

# Recommandations pour la production, le contrôle et l'enregistrement des immunoglobulines antivenimeuses

Jean-Philippe Chippaux

Unité de recherche « Santé de la mère et de l'enfant en milieu tropical », (IRD UR010), Université Paris Descartes, 4 avenue de l'Observatoire, 75270 Paris Cedex 06, France

Auteur correspondant : Jean-Philippe Chippaux, [jean-philippe.chippaux@ird.fr](mailto:jean-philippe.chippaux@ird.fr)

Reçu le 6 décembre 2009

**Résumé** – Les envenimations, malgré leur fréquence et leur gravité élevées, constituent un problème de santé publique négligé par les autorités sanitaires de la plupart des pays en développement. L'inaccessibilité des antivenins, notamment en Afrique subsaharienne, demeure une préoccupation majeure de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) qui a réuni depuis 2007 des experts internationaux pour améliorer la fabrication, le contrôle de qualité, l'enregistrement et l'emploi des antivenins. Les recommandations issues de ces réunions d'experts devraient favoriser l'accessibilité des antivenins et leur utilisation par les services de santé pour réduire significativement, à court terme, la morbidité et la mortalité par morsures de serpent.

**Mots clés** : Immunothérapie / sérum antivenimeux / envenimations / serpents / Organisation Mondiale de la Santé

**Abstract** – Guidelines for the production, control and regulation of snake antivenom immunoglobulins.

Although frequent and severe, envenomations represent a neglected public health problem in most of the developing countries. Access to antivenoms is poor, mainly in Sub-Saharan Africa, and remains a major concern to World Health Organization (WHO). Since 2007, WHO committed international experts to propose guidelines aiming to improve the manufacture, quality control, registration and use of antivenoms. These guidelines, which will be published soon, should promote access to antivenoms, and their use by health services, leading in the short term to a significant decrease of snakebite morbidity and mortality.

**Key words**: Immunotherapy / antivenom / envenomations / snakes / World Health Organization

## Introduction

Les envenimations représentent un problème de santé publique encore négligé, d'une part parce qu'elles sont prépondérantes dans les pays en développement, notamment dans les régions tropicales, et d'autre part parce que leur traitement n'est pas standardisé et encore trop souvent inaccessible (Stock *et al.*, 2007).

L'évaluation exacte de la charge morbide et de la mortalité dues aux envenimations reste difficile parce qu'elle est essentiellement basée sur des études ponctuelles menées par des cliniciens ou des

épidémiologistes et non sur un recueil exhaustif des cas par les autorités sanitaires nationales (Chippaux, 2008). En outre, la prise en charge des envenimations est complexe car elle repose sur l'accessibilité d'un traitement étiologique, les immunoglobulines antivenimeuses, adapté à la faune locale et de bonne qualité. Il est, en effet, désormais admis qu'en cas d'envenimation sévère, une immunothérapie pertinente et effectuée dans de bonnes conditions permet de sauver une vie ou d'éviter une invalidité permanente.

Dès la fin des années 90, plusieurs auteurs ont souligné les difficultés d'approvisionnement en antivenins,

notamment en Afrique (Chippaux, 1998; Theakston & Warrell, 2000; Theakston *et al.*, 2003). L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) s'est saisie de ce problème en faisant inscrire les immunoglobulines thérapeutiques dans la liste des médicaments essentiels. De plus, dès janvier 2007, elle a invité tous les acteurs concernés par le problème des envenimations : agences de financement, fabricants d'immunoglobulines, responsables nationaux de l'enregistrement des produits biologiques, toxicologues, zoologistes et cliniciens, à une réunion à Genève pour discuter des mesures à prendre. Cette réunion a montré la nécessité de faire des recommandations pour la production, le contrôle de qualité des processus de fabrication et l'enregistrement des immunoglobulines antivenimeuses afin d'en promouvoir la distribution et l'utilisation, puis de mettre en place une action concertée dans le but d'assurer un traitement adéquat des accidents d'envenimation, notamment dans les pays en développement.

