Mem. Inst. Butantan
40/41: 221-240, 1976/77.

PHYSIOPATHOLOGIE ET THÉRAPEUTIQUE DE L'ENVENOMATION EXPÉRIMENTALE CAUSÉE PAR LE VENIN DE *MICRURUS FRONTALIS**

OSWALDO VITAL BRAZIL, MARCOS DIAS FONTANA
et ALBERTO PELLEGRINI FILHO
Departamento de Farmacologia, Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas

RÉSUMÉ: Le venin de *Micrurus frontalis,* introduit par voie intraveineuse à des chiens anesthésiés, cause une chute brutale de la pression artérielle qui peut entraîner la mort de l'animal. Toutefois, quand il est injecté par voie intramusculaire, l'effet hypotenseur est modéré et la mort survient, en général, après une à quatre heures, par défaillance respiratoire. L'origine de celle-ci a été étudiée en détectant les décharges de potentiels d'action sur le nerf phrénique. On a constaté qu'elle est d'origine périphérique devant être attribuée à l'action inhibitrice du venin sur la transmission neuromusculaire. On a mis en évidence l'existence de deux variétés régionales de venin quant à la réversibilité du blocage neuromusculaire produit sur la préparation nerf phrénique-diaphragme de rat. La recherche du mécanisme de ce blocage a été faite sur les préparations isolées nerf phrénique-diaphragme de rat (effet sur la libération du médiateur), l'hémidiaphragme chroniquement dénervé de rat (effet sur la contracture produite par l'acétylcholine et sur les réponses à la stimulation eléctrique; effet de la protection des récepteurs par la d-tubocurarine) et le couturier de crapaud (effet sur le potentiel de membrane, sur les potentiels miniatures et sur le potentiel de plaque terminale). On est arrivé à la conclusion que le blocage est exclusivement d'origine postsynaptique et qu'il résulte de la combinaison des neurotoxines du venin avec les récepteurs cholinergiques de la plaque terminale. L'antagonisme venin-néostigmine a été étudié sur des animaux non anesthésiés (singes, chiens, pigeons), sur la préparation *in situ* nerf sciatique-muscle tibial antérieur de chien et la préparation isolée nerf phrénique-diaphragme de rat. L'effet produit par la néostigmine sur la paralysie respiratoire a été recherché en faisant l'électromyographie du diaphragme des chiens anesthésiés. On a constaté que la néostigmine antagonise très bien sur le singe, le chien et le pigeon les effets qui résultent de l'action inhibitrice sur la transmission neuromusculaire de la variété réversible du venin. Les effets causés par la variété irréversible sont partiellement antagonisés sur le chien mais très bien sur le pigeon. Quatorze chiens ont servi à l'létude de l'efficacité du traitement par la néostigmine de l'envenomation expérimentale; sept d'entre-eux ont été employés comme témoins. Les expériences ont été realisées de telle façon que, le même jour et à la même heure, on injectait par voie intramusculaire la même dose de venin dans deux chiens. Quant ils présentaient de la paralysie et une certaine dépression respiratoire, on injectait par voie intraveineuse à l'un d'eux la néostigmine associée à

* Ce travail a fait l'objet d'une aide de la FAPESP (contrat nº 74/336).
Adresse: Caixa Postal 1170 - Campinas - São Paulo - Brasil.

l'atropine; l'autre (témoin) recevait seulement l'atropine. Une injection additionelle de néostigmine était injectée si la paralysie récidivait. Tous les chiens traités avec la néostigmine ont survécus; tous les chiens témoins étaient morts en moins de quatre heures.

MOTS-CLEFS: Toxicité. Symptômes. Réversibilité du blocage neuromusculaire. Mécanisme d'action. Antagonisme venin-néostigmine.

INTRODUCTION

En 1949, dans un travail réalisé en collaboration avec Avelino Barrio, nous avons démontré que le venin du serpent corail d'Amérique inhibe la transmission neuromusculaire tout comme le font ceux des Élapidés de l'Asie, de l'Afrique et de l'Australie. Nous avons utilisé dans cette recherche la préparation *in situ* nerf sciatique-muscle gastrocnémien de rat et le venin de *Micrurus frontalis,* l'espèce de serpent corail la plus fréquente au sud du Brésil et en Argentine. Quelques caractéristiques de l'action neuromusculaire de ce venin furent étudiés (18) et un net antagonisme entre celui-ci et la néostigmine fut démontré (19). Plus tard (20), en 1963, nous avons étudié l'action neuromusculaire du venin d'une autre espèce de serpent corail, *M. lemniscatus,* en utilisant les préparations isolées nerf phrénique-diaphragme de rat et l'hémi-diaphragme chroniquement dénervé de rat. Nous avons vérifié que le venin de *M. lemniscatus* produit un blocage lentement reversible dans la préparation nerf phrénique-diaphragme de rat. Nous avons constaté aussi qu'il inhibe sélectivement la contracture de l'hémi-diaphragme dénervé causé par l'acétylcholine et par d'autres drogues cholinomimétiques, ce qu'il semble démontrer une action des toxines du venin au niveau des récepteurs cholinergiques. Cependant, une action pré-synaptique n'a pas été exclusé, du fait que nous n'avons pas étudié l'effet du venin sur la libération du médiateur. L'absence d'action contracturante sur les muscles innervés ou dénervés aussi bien que l'absence de perde de l'excitabilité directe de ceux-ci après le blocage de la transmission neuromusculaire ou des réponses causées par l'acétylcholine suggère fortement que ce venin ne contient pas de toxine du type de la cardiotoxine du venin des Cobras, c'est à dire, pourvue d'action dépolarisante. Des résultats opposés à ceux-ci ont été obtenus par Weiss et Mc Isaac (22) dans leur recherche sur les actions neuromusculaires et musculaires du venin de *M. fulvius,* une espèce de serpent corail propre de l'Amérique du Nord. Ils ont vérifié, en effet, que ce venin dépolarise la membrane des fibres musculaires et provoque l'inexcitabilité du muscle à l'excitation électrique directe. Ils ont conclu que le venin agit à la manière de la fraction cardiotoxinique du venin des Cobras. Cependant, Snyder et ses collaborateurs (16) ont isolé, plus récemment (1973), une fraction neurotoxinique du venin de *M. fulvius* qui, au contraire du venin total, inhibe la transmission neuromusculaire sans produire de contracture ou de perte de l'excitabilité directe du muscle. Ce venin contient donc des toxines qui exercent une action identique à celle des neurotoxines élapidiques du type de la cobrotoxine ou de l'alfa-bungarotoxine, c'est-à-dire, d'action postsynaptique, et une fraction pourvue d'action apparement semblable à celle de la cardiotoxine.

Dans la présente recherche, nous nous sommes efforcés de éclairer la physiopathologie de l'envenomation causée par le venin de *M. frontalis* aussi bien que le mécanisme du blocage neuromusculaire produit par ce venin. Cependant, un des principaux buts de cette recherche a été l'étude de l'antagonisme venin-

-néostigmine et l'essai de cette substance et de la respiration artificielle pour le traitement de l'envenomation expérimentale. Ces derniers aspects de la recherche nous semblent particulièrement importants car, en fonction des résultats obtenus, nous envisageons l'emploi de ces deux possibilités pour le traitement des accidents par morsure de quelques unes des nombreuses espèces de serpents appartenant aux familles des Élapidés et des Hydrophidés.

VENINS UTILISÉS; LEUR TOXICITÉ

Six échantillons de venin ont été utilisés. Celui de número 5 était constitué d'un mélange de venin obtenus de diverses extractions, faites en notre laboratoire, sur un bel exemplaire de *M. frontalis*. Les autres ont été achetés. Le venin des échantillons nº 1 et nº 3 provenait de serpents capturés dans l'Etat de Mato Grosso, et les autres de serpents de l'Etat de São Paulo.

Nous avons déterminé sur des souris blanches la toxicité de quatre échantillons de venin. Les doses médianes mortelles, calculées selon la méthode de Weil (21), ont varié, en particulier celle de l'echantillon nº 5 s'est montré beaucoup plus petite que les doses médianes mortelles des autres (Tableau 1). Toutefois, comme le venin dans les essais, a été injecté par voie intraveineuse,

TABLEAU 1

TOXICITÉ DU VENIN SEC DE *MICRURUS FRONTALIS* POUR LA SOURIS.

Échantillon n.º	Dose médiane mortelle (DL 50) et ses intervalles au niveau fiduciaire de 95 per cent. (mg/kg, i.v.)
1	1,012 (0,675 à 1,518)
2	0,610 (0,513 à 0,725)
3	0,946 (0,869 à 1,031)
5	0,390 (0,345 à 0,440)

on ne peut pas être sür que ces différences de toxicité soient dues à des variations du contenu en neurotoxines ou à une toxicité variable de celles-ci. Il y a des composants, comme nous le verrons plus loin, qui causent une chute brutale de la pression artérielle quand le venin est administré par voie intraveineuse, mais qui ont une action très modérée quand il est injecté par voie intramusculaire. Il nous paraît que la dose médiane mortelle de l'échantillon nº 5 a été moindre que les autres en raison d'une teneur plus élevée de ces composants, cela parce que dans l'essai de cet échantillon beaucoup de souris sont mortes sans présenter les symptômes typiques de l'envenomation causée par le venin de *M. frontalis*.

