

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire



Domaine : Sciences de la nature et de la vie
Filière : Sciences vétérinaires

Mémoire de fin d'études

Pour l'obtention du diplôme de Docteur

en

Médecine vétérinaire

THEME

Contribution à l'élaboration du sérum antivenimeux ophidien : Etude bibliographique

Présenté par :

Melle SANAT Katia

Mr. ZEHOUANE Mustapha Racim

Soutenu le 01 Décembre 2020 devant le jury :

Mr. DJEZZAR Redha

MCB (ENSV)

Président

Mme DJELLOUT Baya

MAA (ENSV)

Examinatrice

Mr. OUMOUNA M'Hamed

MCB (ENSV)

Promoteur

Mr. BOUDJELLABA Sofiane

MAA (ENSV)

Co-promoteur

2019-2020

Remerciements

Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements et notre profonde gratitude à notre Promoteur **Dr OUMOUNA M'hamed**, Maitre de conférences classe B, qui a eu la bienveillance d'accepter de nous encadrer, pour ses conseils, son orientation, sa disponibilité et son aide durant la période de notre travail.

Nos sincères remerciements s'adressent également aux :

Dr. DJEZZAR Redha pour nous avoir honoré en présidant le jury de notre soutenance
Mme. DJELLOUT Baya pour avoir accepté d'examiner notre travail.

Nous tenons à remercier particulièrement le **Dr. BOUDJELLABA Sofiane** de nous avoir honoré en tant que co-promoteur.

Dédicaces

A mes très chers parents

*Aucune dédicace, aucun mot ne pourrait exprimer à leur juste valeur
Le gratitude et l'amour que je vous porte*

*Ma mère Nora qui m'a arrosé de tendresse, d'espoir et d'apprentissage,
Qu'elle trouve ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.*

Mon père Ali, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir.

A mes adorables sœurs et mon frère

*Lysa, Célia et Tarek qui ont toujours été là pour moi, avec qui je partage les
délires les plus fous.*

A mon Chocobon, ma meilleure rencontre

*DEHABA Abdenour qui a toujours été là pour moi, me supporte malgré nos
petites chamailleries et qui me rend heureuse chaque jour un peu plus,
comme dit G.Musso :
« ... il suffit parfois d'une rencontre...) Je t'aime.*

A mes cousins

Fatiha et Mouhand le duo de choc que j'aime tellement.

A mon chat Pipo, ma boule de poils qui égaie la maison.

A mes amies du lycée

Z.Lina, B.Sofia, A.Lina et R.Nessrine.

*A mes amis de L'ENSV auprès desquels j'ai passé les cinq meilleures années :
I.Ryma, A.Ouardia, M.Adel, B.Amayas, M.Oussama et B.Rachida, je vous dis
Merci.*

Katia

Dédicaces

A Louiza ma maman chérie qui est toujours derrière moi à m'apprendre, me conseiller et m'encourager, je te remercie pour ton soutien, ton amour, ta présence, tes sacrifices et pour tout absolument tout ce que tu fais pour nous, toi qui es la meilleure des meilleures mamans.

A Nazim, Leaticia et Flora, aucun mot ne pourrait décrire l'amour que je porte pour vous, je vous dédie ce modeste travail en espérant de vous de faire mieux, je sais que vous allez le faire, vous en êtes capable.

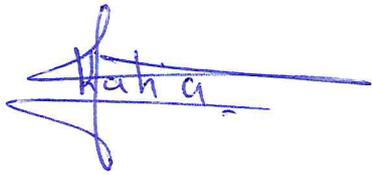
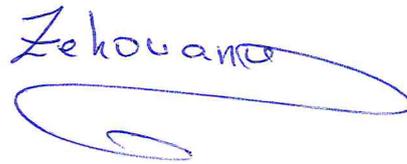
A Sarra qui sans elle mon cursus aurait été moins facile, j'en profite pour te remercier surtout pour ton amour, ta patience et tes encouragements, mais aussi pour tes cours. Je t'aime.

A tous mes amis, Idriss, Anis, Nassim, Salim et Massi. Notamment les deux premiers qui en ce moment même m'attendent pour une game, et j'aimerais les dénoncer car ils ne m'ont jamais encouragé si ce n'est pour jouer et faire la fête...

A toutes les adorables personnes que j'ai pu rencontrer durant mes années à l'école, dont la liste est longue et je ne pourrai malheureusement pas toutes les citer...

Racim

Nous soussignés Melle SANAT Katia et Mr. ZEHOUANE Mustapha Racim,
déclarons être pleinement conscients que le plagiat de documents ou d'une partie
d'un document publiés sous toute forme de support, y compris l'internet,
constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. En
conséquence, nous nous engageons à citer toutes les sources que nous avons
utilisé pour écrire ce mémoire.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Katia". The signature is stylized with a large, sweeping flourish that extends to the left and then loops back to the right, crossing over the name.A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Zehouane". The signature is written in a cursive style and is followed by a large, horizontal, looping flourish that extends to the right and then loops back to the left.

Listes des tableaux

Tableau 1: Evolution de la fabrication des antivenins depuis leur decouverte	18
Tableau 2: Incidence et mortalité par morsure de serpents dans le monde.....	48

Listes des figures

Figure 1: Présence des serpents venimeux	3
Figure 2: Photo d'une vipère à corne, Cerastes cerastes	5
Figure 3: Photo d'une vipère lébétine, Macrovipzra lebetina	6
Figure 4: Type de dentition	7
Figure 5: Patient souffrant du syndrome Vipérin	16
Figure 6: Patient souffrant du syndrome Cobraïque	17
Figure 7: Schéma de structure d'un anticorps	21
Figure 8: Prélèvement de venin de serpent	26
Figure 9: Zones d'immunisation recommandées chez le cheval	31
Figure 10: Récolte de plasma par plasmaphérèse	33
Figure 11: Poche de plasma récolté d'un cheval	34
Figure 12: Distribution Mondiale de l'incidence et de la mortalité par envenimation ohphidienne	48
Figure 13: Cercle vicieux alimentant la mauvaise disponibilité des antivenins	52

Liste des abreviations

µm : micromètre

EPPI : Eau pour préparation injectable

CAP : Centre Antipoison

CCPA : conseil canadien de protection des animaux

°C : Degré Celsius

Cm : Centimètre

Da : Dalton

DL : Dose Létale

Épitopes : site de liaisons à l'anticorps

Fab: Fragment antigen binding

FCA : Adjuvant complet de Freund

Fc : Fragment constant

FIA : Adjuvant Incomplet de Freund

g : est l'accélération due à la force centrifuge dans la centrifugeuse

Ig : Immunoglobuline

IgG : Immunoglobulines G

IM : Intramusculaire

IV : Intraveineuse

L : litre

NGF : Nerve Growth Factor

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

SAT : Sérum antitétanique

SAV : Sérum antivenimeux

SAO : Sérum anti-ophidien

SC : sous cutané

pg : Picogramme

UI : Unité Internationale

WHO: World Health Organization

Sommaire

Introduction	1
Chapitre I :	
Les envenimations ophidiennes et la sérothérapie antivenimeuse	
1 La distribution géographique des serpents venimeux.....	3
2 Les caractéristiques des venins de serpents.....	6
2.1 La fonction venimeuse	6
2.2 La composition des venins	8
2.2.1 Les toxines.....	8
2.2.2 Les enzymes	9
2.2.3 Les autres composants.....	11
2.3 La variabilité des venins.....	11
2.3.1 La variabilité spécifique	12
2.3.2 Variations ontogéniques et environnementales	12
2.4 Le mode d'action des venins	13
2.4.1 Les phénomènes de synergie et de potentialisation.....	13
2.4.2 La toxicocinétique des venins	14
2.5 La symptomatologie des envenimations	14
2.5.1 Le syndrome Vipérin.....	14
2.5.2 Le syndrome Cobraïque :	16
2.5.3 L'atteinte des autres fonctions.....	17
3 L'évolution et les mécanismes de la sérothérapie antivenimeuse	17
3.1 L'évolution de la sérothérapie antivenimeuse	18
3.1.1 Les découvertes scientifiques majeures.....	18
3.1.1.1 L'interaction antigène-anticorps.....	18
3.1.1.2 L'intérêt des adjuvants	19
3.1.1.3 La spécificité des sérums antivenimeux.....	19
3.1.2 Les nouvelles générations de sérums antivenimeux.....	19
3.2 Les mécanismes de la sérothérapie antivenimeuse.....	20
3.2.1 La structure des antigènes	20
3.2.2 La structure des anticorps.....	20
3.2.3 L'hyper-immunisation de l'animal.....	21
3.2.4 Immunisation artificielle passive du patient.....	22
Chapitre II :	
Elaboration du sérum antivenimeux ophidien	
1 Préparation des venins de serpents.....	23
1.1 La sélection des serpents venimeux	23
1.1.1 Le choix d'un sérum monospécifique ou polyspécifique.....	24

1.1.2	La sélection des espèces venimeuses par pays ou région	24
1.1.3	La sélection des serpents pour chaque espèce venimeuse	25
1.2	Préparation et stockage des venins	25
1.2.1	Elevage de serpents	25
1.2.2	Le prélèvement du venin	26
1.2.3	Le traitement et stockage du venin	26
1.3	Le contrôle de qualité du venin	27
2	L'hyper-immunisation des animaux	27
2.1	La préparation de la solution du venin	27
2.2	L'emploi d'un adjuvant	28
2.3	La sélection des animaux	29
2.4	Le protocole d'immunisation	30
2.4.1	Le volume de la préparation antigènes-adjuvant	30
2.4.2	La voie d'injection	30
2.4.3	Les sites d'injection	31
2.4.4	Les injections de rappel	31
2.4.5	La surveillance des animaux et le dossier d'immunisation	32
3	Recueil, Pool et contrôle du plasma	32
3.1	La saignée	32
3.2	Le pool du plasma	34
3.3	Le contrôle du pool de plasma	34
4	La Purification	35
4.1	La purification des IgG entiers	35
4.1.1	La méthode de précipitation par le sulfate d'ammonium ou de sodium	35
4.2	La méthode de précipitation par l'acide caprylique	36
4.3	La purification des fragments d'IGG (ab') ₂	37
4.4	La purification des fragments d'IgG Fab	38
4.5	Les procédés de purification additionnels	38
4.5.1	La chromatographie échangeuse d'ions	38
5	La formulation	39
6	La réduction du risque de contamination virale	39
7	Conditionnement et conservation	40
7.1	Conditionnement	40
7.2	Conservation	42
8	Le contrôle qualité	42
8.1	L'inspection visuelle	43
8.2	L'étanchéité	43
8.3	La solubilité	43
8.4	Le volume extractible	43

8.5	L'humidité résiduelle	43
8.6	La mesure du pH	43
8.7	La mesure de l'osmolalité	43
8.8	Le test de stérilité	44
8.9	Le test des pyrogènes	44
8.10	La concentration en protéine	44
8.11	Le pouvoir neutralisant.....	44
8.12	L'identification des IgG	44
8.13	La pureté.....	45
8.14	La distribution de la taille moléculaire.....	45
8.15	La concentration en excipients	45
8.16	La concentration en agents chimiques.....	45
CHAPITRE III :		
La crise globale de la sérothérapie anti-ophidienne		
1	Epidémiologie des envenimations ophidiennes : incidences et circonstances	46
1.1	Incidences des morsures.....	46
2	Situation mondiale.....	47
2.1	Circonstances des morsures.....	49
2.2	La Gravité des morsures.....	49
3	Les causes de la pénurie des sérums anti ophidiens	50
3.1	Une méconnaissance des besoins	50
3.2	Un déficit d'accessibilité.....	51
3.3	Un personnel médical peu ou non formé.....	51
3.4	Le coût des SAV.....	51
4	Conséquences de la pénurie	52
5	Prévention de l'envenimation.....	52
5.1	Lutte contre les serpents	53
5.1.1	Protection territoriale et contrôle par des moyens physiques	53
5.1.2	Contrôle écologique	53
5.1.3	Contrôle biologique.....	53
5.1.4	Contrôle chimique	54
5.1.5	Protection contre les morsures.....	54
5.2	Organisation de la prise en charge médicale	55
Conclusion		56
Recommandations		57

Introduction

Le serum, « petit lait » en grec, correspond à la portion liquide du sang exempts d'élément cellulaire et des facteurs de coagulation. Les sérums antivenimeux sont des sérums hétérologues, c'est à dire préparés à partir du sérum d'animaux préalablement hyperimmunisés contre le ou les venin(s) pertinent(s). Lorsqu'il est injecté à un patient envenimé, le sérum antivenimeux neutralise le ou les venins utilisé(s) pour sa production. On parle alors de sérothérapie antivenimeuse (SAV). **(OMS,2018)**

Après une longue période de rejet, la fabrication des sérums antivenimeux jugés peu efficaces, dangereux et d'utilisation difficile, a été significativement améliorée. Le traitement symptomatique des envenimations est complexe, souvent insuffisant, et émaillé d'évènements indésirables. En revanche, neutralisant et accélérant l'élimination du venin, les antivenins — dénomination reflétant leurs nouvelles caractéristiques — constituent le traitement étiologique incontournable des envenimations, notamment dans les formations sanitaires isolées des pays en développement. Les préparations actuelles sont des antivenins polyvalents couvrant les espèces venimeuses d'une région. **(J-P Chippeaux, 2013)** Cependant, le monde traverse aujourd'hui une crise, les stocks d'antivenins arrivent à épuisement. La pénurie de ces sérums est un sujet important puisque 100 000 personnes meurent chaque année d'une morsure de serpent à travers le monde notamment chez les femmes, les enfants et les ouvriers agricoles dans les pays pauvres. Il s'agit donc d'une véritable crise de santé publique qui est largement négligée. **(Diàz M.,2016)**

Dans cette thèse, seront présentées dans un premier temps des généralités sur les envenimations ophidiennes et sur la SAV. Afin d'améliorer la compréhension du sujet, différents axes tels que la distribution géographique des serpents venimeux, les caractéristiques des venins de serpents, la symptomatologie des envenimations, l'évolution et les mécanismes de la SAV seront développés. Le deuxième chapitre détaillera l'ensemble des étapes de production des sérums anti-ophidiens (SAO). Pour finir, la dernier chapitre sera consacrée à la crise globale de la sérothérapie antiophidienne, véritable problème de santé publique dans les pays en développement. Les circonstances et l'incidence des envenimations ophidiennes seront tout d'abord exposées puis, un état des lieux du marché mondial des SAO sera établi. Par la suite, la complexité des causes de la crise et ses conséquences dramatiques seront décrites.

Suite aux réformes imposés par les autorités sanitaires dû à la pandémie actuelle, (COVID-19), l'Institut Pasteur d'Alger a dû se résigner à suspendre la convention signée avec l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger qui avait pour objet l'accès au laboratoire sérum thérapeutique afin de réaliser la partie expérimentale du mémoire de fin d'étude. Par conséquent, nous avons été contraints de faire une étude bibliographique.

Chapitre I :
Les envenimations ophidiennes et la
sérothérapie antivenimeuse

CHAPITRE I : Les envenimation ophidiennes et sérothérapie antivenimeuse

Les serpents se seraient séparés des lézards au Crétacé entre 150 et 120 millions d'années en formant l'ordre des ophidiens. L'ensemble des espèces venimeuses appartiennent aux familles des Viperidae, Elapidae et Colubridae. **(Kasturiratne A *et al*, 2008) et (Hsiang AY, *et al*, 2015)** A l'exception de quelques pays exempts d'espèces venimeuses, les envenimations ophidiennes sont redoutées dans le monde entier et sont une menace pour la santé publique. Les venins de serpents ont fait, par ailleurs, l'objet d'analyses biochimiques et toxicocinétiques rigoureuses qui ont permis d'expliquer la diversité des symptômes observés après une envenimation. Pour les envenimations les plus graves, la neutralisation des composants toxiques du venin par le SAV (Sérum anti-venimeux) est la méthode la plus efficace. **(Goyffon.M 2010, *et al*, 2015).**

1 La distribution géographique des serpents venimeux

Il existe 3.500 espèces de serpents connues, seul le 10^{ème} de ceux-ci est venimeux. Les espèces appartiennent à 5 groupes : les vipéridés (Echis, Bétis), les élapidés (Naja, Mamba), les Hydrophidés (serpents marins), les Colubridés (*Chironius flavopictus*) et les crotalidés (*Crotalus ruber*). **(Gentilini M. 2003)**

A l'instar des zones colorées en rouge de la (figure 1) ci-dessous, les serpents venimeux sont largement répandus dans le monde. Fousseur, arboricole, terrestre ou aquatique, ils s'adaptent à toute sorte de climats. **(Swaroop S, Grab B. 1954)**

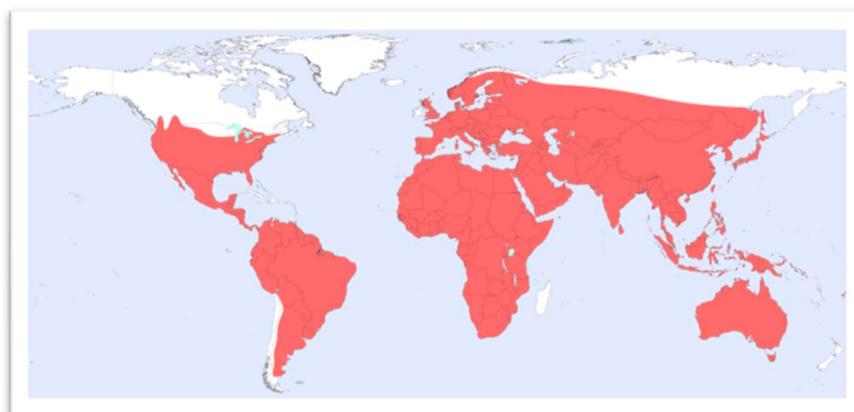


Figure 1: Présence des serpents venimeux (OMS,2010)

Les serpents venimeux sont généralement absents des zones géographiques aux climats extrêmement froids, à l'exception d'une vipère très robuste vivant en Sibérie et au niveau du cercle polaire arctique. En Amérique, aucun spécimen venimeux n'est connu au nord de la frontière sud du Canada. Ces reptiles sont également absents des îles Polynésiennes, de Madagascar, de la Nouvelle-Zélande, des Açores, des Canaries, des îles du Cap-Vert, des Antilles à l'exception de la Martinique, Sainte-Lucie, Tobago et Trinidad), d'Haïti, de Cuba, de la Jamaïque, de Porto Rico, d'Irlande, d'Islande, des Orcades et des Shetlands. **(OMS,2010)**

En revanche, les serpents venimeux sont présents dans toutes les autres régions du globe et sont particulièrement abondants en Afrique, en Asie, en Australie et dans la plupart des pays d'Amérique du Sud **(Swaroop S, Grab B. 1954)**.

Sur les 600 espèces venimeuses recensées, plus de 200 sont considérées comme dangereuses sur le plan médical par l'OMS. L'organisation a classé ces espèces en deux catégories sur la base de la littérature herpétologique et clinique :

- La première catégorie comprend les espèces de serpents venimeux :

- communes ou répandues,
- causant de nombreuses morsures avec des niveaux élevés d'invalidité, de morbidité ou de mortalité.

- La deuxième catégorie contient des espèces de serpents venimeux :

- capables de provoquer une invalidité ou la mort de la victime,
- pour lesquelles les données épidémiologiques ou cliniques sont insuffisantes,
- et/ou sont moins souvent en cause en raison de leurs cycles d'activités,

Leurs comportements, leurs préférences pour des habitats dans des zones éloignées des populations humaines. **(OMS,2010)**

En Algérie, on retrouve *Cerastes cerastes*, la vipère à corne, représentée en (figure 2) dans la première catégorie et *Macrovipera lebetina* dans la deuxième catégorie.



