

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE DE CONSTANTINE 3

FACULTE DE MEDECINE

DEPARTEMENT DE PHARMACIE

THESE

Pour l'Obtention du Diplôme de Doctorat

En Sciences Médicales

Spécialité : Toxicologie

TOXICOLOGIE DU CHARDON A GLU « *Atractylis gummifera* L. »

**Etude analytique, toxicocinétique et évaluation in vivo et in vitro du
principe actif « Atractyloside »**

Présentée par Mohamed Habib BELMAHI

Devant le jury composé de :

Pr. AZZOUZ Mohamed. Professeur, Université d'Alger	Président
Pr. REGGABI Mohamed. Professeur, Université d'Alger	Directeur
Pr. DJAFER Rachid. Professeur, Université d'Annaba	Membre
Pr. GHARBI Abdelaziz. Professeur, Université de Blida	Membre
Pr. CHADER Henni. Professeur, Université d'Alger	Membre

Soutenue le 11 Octobre 2020

Année Universitaire 2019 - 2020

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE DE CONSTANTINE 3

FACULTE DE MEDECINE

DEPARTEMENT DE PHARMACIE

THESE

Pour l'Obtention du Diplôme de Doctorat

En Sciences Médicales

Spécialité : Toxicologie

TOXICOLOGIE DU CHARDON A GLU « *Atractylis gummifera* L. »

**Etude analytique, toxicocinétique et évaluation in vivo et in vitro du
principe actif « Atractyloside »**

Présentée par Mohamed Habib BELMAHI

Devant le jury composé de :

Pr. AZZOUZ Mohamed. Professeur, Université d'Alger

Président

Pr. REGGABI Mohamed. Professeur, Université d'Alger

Directeur

Pr. DJAFER Rachid. Professeur, Université d'Annaba

Membre

Pr. GHARBI Abdelaziz. Professeur, Université de Blida

Membre

Pr. CHADER Henni. Professeur, Université d'Alger

Membre

Soutenue le 11 Octobre 2020

Année Universitaire 2019 - 2020

REMERCIEMENTS

A mon Directeur de thèse

Monsieur le Professeur REGGABI MOHAMED

Professeur en Toxicologie

Je voudrais tout d'abord remercier grandement mon directeur de thèse, Pr REGGABI Mohamed, pour toute son aide. Je suis ravi d'avoir travaillé en sa compagnie car outre son appui scientifique, il a toujours été là pour me soutenir et me conseiller au cours de l'élaboration de cette thèse.

Qu'il trouve ici l'expression de mes sentiments respectueux.

Président du jury,

Monsieur le Professeur AZZOUZ MOHAMED

Professeur en Toxicologie

Je tiens à vous remercier pour avoir accepté de présider cette thèse et pour votre participation scientifique ainsi que le temps que vous l'avez consacré à ma recherche. Je tiens à vous remercier particulièrement pour toutes nos discussions et vos conseils qui m'ont accompagné tout au long de ce travail.

Je lui dois tout mon respect qu'il en soit vivement remercier.

Membre du jury,

Monsieur le Professeur GHARBI ABDELAZIZ

Professeur en Chimie analytique

Je tiens à vous remercier pour avoir accepté d'être membre de mon jury de thèse. Il m'est impossible d'oublier votre aide précieuse qui a permis la réalisation de ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance.

Membre du jury,

Monsieur le Professeur DJAFER RACHID

Professeur en Toxicologie

Je tiens à vous remercier d'avoir accepté de juger cette thèse et d'avoir bien voulu m'éclairé de vous précieux conseils et de m'avoir accordé de votre temps précieux. Je vous dois tout mon respect.

Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance.

Membre du jury,

Monsieur le Professeur CHADER HENNI

Professeur en Pharmacologie

Je tiens à vous remercier d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse et pour votre amabilité et le plaisir et l'honneur d'avoir pu travailler à vos côtés. Qu'il trouve dans ce travail ma très haute considération et mon profond respect.

Je tiens à remercier également mesdames les Professeurs Merad R., Abtroun G, Benali S. et Hamrou S. Pour m'avoir encouragé pour la réalisation de ce travail. Qu'elles trouvent ici l'expression de mes sentiments respectueux.

Dédicaces

A LA MEMOIRE DE MES PARENTS

J'aurais bien aimé que vous soyez parmi nous pour qu'ensemble nous partageons ce bonheur. Puisse Allah vous réserver Sa clémence à Sa bien large miséricorde et vous accueillir en son vaste paradis

A MA TRES CHERE EPOUSE ILHAM

Aucune dédicace ne pourrait exprimer mon amour et mon attachement à toi. Depuis que je t'ai connu, tu n'as cessé de me soutenir et de m'épauler. Tu me voulais toujours le meilleur. Ton amour ne m'a procuré que confiance et stabilité. Tu as partagé avec moi les meilleurs moments de ma vie, aux moments les plus difficiles de ma vie, tu étais toujours à mes côtés, Je te remercie de ne m'avoir jamais déçu. Aucun mot ne pourrait exprimer ma gratitude, mon amour et mon respect. Je remercie le bon dieu qui a croisé nos chemins. Puisse le bon dieu nous procure santé et longue vie.

A MES ENFANTS Yazid et Chafik pour l'espoir que vous gravez de jour en jour dans mon cœur.

A MES PETITES PERLES Douaa et Sarah

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut... Tous les mots ne sauraient exprimer l'amour...., vous êtes la joie de ma vie. J'espère que ma thèse sera pour vous source de fierté et qu'elle sera un exemple à suivre. Votre joie de vivre et vos sourires ont été pour moi le meilleur encouragement que je puisse avoir. Que Dieu vous garde et vous protège.

A MES TRES CHERS FRERES ET SŒURS

Je vous dédie ce travail en témoignage de mon amour et mon attachement. Puisse nos fraternels liens se pérenniser et consolider encore. J'implore dieu qu'il vous apporte bonheur et santé.

A MES GRANDS AMIS ET COLLEGUES

En souvenir des moments merveilleux que nous avons passés et aux liens solides qui nous unissent.

Un grand merci pour votre soutien, vos encouragements, votre aide.

Je remercie particulièrement Dr Mecheri Imane pour son soutien inestimable moral et physique et pour sa participation dans ce travail. Qu'elle trouve mes remerciements les plus sincères.

Je remercie également Dr Rebai Iméne pour son soutien indéfectible.

Table des matières

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	viii
LISTE DES FIGURES	xi
LISTE DES TABLEAUX	xiv
INTRODUCTION	01

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : ETUDE BOTANIQUE DU CHARDON A GLU

I.1. Noms et classification systématique	04
I.1.1. Noms scientifiques	04
1.1.2. Classification	04
I.1.3. Noms vernaculaires	05
I.2. Description botanique	06
I.2.1. Partie aérienne	06
I.2.1.1. Tige	06
I.2.1.2. Feuille	07
1.2.1.3. Inflorescence	08
I.2.1.4. Fleurs	08
I.2.1.5. Fruit	10
I.2.2. Partie souterraine	11
I.3. Biotope et distribution géographique	12

CHAPITRE II : PHYTOCHIMIE DU CHARDON A GLU

II.1. Constituants phytochimiques	13
II.1.1. Glycosides diterpéniques : atractyloside et carboxyatractyloside	13
II.1.2. Polyphénols	15
II.1.2.1. Flavonoïdes	16
A. Flavones et flavonols	17
B. Anthocyanes	19
II.1.2.2. Tanins	19
II.1.3. Autres substances	20

II.2. Distribution des agents chimiques dans la plante	20
II.2.1. Partie souterraine	20
II.2.1.1. Atractyloside	20
II.2.1.2. Autres composés	21
II.2.2. Feuilles	22
CHAPITRE III : USAGES ET ACTIVITES BIOLOGIQUES	
III.1. Usages	23
III.1. 1. Usages traditionnels	23
III.1.1.1. Usages thérapeutiques	23
III.1.1.2. Usages cosmétiques	24
III.1.1.3. Autres	25
III.2. Activités biologiques	26
CHAPITRE IV : TOXICOLOGIE DU CHARDON A GLU	
IV.1. Parties et principes toxiques	27
IV.1.1. Parties toxiques	27
IV.1.2. Principes toxiques	27
IV.1.2.1. Atractyloside	27
A. Structure	27
B. Propriétés physico-chimiques	27
C. Dégradation de l'attractyloside	28
D. Toxicocinétique	30
E. Relation structure-activité	31
IV.1.2.2. Carboxyattractyloside	33
A. Propriétés physico-chimiques	33
B. Toxicocinétique	33
C. Relation structure-activité	34
IV.2. Mode d'action toxique	35
IV.2.1. Chaîne respiratoire	35
IV.2.2. Mécanismes de cytotoxicité	38
IV.2.3. Action sur le métabolisme intermédiaire	42
IV.2.4. Lésions tissulaires	45

IV.2.4.1. Lésions rénales	45
IV.2.4.2. Lésions hépatiques	46
IV.2.4.3. Lésions cardiaques	48
IV.2.4.4. Lésions neurologiques	49
IV.2.4.5. Lésions sur le système reproducteur	49
IV.3. Doses toxiques	50
IV.4. Intoxication au chardon à glu	52
IV.4.1. Epidémiologie des intoxications	52
IV.4.1.1. Circonstances de l'intoxication	52
IV.4.1.2. Bilan des intoxications	52
A. Algérie	52
B. Maghreb	53
C. Dans le monde	54
IV.4.2. Symptomatologie	55
IV.4.2.1. Phase de latence	55
IV.4.2.2. Phase bénigne – digestive	55
IV.4.2.3. Phase mortelle	55
IV.4.2.4. Aspect biologique	56
IV.4.3. Cas cliniques	57
IV.5. Traitement	60
CHAPITRE V: IDENTIFICATION BOTANIQUE ET ANALYSE TOXICOLOGIQUE	
V.1. Identification botanique	62
V.1.1. Examen macroscopique de la plante entière	62
V.1.1.1. Partie aérienne	62
V.1.1.2. Partie souterraine	65
V.1.2. Identification des débris	66
V.2. Analyse toxicologique du végétal et des milieux biologiques	66
V.2.1. Techniques d'extraction	66
V.2.2. Recherche et identification	67

V.2.2.1.Détection chimique	67
V.2.2.2. Détection chromatographique sur couche mince (CCM)	68
V.2.3. Méthodes de dosage	70
V.2.3.1. Spectrophotométrie UV/Visible	70
VI.2.3.2. Chromatographie liquide haute performance (HPLC)	70
A. Techniques HPLC-UV	70
B. Techniques HPLC-MS (Spectrométrie de masse)	71
VI.2.3.3. Chromatographie en phase gazeuse (CG)	72
VI.2.3.4. Autres méthodes	73

PARTIE PRATIQUE

CHAPITRE I: DOSAGE DE L'ATRACTYLOSIDE SERIQUE PAR HPLC

I.1. Matériels et Méthodes	74
I.1.1. Matériels	74
I.1.2. Méthodes	75
I.1.2.1. Préparation des solutions	75
I.1.2.2. Préparation des standards	75
I.1.2.3. Prétraitement de l'échantillon	76
I.1.2.4. Conditions chromatographiques	77
I.2. Validation analytique de la méthode de dosage de l'Atractyloside	78
I.2.1. Rendement d'extraction	79
I.2.2. Spécificité	80
I.2.3. Linéarité	81
I.2.4. Justesse	93
I.2.4.1. Justesse intra-série	93
I.2.4.2. Justesses inter-série	97
I.2.5. Fidélité	100
I.2.6. Limites de détection et de quantification	103
I.2.6.1. Limite de quantification	103
I.2.6.2. Limite de détection	103
I.2.7. Sensibilité	104
I.2.8. Profil d'exactitude	105
I.2.9. Résumé des données de la validation	106

CHAPITRE II: ANALYSE TOXICOCINETIQUE DE L'ATRACTYLOSIDE

II.1. Matériels et méthodes	107
II.1.1. Analyse non compartimentale	107
II.1.1.1 Plan et population d'étude	107
II.1.1.2 Schéma d'administration	107
II.1.1.3 Prélèvements TK et analyse de sang	107
II.1.2. Analyse de la fraction libre	109
II.1.2.1. Principe	109
II.1.2.2. Matériels	110

II.1.2.3. Méthodes	111
II.1.3. Analyse de l'induction enzymatique	112
II.1.3.1. Plan et population d'étude	112
II.1.3.2. Molécule inductrice	112
II.1.3.3. Schéma d'administration	112
II.2. Résultats	113
II.2.1. Analyse non compartimentale	113
II.2.2. Analyse de la fraction libre	117
II.2.3. Analyse de l'induction enzymatique	118
CHAPITRE III: ETUDE DE LA TOXICITE IN VIVO ET IN VITRO	
III.1. Matériels et méthodes	119
III.1.1. Etude In vivo	119
III.1.1.1. Réactif animal	119
III.1.1.2. Equipements et consommable	119
III.1.1.3. Mode opératoire	120
III.1.2. Etude in vitro	122
III.1.2.1. Matériels biologiques	122
III.1.2.2. Evaluation de la cytotoxicité d'atractyloside par l'essai de relargage du rouge neutre	123
A. Principe	123
B. Matériels	123
C. Méthode	125
III.1.2.3. Evaluation in vitro du stress oxydatif généré par l'atractyloside	128
A. Dosage de malondialdéhyde (MDA)	129
B. Mesure du glutathion (GSH)	130
C. Evaluation de l'activité enzymatique de la catalase (CAT)	131
III.2. Résultats	132
III.2.1. Etude in vivo	132
III.2.1.1. Résultats de l'essai de la toxicité aiguë	132
III.2.1.2. Détermination de la DL50 selon la méthode KARBER et BEHRENS	132
III.2.1.3. Détermination de la DL50 selon la méthode MILLER et	133

TAINTER	
III.2.2. Etude in vitro	136
III.2.2.1. Résultats des essais de cytotoxicité	136
A. Résultats de l'essai de cytotoxicité in vitro d'Atractyloside sur les cellules RD	136
B. Résultats de l'essai de cytotoxicité in vitro d'Atractyloside sur les cellules A549	140
C. Résultats de l'essai de cytotoxicité in vitro d'Atractyloside sur les cellules HEP2	144
II.2.2.2. Résultats de l'étude de quantification des biomarqueurs du stress oxydatif	148
A. Evolution des biomarqueurs du stress oxydatif chez les cellules RD	148
B. Evolution des biomarqueurs du stress oxydatif chez les cellules A549	154
C. Evolution des biomarqueurs du stress oxydatif chez les cellules HEP2	159
CHAPITRE IV : DISCUSSION	
IV.1. Validation de la méthode analytique	165
IV.2. Etude in vivo/ in vitro	166
IV.3. Etude toxicocinétique de l'Atractyloside	170
IV.4. Test d'induction et hypothèse d'un ou des métabolites toxiques	171
CONCLUSION GENERALE	172
BIBLIOGRAPHIE	175
ANNEXE	190

LISTE DES ABREVIATIONS

Acetyl-CoA : Acétyl Coenzyme A

ACN: Acétonitrile

ADP: Adénine diphosphates

AIF: Apoptosis Inducing Factor.

ALAT: Alanine amino-tranférase

ANOVA: One way analysis of variance

ANT: Adenine nucleotide translocator

APG III: Angiosperm Phylogeny Group III

ASAT : Aspartate amino-transférase

ATP : Adénine triphosphates

ATR : Atractyloside

AUC : Aire sous la courbe des concentrations plasmatiques-temps.

AUMC : Aire sous la courbe du premier moment.

C.V : Coefficient de variation

CAMU : Centre d'assistance médicale urgente.

CAT : Catalase.

CATR : Carboxyatractyloside

CCM : Chromatographie sur couche mince

CI₅₀ : Concentration inhibitrice 50%

CQI : Contrôle de qualité inférieure

CQM : Concentration médiane de l'intervalle de dosage

CQS : Concentration proche du seuil supérieur de l'intervalle de dosage

CsA : Cyclosporine A

CYP : Cytochrome

DE : Dialyse à l'équilibre.

DL₅₀ : Dose létale 50 %

DTNB : Acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque.

DTT : Dithiothreitol

EDTA : Acide éthylène diamine tétra acétique.

ELISA: Enzym linked immuno sorbent assay

ESI : Electrospray ionisation.

