



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique
جامعة محمد بوقرة بومرداس
Université des Science M'Hammed Bougarra de Boumerdes



Faculté des Sciences

Département de Biologie

Mémoire de fin d'étude

En vue de l'obtention du Diplôme de Master en Biologie

Domaine : En Science de la Nature et de la Vie

Spécialité : Biotechnologie et Pathologie Moléculaire

Thème

Développement d'une approche immunoprotectrice chez la souris contre le venin d'*Androctonus australis Hector* : apport d'un immunoadjuvant nanoparticulaire

Présenté par :

Melle Bouaffad Selma

Melle Kacioui Naouel

Soutenu le 30/09/2020 devant le membre de jury suivant :

Mr Messaouden.DJ	Président	MCB	(UMBB)
Mr Nouri.A	Promoteur	MCB	(UMBB)
Mm Djinali.S	Co-promotrice	MAA	(IPA)
Mr Zergoun.A	Examineur	MCB	(UMBB)

Année universitaire : 2019 - 2020

Remerciements

On voudrait adresser nos plus vifs remerciements :

Tout d'abord à notre promoteur **Monsieur Nouri A**, Enseignant à la Faculté des Sciences (INIM) .Veillez trouvez ici Monsieur, l'expression de notre gratitude et de notre sincères remerciements d'avoir assuré la direction de ce travail qui a pu aboutir grâce à vos orientations, au temps et a l'énergie que vous y'avez consacré. On vous remercie pour tout ce qu'on a appris à vos cotés, pour votre patience, pour vos encouragements, pour vos conseils, toujours judicieux, pour votre rigueur scientifique, pour votre disponibilité à tout moment.

Vos compétences et votre rigueur ont suscité en nous un profond respect et une grande estime.

A **Madame Djilani S**, Maitre assistante en pharmacie galénique (IPA) on vous remercie Madame pour la confiance en nous accueillant dans votre laboratoire et d'accepter d'examiner ce travail .On vous prie de trouvez ici Madame le témoignage de notre reconnaissance, de notre haute considération et de notre profond respect.

A **Monsieur Messaouden DJ**, Enseignant et chef de département de la Biologie à la Faculté des sciences (UMBB), on vous remercie de nous honorer de votre présence dans ce jury en acceptant d'examiner ce travail.

A **Monsieur zargoun M.A**, Enseignant à la Faculté des sciences (UMBB), on vous remercie de nous honorer de votre présence dans ce jury. Pour votre temps accordé à la lecture et à l'examination minutieuse de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

À mes très chers parents, ma fierté

À mon grand père Abdi Sadek

À mon frère Younes Massinissa et ma sœur Yasmine

*Pour leur soutien, leurs amitiés et leur appui à mes projets
et pour tous les principes et valeurs intemporels qu'ils
m'ont inculquée*

*Et à tous qui me sent chers ainsi que toutes les personnes
qui ont cru, croient et croiront toujours en moi.*

Selma

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

À ma famille, elle m'a doté d'une éducation digne, son amour a fait de moi ce que je suis aujourd'hui

Particulièrement à mes parents pour l'effort qu'ils ont suscité en moi

À mes amis pour leur encouragement

Et à ceux qui sont chers à mon cœur et à tous ceux qui m'aiment.

Nacuel

Sommaire

Introduction.....	1
1. Généralités.....	4
1. Les scorpions.....	5
2. Le venin d'Aah.....	5
2.1. Composition et mode d'action.....	5
2.1. Fraction non toxique.....	5
2.1.2. Fraction toxique.....	5
2.1.2.1. Toxines longues.....	6
•Toxine α	6
•Toxine β	6
2.1.2.2. Toxines courtes.....	7
3. la toxicité in vivo du venin.....	7
4. Toxico cinétique de venin.....	7
5. La Symptomatologie de l'envenimation scorpionique.....	8
6. Traitements de l'envenimation scorpionique.....	11
6.1. Traitement symptomatique.....	11
6.2. Immunothérapie antiscorpionique.....	11
7. Les adjuvants immunologiques.....	14
7.1. L'adjuvant de Freund.....	14
7.2. Les adjuvants aluminiques.....	15
7.2.1. Le mécanisme d'action des adjuvants à base d'hydroxyde d'aluminium.....	15
a) Effet pro-phagocytaire.....	16
b) Activation de l'inflammasome NLRP3.....	16
c) Effet sur les cellules dendritiques.....	20
d) Stimulation des réponses immunitaires adaptatives.....	21
7.3. Les nanoparticules d'hydroxyde d'aluminium.....	23

2. Méthodologie.....	24
2.1. Synthèse des nanoparticules d'hydroxyde d'aluminium.....	25
2.2. Caractérisation physicochimique des préparations d'immunisation.....	25
2.1. Analyse structurale des préparations d'immunisation.....	25
2.2.1.1. Microscopie électronique à transmission.....	25
2.3. Analyse de la composition chimique des préparations d'immunisation.....	25
2.3.1. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier.....	25
2.4. Caractérisation immunologiques des préparations d'immunisation.....	26
2.4.1 Immunisation des animaux.....	26
2.5. Etude de la réponse immunitaire inflammatoire.....	26
2.5.1. Numération des leucocytes périphérique.....	26
2.5.2. Évaluation de l'activité sérique de la myéloperoxydase	28
2.5.3. Evaluation de l'activité sérique de l'éosinoperoxydase.....	28
2.6. Evaluation de la réponse immunitaire spécifique.....	28
2.6.1. Numération des leucocytes (lymphocytes).....	28
2.6.2. Evaluation du titre en IgG spécifique par ELISA.....	28
2.6.2.1. Détermination des titres en anticorps IGg1 / IgG2 chez les souris.....	29
2.7 Evaluation de l'effet immuno-protecteur chez les souris.....	29
2.8 Evaluation de la réactogénicité tissulaire.....	30
3. Discussion générale.....	33
4. Conclusion.....	37
5. Références bibliographiques.....	40

Liste des abréviations

Liste des abréviations

µm: Micrometre.

Aah: *Adroctonus australis Hector*.

Alum: Aluminium potassium sulphate.

APC: Antigen Presenting Cell.

ASC: Adaptor protein apoptosis-associated Speck-like protein.

Bot: *Buthus occitanus tunetanus*.

CARD: Caspase activation and recruitment domain.

CD: Cluster of Differentiation.

CD11c + : Cluster de différenciation 11c.

CD40L : Cluster of Differentiation 40 Ligand.

CDR: Complementary determining region.

DAMPs: Danger Associated Molecular Patterns.

DC: Dendritic Cell.

DL50: The median lethal dose.

ELISA: Enzyme linked Immuno Sorbent Assay.

EPO : Eosinophil peroxidase.

Fab : Fragment antigen-binding.

Fc: Fragment crystallizable.

FCA: Freund complet adjuvant.

ICAM-1: Intercellular Adhesion Molecule 1

Ig: Immunoglobulin.

IL : Interleukin.

ITAM : Immunoreceptor Tyrosine-Based Activation Motif.

KBr : Potassium bromide.

KDa: Kilodalton.

LFA-1: Lymphocyte Function-associated Antigen 1.

mAbs: Monoclonal antibodies.

MGG: May-Grundwald-Giemsa.

MHC : major histocompatibility complex.

MPO: Myeloperoxidase.

MSU: Monosodium urate.

Na +: Ion sodium.

Nb: Nanobodies.

NLR: NOD-like receptor.

NLRP3: Nucleotide binding oligomerization domain (NOD) Like Receptor Protein 3.

NOD: NLR, nucleotide Oligomerization Domain.

NP: Nanoparticles.

OPD: Orthophényldiaminedihydrochloride.

PAMP: Pathogen-associated molecular pattern.

PCR: Polymerase chain reaction.

PGE2: Prostaglandin E2.

PI3K: Phosphoinositide 3-kinase.

PRR : Pattern recognition receptor.

Rpm: rotation per minute.

ScFvs: Single-chain variable fragments.

Syk: Tyrosine-protein kinase.

TCR : T cell receptor.

TEM: Transmission electron microscopy.

TH: T helper.

TLR: Toll like receptor.

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique des formats d'anticorps.....	13
Figure 2 : Activation de l'inflammasome NLRP3 par les sels d'aluminium.....	17
Figure 3 : Effet des adjuvants aluminiques (y compris l'hydroxyde d'aluminium) sur les cellules dendritiques.....	19
Figure 4 : Stimulation de réponse immunitaire humorale par les adjuvants aluminiques en agissant sur les lipides membranaires des cellules dendritiques.....	20
Figure 5 : La stimulation de la réponse adaptative par les adjuvants à base d'hydroxyde d'aluminium.....	22
Figure 6: Leucocytes sur un frottis sanguin coloré au MGG.....	27
Figure 7: Analyse histologique de site d'injection par microscope photonique.....	31
Figure 8 : schéma récapitulatif de protocole expérimental d'immunisation.....	32

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principaux symptômes et gradation clinique des envenimations scorpioniques.....	9
Tableau 2 : Le score « Dermal Draize ».....	30

Introduction

Introduction

L'envenimation scorpionique représente un véritable fléau de santé publique, en particulier dans les zones tropicales et subtropicales du monde (Afrique du nord, Afrique du sud, centre et sud d'Amérique, moyen orient, Inde). (Devaux *et al.*, 2004)(Naceur, Amri and Kharrat, 1999).

A l'échelle mondiale plus de 1 200 000 cas de piqûres scorpioniques et près de 2600 décès sont enregistrés chaque année. (Chippaux and Goyffon, 2008)(Chippaux, 2012).En Algérie, 46762 cas de piqûres sont été recensés en 2015 par le Ministère de la santé, de la population et de la réforme hospitalière provoquant 38 cas de décès. Depuis la création du Comité national de lutte contre l'envenimation scorpionique (CNLES), plusieurs actions ont été menées pour prendre en charge ce problème.

Près de 1500 espèces de scorpions sont décrites à travers le monde quelques unes seulement sont dangereuses pour l'homme. En Algérie les espèces les plus dangereuses responsables de la mortalité chez l'homme sont : *Buthus occitanus tunetanus* (Bot) et *Adroctonus australis hector* (Aah). Cette dernière induit lors d'une piqure l'apparition de divers symptômes qui varient selon leur gravité d'une simple douleur locale qui peut évoluer vers des symptômes systémiques modérés allant souvent vers des complications plus sévères comme l'arythmie cardiaque et l'œdème pulmonaire.

Le venin d'Aah responsable de l'apparition de ces symptômes est un mélange complexe de molécules dont la plupart sont des peptides douées de différents types d'activités biologiques, certains de ces peptides se lient à une variété de cibles principalement les canaux ioniques.

La gravité de l'envenimation scorpionique et la diffusion rapide du venin inoculé dans l'organisme nécessite un traitement efficace à action rapide qui est basé sur l'administration des sérums antivenimeux contenant des anticorps neutralisants. C'est l'immunothérapie antiscorpionique. (Chippaux, 2010).

La génération des anticorps neutralisants pour l'immunothérapie nécessite l'administration d'une formulation vaccinale qui contient la toxine de venin accouplé à un adjuvant pour induire une meilleure réponse immunitaire.

L'hydroxyde d'aluminium est l'adjuvant le plus utilisé grâce à son efficacité et sécurité prouvées. Cependant, l'inoculation des vaccins à base d'hydroxyde d'aluminium peut

provoquer des effets indésirables locaux tels que l'érythème et les granulomes à cause de sa nature particulaire et l'effet de dépôt qu'il induit. (Chippaux, 2010)(He, Zou and Hu, 2015).

L'introduction de nanotechnologie dans le domaine de vaccination a permis le remplacement des adjuvants microparticulaires par des adjuvants nanoparticulaires qui induisent avec l'antigène une meilleure production d'anticorps avec moins d'effets indésirables.

Le but de notre travail est l'amélioration des méthodes d'immunisation par le développement d'une formulation vaccinale à base d'adjuvant d'hydroxyde d'aluminium nanoparticulaire pour améliorer ainsi l'immunothérapie antiscorpionique.

Généralités

Généralités

1. Les scorpions

Les scorpions appartiennent au vaste ensemble des arthropodes venimeux, membres de la classe *Arachnida* et de l'ordre des Scorpions. En Algérie, *Androctonus australis hector* est le scorpion le plus dangereux responsable de la mortalité élevée. Il est d'une couleur jaune ou brune et sa taille peut atteindre jusqu'à 10cm. (Martin-Eauclaire,1999).

2. Le venin de l'*Androctonus australis hector*

2.1. Composition et mode d'action

Le venin de l'*Aah* est un liquide visqueux, stable à PH acide, d'une couleur gris verdâtre, sécrété par les glandes à venin qui se trouvent au niveau du telson. C'est un mélange biochimique complexe contenant une fraction toxique et une fraction non toxique.(Quintero-hernández *et al.*, 2013).