Cette première réunion a remarqué que les décès ou les invalidités par envenimations étaient évitables grâce à trois actions qui pouvaient être coordonnées par l'OMS avec l'appui des experts et des autorités sanitaires nationales (WHO, 2007) :

- (a) un approvisionnement suffisant d'immunoglobulines antivenimeuses de qualité contrôlée,
- (b) une amélioration de la politique de distribution et de la logistique,
- (c) une formation appropriée sur la prise en charge clinique et le traitement.

## 1 Préparation des recommandations pour la production, le contrôle et l'enregistrement des immunoglobulines antivenimeuses

Une proposition de recommandations a été rédigée par un comité international d'experts puis discutée et amendée lors d'ateliers régionaux réunissant, (a) des toxicologues, cliniciens ou épidémiologistes spécialistes des envenimations, (b) des représentants des autorités nationales d'enregistrement des médicaments et (c) des représentants des fabricants d'immunoglobulines de la région concernée. De tels ateliers se sont réunis en Amérique latine (São Paulo, juin 2006; Gutiérrez *et al.*, 2006), Asie (Jakarta, mai 2008) et Afrique-Méditerranée (Addis-Abeba, juillet 2008).

La synthèse de ces travaux a été approuvée par le comité d'experts sur la standardisation des produits biologiques en octobre 2008. La rédaction finale est terminée et le document sera publié en 2010. Simultanément, des annexes seront postées sur le site Web

de l'OMS. Ces annexes contiendront (a) la liste des serpents venimeux dangereux, significatifs aux plans épidémiologique et clinique, ainsi que leur distribution géographique (b) la liste des producteurs qui ont accepté de fournir toutes les précisions requises sur les méthodes de fabrication de leurs immunoglobulines antivenimeuses, (c) la liste des immunoglobulines qui ont fait l'objet d'études pré-cliniques et/ou cliniques publiées dans des revues à comité de lecture, reconnaissant leur intérêt thérapeutique pour la région concernée.

Il faut souligner que la production d'immunoglobulines antivenimeuses fait appel à des techniques anciennes ou tombées dans le domaine public et, par conséquent, non protégées au titre de la propriété intellectuelle.

### 1.1 Identification et distribution des serpents venimeux

L'identification des serpents venimeux présents dans une région est un facteur déterminant, à la fois pour mesurer le risque qu'ils représentent et pour entreprendre la fabrication des immunoglobulines antivenimeuses.

Les serpents venimeux médicalement importants ont été désignés sur la base de la littérature herpétologique et clinique en les classant en deux groupes en fonction de leur fréquence et/ou de la toxicité du venin, c'est-à-dire de leur contribution à la charge de morbidité et de mortalité dans chaque pays ou région.

Il apparaît donc crucial non seulement que l'identification zoologique des serpents dont le venin est utilisé pour la fabrication des antivenins soit la plus précise possible, mais aussi que l'origine et les caractéristiques de chaque spécimen soient enregistrées afin d'assurer la traçabilité des échantillons de venin. Il est en effet très important que chaque immunisation puisse être associée précisément aux spécimens de serpents dont le venin a été utilisé, car les dénominations changent et il devient rapidement impossible de se fier à la seule nomenclature zoologique.

Ce travail avait pour but de définir les principales cibles pour la fabrication des antivenins ou pour faciliter leur choix par les autorités sanitaires nationales.

### 1.2 Préparation des antigènes – immunisation des animaux

La préparation des antigènes servant à l'immunisation des animaux utilisés pour la fabrication des antivenins est une étape décisive. Les antivenins monovalents sont préparés à l'aide du venin d'une seule espèce venimeuse, tandis que les antivenins polyvalents utilisent les venins de plusieurs espèces. Le

