présence de protéines autres que les anticorps, conservateurs, agrégats dus à une mauvaise conservation de l'antivenin, contaminants divers) peuvent les déclencher ; (ii) Les protéines antivenimeuses de cheval, représentées par les fragments F(ab)₂, peuvent provoquer une réaction anaphylactoïde mais qui n'est pas aussi immédiate que l'anaphylaxie de l'allergie de type 1, car cette réaction à l'antivenin est principalement de tpe IgE-indépendante [1]. Elle résulte de l'activation du système du complément par des agrégats d'IgG ou des fragments de Fc, résiduels durant le processus de fabrication de l'antivenin, ou par stimulation directe des mastocytes ou des basophiles par ces fragments

d'anticorps [1]. Sur le plan clinique, les tests cutanés ne sont pas assez fidèles pour prédire les réactions d'hypersensibilité de type 1 [1]; (iii) L'action pharmacodynamique de la "Tempête Autonome" chez l'envenimé scorpionique sévère où la libération massive des catécholamines endogènes agit comme une prophylaxie naturelle contre l'anaphylaxie. Ceci suggère que les signes classiques d'anaphylaxie constatés suite à l'injection de l'IT seraient dus aux mécanismes immunopharmacologiques des toxines- α plutôt qu'à l'allergie à l'antivenin. Par ailleurs et à titre préventif, bien que rare, l'anaphylaxie à l'antivenin devrait être différenciée lors de la prise en charge des cas de piqures scorpioniques en dépit de la présence de la tempête autonome.

Dans la prise en charge des piqués scorpioniques, les thérapeutes évitent souvent la voie intraveineuse (*i.v.*) dans l'injection de l'IT par peur de provoquer des réactions anaphylactiques, de type histaminique ou complément-dépendant, provoquées par les protéines de cheval. Ismail M (1994) rapporte dans la cohorte nationale Saoudienne qu'un petit pourcentage de patients développait des réactions allergiques non sévères à l'IT antiscorpionique de type rashes cutanés, urticaires ou des hypersécrétions bronchiques sans aucun cas d'anaphylaxierapporté [2]. Amaral et al. (1994) et Freire-Maia et al. (1994) trouvent une faible incidence de réactions allergiques immédiates à l'antivenin dans leurs séries aux Brésil et les expliquent, en plus de l'effet protecteur des catécholamines contre l'anaphylaxie, par le fait que l'IT antiscorpionique utilisée contient des fragments $F(ab)'_2$ et non pas des fragments Fc [3]. Les fragments Fc constituent de puissants activateurs du système du complément qui libère les anaphylatoxines C2b et C3a et induit des réactions pseudo-allergiques [3].

2. Maladie sérique à l'IT antiscorpionique

Certain patients développent des réactions retardées suite à l'administration de l'IT antiscorpionique avec des signes cliniques ou symptômes typiques de la maladie sérique; à savoir l'éruption cutanée, la fièvre, le malaise, et les polyarthralgies ou la polyarthrite [4]. La maladie sérique est une réaction d'hypersensibilité de type 3 médiée par des dépôts de complexes immuns circulants dans de petits

vaisseaux, ce qui conduit à des lésions dues à un mécanisme immunopathologique impliquant l'activation du système du complément, des polynucléaires neutrophiles et la thrombo-inflammation. L'antivenin représente l'une des protéines les plus fréquentes et connues pour provoquer la maladie sérique. Cette dernière peut aussi résulter de l'action des haptènes excipients contenus dans ce médicament.

Aux États Unis d'Amérique, sur 1534 patients traités avec l'IT antiscorpionique Anascorp[®], 34 patients ont présenté un total de 39 réactions indésirables graves telles que la détresse respiratoire, hypoxie, ataxie, pneumonie et gonflement des yeux [5]. Il n'est pas clair si ces effets indésirables étaient liés à Anascorp[®], à l'envenimation ou à la combinaison des deux. Seulement huit patients ont été considérés comme présentant une hypersensibilité de type 3 et aucun patient n'est décédé ou a interrompu la participation à l'étude en raison de ces types d'effets indésirables et le reste étaient des réactions immédiates dont l'imputabilité n'a pas été établie. Par ailleurs, LoVecchio F et al. (1999) rapportent que la maladie sérique par un antivenin artisanal composé d'immunoglobulines entières de caprins spécifique aux scorpions *Centruroides* s'est développée chez 61% des 99 patients restants (n=60), avec une durée moyenne des symptômes de 2,8 jours réversibles sous corticostéroïdes et/ou antihistaminiques oraux. Cela illustre parfaitement le danger que présente le sérum antivenimeux de mauvaise qualité [4].

