

# Effets du venin d'un serpent (*Bitis arietans*) et d'une plante antivenimeuse de la pharmacopée traditionnelle africaine (*Annona senegalensis*) au niveau de la jonction nerf sciatique-muscle gastrocnémien de crapaud (*Bufo regularis*)

Dr GREMA MOUSTAPHA<sup>1</sup> et Pr KONE PENAHOURE PASCAL<sup>2</sup>

1. Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Abdou Moumouni, BP 110662, Niamey Niger, gremam@yahoo  
2. Laboratoire de Physiologie animale, UFR Biosciences, Université de Cocody-Abidjan, 22 BP 582 Abidjan 22, Côte d'Ivoire

## I. Introduction

Les morsures des serpents venimeux constituent un problème médical, social et économique pour les populations rurales africaines, à faibles revenus et éloignées des centres médicaux (BON, 1994).

Le coût relativement élevé de la sérothérapie antivenimeuse (SAV) occidentale rend le recours à ce traitement, aujourd'hui plus encore, inaccessible à la majeure partie, sinon à la quasi totalité de la population africaine. Selon CHIPPAUX (1989), dans une étude menée au Bénin, 80% des personnes mordues par des serpents affirment qu'elles utilisent plutôt le traitement traditionnel que celui de la médecine moderne occidentale. Ceci s'explique d'une part par le fait que la flore africaine est riche en plantes médicinales réputées pour leur efficacité contre les morsures de serpents et d'autre part, parce que ces médicaments antivenimeux africains auraient l'avantage sur les sérums et les vaccins, d'être facilement accessibles, compatibles pour toutes

les espèces, peu onéreux et conservables à la température ordinaire.

Des études ethnobotaniques et floristiques effectuées au Niger par ADJANAHOUN et Coll. (1981) ; au Nigeria par BURKILL (1985) ; au Bénin par ADJANAHOUN et Coll. (1989) et au Ghana par ABBIW (1990) ont rapporté des activités antivenimeuses de *Annona senegalensis*.

À notre connaissance, aucune étude sur les effets antivenimeux de *Annona senegalensis* n'a été effectuée. Toutefois, il est prouvé chez *Annona senegalensis*, des activités larvicides par MACKIE et MISRA (1956) ; hypotensives par SCHNEIDER et Coll. (1973) ; antibactériennes par YEI-FEN-LIN et Coll. (1979) ; antiparasitaires par JACOBSON et OLIVER-BEVER (1986) et anti-leucémique par HUI et Coll. (1990).

Aussi, le but de ce travail a-t-il été d'établir, scientifiquement, par une expérience sur l'animal, les propriétés antivenimeuses de *Annona senegalensis*.

## II. Matériel et méthode

### 1. Préparation des extraits

Le venin de *Bitis arietans* (Ba) est prélevé manuellement sur des spécimens vivants du Serpentarium de l'Institut Pasteur d'Adiopodoumé (Côte d'Ivoire). Le venin est ensuite congelé puis

lyophilisé et conservé à 4°C (à cause de sa thermolabilité). Dans le but de rester le plus proche possible des conditions naturelles de morsures, les solutions sont préparées en diluant le venin total lyophilisé dans de l'eau bidistillée aux concentrations allant de 10<sup>-2</sup> g/ml (100 mg de venin + 10 ml d'eau bidistillée) à 10<sup>-5</sup> g/ml (1 ml de venin à 10<sup>-4</sup> g/ml + 9 ml d'eau bidistillée).

Pour la préparation de l'antivenin, les échantillons d'écorce de tige de *Annona senegalensis* (As) ont été achetés en janvier 1994 sur le marché d'Abobo à Abidjan (RCI) et authentifiés par le Dr VANGAH-Madeleine et le Prof. AKE ASSI Laurent du Centre National de Floristique (CNF) de l'Université de Cocody-Abidjan. Ces échantillons sont séchés à l'air ambiant du laboratoire puis pulvérisés au broyeur. 10 g de ce broyat d'écorce de tige sont mis en macération avec agitation magnétique constante dans 100 ml d'eau bidistillée durant 24 heures. La solution obtenue est filtrée plusieurs fois sur du coton hydrophile puis du papier filtre. Le filtrat obtenu (solution mère) à la concentration de  $10^{-1}$  g/ml (10 g de poudre + 100 ml d'eau bidistillée) et qui constitue la solution aqueuse d'antivenin, est utilisé directement, après plusieurs dilutions, pour les expérimentations, ceci afin de rester le plus près possible des conditions d'utilisation des plantes par les tradithérapeutes qui les diluent dans de l'eau.

