

République Algérienne Démocratique et Populaire

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Université M'Hamed BOUGARA, Boumerdes



Faculté des sciences biologiques

Mémoire de projet de fin d'études en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine: Sciences de la Nature et de la Vie

Spécialité: Biotechnologie et pathologie moléculaire

Thème

Développement d'une nouvelle approche d'immunothérapie antivenimeuse chez une espèce aviaire : apport d'un adjuvant nanoparticulaire

Présenté par:

Melle FELLAK Sabrina

Melle BOURAI Sara

Soutenu le 03 /10/2020 devant le jury composé de :

Président : M.Z. RAHIM Maitre Assistant A (FSB-UMBB)

Examineur : F.A. NAIT MOHAMED Maitre de Conférences B (FSB-USTHB)

Promoteur : A.NOURI Maitre de Conférences B (FSB-UMBB)

Co-Promoteur : K. LAHBIB Dr. Vétérinaire (Centre cynégétique de Reghaia)

Année universitaire : 2019/2020

Remerciements

Avant tout, nous remercions Allah le tout puissant de nous avoir donné le courage, la volonté et la patience pour réaliser ce travail.

Nous exprimons d'abord nos profonds remerciements à notre promoteur **Mr A.NOURI** pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, pour ses conseils, son disponibilité et son aide.

Nous voudrions également exprimer nos remerciements à notre co-promoteur **Mr K.LAHBIB** pour sa contribution et son aide.

Nos remerciements s'adressent également aux membres du jury qui nous honorent en évaluant ce travail :

A Madame **M.Z. RAHIM**, qui a aimablement accepté de faire partie de ce jury et d'adopter une réflexion critique à ce travail. Que ce travail lui témoigne de notre profonde gratitude.

A Monsieur **F.A. NAIT MOHAMED**, qui nous honore de sa participation à l'évaluation de ce modeste travail en apportant une vision de spécialiste. Que ce travail lui témoigne de notre profonde gratitude.

Nous adressons également nos vifs remerciements à nos parents pour leur soutien constant et leur encouragement.

A toute personne qui a participé de près ou de loin, directement ou indirectement, à la réalisation de ce travail.

SOMMAIRE

Liste des abréviations.

Liste des figures.

Liste des tableaux.

Introduction.....1-2

Chapitre I : Généralités

I.1. Envenimations ophidiennes.....4

I.2. Le serpent *Naja haje*.....4

I.3. Venin de *Naja haje*.....4

I.3.1. Composition du venin de *N.h*.....6

I.3.1.1. Fraction enzymatique.....6

I.3.1.2. Fraction non enzymatique.....6

I.3.2. Mode d'action6

I.3.2.1. Les phospholipases (PLA2).....6-7

I.3.2.2. La famille de Three-Finger Toxins (3FTXs).....7

I.4. Symptomatologie de l'envenimation ophidienne.....9

I.5. Traitement de l'envenimation ophidienne.9

I.6. Immunothérapie antivenimeuse.....12

I.6.1. Les immunoglobulines Y14-15

I.6.2. Antigènes de l'immunothérapie anti-venin.....15

I.7. Adjuvants immunologiques.....17

I.7.1. Adjuvant complet de Freund.....17-18

I.7.2. Hydroxyde d'aluminium.....18-19

I.7.3. Nanoparticules d'hydroxyde d'aluminium.....19

Chapitre II : Méthodes

II.1. Préparation des nanoparticules d'hydroxyde d'aluminium.....	21
II.2. Caractérisation physicochimique des nanoparticules d'alum.....	21
II.2.1. Analyse structurale des préparations d'immunisation.....	21
II.2.2. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier	21-22
II.4. Caractérisation immunologique des préparations d'immunisation.....	22
II.4.1. Immunisation des animaux.....	22
II.5. Extraction des IgY(Δ Fc) spécifiques au venin de <i>N.h</i>	23
II.6. La quantification des IgY.....	23
II.7. Test de séroneutralisation.....	24

Chapitre III : Résultats et Discussion

III.1. Caractérisation physicochimique des préparations d'immunisation.....	26
III.2. Les immunoglobulines Y.....	29-31
Conclusion et perspectives.....	34-35
Références bibliographiques.....	37-40

Liste des abréviations

ACF : Adjuvant complet de Freund.

AChE : Acétylcholinestérases.

AlCl₃ : Chlorure d'aluminium.

Al(OH)₃ : Hydroxyde d'aluminium.

Alum : Hydroxyde d'Aluminium.

CPA : Cellule présentatrice d'antigène.

CRISPs : Cysteine-rich secretory proteins.

ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay.

Fab : Fragment antigen binding.

Fc : Fragment cristallisable.

FTIR : Spectroscopie infrarouge à Transformée de Fourier.

HCl : Chlorure d'hydrogène.

IgA : Immunoglobuline A.

IgG : Immunoglobuline G.

IgM : Immunoglobuline M.

IgY : Immunoglobuline Y.

IgY(ΔFc) : Immunoglobulines Y tronquées.

IL : Interleukine.

LAAO : L-amino-acid-oxidases.

MEB : Microscope électronique à balayage.

MET : Microscope électronique à Transmission.

nAChR : Récepteurs nicotiques de l'acétylcholine.

NaOH : Hydroxyde de sodium.

N.h: *Naja haje*.

NLRP3 : NOD-like receptor protein 3.

Nps : Nanoparticules.

PLA2 : Phospholipases A2.

P/P : Poids à poids.

Rpm : Rotation par minute.

SDS PAGE : Electrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du laurylsulfate de sodium.

SVMP : Snake venom metalloproteinase.

Th1 : T helper 1.

Th2 : T helper 2.

VNGF : Venom nerve growth factors.

3FTX : Three finger toxins.

Liste des figures

Figure 01 : Estimation de la morbidité et de la mortalité régionales et mondiales par morsure de serpent.....	05
Figure 02: A- Schéma général de la structure de l'appareille venimeux des <i>Elapidea</i> , B-Image de l'espèce <i>Naja haje</i>	05
Figure 03: Schéma de la répartition des principales familles des protéines de venin des <i>Elapidea</i>	08
Figure 04 : Site d'action de Alpha- neurotoxine (3FTX) et beta- neurotoxine (PLA2).....	08
Figure 05 : Représentation schématique de la chronologie d'une morsure d' <i>Elapidea</i>	10
Figure 06 : Manifestations cliniques des venins de serpent. (A-Œdème du membre, nécrose cutané, B-ophtalmoplégie externe, C-Ptosis palpébrale et réctus, D-Nécrose étendue de la peau et du tissu sous-cutané).....	10
Figure 07 : Schéma récapitulatif de la physiopathologie des toxines du venin des élapides : vue d'ensemble des effets de toxines du venin sur leurs systèmes-cibles.....	11
Figure 08 : Représentation schématique des fragment d'anticorps F(ab') ₂ et Fab obtenus après digestion enzymatique.....	13
Figure 09 : Schéma représentant la recombinaison du gène des IgY du canard.....	16
Figure 10 : Schéma représentant la structure des immunoglobulines.....	16
Figure 11: Mécanisme d'action des adjuvants.....	20
Figure 12 : Mécanismes d'action proposés pour l'alum in vitro et in vivo et leurs contributions éventuelles à l'adjuvancité.	20
Figure 13: Schéma représentant le protocole d'immunisation des canards« <i>Anas platyrhynchos</i> » avec le venin de <i>Naja haje</i> détoxifié associé à des nanoparticules d'aluminium.....	25
Figure 14 : Caractérisation par MET des nanoparticules d'hydroxyde d'aluminium vide Gr X 120000	27

Figure 15: Spectre d'absorption infrarouge des nanoparticules d'hydroxydes d'aluminium.....	27
Figure 16 : Caractérisation des nanoparticules d'hydroxyde d'aluminium par microscope électronique à balayage.	28
Figure 17: Cinétique de production d'anticorps dans le jaune d'œuf de canards hyperimmunisés avec du venin de cobra.....	32
Figure 18 : Lignes de précipitation formées par la réaction entre le venin natif et la fraction d'immunoglobuline provenant d'IgY d'œuf	32
Figure 19 : Analyse SDS-PAGE d'antivenins dérivés de jaune d'œuf.....	33
Figure 20 : Tableau comparatif entre les immunoglobulines G et les immunoglobulinesY.....	33

Liste des tableaux

Tableau I: Évolution de la production des antivenins depuis leur découverte.....	13
---	----

Introduction

Introduction

L'envenimation par morsure de serpent est une maladie accidentelle négligée provoquant une morbidité et une mortalité considérables. Il existe environ 3 700 espèces de serpents dans le monde appartenant principalement à la famille des *Elapidae* et des *Viperidae*. La famille des *Elapidae* comprend 61 genres incluant 365 espèces (Silva-de-França et al., 2019). Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), il se produit plus de cinq millions de morsures de serpent chaque année. En Afrique, l'incidence annuelle des morsures de serpent varie entre 435 000 et 580 000 cas.

Comme pour tous les pays chauds et arides, les serpents constituent en Algérie une composante majeure de la faune des vertébrés. Le serpent *Naja haje* appartenant à la famille des *Elapidea* est l'une des espèces les plus dangereuses en Algérie (Al-Quraishy et al., 2014). Le venin de *N.h* est composé de puissantes neurotoxines qui jouent un rôle dans la défense des serpents contre les prédateurs et la capture des proies. Ces neurotoxines se propagent rapidement dans le sang provoquant diverses manifestations cliniques telles que la paralysie respiratoire et des troubles hématologiques aboutissant à des hémorragies fatales (Kini, 2010; Gutiérrez et al., 2017).

Un traitement symptomatique est établi afin d'atténuer les effets de l'envenimation et de diminuer les symptômes mais il est toujours insuffisant (Gold et al., 2004). L'immunothérapie antivenimeuse est le traitement spécifique visant à neutraliser les neurotoxines par des anticorps spécifiques et l'élimination rapide du venin (Chippaux, 2013).

Les Immunoglobulines utilisés dans l'immunothérapie sont produites par l'hyper-immunisation des chevaux avec une préparation de venin de serpent détoxifié et conjugué avec un adjuvant. Néanmoins, l'immunothérapie présente des effets secondaires tels que l'induction des réactions d'hypersensibilité et le saignement répétitif des chevaux qui présente un danger majeur pour l'animal. De même, ce processus demeure couteux (Hammoudi-Triki et al., 2007; Gláucia-Silva et al., 2018; Sifi et al., 2018). A cet effet et afin d'améliorer la production de sérum antivenimeux en respectant l'éthique et en réduisant les coûts, de nombreuses recherches sont développées en utilisant de nouvelles approches. En effet, l'utilisation des canards pour produire des anticorps anti-venin à partir de jaunes d'œufs (IgY) représente une perspective prometteuse qui peut remplacer la production conventionnelle d'antivenin.

L'hydroxyde d'alum est l'adjuvant immunologique le plus utilisé dans la vaccination mais malgré ses avantages, il présente certains inconvénients. La grande taille des particules

empêche leur distribution dans les tissus. La nanotechnologie est utilisée dans la vaccination afin de réduire la taille des particules et de diminuer les effets secondaires des microparticules.

L'objectif de cette étude est de développer une approche alternative et efficace pour l'amélioration de l'immunothérapie antivenimeuse contre le venin de *Naja haje* à base des IgY(Δ Fc) provenant de jaune d'œuf du canard en utilisant des nanoparticules d'hydroxyde d'alum.

Chapitre I

Généralités

I.1. Envenimations ophidiennes

L'envenimation ophidienne est une pathologie accidentelle et un problème de santé publique majeur, en particulier dans les régions tropicales et subtropicales (Gutiérrez et *al.*, 2017, 2010). Selon les données annuelles de l'OMS, l'envenimation ophidienne engendre de 1,8 à 2,7 millions de cas d'envenimement chaque année et entre 81 410 et 137 880 cas de décès. En Afrique, environ 435 000 à 580 000 morsures de serpents sont recensées chaque année (Figure 01).

En Algérie, les espèces les plus dangereuses sont *Cerastes cerastes*, *Vipera lebetina* et *Naja haje* appartenant à la famille des *Viperidae* et à la famille des *Elapidae* respectivement. (Bennacef-Heffar and Laraba-Djebari, 2003; Malih et *al.*, 2014)

I.2. Le serpent *Naja haje*

Le serpent *Naja haje* (*N.h*) appartient à la famille des *Elapidae* (Al-Quraishy et *al.*, 2014). Il mesure deux (02) mètres de longueur en moyenne, la coloration de son corps est totalement brun foncé voir mêmes noir pour quelques sous espèces (Chippaux, 2006) (Figure 02).

Cette espèce connue aussi sous le nom de “cobra égyptien” est l'élapidé africain le plus septentrional de la famille des cobras, on peut le rencontrer en Algérie, Maroc, Tunisie, Lybie, Egypte et en Sénégal (Silva-de-França et *al.*, 2019). Le danger de ce cobra est dû à son venin hautement neurotoxique délivré à la victime par le billet de ses crochets relativement longs (8 à 10 mm) (Al-Quraishy et *al.*, 2014; Chippaux, 2006).

I.3. Venin de *Naja haje*

Le venin de *N.h* est un mélange complexe d'enzymes et de toxines qui appartiennent à un petit nombre de superfamilles de protéines, élaborées par une glande spécifique (Kini, 2010 ; GâzFlorea et *al.*, 2016). Il sert à tuer la proie et la digérer mais aussi à se défendre (Gutiérrez et *al.*, 2017; Naoual et *al.*, 2019) (Figure 02).

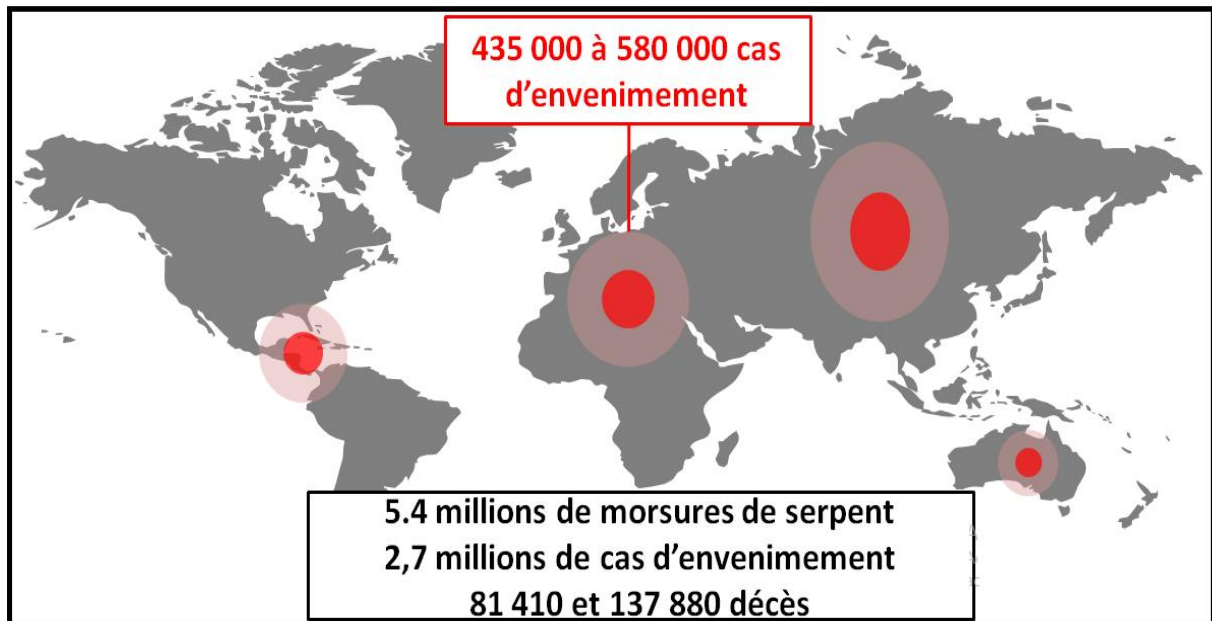


Figure 01 : Estimation de la morbidité et de la mortalité régionales et mondiales par morsure de serpent (OMS).

