

La découverte du sérum antivenimeux [10 février 1894]

La quête d'antivenins efficaces s'est déroulée dans l'ombre des grandes découvertes des XIX^e et XX^e siècles. De grands noms s'y sont pourtant intéressés. Des approches vaccinales de Jenner et Pasteur aux anticorps actuels, retour sur près de 115 ans d'histoire.

*USM 505. Dépt RDDM
Muséum National d'histoire
naturelle

57 rue Cuvier

75005 Paris

mgoyffon@mnhn.fr

**Institut de Recherche pour
le Développement (UR 010)

Faculté de Pharmacie,

4 avenue de l'Observatoire

75270 Paris cedex 06

chippaux@ird.fr

Max Goyffon*, Jean-Philippe Chippaux**

*1 se dit de la vaccination
contre la variole mise au
point par Jenner

(1) Brygoo E R (1982)

Mem Inst Butantan 46, 59-77

(2) Phisalix C, Bertrand G

(1894) *C R Soc Biol* 46,

111-113

(3) Phisalix C, Bertrand G

(1894) *C R Soc Acad Sci* 118,

356-8

a découverte et la mise au point de la vaccination contre la rage par Pasteur en 1885, première vaccination humaine non jennérienne*, marquent la fondation de l'immunologie moderne en même temps que ses applications médicales les vingt années qui suivront : immunité active, immunisation et vaccination (Behring et Kitasato, 1890), transfert d'immunité, immunité passive et sérothérapie (Héricourt et Richet, 1888, puis Behring et Kitasato, 1890, puis Ehrlich, 1892), découverte des premières toxines bactériennes, diphtérique (Roux et Yersin, 1889), tétanique (Faber, 1889), atténuation des toxines par des procédés chimiques ou physiques, c'est-à-dire dissociation du pouvoir toxique et du pouvoir vaccinant (Behring et Kitasato, 1890), notion d'antitoxines physiologiques (Phisalix et Bertrand, 1894) ou anticorps (Pfeiffer, créateur du mot, 1898), première théorie de la réaction antigène-anticorps (Ehrlich, 1900), anaphylaxie (Richet et Portier, 1902), découverte des groupes sanguins (Landsteiner, 1902).

cédés d'atténuation des toxines microbiennes en vue d'une vaccination étaient applicables aux venins. En 1888, Pasteur avait, en effet, déjà réussi à préparer un vaccin contre le choléra des poules et le succès de son essai de vaccination anti-charbonneuse des moutons, à Pouilly-le-Fort en 1881, était dans toutes les mémoires (1).

Césaire Phisalix commence par étudier les venins de salamandre. Les premiers articles sur les venins de vipère n'apparaissent qu'en 1893 lorsque Gabriel Bertrand le rejoint. Auparavant, Bertrand était entré au Muséum en 1889 comme préparateur au laboratoire de chimie au terme de ses études de pharmacie. Au laboratoire de pathologie comparée, une amitié fidèle et durable réunira les deux chercheurs, même après le départ de Bertrand, en 1900, pour l'Institut Pasteur où il accomplira une brillante carrière de biochimiste. Leur collaboration sera décisive. Peu d'articles cosignés seront publiés avant l'article princeps du 10 février 1894 dans les *Comptes Rendus de la Société de Biologie*, puis quelques jours après dans les *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* (2,3). Dans ces premiers articles communs, Phisalix et Bertrand relèvent la résistance naturelle au venin de vipère de deux couleuvres, la couleuvre à collier et la couleuvre vipérine. On sait désormais que cette résistance est vraisemblablement liée à la présence d'inhibiteurs naturels, aujourd'hui isolés chez de nombreuses autres espèces (serpents, mammifères), dont certains possèdent des éléments de structure caractéristiques de molécules appartenant à la fonction immunitaire innée. Le tournant de leurs travaux se situe au tout début de l'année 1894, lorsqu'ils découvrent la possibilité d'atténuer la toxicité du venin par un chauffage à 80°C