## 2. Protocole expérimental

Ces substances pouvant être toxiques, nous avons d'abord procédé à un test toxicologique pour déterminer leur toxicité. Pour cela, nous utilisons des lots de 10 souris blanches de souche SWISS, variété Albinos, âgées de 4 à 6 semaines et de poids moyen 30 g. Nous injectons par voie intrapéritonéale, des concentrations différentes de venin ou d'antivenin à raison d'une concentration pour chaque lot et nous relevons le taux de mortalité durant 6 heures de temps pour chaque lot. Chaque condition expérimentale est répétée 3 fois ( $n=3$ ). La DL50 est déterminée en utilisant la méthode graphique de MILLER et TAINTER et la méthode par calcul de DRAGSTEDT et LANG.

Un dispositif comportant un stimulateur de type KATJI, une cuve à nerf et un oscilloscope cathodique ont permis de montrer l'effet des substances sur l'activité électrique de la préparation nerf sciatique-muscle gastrocnémien de crapaud (*Buffo regularis*). Les phénomènes électriques nerveux et musculaires apparaissant sur l'écran de l'oscilloscope sont filmés à l'aide d'une caméra Polaroid (C-5 OSCILLOSCOPE CAMERA).

Pour étudier l'action des substances sur la préparation nerf-muscle, on dépose au niveau de la jonction neuromusculaire un petit coton imbibé de la solution à tester. Pour l'étude comparée des

effets du venin et de l'antivenin, on suit pour chacune des deux substances, son effet seul dans le temps alors que pour l'antagonisme, nous plaçons le coton imbibé de l'une des substances et 15 minutes après, on remplace la première substance par la deuxième et on suit l'effet dans le temps. Là aussi, chaque condition expérimentale est répétée 3 fois ( $n=3$ ).

## 3. Analyse statistique des résultats

Pour une expérience sur un échantillon de  $n$  observations, la moyenne  $X$  obtenue sur cet échantillon de  $n$  observations suit une loi normale. Dans le cas des petits échantillons ( $n < 30$ ), la moyenne est exprimée sous la forme  $X \pm \text{ESM}$  (Erreur Standard sur la Moyenne).

$$\text{ESM} = \frac{t.s}{\sqrt{n}} \text{ avec :}$$

$t$  = valeur lue sur la table de Student au degré de liberté,  $d d l = n - 1$  à 5% de risque

$s$  = écart type estimé sur l'échantillon

## III. Résultats

### 1. Etude toxicologique

L'étude toxicologique a montré que l'injection des solutions de venin de *Bitis arietans* et de l'extrait aqueux de *Annona senegalensis* à différentes concentrations provoque des modifications de comportement caractérisées par des déplacements fréquents dans les cages, suivis des difficultés de déplacement, des convulsions et la mort des souris pour la concentration 6.10-4 g/ml de venin.

Nous avons enregistré des mortalités avec le venin de *Bitis arietans* alors que nous n'avons pas noté de mort avec les concentrations testées de l'extrait aqueux de *Annona senegalensis* malgré la présence des signes décrits plus-haut.

Nous avons obtenu, pour le venin de *Bitis arietans*, une DL50 de 2,28mg/kg de poids corporel par la méthode graphique (**figure 1**) et une DL50 de 2,13mg/kg de poids corporel par la méthode de calcul.