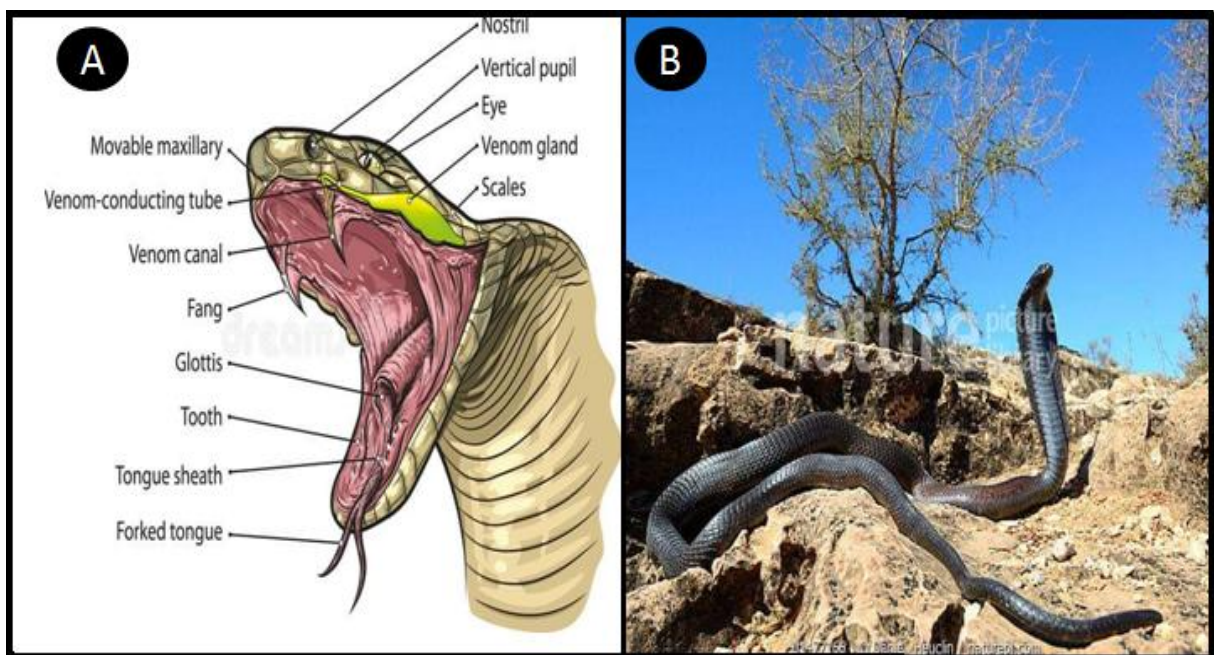


Figure 02: A- Schéma général de la structure de l'appareil venimeux des *Elapidea*. B-Image de l'espèce *Naja haje*.

I.3.1. Composition du venin de *N.h*

Le venin de *naja haje* est composé de deux fractions; enzymatique et non enzymatique.

I.3.1.1.Fraction enzymatique

Les toxines enzymatiques renferment la famille des phospholipases A2 (PLA2), des protéinases (snake venom metalloproteinase (SVMP)), des acétylcholinestérases (AChE) et des L-amino-acid-oxidases (LAAO) (Malih et al., 2014; Gâz Florea et al., 2016; Silva-de-França et al., 2019) (Figure03).

I.3.1.2.Fraction non enzymatique

Les toxines non enzymatiques renferment la famille de three finger toxins (3FTx) qui est la fraction dominante, la famille de cysteine-rich secretory proteins (CRISPs) et la famille de Venom nerve growth factors (vNGF) (Malih et al., 2014;Gâz Florea et al., 2016; Silva-de-França et al., 2019) (Figure03).

I.3.2. Mode d'action

Le venin du *N.h* affecte le système nerveux en bloquant la transmission des signaux nerveux aux muscles et, à des stades ultérieurs, en arrêtant également ceux transmis au cœur et aux poumons, provoquant la mort en raison d'une insuffisance respiratoire complète (Al-Quraishy et al., 2014) (Figure 04).

I.3.2.1.Les phospholipases (PLA2)

Les phospholipases A2 (PLA2) sont des composants enzymatiques majeurs des venins de serpent, elles exercent des effets neurotoxiques et myotoxiques qui conduisent souvent à une nécrose sévère (Šribar et al., 2014; Ferraz et al., 2019) .Ces protéines ont des masses moléculaires de 13 à 15 kDa et sont classées sur la base des caractéristiques structurales en groupes I (enzymes élapides) et II (enzymes vipérides) (Gutiérrez and Lomonte, 2013; Ferraz et al., 2019) .

Cette famille exerce un effet pro-inflammatoire notamment la formation de l'œdème, la production de cytokines et le recrutement de leucocytes. L'inflammation induite par les PLA2 cause une hydrolyse des lipides membranaires qui génèrent de puissants médiateurs lipidiques pro-inflammatoires (Šribar et al., 2014).

Les effets se produisent via la modulation des terminaisons pré-synaptiques ainsi que des terminaisons nerveuses sensorielles. Les effets pré-synaptiques des PLA2 ne sont pas entièrement compris, et les cibles principales restent inconnues, bien que la PLA2 β -neurotoxines soit connue pour se lier aux canaux K⁺ des terminaux pré-synaptiques via une sous-unité kunitz accessoire (Šribar et *al.*, 2014). Ces effets induisent une exocytose robuste des réserves de vésicules des neurotransmetteurs qui conduisent par conséquent à l'épuisement de la libération de neurotransmetteurs dans la jonction neuromusculaire pour favoriser la paralysie musculaire (Ferraz et *al.*, 2019) (Figure 04).

I.3.2.2. La famille de Three-Finger Toxins (3FTXs)

Les toxines à trois doigts (3FTXs) sont les principaux composants du venin des serpents de la famille des *Elapidae* (Utkin, 2013). Elles sont des neurotoxines non enzymatiques allant de 58 à 81 résidus qui contiennent une structure commune de trois boucles β -brin s'étendant à partir d'un noyau central stabilisée par des ponts disulfures. Elles contiennent quatre ou cinq ponts disulfure, dont quatre sont conservés dans tous les membres (Kini, 2010; Ferraz et *al.*, 2019).

L'activité biologique des 3FTXs varie considérablement d'une interaction hautement spécifique avec certains récepteurs (α -neurotoxines) à une lyse cellulaire non spécifique (cytotoxines). Elles exercent aussi d'autres effets tels que la cardiotoxicité et des activités d'agrégation plaquettaire (Utkin, 2013; Malih et *al.*, 2014).

Elles agissent comme α -neurotoxines en se liant spécifiquement et avec une affinité élevée aux récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine (nAChR) pour bloquer la transmission post-synaptique à la jonction neuromusculaire afin d'induire une paralysie flasque (Kini, 2010; Ferraz et *al.*, 2019). Les nAChR sont des protéines réceptrices qui réagissent aux neurotransmetteurs acétylcholine et médient les neurotransmissions dans les systèmes nerveux central et périphérique ainsi que les jonctions neuro-musculaires (Kini, 2010) (Figure 04).

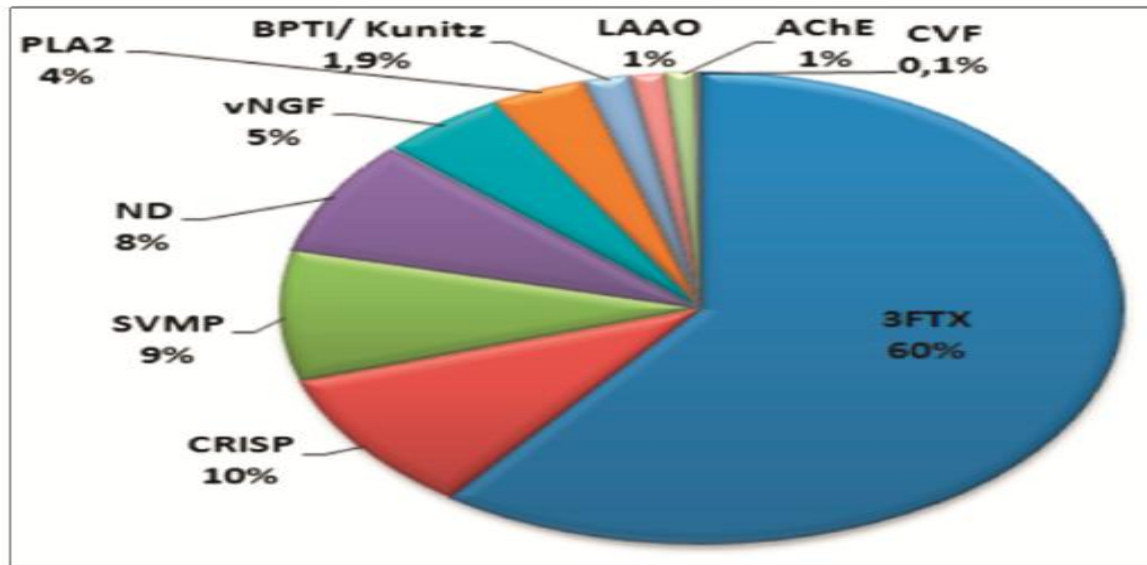


Figure 03 : Schéma de la répartition des principales familles des protéines du venin de cobra *Naja haje legionis*. 3FTX : Toxine à trois doigts, CRISP : protéine sécrétoire riche en cystéine, SVMP : métalloprotéinase de venin de serpent, vNGF : facteur de croissance du nerf venin, PLA2 : phospholipase A2, CVF: facteur de venin de cobra, LAAO: L-amino acide oxydase, AChE: acétylcholinestérase, ND: non déterminé (Malih et *al.*, 2014).

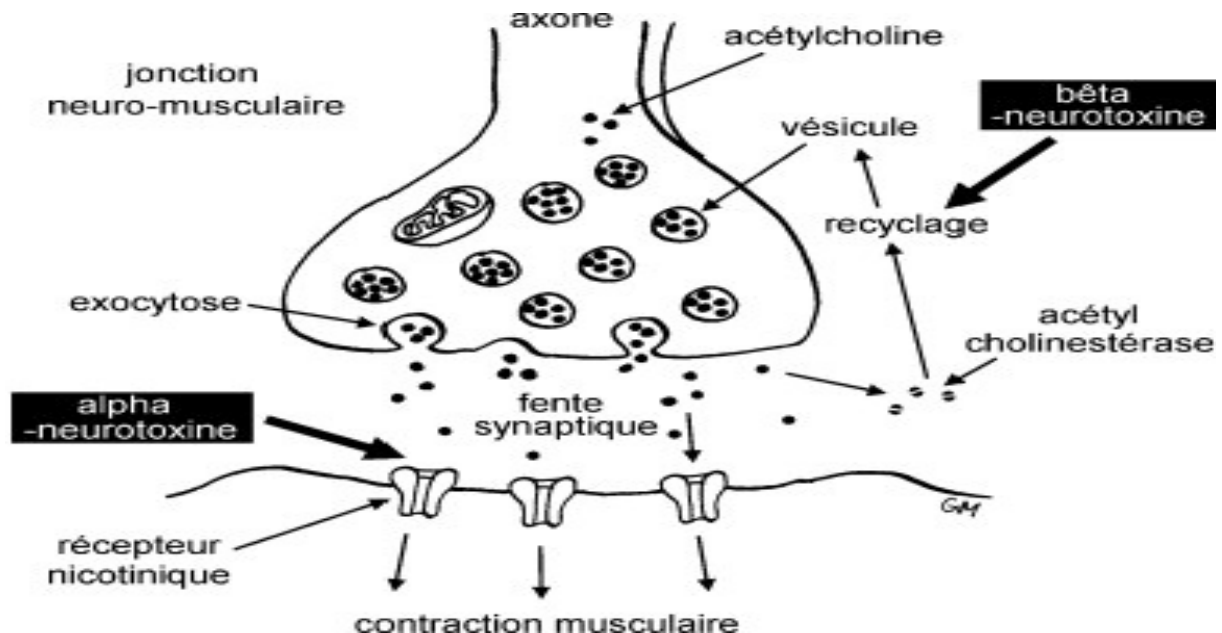


Figure 04 : Site d'action de Alpha- neurotoxine (3FTX) et beta- neurotoxine (PLA2). Les neurotoxines post-synaptiques (alpha-neurotoxines) se fixent spécifiquement sur les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine. Les toxines pré-synaptiques (beta-neurotoxines) induisent une exocytose robuste des réserves de l'acétylcholine et inhibent son recyclage dans les vésicules synaptiques (Larréché et *al.*, 2008).

I.4. Symptomatologie de l'envenimation ophidienne

L'envenimation ophidienne provoque une douleur variable et induit à des signes cliniques; des troubles sensori-moteurs après environ 30 minutes. Cela se traduit par un ptosis et une dyspnée. L'aggravation de ces symptômes induit à une paralysie respiratoire voir le décès de la victime (Chippaux, 2002) (Figure 05).

Les morsures des *élapidea* sont associées au syndrome neurotoxique classique, qui se caractérise par une paralysie flasque. Cette dernière se manifeste d'abord par une ptose et une ophtalmoplégie externe (Gutiérrez et *al.*, 2017). La paralysie est causée par des toxines du venin qui se lient spécifiquement aux récepteurs post-synaptiques de l'acétylcholine nicotinique (Kini, 2010; Ferraz et *al.*, 2019). La paralysie descend ensuite pour impliquer les muscles innervés par les nerfs crâniens inférieurs, ainsi que les fléchisseurs du cou. L'état de panique ressentie lors d'une morsure de serpent peut aussi provoquer un ensemble de symptômes physiques. Ils se manifestent sous forme de diarrhées, nausées, vomissements, vertiges, sudation, hypotension et tachycardie (Gold and Barish, 2002) (Figure 06)(Figure 07).

I.5. Traitement de l'envenimation ophidienne

Actuellement, la conduite thérapeutique est basée sur deux types de traitement, le premier est le traitement symptomatique qui vise à atténuer les effets des toxines du venin dans le but de diminuer ou d'inverser les symptômes. Les antalgiques sont administrés pour soulager la douleur, l'œdème est traité par un anti-inflammatoire alors que le traitement par les corticoïdes est réservé au traitement de l'état de choc. Le second est le traitement spécifique visant à neutraliser les neurotoxines par des anticorps spécifiques (Gold et *al.*, 2004).

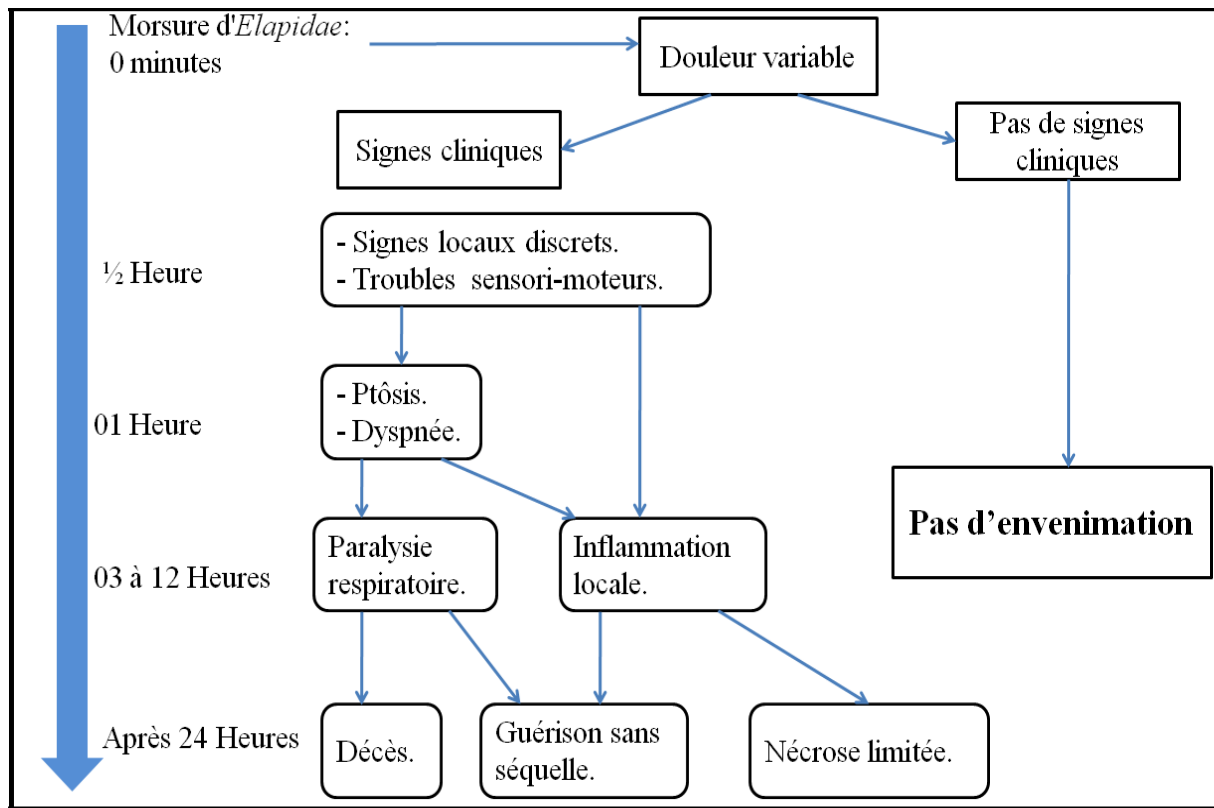


Figure 05 : Représentation schématique de la chronologie d'une morsure d'*Elapidea* (Chippaux, 2002).



