

Les sérums antivenimeux aujourd'hui : préparation, utilisation

Le principe de la protection antivenimeuse, découvert par Phisalix en 1894, repose sur l'immunisation d'un animal dont les anticorps serviront ultérieurement d'antidote. Ces anticorps sont extraits et conservés en attendant d'être utilisés pour traiter une envenimation. Aujourd'hui, les sérums thérapeutiques se fabriquent toujours selon ce principe d'immunisation d'un animal à partir d'un venin. Quelques étapes, de leur fabrication à leur utilisation, ont cependant évolué.

Institut de Recherche pour
le Développement (UR 010)
Faculté de Pharmacie,
4 avenue de l'Observatoire
75270 Paris cedex 06
chippaux@ird.fr

Jean-Philippe Chippaux

L'observation d'une protection naturelle contre un toxique remonterait à Mithridate VI, au II^e siècle avant notre ère. Selon la légende, Mithridate, roi d'Asie mineure, se serait protégé contre le risque d'empoisonnement en absorbant régulièrement des quantités de poisons inférieures au seuil toxique. Sur la base d'un principe analogue, de nombreux scientifiques ont montré au XIX^e siècle que l'injection répétée de toxines ou de venin à un animal assurait la neutralisation d'une dose létale de ce même venin. Ainsi, dès 1887, Sewall immunise un pigeon contre le venin de crotale par inoculations répétées de venin glycérociné (1). Même si le protocole expérimental est imprécis, le pigeon pouvait supporter jusqu'à six fois la dose mortelle de venin.

La découverte du transfert passif de l'immunité est due aux travaux convergents de plusieurs microbiologistes. Roux et Yersin, en 1888, ont montré que le sang d'un animal immunisé contre la toxine diphtérique protège un animal naïf, c'est-à-dire non immunisé au préalable, contre la diphtérie (2). Ils établirent donc que l'immunité apparaît dans le sang de l'animal après l'administration de l'agent pathogène mais qu'il est indépendant de l'organisme qui l'a fabriqué. Behring et Kitasato, deux ans plus tard, ont confirmé cliniquement le transfert passif de l'immunité contre la diphtérie et le tétanos et, de ce fait, ont inventé la sérothérapie (3). Se fondant sur cette découverte,

et avec la collaboration de Bertrand, Phisalix établit la propriété antitoxique du sang des animaux vaccinés contre le venin de vipère au moyen d'un venin atténué par la chaleur et confirme que le transfert passif du sang de cet animal à un autre confère à ce dernier la même protection (4). Calmette, indépendamment de ces deux derniers, fit la même découverte au même moment (5). Cependant, il développa le premier un antivenin à usage médical contre les morsures de cobras asiatiques et se fit le véritable promoteur de la sérothérapie antivenimeuse.

Parce que cette propriété neutralisante est contenue dans le sang débarrassé des éléments figurés après coagulation, c'est-à-dire le sérum sanguin, ce nouvel antidote prit le nom de sérum antivenimeux (SAV). La théorie de l'immunité humorale et le concept d'anticorps ont été élaborés sur la base de ces travaux par Bordet et Erlich entre 1895 et 1900.

Les premières utilisations de ce sérum thérapeutique seront couronnées de succès. Cependant, une controverse naquit très vite entre Calmette et la plupart des expérimentateurs, dont Phisalix, sur la spécificité des SAV. Calmette, à tort, crut pendant longtemps que son antivenin avait une portée universelle. Il apparut dès la fin du XIX^e siècle que les venins des serpents brésiliens et australiens, notamment, n'étaient pas neutralisés par son sérum anticobraïque (encadré 1). Cela justifiait la production locale de SAV.

(1) Sewall H (1887) *J Physiol* 8, 203-10.

(2) Roux P, Yersin A (1888)

Ann Inst Pasteur 2, 629-49.

(3) Behring E, Kitasato S

(1890) *Deutsch med*

Wochenschr 16, 1113-45.

(4) Phisalix C, Bertrand G

(1894)

C R Acad Sc 118, 356-8.

(5) Calmette A (1894)

C R Acad Sc 118, 720-2.

