

# Titration comparative de trois sérums antivenimeux utilisés contre les serpents d'Afrique sub-saharienne.

G. D. Dzikouk (1, 2), L. S. Etoundi Ngoa (3), J. Thonnon (4), A. B. Dongmo (5), V. S. Rakotonirina (2), A. Rakotonirina (1) & J.-P. Chippaux (6)

1. Laboratoire de physiologie animale, Ecole normale supérieure, Université de Yaoundé I, B. P. 47, Yaoundé, Cameroun (coc@iccnnet.cm).

2. Laboratoire de physiologie animale, Faculté des sciences, Université de Yaoundé I, B. P. 812, Yaoundé, Cameroun.

3. Laboratoire de physiologie animale, Ecole normale supérieure, Université de Yaoundé I, B. P. 47, Yaoundé, Cameroun.

4. Centre Pasteur du Cameroun, B. P. 1274, Yaoundé, Cameroun.

5. Laboratoire de physiologie animale, Faculté des sciences, Université de Douala, B. P. 24 157, Douala, Cameroun.

6. Institut de recherche pour le développement (IRD), B. P. 1386, Dakar, Sénégal (chippaux@ird.sn).

**Summary:** Titration of three antivenoms used against sub-Saharan African snake venoms.

The standardisation of serotherapy is necessary in Africa mainly because of the frequency of envenomations and the lack of alternative treatments. Comparative titrations of FAV-Afrique® (Aventis Pasteur), Polyvalent serum (Serum Institute of India = SII) and Polyvalent antivenin (South African Vaccine Fabricants Ltd = SAIMR) were carried out on venoms of *Echis ocellatus* from Cameroun, *E. ocellatus* from Mali, *E. leucogaster* and *Naja melanoleuca*. The 50% protective doses ( $ED_{50}$ ) of the antivenoms were given according either to i) the in vitro method which consists of inoculating 5 batches of 5 mice with a mixture containing 3  $DL_{50}$  of venom and increasing volumes of antivenom incubated for 30 mn at 37 °C and ii) the in vivo method which consists of successive administration of venom and then antivenom after a 30 to 60 mn interval. The three antivenoms showed a similar efficacy against all the *Echis* venoms. Interestingly, the SAIMR proved to be effective against the venom of *E. leucogaster* and *E. ocellatus* although no venom of *Echis* was used to immunise horses during the preparation of antivenom. Conversely, this paraspecificity did not exist with the *Naja melanoleuca* venom against which FAV Afrique® showed a higher efficacy. The electrophoresis pattern of FAV-Afrique® performed on acetate gel strips showed only one protein fraction (76 g.l<sup>-1</sup>), whereas both the SII and SAIMR antivenoms showed four fractions whose protein concentrations was respectively 64 g.l<sup>-1</sup> and 145 g.l<sup>-1</sup>.

**Résumé :**

La standardisation de la sérothérapie en Afrique, indispensable en raison de la fréquence des envenimations et en l'absence d'autres recours thérapeutiques efficaces, reste une préoccupation. Des titrages comparatifs du FAV-Afrique® : d'Aventis Pasteur, du Serum Polyvalent du Serum Institute of India (SII) et du Sérum antivenimeux Polyvalent du South African Vaccine Producers (SAIMR) ont été effectués sur les venins d'*Echis ocellatus* du Cameroun, d'*Echis ocellatus* du Mali, d'*Echis leucogaster* et de *Naja melanoleuca*. Les doses efficaces 50 % ( $DE_{50}$ ) des sérums ont été déterminées selon deux méthodes complémentaires. La première, dite méthode avec incubation, consiste à inoculer, après incubation pendant 30 mn à 37 °C, un mélange contenant une dose de venin équivalente à 3  $DL_{50}$  et des volumes croissants de sérum à 5 lots de 5 souris. La seconde méthode consiste à administrer successivement 3  $DL_{50}$  de venin puis, après un intervalle de 30 à 60 minutes selon les venins, des doses croissantes de sérum à différents lots de 5 souris. Les trois sérums antivenimeux testés présentaient une efficacité similaire sur les venins d'*Echis*, bien qu'aucun venin d'*Echis* ne fasse partie du pool de venins ayant servi à la fabrication du SAIMR. En revanche, cette paraspecificité n'existe pas vis-à-vis du venin de *Naja melanoleuca* pour lequel le FAV Afrique® montre une plus grande efficacité. L'électrophorégramme du FAV-Afrique® effectué sur gel d'acétate montre une seule fraction de concentration protéique élevée (76 g.l<sup>-1</sup>), alors que celui des deux autres sérums est constitué de quatre fractions dont la concentration protéique totale est respectivement 64 g.l<sup>-1</sup> et 145 g.l<sup>-1</sup>.