Venins et toxines bactériennes... même principe

C'est en 1888 que Césaire Phisalix (voir *Biofutur* n°290, p.70-71) arrive au Muséum national d'histoire naturelle de Paris, comme aide-naturaliste, puis comme assistant et enfin comme professeur intérimaire, en 1897, dans le laboratoire de pathologie comparée alors dirigé par Auguste Chauveau. À son arrivée au Muséum, Chauveau l'incita à travailler sur les venins, avec l'idée que les poisons présents dans ceux-ci étaient similaires aux toxines produites par les bactéries, et que les pro-

pendant 5 minutes, et la possibilité de vacciner un animal avec ce venin atténué qu'ils appellent « échidno-vaccin » (4). Par des techniques de chauffage différencié, ils montrent aussi que les effets généraux et les effets locaux (nécrose tissulaire) du venin ne sont pas dûs aux mêmes composants toxiques : en clinique humaine, on observe en effet que les sérums antivenimeux sont peu actifs sur les lésions locales.

La présentation de la découverte de la sérothérapie antivenimeuse a lieu lors de la séance de la Société de biologie du 10 février 1894. Elle est intitulée : « *Sur la propriété antitoxique du sang des animaux vaccinés contre le venin de vipère* ». Phisalix et Bertrand exposent une procédure devenue classique : ils utilisent le venin atténué par la chaleur pour immuniser des cobayes et prélèvent ensuite le sérum de ces animaux immunisés pour traiter un animal envenimé. La sérothérapie antivenimeuse est née. Phisalix et Bertrand précisent que l'immunité des animaux traités par le venin n'est pas immédiate mais qu'elle apparaît au bout de trois jours. Ce résultat, qui paraît aujourd'hui surprenant car il est obtenu après une seule injection, peut s'expliquer par l'induction d'une réponse primaire d'immuno-globulines M (5). Toutefois, Phisalix et Bertrand corrigeront rapidement leur protocole et insisteront sur la nécessité d'une « hypervaccination » pour obtenir un sérum à haut pouvoir protecteur. Ils affirment que l'injection de l'échidno-vaccin provoque la formation dans le sang d'une substance antitoxique neutralisant physiologiquement le venin. Ils pensent aussi que les processus physiologiques mis en jeu dans l'accoutumance au venin (mithridatisation) et la vaccination sont différents, tout du moins qu'ils ne possèdent pas la même efficacité. Enfin, ils estiment être en mesure d'obtenir un sérum d'animal immunisé suffisamment actif pour être utilisé comme agent curatif chez l'homme envenimé, et annoncent en conséquence d'autres expériences. Ils admettent implicitement la spécificité du sérum antivenimeux qu'ils préparent et ne tentent pas de l'utiliser contre d'autres venins que celui de la vipère. Le mécanisme physiologique est correctement interprété en dépit des connaissances rudimentaires de l'époque sur l'immunité.



Césaire Phisalix
1852 - 1906

La méthode Calmette

C'est au cours de la même séance qu'Albert Calmette va présenter ses propres résultats. Calmette, né à Nice, était le fils d'un directeur de cabinet de préfet. Entré à l'École de santé navale de Brest en 1881, il sert tout d'abord en mer de Chine comme aide-major dans une escadre com-

mandée par l'amiral Courbet, dernier amiral français vainqueur en combat naval (Fou Tchéou, 1884), pour lequel il avait une grande admiration. Il y aurait appris, nous dit l'historienne des sciences britannique Barbara Hawgood, le sens du commandement (6). À son retour en France en 1885, il soutient sa thèse de docteur en médecine, puis demande à servir dans les troupes coloniales lors de leur création, en 1890. À l'occasion d'un stage à l'Institut Pasteur de Paris, récemment ouvert, il est remarqué par Emile Roux et est envoyé en 1891 à Saïgon pour y fonder la première filiale, encore en activité, de l'Institut Pasteur, destinée initialement à préparer un vaccin antirabique et un vaccin antivaricelleux. De retour en France en 1893, il est envoyé à Lille pour y fonder une deuxième filiale de l'Institut Pasteur, qu'il dirigera de 1895 à 1919, et reviendra ensuite définitivement à l'Institut Pasteur de Paris (6).