Conclusion

Bien que l'allergie immédiate à l'IT soit peu probable à cause de l'épinéphrine libérée pendant 18 heures par le système nerveux autonome dans les stades sévères de l'ES, les efforts en développement biotechnologique dans le scorpionisme convergent vers la réduction de l'immunogénicité et de la taille des biomolécules neutralisant les toxines en utilisant des techniques de fragmentation, de l'ingénierie moléculaire et la production des nanobodies.

Conflits d'intérêt

Les auteurs ne déclarent aucun conflit d'intérêt

Références

1. Sanaei-Zadeh, H. (2014). Hypersensitivity reaction to scorpion antivenom. *Indian Dermatol. Online J.* 5(Suppl 1):S51–S52
2. Ismail, M. (1994). The treatment of the scorpion-venom syndrome: the Saudi experience with serotherapy. *Toxicon.* 32(9):1019-26
3. Amaral, C.F.,Barbosa, A.J., Leite, V.H., Tafuri, W.L., de Rezende, N.A. (1994). Scorpion sting-induced pulmonary oedema: evidence of increased alveolocapillary membrane permeability. *Toxicon.* 32(8):999-1003
4. LoVecchio, F., Welch, S., Klemens, J., Curry, S.C.,Thomas, R. (1999). Incidence of immediate and delayed hypersensitivity to Centruroides antivenom.*Ann. Emerg. Med.* 34(5):615-9
5. FDA: Highlights of Prescribing Information, Anascorp® Centruroides (Scorpion) Immune F(ab')₂(Equine):<https://www.fda.gov/media/81093/download> (Consulté le 16-07-2020)

RECOMMANDATIONS

AUX AUTEURS

1. REGLES DE PUBLICATION

L'Algerian Journal of Health Sciences (AJHS) est l'organe d'édition et d'information officiel de l'Agence Thématique de la Recherche en Sciences de la Santé (ATRSS). Il s'agit d'une revue à accès libre en ligne, sans frais de soumission ou de publication et à Comité de lecture national et international. Elle publie des articles innovants, offrant une meilleure compréhension des progrès réalisés dans tous les domaines des Sciences de la Santé.

Les travaux soumis doivent être conformes aux instructions ci-dessous, qui sont en harmonie avec les normes de présentation des manuscrits proposées par le Comité International des Rédacteurs de Journaux Médicaux, également connu sous le nom de Groupe de Vancouver (*International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscript submitted to biomedical journals. N Engl J Med*1997;336:310–315).

Tout manuscrit adressé à l'AJHS doit être original, c'est-à-dire qu'en totalité ou dans ses parties essentielles, il ne doit pas avoir fait l'objet d'une publication préalable ni simultanée à la parution dans la revue.

Si des extraits d'autres travaux ou documents sous copyright sont inclus dans l'article, les auteurs doivent fournir une autorisation écrite émanant des détenteurs du copyright et citer les sources de la publication princeps dans l'article. Ces mesures doivent être prises pour éviter le plagiat.

Un contrôle par un logiciel anti-plagiat est systématiquement effectué pour toute soumission. Tout plagiat entraîne le rejet de l'article et la non-consideration de toute soumission ultérieure provenant de l'auteur.

Les travaux soumis à l'AJHS doivent être conformes aux recommandations éthiques de la déclaration d'Helsinki (*"WMA Declaration of Helsinki - Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects"*).

Toute reproduction partielle ou totale des résultats doit respecter les dispositions de la convention Creative Commons <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.fr>

Les articles sont soumis en français, en anglais ou en arabe sous formats Word « .doc ou.docx » et PDF ; des fichiers modèles (prototypes) sont publiés sur le site web de la revue.