Figure 2: Photo d'une vipère à corne, *Cerastes cerastes* (Anonyme 2)

La vipère à corne doit son nom aux deux écailles dressées sur sa tête qui forment des petites cornes. Elle a une tête triangulaire très caractéristique qui se détache de son cou assez mince. Quand elle se déplace, elle provoque un petit crissement dû à ses plaques dorsales aérodynamiques. C'est cette particularité qui lui permet de se mouvoir à reculons. Tel le caméléon, sa « robe » imite parfaitement les nuances du sable. Ce mimétisme va jusqu'à la couleur de ses iris. La longueur moyenne de cette vipère est de 60 cm.

Il existe différents modes de reptation parmi les serpents. La vipère à cornes utilise le déroulement latéral ou "side-winding". En fait, le serpent procède par une succession de "pas" sur le côté. Si l'on observe les traces d'une vipère à cornes sur le sable, on peut constater que le tracé est discontinu.

La vipère à cornes hiverne 2 à 3 mois. Elle fréquente le désert mais également les régions rocheuses. Cette vipère se déplace au hasard sur de grandes étendues. Ce type de déplacement est fréquent chez les espèces déserticoles. Les déplacements semblent liés aux conditions externes. À l'approche de l'hiver, les déplacements se réduisent puis le serpent finit par passer plusieurs mois enfouis pour hiverner.

Cette vipère meurt si la température dépasse 44°C, ce qui est le cas au Sahara. Pour survivre pendant les périodes chaudes, elle s'enfouit dans le sable ce qui lui permet de maintenir sa température interne à 34°C. Elle ne laisse alors dépasser que ses yeux.

L'été, elle opte pour une vie nocturne ; en revanche, dès que l'hiver arrive, elle devient diurne.

Les nomades ont peur de ce reptile. Un dromadaire succombe en quelques minutes sous sa morsure. Chez l'homme, sa morsure n'est pas forcément mortelle mais provoque en local un gonflement impressionnant voire même un œdème hémorragique. (Ulrich Gruber, 2002)



Figure 3: Photo d'une vipère lébétine, *Macrovipera lebetina* (Hellebuyke T.,2016)

La vipère lébétine représenté dans la (figure 3) ci-dessus est une très grosse vipère, trapue avec un corps assez large et aplati. La tête est triangulaire et très distincte du cou. Elle mesure généralement entre 90 et 130 cm à l'âge adulte. Elle peut atteindre 150 cm et même exceptionnellement dépasser les 2 m. La coloration est très variable mais elle est généralement assez claire et terne, le plus souvent grisâtre comme la pierre, mais aussi beige, sable, jaunâtre, olivâtre ou gris bleuté. **(Anonyme 1)**

2 Les caractéristiques des venins de serpents

La présence d'une fonction venimeuse particulièrement élaborée est un caractère dérivé partagé par les serpents les plus évolués. Le venin correspond, chez les serpents, à l'innovation évolutive qui a permis la transition entre un moyen mécanique, la constriction, et un moyen chimique de maîtriser et digérer leurs proies parfois bien plus grandes qu'eux. A ce titre, le venin de serpents est constitué d'un mélange très variable de composants principalement protéiques aux modes d'actions multiples. **(Chippaux J-P, Goyffon M. 1998)**

2.1 La fonction venimeuse

L'appareil venimeux est un dispositif complexe qui associe une glande spécialisée synthétisant une sécrétion toxique, le venin, et un dispositif vulnérable, le crochet venimeux, capable d'injecter le venin dans l'organisme de la proie ou agresseur après rupture de la barrière cutanéomuqueuse. **(Chippaux J.P 2002)** Doivent être considéré comme venimeux tous les serpents possédant une glande buccale à sécrétion toxique, quel que soit le type de denture. Ce qui fait la différence entre une espèce pouvant présenter un danger pour l'homme et une espèce à morsure bénigne, c'est le perfectionnement de l'appareil inoculateur et le

rapport entre la glande venimeuse et cet appareil. (Bauchot.R 1994 ; Bellaires.A 1969 ; Chippaux J-P 1999 ; Fretey.J 1987)

Classification selon la denture : Selon la denture, les serpents peuvent être classés en quatre groupes (figure 4) ci-dessous (Chippaux J-P, 2002) et (Dramé B.S.I 2000) :

- **Aglyphes** : Ce groupe est constitué de serpents qui ont des dents pleines, n'ont pas de glande venimeuse.

Exemples : **boas, python et la majorité des couleuvres.**

- **Opisthoglyphes** Les crochets fixe (également appelé glyphes) sont en arrière du maxillaire (au niveau de l'œil) et sont creusés d'un sillon médian présence de glandes venimeuses ; ce groupe est représenté par le reste des couleuvres, venin hémotoxique.

- **Protéroglyphes** : crochets en avant du maxillaire et fixe, on note la présence de glandes venimeuses, leur venin est neurotoxique (**cobras, mambas**).

- **Solénoglyphes** : Leur appareil venimeux apparait comme l'un des plus perfectionnés du monde animal. Les crochets sont antérieurs et mobile. Ils présentent de glandes venimeuses et leurs venins sont hémotoxique et nécrosant (**vipères et crotales**).

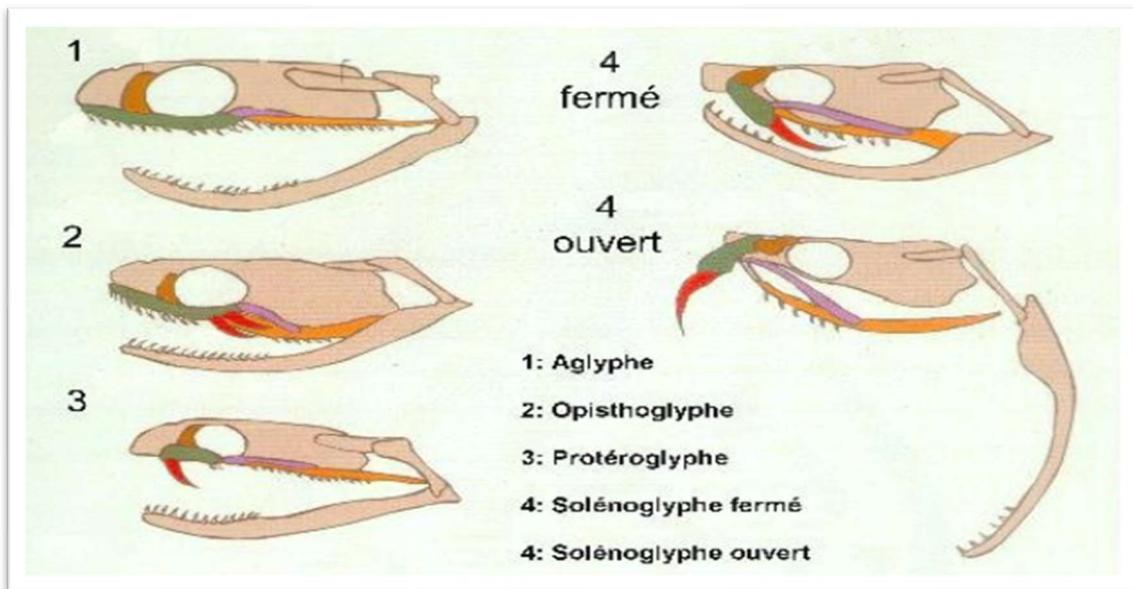


Figure 4: Type de dentition (Michel Le Blanc,1998)

2.2 La composition des venins

2.2.1 Les toxines

Les toxines sont des protéines de faible masse moléculaire qui ont la propriété de se fixer sur un récepteur spécifique, le plus souvent membranaire. Leur effet pharmacologique est dose-dépendant, c'est à dire proportionnel au rapport entre la quantité de toxine introduite et la quantité de récepteurs correspondant présents dans l'organisme de la victime. (OMS,2018) et (Chippaux J-P, 2002)

D'autres facteurs comme la vitesse de diffusion de la toxine, elle-même fortement dépendante de sa taille, et l'affinité de la toxine pour son récepteur vont jouer un rôle dans la rapidité d'apparition des symptômes et sur l'efficacité du traitement. Les toxines sont caractéristiques des venins d'Elapidae. (OMS,2018) et (Chippaux J-P, 2002)

Le tropisme des toxines peut être neurologique, cardio-vasculaire, musculaire ou indifférencié selon la distribution anatomique des récepteurs reconnus (OMS2018) et (Chippaux J-P, 2002). Les toxines sont classées en huit familles principales en fonction de leur structure et/ou de leur mode d'action :

- **Les neurotoxines postsynaptiques** : Se fixent sur des récepteurs cellulaires localisés sur la membrane postsynaptique de la jonction neuromusculaire. Elles sont composées :

- Des toxines curarisantes qui agissent sur la membrane postsynaptique et bloquent la transmission de l'influx nerveux au niveau des muscles, en se fixant directement sur le récepteur de l'acétylcholine. On en rencontre 3 types : les neurotoxines- α courtes, les neurotoxines- α longues et les neurotoxines- κ .

- Des toxines muscariniques qui présentent une structure voisine de celle des neurotoxines curarisantes. Leur nom provient de leur forte affinité pour cette partie du récepteur cholinergique.

- Des toxines « inclassables » qui ont surtout été isolées de venins de Viperidae.

- **Les cytotoxines** : Une cinquantaine de polypeptides composent ce groupe en raison de leur grande homologie de structure. Les cytotoxines, encore appelées cardiotoxines, dépolarisent rapidement et de façon irréversible la membrane cellulaire, conduisant à sa lyse.

- **Les neurotoxines** : Sont des neurotoxines pré-synaptiques ou neurotoxines- β , agissent en amont de la synapse, en modifiant la libération des neuromédiateurs par blocage ou libération massive. Les toxines présynaptiques ont en commun une fonction phospholipasique A2 indispensable à leur activité toxique. Les neurotoxines- β sont classées

en trois groupes : les neurotoxines- β monocaténares, la β -bungarotoxine et les autres neurotoxines- β .

- **Les dendrotoxines**: Encore appelées toxines présynaptiques facilitatrices, favorisent la libération d'acétylcholine en bloquant les canaux potassium voltage-dépendants.

- **Les fasciculines** : Sont des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase, et s'opposent à la régulation physiologique de la transmission de l'influx nerveux.

- **Les myotoxines** : Se fixent sur les canaux ioniques des cellules musculaires et provoquent leur nécrose.

- **Les sarafotoxines** : Sont de puissants vasodilatateurs, structurellement et fonctionnellement très proches des endothélines, hormones vasoconstrictrices présentes dans les cellules endothéliales des mammifères.

-**Les désintégrines** : Ont pour action d'inhiber les intégrines. Les intégrines sont des protéines trans- membranaires qui transfèrent les messages extracellulaires vers le cytoplasme. (Goyffon M, 2010) et (Yang CC, 1974)

2.2.2 Les enzymes

Les enzymes sont des protéines pourvues de propriétés catalytiques et de masse moléculaire plus élevée que les toxines. Les effets pharmacologiques des enzymes sont essentiellement chrono-dépendants, puisqu'ils dépendent plus de la durée du cycle de la réaction enzymatique que de la quantité initiale d'enzymes. L'action enzymatique est caractérisée par une accélération d'un métabolisme particulier. Les venins de Viperidae et de Crotalidae sont, par exemple, particulièrement riches en enzymes. (Chippaux J.P. 2002) et (Yang CC, 1974)

Les enzymes des venins de serpents possèdent des spécificités variables et sont classées en fonction de leur mode d'action :

- **Les phospholipases** : La plupart des venins de serpent contiennent des phospholipases. Ces enzymes hydrolysent les phospholipides libres ou membranaires en acides gras et lysophospholipides.

Les lysophospholipides sont des tensioactifs responsables de destruction cellulaire. Selon le site de l'hydrolyse, on distingue plusieurs types de phospholipases. Dans les venins de serpent, les phospholipases A2 sont très largement majoritaires. Ces phospholipases interviennent sur divers systèmes physiologiques en fonction du type de phospholipides hydrolysés, ce qui entraîne des actions variées. Certaines phospholipases A2 ont pour cible la membrane des hématies conduisant ainsi à une hémolyse. D'autres altèrent les fibres

musculaires striées, provoquant après myolyse, une libération de la myoglobine. **(Goyffon M. 2010), (Yang CC, 1974) et (Kini RM, Evans HJ 1990)**

- **Les acétylcholinestérases** : Sont actives en milieu basique et jouent un rôle essentiel au niveau des synapses en favorisant le passage de l'influx nerveux jusqu'à la membrane postsynaptique. **(Goyffon M. 2010), (Yang CC, 1974) et (Kini RM, Evans HJ 1990)**

- **Les phosphoestérases** : S'attaquent à la liaison entre le ribose ou le désoxyribose et le phosphore. De nombreux venins contiennent des phosphoestérases. Les endonucléases et les exonucléases hydrolysent les acides nucléiques. Enfin, les phosphomonoestérases sont moins spécifiques et hydrolysent tous les mononucléotides, notamment ceux chargés du transport énergétique au niveau cellulaire. **(Goyffon M. 2010), (Yang CC, 1974) et (Kini RM, Evans HJ 1990)**

- **Les L-amino-acide-oxydases** : Après désamination et oxydation, les L-amino-acideoxydases transforment les acides aminés en acide α -cétonique. En raison de leur faible concentration dans les venins, leur effet toxique est négligeable. Le groupement prosthétique flavine-adénine-dinucléotide de ces enzymes donne sa couleur jaune au venin. **(Goyffon M. 2010), (Yang CC, 1974) et (Kini RM, Evans HJ 1990)**

- **Les Hyaluronidases** : Ces enzymes hydrolysent l'acide hyaluronique ou le sulfate de chondroïtine, qui sont des mucopolysaccharides responsables de la cohésion du tissu conjonctif. Les hyaluronidases favorisent par conséquent la diffusion du venin dans les tissus de la victime après son injection. Les Hyaluronidases sont très fréquentes dans la plupart des venins. **(Goyffon M. 2010), (Yang CC, 1974) et (Kini RM, Evans HJ 1990)**

- **Les protéases** : Les protéases agissent sur la structure des protéines. Elles interviennent aussi bien sur les destructions tissulaires observées au cours des nécroses locales, que lors de phénomènes comme les troubles de l'hémostase. On classe les protéases agissant sur la coagulation sanguine en deux groupes structuraux :

- les sérine-protéases, qui agissent en stimulant la formation de caillots, le plus souvent des micro-caillots. **(Goyffon M. 2010), (Yang CC, 1974) et (Kini RM, Evans HJ 1990)**

- les métalloprotéases, qui s'attaquent plus spécialement à l'endothélium des capillaires d'où le nom d'hémorragine donné à quelques-unes d'entre elles. La conjugaison de ces deux actions est à l'origine d'hémorragies externes ou internes redoutables.

- **Les enzymes lytiques** : On trouve également dans les venins de serpent de l'amylase en faible quantité, des transaminases et des déshydrogénases, dont les effets toxiques sont négligeables en pathologie humaine. **(Goyffon M. 2010), (Yang CC, 1974) et (Kini RM,**

Evans HJ 1990)

2.2.3 Les autres composants

Des substances sans effet toxique connu ont été identifiées dans les venins de serpents :

- **Les amines simples ou polyaminiques** : Tous les venins contiennent des amines biogènes (adrénaline et noradrénaline, dopamine, histamine, sérotonine...) qui possèdent des effets physiologiques connus de longue date, dont le rôle dans la toxicité des venins n'est pas encore établi.

- **Le facteur de croissance des nerfs** ou nerve growth factor (NGF) : Favorise la différenciation des neurones sensoriels des ganglions sympathiques. Celui-ci est dépourvu d'activité enzymatique et sa toxicité est nulle. Le facteur de croissance des nerfs est présent essentiellement dans le venin des Elapidae.

- **Les protéines actives sur les thrombocytes** : De nombreuses molécules de masse moléculaire et de structure très variables interviennent sur les plaquettes sanguines ou thrombocytes. Elles masquent les sites effecteurs de la membrane cytoplasmique ou stimulent la dégranulation du thrombocyte.

- **Les inhibiteurs et activateurs enzymatiques** : Plusieurs molécules présentent une activité spécifique sur certaines enzymes naturelles des vertébrés. Ces protéines sont généralement dépourvues d'effets toxiques et cliniques

- **Les facteurs du venin de cobra** : Les venins de cobra contiennent un facteur de croissance des tissus nerveux, le NGF (nerve growth factor), et un CVF (cobra venom factor) qui active le complément impliqué dans l'immunité antibactérienne.

- **Les dendropeptides** : Les dendropeptides, par leurs structures et leurs propriétés, font parties de la famille des facteurs cardiaques natriurétiques. Ces peptides jouent un rôle hormonal dans l'excrétion rénale et la régulation de la pression artérielle. **(Goyffon M. 2010), (Yang CC, 1974)**

2.3 La variabilité des venins

La variabilité du venin a été déclarée depuis l'antiquité en se basant sur le tableau clinique, puis, plus récemment, sur des preuves expérimentales.

Elle a été largement confirmée par des techniques immunologiques et biochimiques. **(Chippaux J.P. 2002)**

La variabilité du venin se présente sous deux aspects :

2.3.1 La variabilité spécifique

La variabilité a été observée à deux niveaux :

-Entre les différentes familles d'ophidiens qui est, comme nous l'avons vu, extrêmement importante. Les venins d'Elapidae sont riches en toxines ayant un fort tropisme neuro-musculaire ; les venins de Viperidae possèdent un arsenal d'enzymes complexes agissant sur de nombreux systèmes, notamment la coagulation.

- Entre les différents genres, entre lesquels il existe certes une grande communauté de structures chimiques, mais où l'on peut observer néanmoins d'importantes différences biochimiques et immunologiques. Aux niveaux spécifique ou sub-spécifique, la similitude entre les venins est encore plus forte. On peut qualifier cette variabilité de phylogénique.

(Chippaux J.P. 2002)

2.3.2 Variations ontogéniques et environnementales

À l'intérieur d'une même population, voire au sein d'une fratrie, nous retrouvons encore des variations importantes du venin dont l'origine génétique a été confirmée depuis une vingtaine d'années. Lorsque l'on analyse la composition du venin d'un individu au cours de son existence, on constate qu'il existe une grande stabilité biochimique. Certains auteurs ont toutefois décrit des variations significatives du venin prélevé chez un même individu à différentes périodes de son existence. Il a été montré, chez un même spécimen de *Crotalus atrox*, une variation de toxicité en fonction de l'âge. Le venin des jeunes *Bothrops jararaca* présente une toxicité plus élevée pour les batraciens que celui des adultes, ce qui s'accorde avec le fait que les jeunes *B. jararaca* sont batrachophages ou sauriphages, et pas les adultes. Ce phénomène n'est pas observé avec *B. alternatus*, qui est mammalophage à tous les âges.

Certaines protéines apparaissent, disparaissent ou se modifient au cours de la vie, notamment chez un même individu, ce qui induit des différences entre le venin synthétisé à la naissance et celui synthétisé à l'âge adulte. Chez certaines espèces, le potentiel enzymatique semble se développer au cours de la croissance puis se réduire lors de la sénescence. La fonction digestive est sans doute plus utile chez les adultes, qui avalent de plus grosses proies, que chez les juvéniles. En revanche, chez ces derniers, ce sont les fonctions d'immobilisation et de toxicité immédiate qui doivent être privilégiées pour

capturer et immobiliser rapidement la proie. Il n'en reste pas moins que certaines observations, comme l'importante variation d'activités enzymatiques observée chez un spécimen de *Pseudonaja textilis* au cours de l'année, ne trouvent pas d'explication. **(Chippaux J.P. 2002)**

Cependant, le régime alimentaire ne modifie pas la composition du venin, pas plus que le rythme des saisons, ni même, comme on l'a suggéré, les facteurs physiologiques importants comme la reproduction ou l'hibernation.

