

UTILISATION DES PLANTES MEDICINALES CONTRE L'ENVENIMATION SCORPIONIQUE ET OPHIDIENNE

A. MEMMI¹, G. SANSA^{2*}, I. RJEIBI^{3*}, M. EL AYE³, N. SRAIRI-ABID³,
Z. BELLASFER³ ET A. FEKHIH¹

¹ Faculté de Pharmacie, rue Avicenne 5009, Monastir, Tunisie.

² Institut Supérieur de Biotechnologie, Avenue Taber Hadded, B.P 74. Monastir, Tunisie.

³ Institut Pasteur de Tunis, 13, Place Pasteur B.P.74 1002, Tunis-Belvédère, Tunisie.

^{3*} Auteur correspondant : E-Mail : rjeibii@yahoo.fr

* ont contribué équitablement.

RESUME

L'envenimation scorpionique et ophidienne constituent un grand problème de santé publique en Tunisie et en particulier dans le Sud-Est de la Tunisie. Dans ces régions *Artemisia campestris* L est une plante très connue qui occupe une place très importante en médecine traditionnelle pour son efficacité présumée contre les venins de scorpions et de serpents. Dans ce travail, nous avons testé pour la première fois, l'activité antivenimeuse d'*Artemisia campestris* L contre le venin de scorpion *Androctonus australis garzonii* et celui de la vipère *Macrovipera lebetina* et ceci en fixant la dose de l'extrait à 3 mg/souris alors que les doses de venins sont variables. Les feuilles d'*Artemisia campestris* L ont été extraites par différents solvants organiques (Ether de pétrole, acétate d'éthyle, méthanol et éthanol). Chaque extrait a été testé pour son pouvoir neutralisant. Pour l'extrait éthanolique d'*Artemisia campestris* L, une activité significative vis-à-vis du venin du scorpion *Androctonus australis garzonii* (Aag) a été décelée. De la même manière, une activité neutralisante significative contre le venin de la vipère *Macrovipera lebetina* (Ml) a été obtenue avec l'extrait au dichlorométhane. Ces résultats suggèrent la présence de deux types de composants chimiques différents dans cette plante : ceux neutralisant le venin de scorpion, solubles dans l'éthanol alors que ceux neutralisant le venin de vipère sont solubles dans le dichlorométhane.

Mots clefs : Venin de scorpion, venin de vipère, *Artemisia campestris* L, *Androctonus australis garzonii*, *Macrovipera lebetina*, toxicité, neutralisation.

ABSTRACT

The scorpionic and opbidian envenomations are a serious public health problem in Tunisia especially in Southeastern regions. In these regions *Artemisia campestris* L is a plant well known which has a very important place in traditional medicine for its effectiveness against alleged venom of scorpions and snakes. In this work, we tested for the first time, the anti-venomous activity of *Artemisia campestris* L against the scorpion *Androctonus australis garzonii* and the viper *Macrovipera lebetina* venoms.

Assays were conducted by fixing the dose of extract to 3 mg / mouse while doses of venom are variable. The leaves of *Artemisia campestris* L were extracted by various organic solvents (Ether of oil, ethyl acetate, methanol and ethanol) and each extract was tested for its venom neutralizing capacity.

For the ethanolic extract, a significant activity with respect to the venoms of scorpion *Androctonus australis garzonii* (Aag), was detected. Similarly, a significant neutralizing activity against the venom of a viper *Macrovipera lebetina* (Ml), was obtained with the dichloromethane extract.

These results suggest the presence of two different type of chemical components in this plant: those neutralizing the venom of scorpion are soluble in ethanol whereas those neutralizing the venom of viper are soluble in dichloromethane.

Key words : Venom of scorpion, venom of viper, *Artemisia campestris* L, *Androctonus australis garzonii*, *Macrovipera lebetina*, toxicity, neutralization.