**antivenom  
titration  
paraspecificity  
envenomation  
snake venom  
Africa**

**sérum antivenimeux  
titrage  
paraspecificité  
envenimation  
venin de serpent  
Afrique**

## Introduction

Un siècle après sa découverte par CALMETTE, la sérothérapie antivenimeuse demeure l'unique thérapeutique spécifique de l'envenimation ophidienne (2). Cependant, la variabilité biochimique de la composition des venins de serpents, due sans doute à une différence de concentration de chaque fraction ou à des modifications structurales de certaines protéines (7), est à l'origine d'une efficacité inconstante

des sérums antivenimeux. De ce fait, la standardisation du traitement immunothérapeutique en Afrique, indispensable en raison de la fréquence des envenimations et en l'absence d'autres recours thérapeutiques efficaces, reste une préoccupation. C'est pour contribuer à ce souci de standardisation que nous avons effectué des titrages comparatifs de plusieurs sérums antivenimeux contre le venin d'espèces bien connues et redoutées par les populations africaines et qui sont à l'origine de nombreux cas d'envenimation.

## Matériel et méthodes

### Venins

Les venins d'*Echis leucogaster*, *E. ocellatus* provenant du Cameroun, *E. ocellatus* originaire du Mali et *Naja melanoleuca* ont été gracieusement fournis par le Laboratoire de Toxines Animales (Latoxan, 20 rue Léon Blum, 26000 Valence, France). Les venins étaient obtenus par stimulation électrique et conservés sous forme lyophilisée en ampoules scellées.

### Sérum antivenimeux

Nous avons utilisé 3 sérums antivenimeux (SAV) commercialisés: le FAV Afrique® (Aventis Pasteur, 2 avenue Pont Pasteur, 69367 Lyon cedex 07, France), le Snake Venin Antiserum du Serum Institute of India, 212/2, Hadapsar Pune, 411028, India (SII) et le Polyvalent Snake Antivenin du South African Vaccine Fabricants Ltd (SAIMR, P. O. Box 28999, Sandringham, 2131 South Africa).

### Détermination de la dose létale 50 %

La dose létale 50 % (DL<sub>50</sub>), c'est-à-dire la quantité de venin qui tue la moitié des animaux d'expérience, a été déterminée selon la méthode de SPEARMAN & KÄRBER (8). En pratique, des doses croissantes de venin ont été inoculées par voie intraveineuse (IV) dans la veine caudale ou par voie intrapéritonéale (IP) à 5 lots de 5 souris, sous un volume constant de 0,2 ml. L'observation s'est prolongée 48 heures après l'inoculation.

### Détermination de la dose efficace 50 %

La dose efficace 50 % (DE<sub>50</sub>) correspond à la quantité de SAV capable de neutraliser une dose fixe de venin mesurée en DL<sub>50</sub>. Elle a été déterminée selon deux méthodes. Le titrage a été effectué par injection intraveineuse IV du SAV dans la veine caudale des souris.

Nous n'avons pas pu mesurer le titre de chaque SAV pour tous les venins, faute d'une quantité suffisante de sérum polyvalent SAIMR.

### Méthode après incubation

Cette méthode consiste à administrer aux souris le mélange venin + SAV après une incubation de 30 minutes à 37 °C. Une dose fixe de 3 DL<sub>50</sub> de venin est mélangée à un volume croissant de SAV, respectivement 10 µl, 20 µl, 40 µl, 80 µl et 160 µl de SAV complété à 0,2 ml avec une solution saline à 9 %. Après incubation, 0,2 ml de chaque mélange est inoculé à 5 lots de 5 souris.