ET : Chaîne de transport d'électron

GC-SM : Chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse

GSH : Glutathion réduit

GSSG : Glutathion oxydé

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène
Hep G2 : Cellules hépatiques G2
HEP2: Human epithelial cell line type 2
HPLC : Chromatographie liquide à haute performance
LDH : Lactate déshydrogénase
LIQ : Limite inférieure de quantification
LNCPP : Laboratoire national de contrôle des produits pharmaceutiques.
m: Moyenne
MDA : Malondialdéhyde.
MRT : Temps de séjour moyen.
MS : Spectre de masse
MS-LC : Spectre de masse lié à la chromatographie liquide
MTT : Bromure de 3 (4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium.
NAC : N-acétyl cystéine
NaCl: Chlorure de sodium
NADP : Nicotinamide adénine di nucléotide phosphate
NCA : Analyse non compartimentale
ng : Nanogramme
O₂: Oxygène
PBS : Tampon phosphate salin.
PDAB : Para-diméthyle-amino-benzaldéhyde
Pg : Picogramme
pH : Potentiel d'hydrogène
PM : Poids molaire
r² : Coefficient de détermination
RED : Dialyse à équilibre rapide
Rf: Rapports frontaux
RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium.
RSD : Déviation standard relative
SD : Ecart-type
SDS : Dodécyl Sulfate de Sodium
SOD : Sulfoxydismutase
T.R : Temps de rétention
TBA: Acide Thio barbiturique
TBARS: Thio Barbituric Acid Reactives Substances
TFA : Acide trifluoroacétique

TK : Toxicocinétique

TMZ : Trimétazidine

TNB : Acide 5-thio-2-nitrobenzoïque

UV : Ultraviolet

VII : Variabilité inter-individuelle

VO : Voie orale

VRP : Vérapamil

LISTE DES FIGURES

N°	Titre de la figure	Page
Figure 1	Chardon à glu : <i>Atractylis gummifera</i> L.	06
Figure 2	Tige d' <i>Atractylis gummifera</i> L.	07
Figure 3	Feuilles d' <i>Atractylis gummifera</i> L.	07
Figure 4	Inflorescence (capitule) d' <i>Atractylis gummifera</i> L.	08
Figure 5	Poils soyeux du capitule floral d' <i>Atractylis gummifera</i> L.	08
Figure 6	Bractée externe du capitule floral d' <i>Atractylis gummifera</i> L.	09
Figure 7	Bractées épineuses entourant le capitule floral d' <i>Atractylis gummifera</i> L.	09
Figure 8	Capitule floral desséché avec des pappus	10
Figure 9	Rhizome d' <i>Atractylis gummifera</i> L.	11
Figure 10	Structure de l'atractyloside	13
Figure 11	Structure de la Carboxyatractyloside	14
Figure 12	Structure de Kaurène	14
Figure 13	Structure tricyclique commune aux flavonoïdes	16
Figure 14	Structure de la lutéoline	17
Figure 15	Structure de l'apigénine	17
Figure 16	Structure des principales flavones présentes chez <i>Atractylis gummifera</i> L.	18
Figure 17	Structure du 3-glucoside de malvidine	19
Figure 18	Analogue d'atractyloside du <i>Coffea arabica</i>	21
Figure 19	(A) Dégradation de l'atractyloside en solution après acidification et chauffage, pendant 120 minutes à forte température (HT=98°C) et à faible température (LT=65°C). (B) Produit du processus d'acidification et de chauffage de l'extrait.	29
Figure 20	Structure du steviol et du stevioside	32
Figure 21	Schéma de la mitochondrie	35
Figure 22	Echange d'ATP/ADP à travers la membrane mitochondriale	36
Figure 23	Schéma de la chaine respiratoire	37
Figure 24	Plantes et néphrotoxicité aiguë	40
Figure 25	Les voies extrinsèque et intrinsèque de l'activité des caspase-3	41
Figure 26	La relation entre le métabolisme mitochondrial et les voies touchées par l' <i>Atractylis gummifera</i> L.	43
Figure 27	Aspect général d' <i>Atractylis gummifera</i> L. en hiver	62

Figure 28	Plantes à l'origine de confusion avec le Chardon à glu	63
Figure 29	Feuilles d' <i>Atractylis gummifera</i> L.	63
Figure 30	Feuilles d' <i>Atractylis gummifera</i> L. en rosette	63
Figure 31	Feuilles des espèces à l'origine de la confusion avec le Chardon à glu.	64
Figure 32	Capitule floral desséché d' <i>Atractylis gummifera</i> L.	64
Figure 33	Rhizome pivotant d' <i>Atractylis gummifera</i> L.	65
Figure 34	Ramifications rampantes. Rhizome d' <i>Atractylis gummifera</i> L.	65
Figure 35	Chromatogramme d'un blanc matrice	80
Figure 36	Chromatogramme de l'Atractyloside à 100 µg/mL	80
Figure 37	Courbe d'étalonnage du premier jour (J1)	81
Figure 38	Courbe d'étalonnage du deuxième jour (J2)	82
Figure 39	Courbe d'étalonnage du troisième jour (J3)	83
Figure 40	Courbes d'étalonnage : J1-J2-J3	84
Figure 41	Courbe d'étalonnage moyenne	85
Figure 42	Pic chromatographique de l'Atractyloside à 10 µg/mL	86
Figure 43	Pic chromatographique de l'Atractyloside à 20 µg/mL	86
Figure 44	Pic chromatographique de l'Atractyloside à 40 µg/mL	87
Figure 45	Pic chromatographique de l'Atractyloside à 60 µg/mL	87
Figure 46	Pic chromatographique de l'Atractyloside à 80 µg/mL	88
Figure 47	Pic chromatographique de l'Atractyloside à 100 µg/mL	88
Figure 48	Courbe de linéarité	90
Figure 49	Pic chromatographique de l'Atractyloside à 10 µg/mL(LIQ)	91
Figure 50	Pic chromatographique de l'Atractyloside à 30 µg/mL(CQI)	91
Figure 51	Pic chromatographique de l'Atractyloside à 45 µg/mL(CQM)	92
Figure 52	Pic chromatographique de l'Atractyloside à 75 µg/mL(CQS)	92
Figure 53	Profil d'exactitude de la technique de dosage de l'Atractyloside	105
Figure 54	Dispositif de dialyse à équilibre rapide	110
Figure 55	Profils individuels des concentrations plasmatiques de l'Atractyloside en fonction du temps après une administration orale unique de 140 mg/kg	114
Figure 56	Profil des concentrations plasmatiques moyennes (± écart type) en Atractyloside en fonction du temps après une administration orale unique de 140 mg/kg	116
Figure 57	Profil des concentrations plasmatiques moyennes en Atractyloside en fonction du temps après une induction enzymatique	118

Figure 57 Bis	Courbe de pourcentage de mortalité (transformés en probits) en fonction du log- dose.	121
Figure 58	Cytotoxicité de l'Atractyloside sur les cellules RD après 24 heures d'incubation	137
Figure 59	Cytotoxicité de l'Atractyloside sur les cellules RD après 48 heures d'incubation	138
Figure 60	Cytotoxicité de l'Atractyloside sur les cellules A549 après 24 heures d'incubation	141
Figure 61	Cytotoxicité de l'Atractyloside sur les cellules A549 après 48 heures d'incubation	142
Figure 62	Cytotoxicité de l'Atractyloside sur les cellules HEP2 après 24 heures d'incubation	145
Figure 63	Cytotoxicité de l'Atractyloside sur les cellules HEP2 après 48 heures d'incubation	146
Figure 64	Evolutions des biomarqueurs du stress oxydatif chez les cellules RD après 24 heures d'incubation avec l'Atractyloside	152
Figure 65	Evolutions des biomarqueurs du stress oxydatif chez les cellules RD après 48 heures d'incubation avec l'Atractyloside	153
Figure 66	Evolution des biomarqueurs du stress oxydatif chez les cellules A549 après 24 heures d'incubation avec l'Atractyloside	157
Figure 67	Evolution des biomarqueurs du stress oxydatif chez les cellules A549 après 48 heures d'incubation avec l'Atractyloside	158
Figure 68	Evolutions des biomarqueurs du stress oxydatif chez les cellules HEP2 après 24 heures d'incubation avec l'Atractyloside	163
Figure 69	Evolutions des biomarqueurs du stress oxydatif chez les cellules HEP2 après 48 heures d'incubation avec l'Atractyloside	164

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Dose létale 50 (DL ₅₀) de l'atractyloside	50
Tableau 2	Dose létale 50 (DL ₅₀) du carboxyatractyloside	50
Tableau 3	Chromatographie CCM des glycosides du chardon à glu. Solvants de migration. Rapports frontaux (Rf)	68
Tableau 4	Réactions de caractérisation de l'ATR à chaud	69
Tableau 5	Préparation des standards d'étalonnage (points de calibration)	75
Tableau 6	Préparation des standards de validation (points de contrôle)	76
Tableau 7	Conditions chromatographiques	77
Tableau 8	Etude du rendement de l'extraction de l'Atractyloside	79
Tableau 9	Résultats des aires des pics J1	81
Tableau 10	Résultats des aires des pics J2	82
Tableau 11	Résultats des aires des pics J3	83
Tableau 12	Gammes étalon. Pentés et coefficients de corrélation des trois jours	84
Tableau 13	Gamme étalon moyenne des 3 jours de calibration	85
Tableau 14	Concentrations calculées des standards de validation des trois jours de validation	89
Tableau 15	Paramètres de justesse pour la première série (J1)	94
Tableau 16	Paramètres de justesse pour la deuxième série (J2)	95
Tableau 17	Paramètres de justesse pour la troisième série (J3)	96
Tableau 18	Calcul des recouvrements	98
Tableau 19	Biais absolu et biais relatif	99
Tableau 20	Estimateurs (écarts types et CV) de la fidélité des trois courbes d'étalonnage	101
Tableau 21	Valeurs des pentés pour les 3 jours de validation	104
Tableau 22	Performances analytiques de la technique de dosage de l'Atractyloside par HPLC	106
Tableau 23	Caractéristiques des rats	107
Tableau 24	Paramètres toxicocinétiques plasmatiques individuels de l'Atractyloside chez le rat, après une administration orale unique de 140 mg/kg	113
Tableau 25	Résumé des paramètres toxicocinétiques plasmatiques de l'Atractyloside chez le rat, après une administration orale unique de 140 mg/kg	115

Tableau 26	Mesure de pourcentage de la fraction liée et libre	117
Tableau 27	Etude comparative des paramètres toxicocinétiques plasmatiques de l'Atractyloside chez le rat, avant et après induction au phénobarbital	118
Tableau 28	Résultats de l'essai de toxicité aiguë d'Atractyloside chez la souris	132
Tableau 29	Récapitulatif des différentes manifestations cliniques observées chez les souris traitées par voie orale par différentes doses d'Atractyloside	134
Tableau 30	Résultats de l'essai de cytotoxicité in vitro d'Atractyloside sur les cellules RD	136
Tableau 31	Récapitulatif des résultats de la cytotoxicité d'Atractyloside sur les cellules RD	137
Tableau 32	Les CI_{50} d'Atractyloside sur cellules RD à différents temps d'incubation	139
Tableau 33	Résultats de l'essai de cytotoxicité in vitro d'Atractyloside sur les cellules A549	140
Tableau 34	Récapitulatif des résultats de la cytotoxicité d'attractyloside sur les cellules A549	141
Tableau 35	Les CI_{50} d'Atractyloside sur cellules A549 à différents temps d'incubation	143
Tableau 36	Résultats de l'essai de cytotoxicité in vitro d'Atractyloside sur les cellules HEP2	144
Tableau 37	Récapitulatif des résultats de la cytotoxicité d'Atractyloside sur les cellules HEP2	145
Tableau 38	Les CI_{50} d'Atractyloside sur cellules HEP2 à différents temps d'incubation	147
Tableau 39	Récapitulatif des résultats des essais de cytotoxicité in vitro de l'Atractyloside sur les différentes lignées cellulaires	147
Tableau 40	Evolution des concentrations du malondialdéhyde (MDA) chez les cellulesRD après 24 et 48 heures d'incubation avec différentes concentrations d'Atractyloside	148
Tableau 41	Evolution des concentrations du glutathion réduit (GSH) chez les cellulesRD après 24 et 48 heures d'incubation avec différentes concentrations d'Atractyloside	150
Tableau 42	Evolution de l'activité enzymatique de la catalase chez les	151

	cellules RD après 24 et 48 heures d'incubation avec différentes concentrations d'Atractyloside	
Tableau 43	Récapitulatif de l'évolution des biomarqueurs du stress oxydatif chez les cellules RD après 24 heures d'incubation avec différentes concentrations d'Atractyloside	152
Tableau 44	Récapitulatif de l'évolution des biomarqueurs du stress oxydatif chez les cellules RD après 48 heures d'incubation avec différentes concentration d'Atractyloside	153
Tableau 45	Evolution des concentrations du malondialdéhyde (MDA) chez les cellules A549 après 24 et 48 heures d'incubation avec différentes concentrations d'Atractyloside	154
Tableau 46	Evolution des concentrations du glutathion réduit (GSH) chez les cellules A549 après 24 et 48 heures d'incubation avec différentes concentrations d'Atractyloside	155
Tableau 47	Evolution de l'activité enzymatique de la catalase chez les cellules A549 après 24 et 48 heures d'incubation avec différentes concentrations d'Atractyloside	156
Tableau 48	Récapitulatif de l'évolution des biomarqueurs du stress oxydatif chez les cellules A549 après 24 heures d'incubation avec différentes concentrations d'Atractyloside	157
Tableau 49	Récapitulatif de l'évolution des biomarqueurs du stress oxydatif chez les cellules A549 après 48 heures d'incubation avec différentes concentrations d'Aractyloside	158
Tableau 50	Evolution des concentrations du malondialdéhyde (MDA) chez les cellules HEP2 après 24 et 48 heures d'incubation avec différentes concentrations d'Atractyloside	159
Tableau 51	Evolution des concentrations du glutathion réduit (GSH) chez les cellules HEP2 après 24 et 48 heures d'incubation avec différentes concentrations d'Atractyloside	160
Tableau 52	Evolution de l'activité enzymatique de la catalase chez les cellules HEP2 après 24 et 48 heures d'incubation avec différentes concentrations d'Atractyloside	161
Tableau 53	Récapitulatif de l'évolution des biomarqueurs du stress oxydatif chez les cellules HEP2 après 24 heures d'incubation avec différentes concentrations d'Atractyloside	162

Tableau 54	Récapitulatif de l'évolution des biomarqueurs du stress oxydatif chez les cellules HEP2 après 48 heures d'incubation avec différentes concentrations d'Atractyloside	163
Tableau 55	Taux du MDA, GSH et Catalase sur les trois souches RD, A549 et HEP2 après 24 et 48 heures d'incubation	168

INTRODUCTION

Le Chardon à glu est, largement, répandu, dans les pays du bassin méditerranéen. Faisant partie de la famille des Astéracées, son nom scientifique est *Atractylis gummifera* L. ; son nom vernaculaire, le plus répandu, au Maghreb, est « addad ». La plante est fréquente, dans la nature, à l'état sauvage. L'usage traditionnel de son rhizome fait qu'on retrouve ce dernier, en fragments desséchés, chez les herboristes [1].

La plupart des espèces connues, appartenant au genre *Atractylis*, sont localisées sur le pourtour méditerranéen, le genre *Atractylis* est, également, représenté par des espèces dispersées en Afrique, en Australie et en Asie, particulièrement, en Chine et au Japon.

Le genre *Atractylis* est représenté par des plantes herbacées vivaces portant des feuilles découpées en lobes piquants. Les gros capitules de fleurs purpurines ou violacées, sont entourés de bractées épineuses.

Le chardon à glu est connu depuis l'antiquité. Théophraste avait noté, 300 ans avant J.C, que la plante était mortelle pour l'animal ; il l'avait décrite sous l'appellation de Chaméléon blanc: de « Chami = lion » et caméléon parce qu'elle change de couleur suivant le terrain sur lequel elle pousse [2, 3, 4].

Khalid El Hakim, physicien, botaniste et pharmacologue, lui a donné le nom de «Mézéréon». Il rapporta, dans son recueil «De Simplicibus» [5], que les persans avaient nommé cette plante mortelle «Zapiens Vitam». Plus tard, Matthioli [6] décrivit deux types, « Chaméléon Bianco » (blanc) et « Chamélon Negro » (noir), ayant des propriétés différentes.

Linné a nommé l'espèce *Atractylis gummifera* L. et l'a classée parmi les Asteracées. L'espèce est, également, connue sous le nom d'*Acarna gummifera* W. et *Carlina gummifera* Less [7].

L'intoxication par *Atractylis gummifera* L., souvent mortelle, peut être collective ; les enfants, attirés par la plante, en sont, souvent, les victimes.

Selon le bilan d'activité du CAP d'Alger, portant sur la période de 1991 à 2010, les intoxications par les plantes représentent 3% de l'ensemble des intoxications. Parmi les plantes, le chardon à glu est responsable de 13% des intoxications qui aboutissent, dans 37% des cas, au décès [8].

La toxicité de la plante est due à la présence, principalement, dans le rhizome, de deux principes toxiques, l'attractyloside (ATR) et le carboxyattractyloside (CATR) ; ce sont des inhibiteurs puissants de la chaîne respiratoire (phosphorylation oxydative) et du cycle de

Krebs, au niveau mitochondrial. Ils bloquent, ainsi, les phénomènes d'oxydoréduction aboutissant à la formation de l'ATP.

L'action inhibitrice de ces deux composés toxiques s'exerce, surtout, sur les cellules riches en mitochondries, telles que les cellules hépatiques et rénales. Cette action est à l'origine de l'augmentation de la consommation du glucose, de l'épuisement du stock hépatique et musculaire du glycogène ainsi que de l'inhibition de la néoglucogenèse.

Les teneurs de ces constituants toxiques sont influencées par les conditions environnementales telles que le sol, le climat et les saisons. Des différences, liées à la distribution géographique, sont rapportées, notamment, par les études, menées en Algérie (Alger, Bejaia, Tizi-Ouzou, Tlemcen, Guelma et Médéa), en Tunisie, au Maroc, ou en Italie (Sardaigne et Sicile) [8,9].

L'influence saisonnière sur les teneurs des racines, en principes toxiques est, également décrite. Les teneurs, les plus élevées, sont retrouvées, en hiver (0,33 à 1,57%); elles sont abaissées, en été (0,12 à 1,21%) [9].

Actuellement, il n'existe aucun traitement spécifique de l'intoxication. Le traitement est symptomatique et insuffisant devant la gravité de l'intoxication qui nécessite l'hospitalisation d'urgence.

Des études ont montré que quelques composés, comme la N-acétyl-cystéine, pourraient protéger contre les effets toxiques de la plante, mais, seulement, si leur administration intervient avant l'exposition [10].

Une nouvelle approche pourrait venir de la recherche en immunothérapie. Ainsi, un certain nombre de travaux explorent la possibilité de produire et d'utiliser des anticorps spécifiques contre les composants toxiques de l'*Atractylis gummifera* L., à l'instar d'études récentes sur d'autres plantes toxiques telle que le Laurier-rose (*Nerium oleander*) et qui ont abouti à des résultats prometteurs [11].

Ainsi, l'approche immuno-thérapeutique pourrait constituer, tout comme la sérothérapie antivenimeuse, une alternative intéressante aux traitements conventionnels.

Pour l'heure, la prévention reste le seul moyen pour se prémunir contre l'intoxication par cette plante ou d'autres plantes toxiques. Cela implique un large travail d'information et de sensibilisation, en direction de la population qui n'est pas, toujours, avertie des risques encourus.