SYMPTÔMES DE L'ENVENOMATION EXPÉRIMENTALE

Le venin de *M. frontalis* provoque de l'hypotonie musculaire et de la paralysie flasque tout comme le curare. L'ordre d'atteint des différents groupes

musculaires est aussi le même dans l'envenomation et dans l'intoxication par ce poison. Il faut remarquer que des singes, dans lesquels le venin a été injecté, présentent un faciès semblable à celui de l'homme non anesthésie qui a reçu le curare et à des patients de myasthenie grave. La principale différence entre l'action du curare et du venin réside en ce que dans l'envenomation les effets sur la musculature squelettique commencent à se manifester après un délai toujours long et s'intensifient très lentement. Le venin de *M. frontalis,* à l'inverse de celui des cobras, ne produit pas à l'endroit de l'inoculation d'oedème ou de nécrose. Outre la paralysie des muscles striés, y compris ceux du pharynx et du larynx, il cause une salivation abondante et, sur le chien, une douleur intense à l'endroit de son injection, des vomissements et de la diarrhée. Ces derniers effets ne s'observent pas en général pendant l'envenomation du singe et du pigeon. Le plus souvent ils disparaissent avant que le chien ne devienne parétique.

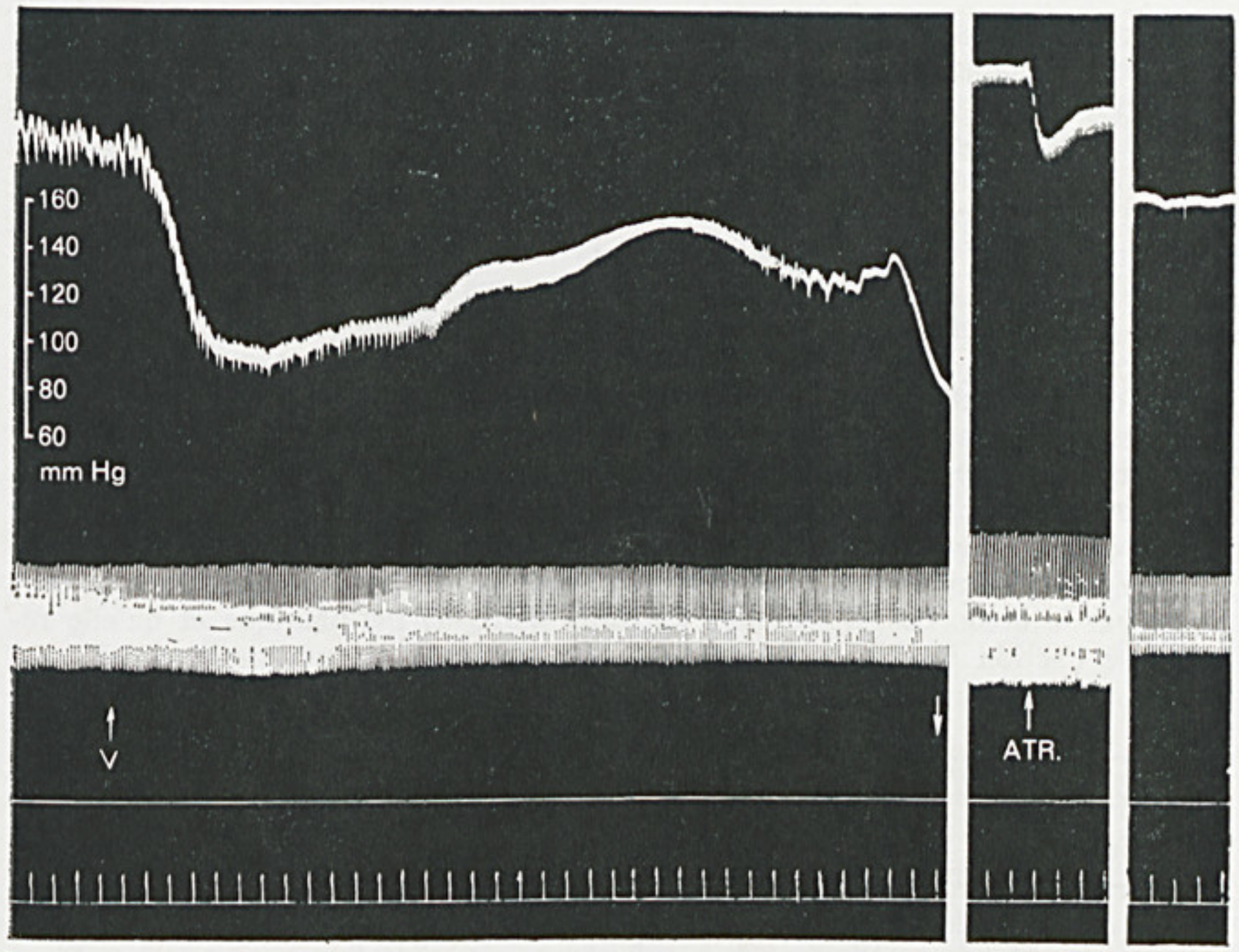
EFFETS CARDIOVASCULAIRES; CAUSE DE MORT

Quand le venin est introduit par voie intraveineuse, il cause une chute de la pression artérielle qui peut entraîner la mort de l'animal. C'est ce qu'on peut voir sur le graphique de la Figure 1. Dans cette expérience, realisée sur un chien anesthésié avec le pentobarbital sodique, nous avons injecté une solution de venin par infusion intraveineuse très lente. Malgré cette précaution, la pression artérielle est tombée à zéro et le couer s'est arrêté. On a fait des massages cardiaques, de la respiration artificielle et une injection intraveineuse de noradrenaline. Les battements du coeur ont repris et la pression artérielle s'est élevée. Toutefois, quand le venin est injecté par voie intramusculaire, l'effet hypotenseur est modéré et la mort découle toujours de l'arrêt des mouvements respiratoires. La respiration artificielle, commencée au moment de la cessation de la respiration naturelle, maintient toujours le chien en vie. Il faut signaler que l'électrocardiogramme ne révèle pas d'altérations — extrasystoles, dissociation auriculoventriculaire, rythme idioventriculaire, etc. — comme on l'observe dans l'envenomation par le venin des *Naja.*