Figure 06 : Manifestations cliniques des venins de serpent. (A-Œdème du membre, nécrose cutanée, B-ophtalmoplégie externe, C-Ptosis palpébrale et réctus, D-Nécrose étendue de la peau et du tissu sous-cutané) [1, modifiée].

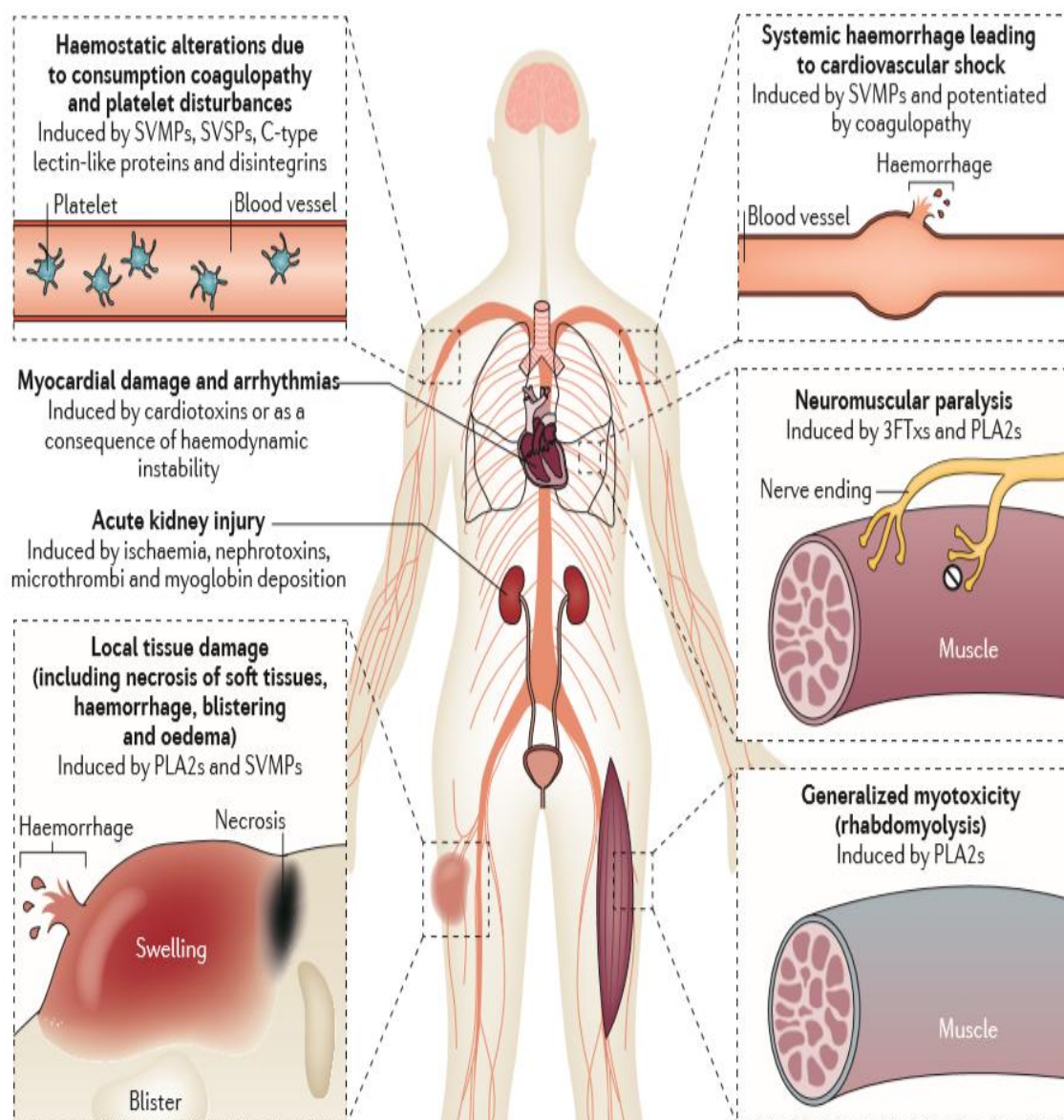


Figure 07 : Schéma récapitulatif de la physiopathologie des toxines du venin des élapides : vue d'ensemble des effets de toxines du venin sur leurs systèmes-cibles (Gutiérrez et *al.*, 2017).

I.6. Immunothérapie antivenimeuse

Développée en 1895 par Calmette et Phisalix & Bertrand, l'immunothérapie passive est l'approche la plus efficace et scientifiquement validée dans le traitement des cas d'envenimation. Les substances actives des sérums antivenins sont des immunoglobulines obtenues par l'hyperimmunisation des animaux, généralement les chevaux. L'hyperimmunisation se fait par des formulations contenant un adjuvant associé au venin détoxifié. Ces anticorps ont la capacité de se lier à des épitopes sur des composants de venin spécifiques, entraînant une inhibition de leurs effets toxiques (Navarro et *al.*, 2016; Gláucia-Silva et *al.*, 2018).

Plusieurs améliorations sont apportées aux sérums thérapeutiques ce qui a permis d'augmenter leur efficacité et leur tolérance. Les premiers sérums thérapeutiques utilisés contre l'envenimation ophidienne sont à base des IgG entiers qui sont obtenus par précipitation au sel de sulfate d'ammonium. L'utilisation de ses derniers induisait des réactions d'hypersensibilité liées aux fragments Fc provoquant un choc anaphylactique.

Pour atténuer les effets secondaires associés à l'administration des IgG entiers, une digestion enzymatique de ces derniers est ensuite utilisée pour la suppression du fragment constant (Fc) fixant le complément (Theakston and Smith, 1995) (Tableau 01).

La digestion des IgG par la pepsine suivie par la papaïne permet l'obtention des fragments F(ab')₂ de masse moléculaire moyenne de (90 KDa) et des fragments Fab (50KDa) respectivement (Figure 08).

La stabilité des F(ab')₂ dans le compartiment vasculaire favorise la formation du complexe immun et la destruction de ce dernier par les cellules immunocompétentes, ce qui les fait généralement préférés aux Fab, qui sont rapidement éliminés par les reins à cause de leur petite taille (50 kDa) (Theakston and Smith, 1997 ; Gutiérrez et *al.*, 2011).

Malheureusement, les inconvénients majeurs de cette procédure sont la souffrance des animaux due à l'hyperimmunisation et aux réactions secondaires sévères induites. Ainsi que l'entretien des animaux et l'achat de matériel pour la saignée animale et aussi la séparation du plasma constituent une fraction importante des coûts de production des sérums antivenimeux équins et ovins. En effet l'utilisation d'anticorps de jaune d'œuf IgY représente une alternative qui peut remplacer la production conventionnelle d'antivenin (Navarro et *al.*, 2016).

Tableau 01 : Évolution de la production des antivenins depuis leur découverte (Chippaux, 2013).

Date	Intervention	Produit obtenu	Bénéfices
1895	Décantation/centrifugation	Sérum antivenimeux (1 ^{ère} génération)	Traitement étiologique des envenimation
1930	Précipitation par le sulfate d'ammonium	IgG totale (2 ^{ème} génération)	Concentration du principe actif
1936	Digestion enzymatique	Fragments d'IgG (3 ^{ème} génération)	Amélioration de la tolérance
2000	Immunisation avec fractions toxiques ou toxines recombinantes	Fragments purifiés	Amélioration de l'immunisation

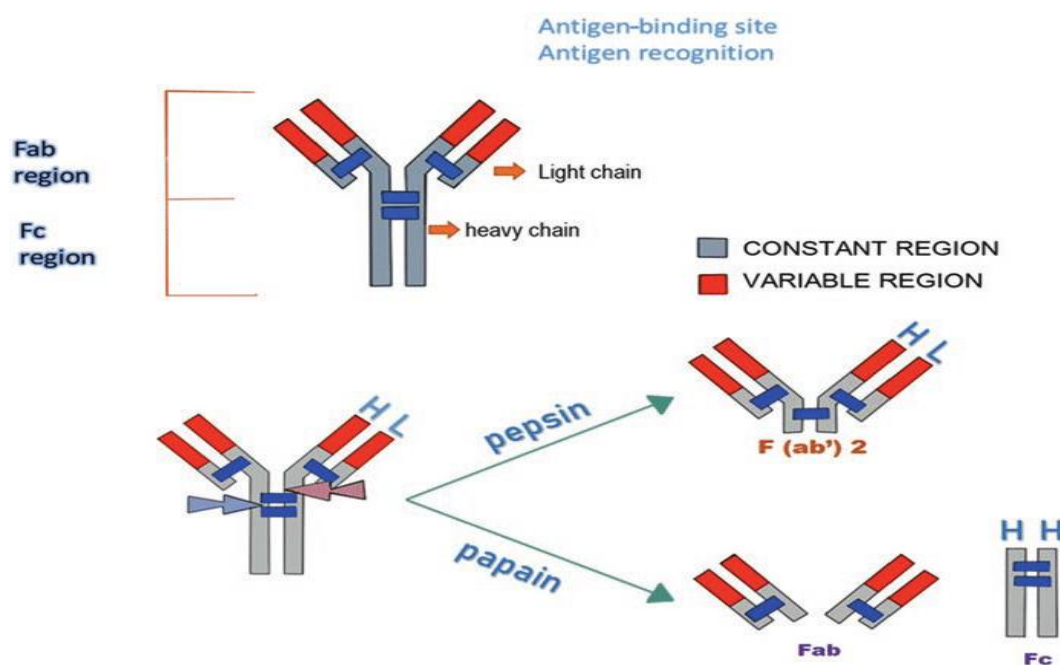


Figure 08 : Représentation schématique des fragment d'anticorps F(ab')₂ et Fab obtenus après digestion enzymatique.

I.6.1. Les immunoglobulines Y

Les oiseaux galliformes et non galliformes expriment trois isotypes d'immunoglobulines, IgM, IgA et IgY. Les IgY sont les principaux anticorps produits par les espèces aviaires, ils sont synthétisés et sécrétés dans le sang et transférés au jaune d'œuf. Structuellement, comme pour toutes les autres immunoglobulines, l'IgY se compose de deux chaînes lourdes et de deux chaînes légères. Contrairement à l'IgG, l'IgY n'a pas de région charnière, une chaîne lourde plus longue et une teneur en glucides plus élevée. L'IgY existe sous trois isoformes produits en raison de l'épissage alternatif de l'ARN messager (ARNm) dans le gène epsilon (ν) chez les canards, qui code pour trois chaînes lourdes. Le premier de ces isoformes est l'IgY transmembranaire, qui en plus des quatre domaines constants (Cv1 – Cv4), il possède également un qui le lie à la membrane cellulaire. Les deux autres isoformes sont sécrétés et trouvés dans le sérum. Ce sont les isoformes de taille normale et tronquées (IgY(Δ Fc)) avec des poids moléculaires de 180 KDa et 120 KDa respectivement (Lundqvist et *al.*, 2006)(Figure 09) (Figure 10).

L'IgY a été largement étudié pour plusieurs fins en santé humaine et vétérinaire(Pereira et *al.*, 2019), comme dans l'immunodiagnostic telle que le tests d'immunoessais pour détecter l'antigène circulant de *Schistosoma japonicum*, développement d'anticorps IgY contre des protéines de *Pythium insidiosum*, utilisation dans capture d'antigène-ELISA (Cai et *al.*, 2012), et dans l'immunothérapie, la neutralisation de toxines provenant d'animaux venimeux(Navarro et *al.*, 2016; Sifi et *al.*, 2018) et de bactéries (Le Claire et *al.*, 2002; Esmailnejad et *al.*, 2019) car elles présentent certains avantages par rapport aux immunoglobulines sériques de mammifères en ce qui concerne la productivité, le bien-être animal et la spécificité.

L'utilisation des canards comme un biofacteur pour la production de l'antivenin représente une alternative qui peut remplacer la production conventionnelle des antivenins à partir des chevaux, les IgY(Δ Fc) des canards sont dépourvus de la région Fc, ils ont la même structure que les fragments Fab'2, donc ces antivenins ne nécessitent pas une digestion enzymatique.

La technologie des IgY permet d'obtenir une quantité d'anticorps à partir d'une seule poule, similaire à celle d'un grand mammifère (Sifi et *al.*, 2018). De plus, l'échantillonnage est non invasif puisque le saignement de l'animal est remplacé par la collecte des œufs, et donc la douleur et la détresse des animaux sont éliminées. Et en comparant les coûts, les procédures et les fournitures nécessaires pour l'élevage des chevaux et des poules, on constate que le coût

de revient de production peut être réduit d'environ 40% (Navarro et *al.*, 2016). De plus, les chevaux requis pour obtenir des sérums antivenimeux doivent avoir entre 3 et 10 ans et peut nécessiter entre 9 et 19 vaccinations en utilisant de grandes quantités de venin, tandis que les poules commencent à pondre après environ 20 semaines, et un niveau significatif d'IgY spécifique dans le sérum a été détecté après la deuxième immunisation (Leiva et *al.*, 2019).

I.6.2. Antigènes de l'immunothérapie anti-venin

L'inoculation du venin brut est mal tolérée par l'animal receveur. En effet, la détoxification du venin sert à réduire sa toxicité en lui conservant ses propriétés immunologiques. Les techniques proposées pour détoxifier le venin sont nombreuses, en utilisant des méthodes physiques tels que, le rayonnement ultraviolet, le traitement thermique, le rayonnement gamma et le rayonnement ionisant ainsi que l'utilisation des agents chimiques telles que le formol, la carboxyméthyl cellulose et la photo-oxydation (Leon et *al.*, 2011).

L'immunisation à l'aide de venin détoxifié par ces techniques présente plusieurs inconvénients. Par exemple, l'irradiation gamma du venin de serpent malgré qu'elle diminue la toxicité par des modifications structurales de leurs protéines qui perdent leurs activités, cette technique présente comme inconvénients, la radiorésistance de la phospholipase et une réduction de l'immunogénicité du venin. D'autres techniques de détoxification du venin présentent un risque potentiel de perdre des épitopes importants (Oussedik-Oumehdi and Laraba-Djebari, 2008; Leon et *al.*, 2011).

Le glutaraldéhyde est un composé bifonctionnel principalement utilisé dans les modifications chimiques des protéines et des polymères, permet la formation des agrégats. Il est le plus utilisé pour la détoxification des venins grâce à son pouvoir de diminuer la toxicité en augmentant l'immunogénicité du venin (Silva et *al.*, 2004).

Le venin détoxifié est souvent associé à un adjuvant afin de stimuler la réponse immunitaire.