L'objectif principal de notre travail est d'évaluer, par des tests *in Vivo* et *in Vitro*, le pouvoir toxique de l'atractyloside, pour lequel, une méthode de dosage sanguin, par HPLC, sera mise au point et validée.

L'étude du pouvoir toxique sera évaluée, *in vivo*, suite à l'administration, par voie orale, d'atractyloside (ATR) :

- étude de la toxicité aiguë, chez la souris, ce qui permettra de déterminer la dose létale 50 de l'atractyloside.
- étude de la toxico-cinétique, chez le rat, après administration de doses sub-toxiques d'atractyloside.

L'étude du pouvoir toxique sera, également, évaluée, *in vitro*, par la détermination de la concentration inhibitrice 50 de l'atractyloside, sur trois souches cellulaires différentes ainsi que par la mesure des indicateurs du stress oxydant (Glutathion, MDA et catalase).

Les objectifs secondaires de ce travail sont:

- de finaliser l'étude cinétique en évaluant le pourcentage de la forme libre par la méthode de dialyse.
- de vérifier l'hypothèse d'une toxicité indirecte suite à la formation de métabolites toxiques et ceci par un test d'induction enzymatique.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I :
ETUDE BOTANIQUE DU CHARDON A GLU

I.1. Noms et classification systématique :

I.1.1. Noms scientifiques :

- *Atractylis gummifera* L.

- *Carlina gummifera* DC.

- *Carlina gummifera* Less.

- *Acarna gummifera* Brot.

- *Acarna gummifera* Willd.

Deux variétés de *Carlina gummifera* ont été proposées: typiques et Fontanesii [12].

I.1.2. Classification :

D'après la classification APGIII [1]:

Embranchement : Embryophytes

Sous-embranchement : Trachéophytes ;

Super classe : Spermaphytes ;

Classe : Angiospermes ;

Clade : Triporées (anciennement Eudicots) ;

Sous-classe : Asterideae ;

Clade : Campanulideae (ou Euasterideae II) ;

Ordre : Astrales ;

Famille : Asteraceae ;

Genre : *Atractylis* ;

Espèce : *Atractylis gummifera* L.

I.1.3. Noms vernaculaires :

Noms berbères :

- Algérie : Adad, Tifroua, Tabonekkart [9,13];
- Maroc : Âhfyoun, Addâd, Haddad [14];
- Tunisie: Âddâd, Ddâd [15].

Noms arabes :

- Algérie : Djerniz, Leddad, Addad, Chouk el alek, Suk el-'alk [15,16];
- Maroc : Chouk el heulk, El-'alk [2];
- Tunisie: Dâd, Ded, Edded, Haddad [17].

Noms français :

- Chardon à glu, caméléon blanc, Chamaéléon blanc, carthame gummifère [2].

Noms anglais:

- Bird-lime, glue thistle [9].

Nom italien :

- Masticogna [9].

I.2. Description botanique :

L'espèce *Atractylis gummifera* L. est une plante herbacée, épineuse, odorante, vivace par ses parties souterraines très développées. Elle comporte deux parties :

- Une partie aérienne formée par la tige, les feuilles, les fleurs et les fruits.
- Une partie souterraine représentée par un volumineux rhizome pivotant et charnu, pouvant atteindre 30 à 40 centimètres de longueur et 7 à 8 centimètres de diamètre (figure 1).

La plante commence à pousser à la fin de l'automne et la floraison est estivale [2].



Figure1: Chardon à glu : *Atractylis gummifera* L.

I.2.1. Partie aérienne :

I.2.1.1. Tige :

La tige est acaule, c'est à dire qu'elle est absente ou très courte (figure 2) [2].



Figure 2: Tige d'*Atractylis gummifera* L.

I.2.1.2. Feuille :

Les feuilles apparaissent dès l'hiver ; elles sont basilaires, disposées en une rosette étalée sur le sol (figure 1), Elles sont longues et épineuses, de 50 à 60 centimètres de long sur 10 centimètres de large ; elles sont groupées en bouquets qui s'étalent sur le sol, donnant à la plante, la forme d'un écusson aplati (figure 3) [18].



Figure 3: Feuilles d'*Atractylis gummifera* L.

I.2.1.3. Inflorescence :

Elle comporte un ou plusieurs volumineux capitules de fleurs ou fleurons ; le capitule est, généralement, solitaire, parfois 2 à 4 capitules floraux peuvent être réunis au centre de la rosette, sur une tige très courte ; il mesure de 6 à 10 cm de diamètre; il est de forme cylindracée et entouré de bractées, formant un involucre dit « gummifère », qui est de forme subglobuleuse et comporte de nombreuses bractées disposées sur trois couches successives (figure 4).



Figure 4: Inflorescence (capitule) d'*Atractylis gummifera* L.

I.2.1.4. Fleurs :

Les fleurs apparaissent en été, entre le mois de juin et juillet. Elles sont appelées «fleurons». Elles sont hermaphrodites et duveteuses. La corolle est gamopétale et comporte 5 lobes de couleur variant du rose au rouge pourpre. Ces lobes sont entourés à leur base par des poils soyeux portés par l'ovaire, ce dernier est uniloculaire et ne renferme qu'un seul ovule (figure 5).



Figure 5: Poils soyeux du capitule floral d'*Atractylis gummifera* L.

Bractées :

Les bractées, pour la plupart hérissées d'épines, laissent exsuder à leur aisselle, un latex de couleur crème, blanc jaunâtre, qui se solidifie en une sorte de glu, d'où le nom vernaculaire de «chardon à glu ». Cette glu est aussi dénommée « gomme » par certains auteurs ; d'où le nom latin de l'espèce : *gummifera* ou gummifère («qui porte de la gomme »).Le latex n'apparaît qu'après la fructification de la fleur (figure 6).

On distingue trois types de bractées :

- Les bractées internes : mutiques et de couleur rouge purpurin, vers le haut,
- Les bractées médianes : à épines faibles,
- Les bractées externes : de forme oblongue linéaire, atténuées en une robuste épine et munies sur leurs bords, de dents épineuses (figure 7).



Figure 6: Bractée externe du capitule floral d'*Atractylis gummifera* L.



Figure 7: Bractées épineuses entourant le capitule floral d'*Atractylis gummifera* L.

I.2.1.5. Fruit :

Le fruit est revêtu de poils, étroitement, appliqués sur l'épicarpe, caractère existant dans les genres voisins, tel le genre *Carlina*, qui ne diffère du genre *Atractylis* que par la position des bractées.(Figure8)

Le fruit est un akène ellipsoïdal de 10 à 30 millimètres de long et quelques millimètres d'épaisseur, il est surmonté d'une aigrette de couleur blanche assurant sa dispersion. Quand il est mûr, le latex blanc sort de la base de la bractée qui coule des capitules. Le latex, inodore, présente des propriétés physiques et chimiques proches de celles du caoutchouc.

Le fruit desséché libéré des pappus (duvet des chardons), appelé aussi aigrette [19 - 22].



Figure 8: Capitule floral desséché avec des pappus

I.2.2. Partie souterraine:

Les organes souterrains, charnus à l'état frais, comprennent un rhizome principal pivotant en forme de navet de grande dimension, accompagné de fines racines et de rhizomes rampants, à section très dure, fibreuse, jaunâtre, laissant apparaître des stries concentriques (figure 9) [2, 12, 23].



Figure 9: Rhizome d'*Atractylis gummifera*L.

I.3. Biotope et distribution géographique :

Le chardon à glu pousse dans les broussailles, les forêts claires ou les terrains herbeux plus ou moins arides de la zone du littoral, les pâturages et les sols sablonneux ou argilo-sablonneux dont le pH serait voisin de 6. On le trouve, également, au bord des chemins ou les champs de culture à l'abandon [9, 23].

Le chardon à glu se retrouve, en toute saison : les feuilles et les fleurs desséchées de l'année précédente persistent, accrochées au sol et marquent l'emplacement de la plante avant que celle-ci n'ait encore de nouvelles feuilles en formation.

La plante qui est présente, un peu partout, en Europe, en Afrique, en Amérique du sud et en Asie. Cependant, elle est, essentiellement répandue sur le pourtour méditerranéen [24,25] :

- En Algérie ;
- Au Maroc ;
- En Tunisie ;
- En France, région de la haute Marne, en Corse ;
- En Espagne, dans la région de Valence et de Murcia ;
- En Italie, au voisinage de Naples ; en Sardaigne, en Sicile ;
- En Grèce ;
- Au Portugal.

En Algérie, la plante est présente dans toute l'étendue de la région littorale et du Tell, tant en plaine qu'en montagne, à partir du niveau de la mer jusqu'aux sommets des Babors et de l'Ouarsenis, c'est-à-dire à des altitudes de 1500-1900 mètres.

Parmi les nombreux gîtes signalés en Algérie, nous pouvons citer ceux d'EL- Kala, Annaba, Guelma, Eulma, Constantine, Batna, Tizi Ouzou, Bejaia, Bouira, Alger, Miliana, Tiaret, Mostaganem, Sig, Sidi bel Abbes et Oran.

CHAPITRE II :
PHYTOCHIMIE DU CHARDON A GLU

La composition chimique de la plante varie avec le cycle végétatif de la plante. Ces variations peuvent être qualitatives et quantitatives :

- **Qualitatives** : Apparition d'un principe actif et disparition d'un autre dans l'espèce d'*Atractylis gummifera* L. l'atractyloside, principe toxique de la plante s'y rencontrerait, à toutes les époques de l'année alors que d'autres composés (asparagine) ne s'y trouve que lorsque la période foliacée est en pleine activité [26, 27].
- **Quantitatives** : La teneur en principes actifs peut passer par un maximum et décroître, ensuite, rapidement.

II.1. Constituants phytochimiques :

II.1.1. Glycosides diterpéniques : atractyloside et carboxyatractyloside

C'est en Algérie que les premiers travaux botaniques et chimiques ont été réalisés. Lefranc, pharmacien militaire et botaniste, aborde en 1866, l'étude chimique et pharmacologique de la plante et isole le principe actif principal, l'atractyloside (ATR) dont Wunschendorf et Braudel, établissent la formule ainsi que celle de ses dérivés d'hydrolyse (figure 10) [9, 32, 36].

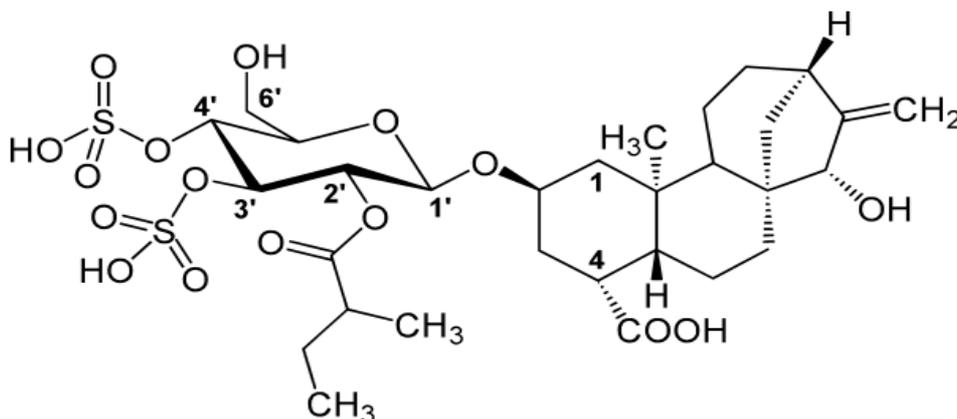


Figure 10: Structure de l'atractyloside

Le principe actif a été isolé à partir d'autres plantes de différents genres : *Callilepsis laureola*, *Xanthium strumarium*, *Iphiona aucheri* et *Wedelia glauca*, *Coffea arabica* (fèves du café)[32 - 36].

Ce n'est qu'en 1964 que le deuxième principe toxique est isolé par Danieli, il est appelé gummiférine ou 4-carboxyatractyloside [37, 38]. C'est un composé voisin de l'atractyloside mais de toxicité beaucoup plus importante et qu'on trouve aussi dans d'autres plantes telles que *Wedelia asperima* ; il diffère de l'atractyloside par la présence d'un second groupement carboxylique en position C (figure 11).

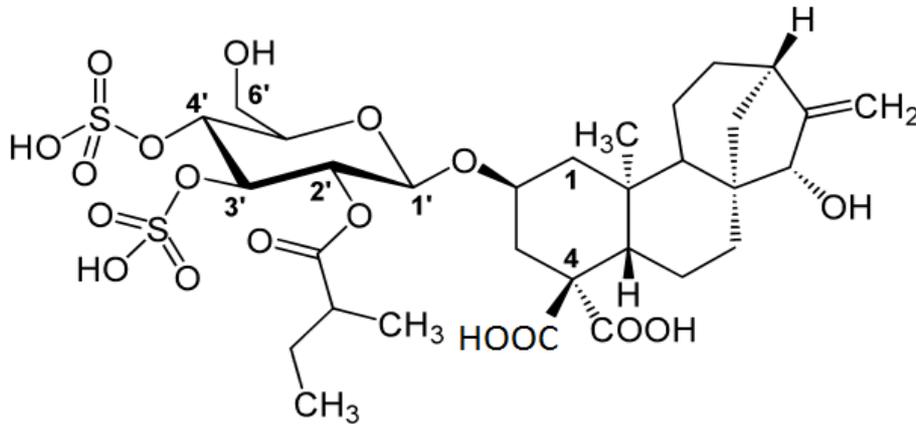


Figure 11: Structure du carboxyatractyloside

Ces deux principes toxiques sont des hétérosides à génine diterpénique dérivée du Kaurène (figure 12) [39].

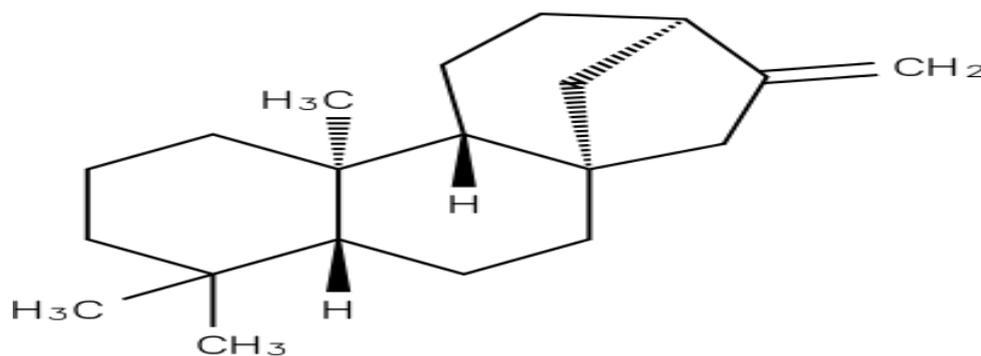


Figure 12: Structure du Kaurène

L'atractyloside, encore appelé atractylate de potassium ou atractyline est un hétéroside complexe, qui libère par hydrolyse acide :

- une molécule d'atractylogénine (aglycone diterpénique de type Kaurène),
- une molécule de glucose,
- deux molécules de sulfate monopotassique,
- une molécule d'acide valérianique ; celui-ci permet, par son odeur et ses réactions colorées, d'identifier le toxique [2].

Selon Riccio, il semblerait que la présence de l'ATR dans la racine, peut exister sous deux formes ATR et épi-ATR. La différence entre ces derniers réside au niveau de la position du groupement COOH, axiale ou équatoriale. Ces deux formes sont issues de la décarboxylation du carboxyatractyloside(CATR) [40].

II.1.2. Polyphénols :

Les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des végétaux, caractérisés par la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est, directement, lié au moins un groupement hydroxyle libre, ou engagé dans une autre fonction telle que : éther, ester, hétéroside... [41,42]. Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racine, tiges, feuilles, fleurs, fruits [43].

Les principaux polyphénols présents dans la plante *Atractylis gummifera* L. sont les flavonoïdes et les tanins [44].

II.1.2.1. Flavonoïdes :

Les flavonoïdes représentent une très large gamme de composés naturels. Ce sont des molécules aromatiques poly substituées. Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux [45, 46]

Les flavonoïdes sont des dérivés benzo-gamma-pyrane (figure 13) [47]. Leur structure de base est constituée de deux noyaux aromatiques (A et B), reliés par un hétérocycle oxygéné, qui désigne la lettre C [48]. Ils peuvent être subdivisés en plusieurs classes dont les plus importantes sont les flavones, les isoflavandiols, les flavanols, les flavondiols, les chalcones et les anthocyanes [49].

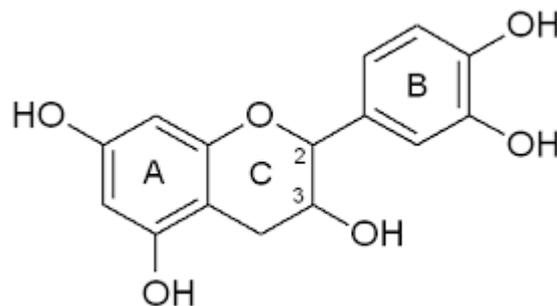


Figure 13: Structure tricyclique commune aux flavonoïdes

Sont, principalement présents dans le chardon à glu, les flavones, les flavonols et les anthocyanes [44].

A. Flavones et flavonols :

Chez ce type de flavonoïdes, il apparaît un hétérocycle porteur d'un groupement carbonyle et d'une insaturation en C3. La principale différence entre ces deux classes est l'absence d'hydroxyle en position C-3 chez les flavones. Les flavones sont, principalement constituées de glycosides de lutéoline et d'apigénine (Figures 14, 15) [50].