La soumission s'effectue exclusivement en ligne sur la plateforme ASJP Algerian Scientific Journal Platform en cliquant sur le lien: <https://www.asjp.cerist.dz/en/PresentationRevue/689>

2. TYPES DE MANUSCRITS

2.1 LETTRE A L'EDITEUR

Une lettre à l'éditeur permet soit de donner un avis sur un article déjà publié soit d'ouvrir un débat, soit de livrer une expérience personnelle. Sa parution, après accord du comité de lecture, se fait dans les délais les plus brefs. Le texte n'excède pas 1500 mots, un tableau et/ou une figure et 05 références.

Elle est signée par trois auteurs au plus et ne comprend qu'une adresse pour la correspondance.

2.2 ARTICLES ORIGINAUX

Il s'agit de tout article présentant des résultats originaux dans le cadre d'essais contrôlés randomisés, d'études d'intervention, d'études de dépistage et de diagnostic, d'études descriptives, d'analyses coût-efficacité, d'études cas-témoins ou encore d'enquêtes épidémiologiques...

Le corps de l'article comprend une introduction qui expose la problématique et les objectifs, Matériels et Méthodes, Résultats, Discussion, et Conclusion. Le texte ne doit pas excéder 4500 mots et comporter au maximum 04 tableaux, 04 figures/photos et 45 références au maximum.

2.3 REVUE GENERALE (Article de Revue)

Une revue générale est une synthèse critique des travaux publiés sur un thème donné et aboutissant à

des propositions utiles et constructives. Ce n'est pas une simple énumération des travaux publiés dans la littérature. Elle doit être rédigée sans parti pris et ne sert pas à démontrer une hypothèse.

La rédaction d'une revue générale est soit demandée par le rédacteur en chef à un auteur, soit proposée par ce dernier. Dans cette éventualité, l'auteur doit prendre contact avec le rédacteur en chef avant de commencer la rédaction pour s'assurer auprès de lui que le sujet intéresse le comité de rédaction et qu'aucun travail similaire n'est en cours de publication. Une revue générale n'excède pas 5000 mots et peut aller jusqu'à 120 références.

2.4 MISE AU POINT

Une mise au point traite les développements récents sur un sujet d'actualité. Elle obéit aux mêmes instructions que celles de la revue générale dont elle diffère par son caractère moins exhaustif. Le texte ne doit pas excéder 3000 mots et 50 références.

2.5 CAS CLINIQUE

Il permet de publier une ou plusieurs observations originales et bien documentées, à valeur didactique et scientifique. Il comprend une courte introduction, l'observation réduite aux faits significatifs, une discussion et une conclusion. Le texte ne dépasse pas 2500 mots, un tableau et/ou une figure et 15 références au maximum.

3. PRESENTATION DU MANUSCRIT

3.1 TITRE, AUTEURS ET AFFILIATIONS

- Le titre doit être suffisamment explicite, reflétant en particulier les objectifs de l'étude, la population de l'étude et le lieu.
- Le titre doit être rédigé en français et en anglais.
- Pour les articles soumis en arabe, le titre doit être rédigé en arabe, en français et en anglais.
- Un titre court devra être fourni par l'auteur pour l'entête de l'article.
- Les noms complets des auteurs, adresses électronique et affiliations de chacun des auteurs doivent être mentionnés.
- Préciser le nom et le numéro de téléphone et l'adresse e-mail de l'auteur correspondant à qui seront adressés les commentaires des reviewers et les tirés à part.
- Dans le cas où il y aurait deux auteurs principaux, les auteurs sont tenus de le mentionner.

3.2 RESUMES ET MOTS-CLES

Hormis la lettre à l'éditeur, chaque article devra comporter un résumé et des mots clés en français et en anglais. Pour les articles soumis en arabe, un résumé et des mots clés en arabe et en anglais sont requis.

Le résumé ne doit contenir aucune abréviation non définie ni référence.

- Pour les articles originaux, le résumé n'excède pas 300 mots ; il doit être structuré : Introduction, Matériels et Méthodes, Résultats, et Conclusion. 05 mots clés sont requis au maximum.
- Pour les revues générales et les mises au point, un résumé non structuré n'excédant pas 300 mots et 05 mots clés au maximum.
- Pour les cas cliniques, un résumé structuré : Introduction et observation n'excédant pas 200 mots et 05 mots clés au maximum.

3.3 TABLEAUX

Les tableaux doivent être numérotés en chiffres arabes et indexés dans le texte par ordre d'apparition entre parenthèses. Le titre est placé au-dessus du tableau et les notes explicatives éventuelles au-dessous.