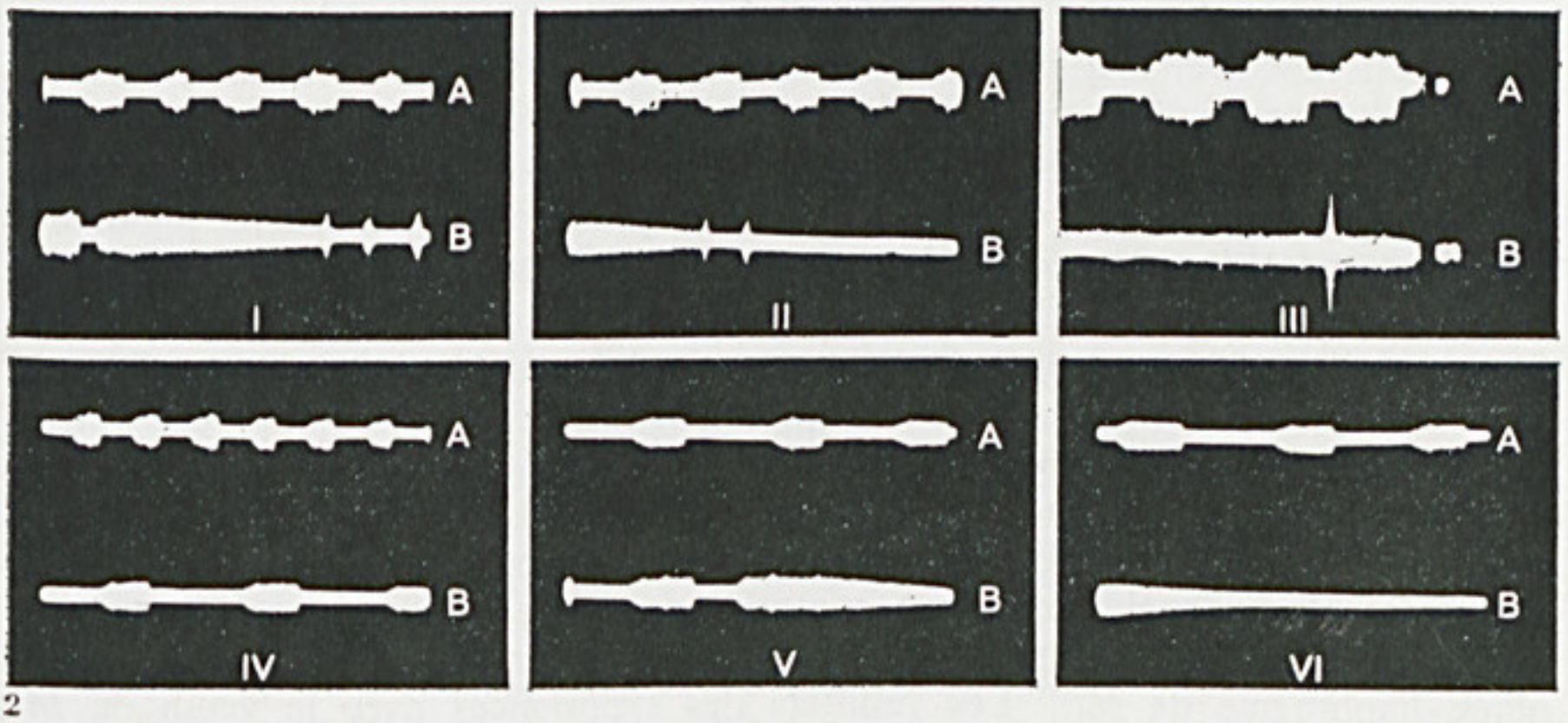
ORIGINE DE LA PARALYSIE RESPIRATOIRE

Nous avons étudié l'origine de la paralysie respiratoire en utilisant la méthode qui consiste à détecter les décharges de potentiels d'action sur le nerf phrénique. Cette méthode a déjà été employée par Kellaway et ses collaborateurs en 1932 pour éclairer l'origine de la paralysie respiratoire produite par le venin d'une Hydrophydé et de nombreuses espèces d'Élapidés (9). Plus récemment elle a été utilisée aussi par Lee et Peng dans leur étude sur la paralysie respiratoire causée par le venin de *Naja naja atra* et de *Bungarus multicinctus* de Formose (12). Sur des chiens anesthésiés, on isole un rameau de l'un des nerfs phréniques, le plus souvent celui qui provient de la cinquième paire cervicale, on le sectione et on applique sur sa portion centrale une électrode bipolaire reliée à un préamplificateur en connection avec l'oscilloscope. Les décharges de potentiels apparaissent sur l'écran et peuvent être photographiées. Les photographies reproduites dans la Fig. 2 montrent qu'après la cessation de la respiration spontanée, il y a des décharges de potentiels pendant qu'on fait de la respiration artificielle. Quand

Mem. Inst. Butantan, 40/41:211-219, 1976/77.
BRAZIL, O.V.; FONTANA, M.D; PELLEGRINI F.º, A. — Physiopathologie et thérapeutique de l'envenomation expérimentale causée par le venin de *Micrurus frontalis*. *Mem. Inst. Butantan, 40/41:221-240,* 1976/77.



1



2

Fig. 1 — Pression artérielle et contractions du tibial antérieur de chien. Stimulation électrique du nerf sciatique poplité externe. En V infusion intraveineuse de 60 ml de sérum physiologique contenant 5,2 mg de venin de *M. frontalis* (0,8 mg/kg). La pression artérielle est tombée à zéro et le couer s'est arreté. On a fait des massages cardiaques, de la respiration artificielle et une injection intraveineuse de noradrenaline. Les battements du coeur ont repris et la ression artérielle s'est élevée (deuxième tableau). On a fait aussi une injection de sulfate d'atropine en vue de l'abondante sécrétion salivaire que l'animal présentait et de prévenir un possible accroissement de la sécrétion bronchique.

Fig. 2 — Détection des décharges de potentiels sur le nerf phrénique. Chien dans lequel on a injecté il y a 3 heures et 20 minutes du venin de *M. frontalis* (0,7 mg/kg, i.m.). Il y a une heure à peu près que la respiration naturelle a cessé. En IA, IIA et IIIA: photographies des décharges de potentiels pendant qu'on fait de la respiration artificielle. En IB, IIB et IIIB: photographies 0,5, 1 et 2 minutes après l'interruption de la respiration artificielle. En IVB, VA, VIA et VIB: photopraphies après section des deux nerfs pneumogastriques. En IVA, IVB, VA et VIA: photographies pendant qu'on fait de la respiration artificielle; en VB et VIB: 1 et 2 minutes après l'interruption de celle-ci.

on interrompt celle-ci, la durée des décharges est d'abord très prolongée et après un temps variable, dans ce cas deux minutes, les décharges disparaissent (Fig. 2, IIIB), ce qui démontre bien que le chien est en apnée. Quand on sectionne les deux nerfs pneumogastriques, les décharges deviennent plus prolongées et leur fréquence moindre (Fig. 2, IVB). Elles ne sont plus synchrones avec le rythme de la respiration artificielle. Ces faits démontrent que le réflexe de Hering-Breuer n'est pas supprimé pendant la paralysie respiratoire produit par le venin. Le chien de l'expérience que nous venons de présenter a reçu le venin de *M. frontalis* par voie intramusculaire. Au bout de deux heures à peu près, sa respiration est devenue difficile. On l'a alors anesthésié et préparé pour la détection des décharges de potentiels sur le nerf phrénique et pour être soumis à la respiration artificielle. Les photographies ont été faites une heure environ aprés que sa respiration naturelle avait cessé. Nous avons fait un total de cinq expériences pour éclairer l'origine de la paralysie respiratoire causée par le venin de *M. frontalis* (15). Tous les résultats ont été semblables à ceux de l'expérience présentée. On peut donc conclure que la paralysie respiratoire produite par le venin de *M. frontalis* est aussi d'origine périphérique et qu'elle résulte de l'action inhibitrice du venin sur la transmission neuromusculaire.

ACTION NEUROMUSCULAIRE. RÉVERSIBILITÉ DU BLOCAGE

Nous avons étudié sur la préparation nerf phrénique-diaphragme de rat la réversibilité de la paralysie neuromusculaire produite par les divers échantillons de venin de *M. frontalis*. Le venin était additionné au bain à la dose de 10 μg/ml. Quand le blocage était presque total, on procédait à des lavages successifs de la préparation. Deux variétés de venin ont été trouvées (Tableau 2): une d'action irréversible; une autre d'action plus ou moins réversible. Les venins de la variété d'action irréversible — échantillons n° 1 et n° 3 — sont ceux qui ont été obtenus des serpents de l'Etat de Mato Grosso. Il semble, donc, que nous sommes, encore une fois, en présence de variations régionales dans la composition du venin d'une même espèce de serpent. La variété d'action réversible ne semble pas être tout à fait uniforme. Le venin de l'échantillon n° 2 a produit un blocage plus réversible que ce lui causé par les autres. D'après Lee, Chang et Chen (13), la réversibilité d'action des neurotoxines des venins des Élapidés et des Hydrophidés dépend de leur richesse en acides aminés hydrophobiques. Les neurotoxines d'action irréversible comme la toxine A du venin de *Naja naja* et l'alfa-bungarotoxine sont riches en alanine et en valine, acides aminés hydrophobiques, au contraire de celles comme la cobrotoxine et l'érabutoxine qui produisent un blocage réversible sur la préparation nerf phrénique-diaphragme de rat. Les résultats des expériences avec le venin de *M. frontalis* suggèrent qu'il contient en proportions variables, en fonction de l'origine géographique des serpents et d'autres facteurs, des neurotoxines avec un contenu différent en acides aminés hydrophobiques dans leurs molécules. Il faut observer que Lee et ses collaborateurs (13) ont constaté que la réversibilité du blocage produit par les neurotoxines dépend aussi de la préparation neuromusculaire utilisée. Nous verrons plus loin que la variété du venin de *M. frontalis* d'action réversible sur la préparation nerf phrénique-diaphragme de rat produit un blocage irréversible de la contracture causée par l'acétylcholine sur la préparation hémi-diaphragme chroniquement dénervé de rat.

TABLEAU 2

PRÉPARATION NERF PHRÉNIQUE-DIAPHRAGME DE RAT. RÉVERSIBILITÉ DU BLOCAGE NEUROMUSCULAIRE CAUSÉ PAR LE VENIN DE *MICRURUS FRONTALIS*.

Exp. nº	Venin		% de blocage			
	Échant. nº	Doses (mg/ml)	Avant de laver la préparation	Après des successives lavages 15 min.	30 min.	45 min.
1	1	0,010	73,40 (90 min.)	73,40	76,60	86,70
2	1	0,010	88,50 (57 min.)	91,50	94,30	94,30
3	2	0,010	85,00 (120 min.)	78,80	54,60	6,90
4	2	0,010	88,40 (120 min.)	60,00	29,00	20,00
5	2	0,010	80,00 (98 min.)	53,50	43,50	3,40
6	3	0,010	88,60 (69 min.)	94,40	91,70	91,70
7	4	0,010	84,00 (60 min.)	80,00	60,00	50,00
8	4	0,010	86,70 (55 min.)	86,70	58,40	16,70
9	4	0,010	87,50 (70 min.)	55,40	28,60	19,70
10	5	0,010	90,00 (50 min.)	58,40	56,20	23,00
11	5	0,010	88,40 (60 min.)	71,50	60,00	42,30
12	5	0,010	88,40 (70 min.)	58,40	54,30	28,60
13	6	0,010	73,70 (120 min.)	65,80	63,20	57,90
14	6	0,010	80,00 (135 min.)	74,00	72,00	68,00
15	6	0,010	87,50 (90 min.)	50,00	45,00	37,50

MÉCANISME D'ACTION

Les préparation isolées nerf phrénique-diaphragme de rat, l'hémi-diaphragme chroniquement dénervé de rat et muscle couturier de crapaud ont été utilisées pour la recherche du mécanisme d'action du venin de *M. frontalis* sur la jonction neuromusculaire et sur la membrane des fibres musculaires striées.