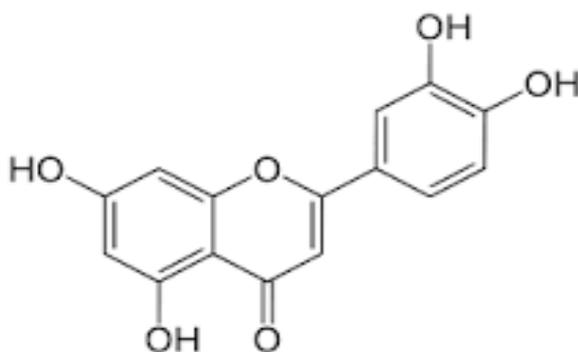


Figure 14: Structure de la lutéoline

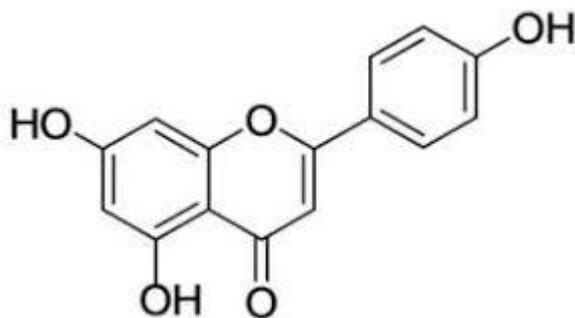
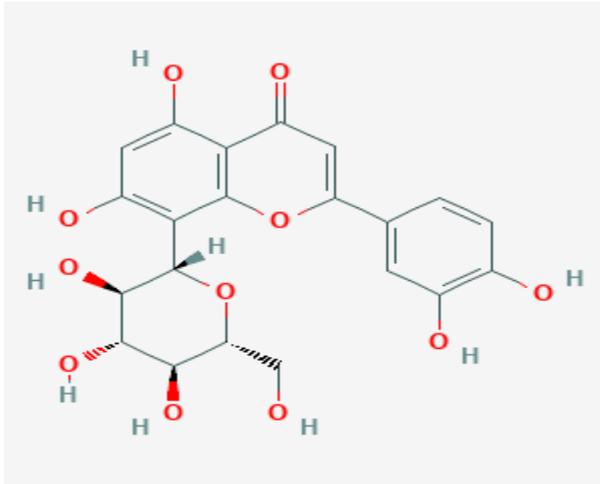
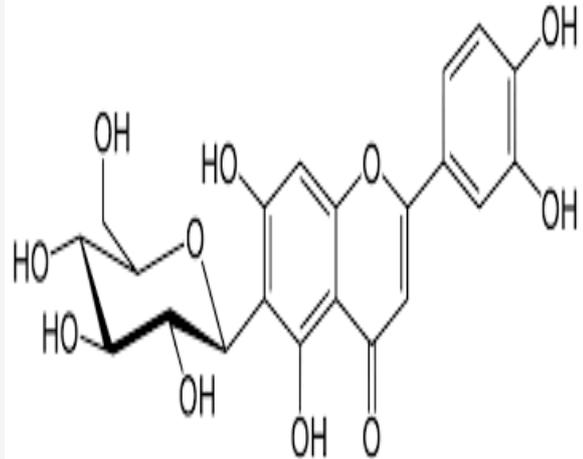


Figure 15: Structure de l'apigénine

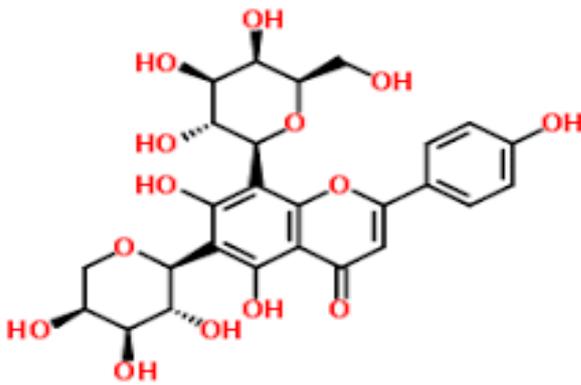
Les principales flavones présentes chez l'*Atractylis gummifera* L. sont l'orientine, l'homoorientine, le corymboside, le néocorymboside et l'isoschaftoside (Figure 16).



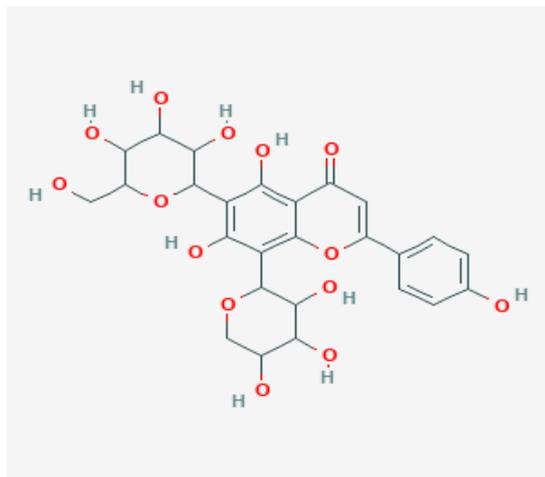
Orientine



Iso orientine



Corymboside



Isoschaftoside

Figure 16: Structure des principales flavones présentes chez *Atractylis gummifera* L.

B. Anthocyanes :

Les anthocyanes regroupent les anthocyanidols et leurs dérivés glycosylés. Ces molécules capables d'absorber la lumière visible, sont des pigments qui colorent les plantes en bleu, rouge, mauve, rose ou orange. Leur structure de base est caractérisée par un noyau "flavone", généralement, glucosylé en position C3.

La malvidine fait partie des six anthocyanidols principaux rencontrés chez les plantes (avec la cyanidine, la delphinidine, la pélargonidine, la péonidine et la pétunidine). Dans ce groupe, elle se caractérise par la présence d'un groupement hydroxyle -OH en position 4' et encadré de deux groupements méthoxyles -CH₃ en position 3' et 5' sur le cycle aromatique B (figure 17).

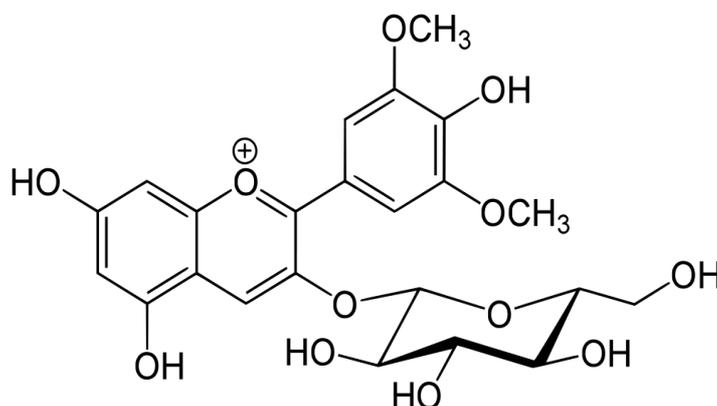


Figure 17: Structure du 3-glucoside de malvidine

II.1.2.2. Tanins :

Les tanins sont des composés polyphénoliques ayant la propriété de tanner la peau, en se fixant sur les protéines. On distingue, habituellement, chez les végétaux supérieurs, deux groupes de tanins, basés sur des différences structurales : les tanins hydrolysables et les tanins condensés. Chez *Atractylis gummifera* L., sont, principalement présents les tanins condensés. Ce sont des polymères flavanoliques constitués d'unités flavan-3-ols, liées entre elles par des liaisons carbone-carbone.

II.1.3. Autres substances :

- Asparagine ;
- De nombreux acides aminés (acide aspartique et glutamique, proline, leucine, valine, et tryptophane) ;
- Divers acides organiques (acide acétique, iso valérianique, oxalique et malique) ;
- Trace d'huile essentielle.

II.2. Distribution des agents chimiques dans la plante :

II.2.1. Partie souterraine :

II.2.1.1. Atractyloside :

Plusieurs facteurs, dont le climat, la composition du sol, le moment de la récolte et les facteurs génétiques, influencent la teneur en glucosides diterpénoïdes dans le rhizome *d'Atractylis gummifera* L.

Les teneurs en atractyloside de la racine *d'Atractylis gummifera* L. varient, ainsi, selon la région et la saison. Des teneurs plus élevées, d'atractyloside, ont été retrouvées dans les rhizomes récoltés en automne ou en hiver, comparées à celles relevées au printemps ou en été [33, 75, 76].

Il a été rapporté, en Sardaigne, des teneurs de 0,12% de matière sèche, en juin et de 0,33 %, en décembre) ; en Algérie, les teneurs variaient de 0,97 %, en Mai à 1,34 % en décembre [28].

Au Maroc, l'atractyloside a été dosé dans divers extraits aqueux de racine; des concentrations variables selon la région et la saison, de 2,9 mg/mL (été) à 4,3 mg/mL (hiver) ont été relevées [28,29].

En Algérie des travaux similaires ont été réalisés sur différents échantillons récoltés sur le territoire algériens et à différentes saisons. Les concentrations d'atractyloside variaient de 0,1 à 0,27 g% [8].

Remarque :

- Contrairement à l'atractyloside, le carboxyatractyloside se retrouve beaucoup plus dans la plante fraîche que dans la plante sèche à tous les niveaux de la plante.
- Des analogues de l'atractyloside ont été mis en évidence dans des extraits aqueux de haricots de café verts et torréfiés de *Coffea arabica* (figure 18). Les haricots de café verts contiennent 34,5 à 624 mg/kg d'atractyloside, aucune publication n'a décrit de cas d'intoxication liée à l'ingestion de café, même chez les gros consommateurs [36].

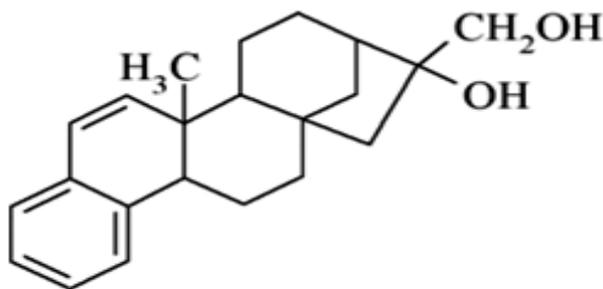


Figure 18: Analogue d'atractyloside du *Coffea arabica*.

II.2.1.2. Autres composés :

Lefranc (1866) rapporta les résultats d'analyse de la partie souterraine d'*Atractylis gummifera* L., récoltée en avril et desséchée à l'air :

- Inuline (46,5%) ;
- Sucres (8%) ;
- Cellulose (25%) ;
- Matière minérales (4,5%) ;
- Eau (4%).

II.2.2. Feuilles :

Ont été décrits des flavonoïdes dérivés de la luteoline, de l'orientine, de l'homo-orientine et de l'isoschaftoside (dérivés de l'apigénine) [2,9]. L'analyse du suc des feuilles montre les mêmes constituants que ceux de la racine à l'exception de l'inuline, de l'asparagine, l'atractylate de potassium [27].

CHAPITRE III :
USAGESET ACTIVITES BIOLOGIQUES
DU CHARDON A GLU

III.1. Usages :

III.1.1. Usages traditionnels

Les propriétés thérapeutiques et toxiques d'*Atractylisgummifera* L. sont reconnues depuis longtemps. Au premier siècle Av J.C, le pharmacologue et médecin grec Pedanius Dioscorides d'Anazarbos a donné une description approfondie de la plante et de ses propriétés. Theophrastus a, également, noté les effets toxicologiques de la plante sur les animaux [31].

III.1.1.1. Usages thérapeutiques :

- La racine était connue pour ses propriétés contre la lèpre [4].
- Galien a recommandé l'utilisation uniquement pour des applications externes [21].
- Dans le traitement des paralysies : on fait cuire «la racine du chardon à glu » dans une marmite neuve avec de l'eau ; on expose, ensuite, le membre paralysé au-dessus des vapeurs [31].
- L'inhalation de vapeurs de racine brûlées est indiquée: contre les vertiges et les céphalées [51].
- Dans le traitement du prurit vaginal les feuilles du chardon à glu sont utilisées pour la toilette intime sous forme de macération [54].
- Contre la jaunisse et les maladies de la poitrine, on peut faire cuire dans le bouillon de racine de « Addad » des œufs et des fèves qu'on mangera après avoir jeté le bouillon [56].
- En application locale, le chardon à glu est, également, utilisé contre les parasites, en médecine vétérinaire populaire, de par ses propriétés vermifuges [57].
- Comme antisyphilitique, « l'addad » est mélangé avec du sel ; avec le mélange, on frotte les boutons [51, 53].

- Une autre préparation permet de vaincre l'asthénie : on fait sécher, pendant 6 heures, au soleil, la racine de « addad » après l'avoir fait bouillir, pendant deux heures. Après mouture, on mélange le tout avec de la semoule. Le produit final obtenu est chauffé en présence du beurre et mangé, le matin à jeun [53].
- Le mélange, « addad » et Henné pilé, est utilisé dans le traitement de la gale [55].
- Selon la pharmacopée chinoise, un médicament traditionnel, à base d'atractyloside, est utilisé pour soigner les infections nasales et les maux de tête [58].
- le traitement des muqueuses nasales (écoulements, congestions, rhinite, sinusite) a été décrit par Nikels par l'usage de la plante entière sous forme de macération [59].
- Les tiges, fleurs et fruits sous forme d'infusion sont utilisés contre les hémorragies sous forme d'infusion [55].
- La plante était, également, connue pour ses propriétés antipyrétiques, diurétiques, purgatives et émétiques [56].
- Le chardon à glu est, également, utilisé dans des régions espagnoles et portugaises, pour cicatriser les blessures ; pour traiter les ecchymoses, les entorses, l'arthrite, les rhumatismes ou comme purificateur de sang. Par voie topique soit par lavage, soit sous forme de cataplasme de la racine fraîche, séchée ou torréfiée la plante du chardon à glu est appliquée. On peut également appliquer les morceaux de racine frits dans de l'huile d'olive [67].

III.1.1.2. Usages cosmétiques :

- Pour blanchir les dents : en utilisant le liquide obtenu par décantation après avoir fait bouillir la racine [53].
- Le mélange, «chardon à glu» et Henné pilé, est utilisé, par les femmes, pour teindre les cheveux. Ce même mélange s'emploie dans le traitement des taches de rousseur [55].

III.1.1.3. Autres :

- Le fait d'exposer une femme enceinte aux fumées du chardon à glu faciliterait son accouchement [51].
- La racine est connue pour ses vertus abortives, par voie orale, sous forme de décoction [51, 52].
- Dans les pays du Maghreb, le rhizome sec est, souvent, brûlé, comme de l'encens, afin de conjurer le mauvais sort [37].
- En fumigation, les fragments de racine desséchée sont employés, dans tout le Maghreb, dans diverses pratiques magiques destinées à conjurer les djinns et le mauvais sort [9].
- La poudre ou le suc de racine fraîche peuvent être administrés, associés à d'autres toxiques, notamment, l'arsenic et la jusquiame blanche, à des fins criminelles ou suicidaires. L'adjonction de la plante, réputée antiémétique, a, généralement, pour but d'empêcher la victime de rejeter le poison, par des vomissements [15].

III.2. Activités biologiques :

La recherche moderne montre que les extraits et les composés des différentes plantes renfermant de l'atractyloside et du carboxyatractyloside, possèdent des effets pharmacologiques étendus et exploités:

- Des effets anti-inflammatoires, anti-rhinite allergiques et analgésiques [60] ;
- Des effets antibactériens, antifongiques et antiviraux ;
- Des effets antidiabétiques [61] ;
- Des effets antilipidémiques [62];
- Des effets insecticides [63] ;
- Des effets antiparasitaires[64];
- Des effets antioxydants [65,66];
- Le pouvoir cicatrisant du chardon à glu a été confirmé par les travaux d'Errai et *al.* sous forme de cataplasme sec, contre les furoncles, la gangrène, les brûlures et le cancer de la peau [67] ;
- Activité anti-tumorale, suite à l'administration du complexe alpha-foetoprotéine (AFP –ATR). Le choix de l'AFP dans ce cas est dû aux deux expériences positives lors du traitement des tumeurs dont les cellules sont porteuses de récepteur AFP à leur surface.
La préparation a été obtenue en établissant une liaison non covalente Complexe AFP avec atractyloside (ATR). Le mécanisme de l'action cytotoxique de l'ATR est lié à l'effet sur la fonction mitochondriale cellulaire, provoquant l'apoptose [68];
- L'atractyloside a acquis une importance significative en tant qu'outil biochimique dans la mesure de l'intégrité mitochondriale externe en raison de sa forte spécificité inhibitrice sur la translocase ADP / ATP [32].

Le fait intéressant est que l'efficacité des remèdes soit soutenue par des études pharmacologiques [69].

Au vu de la forte toxicité et du rapport bénéfice / risque proche de 1, d'autres recherches devraient se concentrer sur l'étude des composés bioactifs concernant cette plante et d'évaluer les mécanismes de détoxification afin de mettre au point des applications thérapeutiques, avec un faible risque toxique [70].

CHAPITRE IV:
TOXICOLOGIE DU CHARDON A GLU

IV.1. Parties et principes toxiques :

IV.1.1. Parties toxiques :

La toxicité de la plante est liée à la présence des deux substances toxiques, l'atractyloside et le carboxyatractyloside.

Toutes les parties de la plante renferment de l'atractyloside, à des concentrations décroissantes de la racine aux feuilles, en passant par la tige, les bractées, la fleur et la graine. Les parties aériennes de la plante sont les moins toxiques [71, 72].

IV.1.2. Principes toxiques :

IV.1.2.1. Atractyloside :

A. Structure :

La structure de l'atractyloside fut définie par Piazzzi [73] puis complétée par Bombardelli [37].

L'atractyloside a pour formule $C_{30} H_{46} O_{16} S_2$ avec un poids molaire de 726,81 gr.

L'atractyloside est composé d'un aglycone (atractylogénine) est d'un diterpène non volatil de la famille des kaurènes, à structure perhydrophénanthrénique (figures 10, 12) [39].

- La portion glucidique est constituée d'une molécule de glucose, avec un seul groupe hydroxyle libre en C-6 ;
- en C-2, on a un résidu d'acide isovalérique,
- en C-3 et C-4 on a deux résidus d'acide sulfurique
- et en C-1 une liaison avec le C-hydroxyle de l'aglycone [37].