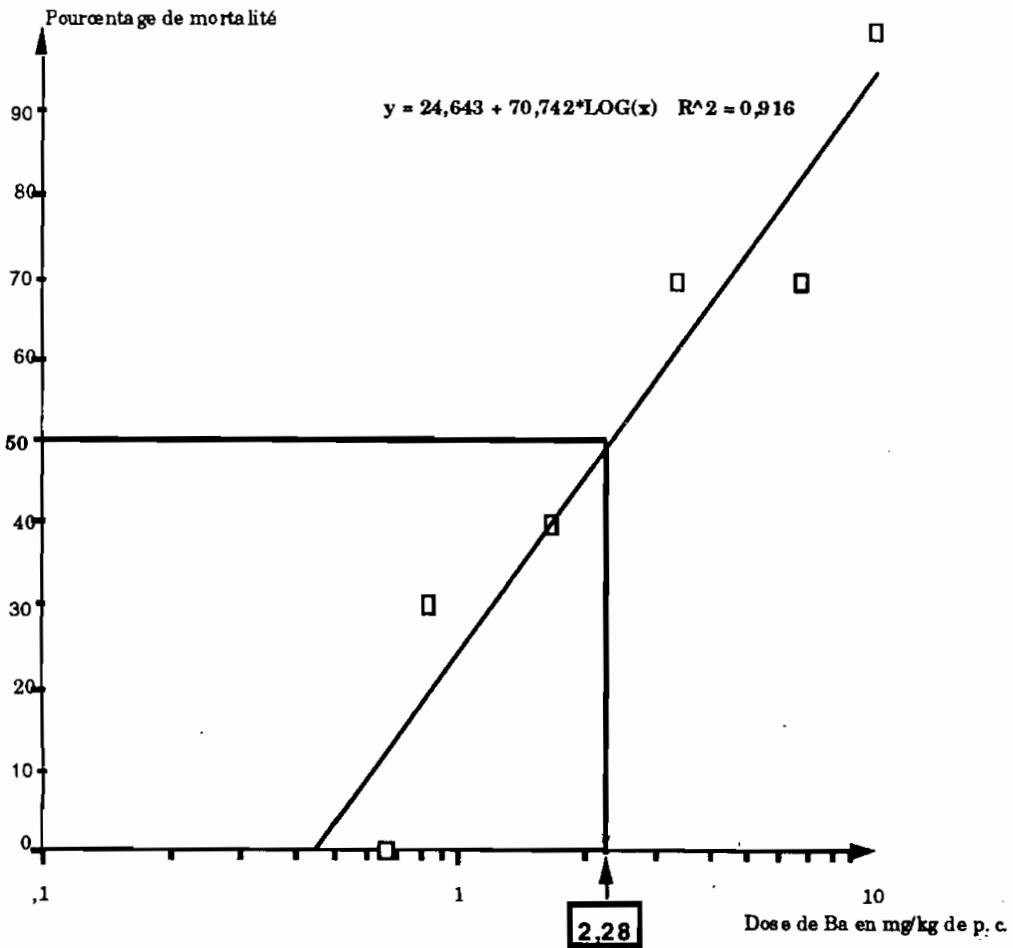


Figure 1 : Courbe de l'évolution du taux de mortalité en fonction de doses de venin

## 2. Activité électrique de la préparation nerf sciatique-muscle gastrocnémien

Le venin de *Bitis arietans* à  $10^{-2}$  g/ml et l'extrait aqueux de *Annona senegalensis* à  $10^{-1}$  g/ml ont été testés au niveau de la jonction nerf-muscle. En conditions normales d'expérience, après stimulation du nerf sciatique, nous obtenons un

potentiel d'action nerveux puis un potentiel d'action du muscle innervé sur l'écran de l'oscilloscope. Lorsqu'on applique le coton imbibé de Ba ou As, l'amplitude du potentiel d'action musculaire (PAM) diminue avec le temps jusqu'à s'annuler complètement à 37 minutes pour Ba (Tableau I) et 40 min pour As (Tableau II). Les durées du PAM en l'absence de Ba et As sont respectivement de  $2,13 \pm 0,12$  ms et  $1,87 \pm 0,24$  ms.