L'effet du venin sur la libération du médiateur a été étudié sur la première préparation mentionée, c'est-à-dire, sur la préparation nerf phrénique-diaphragme de rat. Le dosage de l'acétylcholine liberée a été fait sur l'iléum de cobaye par la méthode de Paton et Vizzi (14). La libération spontanée de l'acétylcholine a été moindre en présence du venin (Tableau 3). Cependant, la différence

TABLEAU 3

PRÉPARATION NERF PHRÉNIQUE-DIAPHRAGME DE RAT. LIBÉRATION DE L'ACÉTYLCHOLINE (EN NANOGRAMES DE LA BASE) EN PRÉSENCE DU VENIN DE *MICRURUS FRONTALIS* (10 mcg/ml).

Exp. n.°	Avant l'addition du venin au bain		Après l'addition du venin au bain	
	Libération spontanée	Libération produite par la stimulation du nerf	Libération spontanée	Libération produite par la stimulation du nerf
1	21,00	82,00	15,50	104,00
2	22,00	73,00	16,20	100,00
3	26,70	73,00	22,00	91,70
Moyenne ± erreur standard	23,23±3,04	76,00±5,20	17,90±3,58	98,57±6,27

n'est pas significative. Dans des expériences-témoin, la deuxième libération ($17{,}90 \pm 2{,}86$ ng, $n = 3$) a aussi été moindre que la première ($21{,}57 \pm 0{,}51$ ng, $n = 3$). Au lieu d'être inhibée, la libération de l'acétylcholine par l'influx nerveux a été accrue après le blocage causé par le venin. Il ne semble donc pas contenir des neurotoxines du type de la béta-bungarotoxine ou de la notéxine. En tout cas, le résultat de ces expériences démontre d'une manière convaincante qu'une action présynaptique ne participe pas au blocage neuromusculaire produit par le venin.

Les muscles chroniquement dénervés de mammifères ont des récepteurs à l'acétylcholine tout le long de la membrane de leur fibres (4). *In vitro,* ils répondent par une contracture pure à l'addition au bain d'acétylcholine ou d'autres substances cholinomimétiques, telles que le décamethonium et la nicotine. Cette contracture est inhibée par les antagonistes de l'acétylcholine sur les récepteurs nicotiniques de la plaque terminale. On peut donc employer les préparations isolées de muscles chroniquement dénervés pour vérifier si une substance inhibe l'effet de l'acétylcholine en se combinant avec ces récepteurs. Le venin de *M. frontalis* tout comme celui de *M. lemniscatus* (20) a inhibé la contracture produite par l'acétylcholine sur le diaphragme chroniquement dénervé mais non les réponses du muscle à la stimulation électrique. Cette action s'est montrée irréversible même pour les variétés de venin qui produisent un blocage réversible sur la préparation nerf phrénique-diaphragme de rat. L'irréversibilité de l'action de venin nous a permis de faire des expériences de protection des ré-

cepteurs avec la d-tubocurarine. Sur le graphique de la Fig. 3 on peut voir comment ces expériences ont été faites. On constate d'abord l'amplitude et la régularité des réponses du muscle à l'addition d'une dose déterminée d'acétylcholine au bain, dans le présent cas 4 mcg/ml. On lave la préparation après chaque addition. Ensuite on laisse la préparation une demi-heure dans la solution de Tyrode avec 10 mcg/ml de chlorure de d-tubocurarine. On additionne de l'acétylcholine au bain et on constate que la réponse est complètement inhibée. On fait alors des lavages de la préparation et on observe, qu'après soixante minutes, les réponses ont une amplitude normale. On additionne alors 10 mcg/ml de d-tubocurarine et après une demi-heure 1 ou 2 mcg/ml de venin. Après 30 minutes on constate le blocage de l'action de l'acétylcholine, après quoi on procède à des lavages de la préparation. Les réponses à l'acétylcholine redeviennent normales après quatre-vingt-dix minutes. Cela prouve que les neurotoxines ne se sont pas fixées sur les récepteurs parce que ceux-ci étaient déjà occupés par les molécules de la d-tubocurarine. Dans une troisième étape, le fait que la combinaison des neurotoxines avec les récepteurs est irréversible est confirmé.

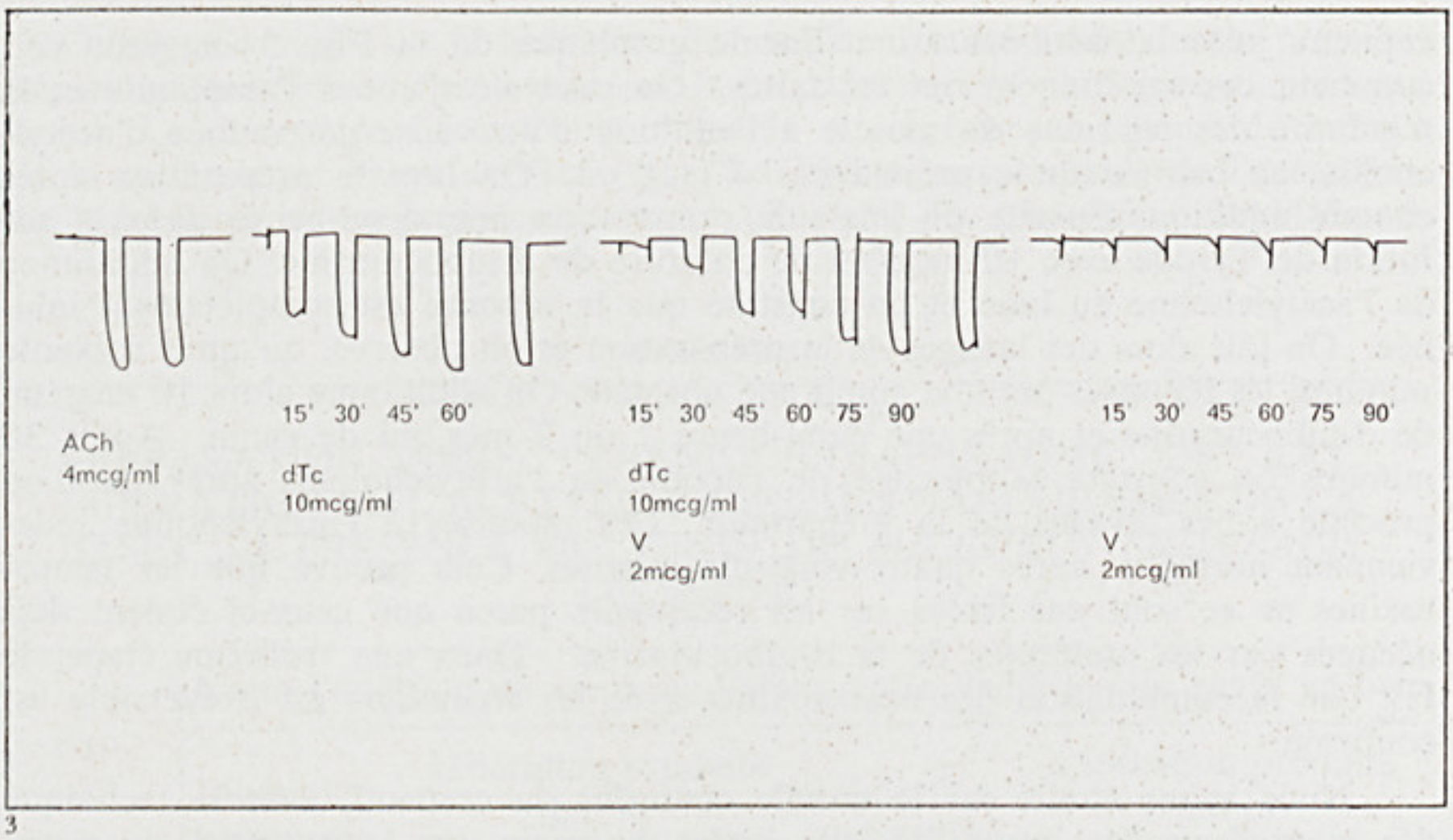
Nous avons étudié sur le muscle couturier du crapaud, avec la technique des microélectrodes intracellulaires, l'effet du venin sur le potentiel de membrane, sur les potentiels miniatures et sur le potentiel de plaque terminale. Quatre expériences préliminaires ont montré que le venin à la dose de 5 mcg/ml produit une paralysie complète de la transmission neuromusculaire en 24 à 30 minutes. Le graphique de la Figure 4 démonstre que 5 mcg/ml et même 10 mcg/ml du venin, n'altèrent pas le potentiel de repos de la membrane des fibres du muscle. Chaque point du tracé représente la moyenne des valeurs du potentiel de membrane de dix fibres. On peut donc conclure que le venin de *M. frontalis,* au contraire de celui de *M. fulvius*(22), ne contient pas de toxines avec une action dépolarisante. Le venin de *M. frontalis* réduit l'amplitude des potentiels miniatures et tout comme le curare les fait disparaître avant que le blocage de la transmission neuromusculaire ne se soit établi. Sur des préparations des muscles couturiers en solution de Ringer riche en magnésium et pauvre en calcium on a constaté que le venin réduit l'amplitude du potentiel de plaque et finalement le supprime.