(Chippaux J.P. 2002)

2.4 Le mode d'action des venins

La toxicité du venin est accentuée lorsque ses composants agissent ensemble durant les phénomènes de synergie et de potentialisation. Une meilleure connaissance de ces mécanismes, et l'étude toxicocinétique des venins permettent aujourd'hui de comprendre et d'anticiper les nombreux symptômes pouvant apparaître après une envenimation.

2.4.1 Les phénomènes de synergie et de potentialisation

Certains venins contiennent des molécules qui ont la particularité d'additionner leurs effets. Ce phénomène de synergie aggrave le tableau clinique en cumulant les effets toxiques. **(GOYFFON, Max 2012)**

De plus, l'association d'actions de divers composants du venin amplifie les effets de l'un ou plusieurs d'entre eux, c'est le phénomène de potentialisation. Ainsi, les venins de Viperidae contiennent des protéines aux activités en apparence antagonistes mais qui sont, en réalité, complémentaires. Des protéases à l'activité dite pro coagulante sur les protéines de la coagulation de la proie, peuvent notamment cohabiter dans le venin avec un activateur de plasminogène. Celui-ci est alors transformé, par les protéases, en plasmine qui lyse les caillots en formation. L'objectif de cette potentialisation est la consommation rapide de l'ensemble des protéines intervenant dans la coagulation, rendant le sang de la victime incoagulable avec un risque d'hémorragies spontanées élevé. De cette façon, les Viperidae immobilisent leurs proies par paralysie ou collapsus vasculaire et par choc hémorragique. **(GOYFFON, Max 2012)**

2.4.2 La toxicocinétique des venins

Après inoculation du venin, les composants de faible masse moléculaire, tels que les toxines des venins d'Elapidae, sont rapidement absorbées dans la circulation sanguine. Ces composants sont ensuite distribués en quelques heures, vraisemblablement par voie lymphatique, aux espaces extravasculaires où se trouvent leurs cibles d'action. **(OMS, 2018), (GOYFFON, Max 2012), (Chippaux J.P.2002) et (Chippaux J.P. 2013)**

La situation est différente pour les constituants de masse moléculaire plus élevée, comme les enzymes des venins de Viperidae et de Crotalidae. En effet, la plupart de ces molécules agissant au niveau vasculaire, plusieurs jours leur sont nécessaires pour rejoindre les espaces extravasculaires. **(OMS, 2018), (GOYFFON, Max 2012), (Chippaux J.P.2002) et (Chippaux J.P. 2013)**

L'apparition plus ou moins rapide des signes cliniques après une morsure est en partie fonction des vitesses d'absorption et de distribution des composants toxiques des venins. **(OMS), (GOYFFON, Max 2012), (Chippaux J.P.2002) et (Chippaux J.P. 2013)**

L'élimination du venin s'effectue en quelques jours, essentiellement par voie rénale. Toutefois, lors de certaines envenimations, une fraction variable du venin pourrait se fixer sur les cellules autour de la morsure ou continuer de circuler dans le système lymphatique. Cette hypothèse conduirait à une libération progressive et une recirculation du venin dans l'organisme, qui expliquerait les rechutes cliniques fréquentes observées jusqu'à 10 jours après la morsure. **(OMS,2018), (GOYFFON, Max 2012), (Chippaux J.P.2002) et (Chippaux J.P. 2013)**

2.5 La symptomatologie des envenimations

2.5.1 Le syndrome Vipérin

Le syndrome vipérin associe douleurs, œdème, troubles cutanés et nécrose ; les troubles hématologiques sont présents le plus souvent **(Bochner R., Goyffon M 2007)**. La douleur est immédiate, toujours vive, transfixiante, parfois syncopale, irradiant vers la racine des membres et précède les autres symptômes inflammatoires. L'œdème apparaît moins d'une demi-heure après la morsure, c'est le premier signe objectif d'envenimation. C'est un œdème volumineux, dur et tendu qui s'étend le long du membre mordu au fil du temps au cours des premières heures pour se stabiliser en 2 ou 6 heures pour décroître très lentement **(Bochner R., Goyffon M 2007)**.

Les morsures de vipères et de crotales se manifestent par un syndrome hémorragique, que celui-ci soit primitif cas le plus rare ou qu'il succède à un syndrome thrombotique patent ou passé inaperçu en raison du caractère instable du caillot. La victime présente une hémorragie discrète et permanente par les perforations provoquées par les crochets venimeux à son admission. Le saignement peut apparaître à distance de la morsure, au niveau d'une plaie récente occasionnée par une manœuvre à visée thérapeutique, comme des scarifications, des incisions ou le débridement d'un œdème volumineux. La plaie peut également être spontanée et résulter d'une brutale augmentation de volume des téguments qui se distendent et se fissurent **(Bochner R., Goyffon M 2007)**. A un stade plus avancé, les saignements peuvent survenir sur une ancienne cicatrice de plaie réputée guérie. Enfin les hémorragies se manifestent sur une muqueuse ou une peau saine, non lésée auparavant. Le défaut de coagulation va provoquer l'extravasation, ce qui se traduira par un purpura, des épistaxis, des gingivorragies, des hémoptysies, des hématuries ou des méléna, voir des hémorragies cérébrales ou viscérales profondes. L'évolution vers une anémie sévère ou un choc hypo volumique peut entraîner la mort du patient en quelques jours **(Bochner R., Goyffon M 2007)**. Les troubles cutanés sont essentiellement liés à l'importance de l'œdème et à l'existence d'un syndrome hémorragique. La peau perd son élasticité, tend et craquelle entraînant des fissures généralement superficielles mais sources de surinfection et d'hémorragie. Les autres signes hémorragiques (ecchymoses, pétéchie, purpura, phlyctène) apparaissent plus tardivement (figure 5) **(J-P Chippaux,2015)**

La nécrose est progressive, débutant par un point noir qui peut être visible une heure après la morsure, l'extension se fait à la fois au niveau des plans superficiels et profonds **(J-P Chippaux,2015)**

La nécrose est cotée du stade 0 au stade 3 :

-Stade 0 : Pas de nécrose.

-Stade 1 : Nécrose cutanée.

-Stade 2 : Atteinte du tissu musculaire

-Stade3 : Atteinte du tissu musculaire et tendineux **(Reimann F, 2011)**. En l'absence de surinfection qui pourrait évoluer vers une gangrène, la zone nécrosée se dessèche et se momifie. **(J-P Chippaux,2015)**



Figure 5: Patient souffrant du syndrome Vipérin (J-P Chippeaux,2013)

2.5.2 Le syndrome Cobraïque :

L'envenimation cobraïque est d'invasion rapide. Après un cortège de paresthésies partant de la morsure et irradiant vers le tronc et la tête, essentiellement sensorielles (anesthésie, picotement, fourmillements, frissons) et peu accessibles à l'examen objectif, le premier symptôme nettement visible est la ptose palpébrale bilatérale (paralysie flasque qui débute par les muscles de la face) et symétrique. Presque simultanément, on observe l'apparition d'un trismus. Le patient perd lentement toute possibilité de communication, la voix s'enroule puis s'éteint. Cette paralysie s'étend aux muscles des membres comme présentée sur la (figure 6). L'hypotension, qui évolue parfois vers un état de choc, est nette. Des troubles digestifs peuvent apparaître 30 minutes après (douleurs épigastriques, vomissements, hypersalivation, sueurs profuses). La dyspnée apparaît ainsi qu'une somnolence, la victime donne l'expression d'être comateux mais il est conscient. Le décès survient rapidement par asphyxie **(Bochner R., Goyffon M 2007)**. L'évolution vers le stade terminal peut s'étendre de deux à dix heures de temps selon la quantité de venin injectée et la taille de la victime. Ce syndrome ne s'accompagne d'aucune lésion neuromusculaire ou cérébrale.

Le coma terminal est un coma calme au cours duquel la conscience n'est jamais altérée et qui n'est que la traduction de la paralysie motrice sans atteinte sensorielle. **(Bochner R., Goyffon M 2007)**.



Figure 6: Patient souffrant du syndrome Cobraïque (OMS,2017)

2.5.3 L'atteinte des autres fonctions

D'autres atteintes plus ou moins spécifiques sont possibles :

- **Une atteinte cardiovasculaire** : Cette atteinte moins spécifique constitue toute la gravité immédiate d'une envenimation.
- **Une atteinte oculaire** : Les cobras cracheurs sont capables de projeter leur venin jusqu'à 3 mètres en visant les yeux de leur proie.
- **Une atteinte musculaire** : L'apparition d'une rhabdomyolyse est caractéristique des Elapidae marins que l'on rencontre du golfe arabe et le nord de l'océan Indien jusqu'au Japon.
- **Une atteinte digestive** : déclenchant diarrhée et vomissements non spécifiques.
- **Une atteinte respiratoire** : avec des œdèmes glottiques ou pulmonaires et des dyspnées asthmatiformes.
- **Une atteinte générale** : souvent causée par une hyperleucocytose accompagnée d'une éosinophilie, et parfois d'une adéno-splénomégalie. (G. Mion, *et al*, 2002) et (Larréché S, *et al*, 2010)

3 L'évolution et les mécanismes de la sérothérapie antivenimeuse

De nombreuses avancées ont été faites depuis le premier succès de la sérothérapie antivenimeuse (SAV) qui date depuis plus d'un siècle. Ces nouvelles connaissances ont permis de comprendre précisément les mécanismes immunitaires entrant en jeu dans la sérothérapie antivenimeuse (SAV). (Chippaux J-P, Goyffon M ; 1998)

3.1 L'évolution de la sérothérapie antivenimeuse

L'efficacité des premiers SAO, quoique significative, nécessitait des doses relativement importantes, ce qui était à la fois coûteux en produit et dangereux pour l'homme à cause des risques d'intolérance aux protéines d'animaux. Les découvertes scientifiques successives ont conduit à la production de nouvelles générations de SAO dotés d'une tolérance et d'une efficacité accrues. (Chippaux J-P, Goyffon M ; 1998)

Tableau 1: Evolution de la fabrication des antivenins depuis leur decouverte (J-P Chippeau,2010)

Date	Intervention	Produit obtenu	Bénéfices
1894	Décantation/centrifugation	Sérum antivenimeux (1 ^{re} génération)	Traitement étiologique des envenimations
1930	Précipitation par le sulfate d'ammonium	IgG totale (2 ^e génération)	Concentration du principe actif
1936	Digestion enzymatique	Fragments d'IgG (3 ^e génération)	Amélioration de la tolérance
1970	Ultrafiltration – dialyse	Fragments purifiés (4 ^e génération)	Amélioration de la tolérance
1990	Lyophilisation	Fragments purifiés (4 ^e génération)	Amélioration de la stabilité et de la conservation
2000	Immunisation avec fractions toxiques ou toxines recombinantes	Fragments purifiés (5 ^e génération)	Amélioration de l'immunisation

3.1.1 Les découvertes scientifiques majeures

Trois principales découvertes scientifiques ont eu un impact sur la production des SAO au 20^{ème} siècle.

3.1.1.1 L'interaction antigène-anticorps

En 1897, Paul Ehrlich (1854-1915), introduit le terme générique d'anticorps et développe une théorie sur la réponse immunitaire centrée sur l'interaction entre les antigènes et les anticorps. Par la suite, les anticorps seront identifiés comme étant les molécules actives responsables de l'action thérapeutique des sérums antivenimeux. Des techniques de détection et de dosages voient rapidement le jour dans tous les laboratoires de sérothérapie. Il fallut attendre 1958 pour que Porter élucide la structure des anticorps, ce qui lui valut le prix Nobel de médecine en 1972. (Daguet A, Watier H 2012)

3.1.1.2 L'intérêt des adjuvants

C'est Gaston Ramon vétérinaire et biologiste qui, en 1925, instaure le principe des substances adjuvantes et les protocoles d'immunisation des animaux, des techniques qui ont permis d'obtenir des sérums plus riches en antitoxines en joignant au vaccin une substance irritante pour les tissus.

En effet, il démontre que l'addition d'un adjuvant au mélange de toxine atténuée provoque une réaction inflammatoire locale qui favorise la réponse immunitaire de l'animal, et un taux d'anticorps plus élevé dans son sérum. Aujourd'hui encore, les techniques d'immunisation emploient des adjuvants de nature variée dont le fonctionnement commence seulement à être compris. **(GOYFFON, Max 2012)**

3.1.1.3 La spécificité des sérums antivenimeux

Albert Calmette crut longtemps, à tort, que son sérum anticobraïque avait un pouvoir curatif universel vis-à-vis de toutes les envenimations ophidiennes. Dès la fin du 19ème siècle, il apparut que les venins des serpents brésiliens et australiens notamment, n'étaient pas neutralisés par le sérum de Calmette. Cette inefficacité fût expliquée et démontrée par la variabilité de la composition des venins abordée plus haut. La principale contrainte qui découle de cette spécificité est la nécessité de multiplier les SAO en fonction des espèces. **(CHIPPAUX, J-P2002), (Chippaux JP *et al*, 1991) et (Gutiérrez JM, *et al*. 2009)**

3.1.2 Les nouvelles générations de sérums antivenimeux

C'est en 1932, Felton montra que l'on pouvait concentrer les sérums thérapeutiques en précipitant la fraction globulinique à l'aide du sulfate d'ammonium. Elle consiste à séparer l'albumine sérique qui n'intervient pas dans le pouvoir curatif des SAO, mais qui peut au contraire déclencher de sérieuses intolérances allant jusqu'au choc anaphylactique. La préparation obtenue est à la fois plus concentrée en anticorps et bien mieux tolérée. **(GOYFFON, Max 2012) et (Chippaux J.P. 2013)**

Le deuxième progrès d'importance est le développement, par Pope en 1936, des méthodes de clivage des anticorps par la pepsine puis la papaïne. **(Daguet A, Watier H 2012)** Ce procédé révolutionnaire entraîne l'obtention des fragments d'anticorps relativement plus actifs et surtout mieux tolérés. **(Chippaux J-P, Goyffon M. 1998) (Chippaux J.P. 2013)**

A partir des années 70, de nouvelles techniques de purification plus poussées, à laquelle

s'ajoutent des procédures de stérilisation microbiologique rigoureuses, renforcent considérablement la sécurité d'emploi des SAO.

3.2 Les mécanismes de la sérothérapie antivenimeuse

La production des SAO et la SAV est basé sur l'association antigène-anticorps, et font intervenir respectivement l'hyper-immunisation de l'animal donneur et l'immunisation artificielle passive du patient

3.2.1 La structure des antigènes

Sur le plan structural, les antigènes sont constitués d'un ensemble de motifs moléculaires de dimensions limitées, distincts les uns des autres, parfois identiques ou en partie similaires. Ces motifs, appelées épitopes, sont spécifiques à chaque antigène et sont directement impliquées dans les liaisons aux cellules de l'immunité. **(Thomas J. Kindt *et al.* .2017)**

Les toxines et les enzymes sont les constituants protéiques toxiques en quantités les plus importantes dans le venin de serpent. Or, les produits de dégradation des enzymes, dont résulte la toxicité, sont en général dépourvus de propriété immunogène, c'est-à-dire dans l'incapacité d'induire une réaction immunitaire spécifique. C'est pourquoi les toxines sont considérées comme les principaux antigènes du venin de serpent.

Il existe plusieurs sites antigéniques sur une immunoglobuline avec les différents niveaux de spécificité suivants :

Isotypique : Les isotopes sont spécifiques dans une l'espèce donnée, ils sont identiques chez chacun d'entre nous.

Les classes et les sous-classes d'immunoglobuline peuvent lier un même antigène au niveau d'un même épitope et possèdent des caractères propres à l'espèce.

Allotypique: Les allotypes sont déterminés par l'ordre d'acide aminé et la structure tridimensionnelle correspondante de la région constante de la molécule d'immunoglobuline. Les allotypes reflètent des différences génétiques au sein d'une même espèce.

Idiotypique : L'idiotype de l'anticorps implique les parties variables des chaînes lourdes et des chaînes légères. **(Anonyme 3)**

3.2.2 La structure des anticorps

Les anticorps sont les glycoprotéines multimériques circulant dans le milieu intérieur et capables de se lier à leur antigène spécifique. Les anticorps sont composés de quatre chaînes

polypeptidiques, deux chaînes lourdes et deux chaînes légères identiques, représentées sur la (figure 7). Les chaînes lourdes sont reliées entre elles et aux chaînes légères par des ponts disulfures. Chaque chaîne possède une région constante, une région variable et une région hypervariable. Les régions hypervariables ou paratopes, constituent deux sites de liaison à l'épitote d'un antigène et sont responsables de la spécificité de l'anticorps à l'antigène. **(Thomas J. et al,2017)**

En outre, chaque anticorps est constitué de deux parties appelées fragment cristallisable (Fc) et fragment antigen binding (Fab). Le fragment Fc comprend le site de liaison des cellules phagocytaires. **(Thomas J. et al .2017)**

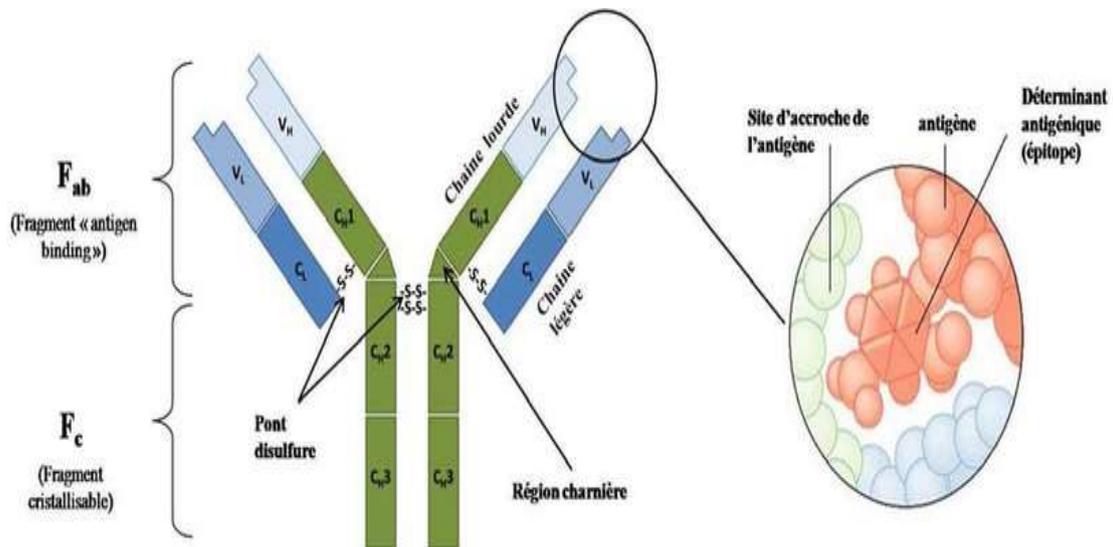


Figure 7: Schéma de structure d'un anticorps (Anonyme 3)

3.2.3 L'hyper-immunisation de l'animal

L'hyper-immunisation de l'animal est le procédé par lequel des doses croissantes de venin(s) sélectionné(s) sont injectés à l'animal, après une possible atténuation, afin de provoquer chez lui une réaction immunitaire spécifique contre ce ou ces venin(s). L'hyper-immunisation est une étape cruciale qui entraîne l'obtention d'un titre élevé en anticorps dans le sang de l'animal pour la production d'un SAO. **(OMS,2018)**

Par ailleurs, une toxine pouvant être multiépitopique ou un venin pouvant contenir de nombreuses familles de toxines, celles-ci induisent la sécrétion d'anticorps différents. Pour cette raison, la réponse immunitaire suivant l'inoculation de venin sera qualifiée de polyclonale. Il en découle que les anticorps présents dans un SAO seront variés, hétérogènes et tous spécifiques d'un épitote d'une toxine donnée. **(Thomas J. et al .2017)**

3.2.4 Immunisation artificielle passive du patient

L'immunité humorale peut être transférée passivement d'un animal immunisé contre une toxine donnée, à un homme non immunisé par injection de SAV, contenant les anticorps spécifiques contre cette toxine. Les anticorps responsables de la neutralisation de cette toxine sont les immunoglobulines G (IgG), qui sont majoritaires dans le sang et les liquides extracellulaires. Les IgG sont des glycoprotéines, de masse moléculaire d'environ 150 000 daltons, douées d'une fonction d'anticorps. Ce sont donc principalement ces molécules que l'on va chercher à extraire et isoler du sérum des animaux immunisés. **(Lambin P, 1989)**

Après purification, les IgG sont injectées aux patients envenimés pour les immuniser contre les toxines impliquées. Les IgG jouent des rôles multiples dans l'élimination des toxines du venin. Les IgG se lient tout d'abord aux toxines circulantes par leur paratope pour les neutraliser, donnant des complexes immun toxines-IgG.