2.1.1. La fraction non toxique

Elle représente 95% du poids sec du venin total, elle renferme des mucopolysaccharides, des bioamines « sérotonine » ainsi que de faibles quantités d'enzymes : hyaluronidases, de phospholipases, des inhibiteurs de protéases. (Zlotkin, Miranda and Nord, 1972) (Goyffon, 2002).

2.1.2. La fraction toxique

Représente uniquement 5% du poids sec du venin, et est composée essentiellement de neurotoxines.

Les premières neurotoxines caractérisées ont été purifiées en 1960 à partir de venins d'espèces de l'Afrique de nord *Androctonus australis hector*. La fixation de ces toxines sur leurs récepteurs est responsable de la totalité de la toxicité du venin. (Miranda and Rochat, 1964).

Selon les critères pris en compte, les toxines peuvent avoir plusieurs classifications. Elles sont classées en toxines longues et toxines courtes en fonction de leur longueur des chaînes peptidiques qui les composent.

Les toxines du scorpion présentent un motif structural commun composé d'une hélice α et d'un feuillet β . Ces structures sont reliées par 3 ponts disulfures, des liaisons covalentes qui confèrent à l'ensemble du motif une stabilité remarquable. La structure reste ordonnée, même dans l'eau portée à ébullition ou après traitement par des agents dénaturants. (Petricevich, 2010).

2.1.2.1. Toxines longues

Ce sont des polypeptides de 6.5 à 8.5 kDa, composées de 60 à 76 résidus d'acides aminés réticulés par 3 à 4 ponts disulfures. Elles agissent sur les canaux sodiques Na^+ en inactivant le potentiel de fermeture sans modifier le potentiel d'ouverture. Elles n'agissent que sur les canaux ouverts et sont dites « potentiel dépendantes ». Les toxines longues se subdivisent en toxines α et β . (Possani *et al.*, 2001).

- **Toxine α**

Les toxines de ce type se lient au site 3 du canal sodique et elles peuvent être divisées en 3 sous groupes :

- ❖ Les toxines α classiques
- ❖ les toxines α like
- ❖ les toxines α spécifiques des insectes. (Bosmans, 2007).

Les toxines α classiques sont très toxiques pour les mammifères. La plus active de ces toxines est la toxine *AahII* du venin de scorpion *Androctonus australis Hector*. Cette dernière représente 50% de l'activité létale de venin. (Bougis, 1999).

- **Toxine β**

Ces toxines se fixent sur le site 4 des canaux sodiques et elles peuvent être divisées en 3 sous groupes.

- ❖ Les toxines β_m qui agissent sur les mammifères.
- ❖ Les toxines β_i qui agissent sur les insectes.

- ❖ Les toxines β like ou mixtes qui agissent sur les mammifères et les insectes. (Bosmans, 2007).

2.1.2.2. Toxines courtes

Les toxines courtes sont présentes dans les venins en très faible quantité (moins de 1% du poids sec) sont des polypeptides d'une masse moléculaire avoisinant les 3 à 4 kDa et sont constituées de 30 à 45 résidus d'acides aminés. (Bougis, 1999). Elle renferme les toxines actives sur les canaux potassique, calcique et chlorure. Leur structure renferme deux hélices α et un feuillet β stabilisés par 3 ou 4 ponts disulfures. (Quintero-hernández *et al.*, 2013).

3. la toxicité in vivo du venin

La toxicité de venin est estimée en DL50 à 0.85 mg/Kg par voie intra-péritonéale. Elle varie selon la taille, l'âge, la nutrition et les conditions climatiques dans lesquelles évolue le scorpion. (Zlotkin, Miranda and Nord, 1972).

4. Toxicocinétique du venin d'*Aah*

Le venin d'*Aah* a une cinétique très rapide et un temps d'élimination d'environ 13 minutes après injection par voie intraveineuse et entre 35 à 53 minutes après injection par voie sous-cutanée.

La distribution du venin dans le compartiment extravasculaire est rapide expliquant l'apparition précoce des symptômes de l'envenimation par *Aah*.

Les études de l'envenimation expérimentale par le venin de *Aah* ont montré que l'injection de ce venin par voie intraveineuse est suivie par une liaison étroite de ses composants aux protéines plasmatiques ; par conséquent avoir un faible volume de distribution alors que suite à l'injection par voie sous-cutanée, la distribution des composants du venin s'effectue en plus à travers le système lymphatique pour atteindre leurs cibles cellulaires à savoir les canaux Na^+ des cellules nerveuses. (Devaux *et al.*, 2004).

5. la symptomatologie de l'envenimation scorpionique :

Les envenimements ont une symptomatologie polymorphe et d'intensité variable, Selon la gravité des symptômes, les cas d'envenimation ont été classés en trois grades variant de réactions locales réversibles à des manifestations sévères mettant en danger le pronostique vital de la victime. Le tableau 1 résume le classement des principaux signes cliniques observables chez les victimes de l'envenimation scorpionique. (Khattabi, Soulaymani-bencheikh and Achour, 2011).

Tableau 1 : Principaux symptômes et gradation clinique des envenimements scorpioniques.

(Khattabi, Soulaymani-bencheikh and Achour, 2011).

Grade	Symptômes inflammatoires	Symptômes digestifs	Symptômes neurologique	Symptômes cardiovasculaires	Symptômes pulmonaires
0	Douleur minime (pique d'épingle) Pas d'ecchymose ni d'œdème	Parfois nausées	Pas de signe local ou général	Parfois palpitation	Parfois respiration rapide
1	Douleur vive, Ecchymose site pique, œdème circonscrit	Parfois nausée	Paresthésie locales (fourmillements, picotements, éruption bulleuse, engourdissement)	Parfois palpitation	Parfois respiration rapide
2	Douleur	Ballonnement abdominal, bouche sèche, nausée, diarrhée, hémorragie gastro-intestinale, vomissements	Maux de tête	Hypertension artérielle Bradycardie ou tachycardie Vasoconstriction	Dyspnée, râles bronchiques
3	Douleur	Ballonnement abdominal, bouche sèche, nausée, diarrhée, hémorragie gastro-intestinale, vomissements	Convulsion, trouble de la conscience, paralysie, coma	« Myocardites scorpionique » = arythmie, bradycardie, hypotension/ hypertension	Cyanose, dyspnée grave, œdème aigu du poumon

6. Traitements de l'envenimation scorpionique

Actuellement, la conduite thérapeutique est basée sur deux types de traitement, le premier est le traitement non spécifique ayant pour but de corriger ou d'inverser les troubles engendrés par l'action du venin sur les organismes cibles et le second est le traitement spécifique visant à neutraliser les neurotoxines par des anticorps spécifiques (Devaux and Rochat, 2002) .

6.1. Traitement symptomatique

Ce traitement vise à atténuer les effets de l'envenimation dans le but de diminuer ou d'inverser les symptômes causés par l'action de venin. La douleur ainsi est atténuée par l'administration des antalgiques, alors que les troubles digestifs, l'hyperthermie, l'hypertension sont traités par des médicaments tels que les antipyrétiques, Métoprolol, Chlorpromazine et les antihypertenseurs. (Devaux and Rochat, 2002)(Goyffon and Billiald, 2007).

6.2. L'immunothérapie antiscorpionique

Développée en 1895 par Calmette, l'immunothérapie passive constitue le seul traitement spécifique des morsures de scorpion.

Elle est fondée sur l'acquisition d'une immunité spécifique par un animal après administration répétée de venin, cette immunoprotection est transférée par injection des anticorps à une victime d'envenimation pour neutraliser le venin et favoriser son élimination rapide. (Chippaux, 2013).

Les sérums antivenimeux furent utilisés après leurs découvertes sans autre procédé de purification que la décantation des éléments figurés du sang. Progressivement, les améliorations technologiques apportées aux sérums thérapeutiques ont permis d'augmenter leur efficacité et leur tolérance. (Chippaux, 2010) La digestion des IgG par des enzymes protéolytiques a permis d'augmenter significativement le rendement de l'immunothérapie passive tout en réduisant les effets secondaires grâce à la suppression du fragment constant (Fc) fixant le complément.

Tout d'abord la pepsine, qui génère les F(ab')₂, puis la papaine qui produit les Fab, ont été utilisées pour obtenir des fragments d'IgG thérapeutiques. (Chippaux, 2010) (Laustsen *et al.*, 2016).

Récemment, plusieurs techniques biotechnologiques ont été appliquées pour la génération des anticorps monoclonaux (mAbs) ou des fragments d'anticorps dans le but de

développement expérimental d'anti-venins de nouvelle génération contre les piqûres de scorpion. Le premier mAb neutralisant produit dans ce domaine été dirigé contre le venin du scorpion d'*Androctonus australis Hector* (Aah), et il a été généré à l'aide de la technologie des hybridomes. (Bahraoui *et al.*, 1988).

La capacité de cloner et de produire synthétiquement des anticorps a ouvert la possibilité de remplacer les lignées cellulaires d'hybridomes et d'explorer également d'autres formats d'anticorps avec des propriétés pharmacocinétiques potentiellement optimisées. Par exemple, des fragments variables à chaîne unique (scFvs) (single-chain variable fragments) ont été développés, et ils ont montré une capacité protectrice contre les toxines de venins. (Mousli *et al.*, 1999)(Devaux *et al.*, 2001). En raison de leur taille réduite (PM autour de 30 kDa), les scFvs présentent plusieurs avantages potentiels, tels qu'une meilleure pénétrabilité tissulaire, augmentation de la biodistribution et diminution de l'immunogénicité. (Wörn and Plückthun, 1999).

Afin d'augmenter leur efficacité, les scFvs peuvent être liés par un éditeur de liens court, créant ainsi des molécules bivalentes capables de se lier simultanément à deux antigènes différents, ces derniers sont fusionnés au niveau génétique. (Juste *et al.*, 2007).

Un autre format d'anticorps important est le domaine variable unique, constitué uniquement de la chaîne lourde de l'anticorps. Ces fragments (communément appelés nanobodies, en abrégé Nb) peuvent être isolés du système immunitaire des camélidés et des requins. (Muyldermans, 2013). Avec un poids moléculaire de 15 kDa, les nanobodies ont connu pour avoir des propriétés bénéfiques d'une bonne stabilité (*ex vivo*), d'un haut niveau d'expression dans les systèmes microbiens, solubilité élevée, bonne spécificité et affinité élevée pour leurs antigènes respectifs. (Cook *et al.*, 2010)(Eyer and Hruska, 2012). Bien que les nanobodies sont rapidement éliminés du sang, leur faible poids moléculaire peut être avantageux pour atteindre les toxines ayant été distribuées dans les organes et les tissus profonds après une piqûre de scorpion. (Richard *et al.*, 2013)(Hmila *et al.*, 2012).

Aucun des mAbs ou fragments d'anticorps susmentionnés n'a été d'origine humaine. Par conséquent, ils présentent un risque de provoquer des effets indésirables chez les receveurs humains. Une tentative pour surmonter ce problème est illustrée par le développement des anticorps humains chimériques, qui sont obtenues en joignant les gènes de région variable d'une molécule d'anticorps produite à partir d'une lignée cellulaire de myélome avec des gènes de région constante d'immunoglobuline humaine. (Morrison *et al.*, 1984).

Les régions non humaines du mAb résultant sont réduites tandis que les propriétés pharmacocinétiques restent inchangées.(Garcı *et al.*, 2004).

Des procédures d'humanisation ont été développées pour les mAbs murins et ses divers formats, mais l'humanisation reste une procédure complexe, souvent accompagnée d'une diminution de l'affinité et de capacité de neutralisation des molécules. Par conséquent, les mAbs devraient idéalement être d'origine humaine pour être inclus dans les antivenins. (Vaswani and Hamilton, 1998)(Vincke *et al.*, 2009).

Au cours de la dernière décennie, quelques mAbs dirigés contre les toxines du scorpion ont été isolés de bibliothèques de phages display humains. Les avantages de l'utilisation de la technologie de phage display incluent la possibilité de modifier les anticorps ou fragments d'anticorps par les techniques d'ingénierie génétique. (Laustsen *et al.*, 2016).

Une approche complémentaire à l'utilisation d'anticorps recombinants ou de fragments d'anticorps est l'utilisation de toxines recombinantes ou de peptides synthétiques pour les procédures d'immunisation animales .Elle permet d'obtenir des sérums antivenimeux avec des titres plus élevés d'anticorps de forte affinité contre les toxines d'intérêt. (Laustsen *et al.*, 2016).

Pour améliorer la réponse immunitaire induite chez les animaux lors de l'immunisation soit avec le venin détoxifié ou avec ces toxines recombinantes et en raison de très petites quantités de venin extraites, des adjuvants ont été ajoutés aux formulations vaccinales d'immunisation ce qui permet l'utilisation d'une petite dose pour moduler la réponse immunitaire.

