

Étude de l'action de la pierre noire sur l'envenimation expérimentale

Jean-Philippe Chippaux¹
Ismaila Diédhiou²
Roberto Stock³

¹ Institut de recherche pour le développement (IRD), BP 9214, La Paz, Bolivie
<chippaux@ird.fr>

² Institut de recherche pour le développement (IRD), BP 1386, Dakar, Sénégal
<diedhiso@ird.sn>

³ Instituto de biotecnología, Universidad nacional de Mexico (Unam), Av. Universidad 2001, Cuernavaca, Morelos 62210, Mexico
<rstock@ibt.unam.mx>

Résumé

La pierre noire est utilisée depuis l'Antiquité pour traiter les morsures de serpent et certaines infections locales. Son efficacité clinique est controversée et, dans la mesure où aucune étude clinique n'a pu être effectuée, nous avons entrepris une série d'expérimentations *in vivo* et *in vitro*. Quatre méthodes ont été employées après la détermination de la DL₅₀ de lots de venins de *Bitis arietans*, *Echis ocellatus* et *Naja nigricollis* selon la technique de Spearman-Kärber. Dans une première série d'expériences, nous avons administré 3 DL₅₀ à des groupes de cinq souris à qui nous avons appliqué la pierre noire à des intervalles de temps variés après l'inoculation intramusculaire du venin. Dans une seconde série d'expériences, nous avons comparé la DL₅₀ mesurée simultanément dans deux groupes de souris avec et sans application de la pierre noire. Nous avons ensuite réduit la pierre noire en poudre que nous avons mise à incuber avec chacun des venins. D'une part, nous avons mesuré la concentration de protéines dans le surnageant après incubation puis centrifugation pour éliminer la poudre de pierre noire. D'autre part, ce même surnageant a été utilisé pour calculer la DL₅₀ des trois venins. Malgré une indiscutable adsorption des protéines par la pierre noire, les tests ont tous montré son incapacité à réduire la toxicité des venins *in vivo* chez les souris. L'efficacité thérapeutique de la pierre noire est en conséquence considérée comme douteuse.

Mots clés : médecine traditionnelle, venin

Abstract

Study of the action of black stone (also known as snakestone or serpent stone) on experimental envenomation

Black stone has been used since Antiquity to treat snake bites and local infections. Its efficacy is debated. Since no clinical trial has been performed, we conducted a series of *in vivo* and *in vitro* experiments in a murine model. After determining the LD₅₀ of batches of venoms of *Bitis arietans*, *Echis ocellatus* and *Naja nigricollis* according to the Spearman-Kärber's method, we used four separate methods. First, we injected a fixed lethal amount of venom (triple the LD₅₀) IM to the shaved thighs of lots of five mice and applied the black stone with an adhesive plaster at the point of injection at 0, 15, 30, 60 and 180 minutes. In another series of experiments, we administered increasing amounts of venom to each group of 5 mice according to the same protocol used to measure the LD₅₀; and applied black stone as above, immediately after the administration of each amount of venom. In the third series of experiments, we reduced black stone to powder and mixed 3 LD₅₀ of each venom with an increasing amount of powder for 30 minutes. After centrifugation, the supernatant was injected into mice and mortality measured. Two control groups (venom alone and black stone alone) were used in all the cases. Venom adsorption on black stone surface was assessed *in vitro* by measurement of residual proteins in supernatant after mixing black stone powder and venom for thirty minutes and centrifugation. The results showed the absence of effectiveness of the black stone when applied on wounds after venom injection. However, the direct contact between the black stone powder and the venom did reduce venom toxicity, as if black stone fixed venom proteins and removed the venom from the inoculum. The mechanical effectiveness of black stone can thus be shown. However, its efficacy in treating envenomation seemed very doubtful because of it is very nonspecific and because the venom diffuses rapidly from the wound.