Les IgG, par leur fragment Fc peuvent aussi recruter le complément, ou activer des cellules de l'immunité telles que des phagocytes ou des granulocytes. La liaison du fragment Fc au récepteur d'un phagocyte facilite l'internalisation et la destruction des toxines via le phénomène d'opsonisation. De même, la liaison des fragments Fc des IgG aux granulocytes favorise leur dégranulation, et déclenche des réponses antimicrobiennes puissantes comprenant l'élimination des complexes immuns. **(Leo O, et al 2011)**

L'immunité apportée par la sérothérapie est une immunité artificielle et passive. C'est pourquoi, contrairement à la vaccination, la SAV a une action immédiate mais courte, qui ne protégera pas le patient lors d'une prochaine envenimation. **(Leo O,et al, 2011)**

CHAPITRE II : L'élaboration du sérum antivenimeux ophidien

Chapitre II : L'élaboration du sérum antivenimeux ophidien

Les premiers travaux de recherche antivenimeux sont présentés à la société de biologie en 1894 par deux français **Césaire Phisalix** et **Gabriel Bertrand**.

Un médecin et bactériologiste français **Albert Calmette** va créer en 1895 le premier sérum antivenimeux pour traiter universel sur toutes les morsures de serpent, ce qui sera contre-prouvé quelques années plus tard par le docteur Brésilien Vital **Brazil** : pour lui aucun doute, il faut un anti-venin pour quasiment chaque espèce venimeuse. (**J-P Chippaux ,2002**)

Elaborer des sérums antivenimeux n'est pas sans danger. Le venin des serpents doit être prélevé directement dans les crochets de l'animal seul des professionnels aguerries peuvent s'y risquer.

La production de SAO doit respecter les principales qualités essentielles de façon à obtenir des produits de qualité, de sécurité et d'efficacité constante. Toutes les opérations doivent être effectuées par du personnel qualifié, dans des locaux et avec du matériel approprié. Le contrôle des risques microbiologique et l'existence d'un système de documentation qui assure la traçabilité de toutes les étapes de la production sont particulièrement importants. (**OMS ,2018**)

1 Préparation des venins de serpents

La sélection, des serpents, le prélèvement, le traitement, le stockage et le contrôle de qualité de ces venins sont essentiels pour la production de SAO répondant aux exigences de qualité et d'efficacité.

1.1 La sélection des serpents venimeux

Pour fabriquer des SAO appropriés, une sélection des espèces venimeuse par pays ou région est faite puis des serpents pour chaque espèce. Mais avant d'entreprendre la sélection des spécimens, le choix de produire un sérum monospécifique ou polyspécifique doit être fait.

Le choix de l'un ou de l'autre type dépend de nombreuses considérations. En principe un

sérum antivenimeux monovalent est plus efficace pour traiter l'envenimation par l'espèce correspondante mais ce n'est pas une règle absolue. Un antigène toxique présent en faible quantité dans le venin de *Dendroaspis angusticeps* n'immunise pas les chevaux tandis qu'un antigène voisin abondant chez *D. jamesoni* protège les chevaux contre l'antigène de *D. angusticeps*. En conséquence, le sérum polyvalent *angusticeps-jamesoni* se révèle plus efficace contre le venin de *D. angusticeps* que le monovalent *angusticeps*. Tout se passe comme si des antigènes proches agissaient en synergie pour conduire à une meilleure réponse immunologique. (J-P Chippaux ,2002)

1.1.1 Le choix d'un sérum monospécifique ou polyspécifique

Les anti-venins monospécifiques sont fabriqués avec des venins d'une seule espèce de serpent venimeux, et leur efficacité est largement limitée à cette espèce de serpent. Ces conditions s'appliquent dans les zones où :

- Il n'y a qu'une seule espèce d'importance médicale ;
- Un simple test sanguin, adapté à une utilisation même dans les centres de santé manquant de ressources, peut définir les espèces piqueuses ;
- Une approche algorithmique simple permet de déduire l'espèce à partir du schéma des caractéristiques cliniques et biologiques ;
- Il existe un test immunodiagnostic rapide fiable et abordable, facilement disponible, permettant d'identifier les toxines sans ambiguïté.

Les anti-venins monospécifiques peuvent être efficaces dans le traitement de l'envenimation par quelques espèces étroitement apparentées dont les venins présentent une neutralisation croisée cliniquement efficace mais cela nécessite une confirmation préclinique et clinique. (OMS 2016)

Lorsque la reconnaissance de l'espèce de serpent responsable n'est pas sûre, il est fortement recommandé de produire un SAO polyspécifique efficace contre les venins de plusieurs espèces de serpents présents dans la zone géographique. Un tel sérum est préparé soit en mélangeant des SAO monospécifiques, soit en hyper-immunisant des animaux avec un pool de venins de diverses espèces de serpents.

1.1.2 La sélection des espèces venimeuses par pays ou région

Les pools de venins utilisés pour la production de SAO doivent être spécifiques pour chaque pays ou région où le sérum sera administré. (Chippaux JP *et al*, 1991)

La sélection d'une espèce de serpent en tant que candidate pour la production de SAO est

basée sur divers critères, dont les deux principaux sont sa répartition géographique, et sa responsabilité dans les envenimations de sa région.

1.1.3 La sélection des serpents pour chaque espèce venimeuse

En raison des variations ontogéniques et environnementales des venins de serpents au sein d'une même espèce, il est impératif que le pool de venins destiné à la fabrication de SAO mono ou polyspécifique soit représentatif de l'espèce. Pour cela, le pool doit être obtenu à partir d'un nombre relativement important de spécimens, généralement entre 20 et 50 serpents d'âge et de sexe différents, prélevés dans diverses régions au sein de l'aire de répartition de l'espèce. **(Chippaux JP *et al*, 1991)**

De ce fait, la connaissance des variations ontogéniques et environnementales des venins de serpents d'une même espèce est nécessaire pour la sélection des localités spécifiques où les spécimens doivent être recueillis. **(Theakston RDG *et al*, 2003)**

1.2 Préparation et stockage des venins

Les préparations de venin, matière première dont il faut assurer la qualité, sont utilisées à la fois pour immuniser les animaux, dans le cadre de production de sérum antivenimeux, et pour fournir des échantillons de venin de référence pour l'évaluation de routine. **(OMS, 2016)**

Les venins utilisés pour la fabrication des SAO doivent être représentatifs de la population de serpents vivant dans la zone où l'anti-venin doit être utilisé et il faut tenir compte de la variabilité de la composition du venin au sein d'une même espèce. Il faudrait également envisager d'inclure le venin de serpents juvéniles ou subadultes dans ces pools de venin car il existe de solide preuve de variation de venin liée à l'âge au sein des spécimens et des populations. **(OMS, 2016)**

1.2.1 Elevage de serpents

L'entretien d'un serpentarium et la manipulation des serpents utilisés pour la production de sérum antivenimeux doit être conforme aux principes des systèmes de qualité.

Les nouveaux arrivés doivent être mis en quarantaine pendant au moins deux mois dans une « chambre de quarantaine » qui doit être située le plus loin de la « la chambre de production » et doivent être examinés par un vétérinaire spécialiste.

1.2.2 Le prélèvement du venin

Selon les espèces, l'intervalle entre les prélèvements de venin varie de toutes les deux semaines à tous les trois mois, sauf pour les spécimens en quarantaine ou en cours de traitement. (OMS 2016)

Le venin est obtenu par pression manuelle de la tête du serpent tel que présenté sur la **figure (8)** ou plus rarement par une brève stimulation électrique des glandes à venins combinée à une anesthésie du serpent. Le matériel utilisé doit être approprié pour provoquer le moins de stress possible pour l'animal tout en assurant la sécurité de l'opérateur. (Goyffon M, 2010) (J-P Chippeaux, 2002)



Figure 8: Prélèvement de venin de serpent (Anonyme 4)

1.2.3 Le traitement et stockage du venin

Plusieurs serpents du même groupe (mêmes espèces et sous-espèces collectées en même temps dans la même zone) peuvent être traités dans le même récipient de collecte de venin. Le récipient doit être conservé dans un bain de glace entre les extractions individuelles, et le venin aliquoté dans des tubes / flacons de stockage étiquetés est surgelé à -20°C ou plus froid en 1 heure.

Pour les venins à forte activité protéolytique, le pool de venins collecté doit être transféré dans un flacon maintenu à une température ultra-basse (-70 à -80°C) ou au moins -20°C , toutes les 10-30 minutes, avant de poursuivre les extractions de ce groupe de spécimens. Une autre méthode consiste à transférer le venin collecté dans un flacon maintenu dans un bain de glace. La centrifugation réfrigérée du venin fraîchement collecté est recommandée,

par exemple à 1000 g pendant 5 minutes (4°C), pour éliminer les débris cellulaires. **(OMS,2016)**

Lors de la préparation des pools de venins, ceux-ci sont décongelés, homogénéisés et desséchés sous vide ou lyophilisés, afin de pouvoir être conservés à basse température pendant des dizaines d'années. Si ces étapes ne sont pas réalisées correctement, les protéines du venin sont rapidement dégradées ou dénaturées. Le stockage des venins desséchés ou lyophilisés durant de longues périodes entraîne un risque d'hydratation, avec une altération significative de la qualité du venin. **(Gutiérrez JM, Lomonte *et al.*2009)**

1.3 Le contrôle de qualité du venin

Pour chaque lot de venin, il est de la responsabilité du fournisseur de mettre à disposition du producteur de SAO, et de toute autorité si nécessaire, un certificat indiquant les informations clés de traçabilité du lot. **(OMS,2018)**

En plus du certificat, le fournisseur de venin peut effectuer des tests biochimiques et pharmacologiques supplémentaires sur chaque lot, pour détecter la dégradation des protéines par l'apparition de nouveaux composants. Ces analyses peuvent être réalisées en parallèle de tests toxicologiques et fonctionnels tels que la détermination de la dose létale médiane ou la quantification des activités enzymatiques. Si le fournisseur de venin n'est pas en mesure d'effectuer ces analyses, celles-ci peuvent être sous-traitées ou, en fonction de l'accord, être opérées par le fabricant lui-même. **(Gutiérrez JM *et al.* 2009)**

2 L'hyper-immunisation des animaux

La préparation de la solution de venin servant à l'hyper-immunisation des animaux et son association à un adjuvant sont des étapes décisives dans la fabrication des SAO. De même, la sélection des animaux donneurs et le protocole d'hyper-immunisation doivent être réalisés avec soin.

2.1 La préparation de la solution du venin

La qualité de la solution de venin de serpent utilisée pour l'hyper-immunisation des animaux, c'est à dire la solution d'antigènes, revêt une importance capitale. En effet, pour ne pas nuire au bien-être et à la santé de l'animal, celle-ci doit être ajustée à pH physiologique et exempt de tout micro-organismes et pyrogènes. Cette solution doit être

préparée de façon à minimiser la dénaturation des protéines du venin, afin de déclencher une réponse immunitaire acceptable chez l'animal. (OMS,2018, Pratanaphon R *et al*, 1997)

La préparation d'antigènes est obtenue par dissolution du ou des venin(s) lyophilisé(s) dans de l'eau physiologique ou dans une solution saline tamponnée au phosphate, avant d'être centrifugée pour élimination des impuretés. La préparation est ensuite stérilisée par filtration à travers une membrane 0,22 µm, aliquotée et stockée entre -15 et -20 ° C dans des flacons stériles identifiés. Pour minimiser l'infection au niveau des sites d'injection, il est nécessaire que toutes ces manipulations soient réalisées dans des conditions aseptiques. (Pratanaphon R *et al*, 1997)

L'inoculation du venin brut est souvent mal tolérée par l'animal receveur. Aussi a-t-on été conduit à préparer un anavenin en détoxifiant le venin tout en lui conservant ses propriétés immunologiques.

Depuis la préparation des premiers sérums antivenimeux, les techniques proposées pour détoxifier le venin ont été nombreuses. Les plus usuelles sont les combinaisons avec des aldéhydes : formol, proposé par Ramon dès 1924, ou glutaraldéhyde. (J-P Chippeaux, 2002)

2.2 L'emploi d'un adjuvant

Détoxifié ou non, le venin est souvent associé à un adjuvant. Le rôle précis de l'adjuvant n'est pas élucidé, mais on pense qu'il ralentit la résorption du venin et qu'il stimule puissamment la réaction immunitaire. Les plus courants sont l'adjuvant de Freund, la bentonite, l'hydroxyde d'aluminium, l'alginate de sodium. (J-P Chippeaux, 2002)

Le choix de l'adjuvant est déterminé par son efficacité, ses effets secondaires, sa facilité de préparation, notamment à grande échelle, et son coût. Il peut varier en fonction du type de venins et de l'expérience des fabricants. L'adjuvant incomplet de Freund (FIA) contient de l'huile minérale et un émulsifiant. (OMS, 2016)

L'adjuvant complet de Freund (FCA), qui contient de l'huile minérale, un émulsifiant et *Mycobacterium tuberculosis* inactivé, a été montré chez les animaux de laboratoire comme l'un des adjuvants les plus puissants connus. Cependant, les chevaux sont assez sensibles au FCA qui a tendance à provoquer la formation de granulomes. Pour cette raison, certains producteurs préfèrent utiliser d'autres adjuvants. Il est recommandé que lors de l'utilisation de FCA et FIA qu'ils ne soient utilisés qu'au début du calendrier de vaccination, et non

pendant le reste de la vaccination, ni pendant les injections de rappel de venin ; cela réduit considérablement la formation de granulomes chez les chevaux. **(Reed, S.G., et al. 2016).**

2.3 La sélection des animaux

De nombreuses espèces animales ont été utilisées à différentes échelles dans la production de sérum antivenimeux (cheval, mouton, âne, chèvre et lapin) ou à des fins expérimentales (chameau, lama, chien et poule). **(Landon, J. et al 1995) et (Landon, J. and D. Smith, 2003)**

Cependant, la production de grands volumes d'anti-venin à partir de grands animaux tels que les équidés est un avantage par rapport aux espèces plus petites. La sélection des espèces animales doit être basée sur plusieurs considérations, telles que les maladies localement répandues, la disponibilité, la région, l'adaptation à l'environnement local et coût de maintenance. Les informations contenues dans ces directives se réfèrent principalement aux immunoglobulines dérivées du cheval.

Le cheval est l'animal de choix pour la production commerciale de sérum antivenimeux. Les chevaux sont dociles, prospèrent dans la plupart des climats et produisent un grand volume de plasma. Les anti-venins fabriqués à partir de plasma de cheval se sont avérés au fil du temps avoir un profil de sécurité et d'efficacité satisfaisant. **(Theakston et al, 2003)**

Les moutons ont également été utilisés comme source alternative pour la production de sérums antivenimeux car ils sont moins chers, plus faciles à élever, peuvent mieux tolérer l'adjuvant à base d'huile que les chevaux, et leurs anticorps peuvent être utiles chez les patients qui sont hypersensibles aux protéines équine. Cependant, les inquiétudes croissantes concernant les maladies à prions peuvent limiter l'utilisation du mouton comme animal pour la production commerciale de sérums antivenimeux. Les grands animaux sont préférables aux plus petits en raison de leur plus grand volume sanguin, mais la race et l'âge sont moins importants. Tous les animaux utilisés doivent être sous surveillance vétérinaire. Lorsque des ovins ou des caprins doivent être utilisés, les fabricants doivent respecter les réglementations visant à minimiser le risque d'encéphalopathies spongiformes transmissibles pour l'homme, telles que les lignes directrices de l'OMS sur la distribution de l'infectiosité des tissus dans les encéphalopathies spongiformes transmissibles à l'homme. **(OMS,2006)**

2.4 Le protocole d'immunisation

Le protocole d'hyper-immunisation soulève des points importants tels que le volume de la solution antigènes-adjuvant à injecter, la voie d'administration, le nombre de sites d'injection et les injections de rappel. Par ailleurs, la surveillance des animaux et la tenue d'un dossier d'immunisation individuel sont indispensables durant toute la durée du programme.

2.4.1 Le volume de la préparation antigènes-adjuvant

En règle générale, les volumes d'injection doivent être aussi petits que possible, à la fois pour limiter les effets secondaires et aussi parce que la réponse immunitaire est généralement plus forte contre un antigène administré en concentration élevée qu'une quantité similaire à faible concentration. Une autre considération importante est l'adjuvant utilisé. Comme discuté précédemment, les adjuvants à base d'huile, en particulier ceux incorporant des produits microbiens, et les adjuvants visqueux qui sont la cause d'un dépôt au site d'injection et induisent une inflammation locale, qui a le potentiel d'induire la formation d'abcès stériles. Pour ces raisons, les antigènes en émulsion doivent être administrés en plus petits volumes que les aqueux. Dans le cas d'une injection SC, de petits volumes peuvent être injectés sur plusieurs sites pour réduire l'intensité des effets secondaires. Cependant, le nombre de sites d'injection doit être limité. **(ERB and HAU 1994)**

2.4.2 La voie d'injection

La voie d'injection peut être sous-cutanée, intramusculaire, intradermique, intrapéritonéale. Celle-ci doit être choisie de façon à provoquer le moins de détresse possible chez l'animal. Les solutions d'antigènes associées à un adjuvant à base d'huile ou de gel visqueux, doivent être injectées par voie sous-cutanée pour éviter les embolies pulmonaires ou la formation d'abcès stériles. **(CCPA 2002)**

2.4.3 Les sites d'injection

Les zones à immuniser doivent être soigneusement nettoyées avec un désinfectant, rasées et frottées avec de l'éthanol à 70% avant l'injection d'immunogène de venin. En général, les sites d'immunisation (figure 09) doivent être situés dans des zones proches des principaux ganglions lymphatiques, de préférence sur le cou et le dos de l'animal. (Pratanaphon, R., *et al.*1997) et (Chotwivatthanakun, C., *et al.*, 2001)

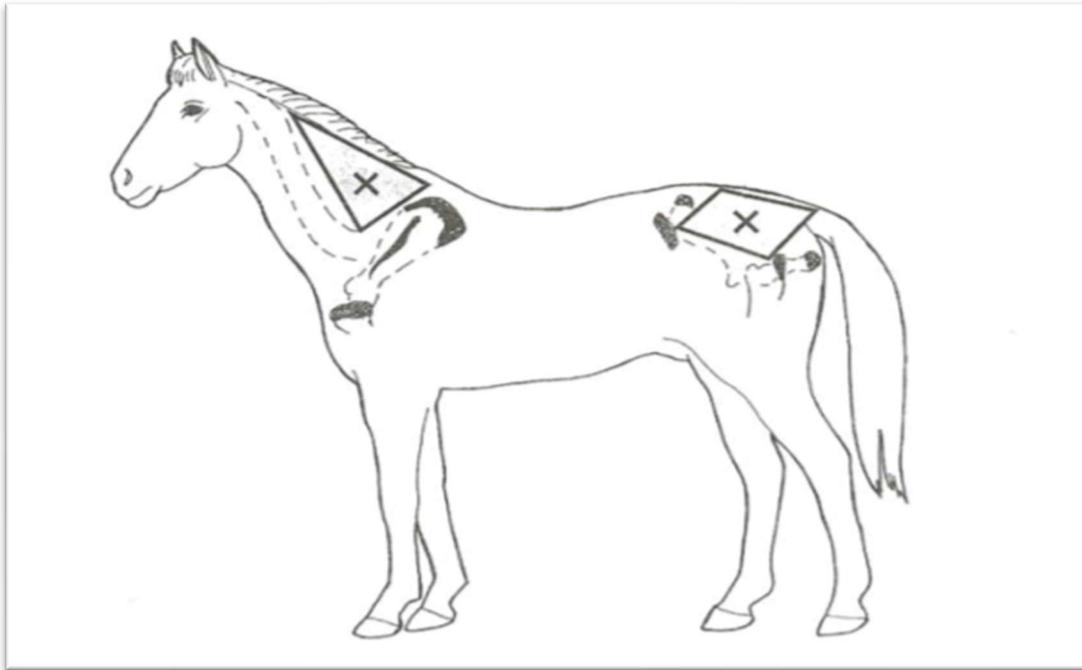


Figure 09 : Zones d'immunisation recommandées chez le cheval (OMS,2018)

2.4.4 Les injections de rappel

Généralement, les titres ne sont pas satisfaisants si les animaux ne sont immunisés qu'une seule fois, même si un adjuvant est utilisé. L'intervalle de temps après lequel la vaccination de rappel est administrée à une grande conséquence, mais il est difficile de donner des recommandations fixes. En règle générale, un rappel peut être envisagé après que le titre d'anticorps a atteint un plateau ou commence à décliner. Habituellement, ceci environ 3 semaines après l'immunisation primaire en utilisant un antigène aqueux, et au moins 4 semaines lorsqu'un adjuvant formant dépôt est utilisé ; de petits échantillons de sang sont souvent prélevés pour déterminer le titre et ainsi aider à établir le moment le plus approprié pour récolter les anticorps. Le nombre de vaccinations de rappel doit être limité à trois au maximum. Si les réponses anticorps sont encore insuffisantes, l'expérience doit normalement être interrompue. Cependant, les antigènes de faible poids moléculaire nécessitent souvent plus de rappels.