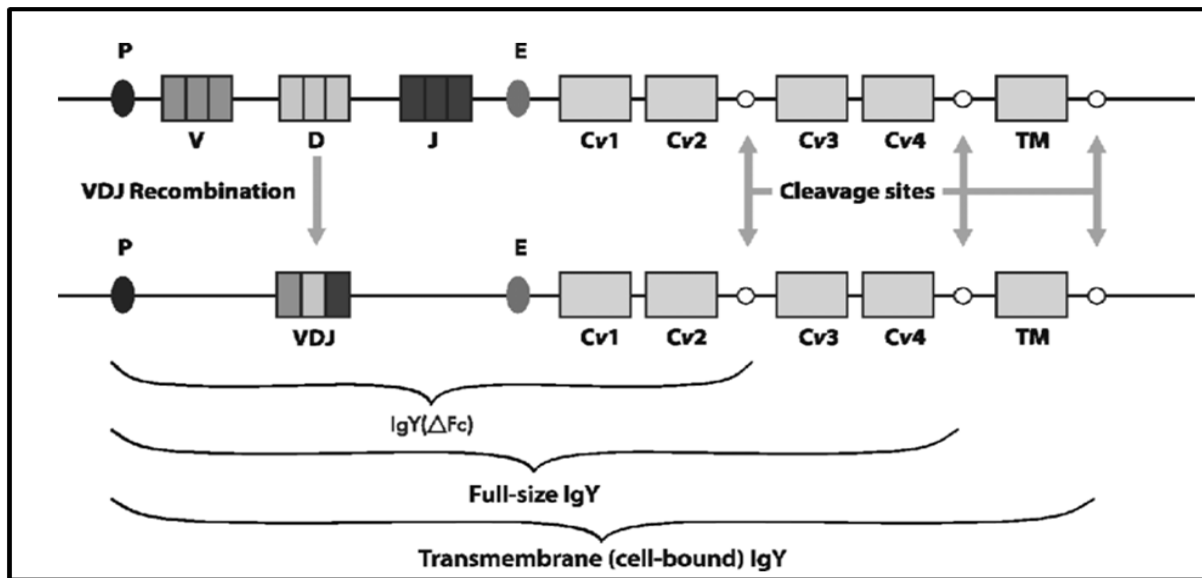


Figure 09 : Schéma représentant la recombinaison du gène des IgY du canard. La recombinaison du gène du canard v: V (variable) D (diversité) J (jonction) (VDJ) permet une hypermutation somatique, créant des chaînes légères d'anticorps ayant une affinité pour l'antigène. Les chaînes lourdes sont produites à partir de quatre régions constantes (Cv1 – Cv4) qui, selon le site de clivage, aboutissent à la production des trois isoformes différentes d'IgY. P: promoteur; E: activateur; TM: transmembranaire (Meddings et *al.*, 2014).

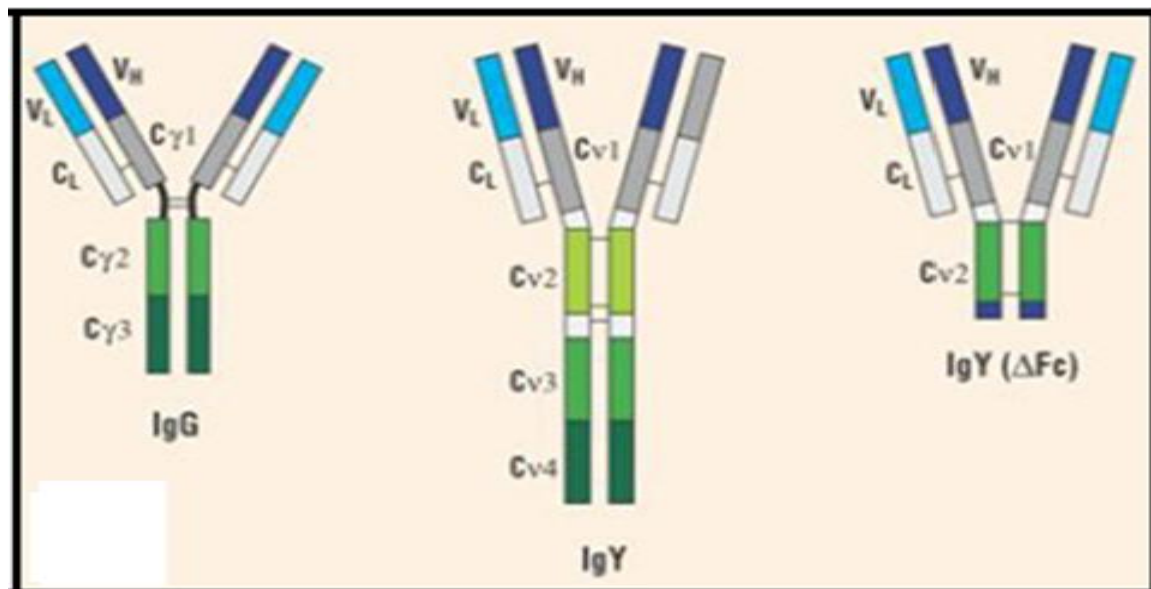


Figure 10 : Schéma représentant la structure des immunoglobulines IgG, IgY et IgY(ΔFc).

1.7. Adjuvants immunologiques

Le terme «adjuvant» dérive du mot latin « adjuvare » qui veut dire aider. C'est un composant clé pour les vaccins capable d'améliorer et moduler les réponses immunitaires spécifiques à l'antigène. Dans le cas de la production d'antivenin, des adjuvants sont utilisés pour produire des titres élevés d'anticorps avec une forte affinité (Cox and Coulter, 1997; Batista-Duharte et al., 2011).

Chaque adjuvant peut favoriser un ou plusieurs des processus immunitaires : i) absorption d'antigène par les cellules présentatrices d'antigène (CPA); ii) la stimulation de la CPA en induisant la production des cytokines et les molécules du CMH de classe II et de la co-stimulation; iii) la migration de la CPA vers la zone T cell des ganglions lymphatiques (Cox and Coulter, 1997; Aguilar and Rodríguez, 2007) (Figure 11).

Le choix et l'utilisation de systèmes adjuvants dans la préparation de sérum antivenimeux de serpent sont très importants en termes de bien-être de l'animal et l'économie, l'adjuvant complet de Freund et l'hydroxyde d'aluminium sont les plus couramment utilisés pour la production des antisérums.

1.7.1. Adjuvant complet de Freund

L'Adjuvant complet de Freund (ACF) est une émulsion d'eau dans l'huile (Huile de paraffine) stabilisé par un agent émulsifiant (monooléate de mannide) à laquelle sont ajoutées des fractions peptidoglycolipidiques extraites de mycobactéries inactivées par la chaleur. Les composants actifs conférés par les mycobactéries sont la N-acétylmuramyl-L-alanine-D-isoglutamine (MDP), une molécule qui active les macrophages et les cellules dendritiques via le domaine d'oligomérisation de liaison aux nucléotides (NOD2), et les éléments squelettiques de la paroi cellulaire bactérienne. Ce qui induit à la production des cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12) et le recrutement des cellules immunitaires (Kotani et al., 1975; Petrovsky and Aguilar, 2004; Aguilar and Rodríguez, 2007; Batista-Duharte et al., 2011).

L'ACF combine l'effet dépôt d'une émulsion eau dans huile et la capacité d'activation de l'immunité non spécifique des bactéries inactivées et la stimulation de cellules T auxiliaires spécifiques d'épitopes de *M.tuberculosis*. Ces propriétés font un puissant activateur à la fois de la réponse humorale et de la réponse cellulaire (Cox and Coulter, 1997).

Cependant, malgré ces activités immunoadjuvantes, l'ACF provoque plusieurs effets indésirables, dont il induit à une augmentation de l'hypersensibilité retardée aux divers antigènes protéiniques incorporés (y compris ceux associés aux mycobactéries), la formation d'un granulome persistant et souvent nécrotique au lieu de l'injection et des troubles auto-immunes analogues peuvent être suscités contre un nombre d'antigènes tissulaires (Aguilar and Rodríguez, 2007).

I.7.2. Hydroxyde d'aluminium

L'hydroxyde d'aluminium (Alum) est le produit chimique le plus utilisé comme adjuvant (Batista-Duarte et *al.*, 2011). Il se présente sous forme d'un précipité insoluble de type gel, sur lequel sont adsorbées les protéines antigéniques, ce qui lui permet de maintenir ses caractéristiques physiques et chimiques. L'Alum stimule la réponse immunitaire en agissant comme un «dépôt»; les antigènes sont libérés lentement sous une forme particulière qui favorise le captage par les cellules présentatrices d'antigène (CPA), et induit ainsi la sécrétion des chimiokines comme CCL3, CCL4 et CCL5 et l'expression élevée des récepteurs membranaires tels que CD83 et CCR7 pour recruter les cellules inflammatoires (Nouri and Laraba-Djebari, 2015). Cet adjuvant favorise l'orientation de la réponse immunitaire adaptative vers la voie Th2 induisant l'activation et la maturation des lymphocytes B en plasmocytes sécréteurs des immunoglobulines, en particulier les IgG1 et IgE.

L'Alum active la protéine NLRP3 appartenant à la famille des récepteurs NLR, qui s'associe à des protéines pro-apoptotiques, l'ASC et la caspase-1 pour former un complexe appelé inflammasome. La caspase-1 à sa forme active, clive les cytokines pro-inflammatoires l'IL-1 β , l'IL-18 et l'IL-33. L'interleukine-1 β est classiquement considéré comme favorisant de la prolifération des cellules Th2. L'IL-33 est un puissant stimulant pro-Th2 et favorise fortement la production de cytokines associées à Th2 (IL-4, IL-5, IL-13); et IL-18 s'est avéré augmenter les anticorps IgE. Ce qui explique la capacité de cet adjuvant à activer préférentiellement les cellules Th2 et à augmenter la production d'anticorps (De Gregorio et *al.*, 2008; Eisenbarth et *al.*, 2008; Calabro et *al.*, 2011).

L'activation de l'inflammasome par l'alum peut être directe ou indirecte via la sécrétion de l'acide urique et d'autres signaux de dangers DAMPs (Danger Associated Molecular Patterns) par des cellules phagocytaires qui subissent une nécrose après la phagocytose de l'Alum (Calabro et *al.*, 2011; Nait Mohamed et *al.*, 2017; Thakkar et *al.*, 2018)(Figure 12).

L'Alum est un adjuvant de choix et continuera d'être utilisé en raison de son bon profil de sécurité et de faible coût, mais, malgré sa capacité de provoquer une forte réponse Th2, il est inefficace contre les agents pathogènes qui nécessitent une immunité à médiation cellulaire (Th1) et peut causer des réactions allergiques induites par les IgE (Kool et *al.*, 2012).

I.7.3.Nanoparticules d'hydroxyde d'aluminium

La réduction de la taille des particules de l'adjuvant d'hydroxyde d'aluminium traditionnel en nanomètres représente une approche nouvelle et efficace pour améliorer son adjuvancité.

Les particules biodégradables polymères avec des antigènes piégés, sont récemment révélées possédant un potentiel important en tant que systèmes d'administration de vaccins. En comparant aux adjuvants traditionnels à base d'Alum, l'adjuvant à l'échelle nanométrique avec la même quantité d'hydroxyde d'aluminium peut adsorber plus d'antigènes en raison de la plus petite taille des particules, de la surface spécifique beaucoup plus grande, de la réactivité de surface plus élevée et de la capacité d'adsorption plus forte. Ce dernier peut ainsi stimuler la production plus élevée d'anticorps que l'Alum et améliorer la différenciation des cellules Th en cellules Th1, ce qui conduit à une réponse immunitaire cellulaire (He et *al.*, 2015).

La petite taille des nanoparticules d'hydroxyde d'aluminium (nano-Al(OH)₃) permet d'augmenter l'internalisation de l'Ag adsorbé sur eux, par les cellules dendritiques et les macrophages ce qui améliore la présentation antigénique et l'activation de l'immunité adaptative (Li et *al.*, 2014).

Des études récentes ont démontré que l'activité adjuvante plus puissante des nano-Al(OH)₃ est probablement liée à leur plus grande capacité d'induire la mort cellulaire et provoque la libération importante des signaux de danger endogènes tels que l'acide urique, suggérant une voie indirecte pour activer l'inflammasome NLRP3 (Thakkar et *al.*, 2018).

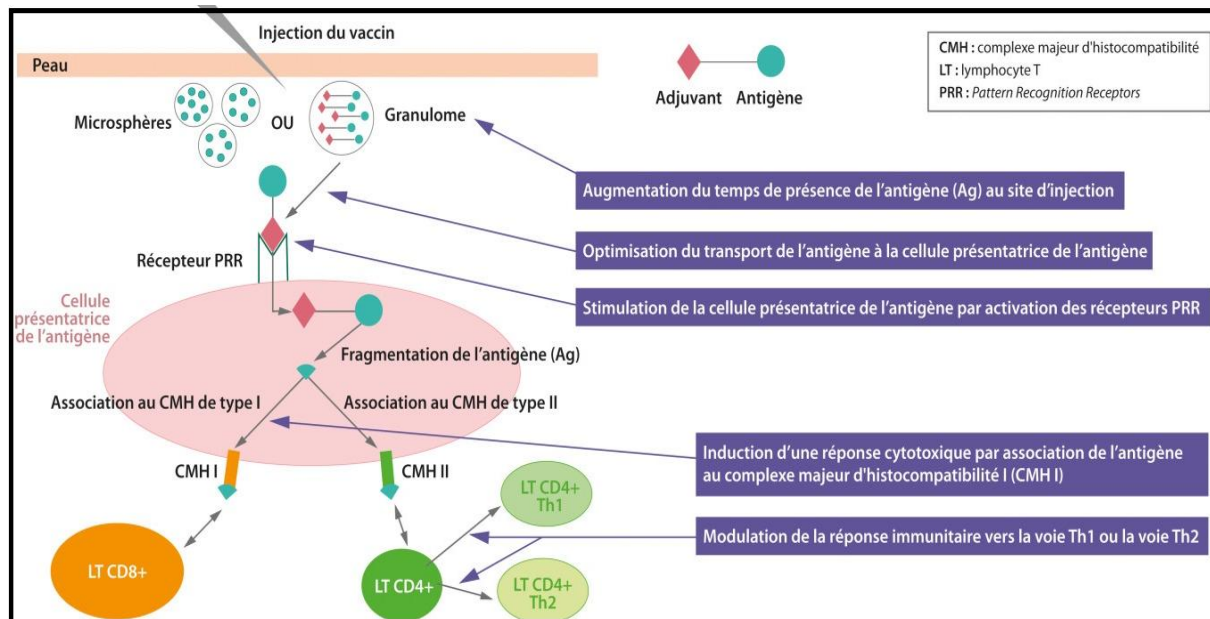


Figure 11 : Mécanisme d'action des adjuvants (Blin, 2019).

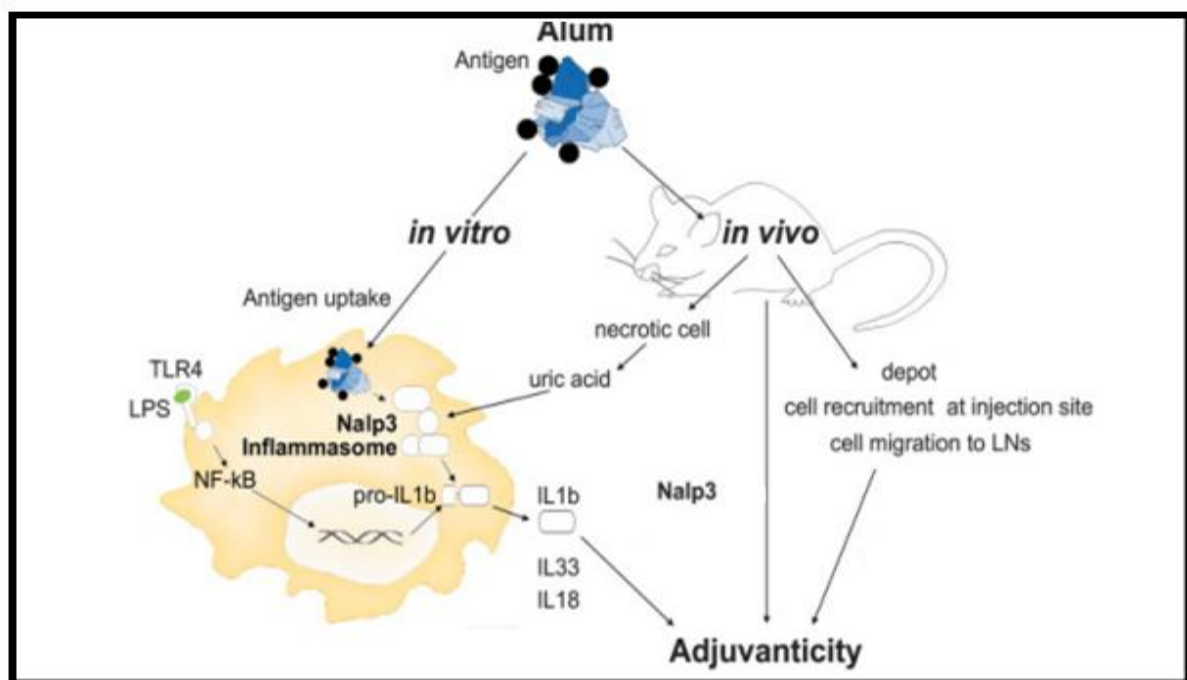


Figure 12 : Mécanismes d'action proposés pour l'alum *in vitro* et *in vivo* et leurs contributions éventuelles à l'adjuvanticité. *In vitro*, l'alum complexé à l'antigène augmente l'absorption d'antigène par l'APC. De plus, l'alum induit une activation directe du complexe inflammasome Nlrp3 (Nalp3) et se met en synergie avec la stimulation LPS de TLR4 pour les cytokines pro-inflammatoires de sécrétion telles que IL-1b, IL-18 et IL-33. *In vivo*, l'alum induit une nécrose dans des cellules cibles non identifiées entraînant la production d'acide urique, qui a le potentiel de stimuler Nlrp3. L'alum stimule également le recrutement local d'APC et la migration d'APC vers les ganglions lymphatiques drainants (De Gregorio et al., 2008).