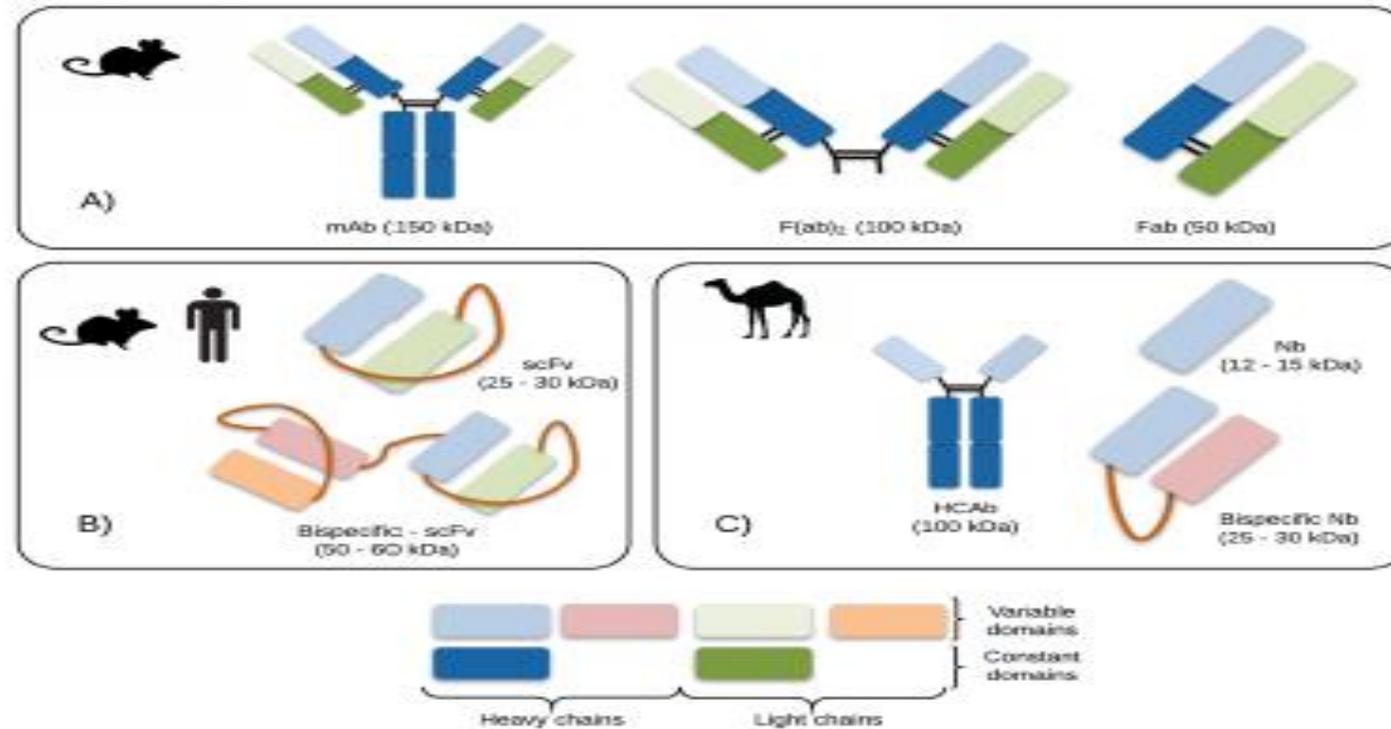


Figure 1 : Représentation schématique des formats d’anticorps mentionnés dans le texte. (A) fragments F (ab)₂ et Fab obtenus après clivage enzymatique des mAbs ;(B) des molécules recombinantes d’anticorps d’origine humaine ou murine, généralement sélectionnées à partir des bibliothèques synthétiques par sélection par phage display ;(C) anticorps à chaînes lourdes des chameaux (HCAb) et ses formats dérivés. (Laustsen *et al.*, 2016).

7. Les adjuvants immunologiques

Dérivé d'un mot latin « *adjuvare* » qui veut dire aider, les adjuvants sont utilisés pour améliorer et potentialiser la réponse immunitaire dirigée contre les antigènes vaccinaux en augmentant leur immunogénicité et par conséquent réduire la dose d'antigène utilisé avec un bénéfice double : d'une part, minimiser les réactions locales ou systémiques et d'autre part, diminuer les coûts de production. (Vermout *et al.*, 2003).

L'activation des cellules T auxiliaires (Th1 et Th2) nécessite des signaux spécifiques d'une cellule présentatrice d'antigène (APC). Les adjuvants ont plusieurs cibles pour interagir avec ce processus et moduler la réponse immunitaire adaptative. Les adjuvants peuvent avoir un impact à différents niveaux tels que:

(1) Reconnaissance d'un motif moléculaire associé à un pathogène(PAMP) par un récepteur PRR.

(2) Présentation d'antigènes par le complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) au récepteur des cellules T (TCR).

(3) Processus de signalisation intracellulaire dans l'APC. (Leroux-Roels, 2010).

7.1. L'adjuvant de Freund

En 1936, Jules Freund (Freund, 1937) a développé une émulsion d'eau dans huile minérale « (water in oil emulsion » contenant des mycobactéries de l'espèce *Mycobacterium tuberculosis* tuées par chaleur, et un agent tensioactif (monooléate de mannide) créant ainsi l'un des adjuvants connus, celui de l'adjuvant complet de Freund (FCA).

Depuis sa description originale, le FCA a été l'adjuvant le plus largement utilisé et le plus efficace pour la production expérimentale d'anticorps. Les capacités immuno-stimulatrices générales du FCA n'ont été dépassées par aucun adjuvant. (Billiau and Matthys, 2001).Cependant son utilisation a été associée à de nombreuses lésions, y compris des granulomes au niveau de site d'injection, et au niveau de plusieurs organes où des microgouttelettes de l'émulsion ont été distribuées par le système lymphatique et circulatoire après injection tel que la rate, les poumons, les reins et le foie. En plus, le FCA est utilisé pour l'induction de nombreux modèles expérimentaux des maladies auto-immunes. (Yamagami *et al.*, 2001)(Billiau and Matthys, 2001).Ce qui rend nécessaire l'utilisation d'autres adjuvants qui induit moins d'effet indésirables.

7.2. Les adjuvants aluminiques

Le principal adjuvant a été appliqué en 1926, lorsqu'Alexander Glenny a utilisé pour la première fois le sulfate d'aluminium et de potassium (Alum) pour formuler un vaccin vétérinaire contre la diphtérie (Glenny, Pope and Wallace, 1925). Les adjuvants aluminiques ont été utilisés par la suite dans les vaccins depuis plus de 80 ans. Ce n'est qu'au cours des deux dernières décennies, de nouveaux adjuvants ont été introduits dans la formulation de nouveaux vaccins autorisés. (Leroux-Roels, 2010).

Les adjuvants aluminiques comprennent principalement l'Alum, l'hydroxyde d'aluminium, le phosphate d'aluminium. Parmi ceux-ci, l'hydroxyde d'aluminium est l'adjuvant le plus couramment utilisé. (He, Zou and Hu, 2015).

Les particules d'hydroxyde d'aluminium d'un diamètre compris entre 1 et 20 μm ont été largement utilisées dans les vaccins humains. (Hem and Hogenesch, 2007). Après l'injection dans l'organisme, l'antigène adsorbé sur ces dernières interagit avec les CPA, ce qui évoque principalement une réponse immunitaire. Avec la décomposition de l'hydroxyde d'aluminium, les antigènes encapsulés sont libérés progressivement, ce qui prolonge la durée de stimulation du système immunitaire. Ce phénomène est appelé «effet de dépôt». (Matheis, Zott and Schwanig, 2002).

L'effet de dépôt a été accepté comme l'un des mécanismes par lequel l'adjuvant d'hydroxyde d'aluminium stimule les réponses immunitaires pendant une longue période, cependant, plusieurs études suggèrent que l'effet de dépôt d'antigènes ne joue pas un rôle important dans l'adjuvantité de l'hydroxyde d'aluminium, et que ce dernier présente des effets supplémentaires qui expliquent ses propriétés adjuvantes. (He, Zou and Hu, 2015)(Hutchison *et al.*, 2017).

7.2.1. Les mécanismes d'action des adjuvants à base d'hydroxyde d'aluminium

Le mécanisme exact par lequel l'hydroxyde d'aluminium stimule la réponse immunitaire reste toujours mal connu cependant plusieurs mécanismes ont été suggérés.

a) Effet pro-phagocytaire :

L'absorption d'antigènes par les APC est essentielle pour l'induction des réponses immunitaires. L'adjuvant d'hydroxyde d'aluminium favorise la phagocytose qui améliore les réponses immunitaires contre les antigènes administrés. (He, Zou and Hu, 2015).

b) Activation de l'inflammasome NLRP3

Plusieurs études suggèrent que l'adjuvant d'hydroxyde d'aluminium cible le NLRP3 (nucleotide binding oligomerization domain (NOD) like receptor protein 3).

NLRP3; également connu sous le nom de NALP3 est un membre de la famille des domaines de liaison aux nucléotides et des gènes contenant des répétitions riches en leucine (NLR). C'est une protéine intracellulaire qui peut détecter divers agents pathogènes, des produits pathogènes, et des cristaux, tels sous forme d'urate monosodique (MSU). (Ogura, Sutterwala and Flavell, 2006).

Lorsqu'il est activé, NLRP3 s'associe à une protéine adaptatrice ASC (adaptor protein apoptosis-associated speck-like protein) contenant un domaine CARD (ASC; également connue sous le nom de PYCARD), qui interagit avec la pro-caspase 1 inactive. Cela facilite l'autocatalyse de la pro-caspase 1 et entraîne la génération de caspase active 1. La caspase 1 clive la pro-interleukin-1 β (IL-1 β), la pro-IL-18 et la pro-IL-33 pour générer les cytokines actives, qui sont ensuite sécrétées par une voie de sécrétion non canonique mal comprise. (Marrack, McKee and Munks, 2009).

La cytotoxicité de l'hydroxyde d'aluminium conduit à la libération de motifs moléculaires associés au danger (DAMPs) tels que l'acide urique par les cellules nécrotiques (Kool *et al.*, 2008). À des concentrations élevées, l'acide urique forme des cristaux d'urate monosodique (MSU), qui sont phagocytés par les cellules résidentes. (Martinon and Glimcher, 2006).

De plus, l'hydroxyde d'aluminium est phagocyté aussi directement par les cellules résidentes (Hornung *et al.*, 2008).

Les cristaux de MSU ou l'hydroxyde d'aluminium phagocyté perturbent les lysosomes, ce qui entraîne la libération de cathepsine B qui peut induire directement ou indirectement un efflux de potassium, qui active l'inflammasome NLRP3. (Marrack, McKee and Munks, 2009) (Figure 2).