De plus, des vaccinations de rappel fréquentes peuvent être nécessaires lorsque les animaux sont utilisés comme donneurs d'anticorps. **(Bryan Howard, *et al*, 2011)**

2.4.5 La surveillance des animaux et le dossier d'immunisation

Les animaux doivent être surveillés quotidiennement et les procédés normalisés de fonctionnement doivent inclure une liste de vérification pour les points limites.

Les injections d'immunogènes ou de mélanges d'immunogène/adjuvant peuvent provoquer des réactions inflammatoires ; par conséquent on doit surveiller tous les jours les réactions aux sites d'injection en particulier et vérifier l'état de santé et de détresse des animaux en général. Leur consommation d'eau et de nourriture, leur activité et leur apparence générale doivent être surveillées. **(CCPA, 2002)**

La tenue d'un dossier est obligatoire pour chaque animal impliqué dans un programme d'hyper-immunisation pour la production de SAO. Ce dossier doit indiquer notamment, la composition de l'agent d'immunisation, la voie d'administration, le ou les sites d'administration, le volume et la date des injections, le poids, l'état de santé et le titre sanguin en anticorps antivenimeux de l'animal tout au long de la procédure d'hyper-immunisation. **(Theakston RDG *et al*, 2003)**

3 Recueil, Pool et contrôle du plasma

Lorsque les animaux hyperimmunisés ont développé un titre d'anticorps antivenimeux correspondant aux spécifications du producteur, ceux-ci peuvent être saignés. Les plasmas séparés du sang sont ensuite poolés et contrôlés.

3.1 La saignée

Les chevaux et les moutons sont saignés au niveau de la veine jugulaire externe. **(OMS, 2016)**

Afin de minimiser la potentielle charge bactérienne et virale du plasma, le saignement doit être réalisé avec du matériel stérile adapté et dans des locaux dédiés soigneusement nettoyés avant et après chaque session **(OMS,2018)**.

Le plasma peut être obtenu soit par aphérèse manuelle soit par plasmaphérèse :

- **L'aphérèse manuelle** est une technique exigeant la collecte du sang total. Le volume de sang à prélever dépend de l'espèce et de la taille de l'animal donneur, soit entre 3 et 6L pour un cheval, et environ 0,5L pour un mouton. Idéalement, le sang est recueilli stérilement dans

des poches plastiques à usage unique, ou des bouteilles en verre contenant un anticoagulant afin d'éviter la formation de caillots. La durée d'une saignée est généralement comprise entre 30 et 45 minutes selon le volume total de sang à recueillir. Les sacs ou les bouteilles de sang sont placés dans une chambre réfrigérée à 5°C +/- 3°C pour la procédure de sédimentation. Les érythrocytes séparés du plasma sont retournés à l'animal donneur, après remise en suspension dans une solution saline stérile à 32-37°C, et au maximum 24h après le prélèvement. (OMS,2018)

- **La plasmaphérèse** est une méthode de collecte automatique du plasma donnant des rendements plus élevés que l'aphérèse manuelle et un plasma moins contaminé par les cellules sanguines (figure 10). Lors de cette procédure, le sang est prélevé sur l'animal, mélangé à un anticoagulant stérile, et passé à travers un séparateur de cellules automatisé. Le plasma est récupéré stérilement dans une poche plastique à usage unique tandis que les érythrocytes sont réinjectés à l'animal. Cette technique fonctionne par cycle avec un cycle de collecte/séparation du plasma, et un cycle de retour des érythrocytes. Le nombre de cycle pour chaque animal donneur dépend du volume total de plasma à recueillir. Par exemple pour les chevaux, tel que présenté en (figure 11), le volume moyen de plasma obtenu est d'environ 6 litres par session. Le nombre de cycles varie de 10 à 20 selon l'hématocrite des chevaux et le processus dur entre 1 et 4 heures. (OMS,2018) Les sacs ou les bouteilles doivent être conservés dans une pièce réfrigérée (2 à 8 ° C) dans l'obscurité jusqu'au début du processus de fractionnement.

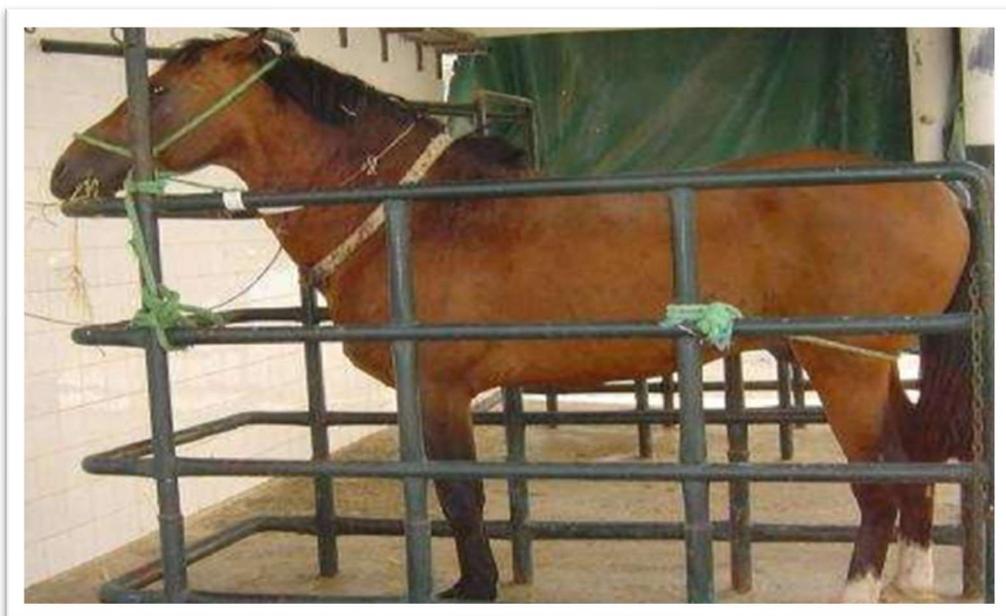


Figure 10 : Récolte de plasma par plasmaphérèse (Chancelin G.,2007)



Figure 11 : Poche de plasma récolté d'un cheval (Chancelin G.,2007)

3.2 Le pool du plasma

Après la saignée de l'ensemble des chevaux du programme, les plasmas peuvent être poolés dans des containers stériles clairement identifiés. En vue de prévenir toute contamination bactérienne, cette opération est effectuée dans une zone à environnement contrôlée. A cette étape, des conservateurs comme le phénol ou le crésol peuvent être ajoutés au mélange. Ces conservateurs sont préalablement dilués avec de l'eau ou de la solution saline pour éviter la dénaturation des protéines contenues dans le plasma. (OMS ,2016)
Le pool de plasma peut être stocké à 5°C +/- 3°C ou congelé à -20°C si aucun conservateur n'a été ajouté. (OMS, 2016)

3.3 Le contrôle du pool de plasma

Avant la poursuite du procédé, le pool de plasma est soumis à des contrôles tels que la vérification de l'absence de précipités macroscopiques et de virus, le dosage de la charge bactérienne et de l'activité neutralisante. Si le résultat de l'un de ces contrôles ne correspond pas à la spécification établie par le producteur, la qualité et l'efficacité du futur SAO ne sont pas garanties et le pool de plasma est détruit. Des contrôles supplémentaires peuvent inclure, le cas échéant, une recherche des pyrogènes et la teneur totale en protéines. (OMS ,2016)

4 La Purification

Cette étape a été introduite pour réduire la fréquence des réactions antivenimeuses. Afin d'éviter tout risque de contamination, il est recommandé de purifier le plus tôt possible le plasma hyper immun individuel ou le poolé.

La première étape de purification est l'élimination des éléments cellulaires par centrifugation du plasma. Par la suite, différentes méthodes de purification ont été mises au point pour obtenir l'une des trois substances actives suivantes :

- des IgG entières après purification pour élimination des protéines sériques non-IgG comme l'albumine,
- des fragments F(ab')₂ de masse molaire d'environ 100 000 Da après digestion des IgG par la pepsine,
- des fragments Fab de masse molaire de l'ordre de 50 000 Da après digestion des IgG par la papaïne. (Chippaux *et al*, 1998, Goyffon, 2012)

La purification d'IGG ou de leurs fragments d'IGG repose sur le fractionnement du plasma hyper immun, c'est à dire sur une succession de processus de précipitation, de filtration, de centrifugation et/ou de digestion des IgG. (Nguyen, 2010)

4.1 La purification des IgG entiers

L'utilisation d'IgG entières pour la fabrication de SAO présente un très grand inconvénient en raison de la forte quantité de sérums anti-ophidiens à injecter, et par les effets indésirables provoqué par l'interaction du fragment Fc des IgG avec le complément. (Chippaux *et al*, 1998)

Néanmoins cette purification peut être réalisée, en diminuant les risques soit par précipitation des IgG par le sulfate d'ammonium ou par la précipitation des protéines non-IgG par l'acide caprylique (Burnouf *et al*, 2004) ou encore combinaison des deux. (Perosa *et al*, 1990)

4.1.1 La méthode de précipitation par le sulfate d'ammonium ou de sodium

Dans le passé, la plupart des laboratoires qui produisaient des antivenins IgG entiers ont utilisé des protocoles de fractionnement basés sur des procédures de relargage utilisant l'ammonium sulfate ou sulfate de sodium. Deux étapes de précipitation sont incluses en

utilisant deux différentes concentrations de sel.

En présence de 30 à 50 % de sulfate d'ammonium ou de sodium, la force ionique du plasma hyperimmun augmente, entraînant la précipitation des IgG. Le culot d'IGG ainsi obtenu est alors repris et dialysé avec une solution appelée PBS pour phosphate-buffered saline. Le surnageant est précipité une nouvelle fois avec une concentration différente en sulfate d'ammonium, afin de précipiter les IgG résiduelles. Le culot, après dialyse, est mélangé au premier tandis que le surnageant composé des protéines non-IgG est éliminé **(Nguyen, 2010 ; Otero *et al*, 1999 ; Perosa, 1990)**

Ces protocoles de fractionnement conduisent généralement à la récupération des anticorps de 40 à 50 % et à la formation d'agrégats de protéines. Néanmoins la présence en quantité importante de protéines non-IgG, tels que l'albumine, dans le produit final entraîne une incidence élevée de réactions indésirables précoces.

4.2 La méthode de précipitation par l'acide caprylique

Plusieurs procédés utilisant la précipitation de protéines non-IgG en présence d'acide caprylique ont été développés pour purifier les IgG du plasma hyperimmun. **(Rojas *et al*, 1994 ; Gutierrez *et al*, 2005)**

En particulier un procédé dans lequel le pH du plasma hyperimmun est ajusté à 5,5 avec de l'acide acétique, puis de l'acide caprylique est ajouté lentement, sous agitation constante, pour atteindre une concentration de 5% (v/v). Le mélange est agité à 22-25°C durant 1h minimum. Dès la fin de l'agitation, les protéines non-IgG précipitées sont éliminées par filtration ou centrifugation. Le filtrat ou le surnageant contenant les IgG est ensuite soumis à une filtration tangentielle, pour éliminer l'acide caprylique résiduel et les protéines de faible masse moléculaire. Des variantes de cette procédure, au niveau du pH, de la température ou de la concentration en acide caprylique ont été mises au point par des fabricants. **(Burnouf *et al*, 2004 ; Perosa *et al*, 1990)**

Le fractionnement de l'acide caprylique permet la production de SAO de pureté relativement élevée, et un rendement pouvant atteindre jusqu'à 60-75% de l'activité du plasma hyperimmun de départ et une faible teneur en agrégats de protéines, car les immunoglobulines ne sont pas précipitées au cours du processus. **(Otero *et al*, 1999 ; Dos Santos *et al*, 1989)**

4.3 La purification des fragments d'IGG (ab')₂

De nombreux fabricants de SOA suivent le protocole classique pour l'antivenin F(ab')₂ décrite par Pope en 1938 avec une certaine modification récente. Cette méthode de fractionnement est basée en premier lieu sur une étape de digestion des IgG par la pepsine en fragment F (ab')₂ et en fragment Fc ensuite par l'étape de précipitation au sulfate d'ammonium (**Raw et al, 1991 ; Grandgeorge et al, 1996 ; Landon et al, 2003**)

Un protocole typique est basé sur une incubation de plasma hyperimmun à pH 3,3 pendant 1 heure, à 30-37 °C dans un réservoir à double paroi, avec une concentration de pepsine de 1,0 g/L. D'autres procédures peuvent être utilisées qui donnent des résultats similaires

Après digestion par la pepsine, le pH est ajusté à 4,5-5,0 par addition de NaOH ou d'un tampon alcalin faible pour inactiver l'enzyme. La durée de cette étape est calculée pour hydrolyser l'ensemble des IgG sans trop fragmenter la partie F(ab')₂ en Fab. (**Morais et al, 2005**).

La deuxième partie du procédé débute avec l'addition de sulfate d'ammonium, sous agitation, à une concentration habituellement proche de 12% (m/v). Le précipité de protéines non-IgG est éliminé par filtration ou centrifugation. Le filtrat ou le surnageant est soumis à un traitement thermique de 56°C pendant 1h appelé thermocoagulation. La thermocoagulation à pH acide en présence de sulfate d'ammonium permet de précipiter les protéines résiduelles instables.

Après refroidissement à moins de 30°C et centrifugation ou filtration, le précipité de protéines non-IgG est éliminé. Le pH est ajusté à 7,0-7,2 ultérieurement avec du NaOH, et une solution de sulfate d'ammonium est ajoutée sous agitation à une concentration suffisamment élevée pour précipiter les fragments F (ab')₂, soit 23% (m/ v) minimum. Les petits fragments protéiques issus de l'action enzymatique de la pepsine restent dans le surnageant et sont éliminés par filtration ou centrifugation. Le sulfate d'ammonium potentiellement présent dans le précipité contenant les fragments F (ab')₂ est éliminé par diafiltration après dissolution du précipité dans du PBS. (**David et al, 1997 ; Burnouf et al, 2004**)

Ce protocole de fractionnement donne des fragments F (ab')₂ de pureté élevée, avec un rendement se situant habituellement entre 30% et 40% de l'activité du plasma hyperimmun de départ. Par ailleurs, l'étape de précipitation au sulfate d'ammonium 23% (m/v) est remplacée par certains fabricants par une ultrafiltration. (**Nguyen, 2010 ; Burnouf et al,**

2004)

4.4 La purification des fragments d'IgG Fab

Elle consiste en un procédé dans lequel les immunoglobulines sont précipitées du plasma par l'ajout de sulfate d'ammonium ou de sulfate de sodium à une concentration de 23%.

Après filtration, le filtrat contenant les protéines non_IgG est éliminé alors que le précipité d'immunoglobuline est dissous dans une solution de chlorure de sodium à pH 7,4. La papaïne est ajoutée et la digestion est effectuée à 37 °C pendant 18-20 heures avant d'être stoppé par l'ajout d'iodoacétamide.

L'iodoacétamide, les sels et les peptides de faible masse moléculaire sont éliminés par diafiltration. Alors que le filtrat contenant les fragments Fab et Fc est quant à lui équilibré avec une solution isotonique tamponnée de NaCl, puis chromatographié sur une colonne échangeuse d'anions. Les fragments Fc et les autres impuretés sont liés sur la colonne, tandis que des fragments de Fab sont récupérés pour donner une solution concentrée en fragments Fab. **(Bush et al, 2015)**

Les fragments Fab ont malgré tout une demi-vie faible dans l'organisme ce qui a pour conséquence de réduire la durée de leur action. L'élimination des fragments Fab est de 1 à 20 fois plus rapide que l'élimination des IgG entières, et de 4 à 5 fois plus rapide que des fragments F(ab')₂ **(Bochner et al, 2007 ; Fernandes et al, 2008)**. Une étude sur l'envenimation par des serpents nord-américains, a montré que l'administration de SAO composés de fragments F(ab')₂, de demi-vie plus longue, réduit le risque de récurrence post traitement et de coagulopathies tardives, par rapport à une prise en charge avec un SAO composé de fragments Fab. **(Bush et al, 2015)**

4.5 Les procédés de purification additionnels

Certains producteurs de SAO ont enrichi les procédés décrits ci-dessus par des étapes supplémentaires, comme la chromatographie échangeuse d'ions qui améliore la pureté, la sécurité et l'efficacité préclinique adéquates du produit. **(Nguyen, 2010 ; J-p Chippeaux 2013)**

4.5.1 La chromatographie échangeuse d'ions

La chromatographie échangeuse d'anions ou de cations peut être utilisée avec succès pour la purification des SAO, en jouant sur le différentiel de charge entre les IgG entières ou leurs

fragments et les impuretés, par modification du pH (Nguyen, 2010)

Les colonnes échangeuses d'anions, sont équilibrées à un pH basique. Les IgG entières ou fragmentées chargées positivement sont éluées, alors que les impuretés chargées négativement sont retenues sur l'échangeur. (Fernandes et al, 2008)

A l'inverse, les colonnes échangeuses de cations, sont équilibrées à pH acide. Les IgG entières ou leurs fragments chargés négativement se lient à l'échangeur, tandis que les impuretés chargées positivement sont éluées. Les IgG entières ou fragmentées sont récupérées via un tampon d'éluion. (Raweerith et al, 2003 ; Saetang et al, 1997) [Les colonnes de chromatographie doivent être correctement régénérées et désinfectées pour éviter la contamination entre différents lots (Raweerith et al, 2003)

5 La formulation

Lors de la formulation de la solution d'IgG ou de fragments d'IgG purifiée, il faut envisager l'ajout de sels pour ajuster l'osmolalité, des conservateurs pour prévenir la contamination bactérienne et fongique, des excipients, si nécessaire pour la stabilité des protéines, des stabilisants (Les tensioactifs Polysorbate 20 et Polysorbate 80 sont largement utilisés à de faibles concentrations pour leur propriété stabilisante), ainsi que l'ajustement du pH.