Au début de son séjour à Saïgon, en 1891, un administrateur local lui fait parvenir un lot de cobras. Il saisit alors l'occasion qui s'offre d'étudier les effets de leurs venins, mais aussi de mettre au point une méthode de neutralisation lui permettant d'immuniser sans dommages des animaux de laboratoire. Tout comme Chauveau et Phisalix, il croyait à une analogie entre les composants toxiques du venin et les toxines bactériennes. Les venins de cobra se révélant résistants à la chaleur, technique habituelle d'atténuation des toxines, il essaye de multiples substances chimiques et retient finalement les hypochlorites alcalins. Il parvient ainsi à immuniser des poules et publie, dès 1892, ses premiers résultats. Revenu en France, il reprend ses recherches sur le venin de cobra. Sa première annonce de l'obtention d'un sérum à activité thérapeutique a lieu à la Société de biologie, puis à

l'Académie des sciences, sous le titre : « *L'immunisation artificielle des animaux contre le venin des serpents et la thérapeutique expérimentale des morsures venimeuses* », le même jour que Phisalix et Bertrand, mais plus tard dans la séance (7,8). Calmette observe, ce qui sera vérifié par la suite par Phisalix et Bertrand eux-mêmes, qu'une immunisation satisfaisante demande un délai minimum de trois semaines. Il conclut sa première présentation en affirmant que ses expériences sur l'animal l'autorisent à espérer beaucoup pour l'application à l'homme. Toutefois, il accordait dans le traitement d'une morsure venimeuse autant d'importance à l'injection locale d'hypochlorite qu'au sérum lui-même. Manifestement, le phénomène immunitaire restait mal compris par Calmette à un moment où le mot « anticorps » n'avait pas encore été créé. Il renoncera peu à peu à soutenir l'intérêt thérapeutique de l'hypochlorite, sans toutefois reconnaître explicitement son erreur.

(4) Bochner R, Goyffon M (2007) *Bull Soc Herpetol Fr* 123, 15-46

(5) Bon C (1996) *Envenomings and their treatments* (C Bon, M Goyffon) Fond Mérieux Lyon, 3-9

(6) Hawgood B (1999) *Toxicon* 37, 1241-58

(7) Calmette A. (1894) *C R Soc Biol* 46, 120-4

(8) Calmette A. (1894) *C R Acad Sci* 118, 720-2

Querelles

Dans les conditions de la présentation de leurs résultats originaux, une querelle de priorité était inévitable. Elle eut bien lieu. Peut-être s'y ajoutait-il une discrète rivalité d'établissement, les uns au Muséum, l'autre à l'Institut Pasteur. Dans une note présentée quelques semaines plus tard, le 27 mars, Calmette fait valoir l'action tout à la fois préventive, antitoxique et thérapeutique du sérum antivenimeux qu'il prépare, sans citer le travail antérieur de Phisalix et Bertrand. Ceux-ci répliquent aussitôt le mois suivant dans une note où ils rappellent leur antériorité, car ils pensent que des conséquences théoriques et pratiques importantes découleront logiquement des faits qu'ils ont établis. Il s'ensuivra une série de courtes notes où chacune des parties conteste les arguments de l'autre. L'Académie des sciences tranchera indirectement le débat en attribuant en 1894 le prix Monthyon à Phisalix et Bertrand pour la découverte d'un sérum antivenimeux (1). Cette querelle laissera des traces. D'autres conflits surgiront. Calmette conteste ensuite la possibilité d'atténuer convenablement les venins par la chaleur. Sur ce point, les adversaires tombent d'accord et concluent que la divergence des résultats peut s'expliquer par la différence des conditions expérimentales. En pratique, le venin de cobra, nettement plus puissant que le venin de la vipère aspic ou péliade, est aussi relativement thermostable. L'année suivante, en 1895, Phisalix et Bertrand démontrent l'inefficacité de l'hypochlorite de calcium dans le traitement préventif ou curatif d'une envenimation par morsure de serpent. Après cette critique sévère, Calmette ne publiera plus de note sur l'hypochlorite. Préférant sans doute ne pas s'égayer dans une vaine polémique, il s'attache avant tout à promouvoir la sérothérapie antivenimeuse avec une incroyable efficacité. Durant ces polémiques, et dans des polémiques ultérieures surgies avec d'autres personnalités scientifiques, Bertrand sera aux côtés de Phisalix le fidèle et constant ami qu'il demeura toute sa vie (4).