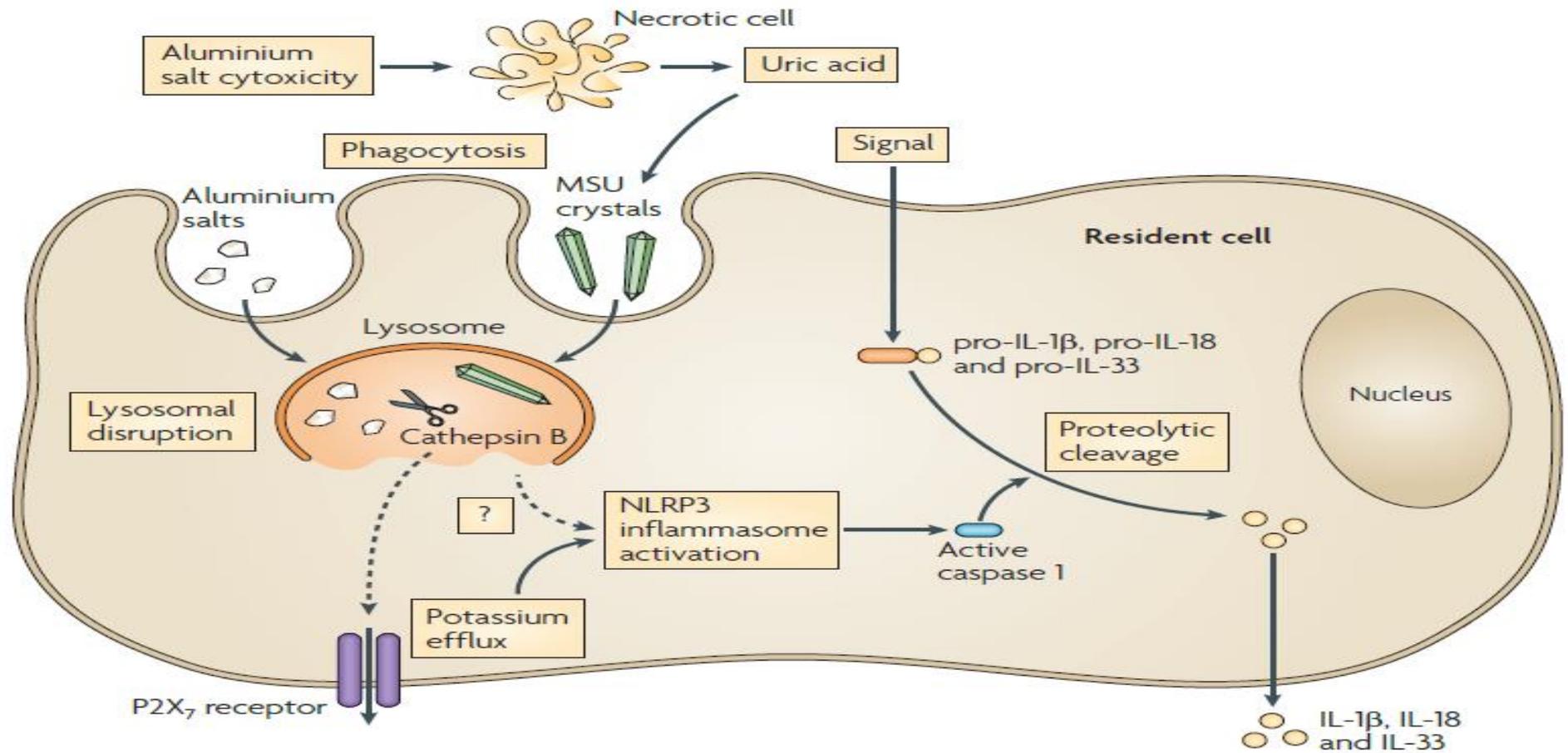


Figure 2 : Activation de l'inflammasome NLRP3 par les sels d'aluminium. (Marrack, McKee and Munks, 2009).

c) Effet sur les cellules dendritiques

L'adjuvant d'hydroxyde d'aluminium peut favoriser la différenciation des cellules dendritiques (DC) et accélérer les réactions inflammatoires locales indépendamment des récepteurs de type Toll (TLR). Son internalisation peut entraîner une déstabilisation et une rupture du phagolysosome, ce qui entraîne l'activation de la cathepsine B et ainsi l'assemblage de l'inflammasome NLPR3 et la libération de l'IL-1 β et IL-18.

La déstabilisation des phagolysosomes induit également la sécrétion de prostaglandin E2 (PGE2). Tous ensemble, PGE2, IL-1 β et IL-18 favorisent la différenciation des cellules CD4T en cellules Th2. (HogenEsch, 2012) (Figure 3).

L'hydroxyde d'aluminium également interagit directement avec les lipides de la membrane cellulaire des cellules dendritiques qui servent comme des récepteurs de substitution pour ces derniers. Ils délivrent l'antigène aux DC via l'endocytose. Le tri lipidique qui s'ensuit déclenche une signalisation intracellulaire en chaîne ITAM-Syk-PI3K qui conduit à l'activation des cellules dendritiques. Les DC activées engagent fortement les lymphocytes T CD4+ via la liaison ICAM-1 et LFA-1 pour l'activation ultérieure des lymphocytes B. (Flach *et al.*, 2011) (Figure 4).

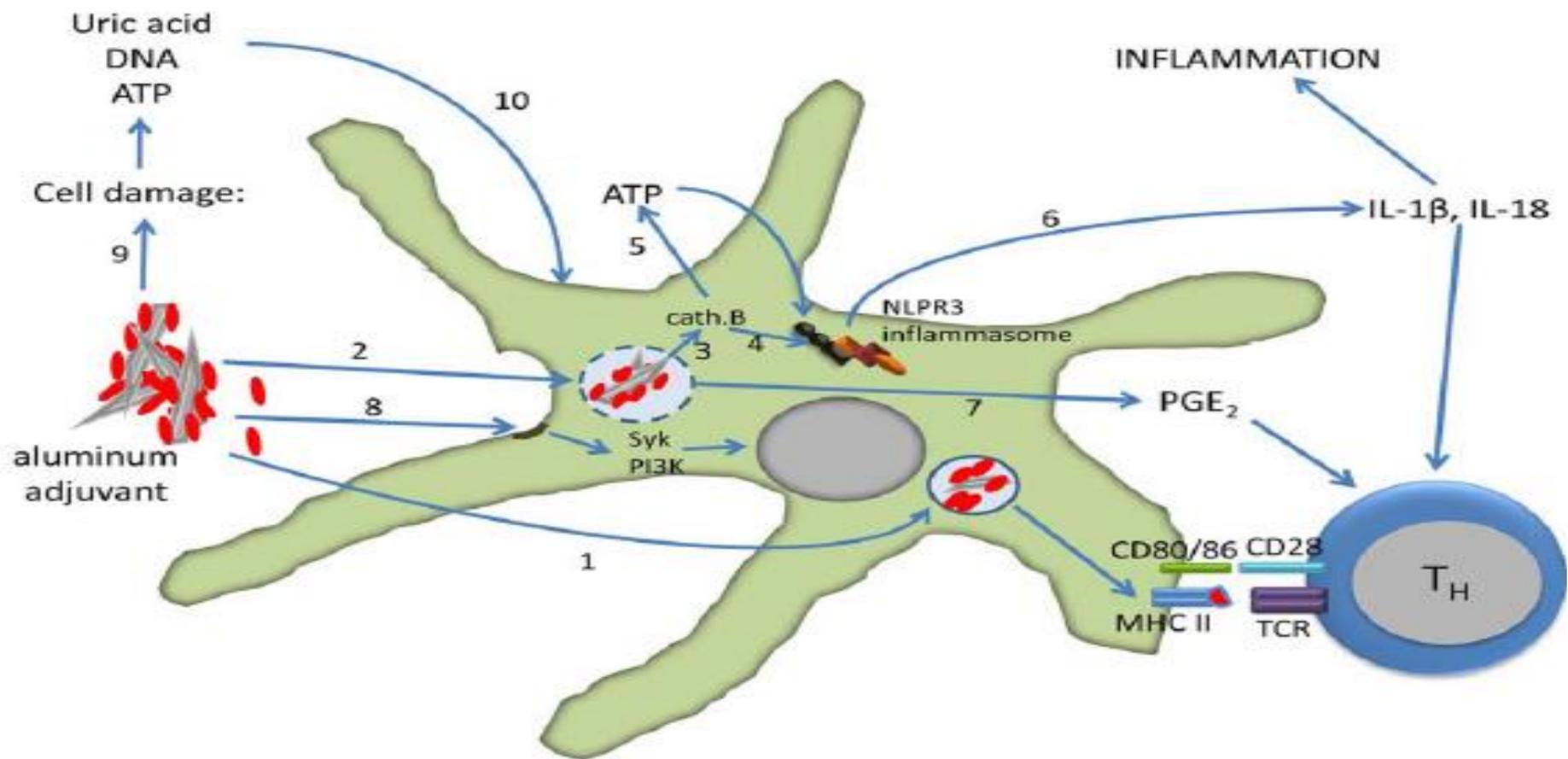


Figure 3: effet des adjuvants aluminiques (y compris l'hydroxyde d'aluminium) sur les cellules dendritiques. (HogenEsch, 2012).

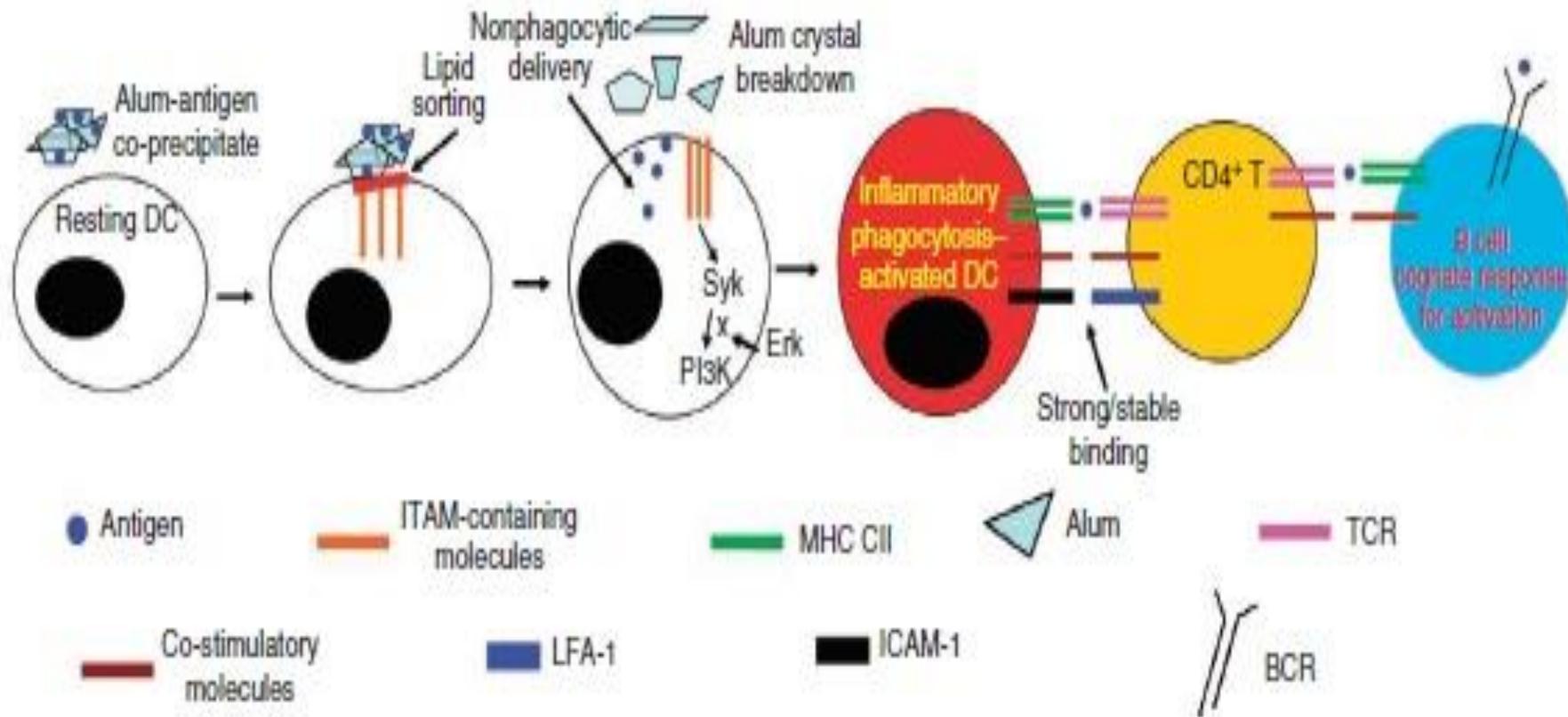


Figure 4: Stimulation de réponse immunitaire humorale par les adjuvants aluminiques en agissant sur les lipides membranaires des cellules dendritiques. (Flach *et al.*, 2011).

d) Stimulation des réponses immunitaires adaptatives

En plus de l'induction de réponses adaptatives de type T helper 2 (TH2), telles que la production d'interleukine-4 (IL-4) par les cellules TH2 et la production d'IgG1 et d'IgE par les cellules B, l'hydroxyde d'aluminium induit également l'accumulation des monocytes, des cellules GR1⁺, des éosinophiles et des neutrophiles au site d'injection. Les monocytes mûrissent en cellules dendritiques CD11c⁺ lors de leur trafic vers les ganglions lymphatiques, où ils activent les cellules T CD4⁺ naïves. Les cellules GR1⁺ sécrètent IL-4, qui inhibe les réponses des cellules TH1, et les éosinophiles améliorent les réponses IgM précoces par les cellules B. Bien que les neutrophiles qui s'accumulent au site d'injection, n'ont aucun rôle connu dans l'immunité adaptative induite par l'hydroxyde d'aluminium. (Marrack, McKee and Munks, 2009). (Figure5).

Malgré son large utilisation dans les vaccins, l'hydroxyde d'aluminium présente de nombreuses limitations telles que l'incapacité de stimulation de la voie Th1 (réponse immunitaire cellulaire) et l'induction des effets indésirables locaux tels que l'érythème, nodules sous-cutanés et des granulomes.

Pour améliorer son adjuvantité plusieurs études ont été réalisées sur la relation entre la forme et la taille de ses particules et l'effet adjuvant induit. (He, Zou and Hu, 2015) (Gheibi Hayat and Darroudi, 2019).