En général, les antivenins sont formulés à un pH neutre ($\text{pH } 7,0 \pm 0,5$) de manière à ne pas provoquer de douleur lors de l'injection. Toutefois, certains fabricants explorent la faisabilité d'une formulation à pH acide pour améliorer la stabilité de la solution. La formulation à un pH supérieur à 7,5 n'est en revanche pas recommandée, car l'instabilité des IgG et de leurs fragments en milieu alcalin favorise la formation d'agrégats. (OMS, Chippaux J-P, Goyffon M 1998, et al, 2009)

6 La réduction du risque de contamination virale

Le SAO final doit être exempt de contamination virale. La réduction du risque de contamination virale des SAO résulte de la combinaison de :

- **La minimisation de la charge virale initiale** du plasma par la mise en place d'un système qualité tout au long de la chaîne de production, d'une surveillance épidémiologique stricte et d'un contrôle sanitaire des animaux donneurs (Theakston et al, 2003)

- **La contribution des procédés de fabrication à l'inactivation et/ou l'élimination des virus** à titre d'exemple le traitement à pH acide, la digestion par la pepsine et la précipitation par l'acide caprylique, qui contribuent à la réduction des virus à enveloppe (**Burnouf et al ; 2004 ; Solano et al,2003**)

Si ces mesures se révèlent insuffisantes, l'introduction d'une étape de réduction virale dédiée telle que la pasteurisation doit être envisagée (**Theakston et al, 2003**). Elle consiste à chauffer les solutions d'IgG entières ou fragmentées, avant ou après la formulation, à 60°C pendant 10 heures. Ces conditions opératoires permettent d'inactiver les virus éventuellement présents avec une dénaturation minimum des IgG (**Nguyen, 2010**)

7 Conditionnement et conservation

7.1 Conditionnement

- **Le conditionnement primaire**

Les SAO sont répartis dans leur conditionnement primaire sous forme liquide en générale (**Burnouf et al, 2004**) ; administrer soit par perfusion intraveineuse après dilution dans une solution saline, ou bien par injection lente. La première méthode a pour avantage de mieux contrôler l'apparition d'effets secondaires immédiats tandis que la deuxième permet de réduire les quantités injectées, et surtout une efficacité plus rapide (**Chippaux et al, 1998**)

Le SAO stérile est réparti aseptiquement en flacon ou en ampoule en verre borosilicaté de type I préalablement dépyrogénisés. La répartition doit être effectuée dans un environnement adapté, sous une hotte à flux laminaire, avec un équipement calibré pour délivrer le volume attendu, en général autour de 10 ml. (**Al-Abdulla et al, 2003**). Le remplissage est effectué via des seringues de précision qui fonctionnent de la même façon que des pompes aspirantes et refoulantes. La course du piston est réglée à l'aide d'une vis micrométrique. Grâce à un jeu de clapets, chaque dose de SAO aspirée par le piston est refoulée vers l'aiguille qui pénètre dans l'ampoule ou le flacon. Les ampoules se déplacent devant les postes de remplissage et de scellage. Pour les produits sensibles à l'oxydation, un gaz inerte stérile peut être introduit dans l'ampoule avant injection du liquide.

Le système de scellage des ampoules est composé de pinces qui assurent l'étirement du verre, après sa fusion au chalumeau, pour former la pointe de l'ampoule. Dans le cas des flacons, un bouchon en caoutchouc inerte et stérile est utilisé pour les obturer. Comme le montre

la figure 16 ci-dessous, les bouchons sont eux-mêmes sertis avec une bague et une capsule en aluminium pour assurer leur maintien. Lors de l'utilisation, le bouchon préalablement aseptisé est transpercé par l'aiguille pour le prélèvement du SAO.

Les formes liquides peuvent être conservées jusqu'à 3 ans à une température de 2-8°C. Des températures plus élevées induisent la dénaturation des IgG réduisant ainsi leur durée de validité et leur efficacité.

Néanmoins, un faible nombre de producteurs poursuivent la fabrication par une étape de lyophilisation avant de procéder au conditionnement secondaire. C'est un procédé de conservation sous vide à température ambiante, qui consiste à extraire l'eau contenue dans une substance organique par interaction des techniques du vide et du froid. Avant utilisation, le lyophilisat est reconstitué, à l'aide d'un solvant. Le procédé de lyophilisation doit être adapté à chaque SAO. Des stabilisants spécifiques comme des polyols, visant à protéger les IgG de la dénaturation et de l'agrégation, peuvent être ajoutés à la formulation du SAO. Le solvant utilisé pour la reconstitution du lyophilisat est en général de l'eau pour préparation injectable (EPPI). (**Burnouf et al, 2004**)

Bien que la lyophilisation soit un procédé coûteux, les formes lyophilisées sont plus satisfaisantes que les formes liquides en termes de conservation. Celles-ci peuvent être conservées 5 ans à l'abri de la lumière à des températures allant jusqu'à 25°C. (**David et al, 1997**).

- **Le conditionnement secondaire**

Il est généralement composé d'une boîte en carton, dans laquelle le flacon ou les ampoules sont emballées avec la notice d'utilisation. Selon la forme pharmaceutique, une ampoule d'EPPI pour reconstitution du lyophilisat, une aiguille ou encore une seringue stérile ; peuvent être jointes au produit.

Les conditionnements primaires et secondaires doivent être correctement identifiés.

Le flacon ou l'ampoule doit être étiqueté avec, à minima, les informations suivantes :

- le nom du produit et du producteur ;
- le nom des espèces animales utilisées pour produire le SAO ;
- le nom commun et scientifique des espèces contre lesquelles le produit est efficace ;
- le numéro de lot ;
- la forme pharmaceutique : liquide ou lyophilisée ;
- le volume de produit contenu dans l'ampoule ou le flacon ;
- la voie d'administration ;

- le pouvoir neutralisant du produit ;
- les conditions de stockage à respecter ;
- la date de péremption.

Des informations supplémentaires peuvent être demandées par les autorités réglementaires nationales.

Le conditionnement secondaire doit comporter les mêmes informations que celles fournies sur le contenant primaire avec en plus :

- la posologie recommandée ;
- le mode de reconstitution pour les formes lyophilisées ;
- le mode d'administration ;
- les effets indésirables précoces et retardés ;
- une indication que le produit est à usage unique.

Les ampoules ou les flacons correctement identifiés et conditionnés sont alors stockés dans des locaux appropriés, en attente des résultats de contrôle pour leur libération (**OMS et al, 1971**).

7.2 Conservation

Lorsque les antivenins sont conservés dans de bonnes conditions, La plupart des préparations antivenimeuses liquides ont une durée de conservation allant jusqu'à 3 ans au réfrigérateur à 2-8 °C, et plus longtemps sous la forme lyophilisée à l'obscurité et à température ambiante.

Ces conditions peuvent être difficiles à atteindre dans les zones tropicales. Par conséquent, les écarts par rapport à cette plage de température, dus à des interruptions de la chaîne du froid pendant le transport ou le stockage, sont susceptibles d'entraîner une détérioration du produit. (**Chippaux et al, 2002; OMS et al, 1971**)

8 Le contrôle qualité

Afin de s'assurer de la bonne qualité du produit final, des tests de contrôles qualités doivent être effectués après chaque étape intermédiaire de fabrication d'un lot de SAO. La libération du lot est ensuite conditionnée par la conformité des tests libératoires, réalisés sur le produit final, par rapport aux spécifications établies (**Nguyen, 2010 ; Raweerith, 2005 ; Furtado, 1991**).

Dans le cas des produits lyophilisés, un échantillon représentatif du lot est dissous dans le solvant et contrôlé comme les formes liquides (OMS, 1971).

Les différents types de contrôle du produit final sont décrits ci-dessous :

8.1 L'inspection visuelle

Le produit final doit être inspecté et tout flacon ou ampoule présentant une turbidité, une coloration anormale ou des particules est éliminé. (OMS, 1971 ; Moroz et al, 1963).

8.2 L'étanchéité

L'étanchéité des flacons ou des ampoules (ex : microfissures) est contrôlée en les plaçant dans un bain coloré, et détectée par la pénétration du colorant à l'intérieure du produit.

D'autres méthodes basées sur la conductivité, ou l'observation microscopique automatique des pointes d'ampoules sont possibles (Moroz et al, 1963).

8.3 La solubilité

La durée de dissolution complète d'un SAO lyophilisé après ajout du solvant, à température ambiante, tout en évitant de les secouer pour éviter formation de mousse doit être inférieure à 10 min (OMS, 1971).

8.4 Le volume extractible

La mesure du volume de SAO extrait du contenant doit être conforme à celui indiqué sur l'étiquette (Moroz et al, 1963).

8.5 L'humidité résiduelle

L'humidité résiduelle maximale autorisée doit être établie pour chaque SAO lyophilisé afin de garantir sa stabilité au cours de la conservation. Parmi les méthodes les plus utilisées pour détecter la teneur en humidité résiduelle des SOA est le titrage de Karl- Fischer et elle doit être inférieure à 3% (Moroz et al, 1963).

8.6 La mesure du pH

Le pH des SAO est mesuré au moyen d'un pH-mètre. La mesure doit être conforme aux normes préétablies (OMS, 1971 ; Moroz et al, 1963).

8.7 La mesure de l'osmolalité

L'osmolalité est obtenue au moyen d'un cryoscope ou d'un osmomètre. Elle doit être d'au moins 240 mOsmol / kg. La détermination de l'osmolalité est également un moyen

indirect de déterminer la quantité de sels ou d'excipients ajoutés pour la formulation du lot (OMS, 1971 ; Moroz *et al*, 1963).

8.8 Le test de stérilité

Les SAO doivent être stériles. Le test de stérilité est effectué sur un échantillon représentatif du lot de produit prélevé après la filtration stérilisante. En théorie, l'état de stérilité absolue n'existe pas. La Pharmacopée Européenne par exemple, autorise un niveau d'assurance de stérilité de 10^{-6} (OMS, 1971)

8.9 Le test des pyrogènes

Les SAO doivent être apyrogènes. Le test des pyrogènes est basé sur la détection d'une élévation de la température rectale des lapins, après injection du SAO dans la veine de l'oreille. Par ailleurs, les endotoxines bactériennes peuvent être plus précisément détectées par le test de Limulus Amebocyte Lysate (OMS, 1971 ; Moroz *et al*, 1963).

8.10 La concentration en protéine

La concentration totale en protéines des sérums antivenimeux peut être déterminée en utilisant plusieurs méthodes notamment :

- ✓ La méthode Kjeldahl pour déterminer la teneur en azote ;
- ✓ Plusieurs procédures colorimétriques ;
- ✓ Dosages spectrophotométriques (280 nm).

La concentration totale en protéines des sérums antivenimeux ne doit de préférence pas dépasser 10 g / dl, car l'administration de quantités plus élevées de protéines peut être Associés à des taux d'effets indésirables plus élevés (OMS , 1971 ; Moroz *et al*, 1963).

8.11 Le pouvoir neutralisant

Le pouvoir neutralisant du SAO est évalué par le test de la dose efficace médiane ED50 (le volume de SAO qui protège 50% de souris envenimés des effets toxiques du venin contre lequel il a été conçu pour agir). Le test de la ED50 reste un indicateur quantitatif du pouvoir neutralisant du SAO (OMS ,1971 ; Moroz *et al*, 1963)

8.12 L'identification des IgG

Pour confirmer l'origine du produit, les IGG sont identifiés obligatoirement par les laboratoires qui produisent plusieurs SOA. Différents tests biologiques, physico-chimiques et immunologiques seront alors effectués (Who expert committee on Biological

Standardization, 1971 ; Fernandes et al, 2008)

8.13 La pureté

La pureté des IgG ou des fragments d'IgG doit être mesurée par l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide, cette dernière permet la détection des contaminants protéiques, en particulier l'albumine (OMS, 1971 ; Nguyen, 2010) qui ne devrait idéalement pas dépasser 1% de la teneur totale en protéines.

La pureté des IgG et leurs fragments constituent normalement la grande majorité de la préparation avec un taux supérieure à 90%.

8.14 La distribution de la taille moléculaire

Les agrégats de protéines, l'abondance des IgG entières, de leurs fragments, ainsi que des produits de digestion enzymatique de faible masse moléculaire peuvent être évalué par des analyses densitométriques des profils chromatographiques (OMS, 1971 ; Nguyen, 2010)

8.15 La concentration en excipients

La concentration des différents excipients ajoutés doit être déterminée en utilisant les méthodes chimiques appropriées. Par exemple la concentration en conservateurs tel que le phénol ne doit pas dépasser 2,5 g / L qui peut être déterminée par spectrophotométrie (OMS, 1971)

8.16 La concentration en agents chimiques

Les réactifs chimiques utilisés pour la purification des IgG ou des fragments d'IgG tels que le sulfate d'ammonium, l'acide caprylique et d'autres sont éliminés du produit final par diafiltration ou dialyse. Si ces étapes d'élimination sont validées, le dosage de la quantité résiduelle en agent chimique peut être exclu. La détermination de la quantité résiduelle d'agents utilisés dans le fractionnement du plasma pourrait être exclue du test de mise en service de routine si le processus de fabrication est validé pour éliminer ces réactifs (OMS, 1971)

CHAPITRE III :
La crise globale de la sérothérapie anti-
ophidienne

CHAPITRE III : La crise globale de la sérothérapie venimeuse ophidienne

1 Epidémiologie des envenimations ophidiennes : incidences et circonstances

1.1 Incidences des morsures

Les envenimations ophidiennes constituent un important problème de santé publique dans de nombreux pays, surtout dans les régions rurales pauvres des pays en développement où l'incidence est la plus élevée. **(Chippaux J.P. 2000)**

Deux familles de serpents sont à l'origine de la majorité des morsures : les Elapidae (cobras et mambas) et les Viperidae (vipères). Environ 1500 espèces de scorpions toutes venimeuses sont à l'origine des piqûres.

Les serpents mordent 500.000 à 5.000.000 de personnes dans le monde par an **(Chippaux J.P. 2002)**. Elle serait de 1.000.000 par an en milieu tropical avec une mortalité entre 30.000 et 50.000 selon l'OMS. **(Chippaux J.P. 2002)**

En Europe, sur 750.000.000 habitants, il y'a 250.000 cas de morsures dont 8.000 cas d'envenimations avec 30 cas de décès. En France, on estime que l'incidence des morsures de serpents est environ 3,5 pour 100.000 habitants soit environ 2.000 morsures ophidiennes et près de 500 envenimations et 1 décès par an. **(Chippaux J.P. 2002)**

Au Canada, avec une population de 270.000.000, il y a 450.000 cas de morsures dont 6.500 cas d'envenimations et dont 15 cas de décès.

En Asie, il y a 100.000 cas de décès sur 2.000.000 de cas d'envenimations sur 4.000.000 de morsures par an avec 300.000.000 habitants. **(Chippaux J.P. 2002)**

En Afrique, plus de 20 000 décès sont enregistrés par an et 400 000 de victimes d'envenimation gardent des séquelles fonctionnelles graves et permanentes.

En Afrique du Nord les serpents venimeux et dangereux sont représentés par les Vipéridés et les Elapidés **(MION.G, OLIVE F. 1998)**

En Algérie, un taux élevé de piqûres de serpent a été enregistré au niveau de la wilaya de Ghardaïa, Laghouat et el Beyed. Depuis le début 2013, le CAP a enregistré 70 cas de piqûres dont 1 cas mortel de piqûre de serpent. El-Menia et Hassi El-Gara sont les deux communes de la wilaya de Ghardaïa où est enregistré le plus grand nombre de piqûres de serpent et de scorpion. **(HADJ DAOUD A, 2013)**

Les activités humaines en milieu rural représentent une exposition de fait aux morsures de serpents, on parlera donc d'accidents de nature professionnelle (agricultures, forestiers...), chasse ou le déplacement pédestre en rapport avec le travail. **(Chippaux J.P. 2002)**

Selon les pays, 50-70% des morsures se situent au niveau des membres inférieurs ; 1/3 à 1/4 la main, la tête et le tronc dans les autres cas. **(Chippaux J.P. 2002)**

Dans les pays en développement, les hommes jeunes sont plus atteints : 50-75%. En régions forestières, les morsures sont plus étalées dans l'année alors qu'en savane, les accidents sont plus nombreux en saison pluvieuse.

Une majorité de morsures se produit en fin d'après-midi ou en début de soirée ; quelques-unes ont lieu la nuit, à domicile et sont infligées au cours du sommeil. Plus de 80% des morsures siègent aux membres inférieurs, principalement au-dessous du genou. **(Chippaux J.P. 2002)**

Dans les pays industrialisés, les morsures surviennent essentiellement lors d'occupations récréatives. **(Chippaux J.P. 2002)**

Dans les pays tempérés, les morsures surviennent entre le printemps et l'automne, principalement pendant la journée. Il y a une augmentation au moment des vacances. **(Chippaux J.P. 2002)**

Depuis quelques années, un nouveau type de morsure se développe, nous parlerons alors de morsures induites ou morsures illégitimes qui surviennent chez des herpétologistes professionnels ou amateurs lors de la manipulation intentionnelle mais encore à cause du développement du phénomène des « nouveaux animaux de compagnie ». **(Chippaux J.P. 2002)**

2 Situation mondiale

Selon les estimations, 5 millions de personnes sont mordues chaque année. Il en résulte jusqu'à 2,5 millions de cas d'envenimement (figure 12), au moins 100 000 décès et environ trois fois plus d'amputations et d'autres incapacités définitives. Dans leur grande majorité, les victimes sont des femmes, des enfants et des agriculteurs vivant dans des communautés rurales pauvres, où les systèmes de santé sont mal équipés et manquent de ressources.

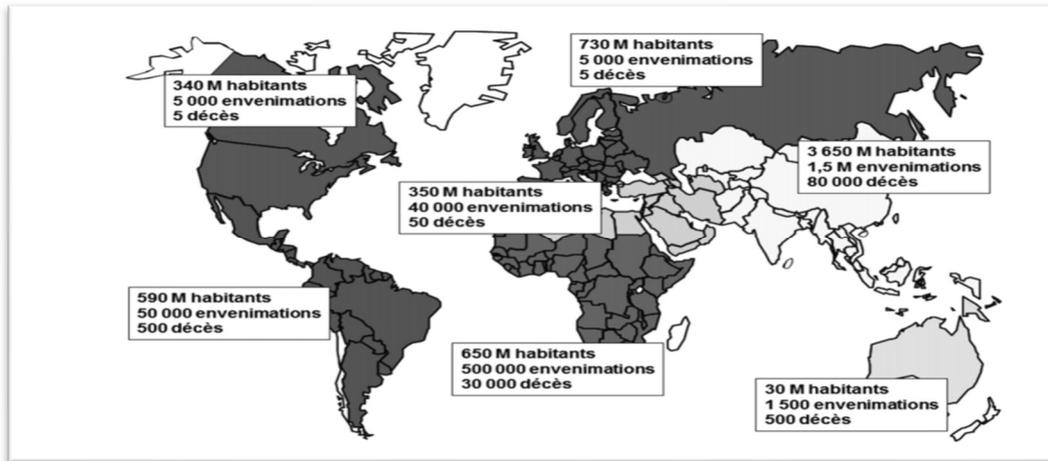


Figure 12 : Distribution Mondiale de l'incidence et de la mortalité par envenimation ophidienne (J-P Chippeaux, 1998)

Tableau 2: Incidence et mortalité par morsure de serpents dans le monde (J-P Chippaux,1998)

	Population 10 ⁶	Nombre total de morsures	Nombre d'envenimations	Nombre de morts
EUROPE	730	25 000	8 000	30
MOYEN ORIENT	160	20 000	15 000	100
USA et CANADA	270	45 000	6 500	15
AMERIQUE CENTRE ET SUD	400	300 000	150 000	5 000
AFRIQUE	760	1 000 000	500 000	20 000
ASIE	3 500	4 000 000	2 000 000	100 000
OCEANIE	20	10 000	3 000	200
TOTAL	5 840	5 400 000	2 682 500	125 345

2.1 Circonstances des morsures

Les activités humaines en milieu rural représentent une exposition de fait aux morsures de serpents, on parlera donc d'accidents de nature professionnelle (agricultures, forestiers...), chasse ou le déplacement pédestre en rapport avec le travail. **(Chippaux J.P. 2002)**

Selon les pays, 50-70% des morsures se situent au niveau des membres inférieurs ; 1/3 à 1/4 la main, la tête et le tronc dans les autres cas. **(Chippaux J.P. 2002)**

Dans les pays en développement, les hommes jeunes sont plus atteints : 50-75%. En régions forestières, les morsures sont plus étalées dans l'année alors qu'en savane, les accidents sont plus nombreux en saison pluvieuse.