Albert Calmette
1863 - 1933

France qu'à Rome, en 1894, et Moscou, en 1897 ? Est-ce le départ en 1900 de Bertrand pour l'Institut Pasteur ? Cette alliance entre un médecin et un pharmacien s'était montrée très productive. L'un et l'autre étaient bien conscients de l'importance de leur découverte. Cependant que Phisalix va s'orienter vers la recherche d'autres antidotes, animaux et végétaux, contre les venins de serpents, seul Calmette s'attache à produire du sérum antivenimeux à une échelle suffisante pour être en mesure de l'employer en thérapeutique humaine. À l'Institut Pasteur de Lille, en 1895, Calmette prépare donc en grande quantité un sérum antivenimeux contre le venin d'un cobra asiatique (*Naja tripudians* = *N. kaouthia*) qui sera utilisé en Inde et au Vietnam. Le premier patient à bénéficier d'une sérothérapie fut un Vietnamien sévèrement envenimé qui, à la fin de l'année 1895, reçut un sérum antivenimeux préparé par Calmette et guérit. En 1896, Calmette publie une monographie rassemblant le résultat de ses recherches sur les venins de serpents et les sérums antivenimeux. La même année, invité par le *Royal college of physicians and surgeons* de Londres, il convainc l'auditoire de l'intérêt et de l'efficacité de la sérothérapie antivenimeuse. Le procès-verbal de cette séance recommande sans restriction l'administration du sérum antivenimeux dans le traitement des envenimations ophidiennes*. Puis les publications de Calmette en français, en anglais ou en allemand se succèdent, chapitres d'ouvrages ou journaux médicaux, et jusqu'aux États-Unis. Calmette parvient rapidement à faire connaître ses résultats à la terre entière. En dehors de

quelques pays, comme le Brésil (4), l'un des tout premiers pays à créer un institut spécialisé destiné à préparer des sérums antivenimeux, l'institut Butantan (Brésil, 1901), les noms de Phisalix et Bertrand tombent peu à peu dans l'oubli. Après les publications de Calmette et son passage à Londres en 1896, la fabrication de sérums analogues va commencer, parfois dans des instituts fondés à l'image de l'Institut Pasteur : Philadelphie (États-Unis, 1902), Sydney (Australie, 1902), Mumbai (Institut Haffkine, Inde, 1903), Johannesburg (Afrique du Sud, 1903), Londres (Grande Bretagne, 1905), Kasauli (Inde, 1907).

La gloire internationale pour Calmette...

Seul Calmette, en effet, sut faire connaître à l'étranger l'importance de la découverte des sérums antivenimeux. Est-ce à cause du mauvais état de santé chronique de Phisalix, qui dès 1898 ne se déplaça plus à l'étranger et ne communiqua ses résultats hors de

... et une reconnaissance tardive pour Phisalix

La différence de tempérament entre Phisalix et Calmette est frappante. Phisalix apparaît comme un biologiste soucieux d'expliquer les phénomènes. Il ne manque pas de souligner la similitude de ses résultats avec ceux