1 - Composition et spécificité des venins

Les venins sont constitués de plusieurs dizaines ou centaines de protéines dont quelques-unes seulement sont toxiques et induisent une symptomatologie significative. La composition du venin varie selon les espèces et l'origine géographique des spécimens, surtout en cas de distribution étendue de l'espèce. Des variations plus fines mais suffisantes pour expliquer des différences importantes de symptomatologie ou d'insuffisance thérapeutique des SAV ont été observées entre des individus de la même espèce, voire de la même portée (6).

Les venins de scorpions et de serpents élapidés (cobra, mamba, serpent corail, etc.) sont particulièrement riches en neurotoxines de faible poids moléculaire, diffusant rapidement dans l'organisme et se concentrant dans les tissus nerveux. L'administration de SAV doit être particulièrement précoce pour prévenir la fixation de ces toxines sur leur récepteur cellulaire qui provoque la mort par paralysie respiratoire.

Les venins de vipères et de crotales sont surtout composés d'enzymes et de toxines fortement inflammatoires, nécrosantes ou agissant sur la coagulation sanguine. L'administration tardive de SAV peut se révéler incapable d'empêcher certains processus morbides déjà engagés, comme les nécroses ou les hémorragies. Les traitements adjuvants ou substitutifs (transfusion sanguine par exemple) peuvent alors s'avérer indispensables pour compléter l'action du SAV.

Le SAV, produit de l'immunisation des chevaux

La fabrication des SAV n'a que peu évolué en plus d'un siècle. L'immunisation des chevaux est toujours effectuée par inoculations répétées de faibles doses de venin. Les SAV peuvent être monovalents, lorsqu'un seul venin est utilisé pour l'immunisation du cheval, ou polyvalents, lorsqu'il reçoit un mélange de venins de plusieurs espèces (encadré 2). Le choix de l'un ou l'autre type dépend de nombreuses considérations mais l'efficacité et la tolérance sont similaires. Au cours de ces dernières années, d'autres animaux ont été proposés pour remplacer le cheval en raison des risques d'intolérance aux protéines équine. Mais, la relative facilité d'élevage, le haut rendement de production et l'absence d'agent transmissible non conventionnel connu le font encore largement préférer aux mouton, chèvre, lapin, poule, âne ou dromadaire.

Les contraintes de la fabrication des SAV

L'inoculation du venin brut est souvent mal tolérée par l'animal receveur. Aussi a-t-on été conduit à détoxifier le venin tout en lui conservant ses propriétés immunologiques. En outre, cela réduit la durée d'immunisation du cheval. Depuis la préparation des premiers SAV, les techniques proposées pour détoxifier le venin ont été nombreuses. Les plus usuelles sont les combinaisons avec des aldéhydes : formol, proposé par Gaston Ramon dès 1924, ou glutaraldéhyde. L'emploi d'adjuvants mélangés au venin ralentit la diffusion de celui-ci, ce qui réduit la toxicité et favorise la réponse immunitaire : bentonite, hydroxyde d'aluminium, tanins, savons, cholestérol ont été utilisés par les producteurs. Aujourd'hui, la plupart des fabricants injectent

de petites quantités de venins en de multiples points, avec ou sans adjuvants, pour obtenir une immunité en quelques mois (7).

L'efficacité des premiers SAV, quoique significative, nécessitait des doses relativement importantes, ce qui était à la fois coûteux en produit et dangereux en raison des risques d'intolérance. La précipitation de la fraction globulinique du sérum thérapeutique à l'aide du sulfate d'ammonium allait permettre la concentration du SAV dès le début des années 30 (8). Le traitement de cette fraction par la pepsine, dont le brevet aux États-Unis remonte à 1936, a conduit dans les années 40 à augmenter encore l'efficacité du SAV – désormais 5 fois plus actif à volume égal que le sérum non purifié – mais aussi à réduire les effets secondaires grâce à l'élimination du fragment de l'immunoglobuline fixant le complément. Ceci ne fut toutefois expliqué qu'en 1960 par Porter qui élucida la structure des immunoglobulines (Figure 1), ce qui lui valut le prix Nobel de médecine en 1972 (9). L'immunoglobuline G (IgG) est une protéine volumineuse de masse molaire égale à environ 150 kDa. Elle se compose de deux fragments Fab (*fragment antigen binding*) thermostables, porteurs de la spécificité immunologique qui assure la liaison avec l'antigène pour former le complexe antigène-anticorps, et d'un fragment Fc thermolabile réagissant avec le complément pour assurer la précipitation et l'élimination du complexe antigène-anticorps.