B. Propriétés physico-chimiques

- Le pouvoir rotatoire de l'atractyloside dextrogyre est de $[\alpha]^{20^\circ C} = -53$
- L'Atractyloside est très soluble dans l'eau, il est retrouvé dans la plupart des extraits aqueux des parties souterraines d'*Atractylis gummifera* L. [15].
- Il est soluble dans l'alcool 95° et, plus au moins soluble, dans les solvants organiques [74].

C. Dégradation de l'atractyloside :

Selon la littérature, de nombreuses toxines endogènes sont instables, à haute température et oxydées ou irradiées, par la lumière [32]. Aux températures élevées, une dégradation de l'atractyloside a été observée. Liang a démontré que la molécule se décompose suite à l'hydrolyse et à la saponification, après chauffage d'une décoction, pendant une période de temps assez longue.

Ce traitement hydrothermal décompose le produit toxique, permettant, ainsi, la détoxification de la matière première, ce qui semble être le cas des conditions d'utilisation du produit, en médecine chinoise. Ainsi, des traitements *in vitro* appropriés permettraient d'atténuer la toxicité des plantes brutes [75].

L'acidification accélère, également, la dégradation de l'atractyloside. Environ 50% du produit est dégradé par un traitement, à 98°C et à pH = 2,3, pendant 2 heures. Cela pourrait expliquer le fait que la fréquence des intoxications soit rare suite à l'ingestion de l'atractyloside en décoction.

La dégradation de l'atractyloside a été démontrée par Errai *et al.* suite à l'effet de traitements hydrothermaux et de l'acidification d'extraits administrés à des rats [67]. Le pouvoir de dégradation est variable selon le pH (entre 2 et 7) et la température (entre 65°C et 98°C), pendant 2 heures (figure19).

Ces résultats concordent avec ceux rapportés par Liang *et al.* [75]. Quant à ce qui est désigné comme étant un métabolisme *in vitro* [67].

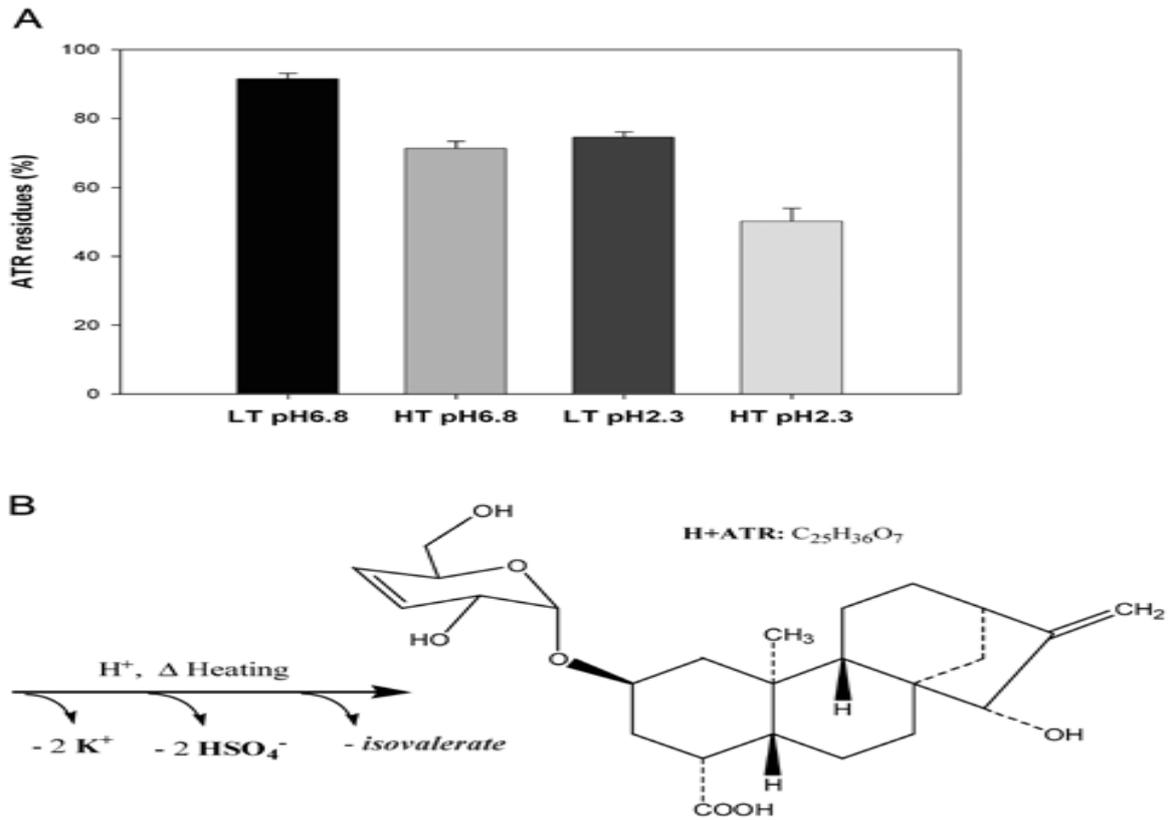


Figure 19:(A) Dégradation de l'atractyloside en solution après acidification et chauffage, pendant 120 minutes à forte température (HT=98°C) et à faible température (LT=65°C).(B) Produit du processus d'acidification et de chauffage de l'extrait.

D. Toxicocinétique :

Peu de données toxicocinétiques de l'ATR sont disponibles ; il n'existe aucune monographie traitant de la distribution plasmatique et/ou tissulaire et il y a peu d'informations sur les voies d'excrétion.

Les travaux effectués sur le métabolisme de l'ATR sont peu nombreux [32].

Le rôle du métabolisme n'est pas encore, parfaitement, élucidé, mais les faits montrent que l'atractyloside interagit avec les systèmes de biotransformation hépatique. L'atractyloside entraîne une diminution du cytochrome P450 (CYP-450) et du cytochrome b5 (CY b5) dans le contenu hépatique, en raison de modifications morphologiques et de changements dans le réticulum endoplasmique [76].

Les dérivés de l'ATR, provenant des grains de café, isolés dans les urines de consommateurs de café, présentent une structure, légèrement, modifiée en rapport à celle de la molécule mère. L'isolement du glucuronide de l'acide 2-hydroxyl-15-oxoatractylane-4-carboxylique de l'urine, chez les consommateurs de café, montre que la fonction alcool du groupement allyl, présente dans l'analogue-ATR de l'arabica C, est, probablement, biotransformés en un métabolite intermédiaire [74].

Bye *et al.* [77] ont montré que l'injection intra-péritonéale d'atractyloside, pendant 4 jours, à des doses de 5, 10 et 25 mg/kg, chez des rats, entraîne une excrétion urinaire quotidienne du toxique, surtout chez les animaux ayant reçu les deux plus fortes doses. Ces derniers ont excrété, approximativement, 200 pg d'ATR/mL d'urine, dans les 24 heures après administration.

Il n'existe pas d'études sur la sévérité de la toxicité aiguë de l'ATR en rapport avec les concentrations plasmatiques ou urinaires de la molécule mère ou de ses métabolites [74].

E. Relation structure-activité :

Le mécanisme d'action de l'atractyloside a été élucidé par l'ensemble d'études réalisées sur les mitochondries du foie de rats.

- L'atractyloside inhibe, compétitivement, la respiration cellulaire, au niveau des mitochondries
- Il bloque la liaison de l'ADP externe aux mitochondries et, par suite, sa translocation
- Il n'a aucun effet sur la phosphorylation oxydative de l'ADP intra-mitochondrial.

Dans ce contexte, il a été démontré l'importance de chaque groupement de la molécule dans l'action, directe ou indirecte, sur l'activité mitochondriale [78].

Comme l'atractyloside, l'atractylogénine inhibe la phosphorylation oxydative de l'ADP extra mitochondrial sans modifier le rendement de la phosphorylation oxydative de l'ADP intra mitochondrial.

Divers analogues d'atractyloside ont été testés, pour évaluer les relations structure-activité et mieux comprendre le mécanisme d'action de la molécule. On a noté que :

- L'aglycone (partie non glucidique de l'hétéroside) est également un inhibiteur compétitif du système de transport d'ADP, cependant la constante d'inhibition K_i du système de transport est 150 fois inférieures à celle de l'atractyloside
- L'aglycone possède, qualitativement, les mêmes propriétés que l'atractyloside mais à rendement plus faible, ceci peut nous amener à conclure que le glucose di sulfate et l'acide valérique augmentent l'effet inhibiteur.
- Les caractères hydrophobes de l'atractylogénine et de la chaîne isovalérique permettent à la molécule de pénétrer dans la membrane.
- D'autre part, l'interaction hydrophile caractérisée par le glucose et le groupement sulfate, permettent à la molécule de rester en surface pour une meilleure fixation sur le site récepteur.
- La réduction du groupe carboxyle en C4 de l'atractylogénine à l'alcool correspondant « atractylitriol » conduit à une perte de l'activité inhibitrice sur la translocation d'ADP.
- L'effet inhibiteur du stéviol sur la translocation d'ADP disparaît quand le groupe carboxyle en C4 est remplacé par un groupe méthyle « 13 hydroxystévane » ou lié à un glucose « stévioside ».

Le **stévioside** est un composé chimique à la saveur sucrée présent dans la feuille d'une plante d'Amérique latine : la *Stevia rebaudiana*. Il s'agit d'un hétéroside principalement connu pour son intense saveur sucrée et, pour cette raison, son emploi comme édulcorant (E960) (figure 20).

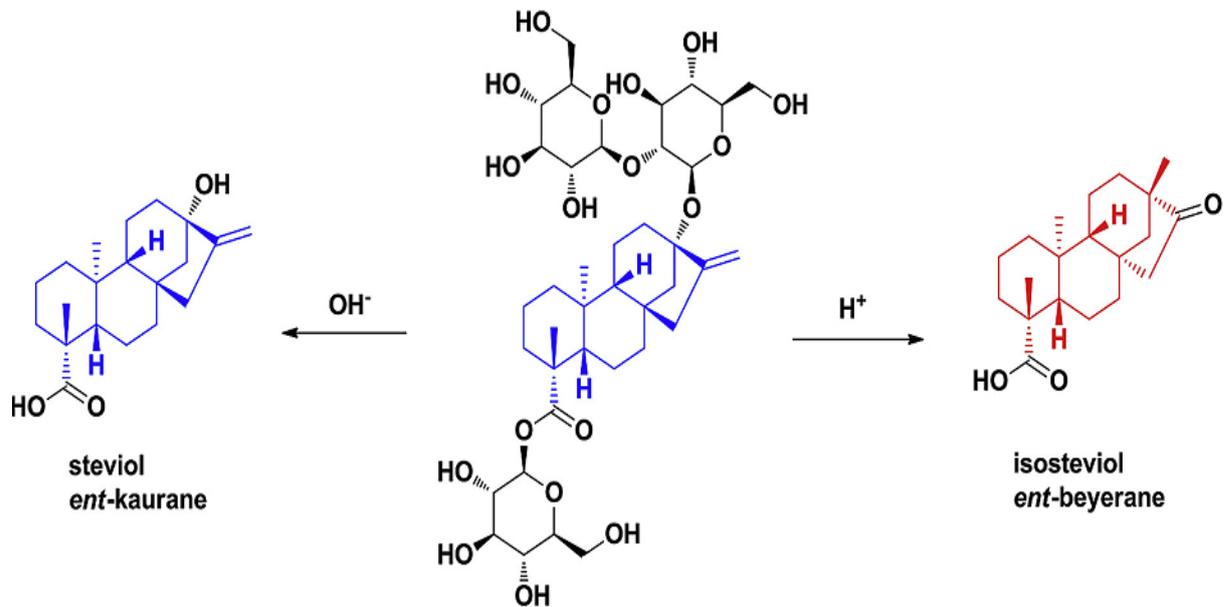


Figure 20: Structure du steviol et du stevioside

- Dans la molécule d'atractyloside, le groupement hydroxyle, en C2 sur l'atractylogénine, est lié au glucose di-sulfate par une liaison bêta-osidique. Ceci peut suggérer, du fait que l'atractyloside et l'atractylogénine ont le même effet inhibiteur ce groupement hydroxyle n'est pas un indispensable à la liaison molécule – protéine réceptrice (figure 10).
- L'acétylation du groupement hydroxyle en C6 de l'atractyloside (localisé sur le glucose) et en C15 de l'atractylogénine, diminue, cent fois, le pouvoir inhibiteur de la molécule initiale, ce qui dénote la responsabilité de ce groupement dans les effets spécifiques.
- La suppression de l'acide iso valérique et/ ou du groupement sulfate n'altère, en aucun cas, l'effet inhibiteur de la molécule initiale.

- Fontana *et al.* [80] ont étudié les effets de deux analogues d'atractyloside de *Coffea arabica* [2-O-(2-O-isovaléryl-bêta-d-glucopyranosyl)-atractyligénine et 2-O-bêta-d-glucopyranosyl-atractyligénine] sur le métabolisme des glucides, chez le rat, en mesurant les taux de glycémie, ainsi que les taux de lactate et de pyruvate hépatique, musculaire.

Dans cette étude, les analogues de l'ATR ont été utilisés, à une dose de 150 mg / kg, correspondant à la DL50 de l'ATR, chez le rat, par voie sous-cutanée. Le 2-O- (2-O-isovaléryl-bêta-d-glucopyranosyl) - atractyligénine a montré la même activité que l'atractyloside ; contrairement au second glycoside qui, en l'absence du groupement iso valérique, était presque inactif [78].

IV.1.2.2. Carboxyatractyloside :

Le CATR diffère de l'ATR par la présence d'un second groupe carboxylique en position C-4 du cycle diterpénique. Il est présent dans la plantes fraîche mais pas dans la plante séchée car il est décarboxylé en ATR, pendant le vieillissement ou la dessiccation [32].

A. Propriétés physico-chimiques :

Formule: $C_{31} H_{44} O_{18} S_2$; PM = 770,81 g

- Pouvoir rotatoire $[\alpha]^{20^\circ C} = -45$;
- Maximum d'absorption en UV : à 200-220 nm ;
- Très soluble dans l'eau et soluble dans l'alcool à 95° ; plus ou moins dans les solvants organiques.

Le carboxyatractyloside est présent dans la racine fraîche mais pas dans la racine sèche ; c'est une décarboxylation du carboxyatractyloside en atractyloside qui se produit lors du séchage ou du vieillissement des racines d'*Atractylis gummifera* L.

B. Toxicocinétique :

Le 4-carboxyatractyloside (CATR), décarboxylé en ATR dans les plantes séchées, semble suivre le même schéma métabolique que l'ATR.

C. Relation structure-activité :

- La présence d'un groupement carboxyle sur l'atractyloside multiplie, par cent, l'effet inhibiteur non compétitif du transport d'ADP.
- L'apoatractyloside, issu du carboxyatractyloside par substitution du groupement isovalérique, inhibe le transport d'ADP ; la différence résiderait dans le mode d'inhibition ; Il est non compétitif pour la carboxyatractyloside et compétitif pour l'apoatractyloside.
- Sur le plan moléculaire et au niveau du site de liaison, le groupe isovaléryle peut interagir avec l'un des groupements carboxyle ; la chaîne isovalérique donne naissance à une boucle qui renforce la rigidité et la stabilité de la molécule « carboxyatractyloside » [78].
- La puissance de son activité, sa rapidité d'action et le caractère non compétitif de son inhibition en font un bon modèle pour les études cinétiques de la transformation de l'ADP en ATP.
- Presque tous les groupements chimiques de l'inhibiteur sont impliqués dans des liaisons de type Van Der Waals ou des liaisons d'hydrogène expliquant, ainsi, la très forte affinité de cette molécule pour le transporteur.
- Cette forte affinité, par rapport à l'ATR, s'explique par le fait des interactions qu'établit le groupe carboxylique supplémentaire avec les acides aminés proches du site de fixation [81].
- Selon Riccio *et al* il semble que l'atractyloside existe sous deux formes isomériques axiale et équatoriale, la forme épi-ATR équatorial est proche du CATR du point de vue de l'activité inhibitrice [40].
- Le point commun étant le groupe carboxyle équatorial, apparemment nécessaire à une liaison de haute affinité. De ce point de vue, CATR et épi-ATR, devraient être comparés respectivement avec ATP et ADP [40].

IV.2. Mode d'action toxique :

La biochimie de l'atractyloside a été étudiée, depuis une cinquantaine d'années, par Vignais et Luciani (1971) et un peu plus tôt, par Winkler (1968) qui a mis en évidence la forte liaison entre la translocase ATP-ADP translocase et l'ATR [82].

Depuis lors, des avancées majeures, dans le domaine analytique, ont été réalisées ; toutefois, les mécanismes d'action toxique restent, imparfaitement, maîtrisés, ce qui ne permet pas l'avènement d'un traitement spécifique.

IV.2.1. Chaîne respiratoire :

Les mitochondries sont formées par deux membranes, une membrane externe ayant principalement des propriétés de perméabilité et une membrane interne où se produisent le transport d'électrons et la phosphorylation oxydative. L'espace interne, appelé matrice, contient des enzymes du métabolisme, l'acide désoxyribonucléique mitochondrial (ADNmt), et le mécanisme moléculaire pour sa répllication et son expression. Le flux d'électrons (e^-) à travers les complexes respiratoires entraîne une diminution de l'énergie libre, qui est utilisée pour pomper les protons (H^+) de la matrice vers l'espace intermembranaire. L'énergie conservée dans ce gradient de protons est utilisée pour promouvoir la synthèse de l'adénosine 5'-triphosphate (ATP) par l'ATP synthase en inversant le flux de protons de l'espace intermembranaire vers la matrice (Figure 21).