Key words: traditional medicine, venom

Tirés à part : J.-P. Chippaux

Toutes les enquêtes épidémiologiques concernant les envenimations ophidiennes dans les pays tropicaux s'accordent sur le fait que la majorité des victimes s'adresse en priorité à la médecine traditionnelle [1, 2]. La pharmacopée traditionnelle utilise la pierre noire, parmi d'autres ingrédients. On la retrouve en Asie, en Afrique où elle est presque systématiquement utilisée et, plus rarement, dans certaines régions d'Amérique latine. L'extraction du venin est une démarche préconisée depuis que l'envenimation est associée à la pénétration d'une substance exogène. La rationalité de cette méthode – l'élimination physique du venin par le point de pénétration – est évidente. La pierre noire représente une méthode d'aspiration passive que certains industriels ont transposée en fabriquant des appareils à dépression destinés à extraire le venin. Provenant d'Inde, la pierre noire est arrivée en Europe vers 1650. Elle est mentionnée pour la première fois dans un document de vulgarisation sur les mœurs extrême-orientales datant de 1656 [3]. Ce document associe l'origine du musc chinois et la pierre noire qui proviendrait de la tête des serpents venimeux. Il semble exister une différence entre la « pierre à serpent » et la « pierre noire » [4]. La première serait fabriquée à partir de cornes de ruminant sauvage ou de concrétion naturelle extraite d'un animal (calcul vésiculaire ou rénal, bézoard), tandis que la seconde provient d'un fragment d'os. La pierre à serpent et la pierre noire ont été contrefaites maintes fois. Celles qui sont utilisées en Afrique proviennent généralement d'une diaphyse d'os long de bovin, lentement torréfié en milieu réducteur [5]. Cela lui confère des propriétés fortement adsorbantes sur les liquides, comme tout charbon animal ou végétal. Selon le mode d'emploi, la pierre est placée sur la plaie. Elle y adhère fortement et en extrait le poison, se détachant spontanément lorsque tout le poison est absorbé. Elle est ensuite régénérée quand on la met à bouillir dans du lait et peut ainsi servir indéfiniment. C'est la même recette qui existe encore aujourd'hui. La symbolique de ce remède est forte. Ses origines mystiques, son procédé de fabrication jalousement tenu secret, les « preuves » de son efficacité, la régénération dans le lait, antitoxique traditionnel dont la blancheur virginale s'oppose à la noirceur du mal, contribuent à sa réputation [5].

Les controverses sur l'efficacité de la pierre noire se poursuivent, sans qu'il n'y ait de véritables arguments pour trancher. Ne pouvant procéder à une évaluation clinique, trop risquée et non éthique, nous avons effectué plusieurs expérimentations *in vivo* et *in vitro* pour tenter de mesurer l'activité de la pierre noire sur le venin de serpent. Nous avons choisi des venins dont le mode d'action, par leur différence, permettait d'extrapoler nos résultats.

Matériel et méthode

Les venins de *Bitis arietans*, *Echis ocellatus* (Viperidae) et *Naja nigricollis* (Elapidae) nous ont été fournis par Latoxan (Valence, France).

La quantité de protéines contenue dans les venins a été mesurée à l'aide d'une méthode utilisant l'acide bicinchoninique (BCA) et des ions cuivriques en milieu alcalin.

Les souris « Swiss » de 3 semaines (20 ± 2 g) provenaient de l'élevage de l'Institut Pasteur de Dakar (Sénégal) ou de celui de l'*Instituto de biotecnologia* de l'université nationale autonome du Mexique (*Universidad nacional de Mexico*, Unam) de Cuernavaca (Mexique). La plupart des titrages ont été effectués en double à Dakar et à Cuernavaca. La dose létale 50 % (DL₅₀) intramusculaire (IM) a été calculée selon la méthode de Spearman-Kärber [2, 6]. Le temps létal 50 % (TL₅₀) a également été mesuré en observant les souris après l'injection de trois DL₅₀ et en notant pour chacune le délai entre l'injection de venin et le décès. Les injections de venins ont été faites sous un volume constant de 0,2 mL dans la cuisse arrière droite des souris.

De fabrication artisanale, les pierres noires ont été achetées sur un marché africain. Nous les avons utilisées, soit réduites en poudre fine au mortier en porcelaine, soit taillées à l'aide d'une scie à métaux afin de mesurer approximativement 1 centimètre carré (poids moyen $377,4 \pm 43,2$ mg) et de s'ajuster parfaitement à la cuisse préalablement rasée des souris. Elles ont été polies pour faciliter leur adhésion. La pierre noire était fixée à l'aide d'un ruban adhésif et maintenue jusqu'à la fin de l'expérience.