Les résultats de toutes ces expériences démontrent donc que le blocage produit par le venin est exclusivement postsynaptique et résulte de la fixation des neurotoxines du venin sur les récepteurs cholinergiques de la plaque terminale.

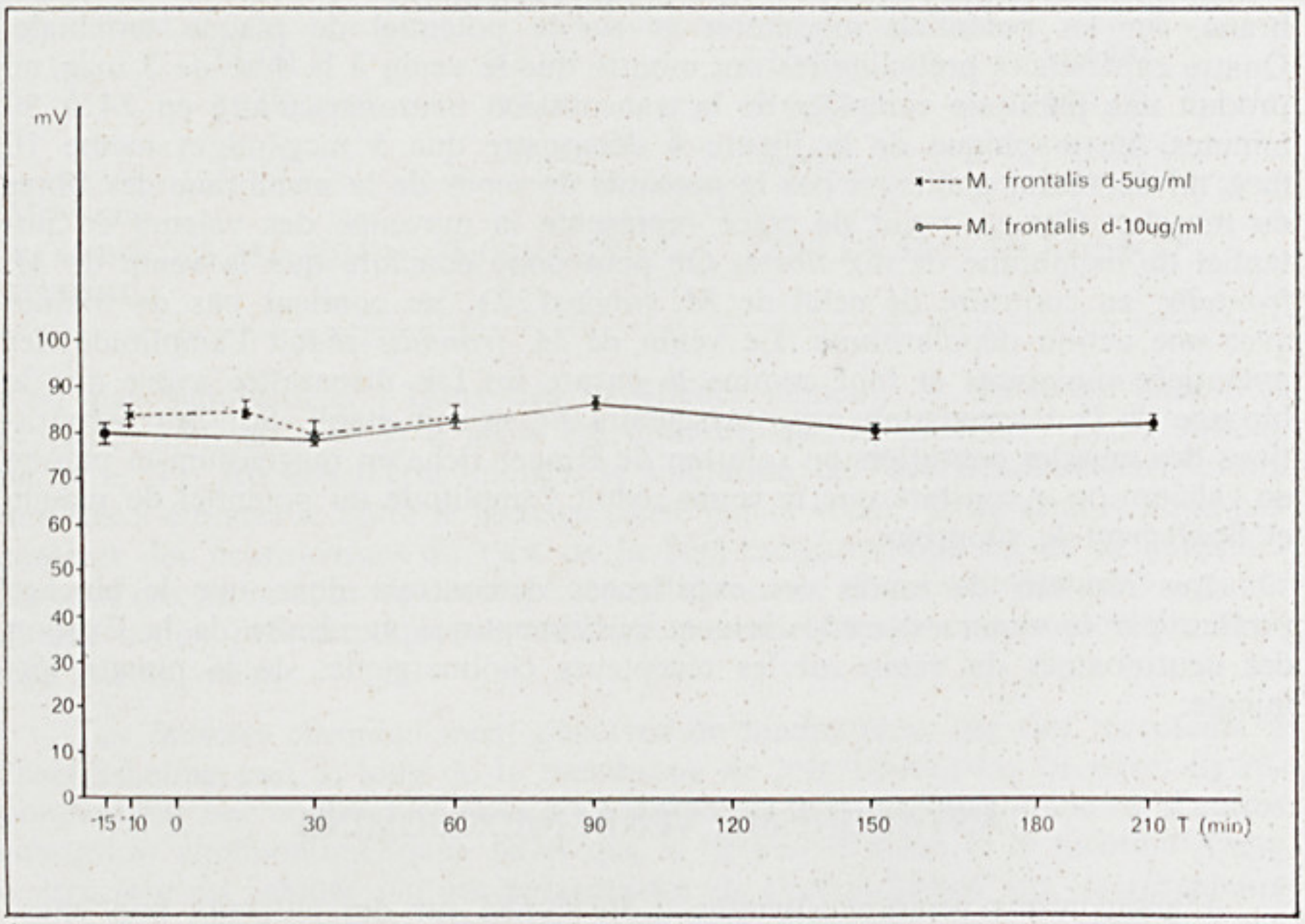
ANTAGONISME VENIN-NÉOSTIGMINE

L'antagonisme venin-néostigmine a été étudié sur des animaux non anesthésiés (singes, chiens, pigeons), sur la préparation *in situ nerf* sciatique-muscle tibial antérieur de chien et la préparation isolée nerf phrénique-diaphragme de rat. On a étudié aussi sur des chiens anesthésiés l'effet de la néostigmine sur la paralysie respiratoire causée par le venin en réalisant l'électromyographie du diaphragme de l'animal.

L'effet produit par l'administration intraveineuse de méthylsulfate de néostigmine (0,05 mg/kg) sur les symptômes de l'envenomation causée au singe (*Cebus* sp) par la variété réversible du venin est impressionnant: une à deux



3



4

Fig. 3 — Diaphragme chroniquement dénervé et isolé de rat. Protection des récepteurs par la d-tubocurarine (dTc). Les contractures ont été produites par l'addition de 4 mcg/ml d'acétylcholine. 1) Réponses normales (deux); 2) après l'administration de 10 mcg/ml de dTc laissés en contact pendant 30 minutes, la réponse à l'acétylcholine a été abolie, mais elle retourne et augmente après des lavages sucessifs: elle devient normale après 60 minutes; 3) administration de 10 mcg/ml de dTc et après 30 minutes de 2 mcg/ml de venin de *M. frontalis;* après 30 minutes de l'addition du venin et apès 1 heure de l'administration de la dTc, la réponse à l'acétylcholine est abolie, mais elle devient normale après 90 minutes de lavages successifs; 4) administration de 2 mcg/ml de venin de *M. frontalis* laissés en contact pendant 30 minutes: blocage presque complet et irréversible des réponses à l'acétylcholine.

Fig. 4 — Muscle couturier isolé de crapaud. Potentiel de membrane avant et après l'administration de 5 mcg/ml et de 10 mcg/ml de venin de *M. frontalis.* Chaque point représente la moyenne des valeurs du potentiel de dix fibres.

minutes après l'injection, la respiration de l'animal redevient normale, son faciès se modifie et la paralysie motrice aussi bien que celle des muscles du larynx et du pharynx disparaissent complètement. Après 45 minutes à une heure, la paralysie, en général, se réinstalle, mais une deuxième injection de néostigmine est capable de restituer une fois de plus la force musculaire à l'animal. Des effets identiques sont observés après l'administration de l'anticholinestérasique à des chiens dans lesquels on a injecté la même variété du venin. Quand on emploie la variété irréversible, la néostigmine ne provoque qu'un retour partiel de la force musculaire. Cependant, elle antagonise très bien les effets produits sur le pigeon par cette variété du venin (*).

Des chiens anesthésiés avec le pentobarbital sodique ont été préparés pour l'excitation du nerf sciatique poplité externe, pour l'enregistrement des contractions du muscle tibial antérieur ainsi que de la pression artérielle, et pour être soumis à la respiration artificielle. L'excitation du nerf a été faite avec des stimuli maximales de 0,2 msec. de durée à la fréquence de 0,5 Hz. Le venin a été injecté par voie intramusculaire dans cinq expériences et par infusion intraveineuse dans une. Après l'atropinisation de l'animal la néostigmine a été administrée par voie intraveineuse alors que l'inhibition des réponses était égale ou supérieure à 75% dans quatre expériences et de 58% et de 44% dans les deux autres. L'antagonisme a été total (Fig. 5) ou presque total dans cinq expériences. Dans l'une d'elles le retour de la tension des contractions a

TABLEAU 4

PRÉPARATION *IN SITU NERF* SCIATIQUE-MUSCLE TIBIAL ANTÉRIEUR DE CHIEN ANTAGONISME ENTRE LE VENIN DE *MICRURUS FRONTALIS* ET LA NÉOSTIGMINE.

Exp. nº	Venin		% de blocage	
	Échant. nº	Dose (mg/kg)	Immédiatement avant l'injection de la néostigmine	Après l'injection de la néostigmine
1	1	0,80 (i.v.)	76 (180 min.)	29
2	2	1,80 (i.m.)	83 (115 min.)	0
3	4	0,85 (i.m.)	44 (240 min.)	0
4	4	0,85 (i.m.)	81 (350 min.)	50
5	4	0,80 (i.m.)	75 (225 min.)	0
6	5	0,85 (i.m.)	58 (270 min.)	20

(*) L'effet antagonique de la néostigmine sur le singe, le chien et le pigeon non anesthésiés, envenimés par le venin de *M. frontalis,* est documenté sur un film projeté en 1975 à l'Institute Pasteur de Paris, et au Centre de Recherche Merrell International à Strasbourg, après les conférences realizées par un des Auteurs (O.V.B.) aussi qu'au 5*th* International Symposium on Animal, Plant, and Microbial Toxins en 1976.