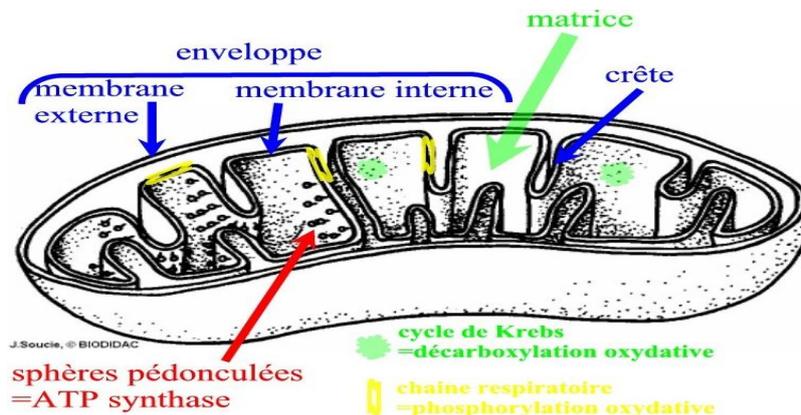


Figure 21: Schéma de la mitochondrie

L'ATR interagit avec le translocateur des nucléotides d'adénine (ANT), une protéine mitochondriale appelé également trans translocase ATP-ADP [83].

L'ANT est une protéine de la membrane interne mitochondriale qui permet l'entrée de l'ADP dans la matrice et la sortie de l'ATP synthétisé vers l'espace inter-membranaire. Elle constitue l'une des protéines les plus abondantes de l'organisme, essentiellement, dans les tissus à fort pouvoir métabolique tels le foie et le cœur.

L'ANT a deux fonctions principales : elle est, donc, responsable de l'antiport de l'ATP et de l'ADP, et fait partie du complexe de pores de transition de perméabilité, un pore non spécifique qui facilite l'augmentation de la perméabilité membranaire [84].

Il existe trois isoformes d'ANT chez l'homme :

- L'ANT1 (T1) exprimée dans le cœur et le muscle squelettique ;
- L'ANT2 (T2) exprimée dans les tissus nobles ;
- L'ANT3 (T3) exprimée dans les cellules à prolifération rapide telle les cellules tumorales [87].

L'ATR et l'ADP interagissent, tous les deux, de manière similaire avec l'ANT car ils se ressemblent dans la structure géométrique et la distribution de charge [85].

Le caractère polaire des groupes sulfate dans ATR correspond au groupe phosphate dans ADP; le glucose, dans le groupe glucoside de l'ATR, correspond au ribose de l'ADP, et les cycles condensés de l'ATR ressemblent à la fraction purine de l'adénine (Figure 22).

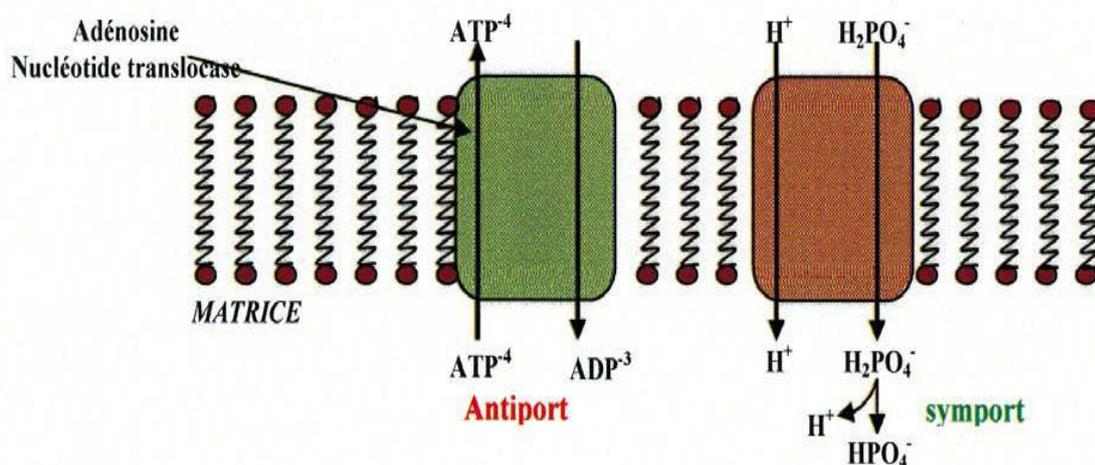


Figure 22: Echange d'ATP/ADP à travers la membrane mitochondriale

L'inhibition de la translocase entraîne :

- Une augmentation de l'ATP dans la matrice ;
- Une diminution de l'utilisation de l'énergie fournie par le gradient de proton ;
- Par suite : une accumulation des protons dans l'espace inter-membranaire ; un blocage des complexes I, III, IV de la chaîne respiratoire ; blocage du pompage des protons de la matrice vers cet espace ;
- Un ralentissement de l'oxydation du cytochrome C réduit par la cytochrome oxydase, ce qui entrainera une diminution de la consommation en oxygène et donc un ralentissement de la respiration ;
- Le ralentissement de l'oxydation du coenzyme QH₂, par le complexe III, privera les complexes I et II de leur coenzyme accepteur d'hydrogène et, par conséquent, une diminution de la consommation du NADH et du succinate.

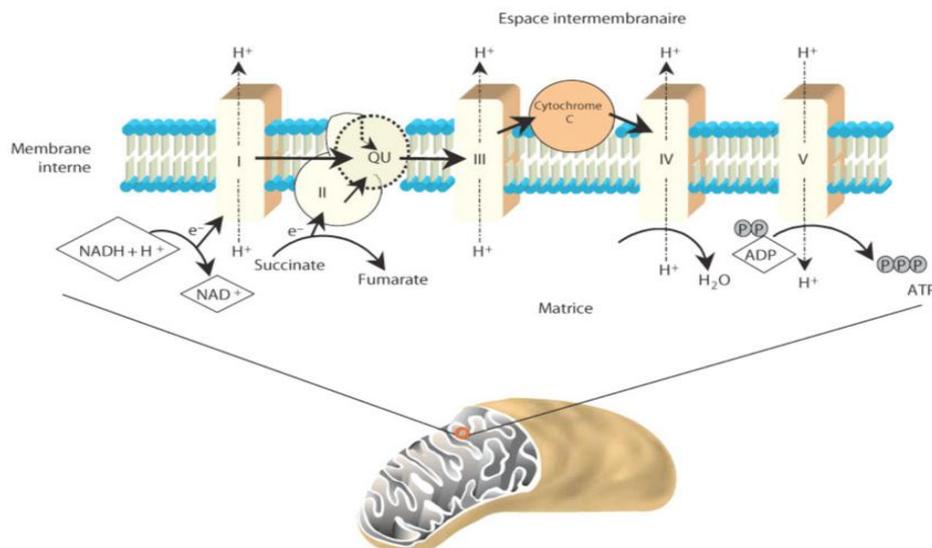


Figure 23: Schéma de la chaîne respiratoire

En conclusion l'inhibition de la translocase entraîne l'inhibition de toute la chaîne respiratoire mitochondriale [84].

Lorsque l'ATR se lie au site externe de fixation de l'ADP de l'ANT, il le bloque dans un état particulier appelé *c-state*, qui est compatible avec l'ouverture du pore qui augmente la perméabilité de la membrane interne mitochondriale vis-à-vis des protéines de bas poids moléculaire, inférieur à 1,5 kDa.

Ceci entraîne une dissipation du potentiel membranaire mitochondrial, un déséquilibre chimique entre le cytoplasme et la matrice mitochondriale ainsi qu'un découplage de la phosphorylation oxydative, provoquant, alors, un gonflement osmotique dû à un processus d'équilibre du gradient des protons, qui peut entraîner la rupture de la membrane externe [90, 91].

Selon Lauquin, la fixation de l'ATR est fonction de l'affinité et du nombre de récepteur ; le nombre maximum d'accepteurs d'atractyloside a été déterminé en utilisant des ligands radio-marqués ^3H atractyloside qui se lient aux mitochondries ; il a été estimé à 310 ± 40 pmol/mg de protéine avec une affinité $K_d = 40 \pm 8$ nM [92, 93].

D'autres études ont démontré que la membrane mitochondriale contient un nombre d'accepteurs d'atractyloside de l'ordre de $10,5 \pm 8$ nmole/mg de protéine et de 22 ± 8 nmole/mg pour le carboxyatractyloside, avec une affinité élevée pour la carboxyatractyloside [94]. En effet, la constante de dissociation du site d'attache est de 50nM pour l'ATR et de 10nM pour le CATR [95].

Cette action s'exerce, en particulier, dans les cellules riches en mitochondries telles que les hépatocytes et les cellules épithéliales tubulaires proximales, qui contiennent des transporteurs permettant à l'ATR de traverser la membrane cellulaire.

IV.2.2. Mécanismes de cytotoxicité :

La liaison sélective de l'ATR à l'ANT a, donc, deux conséquences importantes.

Tout d'abord, l'ATR inhibe le transport d'ADP et inhibe l'accès d'ADP mitochondrial supplémentaire au site de phosphorylation situé dans le compartiment mitochondrial, bloquant ainsi la phosphorylation oxydative et les réactions oxydatives du cycle de Krebs [96, 97].

Dans un deuxième temps, l'ATR induit l'ouverture des pores de transition de perméabilité (PTP) mitochondriale conduisant à une perméabilisation de la membrane et à la libération des protéines intra-membranaires, y compris la cytochrome C. La translocation du cytochrome C des mitochondries au cytosol est une étape cruciale dans l'induction de l'apoptose [98].

On suppose que la quantité d'ATP accessible après l'ouverture du pore est un facteur déterminant dans l'induction de la mort cellulaire par nécrose ou par apoptose [99].

- Les effets toxiques dus à l'inhibition de la phosphorylation mitochondriale sont la nécrose hépatique et l'insuffisance rénale, chez les animaux et les humains. La toxicité aiguë de l'ATR diffère, néanmoins, selon l'espèce animale et la voie d'administration [100].
- L'effet de l'atractyloside (ATR) et du carboxyatractyloside (CATR) sur l'activité des canaux-chlorure des mitochondries, a été évalué sur le muscle cardiaque du rat.

Cette inhibition est dose-dépendante et elle augmente avec le temps d'exposition. Les deux composés n'ont pas influencé l'amplitude du canal ionique, mais induit, par contre, une réduction du temps d'ouverture des canaux-chlorure mitochondriaux. Il est évident que cet effet inhibiteur peut aider à expliquer certains effets cellulaires et / ou subcellulaires [101].

- L'ATPase mitochondriale est connue pour être inhibée par l'ATR (50 mM) dans la cornée humaine, ainsi que $\text{Na}^+ \text{K}^+$ /ATPase rénale dans les fragments tubulaires proximaux [102].

La sensibilité de l'ATR à l'ADP / ATP translocase mitochondriale dans une tumeur humaine (hépatome), est inférieure à celle de la mitochondrie hépatique humaine, ce qui explique sa toxicité pour les cellules normales.

Une observation similaire sur la cytotoxicité de l'ATR et son comportement sur des cellules isolées a été démontrée par Obatomi *et al.*

- Chez le rat, l'ATR est un puissant inhibiteur de la chaîne respiratoire mitochondriale (étape 3), sur les fragments de cellules proximales mais pas sur les fragments cellulaires des glomérules. Ceci suggère que le transport sélectif de ce diterpénoïde dans le tube proximal, peut expliquer la localisation de l'atteinte. Le système de transport, au niveau du tubule proximal, est bien défini et qui pourrait jouer un rôle dans la sélection du transport d'ATR dans ces cellules, alors que les processus sont absents, au niveau des glomérules. Une compréhension de cette sélectivité pourrait aider à développer une intervention thérapeutique rationnelle pour minimiser l'effet néphrotoxique de cette plante [103].

La figure 24 présente le mécanisme d'action rénale de l'ATR, comparée à celle d'autres principes végétaux.

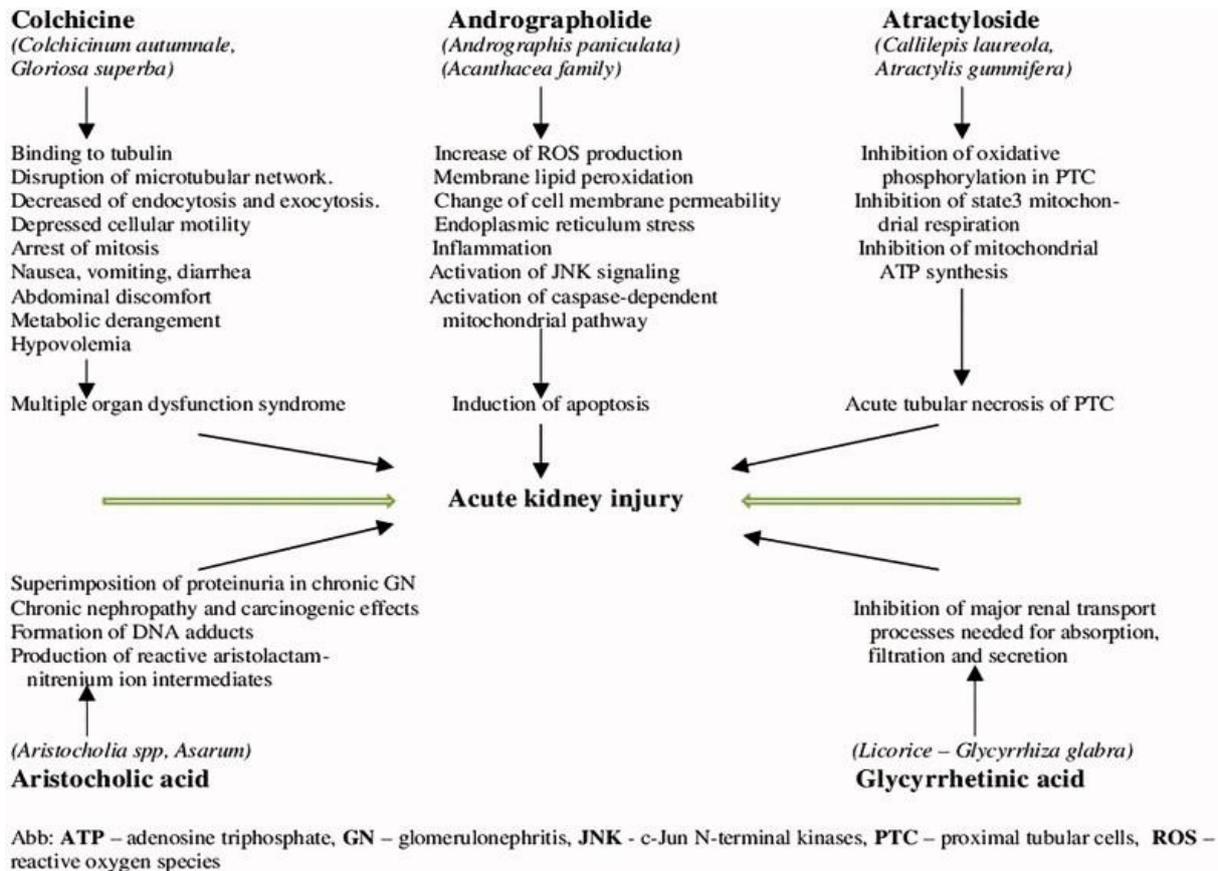


Figure 24: Plantes et néphrotoxicité aiguë [105]

Vancompernelle *et al.* ont mis en évidence l'effet apoptotique de l'ATR, en établissant une relation entre la cathepsine B, l'atractyloside et les caspases. Ces dernières sont reconnues comme exécuteurs centraux d'apoptose. Elles sont, actuellement, divisées en initiateur et en promoteur caspases.

Les caspases d'initiation (caspase-8) sont activées, en conséquence d'événements de signalisation de la membrane cellulaire, tandis que les caspase-3 sont responsables du clivage des substrats cruciaux, impliqués dans la phase de dégradation apoptotique. Les auteurs ont démontré l'effet inducteur de l'atractyloside sur la libération de la cathepsine B [98].

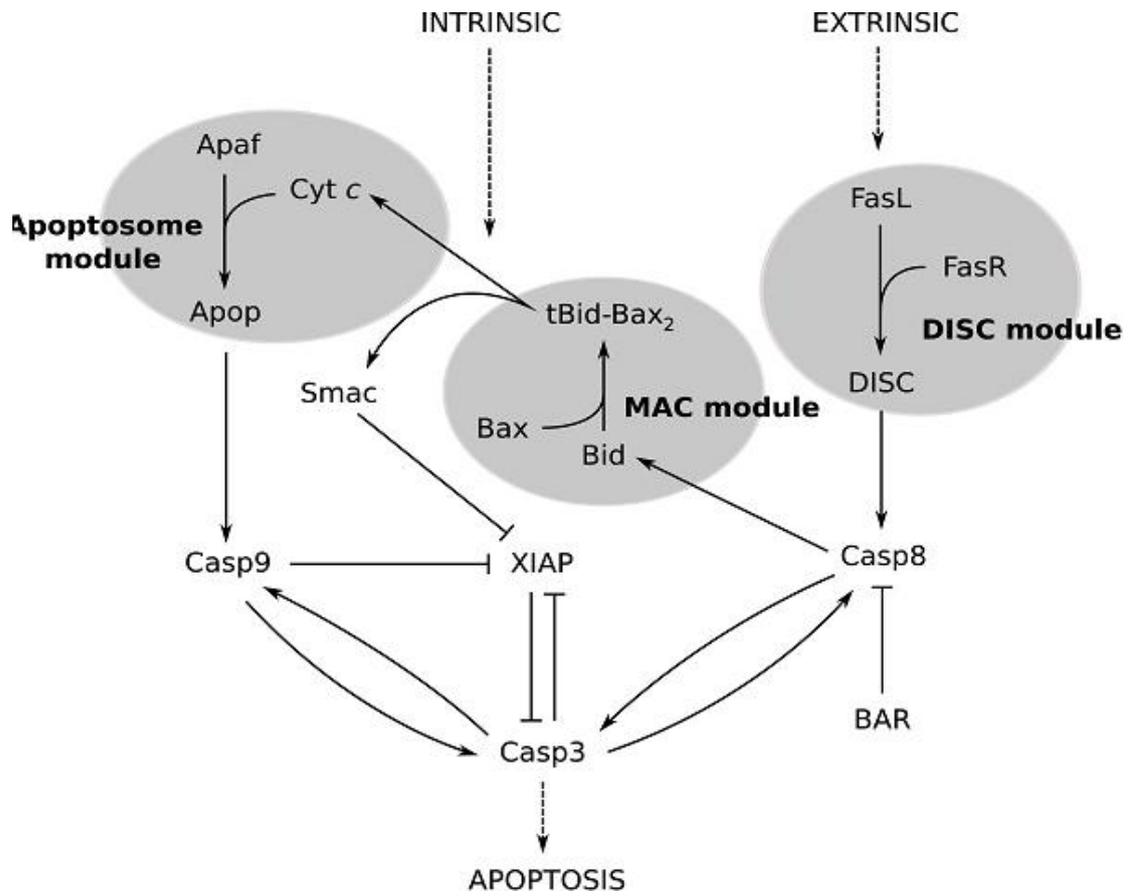


Figure 25: Les voies extrinsèque et intrinsèque de l'activité des caspase-3 [98]

IV.2.3. Action sur le métabolisme intermédiaire :

L'ATR et CATR, inhibiteurs de la phosphorylation oxydative s'opposent à la formation de l'ATP, à partir de l'ADP, et, de ce fait, l'apport de l'énergie n'est plus assuré dans l'organisme.