Tableau I : Evolution en fonction du temps de l'effet de Ba sur l'amplitude du PAM de la préparation nerf sciatique-muscle gastrocnémien de crapaud

Temps en min	0	2	10	30	37
Amplitude du PAM en mV	$15 \pm 2,05$	$11 \pm 2,52$	$10 \pm 1,03$	$5 \pm 0$	$0 \pm 0$
% de diminution	0	26,66	33,33	66,66	100

**Tableau II :** Evolution en fonction du temps de l'effet de As sur l'amplitude du PAM de la préparation nerf sciatique-muscle gastrocnémien de crapaud

Temps en min	0	2	10	30	40
Amplitude du PAM en mV	29±5,44	19±2,05	16±0	5±1,3	0±0
% de diminution	0	34,48	44,82	82,75	100

### 3. Antagonisme entre le venin et l'antivenin

Les observations de l'interaction venin-antivenin montrent là aussi une diminution de l'amplitude du PAM sans toute fois la disparition complète de celle-ci. Nous remarquons que lorsque l'antivenin

est mis après le venin, l'amplitude du PAM diminue de 75,75 % après 45 min (Tableau III) alors que cette amplitude ne diminue que de 21,73 % lorsque l'antivenin est mis avant l'antivenin après toujours 45 min (Tableau IV). La présence de l'antivenin empêcherait à l'effet du venin de se manifester.

**Tableau III :** Evolution en fonction du temps de l'effet de l'antagonisme Ba-As sur l'amplitude du PAM de la préparation nerf sciatique-muscle gastrocnémien de crapaud

Temps en min	0	15	30	45
Amplitude du PAM en mV	6,6±0,06	5,6±0,06	2,6±0,2	1,6±0,2
% de diminution	0	15,15	60,60	75,75

**Tableau IV :** Evolution en fonction du temps de l'effet de l'antagonisme As-Ba sur l'amplitude du PAM de la préparation nerf sciatique-muscle gastrocnémien de crapaud

Temps en min	0	15	30	45
Amplitude du PAM en mV	11,5±1,03	10±1,78	9,5±1,03	9±0
% de diminution	0	13,04	17,39	21,73

### IV. Discussions

L'administration par injection intrapéritonéale (I. P.) de l'extrait aqueux de *Annona senegalensis* a permis d'observer des modifications de comportement des souris, ce qui suggère que As, sans être toxique, a des effets pharmacologiques notables. Malgré la toxicité non établie de As par I.P., son utilisation doit se faire avec prudence parce que la détermination de la DL50 peut dépendre du mode d'administration de la substance entre autres.

Pour Ba, les valeurs de la DL50 obtenues par la méthode graphique (2,28 mg/kg de poids corporel) et par la méthode de calcul (2,13 mg/kg de poids corporel) sont très voisines. Cela nous permet de nous assurer de la validité des valeurs déterminées. D'après DIEZI (1989) qui a utilisé la V. O., des valeurs de DL50 inférieures à 5 mg/kg de poids corporel correspondent à des substances hautement toxiques et des valeurs supérieures à 5000 mg/kg de poids corporel caractérisent les substances faiblement toxiques. La valeur de 2,28 mg/kg de poids corporel que nous avons obtenue classe le venin de *Bitis arietans* parmi les

substances hautement toxiques. Les enflures et nécroses qui caractérisent le syndrome vipérin consécutif à une morsure de vipère sont une preuve de la toxicité du venin de *Bitis arietans* qui est un Vipéridé. D'après FITZSIMONS (1911), une seule morsure de serpent peut produire suffisamment de venin pour tuer 10 à 15 hommes robustes.

Les divers symptômes observés à la suite de l'injection de As et Ba supposeraient que ces substances agissent au niveau de plusieurs organes de l'animal. Les difficultés de déplacement de la souris qui traîne péniblement le train arrière justifie le choix du protocole expérimental.

La diminution progressive puis la disparition sur l'écran de l'oscilloscope, du potentiel d'action musculaire en présence de Ba et As suggère le blocage du passage de l'influx nerveux au niveau de la jonction nerf-muscle. L'influx nerveux ne parvient plus au muscle. Les effets des deux substances sont comparables à ceux du curare d'où leurs effets curare-like. Ces résultats sont semblables à ceux de KONE (1980) qui ont montré que le venin de *Naja nigricollis* et l'antivenin (*Securidaca longepedunculata*) ont des effets bloquants sur la transmission de l'influx nerveux et que ces substances agiraient en bloquant les récepteurs cholinergiques de la membrane post-synaptique. Selon BON (1994), les venins de serpents contiennent des b-neurotoxines qui bloquent la transmission neuromusculaire en empêchant la libération de l'acétylcholine par les terminaisons nerveuses et des a-neurotoxines qui bloquent la transmission neuromusculaire en se liant, comme le curare, sur le récepteur cholinergique présent sur les fibres musculaires squelettiques. Le mécanisme d'action de Ba et As passerait par la mise en jeu de principes actifs de type neurotoxines.