INTRODUCTION

L'envenimation scorpionique et ophidienne constitue un danger pour la vie humaine. Un problème médical dans les pays tropicaux et subtropicaux est la demande pour la protection contre les fréquentes envenimations, dont le traitement est pratiquement délicat en absence de ressources thérapeutiques. Le premier sérum antivenimeux d'usage médical a été préparé pour lutter contre les morsures de cobra du Vietnam ¹. La préparation du premier sérum antiscorpionique pour usage humain était l'œuvre d'Etienne Sergent en 1936. En Tunisie, les régions les plus touchées par le problème de scorpionisme sont essentiellement le Centre et le Sud. Actuellement, l'Institut Pasteur de Tunis fournit des sérums antiscorpioniques élaborés chez le cheval et conditionnés dans des ampoules. Une envenimation scorpionique ou ophidienne nécessite une hospitalisation très rapide ce qui n'est pas toujours possible. En effet, bon nombre de victimes habitent dans des zones rurales où les hôpitaux sont assez éloignés.

Pour ce faire, les habitants se soignent fréquemment contre l'effet de venin des scorpions et des serpents soit en utilisant des emplâtres, soit en faisant consommer à l'accidenté un décocté de plantes. La majorité des substances pures de plantes connues pour leur protection des souris contre l'envenimation ophidienne sont généralement dépourvues de nitrogène et contiennent des composés de faible masse moléculaire, tels que les composés phénoliques, le phytostérol et le triterpénoïde ^{2,3}. Ces micromolécules interagissent avec des macromolécules du venin de serpent et montrent un effet anti-inflammatoire ⁴. Au Sud de la Tunisie, les feuilles d'*Artemisia campestris* L ou de « t'gouft » sont utilisées en médecine traditionnelle pour neutraliser l'effet du venin de scorpion et de serpent. *Artemisia campestris* L est une plante qui appartient à la famille des *compositae*. Elle peut atteindre un mètre de hauteur dans les endroits arrosés. Elle est bien utilisée en médecine traditionnelle comme antiseptique, agent emménagogue, cholagogue, gastrique et tonifiant ⁵. Elle est utilisée comme abortifacient pour faciliter l'accouchement ⁶. Une infusion des racines a été utilisée en diurétique et les mouvements de l'intestin ⁷. Les effets médicaux d'*Artemisia campestris* L sont dus tellement à la présence des principes actifs tels que les huiles essentielles, les flavonoides, les dérivés phénoliques, les dérivés chromaniques et les dérivés acétyléniques. Ces der-

niers se trouvent en grande quantité dans la partie aérienne et particulièrement les feuilles. Il a été démontré que *Artemisia campestris* L induit une action antioxydante et hépatoprotectrice ⁸.

L'Arteminolides A-D (1-4), isolé des parties aériennes d'*Artemisia*, inhibe la croissance de la cellule tumorale de façon dose dépendante ⁹.

Au cours de ce travail, nous avons démontré in vivo, dans un modèle animal, le pouvoir neutralisant d'*Artemisia campestris* L contre le venin de scorpion *Androctonus australis garzonii* et celui de vipère *Macrovipera lebetina* en utilisant différents extraits organiques de cette plante.

MATERIEL ET METHODES

PREPARATION DU MATERIEL VEGETAL

Artemisia campestris L. a été collectée au mois d'août quand la plante possède le maximum d'éléments actifs. Dans la nature, cette période correspond à l'apogée de la période d'activité des scorpions et des vipères. La collecte provient de Djerba et plus précisément de Mezraya, caractérisée par un climat humide et frais en hiver, chaud et sec en été. Le matériel végétal a été ensuite séché à l'ombre, tout en évitant la poussière et l'humidité, pour garder intactes les propriétés pharmacologiques de la plante.

Après séchage, les feuilles qui contiennent la majorité des principes actifs sont détachées facilement en battant les touffes séchées. Ensuite, elles sont tamisées, puis broyées à l'aide d'un broyeur mécanique.

EXTRACTIONS PAR LES SOLVANTS

ORGANIQUES

EXTRACTIONS AVEC L'APPAREIL DE SOXHLET

- *Extraction suivant un gradient de polarité croissante*

Cinquante g de feuilles d'*Artemisia campestris* L ont été extraits par des solvants organiques (éther de pétrole, acétate d'éthyle et méthanol) en suivant un gradient de polarité croissant. Chaque extraction s'effectue par l'appareil de Soxhlet durant 24 heures, ensuite l'évaporation des solvants est réalisée à l'aide d'un évaporateur rotatif.

- *Extraction avec le dichlorométhane*

La partie aérienne d'*Artemisia campestris* L est extraite avec le méthanol 70%.