Chapitre II

Méthodes

II. Méthodes

Au cours de ce travail, la synthèse des nanoparticules d'alum ainsi que les préparations d'immunisation ont été réalisées au niveau de laboratoire d'immunologie de la faculté des sciences de l'université M'Hamed Bouguara, Boumerdes. L'immunisation des canards et la collecte des œufs afin de faire l'extraction des IgY ont été réalisées au niveau de centre cynégétique de Reghaia. Les résultats de la caractérisation physicochimique des nanoparticules d'alum et le pouvoir neutralisant des anticorps ont été obtenus des études récentes.

II.1. Préparation des nanoparticules d'hydroxyde d'aluminium

Les nanoparticules d'hydroxyde d'aluminium ont été préparées en faisant réagir sous agitation à température ambiante un volume de chlorure d'aluminium (AlCl_3) (3,6g/50ml) avec un volume d'hydroxyde de sodium (NaOH) (1,6g/50ml). L'hydroxyde de sodium a été ajouté pour ajuster le pH à 7. La solution obtenue est ensuite centrifugée à 2000 rpm pendant 20 minutes afin de sédimenter les particules d'hydroxyde d'aluminium. Ensuite, l'acide aspartique a été ajouté à raison de 50Mm (6.65 mg/ml de nanoparticules) pour garder la taille des nanoparticules et empêcher leur agrégation. Cette étape a été suivie par un broyage à haut débit en utilisant l'appareil « Retsch MM500 » à 30 rpm pendant 2 cycles avec une durée de 3 min pour chaque cycle.

II.2. Caractérisation physicochimique des nanoparticules d'alum

II.2.1. Analyse structurale des préparations d'immunisation

La caractérisation morphologique des nanoparticules se fait par le microscope électronique à transmission (MET). D'après le protocole de Li et *al.*, (2014) des grilles recouvertes de carbone de 400 mesh s'activent pendant 1 à 2 min. Une goutte de la suspension de nanoparticules se dépose sur les grilles puis incubée pendant 2 min à température ambiante. Les grilles se lavent à l'eau et se séchent pendant 1 min. L'eau supplémentaire s'élimine en utilisant du papier filtre. Les grilles se colorent ensuite à l'acétate d'uranyle pendant 2 min, se lavent à l'eau et se laissent à sécher pendant 15 min avant observation. La forme tridimensionnelle et la taille ainsi des Nps d'alum se fait par le microscope électronique à balayage (MEB) (Li et *al.*, 2014).

II.2.2. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

La Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) est une technique analytique utilisée pour l'identification et l'analyse structurale de composés chimiques. Cette technique mesure l'absorption du rayonnement infrarouge par le matériau de l'échantillon en fonction de la longueur d'ondes. Les pics du spectre IR représentent l'excitation des modes vibrationnels des molécules de l'échantillon et sont donc associés aux différentes liaisons chimiques et groupes fonctionnels présents dans les molécules (Ismail et *al.*, 1997). Cette technique permet la caractérisation et la détermination de la nature des liaisons chimiques présentes dans les Nps d'Alum.

D'après Fiamman Gláucia-Silva et *al.*, 2018 les échantillons se sèchent par un concentrateur sous vide rapide, puis se mélangent uniformément avec du bromure de potassium (KBr) dans une proportion de 1/200 (p / p) et se compressent par une presse hydraulique pour former une pastille (Gláucia-Silva et *al.*, 2018).

II.4. Caractérisation immunologique des préparations d'immunisation

II.4.1. Immunisation des animaux

Les animaux utilisés sont des canards à colvert de l'espèce « *Anas platyrhynchos* » qui appartient à la famille des *Anatidae* et à l'ordre des *Anseriformes*. Ils ont été fournis et hébergés par le « Centre cynégitique de Reghaia ».

Un groupe de six (06) canards d'un poids moyen de 1,2 kg ont été utilisés dans cette étude. Les animaux ont été gardés sous des conditions environnementales adéquates avec un accès libre à l'eau et à l'aliment.

L'immunisation a été réalisée par des injections intramusculaires. Les canards ont reçu 6 injections avec un intervalle d'une semaine. La dose de venin détoxifié associé à des nanoparticules d'hydroxyde d'aluminium injecté est de 0,5 ml par sujet. La collecte des œufs de canards immunisés se fait quotidiennement. Ils ont été conservés à une température de 4°C jusqu'à l'extraction des anticorps IgY(Δ Fc) (Figure 13).

Le venin de *Naja haje* utilisé dans cette étude a été fourni par le Parc des reptiles « Hadj Aissa » de Ghardaïa. La dose létale DL50 adoptée durant cette étude est de 25 µg/kg de poids corporel de l'animal. La détoxification de venin a été faite avec du glutaraldéhyde à 0.25% sous agitation pendant 30 minutes.

II.5. Extraction des IgY(Δ Fc) spécifiques au venin de *N.h*

L'extraction des IgY est basée sur le phénomène de « Salting out », cette technique utilise une concentration élevée de sel pour priver les protéines des molécules d'eau qui les hydratent, celles-ci sortent de solution et précipitent.

La méthode de « Salting out » a été réalisée par la séparation de jaune d'œuf du blanc soigneusement; puis, la membrane du jaune a été perforée et le jaune entier a été laissé s'égoutter dans un bécher et homogénéisé complètement. Cinq (05)g de jaune d'œuf bien mélangé ont été transférés dans un autre bécher stérile et dilués avec 9 volumes d'eau distillée, le pH de la solution a été ajusté à pH 5.1 avec 0.1N HCl puis stockée à 4°C pendant une nuit. Après l'incubation, la solution est centrifugée à 10000×g pendant 25 min à 4°C, le surnageant est récupéré puis mélangé doucement avec du volume égal de sulfate d'ammonium saturé à 40%. La solution est incubée pendant 4 heures à une température ambiante puis centrifugée à 12000×g pendant 30 min à 4°C. Les culots ont été remis en suspension dans 5 ml de PBS stérile et dialysés contre du tampon phosphate 20 mM à 4 ° C pendant une nuit puis stockés à -20°C (Ko and Ahn, 2007).

II.6. La quantification des IgY

Le titrage des anticorps dans les jaunes d'œufs se fait par un dosage immuno-enzymatique (ELISA), c'est une technique de détection qui permet de visualiser une réaction antigène-anticorps grâce à une réaction colorée produite par l'action d'une enzyme préalablement fixée à l'anticorps sur un substrat.

Selon Theakston et al, 2003 des plaques ELISA en polystyrène se recouvrent de venin et se conservent pendant une nuit à 4 ° C. Après une étape de lavage avec du tampon PBS contenant 0,1% de Tween-20, les sites non spécifiques se bloquent avec 100 µl de PBS 0,1 M, pH 7,4 contenant 5% de lait écrémé pendant 1 h à 37 ° C et se lavent cinq fois avec du PBS-Tween 20. Des préparations d'IgYs diluées de 1: 500 à 1: 2048000 dans du tampon PBS (0,1 M, pH 7,4) se rajoutent à chaque puits, suivies d'une incubation de 1 h à 37 ° C. Après lavage, des anti-IgY conjugués à la peroxydase (molécule entière) dilués (1: 2000) dans du PBS-Tween-20 0,1% se rajoutent. Les puits se lavent à nouveau et 50 µl de substrat de tampon (tampon de phosphate de phosphate 0,01 M et pH 5, 10 mg OPD, 4 mM H_2O_2) se rajoutent et les plaques sont incubées à température ambiante pendant 10 à 15 min. De l'acide sulfurique (2 N, 50 µl / puits) se rajoute pour arrêter la réaction. Un lecteur de plaque ELISA a été utilisé pour enregistrer l'absorbance à 490 nm (Sifi et al., 2018; Theakston et al., 2003).

II.7. Test de séroneutralisation

La méthode de double diffusion en gel d'*Ouchterlony* est un phénomène d'immunoprécipitation basé sur la diffusion d'antigènes et d'anticorps en milieu solide (en général un gel d'agarose) à partir de puits placés en vis à vis. Les antigènes solubles se combinent avec des anticorps spécifiques pour former un précipité visible. Les précipités se présentent sous la forme d'un arc blanchâtre visible à l'œil nu.

Selon C. Maya Devi et *al.*, 2002 la capacité de liaison à l'antigène des anticorps isolés se détecte par la méthode de double diffusion d'*Ouchterlony* en utilisant 1% d'agarose (Sigma, USA). L'antigène s'ajoute dans le puit du milieu et des anticorps en dilutions en série s'ajoutent dans les puits périphériques. La réaction se laisse pendant 48 heures à 4°C ; puis, les gels se lavent pendant 24 heures avec plusieurs changements de solution saline. Enfin, le gel se sèche et se colore avec un colorant au bleu de Coomassie à 1% (Maya Devi et *al.*, 2002).

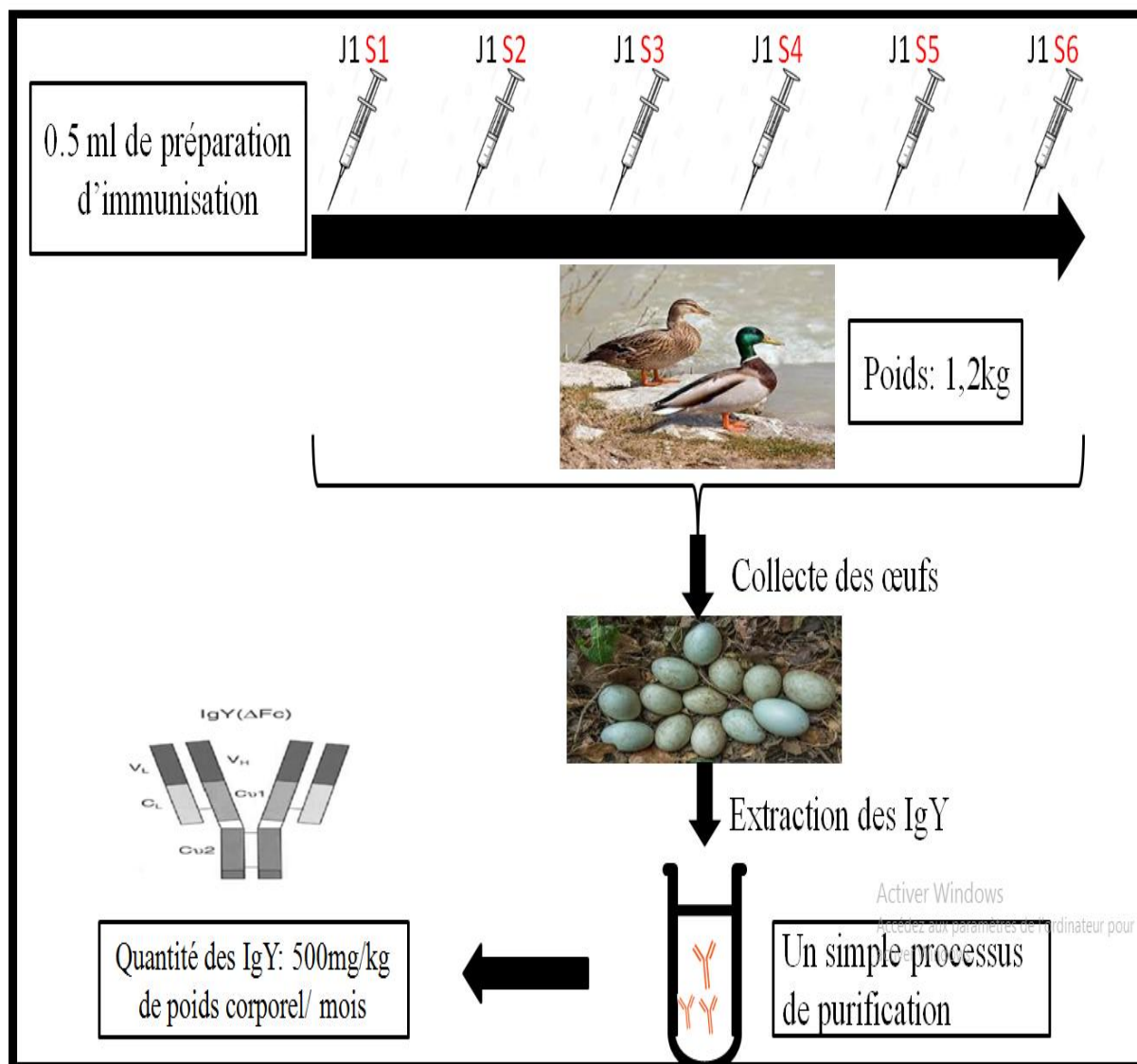


Figure 13: Schéma représentant le protocole d'immunisation des canards « *Anas platyrhynchos* » avec le venin de *Naja haje* détoxifié et associé à des nanoparticules d'aluminium.

Chapitre III

Résultats et discussions

III. Résultats et discussion

III.1. Caractérisation physicochimique des préparations d'immunisation

De nombreux chercheurs conviennent que la taille des particules est cruciale pour leur activité adjuvante (Fifis et *al.*, 2004; Wendorf et *al.*, 2008; Oyewumi et *al.*, 2010; Li et *al.*, 2014). Les études microscopiques des Nps d'alum démontrent que ces derniers ont une taille qui varie entre 100 nm et 220 nm de diamètre (Figure 14) avec une forme sphérique (Figure 16).

L'analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de fourier permet la mise en évidence des liaisons chimiques de la formulation des Nps d'Alum.

Le spectre de l'échantillon des Nps présente des bandes d'absorption dans les intervalles de 3600-3400 cm^{-1} , 1800- 1600 cm^{-1} , 1200- 1000 cm^{-1} qui correspondent aux liaisons O-H, H-O-H et Al-OH respectivement (Figure 15). L'identification des liaisons a été faite en se basant sur le tableau IR (Magamou Gueye, 2016).

Ces résultats montrent que les Nps ont la même composition chimique que l'Alum classique avec une pureté de composition plus importante.

La réduction de la taille des particules de l'adjuvant d'hydroxyde d'aluminium traditionnel en nanomètres permet d'améliorer son activité adjuvante en induisant une réponse immunitaire spécifique plus importante et une production des anticorps plus forte et plus durable, de plus, les Nps d'hydroxyde d'alum provoquent moins de réactions inflammatoires, cette puissante activité des Nps est probablement liée à leur capacité à activer l'inflammasome NLRP3 que les microparticules de sel d'aluminium, car dans la culture cellulaire, les cellules phagocytaires (par exemple les macrophage) peuvent internaliser plus efficacement les Nps que les microparticules, entraînant vraisemblablement une augmentation des dommages et des ruptures lysosomales (Sharp et *al.*, 2009; Thakkar et *al.*, 2018).