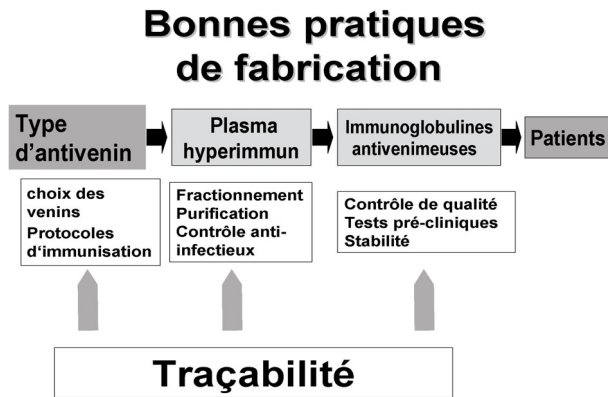


Fig. 1. Bonnes pratiques appliquées à la fabrication des immunoglobulines antivenimeuses.

choix de l'un ou l'autre type dépendra des conditions épidémiologiques et cliniques de la région où les antivenins seront utilisés. Plusieurs procédures peuvent être appliquées selon que les venins sont inoculés ensemble ou séparément, ou que les plasmas des animaux immunisés ont été mélangés avant ou après leur purification. Il semble que les résultats obtenus par ces différentes techniques dépendent surtout du savoir-faire de chaque producteur. L'efficacité de l'antivenin polyvalent est similaire à celle du monovalent correspondant (voir Chippaux, 2010).

Les animaux immunisés pour la fabrication des immunoglobulines antivenimeuses doivent être en parfaite condition physique. Ils suivront un programme approprié de surveillance sanitaire, de vaccinations, de nutrition et de mise en condition. Les protocoles d'immunisation varient selon les fabricants.

### 1.3 Recueil et fractionnement du plasma

Le recueil du plasma, son fractionnement et sa purification devront être effectués dans des conditions de bonne pratique de fabrication (figure 1).

La traçabilité de chaque opération est indispensable pour permettre toutes les vérifications ultérieures. En outre, à chaque étape, des contrôles de qualité, notamment concernant la capacité neutralisante, sont pratiqués.

Le plasma sera débarrassé des protéines autres que les immunoglobulines en utilisant le plus souvent la précipitation par du sulfate d'ammonium ou de l'acide caprylique. Le produit final peut être constitué d'immunoglobulines entières, obtenues de préférence par précipitation par l'acide caprylique, ou de fragments d'immunoglobuline :  $F(ab')_2$  après digestion par la pepsine ou Fab après digestion par la papaïne.

### 1.4 Contrôle du risque infectieux

Outre la prévention exercée au niveau du cheptel (contrôle des maladies infectieuses) et les mesures d'asepsie prises lors de la préparation des immunoglobulines, les fabricants doivent appliquer des techniques de neutralisation ou d'élimination des agents infectieux, notamment viraux.

Ces techniques peuvent être chimiques (conservateurs) ou physiques (filtration, pasteurisation), à condition que leur efficacité soit démontrée et qu'elles n'affectent ni la sécurité, ni la capacité neutralisante du produit final (Burnouf *et al.*, 2004, 2005).

L'OMS encourage les fabricants à démontrer l'efficacité des techniques de purification des immunoglobulines (digestion enzymatique, précipitation saline ou à pH acide, traitement par la chaleur, etc.) pour la neutralisation ou l'élimination des agents infectieux.

### 1.5 Vérification pré-clinique des immunoglobulines antivenimeuses

Les tests permettant de fournir un profil de purification, utile notamment pour évaluer le degré de sécurité, et de mesurer la capacité du produit final à neutraliser le venin, constituent un minimum requis pour obtenir l'enregistrement de l'antivenin. Quelques tests simples, comme l'électrophorèse en *SDS-PAGE*, permettent d'évaluer la purification des fragments d'immunoglobulines et la présence de protéines ou d'agrégats inutiles ou dangereux (Ramos-Cerillo *et al.*, 2008). Ces tests peuvent être effectués par des laboratoires indépendants à faible coût pour confirmer les spécifications du fabricant.