La perturbation du cycle de Krebs et de la respiration cellulaire sera à l'origine de l'altération du métabolisme intermédiaire, notamment celui des carbohydrates [106].

L'ATR épuise le glycogène, in vivo, par inhibition de la synthèse du glycogène ; il y a une augmentation des concentrations d'acide lactique dans le sang et une diminution de la consommation d'oxygène. Cette action est à l'origine de l'augmentation de la consommation du glucose, de l'épuisement du stock hépatique et musculaire en glycogène [107, 108].

L'inhibition de la phosphorylation oxydative des mitochondries par l'atractyloside a des conséquences importantes pour l'organisme entier. D'autre part, l'atractyloside inhibe la néoglucogenèse et l'oxydation des acides gras, mais accélère la glycolyse anaérobie et la glyco-génolyse.

Santi à travers ses travaux a pu mettre en évidence l'interférence de l'ATR sur le cycle de Krebs ainsi que sur le métabolisme glucidique et ceci depuis 1955 [109, 110].

Les altérations métaboliques chez les humains et les animaux comprennent une phase d'hypoglycémie aiguë, en raison de l'épuisement rapide du glycogène hépatique et du muscle squelettique [111].

L'inhibition de la synthèse du glycogène est marquée par une nouvelle phase hypoglycémiant. Au début, les niveaux sanguins de lactate suivent l'évolution des valeurs du glucose, mais dans la phase hypoglycémiant le niveau de lactate augmente régulièrement.

Le déclin rapide du glucose plasmatique aboutit rapidement à l'insuffisance de livraison de glucose dans le cerveau, substrat nécessaire au maintien des fonctions normales de cet organe. La persistance de l'hypoglycémie entraîne également une dépression respiratoire, une hypoxémie, une hypoxie tissulaire (diminution de la consommation d'oxygène), une acidose, des convulsions, un coma et, dans la majorité des cas, la mort [112].

L'inhibition de la synthèse du glycogène et augmentation des lactates dans le sang sont la conséquence de la réduction marquée des réactions oxydatives cellulaires [113].

La relation entre le métabolisme mitochondrial et les voies touchées par *l'Atractylis gummifera* L. est illustrée à travers la figure 26: le signe (+) désigne les voies activées et le signe (-) les voies inhibées par les hétérosides du chardon a glu.

Les voies métaboliques affectées sont la glycolyse, la phosphorylation oxydative, la néoglucogenèse, la glycogénolyse et la lipogenèse [114].

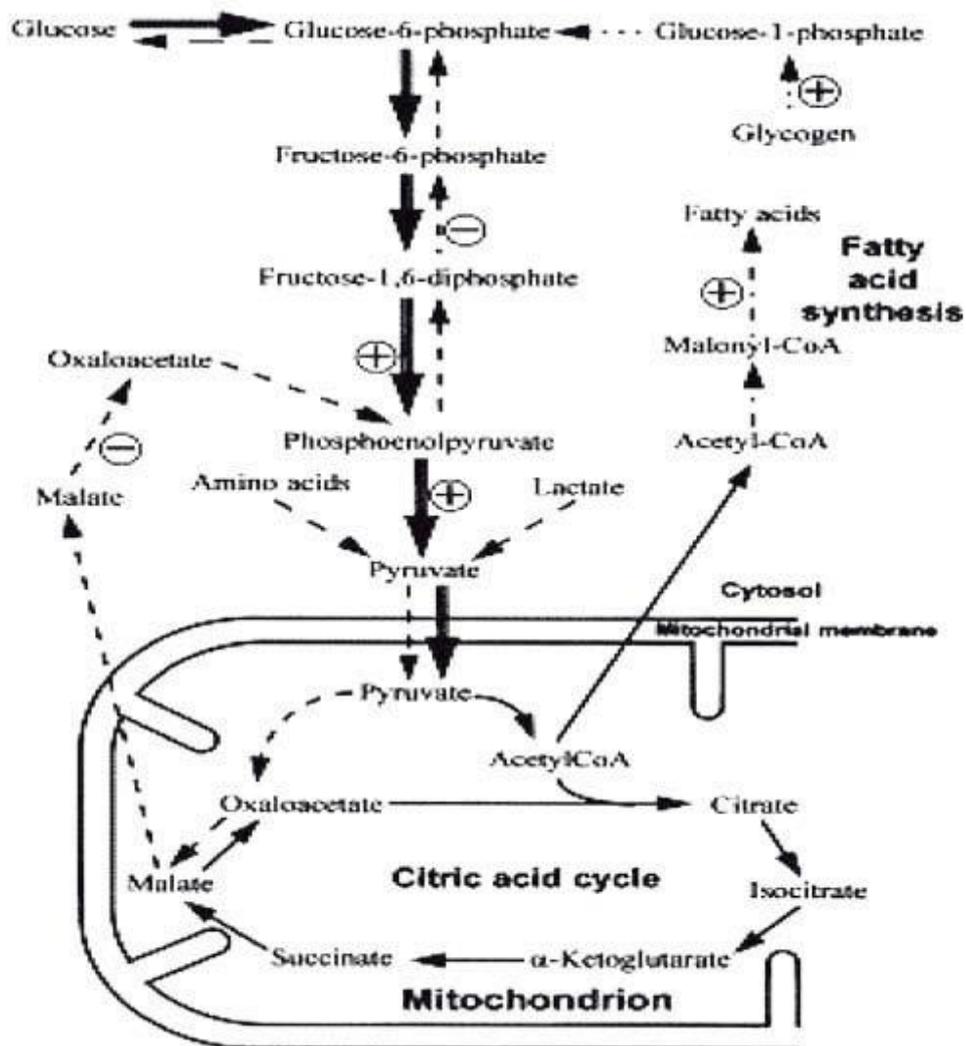


Figure 26: La relation entre le métabolisme mitochondrial et les voies touchées par *l'Atractylis gummifera* L.

Les animaux empoisonnés par l'ATR meurent généralement suite à des convulsions hypoglycémiques. Une caractéristique intéressante de l'intoxication par l'ATR est le temps de latence entre l'administration d'ATR et l'apparition des premières manifestations toxiques, même si le composé est administré par voie intraveineuse.

Après une phase initiale d'hyperglycémie causée par l'épuisement du glucose des muscles squelettiques et du glycogène hépatique, une phase d'hypoglycémie s'ensuit qui a des conséquences importantes sur l'organisme tout entier, telles que la dépression respiratoire, l'hypoxémie.

A ce stade le métabolisme intermédiaire ne pouvant être alimenté que par les protides et les lipides, des acides gras et des acides aminés apparaissent expliquant ainsi la cétonurie et l'acidose métabolique.

Cette dernière s'aggrave du fait qu'au niveau rénal l'absorption des bicarbonates est mal faite et gêne à son tour le catabolisme glucidique [115].

Comme la toxicité de l'ATR persiste après une vagotomie et une pancréatectomie, elle ne peut dépendre donc ni d'une interaction avec le système nerveux autonome ni des glandes impliquées dans le contrôle glycémique. L'atractyloside a inhibé l'effet du phosphoénol carboxyle, stimulé par le glucagon kinase et la gluconéogenèse. On a démontré que les hormones, noradrénaline et la vasopressine, ont inversé l'effet inhibiteur de l'atractyloside sur la gluconéogenèse [116].

La sévérité de l'hypoglycémie induite par l'atractyloside est similaire à celle provoqué par l'administration d'une forte dose d'insuline ou suite à une décharge des catécholamines plasmatiques, du cortisol et du glucagon [117].

Cela suggère que le mécanisme de l'altération d'ATR sur le métabolisme intermédiaire pourrait être plus complexe faisant intervenir plusieurs mécanismes [32].

IV.2.4. Lésions tissulaires:

Les principales lésions, suite à l'ingestion de la racine du chardon à glu, sont une hépato et/ou néphrotoxicité mortelle chez l'homme ou chez les animaux domestiques avec une grande ressemblance essentiellement sur les paramètres biologiques de l'intoxication [118].

Chez l'homme, les symptômes commencent 6 à 36 h après l'ingestion d'extraits de rhizome d'*Atractylis gummifera* L. [51].

IV.2.4.1. Lésions rénales :

Dans une étude chez le rat, Hopps et *al.* ont décrit les effets de l'ATR et de certains de ses dérivés sur la fonction rénale [119].

Les auteurs ont évalué le taux d'excrétion urinaire des enzymes (bêta-N acétyl-d-glucosaminidase, alanine amino peptidase, gamma glutamyltransférase) et les teneurs en électrolytes (Na^+ , K^+ et Cl^-), ainsi que les concentrations sanguines et urinaires de la créatinine chez les rats traités par ATR, atractyligénine et deux dérivés d'atractyloside (l'un dépourvu à la fois des groupes sulfate et du groupe isovalérate, l'autre dépourvu des groupes sulfates seulement).

Les résultats ont démontré que l'atractyloside est fortement toxique pour le rein par l'altération des paramètres biologiques et plus particulièrement par la réduction de la clairance de la créatinine, contrairement à l'atractyligénine qui laisse la fonction rénale presque inchangée.

Des études *in vitro* utilisant des coupes de tissus ont évalué la cytotoxicité de l'ATR. Ces études ont permis d'évaluer les activités enzymatiques, la viabilité mitochondriale, les changements des niveaux d'ATP, la peroxydation lipidique, le glutathion oxydé (GSSG) et les niveaux réduits de glutathion (GSH) dans les tissus rénaux et hépatiques de différents animaux. L'impact rénal de l'ATR ne concernait que les cellules tubulaires proximales, tandis que les cellules glomérulaires ne semblaient pas être affectées [76].

Dans les cellules du tubule proximal, l'ATR a provoqué une diminution significative de la concentration du contenu en ATP et une déplétion du GSH cellulaire [119].

L'atractyloside agit également en interférant avec le transport cellulaire; la présence des groupements sulfate, suggère que cette molécule peut subir un transport d'anions et de ce

faite s'accumule dans les cellules rénales. De plus l'ATR inhibe également l'absorption d'anions organiques et cette inhibition est dose dépendante [111, 119].

L'administration d'une seule injection par voie intra péritonéale ATR chez le rat à une dose du 1/3 de la dose causant la mort de 50% des animaux (DL50), a conduit à des dommages de la structure et à la fonction des reins. L'atteinte structurale est donc précoce même à faible dose [122].

Dans les 180 minutes suivant l'administration il y avait une nécrose tubulaire des cellules de la partie distale du tubule proximal, qui était accompagné d'une augmentation du volume d'excrétion urinaire avec une augmentation d'excrétion d'albumine, de glucose, de corps cétonique et du potassium. L'analyse des indicateurs biochimique du sang a révélé une augmentation de la teneur en urée (3 fois la valeur physiologique) et une légère augmentation des taux de créatininémie [111].

Des effets néphrotoxiques similaires sont observés chez la souris, le porc et les chiens, mais pas chez les cobayes et les lapins suite à l'administration de la même dose et dans les conditions similaires. Le glomérule de ces derniers traités ne semblait pas être affecté [111, 121, 122].

L'ingestion massive d'ATR chez l'homme débute le plus souvent par une augmentation du taux de créatine sérique, une polyurie qui évolue vers une atteinte rénale aigue avec une hyperkaliémie, en moins de 24 heures [32].

IV.2.4. 2. Lésions hépatiques :

Il a été difficile de reproduire toutes les manifestations cliniques observées chez l'homme victimes d'empoisonnement par l'ATR.

Ces manifestations sont toujours de courte durée et mortelle dans 91% des cas [123].

Le pronostic vital dans ce cas est faible et très peu de patient survive [79].

Généralement le décès des patients survient dans un contexte d'un coma hypoglycémiant, qui est toujours accompagné d'une insuffisance hépatique aiguë [31,123-126].

Les manifestations hépatiques sont dues à la peroxydation lipidique, l'épuisement du GSH et l'élévation du GSSG. Ces changements suggèrent que l'ATR peut induire des effets toxiques par un processus oxydatif impliquant sa fraction méthylène produisant ainsi un radical libre. Le métabolite réactif produit n'a pas été identifié, mais des espèces réactives de l'oxygène tel que l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène ou les radicaux hydroxyles peuvent être impliqués.

Les travaux de Yang et *al.* ont révélé qu'il n'y avait pas des lésions histopathologiques visibles dans les poumons, le cœur, la rate et le système nerveux central chez les souris après injection intra-péritonéale d'atractyloside (ATR, aux doses de 50, 125 et 200 mg / kg) et de carboxyatractyloside (CATR, aux doses de 50, 100 et 150 mg / kg) pendant 5 jours. Cependant, il a révélé des lésions hépatiques importantes par rapport au groupe témoin.

Dans la détermination des taux d'enzymes dans le sérum, l'injection intrapéritonéale d'ATR et de CATR a entraîné une augmentation significative des activités de l'alanine aminotransférase (ALT), de l'aspartate aminotransférase (AST) et de la phosphatase alcaline (ALP) par rapport aux témoins. Aussi les dosages de l'activité enzymatique liés aux antioxydants ont montré que l'administration d'ATR et de CATR augmentait considérablement la concentration de malondialdéhyde hépatique (MDA), ainsi qu'une diminution des activités du superoxyde dismutase (SOD), de la catalase (CAT) et de la concentration de glutathion (GSH), et ceci était en bon accord avec les résultats de l'activité aminotransférase sérique et des examens histopathologiques. Pris ensemble, les résultats démontrent que les glycosides induisent une hépatotoxicité chez la souris par le biais de son induction de stress oxydatif sous forme de peroxydation lipidique dans le foie [58].

Chez l'homme l'augmentation de l'activité de l'AST et de lactate déshydrogénase dans le sang est 5 à 10 fois plus élevée par rapport aux normes physiologiques [27].

Chez les personnes qui ont survécu après empoisonnement, une biopsie du foie a révélé une nécrose centro-lobulaire et une distorse graisseuse des hépatocytes situés à la périphérie des lobules hépatiques [31].

Dans de nombreux cas, des modifications nécrotiques étaient trouvés non seulement dans le foie, mais aussi dans les reins [23, 127, 128].

On a noté toutes fois le risque d'une hépatotoxicité suite à un usage médical traditionnel peut être la conséquence d'une interaction et/ou la contamination des plantes [72].

IV.2.4.3. Lésions cardiaques :

L'étude de Song et *al.* a démontré les dommages induits par l'ATR sur les cellules musculaires lisses artériolaires (ASMC) mais également sur la réaction contractile. La teneur relative en ATP dans les ASMC était significativement réduite de 48%, 63% et 66% par rapport au témoin lorsque les cellules étaient traitées respectivement avec 7,5, 10 et 15 μ mole d'atractyloside pendant 10 min, et les ASMC étaient hyperpolarisées, et l'intensité de contraction des ASMC était faible. Ces résultats suggèrent que l'ATR a un effet toxique sur la contraction cardiaque, qui est peut-être lié à des dommages mitochondriaux [130, 131].

Aucun dommage structural et/ou métabolique n'a pu être observé, certains auteurs expliquent ceci par le fait que l'ATR ne pénètre pas dans le cardiomyocyte [122].

Cependant, dans certains cas cliniques les manifestations cardiaques ont été observées sur la contractilité du muscle lisse et sur la paroi des artères myocardiques [25, 130].

Pendant la phase initiale une hypertension transitoire est rapportée évoluant vers une hypotension sévère pouvant aller à un collapsus chez les jeunes enfants. Des troubles de la repolarisation et de la conduction intra-ventriculaire ont été également observés à l'électrocardiogramme (ECG) [11].

Shug et *al.* ont rapporté que la perfusion intra-coronarienne d'ATR chez des chiens sans ligature coronarienne produit des changements électriques et métaboliques similaire à ceux associés au myocarde ischémique [131].

En effet, la perfusion intra coronarienne d'ATR est utilisée comme modèle expérimental par les études de Gilmour et *al.* en physiologie [132].

IV.2.4.4. Lésions neurologiques :

L'atteinte neurologique est dominée par l'apparition d'un coma profond, calme, d'installation rapide et brutale, avec abolition des réflexes de déglutition.

Une encéphalopathie s'accompagne parfois d'un œdème cérébral avec des troubles neurovégétatif caractérisés par des contractures souvent généralisés. Des contractions pseudo-tétaniques apparaissent et sur ce fond de contracture des spasmes et des crises convulsives peuvent apparaître. La phase des troubles neurologiques est un signe de pronostic fatal [51].