Pour séparer la phase aqueuse de la phase organique, le dichlorométhane est additionné au résidu obtenu après l'évaporation du méthanol: le dichloro-

méthane est plus dense que l'eau ce qui permet une meilleure séparation des deux phases aqueuse et organique. Après élimination du dichlorométhane, à l'aide d'un évaporateur rotatif, le résidu obtenu est nommé « extrait du dichlorométhane ».

EXTRACTIONS A REFLUX

• Extraction avec l'éthanol

Les feuilles d'*Artemisia campestris* L broyées (50g) sont macérées dans l'acétone pendant une nuit à température ambiante puis extraites au reflux avec l'éthanol pendant 2 heures.

Après évaporation de l'éthanol, les extraits organiques sont séchés à 40°C pendant une nuit afin d'éliminer les traces de solvants. Les résidus obtenus sont gardés à 4°C.

CALCUL DES RENDEMENTS DES EXTRAITS ORGANIQUES

Le rendement est exprimé en pourcentage de la masse de l'extrait obtenu par rapport au poids de la matière sèche utilisée. Après élimination de toute trace de solvant, on calcule le rendement de chaque extrait organique en appliquant la formule suivante :

$$R (\%) = (P_{bp} - P_{bv}) \times 100 / PMS$$

P_{bp} : poids du ballon plein (contenant l'extrait)

P_{bv} : poids du ballon vide

PMS : poids de la matière sèche utilisée.

PURIFICATION DES EXTRAITS ORGANIQUES

La purification se fait sur gel de silice (45g). Après préparation du gel, chaque extrait (0,5g) est dilué dans le solvant qui le contient, ensuite l'extrait est déposé dans la colonne. Chaque extrait est élué avec l'éluant correspondant (Tableau I).

Tableau I: Purification des extraits organiques et leurs éluants correspondant.

Extrait	Eluant
Dichlorométhane	Acétate d'éthyle /méthanol
Ethanolique	Acétone/éthanol
Ether de pétrole	Ether de pétrole/acétone
Acétate d'éthyle	Chloroforme/méthanol
Méthanolique	Acétone /méthanol

Durant l'élution, la proportion du solvant polaire est augmentée progressivement afin d'éluer tous les composés de chaque extrait. Les fractions sont

ensuite mélangées, sauf la première qui est riche en chlorophylle. Ces fractions sont enfin concentrées jusqu'à un volume de 2 ml.

MATERIEL BIOLOGIQUE

Les venins de scorpion *Androctonus australis garzonii* (Aag) et de vipère *Macrovipera lebetina* (ML) sont fournis par le service des Unités Animalières de l'Institut Pasteur de Tunis. Les tests ont été effectués sur des souris Swiss de 18-20g fournis par le service des Unités Animalières de l'Institut Pasteur de Tunis.

LA DL50 DE VENIN D'Aag ET ML

La toxicité des venins de scorpions et de serpents est évaluée par la détermination in vivo de la dose létale médiane (DL50). Des quantités croissantes sont diluées dans 1% de BSA et NaCl 0,9% puis sont injectées à des lots d'animaux par voie Sous Cutanée (SC) pour le venin d'Aag et par voie intraveineuse (IV) pour *Macrovipera lebetina*. Les animaux sont mis en observation pendant 24 h et les survivants de chaque lot sont notés. La DL50 a été calculée et standardisée en appliquant la méthode de Spearman-Kärber qui obéit à la formule suivante:

$$\text{Log DL50} = -(\bar{x}_0 - d/2 + d\sum (r_i/ni))$$

$\bar{x}_0$ = Log 1/volume qui donne 100% de survivants

d = Log 1/incrément

ni = nombre d'animaux utilisés à chaque dose de venin

r_i = nombre d'animaux positifs (parmi ni)

ETUDE DE LA SOLUBILITE DES EXTRAITS

Les extraits étudiés sont des extraits organiques: l'éthanolique, le dichlorométhane et l'acétate d'éthyle. Etant donné que les extraits sont peu solubles dans le sérum physiologique, du DMSO et de l'éthanol ont été ajoutés. La quantité de chaque extrait est égale à 30 mg dissoute dans 2ml de solvant. Le pourcentage de DMSO est fixé à 5% alors que le pourcentage de l'éthanol est variable (10%, 20%, 30%, 50% et 60%). Ces mélanges ont été préalablement testés sur les souris pour évaluer leur effet toxique et fixer la proportion de l'éthanol avec laquelle aucun effet secondaire n'est décelable.