Quatre protocoles ont été mis en œuvre : – après administration de trois DL₅₀ à cinq lots de cinq souris chacun, la pierre

noire a été appliquée à toutes les souris immédiatement après l'injection de venin pour le premier lot de souris, 15 minutes après l'injection pour le deuxième et 30 minutes pour le dernier. Deux groupes témoins ont reçu respectivement trois DL₅₀ de venin, sans pierre noire, et du solvant (sérum salé isotonique pour préparation injectable), avec la pierre noire. La mortalité a été observée en temps réel pour comparer les TL₅₀ avec et sans pierre noire en fonction du délai d'application ;

– au cours d'une seconde expérimentation, nous avons comparé la DL₅₀ du venin de *Bitis arietans* dans deux groupes de cinq souris ; un premier groupe recevait le venin sans application de pierre noire, tandis que la pierre noire était appliquée immédiatement après l'injection de venin à toutes les souris du second groupe. Les mêmes dilutions de venin étaient inoculées aux deux groupes de souris correspondant respectivement aux souris sans et avec pierre noire. Les observations ont été faites à 24 et 48 heures.

– chaque venin a été incubé à 37 °C en présence de poudre de pierre noire pendant 30 minutes, puis centrifugé. Un dosage de protéines avant et après incubation a permis d'évaluer la quantité de protéines adsorbée sur la poudre de pierre noire. Le témoin était composé d'albumine sérique bovine (BSA).

– le surnageant des solutions de venins mises en incubation avec la pierre noire, après centrifugation pour éliminer la poudre de pierre noire, a été utilisé pour mesurer la DL₅₀.

Les comparaisons statistiques ont utilisé le test de Student, le coefficient de corrélation et le χ^2 pour $p = 0,05$.

Résultats

Les DL₅₀ moyennes de *Bitis arietans*, *Echis ocellatus* et *Naja nigricollis* étaient respectivement de 30, 45 et 25 µg par souris en IM. Le TL₅₀ de trois DL₅₀ était d'environ une heure.

Nous avons systématiquement vérifié la parfaite adhérence de la pierre noire au point d'injection, preuve, selon la notice d'utilisation, du fonctionnement normal de la pierre noire.

Au cours de la première série d'expériences utilisant les trois venins, nous n'avons