Une majorité de morsures se produit en fin d'après-midi ou en début de soirée ; quelques-unes ont lieu la nuit, à domicile et sont infligées au cours du sommeil. Plus de 80% des morsures siègent aux membres inférieurs, principalement au-dessous du genou. **(Chippaux J.P. 2002)**

Dans les pays industrialisés, les morsures surviennent essentiellement lors d'occupations récréatives. **(Chippaux J.P. 2002)**

Dans les pays tempérés, les morsures surviennent entre le printemps et l'automne, principalement pendant la journée. Il y a une augmentation au moment des vacances. **(Chippaux J.P. 2002)**

Depuis quelques années, un nouveau type de morsure se développe, nous parlerons alors de morsures induites ou morsures illégitimes qui surviennent chez des herpétologistes professionnels ou amateurs lors de la manipulation intentionnelle mais encore à cause du développement du phénomène des « nouveaux animaux de compagnie ». **(Chippaux J.P. 2002)**

2.2 La Gravité des morsures

La gravité des morsures de serpents est influencée par plusieurs facteurs : toxicité du venin et la quantité injectée, l'espèce de serpent, la victime (âge, siège, taille, poids) ; les circonstances de la morsure et le délai entre la morsure et la prise en charge efficace. **(Chippaux J.P. 2002)**

3 Les causes de la pénurie des sérums anti ophidiens

Aujourd'hui, il y a une pénurie mondiale de sérums adaptés, sûrs et efficaces contre les venins de serpents. Plusieurs facteurs se sont associés pour aboutir à la situation actuelle : données insuffisantes sur le nombre et le type des morsures de serpents, difficulté à définir les marchés, déficience des politiques de distribution.

La généralisation des SAO polyvalents en remplacement des monovalents est en partie responsable de la diminution du nombre de spécialités, mais elle n'explique pas tout **(Goyffon, 2012)**.

L'efficacité du sérum antivenimeux, seul traitement spécifique des envenimations, n'empêche pas de constater une sous-utilisation paradoxale, notamment dans les pays où il y en a le plus besoin : les pays en développement. Les récentes études menées dans ces pays, y compris en Asie où la situation est pourtant plus favorable, montrent que la consommation en sérums antivenimeux est actuellement inférieure à 10 % des besoins réels, voire inférieure à 1 % dans certains pays d'Afrique sub-saharienne **(J-P Chippaux, 2002)**.

Parmi les causes :

3.1 Une méconnaissance des besoins

La méconnaissance des besoins, la faute d'informations épidémiologiques pertinentes et d'une détermination précise du problème médical constituent des causes de la pénurie. En effet, la majorité des morsures se produisent dans les zones rurales de pays qui ne disposent pas des infrastructures et des ressources nécessaires pour collecter des données statistiques solides sur ce problème **(Kasturiratne, 2008 ; Guitierrez, 2012)**

De plus, le nombre de cas notifiés aux ministères de la santé par les hôpitaux, les cliniques ou les dispensaires, ne constitue qu'un faible pourcentage des victimes, car de nombreuses personnes envenimées ne parviennent pas ou ne souhaitent pas rejoindre un centre de soins, et ne sont donc pas recensés

Donc la rareté des études épidémiologiques correctement conçues expliquent pourquoi l'impact de cet important problème de santé publique est resté longtemps non reconnu et négligé **(Theakston et al, 2003, Gutiérrres, 2012)**.

3.2 Un déficit d'accessibilité

A cette méconnaissance des besoins s'ajoute fréquemment un déficit d'accessibilité des SAV, notamment sur le continent africain. En d'autres termes, la gestion des stocks de SAV (au demeurant modeste) destinés au traitement des victimes de morsures de serpents laisse trop souvent à désirer : lieux de stockages rares, en petit nombre et donc parfois éloignés du site de l'accident d'envenimation, problèmes de conservation de la chaîne du froid indispensable mais qui n'est pas toujours respectée vis-à-vis des SAV sous forme liquide. Très souvent les SAV sont stockés en milieu urbain, laissant paradoxalement démunies les zones rurales généralement les plus exposées au risque dans un contexte d'urgence. Un nombre insuffisant d'établissements de soins, principalement dans les zones rurales et enfin par un échec d'approvisionnement des zones les plus touchées par les envenimations (**J-P Chippaux, 2002**).

3.3 Un personnel médical peu ou non formé

Compte tenu de la forte variabilité des venins, la diversité et la complexité des symptômes sont de nature à dérouter les praticiens mal formés à la prise en charge des envenimations, surtout dans les pays tropicaux où plusieurs dizaines d'espèces peuvent coexister (**Goyffon, 2012 ; J-P Chippaux, 1998**).

Les personnels des centres de soin, n'ayant pas de SAV en stock, perdent la notion de leur importance et de leur efficacité, mais aussi les indications, la pratique d'une bonne administration, les points critiques à surveiller, et la conduite à tenir en cas d'incident. Les patients, ne se voyant plus prescrire de SAV, pensent qu'ils sont inutiles et dangereux et reprennent l'habitude de consulter d'abord le tradipraticien. Entraînant une perte de confiance totale en la SAV (**Calvette et al, 2009**)

3.4 Le coût des SAV

Si modestes que paraissent chacune des améliorations techniques successivement apportées dans la préparation des SAV pour améliorer à la fois leur tolérance et leur efficacité, elles n'en ont pas moins chacune un coût dont le montant atteint un niveau prohibitif qui représente parfois plusieurs mois du revenu d'un ménage de paysans. Pour compenser la baisse des ventes, les fabricants augmentent le prix, ainsi s'établit un véritable cercle vicieux qui s'auto-entretient (figure 13) : la demande diminue, le marché du SAV se

rétrécit, le SAV devient de moins en moins accessible et est de moins en moins utilisé, et donc les coûts de fabrication augmentent, et ainsi de suite. (Chippaux, 2002 ; Sorge, 2016)

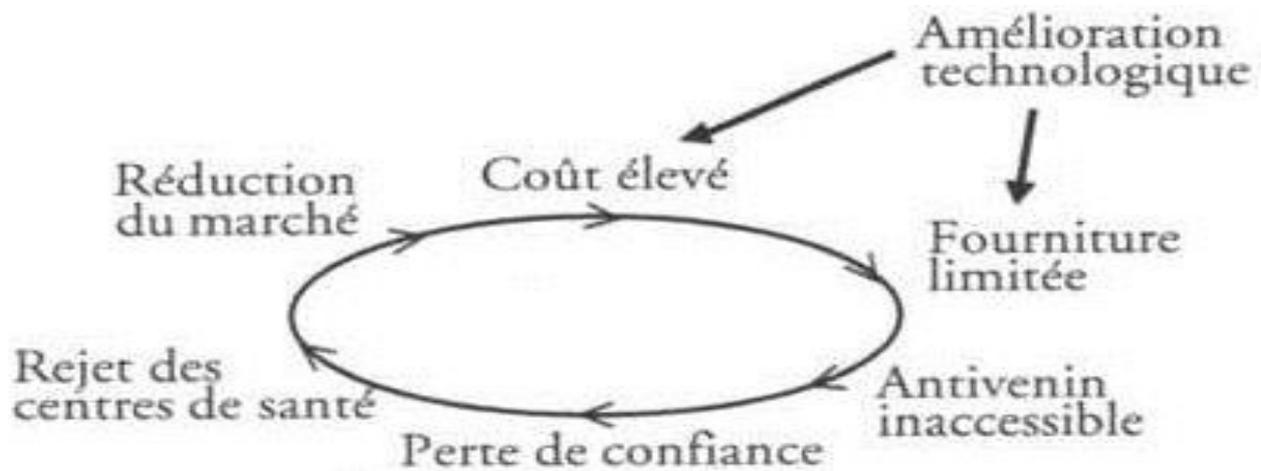


Figure 13 : Cercle vicieux alimentant la mauvaise disponibilité des antivenins (J-P Chippaux,2002)

4 Conséquences de la pénurie

Depuis une trentaine d’années, la vente des SAO se réduit considérablement, donnant de très faibles volumes de production qui ne sont plus en adéquation avec les besoins du marché. Cette incohérence, dont les causes sont multiples, a entraîné une crise durable qui limite actuellement la disponibilité de ces traitements vitaux, en particulier en Afrique subsaharienne où la rupture est imminente. (Gutiérrez J-M. et al, 2014)

La conséquence la plus dramatique de la pénurie en SAO est l’importance de la mortalité malgré l’existence d’un traitement sûr et efficace.

5 Prévention de l’envenimation

Les mesures de prévention des morsures de serpents s’appuieront sur des mesures d’éducation sanitaire pour lesquelles la formation des personnels de santé est capitale : présentation des espèces dangereuses (tableaux, spécimens), des conduites à risques, des précautions simples à prendre pour éviter le risque (caractéristiques des biotopes, habillement), conduite à tenir en cas de morsure par les serpents venimeux. La prévention a pour but de réduire, d’une part, le nombre de morsures de serpent et, d’autre part, la sévérité des envenimations et la mortalité. Elle peut s’organiser à trois niveaux (Sorge et al, 2006)

5.1 Lutte contre les serpents

Plusieurs stratégies ont été proposées pour contrôler les populations de serpents avec des succès divers. Il faut toutefois se souvenir que les serpents contribuent à l'équilibre de l'environnement et que leur contrôle peut entraîner une pullulation de leurs proies habituelles, notamment les rongeurs qui sont également des nuisibles (Sorge et al, 2006).

5.1.1 Protection territoriale et contrôle par des moyens physiques

Cette protection se fait par l'élevage de chiens dressés à la détection de serpents ainsi que l'utilisation des volailles (poules, dindons, canards) pour prévenir de la présence de reptiles.

De la mise en place de dispositifs de protection (fossés à bords lisses entourant la plantation, filets en nylon), l'utilisation de barrières électriques et du piégeage. Mais ces techniques, coûteuses en investissement et en fonctionnement, nécessitent des conditions topographiques particulières pour être vraiment efficaces (Sorge et al, 2006).

5.1.2 Contrôle écologique

La modification de l'environnement intervient sur le peuplement ophidiens, soit en favorisant le développement de certaines populations, soit au contraire en limitant leur conservation.

Le remembrement des parcelles, qui a autorisé une agriculture extensive fortement mécanisée, est à l'origine de la diminution de la morbidité ophidienne dans de nombreux pays industrialisés. De même la destruction de certains habitats (murs de pierres sèches, débroussaillage, chablis), permet de réduire la densité de population ophidienne dans certaines zones. (Sorge et al, 2006).

5.1.3 Contrôle biologique

Les mangoustes, notamment la mangouste indienne (*Herpetes edwardsi*) réputée prédatrice de serpents, ont été introduites dans plusieurs régions tropicales pour lutter contre les serpents. Leur régime alimentaire carnivore très large a été confirmé aux îles Amami, à Trinidad et Porto Rico où l'on peut même observer une relative compétition entre certains serpents venimeux et les mangoustes. Les serpents représentent de toute façon moins de 10 % des proies capturées par les mangoustes. De plus, ces dernières chassent de jour et leur rencontre avec des serpents venimeux, très souvent nocturnes, est très aléatoire. Enfin, on

peut objecter que l'action de la mangouste s'exerce également sur l'ensemble des vertébrés, ce qui peut entraîner des effets nuisibles sur l'environnement. (Sorge et al, 2006).

5.1.4 Contrôle chimique

Cette stratégie a été proposée depuis longtemps mais avec un succès très modeste. L'utilisation d'eau ou de proies empoisonnées, notamment par de la nicotine ou de la strychnine, a permis d'obtenir des résultats intéressants en Amérique du Nord ou au Japon avant les années 1960. Les effets néfastes sur l'environnement et les risques de telles pratiques les ont fait abandonner.

L'utilisation de répulsifs ou de pesticides – organochlorés, association de naphthaline et de soufre (Snake-A-Way®, commercialisé aux États-Unis), pyrèthrynoïdes (deltaméthrine, insecticide toxique pour les animaux à sang froid : K-Othrine®, Décis®) – nécessite des doses élevées, ce qui est coûteux et dangereux pour l'environnement.

La fumigation à l'aide de bromure de méthyle est efficace mais représente un risque de destruction non négligeable de la couche d'ozone. Certaines plantes semblent capables d'éloigner les serpents sans risque pour les autres vertébrés. *Securidaca longepedunculata*, antivenimeux africain très réputé, *Sansevieria sp.* Liliacée ornementale tropicale, et *Ipomoea carnea*, arbuste américain répandu du Texas à l'Argentine, passent pour être de puissants répulsifs naturels (Sorge et al, 2006).

5.1.5 Protection contre les morsures

L'un des moyens les plus simples et les moins onéreux est constitué par les habits de protection. Le port de bottes et de gants épais réduit très significativement le risque de morsures. Les chapeaux à large bord protègent contre les serpents arboricoles qui peuvent tomber sur la victime ou mordre au niveau de la tête. Il faut proscrire certains gestes dangereux ou prendre des précautions avant de les entreprendre : sonder les cavités avec un bâton, utiliser un outil ou se protéger la main. Enfin, la mécanisation de l'agriculture est également un facteur de réduction important du risque en limitant le contact direct homme/serpent.

La prévention individuelle repose surtout sur une information large du public portant sur les modalités des accidents, l'écologie des espèces dangereuses et les premiers secours en cas de morsure. Les conseils sont diffusés en milieu scolaire, par voie de presse ou d'affiche. Sans avoir vraiment fait la preuve de son efficacité, cette méthode a le mérite d'être peu coûteuse (Sorge et al, 2006).

5.2 Organisation de la prise en charge médicale

La rapidité d'intervention et la mise en route du traitement correct sont les points essentiels.

Il faut éviter l'affolement, qui conduit souvent à des gestes néfastes. Les premiers secours doivent rester simples, ce qui nécessite l'information adéquate du public que l'on doit inciter à consulter un centre de santé au plus vite. Par ailleurs, l'organisation du système de santé doit satisfaire l'attente du public et ses besoins

Conclusion

L'immunothérapie passive constitue le traitement privilégié des envenimations. Elle neutralise le venin et en facilite l'élimination rapide optimisant les traitements symptomatiques qui accélèrent la guérison et diminuent les complications ou les risques de séquelles. Grâce au fractionnement et à la purification des anticorps, dont la tolérance est améliorée sans perte d'efficacité, un produit simple d'utilisation est disponible, notamment dans les régions peu médicalisées et dépourvues de moyens sanitaires. Malgré les atouts désormais reconnus des antivenins dans le traitement de l'envenimation, leur sous-utilisation devient préoccupante, en particulier dans les pays en développement. En conséquence, de nouvelles stratégies de prise en charge des envenimations doivent être développées. Des enquêtes épidémiologiques appropriées ou la déclaration obligatoire des cas d'envenimation dans les pays où l'incidence est élevée, identifieront les besoins en vue d'une réponse adaptée.

Recommandations

Il est important que l'OMS, les fabricants d'antivenin, les autorités sanitaires nationales et les organisations non gouvernementales s'impliquent pour diffuser les antivenins polyvalents existants et développer la recherche afin de créer des antivenins efficaces, polyvalents, bien tolérés et d'utilisation simple dans les conditions de terrain (monodose, lyophilisé, etc...).

La formation du personnel de santé, en réintroduisant l'enseignement du diagnostic et du traitement des envenimations dans les écoles d'infirmiers et les facultés de médecine et de pharmacie dont on l'a progressivement retiré, reste une priorité, notamment les zones rurales de l'Afrique du Nord : Maghreb, région de l'Atlas, Sahara (zone saharienne et subsaharienne).

L'information du public sur les propriétés des nouveaux antivenins et la nécessité de les administrer précocement, incitera les victimes à consulter plus rapidement. Enfin, il est indispensable d'améliorer l'accessibilité des antivenins adéquats, en assurant une péréquation de leur financement et en soutenant le contrôle de qualité et la pharmacovigilance des produits de santé dans les pays en développement.

Références bibliographiques :

Aissa Hadj daoud, Article de Journal Publié sans le Quatidien D'Oran le 11.11.2013 [Internet] [Consulté le 01.01.2020] Disponible sur :

<https://www.djazairess.com/fr/lqo/5190204>

Al-Abdulla I, Garnvwa JM, Rawat S, Smith DS, Landon J, Nasidi A. Formulation of a liquid ovine Fab-based antivenom for the treatment of envenomation by the Nigerian carpet viper (*Echis ocellatus*). *Toxicon*. Sept 2003; 42(4): 399-404.

Angulo Y, Estrada R, Gutiérrez JM. Clinical and laboratory alterations in horses during immunization with snake venoms for the production of polyvalent (Crotalinae) antivenom. *Toxicon*, 1997, 35: 81–90.

Anonyme 1: [internet] [consulté le 02.12.2020] Disponible sur:

https://fr.wikipedia.org/wiki/Macrovipera_lebetina#:~:text=C'est%20une%20tr%C3%A8s%20grosse,exceptionnellement%20d%C3%A9passer%20les%20%20m%20

Bauchot, R 1999. Les serpents. Edt. Bordas

Bellairs. A 1969. The life of Reptiles. Edt Weidenfeld and Nicolson

Bochner R., Goyffon M. L'œuvre scientifique de Césaire Phisalix (1852-1906), découvreur du sérum antivenimeux. *Bull. Soc. Herp. Fr.* (2007) 123: 15-46.

Bryan Howard, Timo Nevalinen and Gemma Peretta the COST manua of Laboratory Animal care and Use Refinement, Reduction, and research page 278

Burnouf T et al. Assessment of the viral safety of antivenoms fractionated from equine plasma. *Biologicals*, 2004, 32: 115–128.

Bush SP, Ruha A-M, Seifert SA, Morgan DL, Lewis BJ, Arnold TC, et al. Comparison of F(ab')₂ versus Fab antivenom for pit viper envenomation: A prospective, blinded, multicenter, randomized clinical trial. *Clin Toxicol (Phila)*. janv. 2015 ; 53(1) : 37-45.

Calmette A. L'immunisation artificielle des animaux contre le venin des serpents, et la thérapeutique expérimentale des morsures venimeuses. *C. R. Soc. Biol.*, 1894, 46, 120-

124. Calvete JJ, Sanz L, Angulo Y, Lomonte B, Gutiérrez JM. Venoms, venomics, antivenomics. FEBS Letters. 5 juin 2009, 583(11), 1736-43.

Chippaux J.-P. Snake-bites: appraisal of the global situation. Bull. World Health Organ., 1998, 76, 515-524. Bull. Acad. Natle Méd., 2013, 197, nos 4-5, 993-1008, séance du 9 avril 2013 1

Chippaux J.-P., Goyffon M. Venoms, antivenoms and immunotherapy. Toxicon, 1998, 36, 823-846.

Chippaux J.-P., Stock R.P., Massougbodji A. Methodology of clinical studies dealing with the treatment of envenomation. Toxicon, 2010, 55, 1195-1212.

Chippaux J.-P., Williams V., White J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. Toxicon, 1991, 29, 1279-1303.

Chippaux J.P.:venin de serpent et envenimation. IRD, édition, Paris ,2002-288p.

Chippaux J-P. Role of antivenoms in the treatment of snake envenomation. Bull Acad Natl Med. 2013 ; 197(4-5) : 993-1006 ; discussion 1006-8.