Les améliorations récentes

Entre la fin des années 1940 et les années 1970, aucune avancée notable n'a été enregistrée dans la préparation des SAV. Leur efficacité était jugée suffisante. Pourtant, les effets secondaires, parfois importants voire mortels, étaient fréquents. Principalement dus aux intolérances aux protéines de cheval, et alors que les progrès de la réanimation transformaient le traitement des envenimements, ces effets secondaires ont provoqué une défiance des médecins vis-à-vis des SAV.

2 - Un choix crucial pour la préparation des SAV

La diversité de composition des venins et leur spécificité nécessite une identification rigoureuse de l'espèce et de l'origine géographique du serpent prélevé.

Le fabricant décidera, le plus souvent sur des considérations commerciales, de préparer un sérum monovalent (ne concernant qu'une seule espèce venimeuse) ou polyvalent (associant le venin de plusieurs espèces dans le même SAV). Ce dernier peut résulter de l'immunisation d'un cheval par plusieurs venins ou du mélange de sérums provenant de plusieurs chevaux immunisés chacun par un seul venin. Le nombre de valences et les propriétés de chaque venin influent sur l'efficacité finale du produit. On estime qu'au-delà de dix venins, le SAV perd en efficacité. Trois critères orientent la sélection des venins : la distribution géographique des espèces, leur importance épidémiologique et clinique et les propriétés immunologiques des venins pour favoriser les potentialisations ou les complémentarités immunologiques.

(6) Chippaux *et al.* (1991) *Toxicon* 11, 1279-303.

(7) Chippaux JP (2006) *Venins de serpent et envenimations*, IRD éditions, Paris.

(8) Felton LD (1930) *JAMA* 94, 1893-6.

(9) Porter (1959) *Biochem J* 73, 119-26.