La mesure de la toxicité du venin sur un modèle animal, généralement la dose létale 50 % sur la souris, et de la capacité de neutralisation correspondante exprimée en dose efficace 50 %, également chez la souris, sont les tests les plus pertinents. Les autorités sanitaires nationales chargées de l'enregistrement sont invitées à les demander aux fabricants pour chaque type d'immunoglobulines commercialisées et, de préférence, pour chaque lot produit.

### 1.6 Validation clinique des immunoglobulines antivenimeuses

Les essais cliniques randomisés constituent une situation idéale qui ne peut être demandée pour chaque produit, ni dans chaque pays. D'autres types d'études cliniques sont possibles et peuvent être préconisées par les autorités sanitaires nationales chargées de l'enregistrement des immunoglobulines antivenimeuses. Ces études visent à évaluer la tolérance de ces dernières et à établir les posologies nécessaires (Chippaux *et al.*,

en cours de publication). Les études cliniques prospectives seront privilégiées. Enfin, l'OMS incite les autorités sanitaires à entreprendre des études de pharmacovigilance après la commercialisation du produit. Elles permettront de confirmer l'efficacité et la tolérance du produit et d'optimiser son utilisation.

## 2 Problèmes posés par la fabrication des immunoglobulines antivenimeuses

Divers problèmes ont été identifiés lors des ateliers de préparation de ces recommandations. Certaines touchent à la fabrication des immunoglobulines, à leur mise sur le marché ou à leur utilisation en pratique médicale courante.

### 2.1 Difficultés lors de la fabrication

Certains fabricants mentionnent une perte importante de rendement lors de la purification des immunoglobulines, ce qui conduit à une baisse de la capacité neutralisante du produit final. Les variations de titres entre les lots de plasma sont fréquentes.

Les techniques de lyophilisation ne sont pas toujours bien maîtrisées, ce qui augmente le temps de dissolution des immunoglobulines et entraîne parfois des risques d'agrégats avec, pour conséquence, une moindre tolérance.

En outre, il a été souligné que certains producteurs ne pouvaient pas toujours assurer une bonne traçabilité de leurs produits (origine des venins, purification du plasma, etc.).

### 2.2 Difficultés lors de l'enregistrement et de la mise sur le marché

Peu de pays en développement disposent des capacités d'enregistrement leur permettant de contrôler eux-mêmes la conformité des produits qui leur sont proposés. D'une part, la connaissance de la problématique spécifique (espèces venimeuses présentes dans le pays, antivenins disponibles) est faible. D'autre part, ils ne possèdent généralement pas d'infrastructures pour effectuer les tests de vérification nécessaires. C'est pourquoi il leur est conseillé de demander aux fabricants de leur fournir des dossiers comportant les résultats de ces tests, si possible effectués par des laboratoires indépendants.

De plus, les autorités sanitaires ne connaissent pas la situation épidémiologique qui leur permettrait de formuler précisément les besoins quantitatifs, qualitatifs et géographiques en antivenins.

### 2.3 Difficultés lors de l'utilisation clinique

La formation du personnel de santé ne permet pas une prise en charge efficiente des envenimations, notamment dans les structures sanitaires périphériques. Le mode d'administration, les doses, la surveillance des patients lors du traitement ne sont pas suffisamment standardisés.

On constate fréquemment que des doses inutilement élevées, traduisant parfois une insuffisance de la capacité de neutralisation de l'antivenin, sont administrées aux patients. Cela peut avoir des conséquences graves en termes d'effets indésirables, sans parler du coût de telles pratiques.

En outre, le recueil des données de pharmacovigilance est inexistant dans de nombreux pays.

## Perspectives et conclusion

La prochaine réunion des acteurs de l'immunothérapie passive, qui rassemblera experts en herpétologie et toxicologie, cliniciens, représentants des fabricants, délégués des autorités sanitaires chargées de l'enregistrement des immunoglobulines antivenimeuses et agences ou organismes de financement, se tiendra en février 2010 à Genève. Outre la présentation des recommandations actuellement sous presse (WHO, en cours de publication), elle aura pour but de préparer la mise en œuvre de ces recommandations et l'amélioration de la prise en charge thérapeutique des envenimations dans les pays en développement.