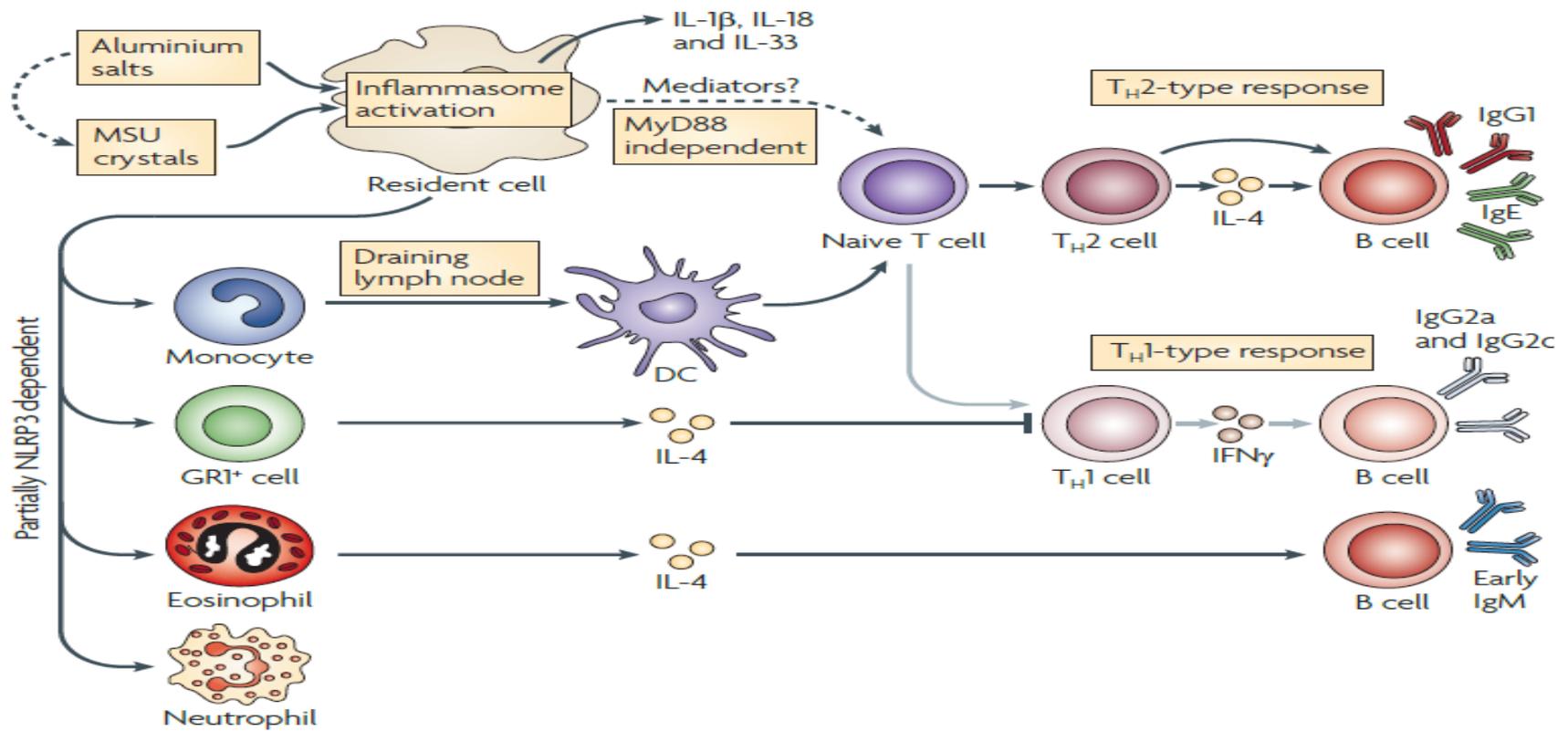


Figure 5 : La stimulation de la réponse adaptative par l'adjuvant d'hydroxyde d'aluminium. (Marrack, McKee and Munks, 2009)

7.3. Les nanoparticules d'hydroxyde d'aluminium

Les nanoparticules (NPs) sont des structures composées de quelques centaines à quelques milliers d'atomes. Du fait de leur taille (1 à 100 nanomètres), les propriétés physiques et chimiques de ces nano-objets sont différentes de celles des matériaux classiques. (Chuto and Chaumet-Riffaud, 2010).

Dans l'ensemble, les NPs pourraient jouer deux rôles dans la préparation vaccinale. Premièrement, ils peuvent être un outil utile pour l'administration passive ou active des vaccins. Deuxièmement, en raison de la propriété d'antigénécité inhérente, ils peuvent bien stimuler le système immunitaire et créer une réponse immunitaire appropriée. (Administra-, 1995) (Couvreur, 2012)(Wilczewska *et al.*, 2012).

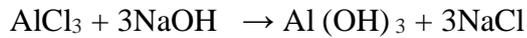
Les NPs en raison des caractéristiques structurelles et de taille peuvent facilement agir comme un virus ou une bactérie et imiter le processus d'une infection naturelle. Ces particules peuvent être absorbées par les cellules présentatrices d'antigène et peuvent ainsi entraîner une stimulation plus forte de la réponse immunitaire. L'une des propriétés des NPs est que les particules inférieures à 100 nm ont la capacité de se transférer du tissu sous-cutané aux ganglions lymphatiques où l'antigène sera présenté aux cellules immunitaires. (Gheibi Hayat and Darroudi, 2019).

Une étude précédente a montré que les nanoparticules d'hydroxyde d'aluminium provoquent une augmentation de la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui induit une activation plus forte des inflammasomes NLRP3 et une production plus élevée d'IL-1 β et d'anticorps, y compris des IgG1 et IgE par rapport aux microparticules de l'aluminium commercial. (Sun *et al.*, 2013).

Méthodologie

2.1. Synthèse des nanoparticules d'hydroxyde d'aluminium

Les nanoparticules d'hydroxyde d'aluminium ont été obtenues par une synthèse par polymérisation chimique selon la réaction suivante :



En faisant réagir les mêmes volumes de chlorure d'aluminium (AlCl_3) 3.6 mg/ml avec l'hydroxyde de sodium (NaOH) 1.6mg/ml La solution a été centrifugée pendant 20 minutes à 2000 rpm afin de sédimenter les nanoparticules d'hydroxydes d'aluminium. (Li, Aldayel and Cui, 2014).

10 ml du culot récupéré a été mélangée avec 0.0023g d'ovalbumine (venin irradié) et 1% du polysorbate a été ajouté à 5 ml de la solution (Nanoparticules + Venin), ces deux solutions ont été traitées par ultrasonication pendant 5 minutes pour disperser les nanoparticules et empêcher leur agrégation.

2.2. Caractérisation physicochimique des préparations d'immunisation

2.2.1. Analyse structurale des préparations d'immunisation

2.2.1.1. Microscopie électronique à transmission

La microscopie électronique à transmission (TEM) est une technique de microscopie où un faisceau d'électrons est transmis à travers l'échantillon. Les nanoparticules d'hydroxyde d'aluminium ont été examinées à l'aide d'un TEM afin d'étudier les caractéristiques morphologiques par la méthode de coloration négative. Ces dernières sont déposées sur une grille puis recouvertes de phosphotungstate, elles sont par la suite séchées et observées en MET.

2.3. Analyse de la composition chimique des préparations d'immunisation

2.3.1. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

La spectroscopie infrarouge est une technique d'analyse rapide permettant d'identifier rapidement les fonctions chimiques des molécules présentes dans les matériaux analysés. Cette technique repose sur l'absorption par l'échantillon de radiations électromagnétiques infrarouges comprises entre 1 et 50 μm (micromètre).

Les nanoparticules d'hydroxyde d'aluminium doivent être séchés et additionnés au Bromure de Potassium (KBr) qui est transparent aux rayonnements infrarouges. Le mélange va être ensuite pressé en pastille avant de lancer l'analyse.

2.4. Caractérisation immunologiques des préparations d'immunisation

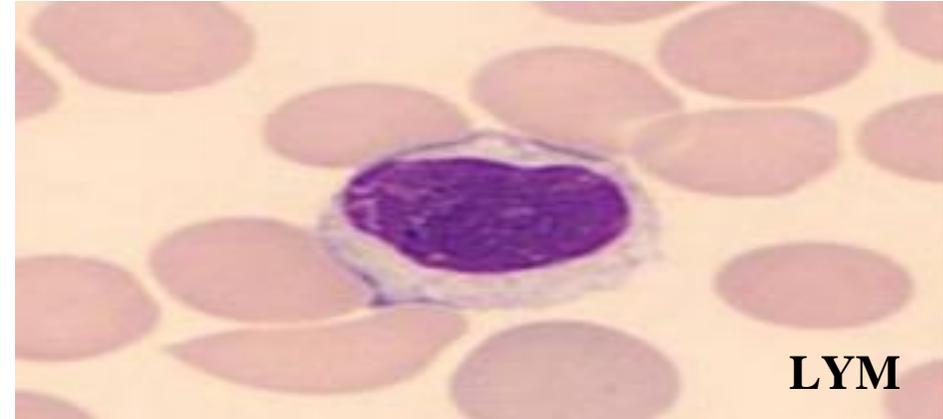
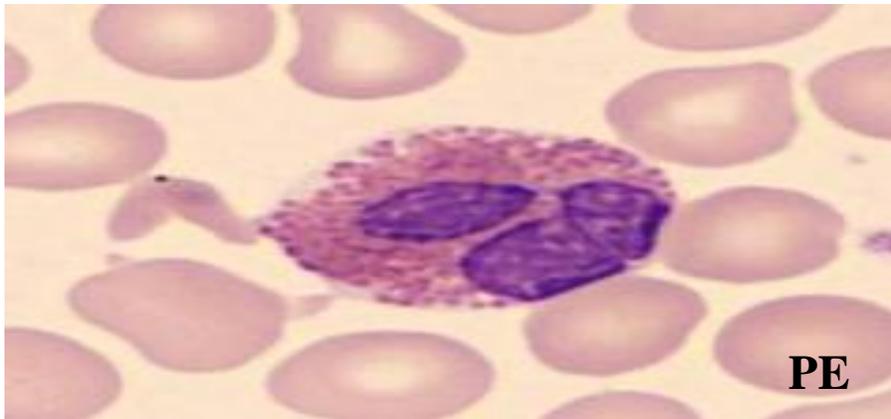
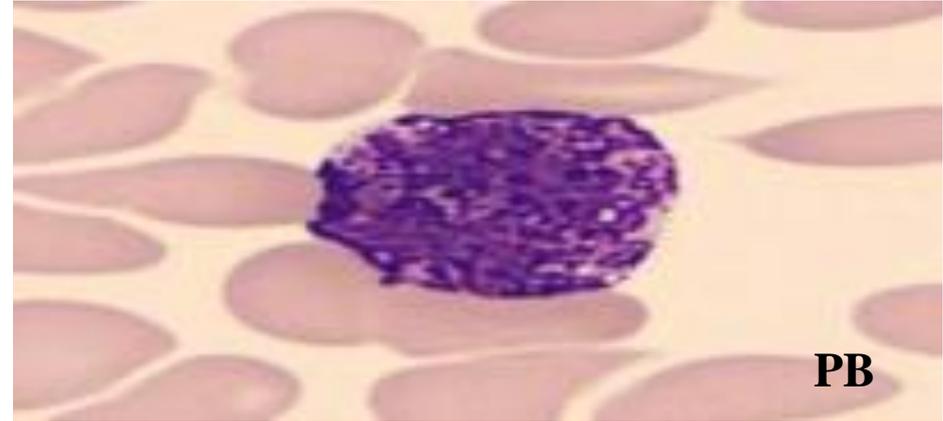
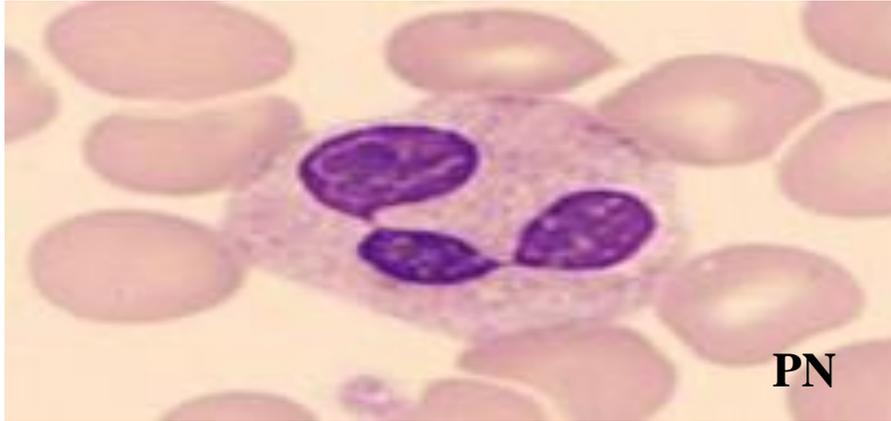
2.4.1. Immunisation des animaux

L'immunisation des souris est réalisée par des injections intramusculaires au niveau des quadriceps des membres inférieures selon un protocole précis. Les souris ont été réparties en groupes et chaque groupe reçoit des injections de formulations préparées avec un intervalle de temps.