Chippaux J-P ; Guyffon M. La sérothérapie antivenimeuse : Ses application, Ses limites, Son avenir ; Bulletin de La Société De Pathologie Toxique Ex., 84, 1991, 286-291

Chippaux JP, Goyffon M. Producers of antivenomous sera. Toxicon. 1983, 21(6) 739-52.

Chippaux J-P, Goyffon M. Venoms, antivenoms and immunotherapy. Toxicon. 1 juin 1998; 36(6): 823-46.

Chippaux JP, Williams V, White J. Snake venom variability: Methods of study, results and interpretation. Toxicon, 1991, 29: 1279–1303.

Chippaux J-P. Epidemiology of snakebites in Europe : A systematic review of the literature. Toxicon. janv. 2012 ; 59(1) : 86-99.

Chippaux J-P. Morsures et envenimations ophidiennes. Revue Française des Laboratoires, 2002, n°342, 55-60.

Chippaux J-P. Snake-bites: appraisal of the global situation. Bulletin of the World Health Organization, 1998, 76: 515–524. CHIPPAUX, Jean-Philippe. Venins de serpent et envenimations. IRD Editions, 2002. ISBN : 2-7099-1507-3.

Chippaux. J-P 1999. Les serpents d'Afrique occidentales et centrale. Edt IRD

Chippaux J.P.: Serpent d'Afrique Occidentale et Centrale.les Serpents et l'environnement.2000. Disponible sur : <http://www.mpl.ird.fr/serpents/benin.html>.

Chippaux J-P : Prise en charge des morsures de serpent en Afrique subsaharienne. Médecine et Santé Tropicales 2015; 25 : 245-248

Chotwiwatthanakun, C., et al., Production of potent polyvalent antivenom against three elapid venoms using a low dose, low volume, multi-site immunization protocol. Toxicon, 2001. 39(10): p. 1487-94

Daguet A, Watier H. La sérothérapie, entre innovations thérapeutiques et progrès scientifiques à la fin du XIXe s. et au XXe s. La revue du praticien, octobre 2012, vol.62, 1177-1181.

David R., Theakston G., Smith Damon C. Antivenoms : A Review of Current Status and Future Developments. BioDrugs, 1997 :7(5) : 366-375.

Diàz Michèle, Chronique science, Une inquiétante pénurie de serum antivenin publié le 02.07.2016 [consulté le 06.12.2020] disponible sur:

<https://www.rfi.fr/fr/emission/20160703-une-inquietante-penurie-serum-antivenin>

Dos Santos MC et al. Purification of F(ab')₂ anti-snake venom by caprylic acid : a fast method for obtaining IgG fragments with large neutralization activity, purity and yield. Toxicon, 1989, 27 : 297-303. 68. Morais V, Massaldi H. Effect of pepsin digestion on the antivenom activity of equine immunoglobulins. Toxicon. 15 déc. 2005 ; 46(8) : 876-82. 69.

Dramé B.S.I : les accidents d'envenimations par morsure de serpent au service des urgences chirurgicales de l'hôpital Gabriel Touré. Th. Doc. Med, Bamako, 2000,75p

Erb, K., and J.Hau. 1994. Monoclonal and polyclonal antibodies. Handbook of Laboratory Animal Science 1:293-309

Espino-Solis GP, Riaño-Umbarila L, Becerril B, Possani LD. Antidotes against venomous animals : State of the art and perspectives. Journal of Proteomics. 6 mars 2009 ; 72(2) : 183-99.

Fernandes A, Kaundinya JO, Daftary G, Saxena L, Banerjee S, Pattnaik P. Chromatographic purification of equine immunoglobulin G F(ab')₂ from plasma. *Journal of Chromatography B.* 1 déc. 2008 ; 876(1) : 109-15.

Freley.J 1987. Guide des reptiles de France. Edt Hatier

G. Mion, F. Olive, D. Giraud, E. Lambert, C. Descraques, E. Garrabé & M. Goyffon. Surveillance clinique et biologique des patients envenimés. *Bull Soc Pathol Exot,* 2002, 95, 3, 139-143.

Goyffon M. L'immunothérapie passive aujourd'hui : bref historique. *Biologie Aujourd'hui.* 2010 ; 204(1) : 51-4.

GOYFFON, Max. Les sérums antivenimeux : crise actuelle de leur production et conséquence. *Annales de l'Académie de Mâcon, supplément au tome 6,* 2012

Gutiérrez JM et al. Pan-African polyspecific antivenom produced by caprylic acid purification of horse IgG : an alternative to the antivenom crisis in Africa. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene,* 2005, 99 : 468–475.

Gutiérrez JM, Lomonte B, León G, Alape-Girón A, Flores-Díaz M, Sanz L, et al. Snake venomomics and antivenomics : Proteomic tools in the design and control of antivenoms for the treatment of snakebite envenoming. *Journal of Proteomics.* 6 mars 2009, 72(2): 165-82.

Gutiérrez J-M. et al. A multicomponent strategy to improve the availability of antivenom for treating snakebite envenoming. *Bull World Health Organ* 2014, 92 :526-532

Gutiérrez JM. Improving antivenom availability and accessibility: Science, technology, and beyond. *Toxicon.* 15 sept 2012; 60(4): 676-87.

Gutiérrez JM. Improving antivenom availability and accessibility: Science, technology, and beyond. *Toxicon.* 15 sept 2012; 60(4): 676-87.

Howard, Timo Nevalinen and Gemma Peretta the COST manual of Laboratory Animal care and Use Refinement, Reduction, and research page 279

Hsiang AY, Field DJ, Webster TH, Behlke AD, Davis MB, Racicot RA, et al. The origin of snakes: revealing the ecology, behavior, and evolutionary history of early snakes using

genomics, phenomics, and the fossil record. *BMC Evolutionary Biology*. 20 mai 2015; 15 :87.

Jones RGA, Landon J. A protocol for 'enhanced pepsin digestion: a step by step method for obtaining pure antibody fragments in high yield from serum. *Journal of Immunological Methods*, 2003, 275: 239–250.

Kasturiratne A et al. Estimating the global burden of snakebite: A literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. *PLoS Medicine*, 2008.

Kini RM, Evans HJ. Effects of snake venom proteins on blood platelets. *Toxicon*. 1 janv. 1990 ; 28(12) : 1387-422.

Lambin P. Les sous classes d'immunoglobulines IgG Aspects biochimiques et cliniques. *Revue Française de Transfusion et d'Hémodiologie*. 1 oct. 1989 ; 32(5) : 357-76.

Landon, J. and D. Smith, Merits of sheep antisera for antivenom manufacture. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*, 2003 22 : p. 15-22.

Landon, J., J.A. Woolley, and C. McLean, Antibody production in the hen, in *Therapeutic antibodies*. , J. Landon and T. Chard, Editors. 1995 Springer-Verlag: London. p. 47-68.

Larréché S, Boucau C, Erauso T, Mion G. Envenimations ophidiennes graves. *Le Praticien en Anesthésie Réanimation*. 1 sept 2010 ; 14(4) : 254-63.

Leo O, Cunningham A, Stern PL. Vaccine immunology. *Perspectives in Vaccinology*. 1 août 2011 ; 1(1) : 25-59.

Lignes directrices du CCPA : production d'anticorps.2002 consulté le 08/06/2020 disponible sur :

https://www.ccac.ca/Documents/Normes/Lignes_directrices/Production_anticorps.pdf

MION.G, OLIVE F. Envenimation par vipères en Afrique. *Réanimation en médecine tropicale* : 1998 ; 349-365.

Mohanty JG, Elazhary Y. Purification of IgG from serum with caprylic acid and ammonium sulphate precipitation is not superior to ammonium sulphate precipitation alone. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 1 janv. 1989; 12(4) : 153-60. 64.

Moroz-Perlmutter C et al. Detoxification of snake venoms and venom fractions by formaldehyde. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1963, 112 :595–598.

Nguyen L. Production d'immunoglobulines thérapeutiques hautement purifiées (ITHP): analyse d'un procédé de purification. Biologie Aujourd'hui. 2010, 204(1): 55-9.

OMS — Application for inclusion of equine F(ab')₂ antivenoms in the WHO model list for essential medicines.

OMS 2006: World Health Organization. Guidelines on tissue infectivity distribution in transmissible spongiform encephalopathies. 2006

<http://www.who.int/bloodproducts/cs/TSEPUBLISHEDREPORT.pdf>.

OMS. 2016 : Disponible sur :

https://www.who.int/biologicals/ECBS_2016_BS2300_WHO_Guidelines_antivenom_clean1.pdf

OMS. Sérums antivenimeux [Internet] [cité 24.10.2020]. Disponible sur : <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs337/fr/>

OMS,2018: WHO Guidelines for the Production, Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins. [Internet] [Consulté 24.10.2020] Disponible sur:

http://www.who.int/bloodproducts/snake_antivenoms/snakeantivenomguide/en/

OMS,1971: WHO Blood Products and related Biologicals Animal sera Antivenoms frames page [Internet] [Consulté 24.10.2020]. Disponible sur :

<http://apps.who.int/bloodproducts/snakeantivenoms/database/>

Otero R et al. A randomized blinded clinical trial of two antivenoms, prepared by caprylic acid or ammonium sulfate fractionation of IgG, in Bothrops and Porthidium snake bites in Colombia : correlation between safety and biochemical characteristics of antivenoms. Toxicon, 1999, 37 : 895–908.

Perosa F, Carbone R, Ferrone S, Dammacco F. Purification of human immunoglobulins by sequential precipitation with caprylic acid and ammonium sulphate. Journal of Immunological Methods. 1 janv. 1990 ; 128(1) : 9-16.

Pratanaphon R, Akewan S, Khow O, Sriprapat S, Ratanabanangkoon K. Production of highly potent horse antivenom against the Thai cobra (*Naja kaouthia*). *Vaccine*. oct. 1997; 15(14) : 1523-8.

Pratanaphon, R., et al., Production of highly potent horse antivenom against the Thai cobra (*Naja kaouthia*). *Vaccine*, 1997. 15(14): p. 1523-8.

Rabies and envenomings, a neglected public health issue. Report of a Consultative Meeting. Geneva, World Health Organization, 2007 Disponible sur : http://www.who.int/bloodproducts/animal_sera/Rabies.pdf

Raweerith R, Ratanabanangkoon K. Fractionation of equine antivenom using caprylic acid precipitation in combination with cationic ion-exchange chromatography. *Journal of Immunological Methods*, 2003, 282 : 63–72.

Reed, S.G., et al., The science of vaccine adjuvants: advances in TLR4 ligand adjuvants. *Curr Opin Immunol*, 2016. 41: p. 85-90

Reed, S.G., et al., The science of vaccine adjuvants: advances in TLR4 ligand adjuvants. *Curr Opin Immunol*.

Reimann F. English: French *Vipera aspis aspis* seen in the wild, 2011 [Internet] [Consulté 24.10.2020], disponible sur :

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Vipera_aspis_aspis.jpg

Saetang T et al. Quantitative comparison on the refinement of horse antivenom by salt fractionation and ion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography*, 1997, 700 : 233–239.

Solano S, Segura Á, León G, Gutiérrez J-M, Burnouf T. Low pH formulation of whole IgG antivenom : Impact on quality, safety, neutralizing potency and viral inactivation. *Biologicals*. Mars 2012 ; 40(2) : 129-33.

Swaroop S, Grab B. Snakebite mortality in the world. *Bull World Health Organ*. 1954 ; 10(1) : 35-76.

Theakston RDG, Warrell DA, Griffiths E. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. *Toxicon*, 2003, 41 : 541–557.

Theakston, R.D., D.A. Warrell, and E. Griffiths, Report of a WHO workshop on the

standardization and control of antivenoms. *Toxicon*, 2003. 41(5): p. 541-57.

Thomas J. Kindt, Richard A. Goldsby, Barbara A. Osborne, Kuby J. Kuby immunology. 6th Ed. New York : W.H. Freeman, 2007, 574p [Internet] [cité 24.10.2020]. Disponible sur : <https://muhammad1988adeel.files.wordpress.com/2011/04/kuby-immunology6th-edition.pdf>. ISBN : 9780716785903.

Ulrich gruber 2002, guide encyclopédique des serpents Editions Artemis Guide des serpents U.Gruber Delachaux et Niestlé ;Ces étranges animaux venus de la Préhistoire Editions Atlas disponible

sur : https://www.dinosoria.com/vipere_corne.htm

Yang CC. Chemistry and evolution of toxins in snake venoms. *Toxicon*. 1 janv. 1974 ; 12(1) : 1-2.

Références Bibliographiques des Figures

Figure 1: WHO Blood Products and related Biologicals Animal sera Antivenoms frames page. [Internet] [Consulté 24.10.2020]. Disponible sur : <http://apps.who.int/bloodproducts/snakeantivenoms/database/>

Figure 2 : Anonyme 2 [Internet] [Consulté 24.10.2020] Disponible sur <https://www.paulstarosta.com/serpents/h4DD98EC8#h4dd97ab8>

Figure 3 : Hellebuyck, Tom 2016. Picture: Milos viper (*Macrovipera lebetina*). Litteratura Serpentium 36 (3): 110 - [Internet] [Consulté 24.10.2020]. Disponible sur : <https://www.snakesociety.nl/jaargangenoverzicht-e.htm>

Figure 4 : Michel Le Blanc 1998 ; Réptiles en captivité [Internet] [Consulté 24 Oct.2020] Disponible sur : <https://www.reptilesencaptivite.com/?id=3214>

Figure 5: Jp C. Role of antivenoms in the treatment of snake envenomation. Bull Acad Natl Med. 2013 ; 197(4-5) : 993-1006 ; discussion 1006-8.

Figure 6: Rabies and envenomings, a neglected public health issue. Report of a Consultative Meeting. Geneva, World Health Organization, 2007 [Internet] [Consulté 24.10 2020]. Disponible sur : http://www.who.int/bloodproducts/animal_sera/Rabies.pdf

Figure7: Anonyme 3 [Internet] [Consulté 24.10.2020] Disponible sur : <https://www.toutsurlatransfusion.com/immunohematologie/anticorps/structure.php>

Figure8 : Anonyme 4 : Le venin, une arme biologique redoutable [Internet] [Consulté 14.10.2020]. Disponible sur : http://www.allodocteurs.fr/se-soigner/medicaments/le-venin-une-arme-biologiqueredoutable_17517.html

Figure9 : OMS ,2018 [Internet] [Consulté 24.10.2020] Disponible sur : https://www.who.int/biologicals/ECBS_2016_BS2300_WHO_Guidelines_antivenom_clean1.pdf

Figure 10 : Memoire Online - Utilisation des produits biologiques d'origine équine en thérapeutique humaine - Geraud Chancelin HELLOW TEJIOZEM [Internet] [consulté le 15.07.2020] Disponible sur : http://www.memoireonline.com/01/08/863/m_utilisation-produits-

biologiquesorigine-equine-therapeutique-humaine1.html

Figure 11 : Memoire Online - Utilisation des produits biologiques d'origine équine en thérapeutique humaine - Geraud Chancelin HELLOW TEJIOZEM [Internet] [consulté le 15.07.2020] Disponible sur :

http://www.memoireonline.com/01/08/863/m_utilisation-produits-biologiquesorigine-equine-therapeutique-humaine1.html

Figure 12: Chippaux J.-P. Snake-bites: appraisal of the global situation. Bull. World Health Organ.,1998, 76, 515-524.

Figure 13: Chippaux J.P:venin de serpent et envenimation. IRD, édition, Paris,2002

Références Bibliographiques des tableaux

Tableau 1 : Chippaux J.-P. — Immunothérapie d'urgence : antivenins de serpent et scorpion. Biol. Aujourd'hui, 2010, 204, 61-70.

Tableau 2 : Chippaux J-P « Snake morsures : bilan d'une situation globale », Bull. OMS ; 1998, 76 (5) p 520. Disponible sur [Internet]. [Consulté le 24.10.2020]. Disponible sur : <http://mednet3.who.int/EML/expcom/expcom15/applications/newmed/equine/antivenoms.pdf>

Résumé :

Les sérums antivenimeux sont préparés à partir du plasma d'animaux préalablement hyperimmunisés contre le venin pertinent.

Lors de son injection à un patient envenimé, le sérum antivenimeux neutralise le venin utilisé pour sa production. C'est la sérothérapie antivenimeuse. Cette thèse a pour objectif l'exploration et la vulgarisation d'une discipline pharmacologique méconnue qui est la production des sérums antivenimeux dirigés contre les venins de serpents, appelés sérums anti-ophidiens, mais aussi d'informer sur les causes et les conséquences de la pénurie mondiale actuelle. La production des sérums anti-ophidiens doit respecter les principes qualité essentiels. Les améliorations successives des procédés de fabrication ont conduit à l'apparition de nouvelles générations de sérums anti-ophidiens dotés d'une tolérance et d'une efficacité accrues. Bien que les sérums anti-ophidiens constituent le seul traitement spécifique efficace et sûr contre les envenimations par morsure de serpent, ceux-ci restent indisponibles pour des milliers de victimes à travers le monde. Cette pénurie est un véritable problème de santé publique, particulièrement en Afrique subsaharienne et dans certains pays d'Asie où la rupture d'approvisionnement est imminente.

Mots clés : Sérum anti-ophidien, Morsure de serpent, Venin, Envenimation, Sérothérapie, Production, Immunoglobuline G - Pénurie.

Abstract:

Antivenoms are prepared from the plasma of animals previously hyperimmunized against the relevant venom.

When injected into a poisoned patient, the antivenom neutralizes the venom used for its production. This is called serotherapy or antivenom immunotherapy.

This thesis aims to present the different stages in the development of antivenoms directed against snake venoms, called anti-ophidial serum, but also to provide information on the causes and consequences of the current global shortage. The production of anti-ophidial serums must respect the essential quality principles. Successive improvements in manufacturing processes have led to the emergence of new generations of anti-ophidial sera with increased tolerance and efficacy.

Although anti-ophidial sera are the only effective and safe specific treatment for snakebite envenomation, they remain unavailable to thousands of victims around the world. This shortage is a real public health problem, especially in sub-Saharan Africa and in some Asian countries where supply disruption is imminent.

Keywords: Anti-ophidian serum, Snake bite, Venom, Envenomation, Serotherapy, production Immunoglobulin G, Shortage.

ملخص

يتم تحضير مضادات السموم من بلازما الحيوانات التي سبق تحصينها ضد السم ذي الصلة عند حقنه في مريض مصاب بالسم، فإن مضاد السم يحيد السم المستخدم في إنتاجه. وهذا ما يسمى بالعلاج المصلي أو العلاج المناعي المضاد للسم. تهدف هذه الأطروحة إلى عرض المراحل المختلفة لإنتاج مضادات السموم الموجهة ضد سموم الثعابين، والتي تسمى الأمصال المضادة للسموم، ولكنها تهدف أيضًا إلى تقديم معلومات عن أسباب وعواقب النقص الحالي. يجب أن يحترم إنتاج الأمصال المضادة للالتهابات مبادئ الجودة الأساسية. أدت التحسينات المتتالية في عمليات التصنيع إلى ظهور أجيال جديدة من الأمصال المضادة لسموم الثعابين مع زيادة التحمل والفعالية. على الرغم من أن الأمصال المضادة للالتهابات هي العلاج الوحيد الفعال والأمن للتسمم الناتج عن لدغات الأفاعي، إلا أنها لا تزال غير متاحة لآلاف الضحايا حول العالم. هذا النقص هو مشكلة صحية عامة حقيقية، لا سيما في أفريقيا جنوب الصحراء الكبرى وفي بعض البلدان الآسيوية حيث انقطاع الإمدادات وشيك

الكلمات المفتاحية : مصل مضاد سموم الثعابين - لدغة الأفعى - السم - العلاج المصلي - الإنتاج - الغلوبولين المناعي G - النقص