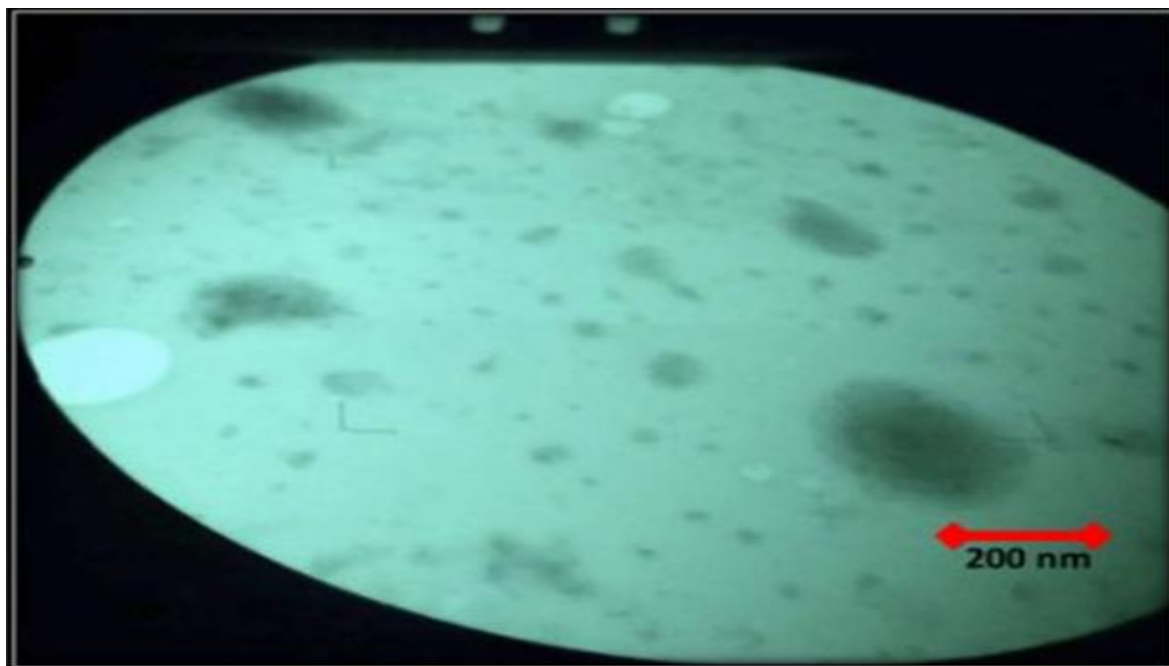


Figure 14 : Caractérisation des nanoparticules d'hydroxyde d'aluminium vide par microscope électronique à transmission Gr X 120000(Attar et *al.*,2018)

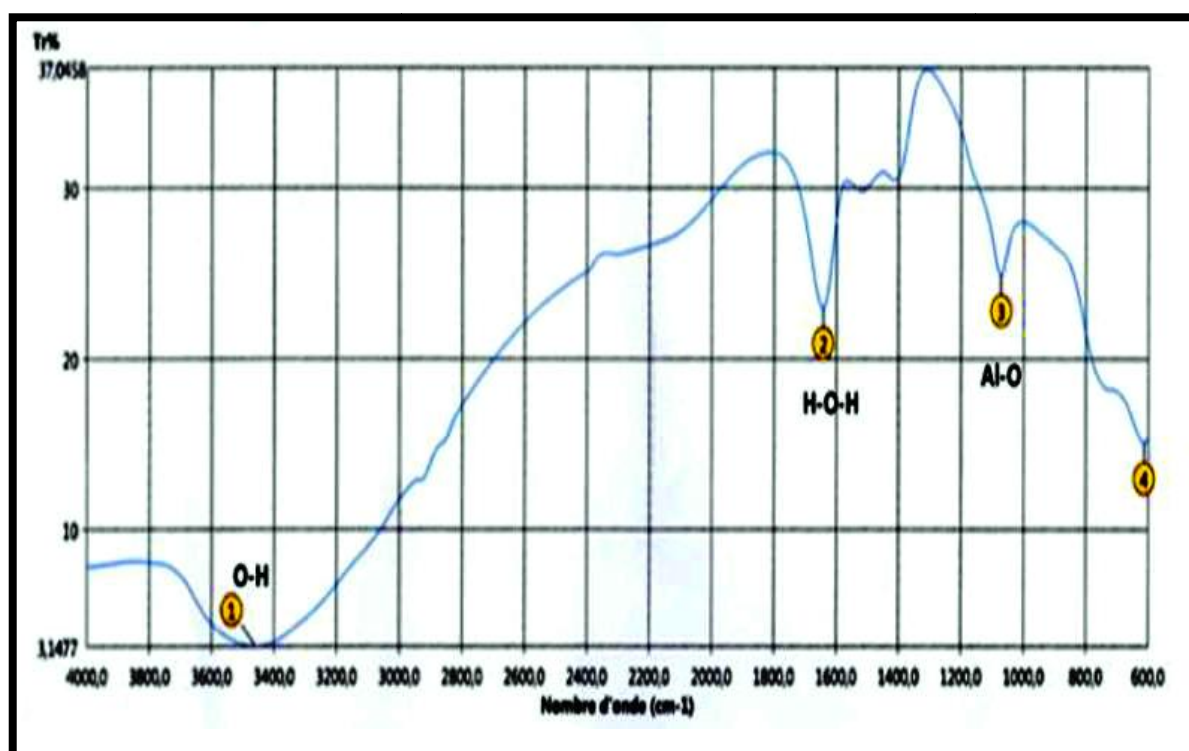


Figure 15: Spectre d'absorption infrarouge des nanoparticules d'hydroxydes d'aluminium (Attar et *al.*,2018)

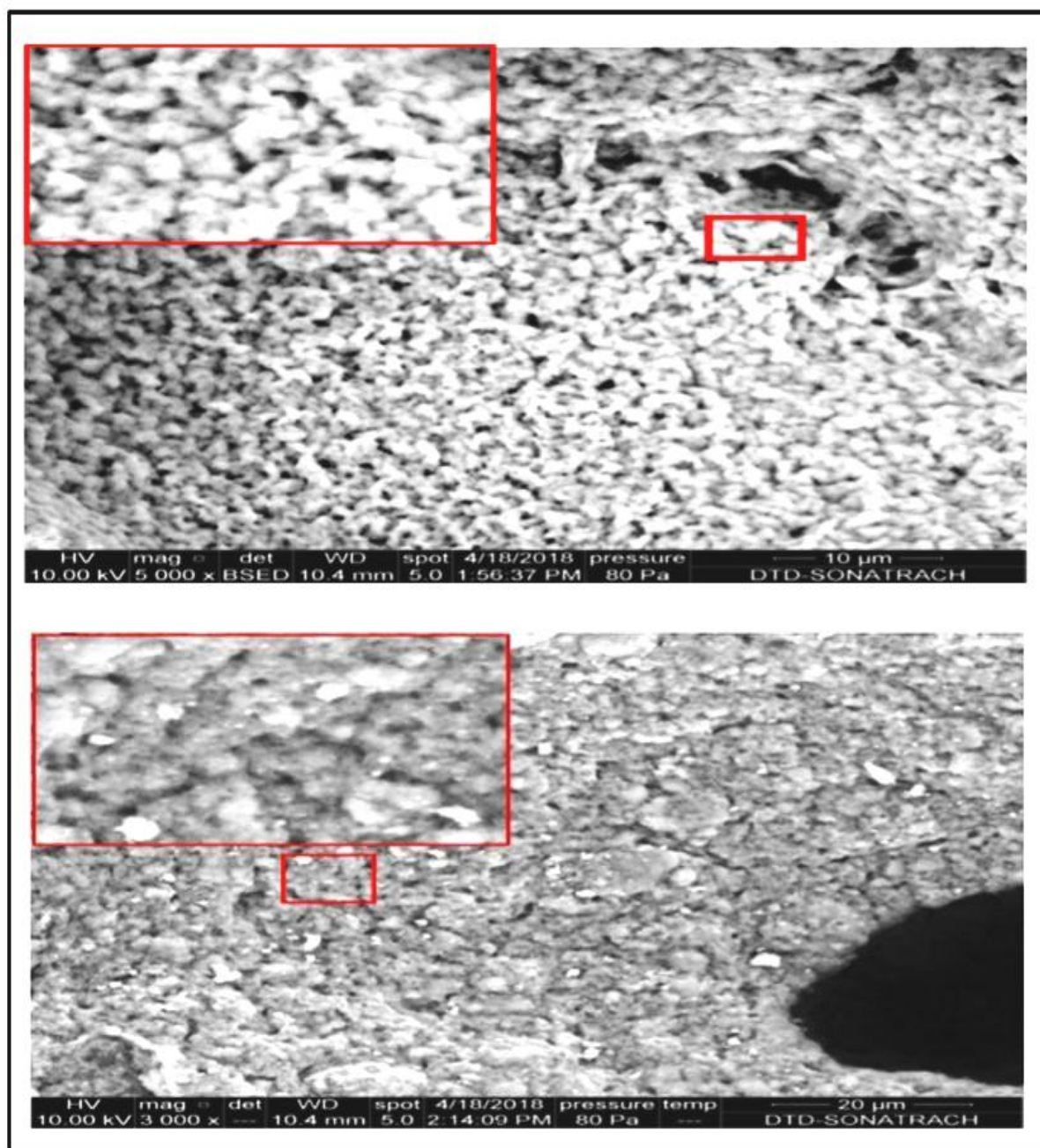


Figure 16 : Caractérisation des nanoparticules d'hydroxyde d'aluminium par microscope électronique à balayage (Attar et *al.*,2018).

III.2. Les immunoglobulines Y

L'immunothérapie pour le traitement des envenimations est basée sur les anticorps IgG mammaliens. Cette technique est non seulement un processus coûteux mais elle a des graves effets secondaires sur les animaux producteurs en réduisant leur espérance de vie, ce qui diminue indirectement l'efficacité des anticorps (Hammoudi-Triki et *al.*, 2007; Pakmanee et *al.*, 2013; Sifi et *al.*, 2018), alors des méthodes alternatives sont actuellement essayées.

Plusieurs recherches ont rapporté l'utilisation d'immunoglobulines de jaune d'œuf (IgY) en remplacement des anticorps de mammifères dans des applications thérapeutiques (Warr et *al.*, 1995; Dias da Silva and Tambourgi, 2010; Zhang et *al.*, 2017; Esmailnejad et *al.*, 2019; Leiva et *al.*, 2019). Des anticorps spécifiques de poulet ont été utilisés avec succès contre plusieurs antigènes. Cette technique est rentable, pratique et non invasive avec des taux de rendement élevés.

Les résultats de plusieurs études appliquant différents protocoles d'immunisation révèlent la présence des anticorps spécifiques dans le jaune d'œuf après 15 jours de l'inoculation. La production d'anticorps augmente progressivement pendant la période d'immunisation et atteint un taux suffisamment élevé après la sixième semaine. Ce dernier reste élevé et stable jusqu'à la fin de la période d'observation. Cette réponse humorale typique a été observée par Victor Y-Neng Chiou après avoir immuniser des canards par 0,5 ml de venin de cobra détoxifié (4 mg/ml). Le même profil a été observé en utilisant le venin du serpent et du scorpion comme antigène pour l'immunisation des poulets (Almeida et *al.*, 1998; de Almeida et *al.*, 2008; Navarro et *al.*, 2016; Sifi et *al.*, 2018). Tandis que la production d'antivenin chez les chevaux peut prendre entre 9 et 19 immunisations en utilisant des quantités élevées de venin (26,5 à 51 mg) (Leiva et *al.*, 2019) (Figure 17).

Le processus d'extraction et de purification des IgY (ΔFc) est simple et n'utilise que des produits biocompatibles. La dilution du jaune d'œuf à l'eau suivie par la précipitation au sulfate d'ammonium permet d'obtenir un précipité d'anticorps de pureté allant jusqu'à 95% (Chiou, 2008).

Cette méthode simple et efficace d'extraction des anticorps antivenin avec une pureté élevée permet de résoudre certaines complications associées à l'immunothérapie antivenimeuse classique.

Les effets secondaires cliniques qui surviennent chez les personnes recevant du sérum antivenin produit chez les chèvres, les moutons et les chevaux est dû à la présence de protéines sériques sur le sérum antivenin dérivé de ces animaux, dans lequel les IgG ne sont pas suffisamment purifiées. Un avantage de l'utilisation de l'IgY dans la sérothérapie antivenin est qu'elle est facilement purifiée, ce qui minimiserait l'apparition d'effets secondaires dus à ces protéines non spécifiques (Sjöstrom et *al.*, 1994; Araújo et *al.*, 2010; Pereira et *al.*, 2019).

Les résultats du test d'*Ouchterlony* montrent une précipitation de complexe immunitaire (IgY -antigène) visible sous forme d'un arc ce qui confirme la présence des immunoglobulines spécifique antivenin dans le jaune d'œuf (Maya Devi et *al.*, 2002) (Figure 18).

Selon Victor Y-Neng Chiou, les résultats de SDS PAGE d'antivenins dérivés de jaune d'œuf montrent la présence de deux bandes de 120 KDa et 180 KDa qui correspondent aux IgY (Δ Fc) et IgY respectivement (Chiou, 2008).

Malgré que le mode de fonctionnement des IgY(Δ Fc) chez l'animal n'est pas intégralement illustré, leurs utilisation pourrait avoir plusieurs avantages dans les applications thérapeutiques. Ces anticorps tronqués ont une structure similaire à celle des fragments F(ab')₂, ils sont des analogues naturels des F(ab')₂ qui ont la capacité de reconnaître spécifiquement un antigène immunisant. Cette structure naturelle et unique de ces anticorps permettra de simplifier le processus de production d'antivenin car ils ne nécessitent pas une digestion enzymatique par la pepsine. Cela permettra au même temps d'améliorer la qualité et le rendement du processus tout en réduisant le coût final (Warr et *al.*, 1995; Lundqvist et *al.*, 2006; Munhoz et *al.*, 2014)(Figure 19).

Les analyses de plusieurs recherches ont montré que les extraits d'IgY sont capables de reconnaître et neutraliser la plupart des principaux composants du venin de différentes espèces(Araújo et *al.*, 2010; Sifi et *al.*, 2018).Une comparaison entre l'activité des IgY et IgG équin spécifique au venin des serpents du genre *Bothrops* et contre le venin de l'espèce *Crotalus durissus terrificus* a été faite par Andrade et al. Des profils similaires de reconnaissance des antigènes ont été observés pour les anticorps IgY du sérum et de jaune d'œuf et les anticorps IgG du sérum équin. La majorité des composants du venin de cobra sont des neurotoxines de taille moléculaire inférieure à 25 KDa, l'analyse par Western blot de Victor Y-Neng Chiou indique que les IgY(Δ Fc) contre le venin de cobra reconnaissent les protéines de venin de petits poids moléculaire et la protéine de poids moléculaire de 50 KDa. Ce schéma de reconnaissance est

similaire aux antivenins commerciaux ou expérimentaux dérivés des équidés (De Andrade et *al.*, 2013).

Les antivenins dérivés du jaune d'œuf de canard étaient efficaces pour neutraliser la létalité chez les souris injectées avec 4×DL50 de venins (Chiou, 2008).

La méthode de production d'IgY(Δ Fc) contre les venins de serpents permet la préparation de lots plus importants d'anticorps puissants et spécifiques avec des titres d'anticorps élevés > 500 mg/kg de poids corporel/ mois et celui du sérum de cheval est < 200 mg/kg de poids corporel/ mois (Chiou, 2008). En plus, les chevaux requis pour obtenir des sérums antivenimeux doivent avoir entre 3 et 10 ans tandis que les canards commencent à pondre après environ 20 semaines et le saignement douloureux chez les animaux est remplacé par la collecte des œufs (Navarro et *al.*, 2016). Alors l'utilisation d'antivenins de canard pour traiter les envenimations doit donc être une alternative qui peut remplacer la production conventionnelle d'antivenin en raison de ses avantages économiques, éthiques et productifs.