TEST DE NEUTRALISATION DU VENIN ANDROCTONUS AUSTRALIS GARZONII ET MACROVIPERA LEBETINA

Afin de tester l'effet neutralisant des différents

extraits de la plante contre les venins d'*Androctonus australis garzonii* et *Macrovipera lebetina*, la dose de l'extrait à tester est fixée à 3 mg/souris, alors que les doses de venin sont variables (1 DI50 ; 1,25 DI50 ; 1,56 DI50 ; 1,95 DI50 et 2,44 DI50). Un lot de 6 souris est utilisé pour chaque dose du venin.

Pour l'Aag, les extraits d'*Artemisia campestris* L testés sont les extraits à l'éthanol, au dichlorométhane et à l'acétate d'éthyle. En ce qui concerne MI, seulement les extraits éthanolique et au dichlorométhane sont testés. Chaque extrait, est dissout dans un mélange Eau/ETOH/DMSO (85/10/5) puis, incubé avec des doses croissantes du venin brut de MI et des extraits du venin Aag pendant 45 min à 37 °C.

RESULTATS

RENDEMENTS DES EXTRAITS ORGANIQUES ET DE L'HUILE ESSENTIELLE

Le rendement en huile essentielle d'*Artemisia cam-*

pestris L est égal à 6% après 6 h d'extraction. En revanche, Akrouit et ses collaborateurs ¹⁰ ont trouvé un rendement en huile essentielle égal à 1,2% dans la même période de collecte. Ceci peut être dû à plusieurs facteurs qui peuvent influencer sur le rendement tel que la pluviométrie.

L'analyse de l'huile essentielle d'*Artemisia campestris* L par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM) a révélé que cette dernière est constituée principalement de monoterpènes (47%-63%) et de quiterpènes (24%-30%). D'autres substances non volatiles, telles que des flavonoides, acides aminés, dérivés phénoliques et tanins, sont contenus dans la partie aérienne de la plante et peuvent figurer parmi les extraits organiques ¹⁰.

Chaque étape d'extraction est effectuée en triplicata. Les résultats donnés dans le tableau II pour chaque extrait (R) représentent la valeur moyenne des différentes teneurs calculées pour les trois essais d'extraction.

Tableau II: Les rendements des extraits organiques et de l'huile essentielle.

	Extrait Ethanolique (%)	Extrait au dichlorométhane (%)	Extrait à l'éther de pétrole (%)	Extrait à l'acétate d'éthyle (%)	Extrait méthanolique (%)	Huile essentielle (%)
1 ^{ère} essai	16	16,6	4,4	19,2	21,4	0,6
2 ^{ème} essai	16,5	16,8	4,1	18,8	21,7	0,6
3 ^{ème} essai	15,9	17,7	4,8	19,4	22,2	0,6
Moyenne R%	16,13	16,83	4,43	19,13	21,76	0,6

ETUDE DE LA SOLUBILITE ET DE LA TOXICITE DES EXTRAITS

Etant donné que les extraits contiennent des composés chimiques peu solubles dans le sérum physiologique, du DMSO 5% et de l'éthanol à des proportions variables (10%, 20%, 30%, 50% et 60%) sont ajoutés. La solubilité des extraits augmente en fonction du pourcentage d'éthanol. A partir de 50%, la solubilisation des extraits est quasi totale.

Après injection en sous cutanée chez les souris, on observe une phase d'ébriété marquée par des mouvements de titubation où la souris semble désorientée, suivie d'une phase d'agitation et de frottement du museau exprimant l'angoisse de l'animal. Ces signes de toxicité s'aggravent au fur et à mesure que l'on augmente les proportions de l'éthanol. Suite à l'injection par voie intraveineuse, les signes sont plus prononcés. A partir de 30% on enregistre une mortalité de quelque souris injectées (1/6). A 50% et 60%

d'éthanol, les souris perdent toute résistance et 100% de létalité est observée. Pour le reste de notre travail, les proportions d'éthanol seront fixées à 10%, permettant une dissolution partielle des extraits sans pour autant avoir des signes de toxicité.