Une aide devra être proposée aux fabricants pour qu'ils suivent les recommandations et qu'ils améliorent leur production, notamment en termes de capacité de neutralisation des venins, de sécurité et de traçabilité des antivenins.

Le soutien le plus important concernera les autorités sanitaires nationales. Leurs capacités d'enregistrement des produits devront être augmentées, tant au niveau des connaissances herpétologiques que des moyens de vérification de la qualité des produits proposés. La mise en ligne par l'OMS de la liste des serpents venimeux et de leur distribution est certes une première étape essentielle. Mais il est nécessaire d'identifier des laboratoires indépendants, si possible régionaux, qui seront en mesure de les aider à vérifier la qualité des immunoglobulines antivenimeuses.

En outre, il devient urgent de développer des compétences nationales pour assurer le recueil de données épidémiologiques afin de préciser les besoins thérapeutiques, notamment les quantités d'antivenins nécessaires.

Les politiques d'approvisionnement en antivenins devront être également définies en fonction des résultats épidémiologiques et cliniques. Cela comprend

l'évaluation des besoins et la gestion des stocks d'antivenins. Des recherches sur le coût socio-économique des envenimations pourraient permettre d'ajuster les efforts et de mobiliser les fonds indispensables afin d'alléger les charges financières qui pèsent le plus souvent sur les seules victimes.

Ces efforts concertés, que l'OMS s'efforce de coordonner, devraient pouvoir réduire significativement ce problème de santé publique.

## References

- Burnouf T., Griffiths E., Padilla A., Seddik S., Stephano M.A., Gutiérrez J.M., Assessment of the viral safety of antivenoms fractionated from equine plasma. *Biologicals*, 2004, 32, 115-128.
- Burnouf T., Radosevich M., Goubran H.A., Willkommen H., Place of nanofiltration for assuring viral safety of biologicals. *Curr Nanosci*, 2005, 1, 189-201.
- Chippaux J.-P., The development and use of immunotherapy in Africa. *Toxicon*, 1998, 36, 1503-1506.
- Chippaux J.-P., Estimating the global burden of snakebite can help to improve management. *PLoS Medicine*, 2008, 5, e221.
- Chippaux J.-P., Immunothérapie d'urgence : antivenins de serpents et de scorpions. *Biologie Aujourd'hui*, 2010, 204, 61-70.
- Chippaux J.-P., Stock R., Massougbdji A., Review: Methodology of clinical studies dealing with the treatment of envenomation. *Toxicon*, 2010, soumis.
- Gutiérrez J.M., Higashi H.G., Wen F.H., Burnouf T., Strengthening antivenom production in Central and South American public laboratories: Report of a workshop. *Toxicon*, 2006, 49, 30-35.
- Ramos-Cerrillo B., de Roodt A., Chippaux J.-P., Olguín L., Casasola A., Guzmán G., Paniagua-Solís J., Alagón A., Stock R.P., Characterization of a new polyvalent antivenom (*Antivipmyn Africa*<sup>®</sup>) against African vipers and elapids. *Toxicon*, 2008, 52, 881-888.
- Stock R.P., Massougbdji A., Alagón A., Chippaux J.-P., Bringing antivenom to Sub-Saharan Africa. *Nature Biotechnol*, 2007, 25, 173-177.
- Theakston R.D., Warrell D.A., Crisis in snake antivenom supply for Africa. *Lancet*, 2000, 356, 2104.
- Theakston R.D., Warrell D.A., Griffiths E., Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. *Toxicon*, 2003, 41, 541-557.
- WHO. Guidelines on Production, Control and Regulation of snake antivenom immunoglobulins, OMS, Genève, sous presse.
- WHO. Rabies and envenomings. A neglected public health issue. Report of a consultative meeting, OMS, Genève, 2007, p. 32 [http://www.who.int/bloodproducts/animal\\_sera/Rabies.pdf](http://www.who.int/bloodproducts/animal_sera/Rabies.pdf)