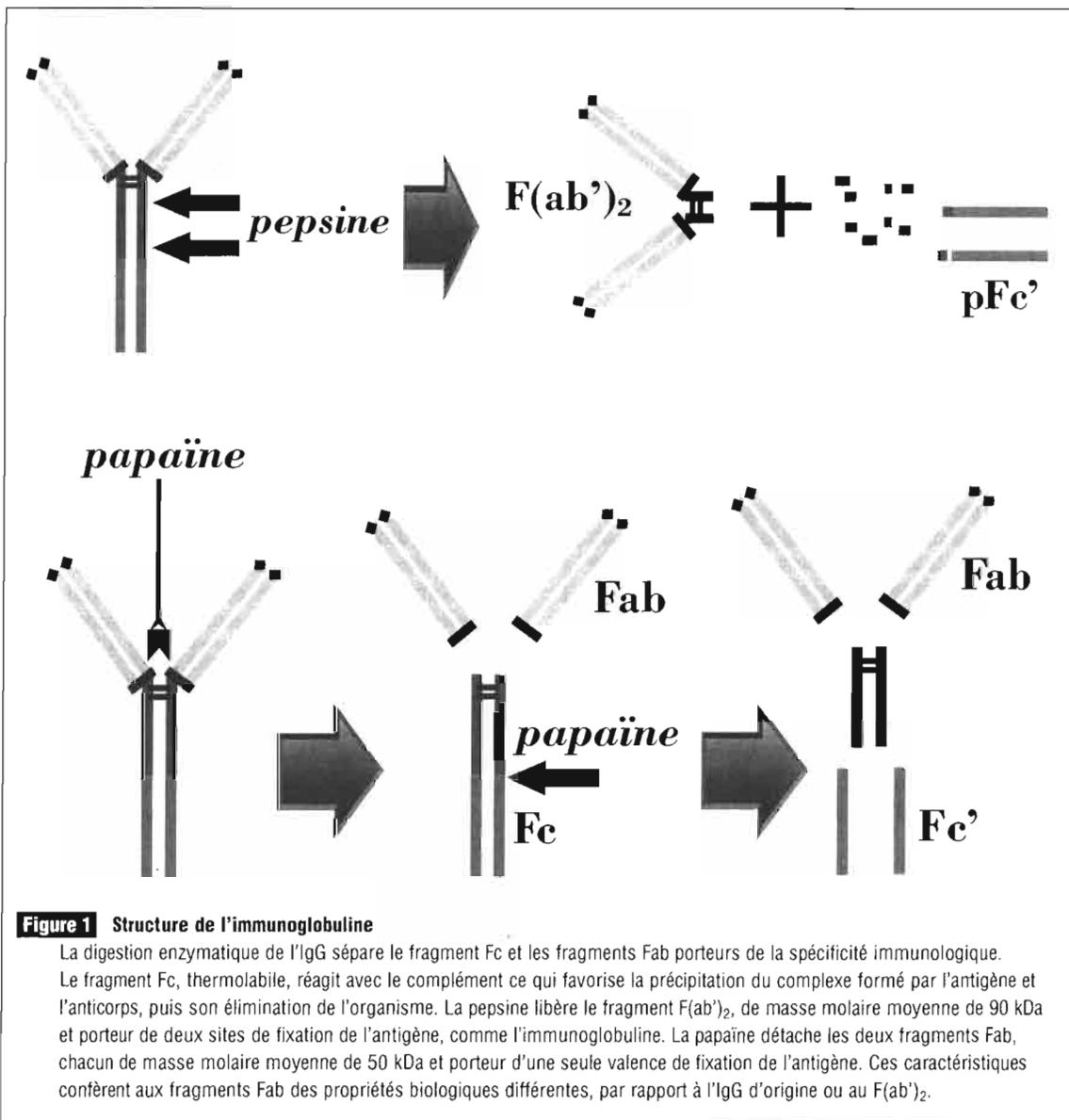


Figure 1 Structure de l'immunoglobuline

La digestion enzymatique de l'IgG sépare le fragment Fc et les fragments Fab porteurs de la spécificité immunologique. Le fragment Fc, thermolabile, réagit avec le complément ce qui favorise la précipitation du complexe formé par l'antigène et l'anticorps, puis son élimination de l'organisme. La pepsine libère le fragment F(ab')₂, de masse molaire moyenne de 90 kDa et porteur de deux sites de fixation de l'antigène, comme l'immunoglobuline. La papaine détache les deux fragments Fab, chacun de masse molaire moyenne de 50 kDa et porteur d'une seule valence de fixation de l'antigène. Ces caractéristiques confèrent aux fragments Fab des propriétés biologiques différentes, par rapport à l'IgG d'origine ou au F(ab')₂.

© DR

Une purification plus poussée, notamment par des techniques de dialyse, d'ultrafiltration et de chromatographie échangeuse d'ions ou d'affinité, à laquelle s'ajoute la réduction du risque infectieux par des procédures antiseptiques rigoureuses, renforce aujourd'hui considérablement la sécurité d'emploi des SAV (10).

La validation pharmacologique et clinique

Curieusement, depuis leur découverte il y a plus d'un siècle, les sérums thérapeutiques n'ont été l'objet d'aucun essai clinique ni de recherche pharmacologique jusqu'aux années 1970.