### Méthode séquentielle

Dans cette méthode, venin et SAV sont inoculés séparément. Une dose constante de venin correspondant à 3 DL<sub>50</sub> est inoculée à chaque souris par voie sous-cutanée pour le venin de *N. melanoleuca* et par voie intra-péritonéale pour les venins d'*Echis*. Après un intervalle de temps de 30 minutes pour *N. melanoleuca* et 120 minutes pour les *Echis*, le SAV est injecté par voie intra-veineuse dans la veine caudale des souris. Les souris de chaque lot sont traitées respectivement avec 10 µl, 20 µl, 40 µl, 80 µl et 160 µl de SAV complété à 0,2 ml avec une solution saline à 9 %.

### Calcul de la DE<sub>50</sub>

Les souris sont observées pendant 48 heures et la DL<sub>50</sub> est calculée comme pour la mesure de la toxicité. La quantité de SAV correspondante est considérée comme neutralisant au moins 2 des 3 DL<sub>50</sub> administrées aux souris (5).

Le volume de SAV est ensuite converti en poids de  $\gamma$ -globuline calculé après dosage et électrophorèse des protéines.

## Dosage et électrophorèse des protéines

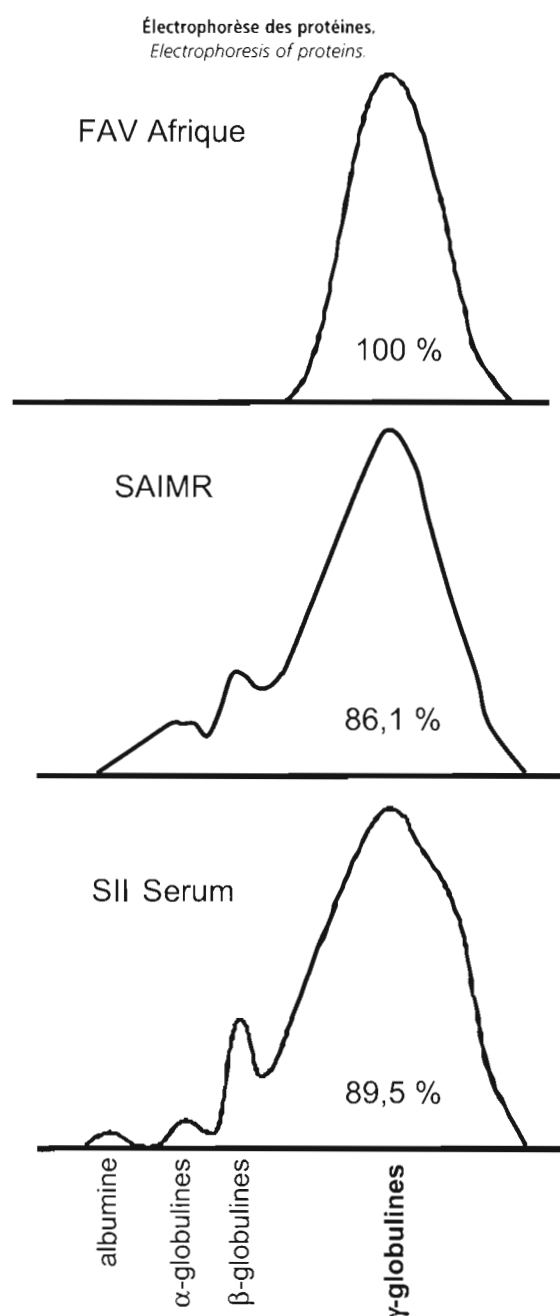
Le dosage des protéines se fait par colorimétrie en utilisant un automate analyseur multiparamétrique (Alcyon 160®). Il s'agit d'un dosage utilisant la réaction du biuret à l'aide d'un réactif pour protéines totales fabriqué et commercialisé par Bayer-Technicon R. A.

L'électrophorèse des protéines se fait sur acétate de cellulose (Titan III n° 3023) avec un tampon tris/barbital à pH = 8. Le dépôt est de 5 µl d'échantillon. La migration se fait sous 180 V pendant 15 mn dans une cuve Hélène. Les protéines sont colorées au rouge ponceau; après décoloration, clarification et séchage des bandes d'acétate, l'intégration des fractions protéiques est effectuée à l'aide d'un densitomètre Optiscan® (Hélène-France).