2.5. Etude de la réponse immunitaire inflammatoire

2.5.1. Numération des leucocytes périphériques

Le dénombrement des leucocytes, est effectué sur des frottis sanguins colorés selon la méthode de May-Grundwald-Giemsa (MGG). Le principe de cette coloration est basé sur l'action combinée de deux colorants neutres : Le May-Grunwald (3 à 5 minutes) composé d'un colorant acide, l'éosine, et un colorant basique, le bleu de méthylène induit la coloration des granules des éosinophiles, neutrophiles (un bleu ou violette est observé dû au bleu de méthylène). Tandis que le colorant de Giemsa (10 à 30 minutes) constitué de l'éosine, et d'un colorant basique l'azur de méthylène ce dernier colore le cytoplasme des lymphocytes et la chromatine des noyaux (couleur rouge orangé pour les éléments azurophiles). Les lames sont rincées et égouttées après chaque coloration par de l'eau distillée pendant quelques secondes puis laissées sécher à l'air libre et observées sous microscope photonique. (Figure 10)



(PN : polynucléaire neutrophile ; PB : polynucléaire basophile; PE : polynucléaire éosinophile ; LYM : lymphocyte).

Figure 6 : Leucocytes sur un frottis sanguin coloré au MGG.(V-rabat, 2016)

2.5.2. Evaluation de l'activité sérique de la myéloperoxydase

La myéloperoxydase (MPO) est une enzyme hémique présente en concentrations importantes dans les granules primaires des cellules polymorphonucléaires neutrophiles.

Outre son activité de peroxydase, elle présente une activité de chloration, utilisant le peroxyde d'hydrogène et les ions chlorures pour former l'acide hypochloreux, un oxydant fort, capable de chlorer les molécules. Dans le phagolysosome, la MPO exerce une forte activité antimicrobienne. Par contre, les concentrations anormalement élevées en MPO dans le plasma, dans les liquides biologiques et dans les tissus indiquent une activation importante ou excessive des neutrophiles donc l'activité sérique de MPO est un indicateur de l'activation des cellules polynucléaires neutrophiles. (Serteyn *et al.*, 2003).

Le test d'activité de la MPO est basé sur la cinétique d'oxydation de l'O-dianisidine par cette enzyme en présence de H₂O₂.

2.5.3. Evaluation de l'activité sérique de l'éosine peroxydase

L'éosinophile peroxydase (EPO) est une protéine constituée de deux sous-unités de 12,7 et 53 kDa qui catalyse la formation de radicaux libres extrêmement instables et oxydants, ce qui explique l'activité bactéricide et cytotoxique attribuée à cette peroxydase (Carreras *et al.*, 2003). Le test de l'activité de l'EPO est basé sur la cinétique d'oxydation de l'Orthophényl diaminedihydrochloride (OPD), en présence de H₂O₂.

2.6. Evaluation de la réponse immunitaire spécifique

2.6.1. Numération des leucocytes (Lymphocytes)

Le dénombrement des Lymphocytes s'effectue sur des frottis sanguins colorés selon la méthode May-Grünwald-Giemsa (MGG) puis observés au microscope photonique (Gr x 100).

2.6.2. Evaluation du titre en IgG spécifique par ELISA

La technique « Enzyme linked Immuno Sorbent Assay » est une méthode immuno-enzymatique quantitative et qualitative qui met en évidence la présence d'Ag ou d'Ac spécifique dans un liquide biologique.

Cette technique est réalisée sur une plaque de microtitration à fond plat qui est sensibilisée avec une solution de venin natif à 5 µg/ml dissout dans un tampon carbonate - bicarbonates pH 9.6 a raison de 100 µl /puits et incubée à 4°C pendant une nuit. L'excès d'antigène est éliminé par une série de lavages avec le tampon PBS-Tween 20 à 0.1% (pH 7.4 ; 0.1M) et les

sites de fixation non spécifiques sont saturé avec une solution de PBS-Lait écrémé (0.5%) a raison 200 µl/puits. Après une incubation d'une heure et une série de lavages, une gamme de dilutions successives de fragments F (ab') 2 est effectuée dans le tampon PBS (0.1M, pH 7.4) et ré-incuber à 37°C pendant une heure, une série de lavages est effectuée. L'anticorps secondaire anti- IgG dilué à 1/1000 dans un tampon PBS 0.1M est déposé à raison de 100 ul/puits. La réaction immuno-enzyme se développe à l'obscurité et à température ambiante pendant 15 minutes de 100 µl / puits de substrat chromogène composé 10 mg OPD dans 10ml de tampon phosphate (0.01M °; pH 7.4) et 0.3% de H₂O₂.

La mesure de l'absorbance à 490 nm est réalisée après l'addition d'une solution de H₂SO₄ 2N a raison de 50µl/puits. Le titre d'anticorps correspond à l'inverse de la dilution maximale pour la quelle la réaction enzymatique est supérieure au témoin.

2.6.2.1. Détermination des titres en anticorps IgG1/IgG2 chez les souris

L'évaluation de la balance IgG1/IgG2a est utilisé pour déterminer l'orientation de la réponse immunitaire spécifique vers la voie Th2 ou Th1 respectivement. Le protocole d'immunisation des souris consiste à l'introduction des injections des préparations des NPs d'hydroxyde d'aluminium adsorbant le venin détoxifié d'*Aah*.

2.7. Evaluation de l'effet immuno-protecteur chez des souris

Les souris immunisées ont reçu par voie sous – cutanée des doses létales croissantes (1, 2,3 DL50) de venin natif d'*Aah*. La détermination du taux de survie est effectuée après 24 heures de l'injection. Les organes des animaux survivant seront récupérés pour une étude histologique des effets du venin sur les organes-cibles du venin, a savoir le myocarde et le parenchyme pulmonaire.

Pour évaluer le niveau de protection des souris immunisées par la formulation préparée (venin *Aah* détoxifié+NPs) contre le venin natif d'*Aah*, une étude histologique est effectuée en utilisant la coloration à l'hématoxyline éosine. Les animaux survivants après envenimation expérimentale sont sacrifiés, leur organes (cœur, poumon) ont été récupérés et fixés dans du formol et ensuite inclus dans la paraffine pour obtenir des coupes histologique à analyser.

2.8. Evaluation de la réactogénicité tissulaire

Afin de déterminer si les 2 formulations vaccinales (« Venin *Aah* détoxifié conjugué au Nps » et « Venin *Aah* détoxifié conjugué au alum ») administrées par voie sous cutanée sont

susceptibles d'entraîner des effets secondaires locaux, une étude histologique de la peau a été évaluée quotidiennement au site d'injection de nanoformulation.

Tout au long du protocole expérimental, les animaux ont été observés, leur état de santé et leur éventuelle mortalité ou effet secondaire ont été évalués. Les observations comprenaient la peau et la fourrure. La réactogénicité a été évaluée dans les sites d'injections notés pour l'œdème et l'érythème en utilisant le score « Dermal Draize » de 0 à 4. (Tableau 3)

A la fin de cette observation les animaux sacrifiées ont été euthanasiés et une coupe tissulaire du site d'injection était prélever de chaque souris pour une analyse histologique. (Figure 10)

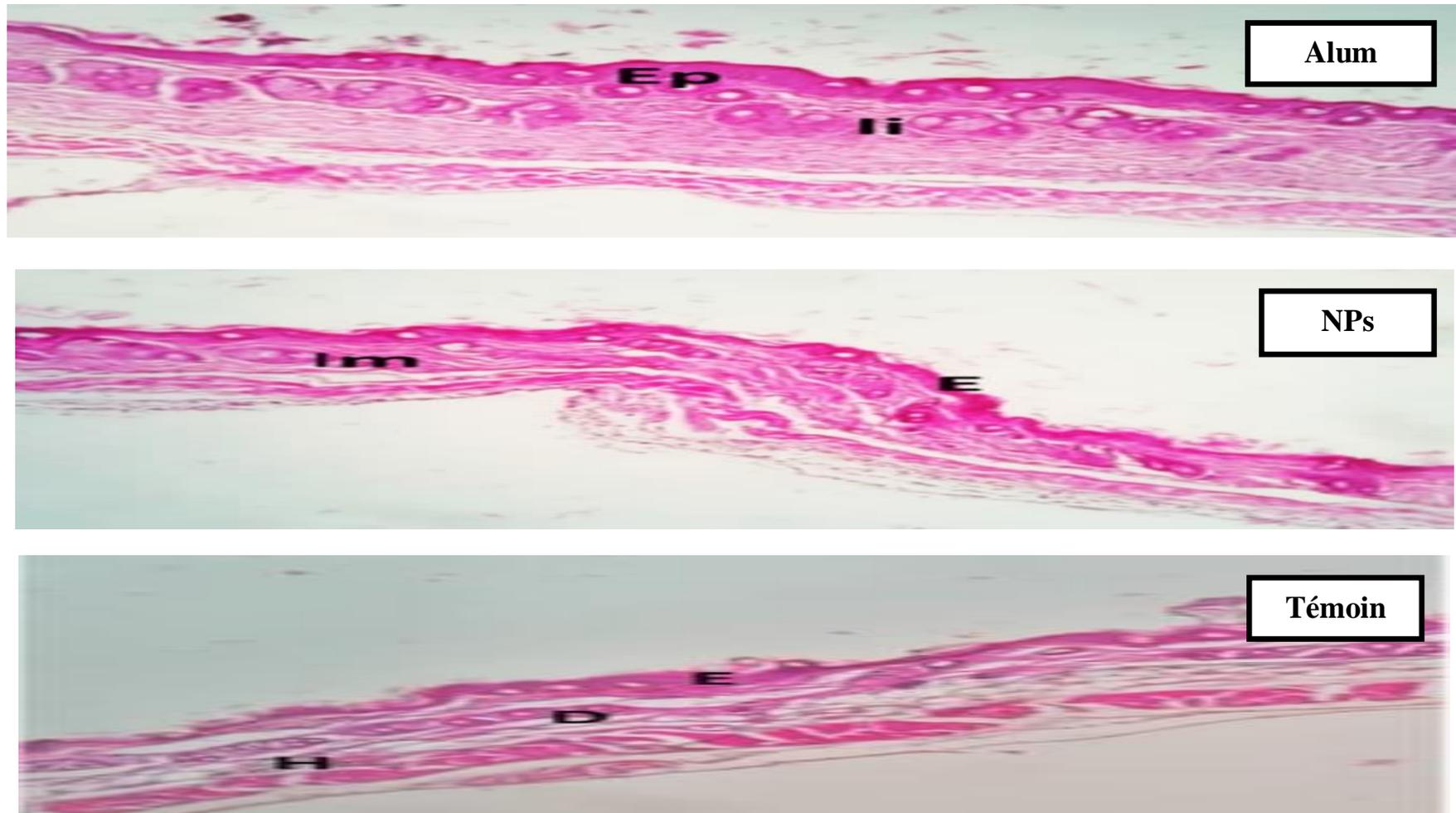
L'examen histologique de la peau des animaux immunisés avec Nps-hydroxyde d'aluminium a mis en évidence une peau semblable à celle du témoin avec une structure histologique typique contenant l'ensemble des éléments structuraux de l'épiderme, un derme bien organisé et une couche adipeuse hypodermique.

La coupe tissulaire de la peau des animaux immunisés avec l'Alum a révélé que le score de Dermal Draize aux points d'injections était limité à un épaissement de l'épiderme qui serait due à un œdème suite au recrutement des cellules inflammatoires.

Dans l'ensemble aucune observation défavorable liée au NPs n'a été observée dans les études de réactogénicité systémique ou locale. (Li, Aldayel and Cui, 2014)(Amokrane *et al.*, 2017).

Tableau 2: Le score « Dermal Draize observations »

Score	Grade	Edema	Erythema
0	None	No swelling	Normal color
1	Minimal	Slight swelling : indisctinct border	Light pink : indistinct
2	Mild	Defined swelling : distinct border	Bright pink /pale red : distinct
3	Moderate	Defined swelling : raised border (<1 mm)	Bright red : distinct
4	Severe	Defined swelling : raised border (≥ 1mm)	Dark red : pronounced



(D : derme ; E : épiderme ; H : hypoderme ; Im : inflammation modérée ; EP : épaissement ; li : infiltration)

Figure 7 : Analyse histologique de site d'injection par microscope photonique. (Hamma yasmine et Kaci manel.2019).