Après inoculation, le venin diffuse rapidement dans l'ensemble de l'organisme et sa concentration tend à s'équilibrer entre les différents compartiments : sang et organes profonds, notamment. L'élimination du venin administré par voie veineuse se fait en 2 ou 3 jours (11,12), essentiellement par voie rénale. Au cours de l'envenimation naturelle, il est probable que la présence de venin, injecté par voie intramusculaire ou

sous-cutanée par le serpent, se prolonge davantage. La vitesse de diffusion et la distribution des anticorps dépendent de leur nature. Les IgG complètes restent majoritairement dans le sang où la concentration maximale est atteinte en six heures. Le pic sanguin des F(ab')₂ est obtenu en une heure environ et ces fragments d'immunoglobulines ont une distribution médiocre dans les organes profonds. Enfin, les Fab, dont le volume est plus petit, se distribuent en moins d'une heure dans tous les tissus de l'organisme où ils sont présents à concentration égale. La présence d'anticorps dans le compartiment vasculaire provoque un transfert du venin à partir des compartiments tissulaires vers le sang où ils forment le complexe antigène-anticorps (figure 2 ; 13). Le complexe immunitaire est détruit par le système immunitaire lorsqu'il est composé d'IgG complètes ou de fragments F(ab')₂. En revanche, formé avec les fragments Fab, il est éliminé par voie rénale, ce qui peut éventuellement provoquer des lésions à ce niveau.

La posologie est empirique et surtout guidée par l'évolution clinique. Généralement, le SAV est administré par perfusion, mais l'injection intraveineuse directe

- (10) Chippaux JP, Goyffon M (1998) *Toxicon* 36, 823-46.
- (11) Audebert F *et al.* (1994) *Hum exper Toxicol* 13, 683-8.
- (12) Audebert F *et al.* (1994) *J Pharmacol exper Ther* 268, 1512-7.
- (13) Rivière G, Bon C (1999) *Ann IP/Actualités* 10, 173-82.

lente permet de réduire les quantités injectées. La perfusion a pour avantage de mieux contrôler l'apparition d'effets secondaires immédiats ou précoces lorsque l'on administre un SAV faiblement purifié. Les doses à administrer se fondent sur l'identification du serpent responsable de l'envenimation, le délai de mise en route de l'immunothérapie, l'évolution clinique, le titre du SAV et l'environnement médical. Les producteurs se basent le plus souvent sur la capacité moyenne des glandes à venin de chaque espèce contre laquelle le SAV est préparé et en tiennent compte pour la présentation du produit.

Les rares essais cliniques menés depuis une vingtaine d'années confirment la grande variabilité de symptomatologies cliniques et de réponses thérapeutiques en fonction des espèces venimeuses et des circonstances.

L'avenir de la sérothérapie

Diverses solutions peuvent être envisagées pour améliorer la sérothérapie afin d'obtenir une plus grande efficacité et une sécurité d'emploi accrue.

Le choix des venins, les techniques d'immunisation des chevaux, le changement d'animal d'immunisation et les procédures de purification du SAV ont largement été exploités et ne semblent pas offrir de nouvelles perspectives. En revanche, la recherche s'oriente vers plusieurs voies prometteuses. L'isolement ou la synthèse des composants toxiques des venins pourrait augmenter la réponse immunitaire des animaux et l'efficacité des SAV. L'obtention de fragments d'anticorps

plus petits, comme les Fv ou le scFv, par clivage chimique ou par biologie moléculaire conduirait à une meilleure reconnaissance des antigènes et à une réduction probable des effets secondaires (Lire p. 40). Enfin, l'association de traitements adjuvants potentialisant le SAV constitue un enjeu thérapeutique majeur de ces dernières années.