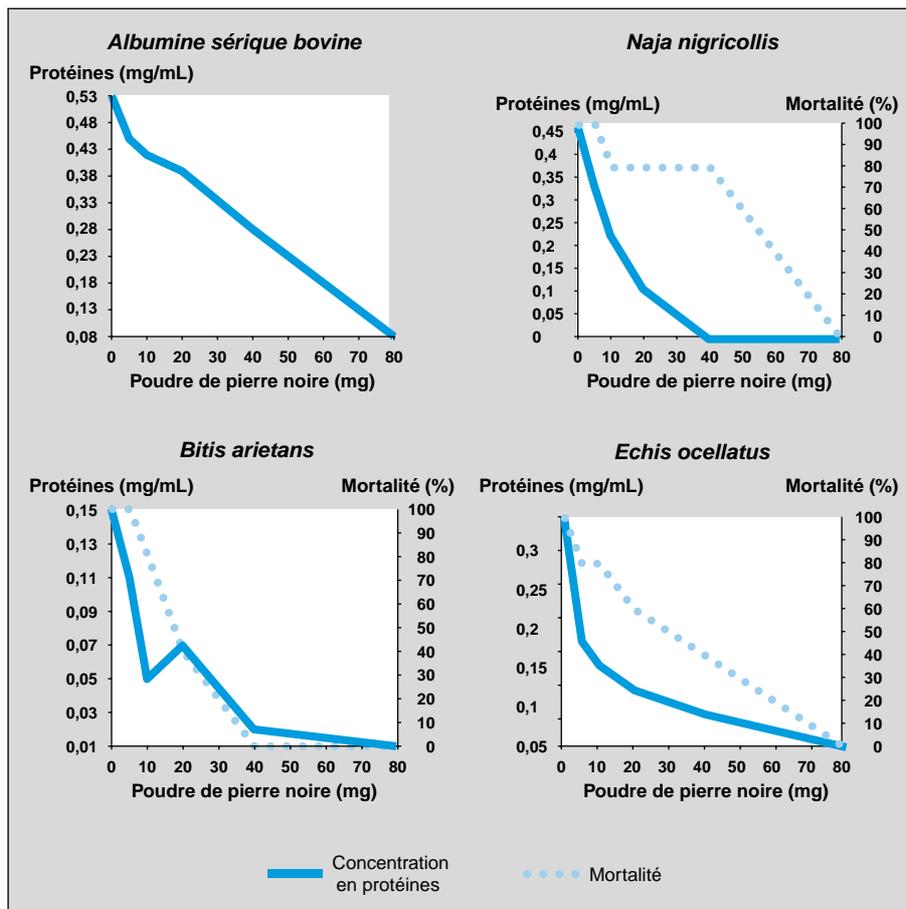


Figure 1. Corrélation entre la concentration de protéines et la toxicité des surnageants.

Figure 1. Correlation between protein concentration and supernatant toxicity.

observé aucune différence statistique entre le lot de souris sans pierre noire (témoin) et celui à qui elle avait été appliquée 0, 15 et 30 minutes après l'injection de venin. De plus, nous n'avons pas observé de différence entre les TL_{50} des différents lots de souris.

La mesure de la DL_{50} du venin de *B. arietans*, avec et sans pierre noire, a présenté une différence significative : la DL_{50} sans pierre noire était de $29,7 \pm 2,2 \mu\text{g}$ par souris. Avec la pierre noire, la DL_{50} était de $21 \pm 2,2 \mu\text{g}$ par souris, c'est-à-dire significativement plus toxique ($t = 3,1$; $p > 0,01$). Nous n'avons pas reproduit cette expérimentation avec le venin des autres espèces.

Le dosage des protéines dans le surnageant a montré une diminution de la quantité de protéines proportionnelle à la quantité de poudre de pierre noire en incubation avec le venin ou l'albumine

sérique bovine utilisée comme témoin (figure 1).

Après incubation avec la poudre de pierre noire, la DL_{50} des surnageants a permis de calculer les quantités de pierre noire neutralisant chacun des venins (figure 1) :

- 16,2 [10-26,3] mg de pierre noire neutralisent 36,6 μg de venin de *B. arietans* ;
- 21,4 [10,8-42,4] mg de pierre noire neutralisent 64,4 μg de venin d'*E. ocellatus* ;
- 37,3 [22-63,3] mg de pierre noire neutralisent 56,6 μg de venin de *N. nigricollis*.

La corrélation entre l'adsorption de BSA et de chacun des venins est significative ($p < 0,05$). En revanche, la corrélation entre l'absorption des protéines du venin et la réduction de la toxicité n'est pas toujours significative. Elle l'est pour *B. arietans* ($r = 0,88$; $p = 0,01$) et *E. ocellatus* ($r = 0,85$; $p = 0,02$), mais non pour *N. nigricollis* ($r = 0,68$; $p = 0,10$).

Discussion

Les premières tentatives d'évaluation de l'efficacité de la pierre noire remontent au milieu du XVII^e siècle [3]. Kircher et Redi ont procédé à une série d'expérimentations contradictoires. Le premier a fait mordre un chien par une vipère avant d'appliquer la pierre noire. Après 24 heures de fortes fièvres, le chien en réchappe prouvant, selon Kircher, l'efficacité du traitement. Par ailleurs, Kircher rapporte qu'un paysan mordu par un serpent avait été traité avec succès par l'application de la pierre noire. En revanche, Redi mène de très nombreuses expériences sur des coqs et des pigeons. Il publiera 20 ans plus tard ses résultats – montrant l'absence d'efficacité de la pierre noire – dans l'indifférence générale. En fait, ce débat avait rapidement pris un tour pas-

sionnel et idéologique, la simplicité de la démonstration de Kircher s'opposant à la complexité des expérimentations de Redi. Il faut noter qu'un siècle plus tard, Fontana avait tenté sans succès l'expérience de retirer le venin de pigeons mordus par une vipère, soit par succion buccale, soit à l'aide d'une sangsue (*in : Traité de la vipère*, 1781, cité par Épelboin [5]).

La pierre noire a été largement reprise par la suite, notamment par les Pères Blancs qui les vendirent jusqu'à ces dernières années dans toutes les procures de missions en Afrique. La pierre noire est présente dans la plupart des dispensaires où elle a supplanté le sérum antivenimeux trop coûteux et difficile à conserver.