TEST DE NEUTRALISATION DE VENIN DE *MACROVIPERA LEBETINA*

Pour étudier l'effet neutralisant des extraits organiques du venin brut de vipère *Macrovipera lebetina*, la voie intra-veineuse est utilisée. En effet les vipères mordent en général grâce au crochet par IV (stimulation de l'envenimation). Le volume injecté à une souris de 18 à 20 g est de 200 µl, ce qui correspond au volume maximal injectable par voie intra-veineuse ¹¹. L'extrait éthanolique semble n'avoir aucune activité antivenimeuse. Par contre, une activité a été décelée pour l'extrait au dichlorométhane en neutralisant 1,25 DI50 du venin de MI

(Tableau III). Toutes les expériences sont réalisées en triplicate et pour chaque extrait 6 lots de souris sont utilisés et 6 témoins. On n'observe pas de variation significative. En effet un lot de 6 souris donne des résultats statistiquement significatifs.

La nouvelle DL50 (calculée par la méthode de Spearman et Karber) du venin Ml en présence de l'extrait d'*Artemisia campestris* L au dichlorométhane sur des souris Swiss de 18 à 20 g est de 45,28 μ g (Ancienne DL50= 26,4 μ g).

Tableau III: Résultats des tests de neutralisation de venin de *Macrovipera lebetina*.

Dose de venin de <i>Macrovipera lebetina</i> / souris			Nombre de survivants après 48 h	
Exprimées en DL50	Volume Injecté (IV) (μ l)	Quantité de venin (μ g)	Extrait éthanolique + venin	Extrait au dichlorométhane + venin
1,25	8,25	33	2/6	6/6
1,56	10,29	41,18	2/6	4/6
1,95	12,87	51,48	1/6	1/6
2,44	16,104	64,41	0/6	1/6

DL50 = 26,4 μ g.

TEST DE NEUTRALISATION DE VENIN D'*ANDROCTONUS AUSTRALIS GARZONII*

L'injection de mélange (extrait + extrait du venin) se fait par voie sous-cutanée. En effet les scorpions piquent par l'aiguillon par voie sous-cutané (simulation de l'envenimation). Toutes les expériences sont réalisées en triplicate et pour chaque extrait 6 lots de souris sont utilisés et 6 témoins. On n'observe pas de variation significative. Les premières mortalités

n'apparaissent qu'au bout de 30 min suivant l'injection. Trois extraits ont été testés pour leur pouvoir neutralisant contre le venin d'Aag.

L'extrait à l'acétate d'éthyle et au dichlorométhane sont dépourvus de toute activité neutralisante. Par contre l'extrait éthanolique est capable de neutraliser au minimum une DL50 (Tableau IV). La nouvelle DL50 calculée par la méthode de Spearman Karber est de 47,24 μ g (Ancienne DL50= 38 μ g).

Tableau IV : Résultats des tests de neutralisation d'*Androctonus australis garzonii*.

Dose de venin Aag pour chaque souris			Nombre de survivants après 24 h		
Exprimées en DL50	Volume injecté (SC) (μ l)	Quantité de venin (μ g)	Extrait avec l'acétate d'éthyle + venin	Extrait au dichlorométhane + venin	Extrait éthanolique + venin
1	2,7	38	0/6	1/6	6/6
1,25	3,375	47,5	0/6	2/6	4/6
1,56	4,212	59,28	0/6	0/6	2/6
1,95	5,265	74,1	0/6	0/6	0/6
2,44	6,588	92,72	1/6	0/6	0/6

DL50= 38 μ g.

DISCUSSION

Actuellement, c'est la voie chimique qui est utilisée comme traitement des morsures de serpents et des piqûres de scorpions. Les extraits des plantes sont utilisés en médecine traditionnelle, surtout dans les zones tropicales. Plusieurs recherches s'intéressent à l'étude de ces plantes afin d'étudier leurs effets et

identifier les constituants actifs. Ils peuvent constituer une voie assez prometteuse pour ce genre de traitements.