*2 dues aux serpents

qui sont obtenus à partir de la toxine tétanique ou diphthérique. Il écrit, en conclusion d'une note précédant de peu sa note princeps : « *Notre travail avait eu pour point de départ la comparaison des venins de vipère avec les toxines microbiennes ; nous venons de démontrer la ressemblance en ce qui concerne l'atténuation par la chaleur et la transformation de ce venin en vaccin* » (9). Il ne doutait pourtant pas de l'importance de ses résultats, la querelle de priorité le montre bien. Mais plutôt que de mettre en valeur son acquis, il préféra partir à la recherche d'autres antidotes pour mieux comprendre le phénomène de la neutralisation d'un venin. Ses réflexions, ses expérimentations l'amènèrent à d'autres découvertes qu'il n'approfondit pas davantage mais dont certaines sont actuellement considérées comme des voies de recherches prometteuses. Il conclut par exemple une note en soulignant que le facteur naturel de résistance aux venins de serpents chez certains animaux (mangouste, hérisson) pourrait fournir un antidote intéressant en thérapeutique, une piste explorée à nouveau et développée depuis une dizaine d'années. À l'opposé, Calmette met toute son énergie à faire reconnaître l'intérêt de sa découverte. L'interprétation des phénomènes qu'il observe est volontiers mécaniciste. Il vise avant tout l'efficacité. Il injecte localement de l'hypochlorite parce qu'il s'agit du meilleur produit capable d'atténuer *in vitro* le venin, ce que lui reprocheront à juste titre Phisalix et Bertrand, non sans vivacité. Dans sa querelle avec Phisalix, emporté sans doute par ses convictions profondes, il affirme que son sérum antivenimeux est actif contre le venin de plusieurs serpents, une erreur qui ne manquera pas d'être soulignée par plusieurs équipes étrangères. Adhérent pleinement au credo pasteurien, il vise avant tout à développer une recherche bénéfique pour l'humanité. Élève et admirateur de

Roux tout autant que de Pasteur, sa foi, son pouvoir de conviction et un dynamisme hors du commun balayeront aisément des approximations et des échecs en fin de compte mineurs, et réussiront à imposer ses opinions et ses résultats : il sera prophète en dehors de son pays comme en son pays...

Rien n'a changé... ou presque

Les procédures utilisées aujourd'hui pour la préparation des sérums antivenimeux restent fondamentalement les mêmes, plus d'un siècle après leur découverte. Parmi les améliorations notables, on retiendra la neutralisation des toxines par le formol (Ramon, 1924) qui permettra de s'affranchir du chauffage, aux résultats parfois incertains, et des divers dénaturants essayés jusqu'alors, plus aléatoires encore. La formalisation de Gaston Ramon neutralise la toxicité en laissant intactes les propriétés antigéniques : les toxines sont modifiées en anatoxines*³ (le terme de « toxoïde » tend à se substituer à celui d'anatoxine). Outre ce réel progrès dans l'immunisation des animaux destinés à fournir le sérum antivenimeux, des améliorations considérables ont été apportées à la nature des fragments d'anticorps maintenant utilisés à la place des immunoglobulines natives. On dispose donc de produits de haute activité, d'excellente tolérance et indispensables au traitement des envenimations graves pour lesquelles le traitement symptomatique le mieux conduit reste encore insuffisant. Paradoxalement, en dépit d'une efficacité spécifique qui les rend irremplaçables, les sérums antivenimeux deviennent inaccessibles (lire p.45). Cette situation insupportable entraîne actuellement à l'échelle mondiale diverses actions dont on espère qu'elles aboutiront. ●

(9) Phisalix C, Bertrand G (1894) *Arch Physiol Norm Pathol* 5, 567-82

*³ toxine atténuée aux propriétés immunisantes

Vipera aspis, espèce autochtone habituellement utilisée par Césaire Phisalix dans ses travaux sur les venins de serpents. C'est avec le venin de cette espèce qu'il a fabriqué le premier sérum antivenimeux.



Goyffon M., Chippaux Jean-Philippe (2008)

La découverte du sérum antivenimeux (10 février 1894)

Biofutur, 27 (292), 32-35

ISSN 0294-3506