La pierre noire est un recours thérapeutique à la fois simple et logique puisqu'elle procède par extraction du venin. Néanmoins, elle constitue une réponse à un événement non fortuit pour une grande partie des populations rurales des pays tropicaux. La morsure de serpent résulte en effet de circonstances particulières qui exigent une prise en charge appropriée. Il s'y associe un rituel qui peut combiner plusieurs recettes traditionnelles, parmi lesquelles celle de la pierre noire apparaît comme la plus accessible [5].

Les arguments en faveur de l'efficacité de la pierre noire sont peu nombreux et tous de nature clinique. La plupart des succès rapportés se fondent sur des rumeurs [7], le plus souvent non vérifiées ou incontrôlables. Même lorsque le plaidoyer est solidement documenté et fait appel à un grand nombre d'observations [8], aucune preuve formelle n'est apportée par les auteurs. Il s'agit, le plus souvent, de cas traités avec succès après l'application de la pierre noire mais sans détail clinique, ni identification formelle du serpent. Parfois, le serpent est bien identifié comme venimeux, mais on sait que cette démonstration est d'un intérêt limité dans la mesure où un serpent venimeux peut ne pas inoculer de venin. Par ailleurs, les séries cliniques, même importantes, concluant à une majorité de guérison ne sont pas davantage probantes puisqu'il a été montré dans de nombreuses études épidémiologiques que plus de la moitié des morsures non traitées ne sont suivies d'aucun trouble clinique et que la létalité est très variable d'un endroit à l'autre et peut être – même en l'absence de tout traitement – inférieure à 1 % [1, 2].

Nous avons choisi des venins de modes d'action différents pour élargir la validité de nos résultats. *Bitis arietans* et *Echis*

ocellatus sont des Viperidae dont le venin est essentiellement composé d'enzymes. Le venin de *B. arietans* est nécrosant, celui d'*E. ocellatus* est davantage hémorragique. En revanche, *N. nigricollis* est un Elapidae dont le venin est riche en toxines qui associent une neurotoxicité par bloc des récepteurs cholinergiques à une action nécrosante locale due aux cytotoxines [2]. Ce choix permettait de distinguer une éventuelle protection de la pierre noire aux niveaux systémique et local.

Notre expérimentation semble confirmer l'absence d'efficacité de la pierre noire. Il ne faut probablement pas accorder une trop grande importance à l'augmentation de toxicité observée chez les souris soumises à la pierre noire lors de la mesure comparée de la DL₅₀. Elle pourrait s'expliquer par la pose de la pierre, de grande taille relativement à la cuisse d'une souris de 3 semaines malgré nos efforts pour l'ajuster, et du ruban adhésif qui comprimait la racine du membre. Cependant, la variabilité des mesures de la DL₅₀, due à l'absence de parfaite homogénéité des souris autant qu'aux aléas climatiques (chaleur et humidité notamment qui réduisent la résistance des animaux d'expérience), peut expliquer cette différence. L'intervalle de confiance donné par l'équation de Spearman-Kärber correspond à l'écart lié à l'expérimentation elle-même et non aux variations de conditions du test qui dépendent de nombreux facteurs environnementaux et circonstanciels [2].

L'absence de protection *in vivo* est corroborée par plusieurs expérimentations utilisant les différents venins. Il semble que la pierre noire, dont les capacités d'adsorption sont indéniables, ne puisse extraire le venin après son inoculation dans l'organisme. Il faut souligner le caractère non spécifique de l'adsorption du venin par la pierre noire. La *figure 1* montre que l'adsorption d'une protéine pure, l'albumine sérique bovine, est strictement proportionnelle ($r = -1$) alors que celle des différents venins ne l'est pas, même si elle reste relativement proche de la linéarité : le coefficient de corrélation est égal à -0,82 pour *B. arietans*, -0,77 pour *E. ocellatus* et -0,83 pour *N. nigricollis* ($p = 0,05$). Cela suggère que l'adsorption des protéines appartenant à un mélange, comme le sont les venins, n'est pas homogène et que certaines présentent des coefficients d'adsorption différents. Soit le mélange de protéines se traduit par une compétition entre elles, soit les propriétés structurales modifient le degré d'affinité pour la pierre noire, ce