été seulement de 50% de sa valeur initiale. Sur le Tableau 4 on peut voir les résultats des six expériences qui ont été realisées.

L'antagonisme venin-néostigmine est beaucoup moins accentué sur la préparation nerf phrénique-diaphragme de rat. Le plus souvent, la néostigmine ne provoque qu'une augmentation fugace de l'amplitude des réponses partiellement inhibées. L'injection intraveineuse de néostigmine restitue les contractions du diaphragme des chiens auxquels on avait administré du venin par voie intramusculaire (Fig. 6).

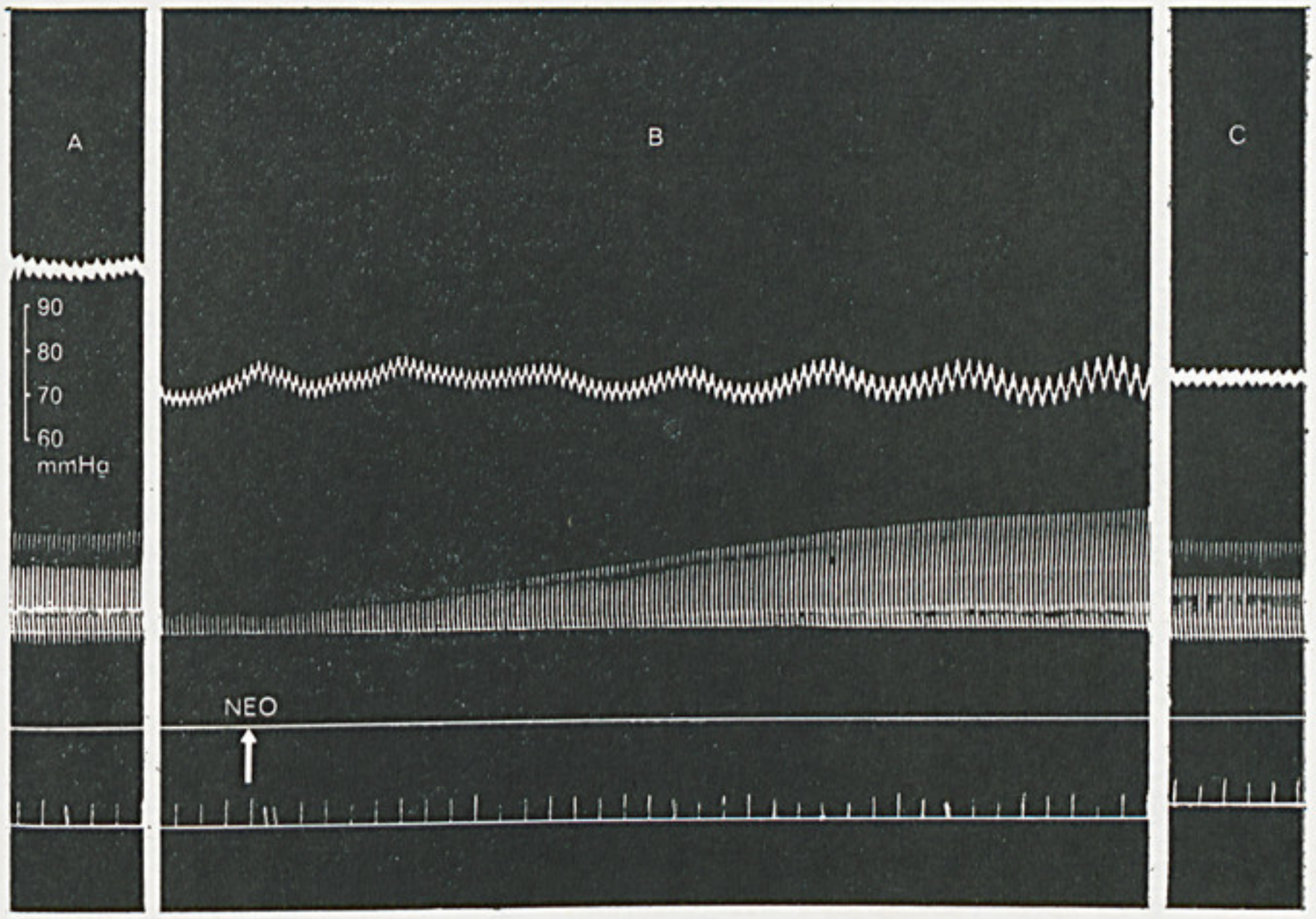
Sur le Tableau 5 sont exposés les résultats des quatre expériences qui ont été faites.

On peut donc conclure que la néostigmine antagonise très bien la paralysie neuromusculaire produite sur le chien par la variété réversible du venin.

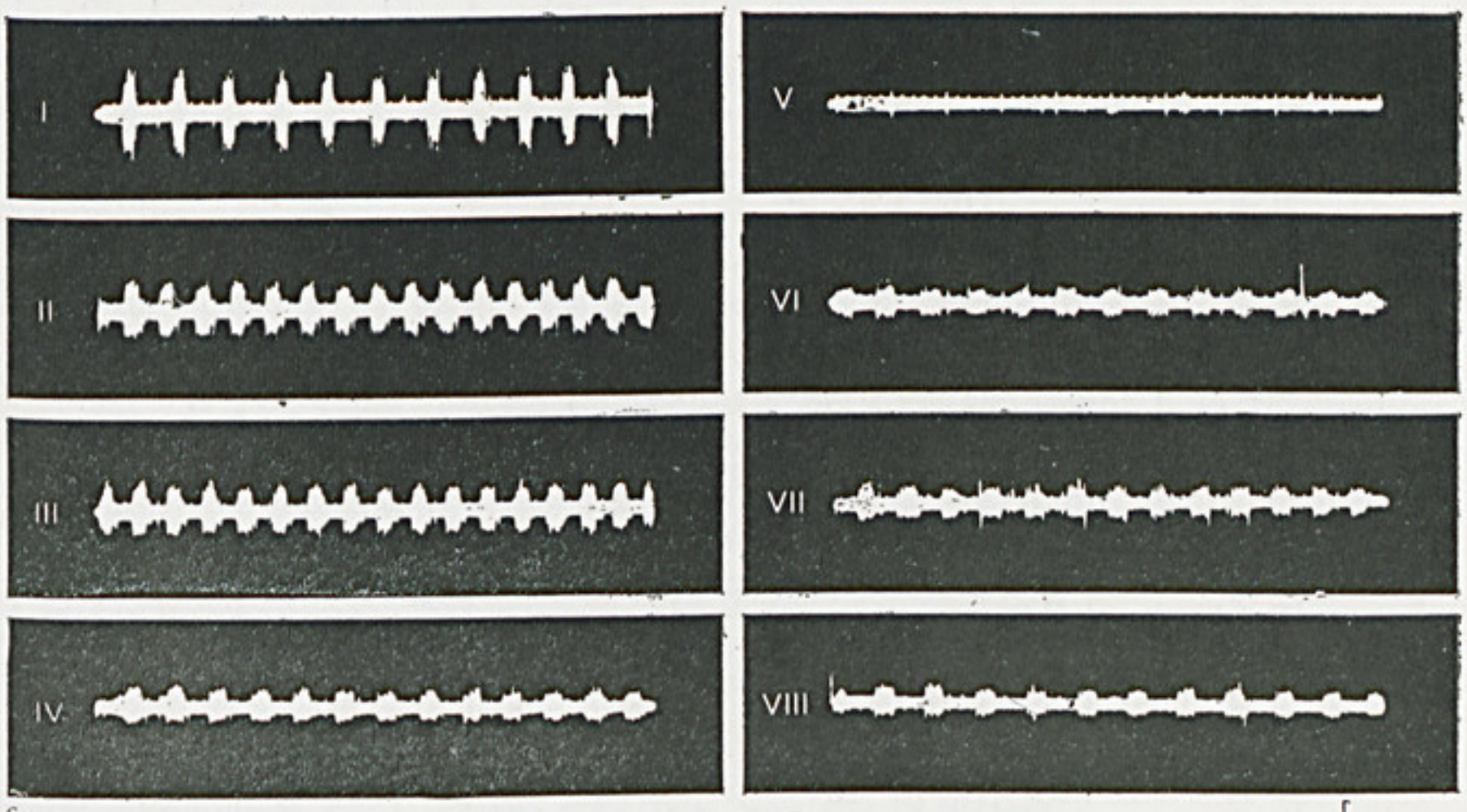
TRAITEMENT DE L'ENVENOMATION EXPÉRIMENTALE