L'efficacité de plusieurs plantes sur l'envenimation ophidienne et scorpionique a été démontrée. Plusieurs composés de plantes extraites par différents solvants organiques (méthanol, buthanol et

éthanol)^{12, 19} ont une activité antivenimeuse. Ainsi l'extrait méthanolique de *Parkia biglobosa*, est capable de protéger contre l'effet neurotoxique, hémotoxique et cytotoxique provoqué par le venin de serpent Nigérien *Naja nigricollis*¹⁶. En 2006, Chatterjee et ses collaborateurs¹⁸ ont découvert que l'extrait méthanolique des racines de *Hemidesmus indicus* neutralisent l'effet neurotoxique et cardiotoxique induits par le venin de cobra *Naja kaouthia* et *Daboia russelli*. Au Mexique, Jimenez-Ferrer et ses collaborateurs²⁰ ont montré que l'extrait à l'hexane et l'extrait méthanolique de *Bouvardia ternifolia* neutralisent le venin de scorpion *Centruroides limidus Limpidus*.

Tous ces travaux ont mis en évidence l'importance de solvants utilisés pour extraire, de ces différentes plantes, des composés actifs.

Au Sud-Est de la Tunisie *Artemisia campestris* L est très connue et occupe une place très importante en médecine traditionnelle pour son efficacité présumée contre le venin des scorpions et des serpents. Dans ce travail, nous avons étudié pour la première fois en Tunisie l'activité antivenimeuse d'*A. campestris* L en testant le pouvoir neutralisant de ses extraits utilisant différents solvants (éther de pétrole, acétate d'éthyle, méthanol et éthanol). Une première étape de solubilisation de matière sèche de la plante a été réalisée en ajoutant au sérum physiologique, du DMSO à 5% et de l'éthanol à des proportions variables. L'étude de la toxicité de l'éthanol est une étape nécessaire afin d'éviter tout effet agoniste avec le venin susceptible de fausser les résultats. Après extraction par différents solvants organiques, les extraits obtenus ont été testés pour leurs effets neutralisant les venins de scorpion et de vipère. L'injection simultanée par voie intraveineuse, des extraits éthanoliques et du venin de vipère *Macrovipera lebetina* induit 100% de mortalité indiquant que l'extrait éthanolique n'a aucune activité antivenimeuse.

D'autre part, l'injection du même extrait avec le venin de scorpion *Androctonus australis garzonii*, par voie sous-cutanée à des souris Swiss neutralise l'activité venimeuse de ce venin. De même, l'extrait au dichlorométhane entraîne la neutralisation de venin de vipère *MI*. En effet, l'extrait éthanolique augmente les valeurs de la DI50 du venin scorpion *Androctonus australis garzoni* de 38µg à 47,24µg, alors que l'extrait au dichlorométhane neutralise

1,25 DI50 du venin de vipère *Macrovipera lebetina* en modifiant la DI50 de ce venin de 26,4µg à 45,28µg.

Notre travail indique clairement que des extraits éthanoliques et au dichlorométhane ont une activité neutralisante sélective contre le venin de scorpion *Aag* et de vipère *MI* respectivement. La sélectivité des extraits utilisés montre que les composées neutralisant le venin *Aag* (solubles dans l'éthanol) et ceux neutralisant le venin de *MI* (solubles dans le dichlorométhane) sont différents. L'identification et la purification des composés responsables de cette activité sont des étapes obligatoires pour une caractérisation plus poussée de leur activité contre l'envenimation scorpionique et vipérine.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier vivement Monsieur le Professeur Mohamed HAMMAMI de la faculté de Médecine de MONASTIR, qui nous a facilité l'accès à son laboratoire et nous a permis de mener à bien tous les travaux d'analyse.

REFERENCES

- 1- E.R. Brygoo (1985). La découverte de la sérothérapie antivenimeuse en 1984. *Bull. Assoc. Eleves. Inst. Pas.*, **104**, 10-22.
- 2- L.A. Ferreira, O.B. Henriques, A.A. Andreoni, G.R. Vital, M.M. Campos, G.G. Habermehl et V.L. de Moraes (1999). Antivenom and biological effects of ar-turmerone isolated from *Curcuma longa* (Zingiberaceae). *Toxicon.*, **30**, 1211-1218.
- 3- Z.E.Selvanayagam, S.G. Gnanavendhan, K. Balakrishna, R.B. Rao, J. Sivaraman, K. Subramanian et R. Puri (1996). Ehretianone, a novel quinonoid xanthene from *Ehretia buxifolia* with antisnake venom activity. *Journal of Natural Products.* **59**, 664-667.
- 4- J.H.Y. Vilegas, F.M. Lançasa, W. Vilegas et G.L. Pozettib (1997). Further Triterpenes, Steroids and Furocoumarins from Brazilian Medicinal Plants of *Dorstenia* genus (Moraceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society.* pp ; 529-535.
- 5- R. Chiej (1984). *Encyclopaedia of medicinal plants.* pp ; 10541-10545.
- 6- R. Gender (1994). *Scented flora of the word.* pp; 5440-5548.
- 7- D. Moerman (1998). *Native American Ethnobotany* Timber Press.