qui conduit à des réductions de concentrations protéiques dans le surnageant. En outre, appliquée sur la peau après une morsure, la pierre noire est en contact avec de nombreux fluides biologiques, sang, lymphes, sueur qui probablement sont en compétition avec le venin s'il en reste. Mais l'absence de réduction de la toxicité *in vivo* peut aussi être due à la rapide diffusion du venin dans l'organisme hors de la portée de la pierre noire. Bénéficiant d'une bienveillante indifférence, la pierre noire a été présentée comme virtuellement utile, en tout cas non nuisible, grâce à l'effet placebo permettant de rassurer la victime. Toutefois, il faut souligner deux risques importants : l'effet dissuasif qui conduit à écarter, ou au moins retarder, un traitement réellement efficace et les risques de surinfection – voire de tétanos [9] – liés à des pratiques douteuses et potentiellement dangereuses comme les incisions précédant l'application de la pierre noire.

Conclusion

Bien qu'introduite récemment par la médecine occidentale, la pierre noire fait désormais partie de la médecine traditionnelle africaine et jouit d'une réputation favorable encore très importante auprès des populations. C'est la raison pour laquelle, excluant autant pour des raisons éthiques que scientifiques un essai clinique, une démonstration expérimentale s'avérerait nécessaire.

L'expérimentation rapportée ici ne permet pas de confirmer une efficacité quelconque de la pierre noire. C'est pourquoi, en cas d'envenimation sévère, nous contestons formellement une capacité thérapeutique à empêcher une évolution fatale ou des séquelles graves. Il est d'ailleurs significatif que les Pères Blancs, qui commercialisaient la pierre noire en Afrique depuis la fin du XIX^e siècle, en aient récemment et discrètement suspendu la distribution... ■

Remerciements

Nous remercions Yvon Doljansky et le Laboratoire de toxines animales (Latoxan) qui nous ont procuré gracieusement le

venin nécessaire à cette expérimentation. Par ailleurs, nous exprimons notre gratitude à Blanca Ramos, Jackson Malukisa, Ermus Musama et Georges Diatta pour leur aide lors des titrages.

Références

1. Chippaux JP. Snake bites : appraisal of the global situation. *Bull World Health Organ* 1998 ; 76 : 515-24.
2. Chippaux JP. *Venins de serpent et envenimations*. Paris : IRD éditions, 2002.
3. Baldwin M. The snakestone experiments. An early modern medical debate. *Isis* 1995 ; 86 : 394-418.
4. Rasquinha D. Snake stone for snake envenomation. *Am J Emerg Med* 1996 ; 14 : 112-3.
5. Épelboin A. La malédiction de la pierre noire. In : Retel Laurentin A, ed. *Étiologie et perception de la maladie dans les sociétés modernes et traditionnelles*. Paris : L'Harmattan, 1995.
6. Organisation mondiale de la santé (OMS). *Caractérisation des venins et standardization des sérums antivenimeux : progress réalisés*. Offset Publ. 58. Genève : OMS, 1981.
7. Favarel-Garrigues JC. Réflexions sur le traitement des envenimations par la « pierre noire » dite « pierre à serpents ». *Conc Méd* 1981 ; 103 : 1643-9.
8. Scarpa A. The serpent stone or the black stone. *Soc Sci Med* 1987 ; 25 : 229-30.
9. Habib AG. Tetanus complicating snakebite in northern Nigeria : clinical presentation and public health implications. *Acta Trop* 2003 ; 85 : 87-91.

John Libbey EUROTEXT

ACTIVEZ l'accès en ligne à VOTRE REVUE

GRATUIT pour les abonnés

Il vous suffit de vous munir de votre numéro d'abonné* et de suivre les instructions pas à pas.

*Pour connaître votre n° d'abonné : reportez-vous à votre facture ou appelez notre service abonnement au : + 33 (0)1 43 62 66 64

Consultation de la revue en ligne
Articles téléchargeables au format PDF
Accès aux archives de la revue

Rendez-vous sur www.cahierssante.fr

REVUES
Toutes les revues
Médecine
Biologie et recherche
Santé publique
Agronomie et Biotech.

ABONNES
Mon compte
Mot de passe oublié ?
Activer mon compte

SERVICES
Commander un numéro
Articles à la carte
Newsletters

ESPACE AUTEURS