Discussion

L'immunothérapie antiscorpionique est fondée sur l'utilisation d'anticorps produits par un animal hyperimmunisé (généralement les chevaux) contre le venin. Notre objectif dans ce travail est d'améliorer l'immunothérapie antivenimeuse en synthétisant un adjuvant nanoparticulaire d'hydroxyde d'aluminium et en étudiant sa possibilité de remplacer les adjuvants microparticulaires dans les formulations vaccinales d'immunisation.

Il a été déjà rapporté que l'hydroxyde d'aluminium microparticulaire conjugué au venin d'*Aah* détoxifié induit une réponse immunitaire spécifique importante caractérisée par une activation efficace des lymphocytes ainsi que par une production élevée d'anticorps spécifiques. Ces résultats étaient en corrélation avec les activités myéloperoxydase et éosinophile peroxydase respectivement en tant que marqueurs du recrutement des cellules neutrophiles et éosinophiles dans le sang après l'immunisation.

Une augmentation significative du titre d'IgG spécifique a été constatée après un mois d'immunisation primaire. Cet adjuvant provoque une réponse immunitaire Th2 prédominante caractérisée par une production élevée d'anticorps. (Nouri and Laraba-djebari, 2015).

Vu que la taille des particules est l'un des principaux paramètres qui peuvent influencer les mécanismes d'induction des réponses immunitaires, X. Li, et al., dans leur étude, ont comparé entre l'effet adjuvant induit par les microparticules et les nanoparticules d'hydroxyde d'aluminium conjuguées à l'ovalbumine. Ils ont montré que l'activité adjuvante des nanoparticules d'hydroxyde d'aluminium était plus puissante que celle des microparticules d'hydroxyde d'aluminium traditionnelles. (Li, Aldayel and Cui, 2014).

Les réponses spécifiques en anticorps induites par les antigènes protéiques adjuvés avec les nanoparticules d'hydroxyde d'aluminium étaient plus fortes et plus durables que celles induites par la même quantité d'antigènes adjuvés avec les microparticules d'hydroxyde d'aluminium traditionnel. L'activité adjuvante plus puissante des nanoparticules d'hydroxyde d'aluminium peut être partiellement attribuée à leur capacité à se lier plus largement aux antigènes et à augmenter l'absorption des antigènes adsorbés sur eux par les CPA.

De plus, les nanoparticules d'hydroxyde d'aluminium étaient moins pro-inflammatoires que les microparticules au niveau des sites d'injection. (Li, Aldayel and Cui, 2014).

Dounighi et ses collègues ont démontré que les nanoparticules de chitosane chargées de venin de scorpion *M. eupeus* pourraient être mieux soutenues qu'avec des adjuvants conventionnels

chargés de venin et par conséquent, constituer une option alternative aux systèmes adjuvants traditionnels. (Mohammadpour Dounighi *et al.*, 2012).

F. Rebbouh, et al. , ont utilisé les nanoparticules de chitosane comme une plate forme de livraison pour la neurotoxin II de venin d'*Aah* (*Aah* II). La nano-encapsulation d'*Aah* II avec ces nanoparticules a réduit sa toxicité et protégé les souris jusqu'à 10 DL50. L'*Aah* II nano-encapsulé a provoqué des réponses immunitaires systémiques innées et humorales. Les résultats de leur étude ont été encourageants et prometteurs pour le développement de thérapies préventives contre l'envenimation scorpionique. (Rebbouh, Martin-Eauclaire and Laraba-Djebari, 2020).

Une autre étude précédente utilisant des nanoparticules d'alginate de calcium comme plate-forme de livraison pour le venin d'*Aah* natif et irradié et sa fraction toxique (FtoxG50) a montré que les nanoparticules d'alginate contenant soit le venin irradié ou la fraction irradiée étaient plus immunogènes et plus efficace dans l'induction d'une réponse immunitaire anti-venin spécifique corrélée à une faible réactogénicité.(Nait Mohamed and Laraba-Djebari, 2016) (Amokrane *et al.*, 2017).

En effet, La taille des NPs a un impact significatif sur l'internalisation par les cellules du système immunitaire inné, le déclenchement de la réponse immunitaire innée et leur bio distribution globale in vivo.(Petrarca *et al.*, 2015).

Comparé aux adjuvants traditionnels à base d'hydroxyde d'aluminium, l'adjuvant à l'échelle nanométrique avec la même quantité d'hydroxyde d'aluminium peut adsorber plus d'antigènes en raison d'une plus petite taille de particule, d'une surface spécifique beaucoup plus grande, d'une réactivité de surface plus élevée et d'une capacité d'adsorption plus forte. (He, Zou and Hu, 2015).

Les formulations vaccinales avec l'adjuvant d'hydroxyde d'aluminium nanoparticulaire peuvent stimuler la production d'anticorps précocement comparées aux vaccins traditionnels et améliorer la différenciation des cellules Th en cellules Th1, ce qui conduit à une réponse immunitaire cellulaire plus intense contrairement aux microparticules d'hydroxyde d'aluminium. Par rapport aux adjuvants classiques à base d'hydroxyde d'aluminium, les adjuvants à base d'hydroxyde d'aluminium nanoparticulaire atténuent de manière significative les réactions inflammatoires excessives (par exemple, granulome sous-cutané) au niveau de site d'injection. En plus, les petites NPs se sont rapidement drainées vers les ganglions

lymphatiques (LN) et donc pourraient circuler dans les veines et le drainage lymphatique, offrant une meilleure présentation de l'antigène.(He, Zou and Hu, 2015) (Gheibi Hayat and Darroudi, 2019).

D'après les résultats des études citées au dessus l'utilisation de nanoformulation d'hydroxyde d'aluminium et de venin détoxifié pour l'immunisation des chevaux, va éventuellement induire moins d'effets secondaires au niveau du site d'injection, une faible réactogénicité et une meilleure réponse immunitaire en anticorps. Tous ensembles, ces travaux indiquent que le développement d'une approche vaccinale à partir de nanoparticules d'hydroxyde d'aluminium associé au venin d'Aah sera probablement plus efficace pour l'élaboration d'un sérum anti-scorpionique à capacité de neutralisation plus importante.

Conclusion

Des études expérimentales et épidémiologiques ont démontré que la nouvelle approche immuno-thérapeutique antivenimeuse reste un élément essentiel pour la prise en charge thérapeutique des envenimations scorpioniques dont l'objectif de cette présente étude est de développer la préparation des nanoparticules d'hydroxyde d'aluminium en comparaison avec l'adjuvant classique afin de développer une approche immuno-thérapeutique antiscorpionique.

La caractérisation physicochimique révèle que la préparation d'hydroxyde d'aluminium est une nanoformulation inorganique de forme sphérique d'un diamètre 200 nm environs .La composition de cette nouvelle formulation est identique à celle d'hydroxyde d'aluminium traditionnel avec une efficacité plus puissante dans l'induction d'une réaction inflammatoire moins importante. Les nanoparticules d'hydroxyde d'aluminium assurent une activation plus forte et plus durable de la réaction immunitaire spécifique par un recrutement plus important de lymphocytes et une induction de titre plus élevé d'anticorps spécifiques comparé à l'hydroxyde d'aluminium classique.

L'ensemble de ces résultats nous permet de conclure que l'amélioration du processus de production des anti-sérums utilisés dans l'immunothérapie est possible à travers l'utilisation du venin détoxifié associé au NPs d'hydroxyde d'aluminium comme adjuvant .Cela permettra une meilleure production des anticorps anti venimeux à pouvoir neutralisant plus élevé et un meilleur profil de sécurité.

Cette préparation d'adjuvant nanoparticulaire pourra potentiellement être utilisée dans l'amélioration de la production des antidotes contre d'autres antigènes afin de simplifier les procédés d'immunisation et éviter les effets toxiques des antigènes natifs sur les animaux producteurs de sérum ce qui convient à l'éthique scientifique.

Afin de compléter cette étude et d'apporter plus de précision, il serait intéressant de :

- Réaliser une étude de dépistage pour déterminer les capacités des nanoparticules à induire la production d'IL 4
- Evaluer la réactogénicité des nanoparticules à long terme sur les modèles d'animaux supérieures tels que les primates afin de projeter dans une éventuelle étude sur l'homme.

- Développer et évaluer le potentiel des nanoparticules d'hydroxyde d'aluminium en un adjuvant plus efficace pour formuler de nouveau vaccin et reformuler les vaccins existants.

Références

bibliographiques

- Administra-, D. (1995) 'Nanoparticles as Adjuvants for Vaccines'.
- Amokrane, F. *et al.* (2017) 'Reactogenicity and safety assessment of an attenuated nanovaccine against scorpion envenomation : Preclinical study', *Vaccine*. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.10.028.
- Bahraoui, E. *et al.* (2020) 'Monoclonal antibodies to scorpion toxins . Characterization and molecular mechanisms of neutralization . This information is current as Why The JI ? Submit online . • Rapid Reviews ! 30 days * from submission to initial decision • No Triage ! Every submis'.
- Billiau, A. and Matthys, P. (2001) 'Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases.', *Journal of leukocyte biology*, 70(6), pp. 849–60. doi: 10.1189/jlb.70.6.849.
- Bosmans, F. and Ã, J. T. (2007) 'Voltage-gated sodium channel modulation by scorpion a - toxins', 49, pp. 142–158. doi: 10.1016/j.toxicon.2006.09.023.
- Bougis, E. (1999) 'Les toxines des venins de scorpion', pp. 207–222.
- Carreras, E. *et al.* (2003) 'Articles Both Aromatic and Cationic Residues Contribute to the Membrane-Lytic and Bactericidal Activity of Eosinophil Cationic Protein †', pp. 6636–6644.
- Chippaux, J.-P. (2013) 'Place de l'immunothérapie dans le traitement actuel des envenimations ophidiennes', *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*, 197(4–5), pp. 993–1008. doi: 10.1016/s0001-4079(19)31542-0.
- Chippaux, J. and Goyffon, M. (2008) 'Acta Tropica Epidemiology of scorpionism : A global appraisal', 107, pp. 71–79. doi: 10.1016/j.actatropica.2008.05.021.
- Chippaux, J. P. (2010) 'Immunothérapie d'urgence: antivenins de serpent et de scorpion', *Biologie Aujourd'hui*, 204(1), pp. 61–70. doi: 10.1051/jbio/2009042.
- Chuto, G. and Chaumet-Riffaud, P. (2010) 'Les nanoparticules', *Medecine Nucleaire*, 34(6), pp. 370–376. doi: 10.1016/j.mednuc.2010.03.003.
- Cook, D. A. N. *et al.* (2010) 'Analysis of camelid IgG for antivenom development: Immunoreactivity and preclinical neutralisation of venom-induced pathology by IgG subclasses, and the effect of heat treatment', *Toxicon*, 56(4), pp. 596–603. doi: 10.1016/j.toxicon.2010.06.004.
- Couvreur, P. (2012) 'Nanoparticles in drug delivery : Past , present and future ☆', *Advanced Drug Delivery Reviews*, pp. 4–6. doi: 10.1016/j.addr.2012.04.010.
- Devaux, C. *et al.* (2001) 'Construction and functional evaluation of a single-chain antibody fragment that neutralizes toxin Aahl from the venom of the scorpion *Androctonus australis hector*', *European Journal of Biochemistry*, 268(3), pp. 694–702. doi: 10.1046/j.1432-1327.2001.01923.x.
- Devaux, C. *et al.* (2004) 'Quantitative variability in the biodistribution and in toxinokinetic studies of the three main alpha toxins from the *Androctonus australis hector* scorpion venom', 43, pp. 661–669. doi: 10.1016/j.toxicon.2004.02.021.
- Devaux, C. and Rochat, H. (2002) 'Bases théoriques et expérimentales du traitement des