L'interaction venin-antivenin montre que lorsque Ba est placé avant As, As présente un effet agoniste, potentialisant l'effet de Ba et quand c'est As qui est placé avant Ba, Ba induit un effet antagoniste. Le prétraitement de la jonction neuromusculaire par l'extrait antivenimeux le préserve de l'effet du venin. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par DATTE en 1996 avec l'extrait aqueux de *Caesalpinia bonduc* (EACB) et le venin de *Bitis arietans*. Selon cet auteur, EACB pourrait induire des effets antagonistes vis à vis du venin, attribués à une inhibition de la libération de l'acétylcholine ou à

une diminution du taux d'acétylcholine dans l'espace synaptique.

## V. Conclusion

Au niveau de l'activité électrique de la préparation nerf-muscle de crapaud, Ba et As ont une action  $\leq$ curare-like, provoquant un blocage du passage de l'influx nerveux au niveau de la jonction neuromusculaire. L'antivenin (As) serait plutôt efficace lorsqu'il est utilisé pour le traitement préventif que curatif. C'est ce qui explique le fait que les chasseurs, les travailleurs aux champs mangent des boulettes de ces plantes avant d'aller à leurs occupations.

## VI. Bibliographie

- **ABBIW, D. K. (1990).** Useful plants of Ghana Royal Botanic Garden Kew Ed.
- **ADJANOHOUN, E. J.; AHYI, A.M.R. ; AKE-ASSI, L.; DAN DICKO, L. ; DAOUDA, H. ; DELMAS, M. ; de SOUZA, S. ; GARBA, M. ; GUINKO, S.; KAYONGA, A. ; NGOLO, D. ; RAYNAL, J. L. et SAADOU, M. (1981).** Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques au Niger. Ed. ACCT, Paris, 250p, ISBN 92-9028-009-3
- **ADJANOHOUN, E. J.; ADJAKIDJE, V. ; AHYI, A.M.R. ; AKE-ASSI, L.; AKOEGNINOU, A. ; d'ALMEIDA, J. ; APOVO, F. ; BOUKEF, K. ; CHADARE, M. ; CUSSET, G. ; DRAMANE, K. ; EYME, J. ; GASSITA, J-N. ; GBAGUIDI, N. ; GOUDOTE, E. ; GUINKO, S.; HOUNGNON, P. ; ISSA, LO ; KEITA, A. ; KINIFFO, H. V. ; KONE-BAMBA, D. ; MUSAMPA, NSEYYA, A. ; SAADOU, M ; SODOGANDJI , Th. ; de SOUZA, S. ; TCHABI, A. ; ZINSOU DOSSA, C. et ZOHOUN, Th. (1989).** Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques en République du BENIN. Ed. ACCT, Paris, 895p, ISBN 92-9028-152-9
- **BON, C. (1994).** Venins de serpents et pharmacopées In Les serpents Ed. Bordas, pp. 194-203.
- **BURKILL, H. M. (1985).** The useful plants of West Tropical Africa Vol. 1, royal Botanic Gardens Ed. Kent, England.