## Résultats

### Dosage et électrophorèse des protéines des SAV (figure 1)

Figure 1.



Le FAV Afrique® présente une concentration protéique de 76 g·l<sup>-1</sup> et une seule fraction à l'électrophorégramme correspondant aux  $\gamma$ -globulines. Le sérum polyvalent SAIMR a une concentration protéique totale de 168 g·l<sup>-1</sup> avec 3 fractions représentant 6,2, 7,7 et 86,1 % correspondant respectivement aux  $\alpha$ -,  $\beta$ - et  $\gamma$ -globulines. Enfin, la concentration protéique du sérum polyvalent SII est de 64 g·l<sup>-1</sup> distribués en 4 fractions: albumine (1,1 %),  $\alpha$ -globulines (1,8 %),  $\beta$ -globulines (7,6 %) et  $\gamma$ -globulines (89,5 %).

## Toxicité des venins

Le venin de *N. melanoleuca* est environ deux fois plus toxique que les venins d'*Echis* (tableau I). En outre, la voie d'administration modifie peu la toxicité relative du venin. Les venins d'*Echis* présentent une toxicité comparable entre eux. La voie d'administration n'a qu'une influence modeste sur la toxicité, en dehors du venin d'*E. ocellatus* provenant du Mali, qui est deux fois moins toxique par voie IP que par voie IV.

Tableau I.

Dose létale 50 % (DL <sub>50</sub> ) des venins. Lethal dose 50% (LD <sub>50</sub> ) of venoms.		
venins	voie d'inoculation	DL <sub>50</sub> (µg) (intervalle de confiance 95 %)
<i>Echis leucogaster</i>	intraveineuse	32,5 (19,1 - 55,1)
	intrapéritonéale	37,3 (20,2 - 68,6)
<i>E. ocellatus</i> (Cameroun)	intraveineuse	32,5 (20 - 52,6)
	intrapéritonéale	42,9 (21,6 - 84,7)
<i>E. ocellatus</i> (Mali)	intraveineuse	21,4 (13,2 - 34,7)
	intrapéritonéale	42,9 (22,4 - 81,8)
<i>Naja melanoleuca</i>	intraveineuse	16,2 (10 - 26,3)
	intrapéritonéale	21,4 (11,2 - 37,9)

## Neutralisation du venin de *Naja melanoleuca*

La neutralisation de 2 DL<sub>50</sub> du venin de *N. melanoleuca* est obtenue avec 6,8 µg (méthode après incubation) ou 5,3 µg (méthode séquentielle) de  $\gamma$ -globulines de FAV Afrique (tableau II). La quantité de  $\gamma$ -globulines de sérum polyvalent SII nécessaire pour neutraliser la même dose de venin est respectivement de 14,8 µg et 12 µg, soit plus du double.

## Neutralisation des venins d'*Echis*

Le FAV Afrique® et le sérum polyvalent SAIMR présentent une capacité de neutralisation très voisine quelle que soit la

Tableau II.

Protection des sérums antivenimeux (DE <sub>50</sub> ) contre le venin de <i>Naja melanoleuca</i> exprimée en µg d'IgG neutralisant 2 DL <sub>50</sub> de venin Neutralisation of <i>Naja melanoleuca</i> venoms by antivenoms (DE <sub>50</sub> expressed in µg of IgG neutralising 2LD <sub>50</sub> of venom).		
sérum	DE <sub>50</sub> (µg) après incubation (intervalle de confiance 95 %)	DE <sub>50</sub> (µg) administration séparée (intervalle de confiance 95 %)
FAV Afrique®	6,8 (4,6 - 9,1)	5,3 (3,8 - 8,4)
SII serum polyvalent	14,8 (10,9 - 20,1)	12 (9,7 - 17,8)

Tableau III.