- envenimations scorpioniques’, *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique*, 95(3), pp. 197–199.
- Eyer, L. and Hruska, K. (2012) ‘Single-domain antibody fragments derived from heavy-chain antibodies : a review’, 2012(9), pp. 439–513.
- Flach, T. L. *et al.* (2011) ‘Alum interaction with dendritic cell membrane lipids is essential for its adjuvanticity’, *Nature Medicine*, 17(4), pp. 479–487. doi: 10.1038/nm.2306.
- Freund (1937) ‘No Title’.
- Garcı, C. *et al.* (2004) ‘Bacterial expression , purification and functional characterization of a recombinant chimeric Fab derived from murine mAb BCF2 that neutralizes the venom of the scorpion *Centruroides noxius hoffmann*’, 43, pp. 43–51. doi: 10.1016/j.toxicon.2003.10.015.
- Gheibi Hayat, S. M. and Darroudi, M. (2019) ‘Nanovaccine: A novel approach in immunization’, *Journal of Cellular Physiology*, 234(8), pp. 12530–12536. doi: 10.1002/jcp.28120.
- Glenny, A. T., Pope, C. G. and Wallace, U. (1925) ‘Immunological notes’.
- Goyffon, M. (2002) ‘Dossier scientifique’.
- He, P., Zou, Y. and Hu, Z. (2015) ‘Advances in aluminum hydroxide-based adjuvant research and its mechanism’, *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 11(2), pp. 477–488. doi: 10.1080/21645515.2014.1004026.
- Hem, S. L. and Hogenesch, H. (2007) ‘Relationship between physical and chemical properties of aluminum-containing adjuvants and immunopotentiality’, *Expert Review of Vaccines*, 6(5), pp. 685–698. doi: 10.1586/14760584.6.5.685.
- Hmila, I. *et al.* (2012) ‘Pre-clinical studies of toxin-specific Nanobodies: Evidence of in vivo efficacy to prevent fatal disturbances provoked by scorpion envenoming’, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 264(2), pp. 222–231. doi: 10.1016/j.taap.2012.07.033.
- HogenEsch, H. (2012) ‘Mechanism of immunopotentiality and safety of aluminum adjuvants’, *Frontiers in Immunology*, 3(JAN), pp. 1–14. doi: 10.3389/fimmu.2012.00406.
- Hornung, V. *et al.* (2008) ‘Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization’, 9(8), pp. 847–856. doi: 10.1038/ni.1631.
- Hutchison, S. *et al.* (2017) ‘Antigen depot is not required for alum adjuvanticity’, 26(3), pp. 1272–1279. doi: 10.1096/fj.11-184556.
- Juste, M. *et al.* (2007) ‘Using a recombinant bispecific antibody to block Na⁺-channel toxins protects against experimental scorpion envenoming’, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(2), pp. 206–218. doi: 10.1007/s00018-006-6401-3.
- Khattabi, A., Soulaymani-bencheikh, R. and Achour, S. (2011) ‘Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene Classification of clinical consequences of scorpion stings : consensus development’, 105, pp. 364–369. doi: 10.1016/j.trstmh.2011.03.007.
- Kool, M. *et al.* (2008) ‘Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells’, 205(4), pp. 869–882. doi: 10.1084/jem.20071087.

- Laustsen, A. H. *et al.* (2016) 'Biotechnological trends in spider and scorpion antivenom development', *Toxins*, 8(8). doi: 10.3390/toxins8080226.
- Leroux-Roels, G. (2010) 'Unmet needs in modern vaccinology. Adjuvants to improve the immune response', *Vaccine*, 28(SUPPL. 3). doi: 10.1016/j.vaccine.2010.07.021.
- Li, X., Aldayel, A. M. and Cui, Z. (2014) 'Aluminum hydroxide nanoparticles show a stronger vaccine adjuvant activity than traditional aluminum hydroxide microparticles', *Journal of Controlled Release*, 173(1), pp. 148–157. doi: 10.1016/j.jconrel.2013.10.032.
- Marrack, P., McKee, A. S. and Munks, M. W. (2009) 'Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium', *Nature Reviews Immunology*, 9(4), pp. 287–293. doi: 10.1038/nri2510.
- Martinon, F. and Glimcher, L. H. (2006) 'Gout : new insights into an old disease', 116(8), pp. 2073–2075. doi: 10.1172/JCI29404.fundamental.
- Matheis, W., Zott, A. and Schwanig, M. (2002) 'The role of the adsorption process for production and control combined adsorbed vaccines', 20, pp. 67–73.
- Miranda, F. and Rochat, H. (1964) 'Depuis le début du siècle , différents auteurs se sont intéressés au problème de la purification des neurotoxines de scorpions d ' espèces très variées . Cependant , l ' état des connaissances actuelles montre une telle ressemblance des propriétés pha', 2, pp. 51–69.
- Mohammadpour Dounighi, N. *et al.* (2012) 'Preparing and characterizing chitosan nanoparticles containing hemiscorpius lepturus scorpion venom as an antigen delivery system', *Archives of Razi Institute*, 67(2), pp. 145–153. doi: 10.22092/ari.2016.103899.
- Morrison, S. L. *et al.* (1984) 'Chimeric human antibody molecules : Mouse antigen-binding domains with human constant region domains A ' EI', 81(November), pp. 6851–6855.
- Mousli, M. *et al.* (1999) 'A recombinant single-chain antibody fragment that neutralizes toxin II from the venom of the scorpion *Androctonus australis hector*', *FEBS Letters*, 442(2–3), pp. 183–188. doi: 10.1016/S0014-5793(98)01647-0.
- Muyldermans, S. (2013) 'Nanobodies: Natural single-domain antibodies', *Annual Review of Biochemistry*, 82, pp. 775–797. doi: 10.1146/annurev-biochem-063011-092449.
- Naceur, M., Amri, F. and Kharrat, H. (1999) 'Evaluation of antivenom therapy in children severely envenomed by *Androctonus australis garzonii* (Aag) and *Buthus occitanus tunetanus* (Bot) scorpions', 37, pp. 1627–1634.
- 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), pp. 2692–2699. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.04.035.
- 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', pp. 1–8.
- Ogura, Y., Sutterwala, F. S. and Flavell, R. A. (2006) 'Minireview The Inflammasome : First Line of the Immune Response to Cell Stress', pp. 659–662. doi: 10.1016/j.cell.2006.08.002.

- Oyffon, M. G. and Illiald, P. B. (2007) 'Venin Trop', (27), pp. 439–446.
- Petrarca, C. *et al.* (2015) 'Engineered metal based nanoparticles and innate immunity', ???, pp. 1–12. doi: 10.1186/s12948-015-0020-1.
- Petricевич, V. L. (2010) 'Scorpion venom and the inflammatory response', *Mediators of Inflammation*, 2010. doi: 10.1155/2010/903295.
- Possani, L. D. *et al.* (2001) 'Scorpion toxins specific for Na⁺-channels', 300(1999).
- Press, D. (2012) 'Emerging options for the management of scorpion stings', pp. 165–173.
- Quintero-hernández, V. *et al.* (2013) 'Toxicon Scorpion venom components that affect ion-channels function', *Toxicon*, 76, pp. 328–342. doi: 10.1016/j.toxicon.2013.07.012.
- 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 Tropica*, 205(December 2019). doi: 10.1016/j.actatropica.2020.105353.
- Richard, G. *et al.* (2013) 'In Vivo Neutralization of a α -Cobrotoxin with High-Affinity Llama Single-Domain Antibodies (VH Hs) and a VH H-Fc Antibody', 8(7), pp. 1–14. doi: 10.1371/journal.pone.0069495.
- Serteyn, D. *et al.* (2003) 'La myéloperoxydase des neutrophiles, une enzyme de défense aux capacités oxydantes', *Annales de Médecine Veterinaire*, 147(2), pp. 79–93.
- Sun, B. *et al.* (2013) 'Engineering an effective immune adjuvant by designed control of shape and crystallinity of aluminum oxyhydroxide nanoparticles', *ACS Nano*, 7(12), pp. 10834–10849. doi: 10.1021/nn404211j.
- V-rabat, U. M. (2016) 'Les techniques de coloration en hématologie'.
- Vaswani, S. K. and Hamilton, R. G. (1998) 'Humanized antibodies as potential therapeutic drugs', *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 81(2), pp. 105-116,119. doi: 10.1016/S1081-1206(10)62794-9.
- Vermout, S. *et al.* (2003) 'Choix d'un adjuvant lors d'essais de vaccination', *Annales de Médecine Veterinaire*, 147(6), pp. 393–401.
- Vincke, C. *et al.* (2009) 'General Strategy to Humanize a Camelid Single-domain Antibody and Identification of a Universal Humanized Nanobody Scaffold *'. doi: 10.1074/jbc.M806889200.
- Wilczewska, A. Z. *et al.* (2012) 'Nanoparticles as drug delivery systems', *Pharmacological Reports*, 64(5), pp. 1020–1037. doi: 10.1016/S1734-1140(12)70901-5.
- Wörn, A. and Plückthun, A. (1999) 'Different equilibrium stability behavior of scFv fragments: Identification, classification, and improvement by protein engineering', *Biochemistry*, 38(27), pp. 8739–8750. doi: 10.1021/bi9902079.
- Yamagami, H. *et al.* (2001) 'Mycobacterium tuberculosis Induces Granulomas in Mice Trehalose 6, 6 J -Dimycolate (Cord Factor) of Mycobacterium tuberculosis Induces Foreign-Body- and Hypersensitivity-Type Granulomas in Mice'. doi: 10.1128/IAI.69.2.810.

Zlotkin, E., Miranda, F. and Nord, S. (1972) 'PROTEINS IN SCORPION VENOMS TOXIC TO MAMMALS AND INSECTS', 10, pp. 207–209.

Résumé

L'envenimation scorpionique représente un véritable problème de santé publique dont le seul traitement spécifique disponible actuellement est l'immunothérapie passive. Notre objectif dans ce travail est l'amélioration des méthodes d'immunisation par le développement d'une formulation vaccinale à base d'adjuvant d'hydroxyde d'aluminium nanoparticulaire pour améliorer ainsi l'immunothérapie antiscorpionique.

Notre Protocole expérimental est basé sur l'évaluation de l'effet de 2 formulations d'immunisation contenant le venin détoxifié conjugué soit à l'Alum ou aux nanoparticules d'hydroxyde d'aluminium (NPs) chez des souris. Les prélèvements sanguins de ces dernières ont été utilisés pour l'étude de la réponse immunitaire spécifique et inflammatoire par le dénombrement cellulaire, l'évaluation de l'activité de myéloperoxydase et de l'éosinophil peroxydase ainsi que les titres d'anticorps sécrétés. Une analyse histologique est aussi réalisée pour l'évaluation de la réactogénicité tissulaire induite par les deux formulations.

Les résultats des études déjà réalisées ont montré que les antigènes protéiques adsorbés sur les NPs induisaient une réponse anticorps spécifique d'antigène plus forte que les mêmes antigènes protéiques adsorbés sur les microparticules d'hydroxyde d'aluminium traditionnelles. L'inflammation locale induite par les NPs dans les sites d'injection était plus légère que celle induite par les microparticules ce qui les rend une alternative prometteuse pour la substitution dans les formulations d'immunisation.

Abstract

Scorpion envenomation represents a real public health problem for which the only specific treatment currently available is passive immunotherapy. Our objective in this study is to improve immunization methods through the development of a vaccine formulation based on nanoparticulate aluminum hydroxide adjuvant to thereby improve antiscorpion immunotherapy.

Our experimental protocol is based on the evaluation of the effect of 2 immunization formulations containing the detoxified venom conjugated to either Alum or aluminum hydroxide nanoparticles (NPs) in mice. The blood samples of the latter were used for the study of the specific and inflammatory immune response by cell counting, the evaluation of the activity of myeloperoxidase and eosinophil peroxidase as well as the titers of secreted antibodies. An histological analysis is also carried out for the evaluation of the tissue reactogenicity induced by the two formulations.

The results of the studies already carried out have shown that the protein antigens adsorbed on the NPs induced a stronger antigen-specific antibody response than the same protein antigens adsorbed on the traditional aluminum hydroxide microparticles. Local inflammation induced by NPs at the injection sites was milder than that induced by microparticles making them a promising alternative for substitution in immunization formulations.

ملخص

يعتبر التسمم العقربي مشكلة صحية عامة حقيقية علاجها المحدد الوحيد المتاح حاليًا هو العلاج المناعي السلبي. يتمثل هدفنا في هذا العمل في تحسين طرق التحصين من خلال تطوير تركيبة لقاح تعتمد على مادة هيدروكسيد الألومنيوم النانوية لتحسين العلاج المناعي ضد التسمم العقربي.

يعتمد بروتوكولنا التجريبي على تقييم تأثير تركيبتين من تركيبات التحصين التي تحتوي على السم المعالج المقترن بالشب أو بجسيمات نانوية من هيدروكسيد الألومنيوم (NPs) في الفئران. تم استخدام عينات الدم هذه الأخيرة لدراسة الاستجابة المناعية النوعية والالتهابية عن طريق عد الخلايا ، وتقييم نشاط الميلوبيروكسيداز و بوزينوفيل بيروكسيداز وكذلك عيارات الأجسام المضادة المفرزة. يتم إجراء التحليل النسيجي أيضًا لتقييم تفاعل الأنسجة بعد حقن التركيبتين.

أظهرت نتائج الدراسات التي تم إجراؤها سابقًا أن مستضدات البروتين التي تم امتصاصها على NPs تسبب في استجابة أقوى للأجسام المضادة الخاصة بمستضد معين من نفس مولدات المضادات البروتينية الممتصة على جزيئات هيدروكسيد الألومنيوم التقليدية. كان الالتهاب الموضعي الناتج عن NPs في مواقع الحقن أكثر اعتدالًا من الالتهاب الناجم عن الجزيئات الدقيقة مما يجعلها بديلاً واعدًا للاستبدال في تركيبات التحصين.