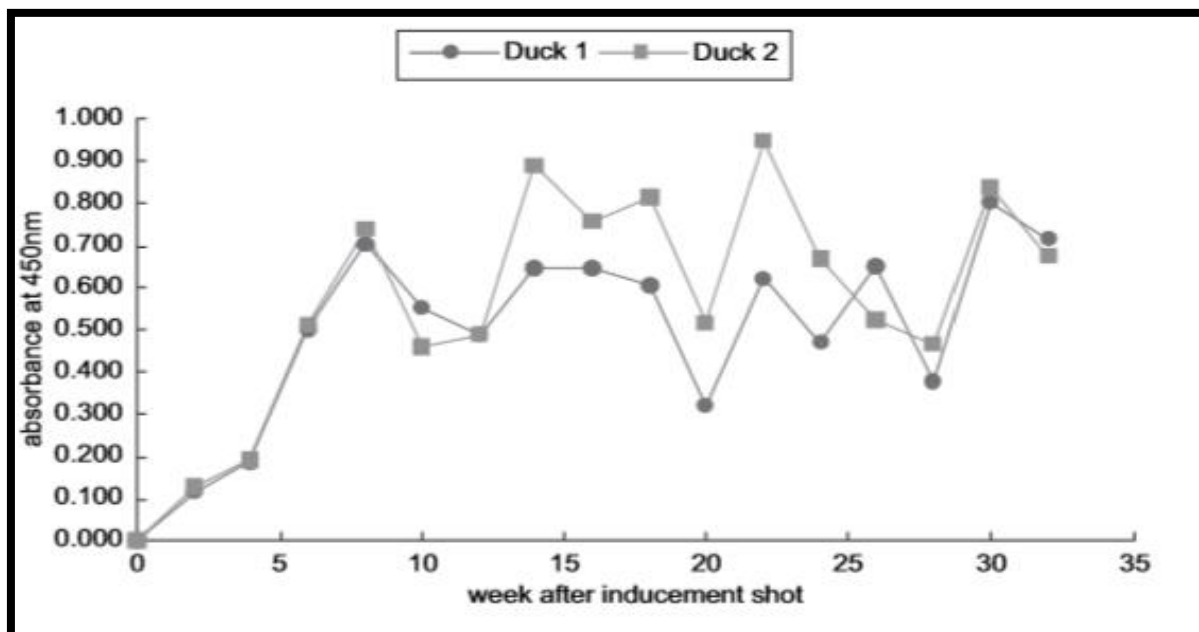


Figure 17: Cinétique de production d'anticorps dans le jaune d'œuf de canards hyperimmunisés avec du venin de cobra. Le titre d'anticorps a été estimé par ELISA. L'IgY (Δ Fc) avant immunisation a été testée comme le titre de la semaine 0 (Chiou, 2008).

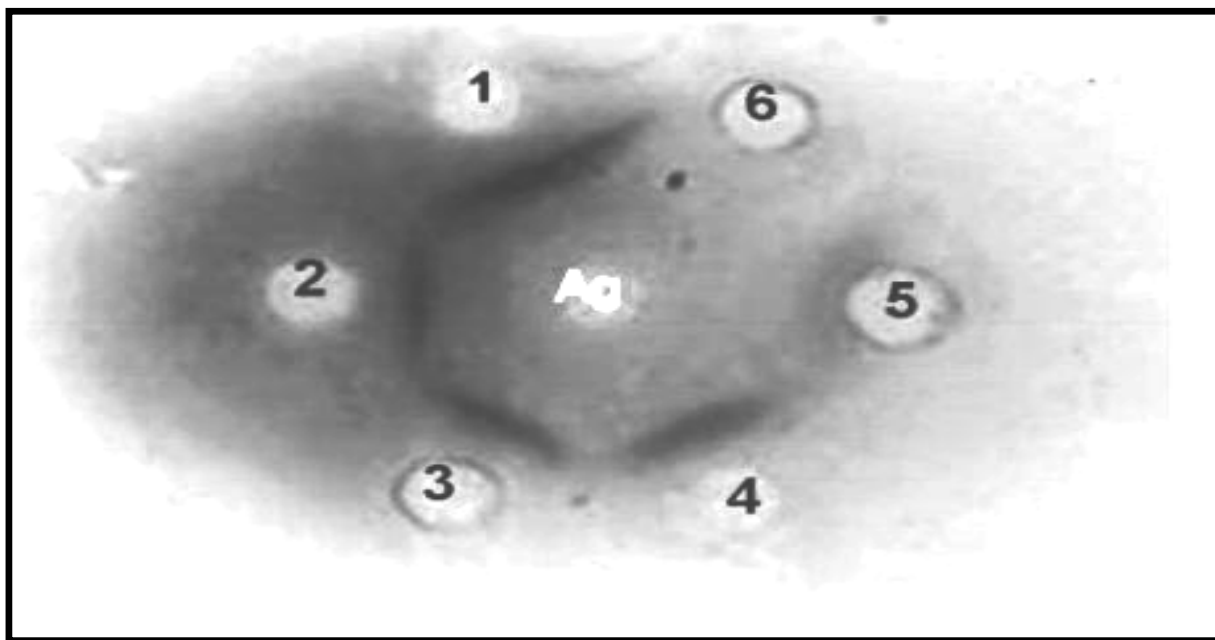


Figure 18: Lignes de précipitation formées par la réaction entre le venin natif et la fraction d'immunoglobuline provenant d'IgY d'œuf. Le puits du milieu contenait du venin de 20 μ g (protéine de Lowry) et le puits périphérique 1 contenait 20 μ g de fraction d'immunoglobuline. Les dilutions en série 1: 2, 1: 4, 1: 8, 1:16 et 1:32 ont été ajoutées dans les puits 2 à 6, respectivement (Maya Devi et *al.*, 2002).

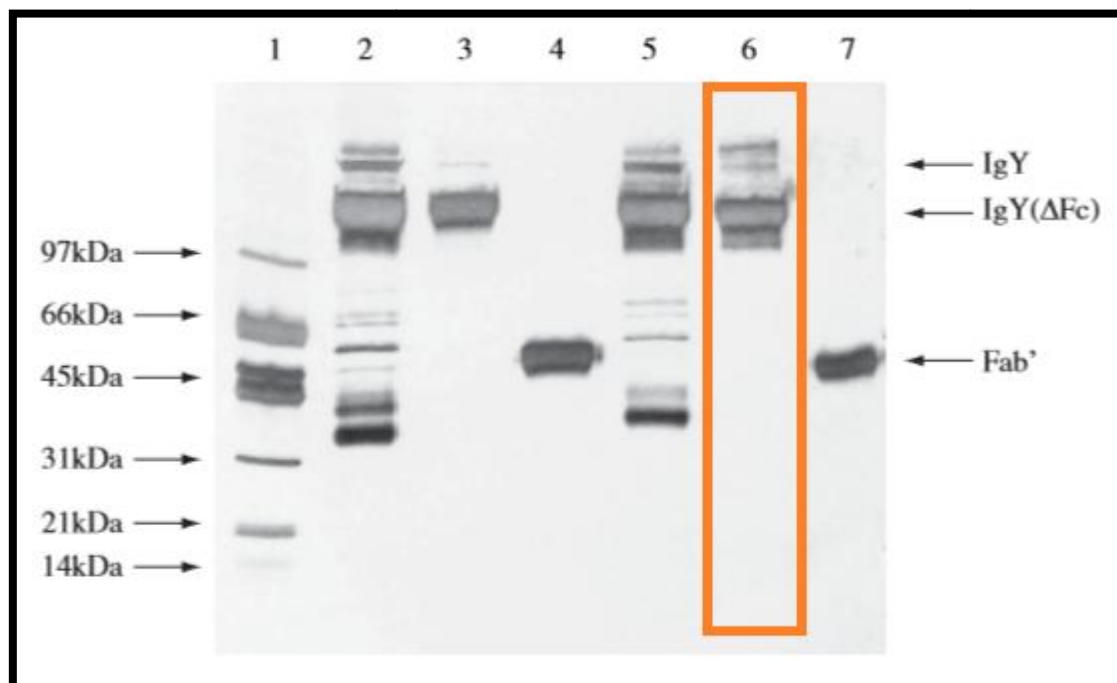


Figure 19 : Analyse SDS-PAGE d'antivenins dérivés de jaune d'œuf obtenus par différents procédés de production. Les anticorps de canard ont été séparés par SDS-PAGE gradient 8 ~ 20% et visualisés par coloration à l'argent. 6 : IgY (Δ Fc) spécifique au venin préparée par chromatographie d'affinité (Chiou, 2008).

Comparison items	Mammalian IgG	Avian IgY
Main sources	Plasma	Egg yolk
Steps imposing physical suffering to the antibody-producing animals	Antigen injection, blood collections, sometimes blood transfusions	Antigen injection
Antibody titer to mammalian antigens	Frequently low	Frequently high
Binding to Protein A/Protein G	++++	-
Binding to mammalian cell Fc receptor	++++	-
Immunocomplexes activate mammalian complement system	++++	-
Sustained antibody production	From 60th day in rabbits	From 30th day in chickens
Antibody production capacity	50-70 ml sera/90 immunization day; 500-700 mg of IgG	1 egg per day and 60 eggs/90 immunization days: 3-6 g of IgY
Antibody source collection	Production of the antisera involves complexes and expensive several steps	Production of the antisera involves simple and inexpensive few steps
Applications	RIA, IRMA, ELISA, Western blot, FACS, etc.	RIA, IRMA, ELISA, Western blot, FACS, etc.

Figure 20 : Tableau comparatif entre les IgG et les IgY (Dias da Silva and Tambourgi, 2010).

Conclusion et perspectives

Conclusion

L'étude réalisée à pour objectif la mise au point d'une approche immunothérapeutique antivenimeuse à base des nanoparticules d'hydroxyde d'alum et des IgY(Δ Fc) de jaune d'œuf de canard pour neutraliser le venin du cobra *Naja haje*.

L'étude des caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules a montré que ces dernières ont une forme sphérique, une taille de l'ordre de 200 nm et une composition chimique identique à celle de l'adjuvant alum classique. L'utilisation de ces Nps dans l'immunisation des animaux devrait avoir un effet inflammatoire réduit accompagné d'une amélioration de la réponse immunitaire spécifique. Tous ensembles ces résultats montrent que les nanoparticules d'hydroxyde d'aluminium ont le potentiel d'être développées en adjuvant plus efficace et plus sûr pour formuler de nouveaux vaccins et reformuler les vaccins existants.

La production des anticorps antivenin à partir de jaune d'œuf de canard (IgY(Δ Fc)) représente une perspective prometteuse pour traiter spécifiquement les cas d'envenimation sévères causés par le cobra *Naja haje* grâce à ses multiples avantages. Les IgY(Δ Fc) sont récupérables de manière non invasive et éthiquement acceptable. De plus, les coûts d'extraction et l'entretien des animaux sont économiques dans le cas des IgY(Δ Fc) ce qui permettra d'élargir la production des antivenins dans les pays pauvres (les pays les plus touchés).

Alors l'utilisation de cette technique répond aux exigences médicales, éthiques et économiques pour une utilisation en tant que immunothérapie fiable contre les morsures de serpents.

Afin d'enrichir et de développer cette étude, il serait intéressant de :

- Faire une étude de l'immunogénicité des nanoparticules chez les canards à fin de déterminer leur efficacité ainsi que leur effet sur cette espèce.
- Faire une étude comparative *in vivo* et *in vitro* du mode d'action des nanoparticules avec différentes cellules immunitaires mammifère et celles des canards.
- Essayer d'autres voies d'administrations des préparations d'immunisation (intamusculaire/ intraveineuse/ intradermique) et augmenter le nombre des canards immunisés.
- Faire une étude comparative d'efficacité, de pharmacocinétique et de biocompatibilité entre les effets des IgY (Δ Fc) et les fragments mammaliens fab'2 pour la neutralisation de différentes toxines de venins.

- Développer une nouvelle méthode de filtration qui nous permet d'extraire spécifiquement les IgY (ΔFc) et de les séparer des IgY conventionnelles.
- Développer des IgY(ΔFc) multivalents contre les toxines de différentes espèces.
- Application des IgY (ΔFc) dans d'autres fins diagnostiques et thérapeutiques tel que l'utilisation des IgY comme un marqueur pour la détection des antigènes cancéreux.

*Références
bibliographiques*

- Aguilar, J.C., Rodríguez, E.G., 2007. Vaccine adjuvants revisited. *Vaccine* 25, 3752–3762. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.01.111>
- Almeida, C.M.C., Kanashiro, M.M., Rangel Filho, F.B., Mata, M.F.R., Kipnis, T.L., Dias da Silva, W., 1998. Development of snake antivenom antibodies in chickens and their purification from yolk. *Vet. Rec.* 143, 579–584. <https://doi.org/10.1136/vr.143.21.579>
- Al-Quraishy, S., Dkhil, M.A., Abdel Moneim, A., 2014. Hepatotoxicity and oxidative stress induced by Najahaje crude venom. *J. Venom. Anim. Toxins Trop. Dis.* 20, 42. <https://doi.org/10.1186/1678-9199-20-42>
- Araújo, A.S., Lobato, Z.I.P., Chávez-Olórtegui, C., Velarde, D.T., 2010. Brazilian IgY-Bothropsantivenom: Studies on the development of a process in chicken egg yolk. *Toxicon* 55, 739–744. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.11.004>
- Batista-Duharte, A., Lindblad, E.B., Oviedo-Orta, E., 2011. Progress in understanding adjuvant immunotoxicity mechanisms. *Toxicol. Lett.* 203, 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.03.001>
- Bennacef-Heffar, N., Laraba-Djebbari, F., 2003. Evaluation of the effect of gamma rays on the venom of *Viperalebetina* by biochemical study. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 81, 1110–1117. <https://doi.org/10.1139/y03-112>
- Blin, A., 2019. Les adjuvants vaccinaux. *Actual. Pharm.* 58, 52–55. <https://doi.org/10.1016/j.actpha.2019.01.020>
- Cai, Y.-C., Guo, J., Chen, S.-H., Tian, L.-G., Steinmann, P., Chen, M.-X., Li, H., Ai, L., Chen, J.-X., 2012. Chicken egg yolk antibodies (IgY) for detecting circulating antigens of *Schistosoma japonicum*. *Parasitol. Int.* 61, 385–390. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2012.01.008>
- Calabro, S., Tortoli, M., Baudner, B.C., Pacitto, A., Cortese, M., O'Hagan, D.T., De Gregorio, E., Seubert, A., Wack, A., 2011. Vaccine adjuvants alum and MF59 induce rapid recruitment of neutrophils and monocytes that participate in antigen transport to draining lymph nodes. *Vaccine* 29, 1812–1823. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.12.090>
- Chiou, V.Y.-N., 2008. The development of IgY(Δ Fc) antibody based neuro toxin antivenoms and the study on their neutralization efficacies. *Clin. Toxicol.* 46, 539–544. <https://doi.org/10.1080/15563650701771973>
- Chippaux, J.-P., 2013. Place de l'immunothérapie dans le traitement actuel des envenimations ophidiennes. *Bull. Académie Natl. Médecine* 197, 993–1008. [https://doi.org/10.1016/S0001-4079\(19\)31542-0](https://doi.org/10.1016/S0001-4079(19)31542-0)
- Chippaux, J.-P., 2006. Les serpents d'Afrique occidentale et centrale. IRD éd., Paris.
- Chippaux, J.-P., 2002. Venins de serpent et envenimations. IRD éditions, Paris.
- Cox, J.C., Coulter, A.R., 1997. Adjuvants—a classification and review of their modes of action. *Vaccine* 15, 248–256. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(96\)00183-1](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(96)00183-1)
- De Almeida, C.M.C., da Silva, C.L., Couto, H.P., Escocard, R. de C.M., da Rocha, D.G., Sentinelli, L. de P., Kipnis, T.L., da Silva, W.D., 2008. Development of process to produce polyvalent IgY antibodies anti-African snake venom. *Toxicon* 52, 293–301. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.05.022>
- De Andrade, F.G., Eto, S.F., Navarro dos Santos Ferraro, A.C., Gonzales Marioto, D.T., Vieira, N.J., Cheirubim, A.P., de Paula Ramos, S., Venâncio, E.J., 2013. The production and characterization of anti-bothropic and anti-crotalic IgY antibodies in laying hens: A long term experiment. *Toxicon* 66, 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.01.018>
- De Gregorio, E., Tritto, E., Rappuoli, R., 2008. Alum adjuvanticity: Unraveling a century old mystery. *Eur. J. Immunol.* 38, 2068–2071. <https://doi.org/10.1002/eji.200838648>
- Dias da Silva, W., Tambourgi, D.V., 2010. IgY: A promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 135, 173–180. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.12.011>
- Eisenbarth, S.C., Colegio, O.R., O'Connor, W., Sutterwala, F.S., Flavell, R.A., 2008. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature* 453, 1122–1126. <https://doi.org/10.1038/nature06939>