3.4 FIGURES

Toutes les figures doivent être numérotées en chiffres arabes. Les chiffres doivent toujours être cités dans le texte dans un ordre numérique consécutif. Les parties des figures doivent être désignées par des lettres minuscules (a, b, c, etc.). Le titre est placé au-dessous de la figure et doit comporter une référence si la figure est extraite d'un autre travail publié.

3.5 ABREVIATIONS

Les abréviations dans le texte doivent être définies à la première mention et utilisées de manière cohérente par la suite. Dans les tableaux et les figures, les abréviations doivent être précisées en dessous des tableaux et des figures avec une police de 8.

3.6 REMERCIEMENTS

Les remerciements peuvent être mentionnés. Si des financements doivent être déclarés, les noms des organismes de financement doivent être précisés en entier.

3.7 CONFLITS D'INTERET

Les auteurs doivent déclarer tout lien d'intérêt en rapport avec leur travail de recherche. Un lien d'intérêts existe quand un auteur ou un coauteur a des relations financières ou personnelles avec d'autres personnes ou organisations qui sont susceptibles d'influencer ses jugements professionnels concernant une valeur essentielle.

3.8 REFERENCES

Dans le texte, les numéros de référence doivent être mis entre crochets [] et avant la ponctuation; par exemple [1], [1-3] ou [1,3].

Lorsque la référence comprend plusieurs auteurs, il convient de les citer tous.

Les références sont présentées conformément aux normes de Vancouver (*International Committee of Medical Journal Editors* <http://www.icmje.org/>) selon le style APA comme indiqué ci-dessous :


1. Pour les articles originaux: Auteur 1, A.B., Auteur 2, C.D. (année). Titre de l'article. *Nom abrégé du journal*, Volume, numéro:pp
2. Pour les chapitres de livres: Auteur 1, A.B., Auteur 2, C.D. Titre du chapitre. Titre du livre; Editeur 1, A., Editeur 2, B., Eds.; Editeur: Lieu de Publication, Pays, année; Volume, p.
3. Pour les ouvrages: Auteur 1, A.B., Auteur 2, C.D. Titre du livre; Editeur: Lieu de publication, Pays, année; pp
4. Pour les articles en pré-publication: Auteur 1, A.B., Auteur 2, C. Titre de l'article non publié. Nom abrégé de la revue, stade de la publication (en cours de révision, accepté, sous presse).
5. Pour les travaux présentés lors de congrès: Auteur 1, A.B. (Université, Ville, Pays); Auteur 2, C. (Institut, Ville, Pays). Communication personnelle, année
6. Pour les présentations publiées sur des actes: Auteur 1, A.B., Auteur 2, C.D., Auteur 3, E.F. Titre de la présentation. Acte du nom de la conférence, lieu de la conférence, pays, date de la conférence; Éditeur: ville, pays, année (si disponible); Numéro de l'abstract (facultatif), pagination (facultatif)
7. Pour les travaux de thèse: Auteur 1, A.B. Titre de la thèse. Nom de l'Université, année de soutenance. Titre du site. Disponible en ligne: URL (consulté le jour, mois, année)
8. Pour les travaux publiés sur des sites web: Adresse du site. Disponible online: URL (consulté le: jour, mois, année)

Adresse de l'ATRSS : Cité du Chercheur (Ex : IAP) Route
de l'Aéroport Ahmed Ben Bella, Es-Sénia, Oran, Algérie.

BP 1801/08-31000 Oran El M'Naouar.

Adresse électronique de l'ATRSS : [AJHS @atrss.dz](mailto:AJHS@atrss.dz)

Site de l'AJHS : <https://ajhs.atrss.dz>



Volume 2 • Supplément 1 (2020) • AJHS N°3 • ISSN : 2710-8082

Agence Thématique de Recherche en Sciences de la Santé

Adresse : Cité du Chercheur (Ex : IAP) Route
de l'Aéroport Ahmed Ben Bella, Es-Sénia, Oran, Algérie.
BP 1801/08-31000 Oran El M'Naouar.

Email : [AJHS @atrss.dz](mailto:AJHS@atrss.dz)

Site de l'AJHS : <https://ajhs.atrss.dz>