Le traitement idéal des accidents produits par la morsure de serpent venimeux est celui qui peut prévenir la manifestation des symptômes de l'envenomation ou, du moins, les atténuer. Ceci peut être obtenu par la sérothérapie antivenimeuse introduite par Calmette à la fin du siècle dernier et qui était jusqu'à présent l'unique thérapeutique qui donnait une garantie de guérison. Toutefois, pour être réellement efficace, l'antivenin doit être administré en temps voulu et il doit être spécifique comme l'ont démontré les belles expériences de Brazil en 1901 (6) et en 1903 (5), aussi bien que celles de Lamb et Hanna en 1903 (10) et en 1904 (11), de Tidswell en 1906 (17), et d'Arthus en 1912 (2, 3). Malheureusement, ces deux condition ne peuvent pas toujours être remplies. Il faut donc développer d'autres mesures thérapeutiques pour qu'on puisse venir à l'aide des accidentés par morsure de serpents venimeux dans le cas où l'antivenin spécifique n'est pas disponible ou a été injecté tardivement. Les deux moyens — injection de néostigmine et respiration artificielle — que nous avons étudié expérimentalement pour le traitement de l'envenomation par le venin de *M. frontalis,* au contraire de l'antivenin, doivent être employés tardivement, quand la dépression respiratoire commence à se produire. Il faut observer que l'emploi de la respiration artificielle a été déjà l'objet d'études expérimentales et d'emploi clinique. Ainsi, par exemple, Arthus (1) a constaté que des lapins dans lequels on avait injecté du venin de *Naja naja,* traités tardivement avec l'antivenin cobraîque, pouvaient être sauvés si on les soumettait à la respiration artificielle. Campbell (7) affirme dans un travail publié en 1964 qu'il a obtenu de très bons résultats en ce qui concerne la survie des accidentés par morsure de serpent en Nouvelle Guinée en employant, outre l'antivenin, la respiration artificielle au cas où survienne la dépression respiratoire. Plus récemment, des anesthésistes indiens (8) ont constaté sur des chiens anesthésiés dans lequels ils avaient injecté du venin de *Naja naja* que la respiration artificielle peut maintenir en vie les animaux jusqu'à ce que la respiration naturelle reprenne.

Les essais concernant l'efficacité du traitement par la néostigmine ont été realisés sur quatorze chiens non anesthésiées. Sept on été traités par la néostigmine. Sept ont servi de témoins. Les expériences ont été realisées de telle façon que, le même jour et à la même heure, on injectait par voie intramusculaire



5



6

Fig. 5 — Pression artérielle et contractions du tibial antérieur de chien. Stimulation électrique (stimuli maximales, 0,5 Hz, 0,2 m. sec) du nerf sciatique poplité externe. A) Avant l'administration du venin; B) 3 heures et 40 minutes après; C) 90 minutes après B. Le venin de *M. frontalis* a été injecté par voie intramusculaire 0,8 mg/kg). NEO: administration de 0,1 mg/kg de méthylsufate de néostigmine par voie intraveineuse.

Fig. 6 — Électromyographie du diaphragme *in situ* de chien. Administration de 0,85 mg/kg i.m. de venin de *M. frontalis* et de 0,1 mg/kg i.v. de méthylsufate de néostigmine. En I, photographie des «potentiels avant l'injection du venin; en II, III et IV, photographies de potentiels 110, 135 et 200 minutes après l'injection du venin; en V, 240 minutes après l'administration du venin — la photographie ne décèle plus de potentiels (le chien est en apnée); en VI, photographie de potentiels (la respiration naturelle est redevenue) 3 minutes après l'injection de la néostigmine et 7 minutes après V; en VII et VIII, photographies de potentiels 20 et 40 minutes après l'injection de la néostigmine.

TABLEAU 5

DÉCHARGES DE POTENTIELS D'ACTION DU DIAPHRAGME DES CHIENS ANESTHÉSIÉS. ANTAGONISME ENTRE LE VENIN DE *MICRURUS FRONTALIS* ET LA NÉOSTIGMINE.

Exp. n.º	Venin dose (mg/kg, i.m.)	Décharges de potentiels d'action								
		Avant l'injection du venin		Après l'injection du venin			Après l'injection de la néostigmine (0,1 mg/kg)			
		Ampl.	Fréq.	Ampl.	Fréq.		Ampl.	Fréq.	Ampl.	Fréq.
1	1,50	+++	30	+±	6 (200 min)	— 0 (203 min)	++	24 (10 min)	— 0 (60 min)	
2	0,85	+++	15	+	27 (225 min)	— 0 (270 min)	+	27 (5 min)	+± 27 (8 min)	
3	0,85	+++	33	+	39 (200 min)	— 0 (300 min)	+	39 (3 min)	+ 39 (15 min)	+ 39 (46 min)
4	0,85	?	?	+++	14 (304 min)	— 0 (305 min)	+	24 (7 min)	+++ 36 (10 min)	— 0 (20 min)

dans deux chiens d'environ le même poids 0,95 mg/kg du venin de la variété réversible. Quand ils présentaient de la difficulté respiratoire on injectait dans l'un d'eux par voie intraveineuse, une solution de néostigmine et d'atropine. L'autre chien recevait par la même voie seulement de l'atropine dissoute dans un volume égal de sérum physiologique. On a employé dans toutes ces expériences une dose de 0,05 mg/kg de méthylsulfate de néostigmine. Il faut remarquer qu'il a été nécessaire d'injecter une deuxième dose de venin dans l'un des chiens dans une expérience et dans les deux dans une autre. Dans l'intervalle de deux à cinq minutes après l'injection de la néostigmine, il y a eu une régression totale de la dépression respiratoire et de la paralysie motrice produites par le venin. Une deuxième dose de néostigmine a été employée, cette fois par voie intramusculaire, dans quatre chiens qui ont présenté une récidive des symptômes de parésie après 20 à 70 minutes qui suivirent la première injection de l'anticholinestérasique. Tous les chiens traités ont survécu. Tous les chiens témoins sont morts en moins de trois heures et quarante minutes après l'injection du venin. Les principales données de ces expériences sont exposées sur les Tableaux 6a, 6b.

Comme on peut voir sur le Tableau 7 et ainsi que l'on pouvait le prévoir, les chiens envenimés survivent aussi, si on les soumet à la respiration artificielle jusqu'à ce que la respiration naturelle devienne normale. La respiration artificielle a été faite sur des chiens anesthésiés.

CONCLUSIONS

1) Le venin de *Micrurus frontalis* cause toujours la mort par paralysie respiratoire, s'il est employé par voie intramusculaire; quand il est introduit par voie intraveineuse, elle peut survenir en conséquence de ses effets sur la circulation.

2) La paralysie respiratoire est exclusivement d'origine périphérique et doit être attribuée à l'action inhibitrice des neurotoxines du venin sur la transmission neuromusculaire.

3) Il y a deux variétés de venin de *M. frontalis* quant à la réversibilité de son action sur la préparation nerf phrénique-diaphragme de rat.

4) Le blocage neuromusculaire produit par le venin est exclusivement d'origine postsynaptique et résulte de la combinaison de ses neurotoxines avec les récepteurs cholinérgiques de la plaque terminale.

5) La néostigmine antagonise très bien la paralysie neuromusculaire et, en conséquence, la dépression respiratoire et la paralysie motrice produites sur le chien par la variété réversible du venin. L'antagonisme est aussi marqué sur le singe et sur le pigeon. Les effets causés par la variété irréversible sont partiellement antagonisés sur le chien, mais très bien sur le pigeon.

6) L'emploi de la néostigmine et de la respiration artificielle permettent la survie des chiens dans lesquels on a injecté des doses sûrement mortelles du venin de *M. frontalis*. Le traitement des accidentés par morsure de serpent corail de l'espèce *M. frontalis* avec une ou deux de ces ressources s'impose dans le cas où survient une dépression respiratoire au cours de l'envenomation.

7) Il est très probable que la néostigmine peut aussi être efficace pour le traitement de l'envenomation produite par le venin d'autres Élapidés et même par celui d'Hydrophidés.

TABLEAU 6a

TRAITEMENT PAR LA NÉOSTIGMINE DE L'ENVENOMATION EXPÉRIMENTALE DU CHIEN PAR LE VENIN DE *MICRURUS FRONTALIS*.

Exp. Nº	Chien (poids)	Venin		Dépression respiratoire (heure)	Néostigmine			Résultat
		Dose totale (mg. i.m.)	Heure		Dose totale (mg)	Voie	Heure	
1	a) 4,9kg	4,655	9,55	11,00 (65 min)	0,250 0,250	i.v. i.m.	11,55 12,30	Survie
	b) 4,0kg	3,800	9,50	11,00 (70 min)	—	—	—	Mort, 11 h et 50 min
2	a) 9,7kg	9,305 4,850	10,40 14,00	14,20 (220 min) et (26 min)	0,485 0,485	i.v. i.m.	14,40 15,30	Survie
	b) 7,6kg	7,220	10,27	11,30 (63 min)	—	—	—	Mort, 11 h et 50 min
3	a) 5,9kg	5,600 2,950	9,50 12,30	13,20 (210 min) et (50 min)	0,295 0,295	i.v. i.m.	13,35 14,35	Survie
	b) 5,8kg	5,510 2,900	9,45 12,45	13,15 (210 min) et (35 min)	—	—	—	Mort, 13 h et 35 min
4	a) 6,3kg	6,000	11,35	13,20 (105 min)	0,300	i.v.	13,30	Survie
	b) 5,8kg	5,510	11,30	12,50 (80 min)	—	—	—	Mort, 13 h et 20 min

TABLEAU 6b

TRAITEMENT PAR LA NÉOSTIGMINE DE L'ENVENOMATION EXPÉRIMENTALE DU CHIEN PAR LE VENIN DE *MICRURUS FRONTALIS*.