Protection des sérums antivenimeux (DE <sub>50</sub> ) contre le venin d' <i>Echis</i> exprimée en µg d'IgG neutralisant 2 DL <sub>50</sub> de venin Neutralisation of <i>Echis</i> venoms by antivenoms (DE <sub>50</sub> expressed in µg of IgG neutralising 2LD <sub>50</sub> of venom).		
sérum	DE <sub>50</sub> (µg) incubation (intervalle de confiance 95 %)	DE <sub>50</sub> (µg) administration séparée (intervalle de confiance 95 %)
FAV Afrique®	<i>E. leucogaster</i>	5,3 (3,8 - 8,4)
	<i>E. ocellatus</i> (Cameroun)	8,4 (4,6 - 15,2)
	<i>E. ocellatus</i> (Mali)	2,3 (1,5 - 3,8)
SII	<i>E. leucogaster</i>	2,3 (1,7 - 3,4)
	<i>E. ocellatus</i> (Cameroun)	2,3 (1,7 - 2,9)
	<i>E. ocellatus</i> (Mali)	1,1 (0,6 - 1,7)
SAIMR	<i>E. leucogaster</i>	8,7 (5,8 - 16)
	<i>E. ocellatus</i> (Cameroun)	10,2 (7,3 - 16)

méthode de titrage utilisée (tableau III). Le sérum polyvalent SII a un pouvoir neutralisant plus élevé, notamment à l'égard du venin d'*E. ocellatus* provenant du Cameroun et, dans une moindre mesure, du venin d'*E. leucogaster*.

## Discussion

Les trois SAV ne présentent pas la même concentration protéique ni le même degré de purification. Si le SAIMR est deux fois plus concentré que les autres SAV, ce qui permet une administration de volume plus faible pour une efficacité comparable *a priori*, seul le FAV Afrique est correctement purifié, du moins selon les normes européennes en vigueur. Les  $\gamma$ -globulines constituent 100 % de la fraction protéique du sérum. Cette propriété explique la remarquable tolérance du produit qui avait été confirmée par un essai clinique mené au Cameroun (3), où 2 des 46 patients traités par le FAV Afrique avaient présenté des effets indésirables mineurs. En revanche, MORAN *et al.* (6) ont signalé chez 13 patients sur 17 traités avec le sérum SAIMR des réactions anaphylactoïdes sévères. Les effets indésirables sont proportionnels à la quantité totale de protéines injectées et accentués avec certaines protéines, notamment l'albumine, réputée fortement allergène. Les réactions d'hypersensibilité sont favorisées par un contact antérieur, en l'occurrence l'administration d'un sérum équin quel que soit son type, sérum antitétanique inclus.

La toxicité des venins confirme les résultats que nous avons obtenus par ailleurs (4). Les deux voies d'administration (IP et IV) sont comparables, de même que la voie sous-cutanée avec le venin de *N. melanoleuca*.

Pour le titrage par la méthode séquentielle, nous avons utilisé des voies d'administration différentes pour le venin et le SAV afin de ne pas risquer d'induire une lésion de la veine lors de l'inoculation du venin qui aurait empêché l'injection du SAV par la suite. Cela ne modifie en rien le calcul du titre protecteur et encore moins la comparaison des titres entre eux. L'intervalle de temps entre l'administration du venin et celle du SAV est plus court en ce qui concerne le venin de *N. melanoleuca* dont la toxicité se manifeste très rapidement. L'injection retardée de SAV après celle des venins d'*Echis*, dont le mode d'action est plus lent, nous rapproche des situations rencontrées en brousse où les retards de consultation sont importants (1).

La méthode de titrage après incubation permet une comparaison du pouvoir de neutralisation des différents SAV indépendamment des conditions d'administration, de susceptibilité ou de réponse individuelles des animaux d'expérience. En revanche, l'administration séquentielle reproduit les conditions d'utilisation du SAV sur le terrain où le SAV est toujours administré après la morsure. Quoiqu'il en soit, les deux méthodes donnent des résultats très comparables, ce qui traduit probablement leur robustesse.

La différence de neutralisation du venin de *N. melanoleuca* par chacun des deux SAV s'explique logiquement. Seul le FAV Afrique® est préparé à partir de venin de *N. melanoleuca* et les réactions immunologiques croisées avec les *Naja* asiatiques sont faibles.