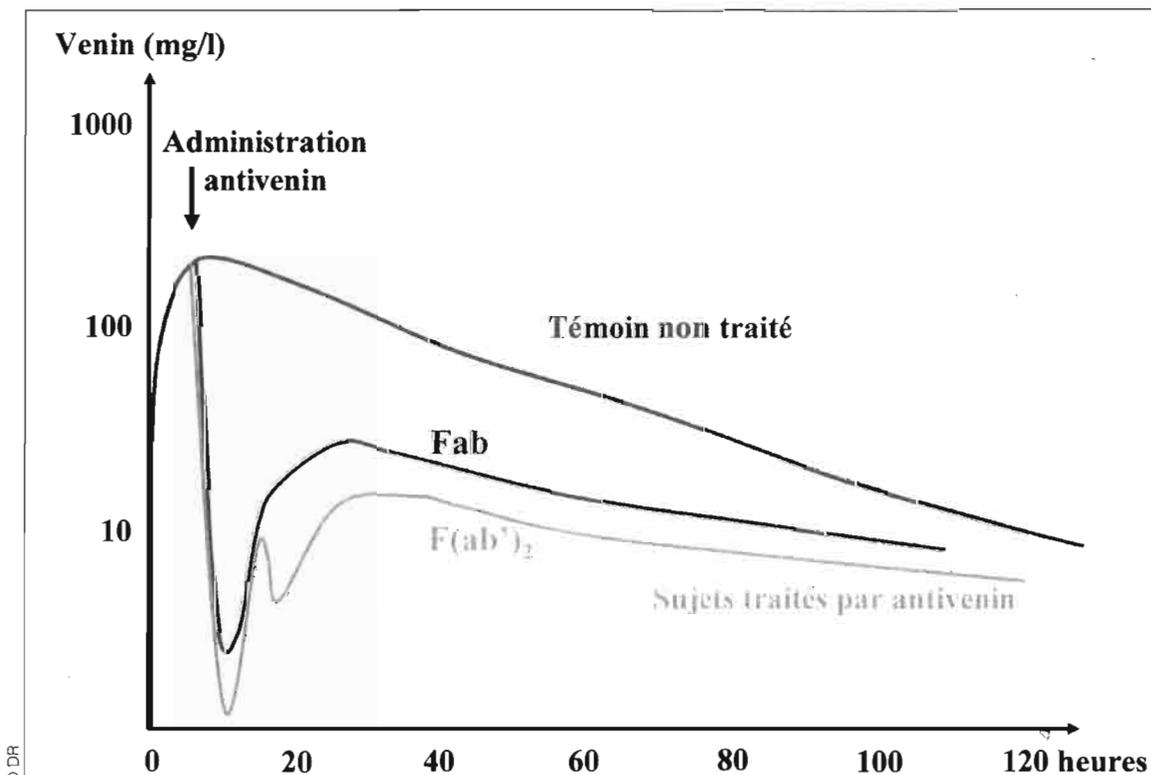
Les antivenins commercialisés actuellement ne sont pas tous d'excellente qualité (14). Leur spécificité dépend essentiellement des venins qui ont été utilisés pour immuniser le cheval (encadré 2). On rencontre encore trop souvent dans les pays en développement des producteurs négligents qui se procurent des venins d'origine douteuse, non authentifiés et provenant parfois d'espèces absentes des régions où ils commercialisent leur produit. Dans ces conditions, quelle que soit la rigueur de la purification, le SAV sera de faible efficacité contre les envenimations. C'est pourquoi l'OMS élabore actuellement des recommandations pour la fabrication, la validation et l'utilisation des SAV.

La purification du SAV est coûteuse et peut conduire à des choix industriels dont la performance est moindre, ce qui peut avoir pour conséquence une réduction importante de la sécurité d'utilisation : les effets secondaires seront à la fois plus fréquents et plus sévères... Toutefois, avec des sérums répondant aux normes de qualité modernes, la réticence encore forte des praticiens n'est plus de mise. L'indication du SAV doit donc s'élargir. Son emploi devrait être systématique dans tous les cas d'envenimation pour diminuer les complications et la durée d'hospitalisation. ●

(14) Warrell DA (2008)
Trans R Soc Trop Med Hyg
102, 397-9.

Figure 2 pharmacocinétique des anticorps et neutralisation du venin (d'après 13)

Le venin est dosé dans le sang à intervalle répété. Chez un sujet non traité, le venin (courbe rouge) s'élimine de l'organisme en plus de 120 heures. Lorsqu'un anticorps est injecté par voie veineuse, il se complexe avec le venin et entraîne sa disparition rapide du compartiment sanguin (en vert clair quand il s'agit d'un Fab et en vert foncé pour un F(ab')₂). Si les anticorps sont en excès dans le sang, ils s'associent avec le venin qui y revient à partir des organes profonds.



Chippaux Jean-Philippe (2008)

Les serums antivenimeux aujourd'hui : préparation,
utilisation

Biofutur, 27 (292), 36-39

ISSN 0294-3506