- 8- **Y. Aniya, M. Shimabukuro, M. Shimoji et T. Egashira (2000)** Antioxydant and hepatoprotective of medicinal herb *Artemisia campestris* from Okinawa islands. *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 309-312.
- 9- **H.L. Seung, L.M. Young et M.K. Byoung (2003)** Anti-tumor activity of the farnesyl-protein transferase inhibitors arteminolides, isolated from *Artemisia*. *J. Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **11**, 4545-4549.
- 10- **A. Akrouit, R. Chemli, I. Chraief et M. Hammami (2001)**. Analysis of the essential oil of *Artemisia campestris* L. *Flavour et fragrance journal*. **16**, 337-339.
- 11- **A. Clark, B. Dean, O. Pamela, H. Fred, M. Schunk, A. Fletch, et G. Griffin (2002)**. Lignes directrices du Conseil canadien de protection des animaux: production d'anticorps. p 38.
- 12- **A.H. Januario, S.L. Santos, S. Marcussi, M.V. Mazzi, R.C. Pietro, D.N. Sato, J. Ellena, S.V. Sampaio, S.C. Franca et A.M. Soares. (2004)**. Neo-clerodane diterpenoid, a new metalloprotease snake venom inhibitor from *Baccharis trimera*(Asteraceae):anti-proteolytic and anti-hemorrhagic properties. *Chem. Biol. Interact.*, **150**, 243-251.
- 13- **P. Pimolpan, L. Sasitorn, B. Rapepol, P. Narumol et S. Rutt (2003)**. Anti-venom potential of butanolic extract of *Eclipta prostrata* against Malayan pit viper venom. *Journal of Ethnopharmacology*. pp 90.
- 14- **Y.C. Hung, V. Sava, M.Y. Hong et G.S. Huang (2004)**. Inhibitory effects on phospholipase A2 and antivenin activity of melanin extracted from *Thea sinensis* Linn. *Life Sci.*, **74**, 2037-2047.
- 15- **M.I. Alam, B. Auddy et A. Gomes (1994)**. Isolation, purification and partial characterization of viper venom inhibiting factor from the root extract of the Indian medicinal plant sarsaparilla (*Hemidesmus indicus* R. Br.). *Toxicon.*, **32**, 1551-1557.
- 16- **I.U. Asuzu et A.L. Harvey (2003)**. The antisnake venom activities of *Parkia biglobosa* (Mimosaceae) stem bark extract. *Toxicon.*, **42**, 763-768.
- 17- **P.A. Lui, J.D. Moura, F.C. Meotti et A.R. Santos (2007)**. Antinociceptive action of ethanolic extract obtained from roots of *Humirianthera ampa* Miers. *J Ethnopharmacol.*, **114**, 355-363.
- 18- **I. Chatterjee, A.K. Chakravarty et Gomes (2006)**. *Daboia russellii* and *Naja kaouthia* venom neutralization by lupeol acetate isolated from the root extract of Indian sarsaparilla *Hemidesmus indicus* R.Br. *J Ethnopharmacol.*, **106**, 38-43.
- 19- **A. Gomes, A. Saha, I. Chatterjee et A.K. Chakravarty (2007)**. Viper and cobra venom neutralization by beta-sitosterol and stigmasterol isolated from the root extract of *Pluchea indica* Less.(Asteraceae). *Phytomedicine*. **14**, 637-643.
- 20- **J.E. Jimenez-Ferrer, Y.Y. Perez-Teran, R. Roman-Ramos et J. Tortoriello. (2005)**. Antitoxin activity of plants used in Mexican traditional medicine against scorpion poisoning. *Phytomedicine*. **1-2**, 116-122.