- Esmailnejad, A., Abdi-Hachesoo, B., Hosseini Nasab, E., Shakoory, M., 2019. Production, purification, and evaluation of quail immunoglobulin Y against *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis*. *Mol. Immunol.* 107, 79–83. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2019.01.012>
- Ferraz, C.R., Arrahman, A., Xie, C., Casewell, N.R., Lewis, R.J., Kool, J., Cardoso, F.C., 2019. Multifunctional Toxins in Snake Venoms and Therapeutic Implications: From Pain to Hemorrhage and Necrosis. *Front. Ecol. Evol.* 7, 218. <https://doi.org/10.3389/fevo.2019.00218>
- Fifis, T., Gamvrellis, A., Crimeen-Irwin, B., Pietersz, G.A., Li, J., Mottram, P.L., McKenzie, I.F.C., Plebanski, M., 2004. Size-Dependent Immunogenicity: Therapeutic and Protective Properties of Nano-Vaccines against Tumors. *J. Immunol.* 173, 3148–3154. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.5.3148>
- GâzFlorea, Ș.A., Ciurca, D., Mare, A., Man, A., Cordoș, B., Grama, A.-L., Muntean, D.-L., 2016. New RP-HPLC Method for Separation of *Naja haje* Venom and Studies of its Bactericidal Effect. *Acta Medica Marisensis* 62, 90–94. <https://doi.org/10.1515/amma-2015-0113>
- Gláucia-Silva, F., Torres-Rêgo, M., Rocha Soares, K.S., Damasceno, I.Z., Tambourgi, D.V., Silva-Júnior, A.A. da, Fernandes-Pedrosa, M. de F., 2018. A biotechnological approach to immunotherapy: Antivenom against *Crotalus durissus cascavella* snake venom produced from biodegradable nanoparticles. *Int. J. Biol. Macromol.* 120, 1917–1924. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.203>
- Gold, B.S., Barish, R.A., 2002. Bites of Venomous Snakes. *N. Engl. J. Med.* 10.
- Gold, B.S., Barish, R.A., Dart, R.C., 2004. North American snake envenomation: diagnosis, treatment, and management. *Emerg Med Clin N Am* 21.
- Gutiérrez, J.M., Calvete, J.J., Habib, A.G., Harrison, R.A., Williams, D.J., Warrell, D.A., 2017. Snakebite envenoming. *Nat. Rev. Dis. Primer* 3, 17063. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.63>
- Gutiérrez, J.M., León, G., Burnouf, T., 2011. Antivenoms for the treatment of snakebite envenomings: The road ahead. *Biologicals* 39, 129–142. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2011.02.005>
- Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., 2013. Phospholipases A2: Unveiling the secrets of a functionally versatile group of snake venom toxins. *Toxicon* 62, 27–39. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.09.006>
- Gutiérrez, J.M., Williams, D., Fan, H.W., Warrell, D.A., 2010. Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. *Toxicon* 56, 1223–1235. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.11.020>
- 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. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 218, 205–214. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2006.11.003>
- He, P., Zou, Y., Hu, Z., 2015. Advances in aluminum hydroxide-based adjuvant research and its mechanism. *Hum. Vaccines Immunother.* 11, 477–488. <https://doi.org/10.1080/21645515.2014.1004026>
- Ismail, A.A., van de Voort, F.R., Sedman, J., 1997. Chapter 4 Fourier transform infrared spectroscopy: Principles and applications, in: *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*. Elsevier, pp. 93–139. [https://doi.org/10.1016/S0167-9244\(97\)80013-3](https://doi.org/10.1016/S0167-9244(97)80013-3)
- Kini, R.M., 2010. Structure, function and evolution of three-finger toxins: Mini proteins with multiple targets 13.
- Ko, K.Y., Ahn, D.U., 2007. Preparation of Immunoglobulin Y from Egg Yolk Using Ammonium Sulfate Precipitation and Ion Exchange Chromatography. *Poult. Sci.* 86, 400–407. <https://doi.org/10.1093/ps/86.2.400>
- Kool, M., Fierens, K., Lambrecht, B.N., 2012. Alum adjuvant: some of the tricks of the oldest adjuvant. *J. Med. Microbiol.* 61, 927–934. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.038943-0>
- Kotani, S., Watanabe, Y., Shimono, T., Narita, T., Kato, K., 1975. Immunoadjuvant activities of cell walls, their water-soluble fractions and peptidoglycan subunits, prepared from various gram-positive bacteria, and of synthetic n-acetylmuramyl peptides. *Z. Immunitätsforsch. Exp. Klin. Immunol.* 149, 302–319.

- Larréché, S., Mion, G., Clapson, P., Debien, B., Wybrect, D., Goyffon, M., 2008. Neurotoxines ophidiennes. *Ann. Fr. Anesth. Réanimation* 27, 310–316. <https://doi.org/10.1016/j.annfar.2008.02.010>
- LeClaire, R.D., Hunt, R.E., Bavari, S., 2002. Protection against Bacterial Superantigen Staphylococcal Enterotoxin B by Passive Vaccination. *Infect. Immun.* 70, 2278–2281. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.5.2278-2281.2002>
- Leiva, C.L., Cangelosi, A., Mariconda, V., Farace, M., Geoghegan, P., Brero, L., Fernández-Miyakawa, M., Chacana, P., 2019. IgY-based antivenom against *Bothrops alternatus*: Production and neutralization efficacy. *Toxicon* 163, 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.03.020>
- Leon, G., Sanchez, L., Hernandez, A., Villalta, M., Herrera, M., Segura, A., Estrada, R., Maria Gutierrez, J., 2011. Immune Response Towards Snake Venoms. *Inflamm. Allergy - Drug Targets* 10, 381–398. <https://doi.org/10.2174/187152811797200605>
- Li, X., Aldayel, A.M., Cui, Z., 2014. Aluminum hydroxide nanoparticles show a stronger vaccine adjuvant activity than traditional aluminum hydroxide microparticles. *J. Controlled Release* 173, 148–157. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.10.032>
- Lundqvist, M.L., Middleton, D.L., Radford, C., Warr, G.W., Magor, K.E., 2006. Immunoglobulins of the non-galliform birds: Antibody expression and repertoire in the duck. *Dev. Comp. Immunol.* 30, 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2005.06.019>
- Malih, I., Ahmad rusmili, M.R., Tee, T.Y., Saile, R., Ghalim, N., Othman, I., 2014. Proteomic analysis of Moroccan cobra *Naja haje* venom using tandem mass spectrometry. *J. Proteomics* 96, 240–252. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.11.012>
- Maya Devi, C., Vasantha Bai, M., Vijayan Lal, A., Umashankar, P.R., Krishnan, L.K., 2002. An improved method for isolation of anti-viper venom antibodies from chicken egg yolk. *J. Biochem. Biophys. Methods* 51, 129–138. [https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(02\)00002-7](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(02)00002-7)
- Meddings, J.I., Owens, L., Burgess, G., Ariel, E., 2014. Revelations in reptilian and avian immunology: a proposed evolutionary selection pressure for truncated immunoglobulin-Y. *Int. J. Immunol. Stud.* 2, 29. <https://doi.org/10.1504/IJIS.2014.066848>
- Munhoz, L.S., Vargas, G.D., Fischer, G., Lima, M. de, Esteves, P.A., Hübner, S. de O., 2014. Avian IgY antibodies: characteristics and applications in immunodiagnostic. *Ciênc. Rural* 44, 153–160. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782014000100025>
- Nait Mohamed, F.A., Nouri, A., Laraba-Djebari, F., 2017. Reactogenicity and safety assessment of an attenuated nanovaccine against scorpion envenomation: Preclinical study. *Vaccine* 35, 6657–6663. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.10.028>
- Naoual, O., Rachid, E., Sebastien, L., Salma, C., Fouad Chafi, q, Abdelaziz, H., Georges, M., 2019. Snake bites in morocco: Progress and challenges. *Adv. Toxicol. Toxic Eff.* 3, 009–014. <https://doi.org/10.17352/atte.000004>
- Navarro, D., Vargas, M., Herrera, M., Segura, Á., Gómez, A., Villalta, M., Ramírez, N., Williams, D., Gutiérrez, J.M., León, G., 2016. Development of a chicken-derived antivenom against the taipan snake (*Oxyuranus scutellatus*) venom and comparison with an equine antivenom. *Toxicon* 120, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.06.018>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.09.045>
- Oussedik-Oumehdi, H., Laraba-Djebari, F., 2008. Irradiated *Cerastes cerastes* Venom as a Novel Tool for Immunotherapy. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 30, 37–52. <https://doi.org/10.1080/08923970701812324>
- Oyewumi, M.O., Kumar, A., Cui, Z., 2010. Nano-microparticles as immune adjuvants: correlating particle sizes and the resultant immune responses. *Expert Rev. Vaccines* 9, 1095–1107. <https://doi.org/10.1586/erv.10.89>
- Pakmanee, N., Noiphrom, J., Kay, A., Pornmuttakun, D., Sakolparp, L., Hemmala, W., Akesowan, S., Khomvilai, S., Sitprija, V., 2013. Comparative abilities of IgG and F(ab)2 monovalent antivenoms to neutralize lethality, phospholipase A2, and coagulant activities induced by *Daboia siamensis* venom and their anticomplementary activity. *ScienceAsia* 39, 160. <https://doi.org/10.2306/scienceasia1513-1874.2013.39.160>

- Pereira, E.P.V., van Tilburg, M.F., Florean, E.O.P.T., Guedes, M.I.F., 2019. Egg yolk antibodies (IgY) and their applications in human and veterinary health: A review. *Int. Immunopharmacol.* 73, 293–303. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.05.015>
- Petrovsky, N., Aguilar, J.C., 2004. Vaccine adjuvants: Current state and future trends. *Immunol. Cell Biol.* 82, 488–496. <https://doi.org/10.1111/j.0818-9641.2004.01272.x>
- Sharp, F.A., Ruane, D., Claass, B., Creagh, E., Harris, J., Malyala, P., Singh, M., O'Hagan, D.T., Pétrilli, V., Tschopp, J., O'Neill, L.A.J., Lavelle, E.C., 2009. Uptake of particulate vaccine adjuvants by dendritic cells activates the NALP3 inflammasome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 870–875. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804897106>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.06.013>
- Silva-de-França, F., Villas-Boas, I.M., Serrano, S.M. de T., Cogliati, B., Chudzinski, S.A. de A., Lopes, P.H., Kitano, E.S., Okamoto, C.K., Tambourgi, D.V., 2019. Najaannulifera Snake: New insights into the venom components and pathogenesis of envenomation. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 13, e0007017. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007017>
- Sjostrom, L., Al-Abdulla, I.H., Rawat, S., Smith, D.C., Landon, J., 1994. A comparison of ovine and equine antivenoms. *Toxicon* 32, 427–433. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(94\)90294-1](https://doi.org/10.1016/0041-0101(94)90294-1)
- Šribar, J., Oberčkal, J., Križaj, I., 2014. Understanding the molecular mechanism underlying the presynaptic toxicity of secreted phospholipases A2: An update. *Toxicon* 89, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.06.019>
- Thakkar, S.G., Xu, H., Li, X., Cui, Z., 2018. Uric acid and the vaccine adjuvant activity of aluminium (oxy)hydroxide nanoparticles. *J. Drug Target.* 26, 474–480. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2018.1428808>
- Theakston, R.D.G., Smith, D.C., 1997. Antivenoms: A Review of Current Status and Future Developments. *BioDrugs* 7, 366–375. <https://doi.org/10.2165/00063030-199707050-00004>
- Theakston, R.D.G., Smith, D.C., 1995. Therapeutic Antibodies to Snake Venoms, in: Landon, J., Chard, T. (Eds.), *Therapeutic Antibodies*. Springer London, London, pp. 109–133. https://doi.org/10.1007/978-1-4471-1937-1_6
- Theakston, R.D.G., Warrell, D.A., Griffiths, E., 2003. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. *Toxicon* 41, 541–557. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(02\)00393-8](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(02)00393-8)
- Utkin, Y.N., 2013. Three-finger toxins, a deadly weapon of elapid venom – Milestones of discovery. *Toxicon* 62, 50–55. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.09.007>
- Warr, G.W., Magor, K.E., Higgins, D.A., 1995. IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunol. Today* 16, 392–398. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/0167-5699(95)80008-5)
- Wendorf, J., Chesko, J., Kazzaz, J., Ugozzoli, M., Vajdy, M., O'Hagan, D., Singh, M., 2008. A comparison of anionic nanoparticles and microparticles as vaccine delivery systems. *Hum. Vaccin.* 4, 44–49. <https://doi.org/10.4161/hv.4.1.4886>
- Zhang, X., Calvert, R.A., Sutton, B.J., Doré, K.A., 2017. IgY: a key isotype in antibody evolution: IgY antibody. *Biol. Rev.* 92, 2144–2156. <https://doi.org/10.1111/brv.12325>

ملخص

تمثل لدغات الافاعي مشكلة صحية عامة حقيقية في العالم. العلاج الوحيد الفعال لهذه المشكلة هو العلاج المناعي. تحضيرات اللقاح مترافقة مع مادة مساعدة أكثرها استخداما هو هيدروكسيد الألمنيوم، قد يكون الحجم النانومتري لجزيئات هيدروكسيد الألومنيوم واستخدام الغلوبولين المناعي من صفار البيض بديلاً جديداً لتحضير لقاحات مضادات السموم، الهدف من هذه الدراسة هو تطوير بديل فعال لتحسين العلاج المناعي ضد كوبرا *NajaHaje* باستخدام الغلوبولين المناعي (ΔFc) Y من صفار بيض البط والجزيئات النانومترية لهيدروكسيد الألومنيوم.

تم تحصين مجموعة مكونة من ستة بطات من نوع "*Anas platyrhynchos*" بسُّم *Naja haje* الذي تم تخفيف فعاليته بواسطة glutaraldéhyde ، مترافق مع جزيئات الألمنيوم النانومترية. ثم جمع البيض لاستخلاص الغلوبولين المناعي Y. أظهرت العديد من الدراسات أن استخدام الغلوبولين المناعي يؤدي الى تحييد سموم الأفعى ويستجيب للجوانب الأخلاقية عن طريق تقليل ألم الحيوانات. بالإضافة إلى ذلك ، هذه العملية غير مكلفة

Summary

Snakebites present a major public health problem in the world. The only effective treatment for this problem is immunotherapy. The vaccine preparations are conjugated with an adjuvant, the most widely used is aluminum hydroxide. The nanometric size of aluminum hydroxide particles and the use of Y-immunoglobulins from egg yolks may be a new alternative for the preparation of antivenom vaccines. The objective of this study is to develop an effective alternative for the improvement of antivenom immunotherapy against the *Najahaje* cobra based on IgY (ΔFc) from duck egg yolk by using nanoparticles of aluminium hydroxide. A group of six ducks "*Anas platyrhynchos*" were immunized with the *Najahaje* venom detoxified with glutaraldehyde, conjugated to aluminum nanoparticles. The eggs were collected for IgY extraction.

The results of several studies have shown that the use of IgY (ΔFc) enables the neutralization of snake venom toxins and responds to ethical aspects by minimizing animal distress. In addition, it is inexpensive and economical process.

Résumé

Les morsures de serpent présentent un véritable problème de santé publique majeur dans le monde. Le seul traitement efficace pour ce problème est l'immunothérapie. Les préparations vaccinales sont conjuguées à un adjuvant dont le plus utilisé est l'hydroxyde d'aluminium. La taille nanométrique des particules d'hydroxyde d'alum et l'utilisation des immunoglobulines Y provenant de jaunes d'œufs peuvent être une nouvelle alternative pour la préparation des vaccins antivenins. L'objectif de cette étude est de développer une alternative efficace pour l'amélioration de l'immunothérapie antivenimeuse contre le cobra *Naja haje* à base des IgY(ΔFc) provenant de jaune d'œuf du canard en utilisant des nanoparticules d'hydroxyde d'alum.

Un groupe de six canards « *Anas platyrhynchos* » ont été immunisés avec le venin de *Naja haje* déttoxifié avec le glutaraldéhyde, conjugué à des nanoparticules d'alum. Les œufs ont été collectés pour l'extraction des IgY.

Les résultats de plusieurs études ont démontré que l'utilisation des IgY(ΔFc) permet une neutralisation des toxines de venin de serpents et répond aux aspects éthiques en minimisant la détresse animale. De plus, c'est un processus rentable et économique.