Il en est autrement de la neutralisation des venins d'*Echis*. Ramené en volume de SAV, le titre protecteur montre que, malgré une concentration plus forte en  $\gamma$ -globulines, il faut un volume équivalent des différents SAV pour neutraliser la même dose de venin d'*E. leucogaster* et d'*E. ocellatus* du Mali. En revanche, le venin d'*E. ocellatus* du Cameroun est neutralisé par un volume nettement plus faible de sérum polyvalent SII

par la méthode après incubation et un volume identique par la méthode séquentielle. Ces résultats paradoxaux trouvent une explication dans le pouvoir de neutralisation croisée ou paraspecificité des SAV. D'une part, aucun venin d'*Echis* n'entre dans la préparation du sérum polyvalent SAIMR. Son efficacité peut s'expliquer soit par l'immunogénicité croisée des venins de *Bitis* utilisés pour immuniser les chevaux, soit par une immunisation multiple des chevaux qui auraient été auparavant immunisés avec du venin d'*Echis*. D'autre part, le sérum polyvalent SII est fabriqué à partir de venin d'*E. carinatus* originaire d'Inde dont on aurait pu penser qu'il est très différent de celui des *Echis* africains. La paraspecificité entre les venins d'*Echis* apparaît donc comme relativement forte, avec toutefois des nuances : la différence entre les venins des *E. ocellatus* provenant du Mali et du Cameroun est sensible tant au niveau de la toxicité que des capacités neutralisantes des SAV testés. On peut émettre l'hypothèse que le venin d'*E. ocellatus* originaire du Cameroun contient une substance toxique absente des venins d'*E. ocellatus* du Mali et d'*E. carinatus* indienne, ces deux venins possédant par ailleurs une forte communauté antigénique.

## Conclusion

La capacité de neutralisation des 3 SAV apparaît similaire à l'égard des venins d'*Echis*, responsables du plus grand nombre d'envenimations en Afrique sub-saharienne. Toutefois, seul le FAV Afrique® a fait l'objet d'un essai clinique qui a confirmé son efficacité sur le terrain. En outre, le FAV Afrique® possède une tolérance remarquable grâce à sa haute purification. On peut réduire le choix du SAV à sa seule dis-

ponibilité commerciale ou à son coût. L'importance de la sécurité des thérapeutiques devient prépondérante et il appartient aux autorités sanitaires de chaque pays de définir les limites acceptables du risque thérapeutique.

## Références bibliographiques

1. CHIPPAUX JP – L'envenimation ophidienne en Afrique: épidémiologie, clinique et traitement. *Ann IPactualités*, 1999, **10**, 161-171.
2. CHIPPAUX JP & GOYFFON M – Venoms, antivenoms and immunotherapy. *Toxicon*, 1998, **36**, 823-846.
3. CHIPPAUX JP, LANG J, AMADI EDDINE S, FAGOT P & LE MENER V – Short report: treatment of snake envenomations by a new polyvalent antivenom composed of highly purified F(ab')<sub>2</sub>: results of a clinical trial in Northern Cameroon. *Am J Trop Med Hyg*, 1999, **61**, 1017-1018.
4. CHIPPAUX JP, RAKOTONIRINA VS, RAKOTONIRINA A & DZIKOUK G – Substances médicamenteuses ou végétales antagonistes du venin ou potentialisant le sérum antivenimeux. *Bull Soc Pathol Exot*, 1997, **90**, 282-285.
5. GOYFFON M – Scorpionisme et sérums antiscorpioniques. *Rev Arachnol*, 1984, **5**, 311-319.
6. MORAN NF, NEWMAN WJ, THEAKSTON RDG, WARRELL DA & WILKINSON D – High incidence of early anaphylactoid reaction to SAIMR polyvalent snake antivenom. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1998, **92**, 69-70.
7. NKININ SW, CHIPPAUX JP, PIETIN D, DOLJANSKY Y, TREMEAU O & MENEZ A – L'origine génétique de la variabilité des venins: impact sur la préparation des sérums antivenimeux. *Bull Soc Pathol Exot*, 1997, **90**, 277-281.
8. OMS – *Progress in the characterization of venom and standardization of antivenoms*. WHO offset publ. n° 58, OMS, Genève, 1981.