Exp. Nº	Chien (poids)	Venin		Dépression respiratoire (heure)	Néostigmine			Résultat
		Dose totale (mg, i.m.)	Heure		Dose totale (mg)	Voie	Heure	
5	a) 7,7kg	7,310	9,40	10,30 (50 min)	0,760	i.v.	10,40	Survie
	b) 6,4kg	6,080	9,25	11,00 (95 min)	—	—	—	Mort, 11 h et 20 min
6	a) 5,8kg	5,510	12,05	14,00 (115 min)	0,290 0,290	i.v. i.m.	14,05 14,25	Survie
	b) 5,3kg	5,035	12,10	14,00 (110 min)	—	—	—	Mort, 14 h et 30 min
7	a) 5,4kg	5,130	10,00	11,55 (115 min)	0,270	i.v.	12,15	Survie
	b) 4,8kg	4,560	10,05	12,10 (125 min)	—	—	—	Mort, 13 h

TABLEAU 7

TRAITEMENT PAR LA RESPIRATION ARTIFICIELLE DE L'ENVENOMATION EXPÉRIMENTALE DU CHIEN PAR LE VENIN DE *MICRURUS FRONTALIS*.

Exp. N°	Venin		Paralysie respiratoire (minutes après l'injection du venin)	Durée de la respiration artificiele (en minutes)	Observations
	Échant N°	Dose (mg/kg)			
1	2	0,85	120	1020	540 minutes après l'injection du venin, le chien était encore en apnée. Le chien a survécu.
2	2	0,85	390	960	La paralysie respiratoire a eu une durée de 240 minutes. Le chien a survécu.
3	4	0,90	100	300	La paralysie respiratoire a eu une durée de 60 minutes. Le chien a survécu.
4	5	0,85	90	195	160 minutes après l'injection du venin, le chien était encore en apnée. Il a survécu.

ABSTRACT: Pathophysiology and treatment of the experimental envenomation produced by *Micrurus frontalis* venom. The cause of death produced by *M. frontalis* venom was investigated in the dog. Its i.v. injection caused a dramatic fall of arterial blood pressure which can prove to be fatal. However, when it was administered intramuscularly the effect on blood pressure was always mild and the animals died after a few hours from respiratory failure if artificial respiration was not given. The origin of this respiratory paralysis was studied by recording the phrenic discharge of action potentials from dogs intramuscularly injected with the venom. It was found that it is peripheral and must be ascribed entirely to the neuromuscular blocking action of the venom. There are two geographical varieties of venom with respect to the reversibility of the neuromuscular blockade produced in the rat isolated phrenic nerve-diaphragm preparation. The mechanism of the neuromuscular blocking action of the venom was investigated on the rat phrenic nerve-diaphragm preparation (effect on ACh release), the rat isolated and chronically denervated hemidiaphragm (effects on the responses elicited by ACh and electrical stimulation, effect of protection of the cholinergic receptors with dTc), and the toad sartorius (effects on the resting membrane potential, m.e.p.p's and e.p.p.). It was concluded that the neuromuscular block produced by the venom is entirely postjunctional, resulting from the fixation of its neurotoxins on the cholinergic receptors of the end-plate. The antagonism venom-neostigmine was studied on unanaesthetized animals (monkeys, dogs, pigeons), the dog sciatic nerve-tibialis anterior muscle preparation and the rat isolated phrenic nerve-diaphragm prepara tion. The effect of neostigmine administration on the respiratory paralysis evoked by the venom was investigated by recording the action potentials from the diaphragm of anaesthetized dogs. It was demonstrated that neostigmine antagonizes very well in monkeys, dogs and pigeons the effects resulting from the neuromuscular block caused by the reversible variety of the venom. The effects evoked by the irreversible variety were only partially antagonized in dogs but very well in pigeons. Fourteen dogs were employed in the study of the effectiveness of neostigmine administration in the treatment of the envenomation; seven of these were used as control. The experiments were carried out in such a way that in the same day and at the same hour two dogs were injected intramuscularly with the same dose of venom. When they became paretic and showed respiratory depression, one of them was injected intravenously with atropine (control) while the other received atropine plus neostigmine. An additional injection of neostigmine was given if the paresis returned. All animals of the control group died within four hours; all neostigmine treated animals survived.

UNITERMS: Toxicity. Symptoms. Reversibility of neuromuscular blocking. Mechanism of action. Venom-neostigmine antagonism.

BIBLIOGRAFIA

1. ARTHUS, M. Le venin de cobra est un curare. Arch. Inter. Physiol.,*10:* 161-191, 1910.
2. ARTHUS, M. De la spécificité des sérums antivenimeux — Sérum anticobraïque et venins d'Hamadryas (*Naja Bungarus*) et de Krait (*Bungarus coeruleus*). Arch. Inter. Physiol. Liége, *11:* 265-284, 1912.
3. ARTHUS, M. De la spécificité des sérums antivenimeux — Sérums anticobraïque, antibothropique et anticrotalique; venins de *Lachesis lanceolatus,* de *Crotalus terrificus* et de *Crotalus adamanteus.* Arch. Inter. Physiol. Liége, *12:* 317-338, 1912.
4. AXELSSON, J. et THESLEFF, S. A study of the supersensitivity in denervated mammalian skeletal muscle. J. Physiol., *147:* 178-193, 1959.
5. BRAZIL, V. Contribuição ao estudo do veneno ophidico. Rev. Med. São Paulo, *6:* 265-278, 1903.
6. BRAZIL, V. Do envenenamento ophidico e seu tratamento. Conferência realizada em 1º de dezembro, na Escola de Farmácia, Collectanea de Trabalhos (1901-1917) do Instituto Butantan, São Paulo, 31-55, 1918.

7. CAMPBELL, C.H. Venomous snake bite in Papua and its treatment with tracheotomy, artificial respiration and anti-venom. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., *58:* 263-273, 1964.

8. GODE, G.R.; TNADAN, G.C. et BHIDE, N.K. Role of artificial ventilation in experimental envenomation in the dog. Brit. J. Anaesthesiol, *40:* 850-852, 1968.

9. KELLAWAY, S.H.; CHERRY, R.O. et WILLIAMS, F.E. The peripheral action of the Australian snake venoms. 2. The curare-like action in mammals. Australian J. Exper. Biol. Med. Sci., *10:* 181-194, 1932.

10. LAMB, G. et HANNA, W. Specificity of antivenomous sera. Scientific Mem. by Officers of the Medicine and Sanitary Department of the Gouvernement of India, nº *5:* 1-14, 1903.

11. LAMB, G. et HANNA, W. Specificity of antivenomous sera. Scientific Mem. by Officers of the Medicine and Sanitary Department of the Gouvernement of India, nº *10:* 1-25, 1904.

12. LEE, C.Y. et PENG, M.T. An analysis of the respiratory failure produced by the Formosan elapid venoms. Arch. int. Pharmacodyn., *133:* 180-192, 1961.

13. LEE, C.Y.; CHANG, C.C. et CHEN, Y.M. Reversibility of neuromuscular blockade by neutrotoxins from Elapid and Sea snake venoms. J. Formosan Med. Assoc., *71:* 344-350, 1972.

14. PATON, W.D.M. et VIZZI, E.S. The inhibitory action of noradrenaline and adrenaline on acetylcholine out-put by guinea pig longitudinal muscle strip. Brit. J. Pharmocol., *35:* 10-28, 1969.

15. PELLEGRINI FILHO, A. et VITAL BRAZIL, O. Origem da paralisia respiratória causada pela peçonha de *Micrurus frontalis*. Ciência e Cultura, 28(2): 199-202, 1976.

16. SNYDER, G.K.; RAMSEY, H.W.; TAYLOR, W.J. et CHIOU, C.Y. Neuromuscular blockade of chick biventer cervicis nerve-muscle preparations by a fraction from coral snake venom. Toxicon, *11:* 505-508, 1973.

17. TIDSWELL, Fr. Researches on Australian venoms, snake bite, snake venom and antivenin. Researches on Australian Venoms. Department of Public Health, New South Wales, W.A. Glick, Sidney, 1-79, 1906.

18. VITAL BRAZIL, O. et BARRIO, A. Acción curarizante de las ponzoñas de Elapidae. I. Fenomenos de inhibición y facilitación en la union neuromuscular. La Prensa Medica Argentina, *37:* 1249-1256, 1950.

19. VITAL BRAZIL, O. et BARRIO, A. Acción curarizante de las ponzoñas de Elapidae. II. Efectos de algunos antagonistas del curare. La Prensa Medica Argentina, *37:* 1313-1318, 1950.

20. VITAL BRAZIL, O. Ação neuromuscular da peçonha de *Micrurus*. São Paulo, 1963 (Tese de Doutoramento, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo).

21. WEIL, C.S. Tables for the convenient calculation of median-effective dose (LD50 or ED50) and instructions in their use. Biometrics, *8:* 249-263, 1952.

22. WEISS, R. et McISAAC, R.J. Cardiovascular and muscular effects of venom from coral snake, *Micrurus fulvius*. Toxicon, *9:* 219-228, 1971.

Recebido para publicação em 09-II-1977 e aceito em 13-IV-1977.