- **CHIPPAUX J. P. (1989)**. Snake bite epidemiology in Bénin (West Africa) *Toxicon*, 27,127-135.
  - **DATTE Y., J. (1996)**. Contribution à l'étude des propriétés bioactives d'une substance naturelle: Extrait aqueux de *Caesalpinia bonduc* (Caesalpiniacée). Thèse Doctorat 3ème cycle, Centre Univ. Cocody (Abidjan): n°210/94, 141 p.
  - **DIEZI J. (1989)**. Toxicologie: principes de base et répercussions cliniques. in "pharmacologie. Des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques". Ed. Slatkine-Geneve, pp. 33-44.
  - **FITZSIMONS F. W. (1911)**. The snake of South Africa Cape Town: MASKEW MILLER
  - **GREMA M. (1998)**. Effets pharmacologiques du venin d'un Vipéridé (*Bitis arietans*) et d'une plante antivenimeuse utilisée en Pharmacopée Africaine (*Annona senegalensis*) sur quelques paramètres physiologiques de vertébrés. Thèse de Doctorat 3ème cycle, Université de Cocody-Abidjan, N° 269, 158 p.
  - **HUI Y. H., CHANG C. J., SMITH D. and MC LAUGHLIN J. L. (1990)**. *Pharmaceutical Research*, 7 (4), p. 376.
  - **KONE P. P. (1980)**. Études toxicologiques, électrophysiologiques et pharmacologiques du venin de *Naja nigricollis* (Elapidé de Côte d'Ivoire) et d'une substance antivenimeuse de la pharmacopée traditionnelle africaine (extrait de *Securidaca longepedunculata*, Polygalacée). Thèse de Doctorat ès Sciences, Université d'Abidjan, N° 58, 172 p.
  - **MACKIE A. and MISRA A. L. (1956)**. J. chemical investigations of leaves of *Annona senegalensis* I. Constituents of the leaf wax. *Sci. Food Agr.*, 7, p. 203.
  - **OLIVIER-BEVER B. (1986)**. Medicinal plants in tropical West Africa Cambridge University Press - Londres, p. 182.
  - **SCHNEIDER F., GEROLD M. and BERNAUER K. (1973)**. *Helv. Chim. Acta*, 56, 759.
  - **YEI-FEN-LIN, KUEI-HSIANG and LU-SHENG-TEH (1979)**. *Yao Hsuch. Isa. Chih.* 31, 28.
-

**Résumé**

Les effets du venin d'un serpent (*Bitis arietans*) et d'une plante antivenimeuse de la Pharmacopée Africaine (*Annona senegalensis*) ont été testés au niveau de la jonction nerf sciatique – muscle gastrocnémien de crapaud (*Bufo regularis*). Pour cela, nous avons utilisé un dispositif comportant un stimulateur de type KATJI, une cuve à nerf et un oscilloscope cathodique. Les phénomènes électriques nerveux et musculaires apparaissant sur l'écran de l'oscilloscope sont filmés à l'aide d'une caméra. L'étude toxicologique montre que le venin qui a une DL50 de 2,28 mg/kg de poids corporel est hautement toxique alors que l'antivenin ne l'est pas du tout. En conditions normales d'expérience, après stimulation du nerf sciatique, nous obtenons un potentiel d'action nerveux suivi d'un potentiel d'action du muscle innervé. L'application du venin ou de l'antivenin diminue l'amplitude du potentiel d'action musculaire qui peut même disparaître avec le temps. Ces substances ont une action "curare-like", provoquant un blocage du passage de l'influx nerveux au niveau de la jonction neuromusculaire. L'interaction venin-antivenin montre que l'antivenin serait efficace lorsqu'il est utilisé en traitement préventif que curatif.

**Mots-clés :** *Annona senegalensis* ; antivenin ; *Bitis arietans* ; crapaud ; curare-like ; jonction neuromusculaire ; Pharmacopée Africaine ; traitement préventif ; venin.

**Summary**

The effects of snake venom (*Bitis arietans*) and antivenimous plant of African Pharmacopoeia (*Annona senegalensis*) have been tested on frog neuromuscular junction. We have used an experimental design containing a stimulator (KATJI), a nerve cuve and cathodic oscilloscope. The nervous and muscular electric phenomena, appearing on the oscilloscope's screen are filmed with camera. The toxicological studies show that the venom with a LD50 of 2,28 mg/kg of corporeal weight is highly toxic when the antivenin is not at all toxic. In normal experimental conditions, after stimulation of nerve, we obtain a nerve action potential followed by a muscle action potential. The application of venom or antivenin decreases the muscle action potential, which can disappear with time. These substances have curare-like action, provoking a blockage of passage of nervous influx at the neuromuscular junction. The interaction between venom and antivenin shows that the antivenin will be efficacious when it is used like preventive treatment than curative.

**Key Words:** African Pharmacopoeia; *Annona senegalensis*; antivenin; *Bitis arietans* ; curare-like; frog ; neuromuscular junction ; preventive treatment ; Venom.