L'examen neurologique montre des réflexes ostéo-tendineux abolis ou au contraire exacerbés. Il existe souvent un signe de Babinski bilatéral, les pupilles sont en myosis puis en mydriase dans la phase terminale. Dans les intoxications graves, des anomalies de l'électroencéphalogramme ont été rapportées. Des troubles thermiques avec hypothermie a été rapporté suite à une intoxication collective par le chardon à glu de six enfants d'une même famille [124].

IV.2.4.5. Lésions sur le système reproducteur :

La toxicité de l'extrait de l'*Atractylis gummifera* L. sur le système reproducteur des rats mâles, montre une nette modification de la morphologie du sperme, notamment le flagelle. La morphologie des testicules et de l'épididyme a été aussi altérée, ces observations devraient être vérifiées par des études plus poussées [133].

IV.3. Doses toxiques :

La toxicité est plus élevée chez le chien que chez la souris et le rat ; la toxicité, chez l'Homme, semble, encore [134].

La toxicité dépend de la dose, de l'âge du sujet, de la quantité et de la nature de la substance ingérée [74].

Les **tableaux 1 et 2** rapportent les doses létales 50 de l'atractyloside et du carboxyatractyloside chez deux espèces, le rat et la souris.

Les DL 50, exprimées en poids de racine, sont variable selon le pays, la région et selon l'état de la plante, sèche ou fraîche.

Tableau 1: Doses létales 50 (DL₅₀) de l'atractyloside [19, 101]

Animal	Voie	DL 50 mg/Kg
Souris	I.P	434
Rat	I.M	431
	S.C	155
	Peros	≥1000
	I.P	210

Tableau 2: Dose létale 50 (DL₅₀) du carboxyatractyloside [19, 101]

Animal	Voie	DL 50 mg/Kg
Souris	I.P	9,5
Rat	I.M	2,9
	S.C	5,3
	I.P	350

Les DL 50, exprimées en poids de racine, sont variable selon le pays, la région et selon l'état de la plante, sèche ou fraîche.

Selon Balansard, la DL50 par voie orale, exprimée en poids de racine, chez la souris, est de l'ordre de **1,1 g/kg** [136].

Des études de Bye ont montré que le niveau d'ATR était de 6,7 mg/g de poids frais dans un tubercule de plante (*C. Laureola*) [77].

Il n'existe pas de données concernant les doses létales de l'atractyloside chez l'Homme, et la transposition des données animales à l'Homme ne peut être appliquée en raison de l'absence de données cinétiques relatives au volume de distribution de l'atractyloside, valeur nécessaire au calcul de la « Concentration Équivalente en Toxicité Humaine » [8].

La toxicité diffère également selon la souche de l'animal exemple chez les rats mâles entre les souches albinos et Wistar.

Chez les rats albinos l'ATR n'est toxique que pour des doses allant jusqu'à 200 mg/kg d'ATR administré par voie intrapéritonéale, tandis que chez les souches Wistar, 60 mg/kg peuvent entraîner la mort dans les 8 heures administrés par la même voie [122].

La toxicité rénale est variable selon les espèces, par exemple, les lapins et les cobayes ne présentent aucune nécrose rénale à des doses d'ATR qui sont néphrotoxiques pour les rats [123].

Les DL 50 sont variables d'une préparation à une autre, de la période de récolte, de la forme de la plante qui pourrait expliquer la différence de la réponse et la gravité de l'intoxication [32, 124, 128, 137].

Cependant, il n'y a pas d'études publiées sur la toxicité subchronique et chronique, ainsi que sur la mutagénicité et la cancérogénicité de l'ATR.

IV.4. Intoxication au chardon à glu :

IV.4.1. Epidémiologie des intoxications :

IV.4.1.1. Circonstances de l'intoxication :

La principale source d'exposition humaine à ATR ou CATR est l'utilisation de plantes comme remède ou leur prise accidentelle de la partie aérienne de *Weidelia glauca*, du rhizome d'*Atractylis gummifera* L. ou des porte-greffes de *Callilepis laureola* [32, 124].

La plupart des intoxications sont accidentelles, rarement criminelles. Elles sont, souvent, collectives, touchant plusieurs enfants d'une même famille, vivant à la campagne. Les enfants confondent la racine du chardon à glu avec d'autres plantes comestibles comme les artichauts sauvages, *Scolymus hispanicus* (« guernina ») ; ils utilisent, également, la glu sécrétée par la plante comme chewing-gum. L'évolution est le plus souvent mortelle.

IV.4.1.2. Bilan des intoxications :

A. Algérie :

- Selon le bilan du Centre Anti-Poisons d'Alger (CAP) sur la période de 1991 à 2009, le chardon à glu occupe la 1ère position parmi les plantes responsables d'intoxications. Cette plante est responsable de 81% des décès dues aux plantes, et de 15% des décès, toutes causes confondues. Les intoxications au chardon à glu sont, généralement, accidentelles (86% des cas); par curiosité chez les enfants ou suite à une thérapie traditionnelle inadéquate, mais peut-être, également, le résultat d'une prise volontaire dans un but suicidaire, et constitue 14% des cas [8].
- Le bilan du CAP d'Alger, portant sur la période de 1991 à 2002, rapporte 110 appels concernant le chardon à glu contre 867 appels relatifs à l'ensemble des plantes, soit près de 13% ; sur 46 décès imputés aux plantes, 34 (dont 32 d'enfants), sont causés par le chardon à glu, soit 74 % [9, 138].
- Une enquête, dans les régions de Sétif et de Bordj Bou-Argeridj (Est de l'Algérie), entre 1992 et 2002, place le Chardon à glu, en deuxième position des intoxications aux plantes (17,5%) [139].
- En 2014, une enquête, réalisée dans la région de Tlemcen, rapporte une fréquence d'intoxications par le Chardon à glu de 13% [140].

B. Maghreb :

- Selon Rebgui, une étude rétrospective descriptive de 241 cas d'intoxication notifiés, entre 1980 et 2007, dans la région de Fès-Boulemane, auprès du Centre Anti Poison du Maroc, a révélé une prédominance de l'intoxication au chardon à glu soit 212 cas sur la totalité des intoxications.

Les cas de décès étaient, généralement, associés à *Atractylis gummifera* L., avec un taux de létalité spécifique de 24,1%. Ceci corrobore les travaux de Bouzidi *et al.* qui rapporte un taux de létalité de 17,5% [141].

- Le Centre Anti poison et de Pharmacovigilance du Maroc (CAPM) a déclaré 3267 cas d'intoxication par les plantes, entre 2001 et 2015. Les déclarations étaient en hausse, en 2003 et en 2004, avec une recrudescence des intoxications durant la période automnale, incluant 958 cas soit 29,32 %. Le chardon à glu avec 6,39% de cas, figurait parmi les principales plantes ayant provoqué des intoxications au Maroc durant la période d'étude.

- Selon Belarbi *et al.*, sur tous les cas d'intoxication répertoriés entre 1981 et 2004 au CAPM, 240 personnes ont été hospitalisées pour une intoxication au chardon à glu, dont 72 % d'enfants de moins de 16 ans. La gravité de cette intoxication a été affirmée par une létalité intra-hospitalière importante. En effet, parmi les 182 patients pour lesquels l'évolution est connue, 98 sujets sont décédés, soit 54 % [142].

- Toujours, selon le CAPM, sur 487 cas rapportés entre 1980 et 2013, 53,8% des patients sont décédés, dont 62,2% d'enfants de moins de dix ans. Selon les mêmes données, 77,5% des décès sont attribués à un empoisonnement accidentel. Il est à noter qu'il y a, en moyenne, dix cas d'intoxication par an et 4,1 décès par an.

La plante se trouve en vente libre chez les herboristes et dans les souks. Sa consommation est caractéristique de fratrie d'enfants vivant en milieu rural, essentiellement, des bergers qui la consomment pour son goût sucré par ignorance de son danger [67].

- L'intoxication aiguë par *Atractylis gummifera* L. représente la principale cause de décès dus aux intoxications par les plantes, en particulier chez les enfants. 467 cas d'intoxication reçus au CAPM, entre janvier 1981 et décembre 2009, ont été inclus dans une étude rétrospective. 63,4 % des cas concernaient des enfants (dont, 75,5 % dus à une exposition accidentelle).
Certaines expositions avaient des visées thérapeutiques dans 18,1 % des cas ou abortives, dans 7,4 % des cas. Le taux de mortalité était de 39,2 % dont 81,1 % se sont produits chez des enfants de moins de 15 ans [143].
- En Tunisie, on a rapporté des intoxications accidentelles, souvent collectives, regroupant 21 cas touchant, principalement, des enfants d'une même fratrie.
Ces intoxications se produisent, le plus souvent, au printemps et dans une zone rurale et/ou montagneuse [11].
- Hamouda *et al.* ont recueilli, 1983 et 1998, 56 dossiers médicaux de patients admis aux soins intensifs, suite à des intoxications dues à 11 espèces de plantes. Les principales espèces impliquées étaient *A. gummifera* L. (18 cas soit 32%), *Datura stramonium* (14 cas soit 25%) et *Ricinus communis* (5 cas soit 9%).
Sur les 56 cas, 16 étaient mortels, tous sont dus au chardon à glu [143].

C. Dans le monde :

L'intoxication par les plantes occupe le 4^{ème} rang des empoisonnements et concerne beaucoup plus les enfants dans 44 % des cas concernant le chardon à glu [141].

L'intérêt porté pour ces deux glucosides est moins important en Europe du fait que les intoxications étaient généralement accidentelles, contrairement en Afrique du Nord, en Asie et en Amérique du sud où les plantes à base d'atractyloside sont utilisées en médecine traditionnelle responsable de nombreux décès empoisonnements [7, 83, 113, 146, 177, 182, 188].

IV.4.2. Symptomatologie :

L'effet toxique, dû à l'inhibition de la phosphorylation oxydative mitochondriale s'exerce surtout, dans les cellules riches en mitochondries telles que les hépatocytes et dans l'épithélium tubulaire proximal des cellules, qui contiennent des supports permettant à l'ATP de traverser la membrane cellulaire.

IV.4.2.1.Phase de latence :

Les symptômes ne débutent qu'entre 8 à 12 heures, jusqu'à 36 heures, après ingestion [51]. Dès l'apparition des symptômes, toute tentative d'élimination du toxique reste inefficace [53].

IV.4.2.2.Phase bénigne - digestive :

Les premiers symptômes sont, parfois, atypiques tels des troubles gastro-intestinaux, des nausées, des vomissements, des douleurs épigastriques, abdominales et des diarrhées [51, 124, 144].

Hamouda décrit des symptômes généraux tels l'anxiété, des maux de tête, une fatigue, une soif intense et des convulsions [145].

IV.4.2.3.Phase mortelle:

Elle se caractérise par :

- Une atteinte neurologique composée d'une aggravation du réflexe ostéo-tendineux, d'un état de somnolence, d'une mydriase bilatérale, des convulsions et une hypertonie musculaire [51,124, 146] ;
- Des troubles thermiques avec une hypothermie initiale suivie d'un état fébrile [147] ;
- Des troubles respiratoires avec une dyspnée variable d'installation progressive qui fait suite à l'encombrement bronchique [53] ;
- Des troubles cardiovasculaires avec une accélération du pouls, une irrégularité tensionnelle qui se termine, en phase terminale, par une hypotension et un collapsus [146, 147] ;
- Des troubles hématologiques avec hémorragie digestive et rénale [148] ;

- Une insuffisance rénale bénigne évoluant vers des lésions avec perturbation des paramètres biologiques aboutissant à une oligurie ou une anurie [51, 149] ;
- Une insuffisance hépatocellulaire qui peut apparaître en moins de 24 heures, un ictère cutanéomuqueux avec augmentation des enzymes hépatiques, de la bilirubine sérique et de l'ammoniaque, ainsi qu'une cholestase intra hépatique [124,150, 151] ;
- La mort peut survenir à la suite d'une grave atteinte hépatique où le malade sombre dans un coma profond [139, 152, 153].

IV.4.2.4.Aspect biologique :

Le bilan biologique montre une variation :

- De la glycémie : (hyperglycémie suivie d'une hypoglycémie) [9] ;
- Hématologique : avec un taux de prothrombine bas entre 70 à80% ;
- Hépatique : avec des taux de transaminases et phosphatase alcaline très élevées ;
- Rénale (urée et créatinine élevées) ;
- Acidose métabolique [99] et hyponatrémie sévère [10].

Ces perturbations biologiques soulignent un syndrome hépatocellulaire et rénal aigu avec anurie et une insuffisance rénale terminale [124,149].

Ces variations sont suivies par une altération de l'état général et, enfin, un coma et la mort, 4 à 5 jours, après l'ingestion [51,54].

L'examen histo-pathologique post-mortem montre :

- Un tissu gastro-intestinal hémorragique ;
- Une nécrose diffuse du parenchyme hépatique avec une diminution importante du tissu conjonctif interstitiel et une accumulation des macrophages [148] ;
- Les reins montrent un cortex avec des glomérules dont la capsule de Bowman est normale et une diminution de l'espace de filtration encombrée par une sérosité hémorragique [146,148] ;
- La biopsie rénale révèle une tubulo-néphrite ou une nécrose tubulaire avec infiltration interstitielle et une congestion rénale accompagnée de pétéchies [150].

IV.4.3. Cas cliniques :

Observation 1. Une femme de 40 ans, ayant des antécédents de troubles psychiatriques, a été traitée par sa famille avec une tisane (sud-est de l'Algérie).

Des racines de chardon à glu ont été ajoutées au un mélange d'herbes afin d'éviter le «mauvais œil». Après 5 jours de ce nouveau traitement, elle s'est plainte de vomissements ; elle est transférée, en état de coma, à l'hôpital où l'examen a révélé une hypoglycémie, une insuffisance rénale et hépatique. Elle est décédée quelques heures après son admission, en dépit d'un traitement d'hémo-dialyse [154].

Observation 2. Une fillette de 2 ans, brûlée au deuxième degré sur la fesse, a été traitée par sa grand-mère avec un cataplasme de plusieurs plantes dont des racines de chardon à glu. Les symptômes sont apparus en quelques heures: vomissements, agitation, convulsions et coma. Elle est décédée, dès son arrivée à l'hôpital (hypoglycémie, insuffisance rénale et hépatique) [154].

Observation 3. Trois frères, âgés de 9, 10 et 12 ans, ont mangé du chardon à glu, suite à une confusion avec des artichauts sauvages. Trois heures après l'ingestion, sont apparus des, vomissements, une hypoglycémie et des convulsions. 15 à 28 heures après, les trois frères ont décédé [154].

Observation 4. Un enfant de 12 ans, habitant en milieu rural, près de Rabat et fils de fermier, est admis, un soir, à 22 heures à l'hôpital, souffrant de vomissements, d'épigastalgies et de diarrhée noirâtre. Deux heures plus tard, des contractures et des mouvements anormaux sont observés, suivis d'un coma d'installation rapide (stade 2) avec un score Glasgow de 3. L'évolution a été, fort heureusement, favorable après une hospitalisation de 72 heures. Après son rétablissement, l'enfant a confirmé avoir mangé la racine de la plante en quantité indéterminée [155].

Observation 5. Un garçon, âgé de 7 ans, habitant au nord de la Tunisie, est admis, à 2 h du matin, aux urgences de l'hôpital, avec une perte de conscience, suivie de convulsions tonico-cloniques généralisées, révolutions des globes oculaires ; avec de la mousse aux lèvres, qui a duré environ 5 minutes, sans reprise d'un état de conscience normale. L'examen biologique primaire montre une hypoglycémie.

L'enfant est fébrile et comateux avec une acidose métabolique sévère. Il a été intubé, ventilé et adressé au Centre d'Assistance Médicale Urgente (CAMU). L'interrogatoire de la famille aboutit à la notion d'ingestion de chardon à glu.

Observation 6. Âgé de 5 ans et habitant au nord de la Tunisie, le sujet a été admis aux urgences suite à des vomissements, céphalées et asthénie depuis 2 jours. Un traitement symptomatique lui a été instauré. Le lendemain, des convulsions tonico-cloniques sont observées, suivies d'un coma d'installation rapide. À l'admission au CAMU, l'examen clinique montre un sujet comateux avec un score Glasgow 6/15, des pupilles en myosis, des réflexes cutanés plantaires et ostéo-tendineux abolis, une tension artérielle de 6/4 et un ictère conjonctival. L'examen biologique a montré une insuffisance hépatique avec cytolyse, une rhabdomyolyse, une hyperkaliémie et une acidose métabolique. La recherche de toxiques s'avère négative. L'interrogatoire de la famille montre la notion de disponibilité du chardon à glu à la maison (sa mère était en train de le sécher). Le patient était sous sédatifs, intubé et ventilé. L'évolution sur le plan hémodynamique est marquée par un état de choc d'origine hypovolémique avec vasoplégie et une réponse partielle au remplissage nécessitant la mise sous noradrénaline. Le décès du malade est intervenu après 7 jours d'hospitalisation dans un tableau d'état de choc réfractaire avec défaillance multi viscérale [112].

Observation 7. L'analyse des dossiers des années 1984 - 2004 a retenu le cas de quatre enfants dont deux fillettes âgées de 12 et 14 ans de la région d'Ouezzane (près de Fès) ayant succombé à l'intoxication au chardon à glu et deux garçons âgés de 11 et 12 ans de la région de Kénitra, ayant survécu et faisant partie d'un groupe de sept enfants parmi lesquels cinq sont décédés. Leur état clinique était le suivant : la première, âgée de 14 ans, était dans un coma profond de stade 2 avec un score de Glasgow de 3. Ses pupilles présentaient une mydriase bilatérale réactive. L'examen hémodynamique montrait un pouls filtrant et une tension artérielle imprenable. L'enfant est récupérée d'un premier arrêt cardiaque par massage cardiaque et injection de 0,5 mg d'adrénaline mais décède après un deuxième arrêt cardiaque cinq minutes plus tard. La seconde a présenté la même symptomatologie, trois jours après hospitalisation [156].

Observation 8. Georgiou a décrit le cas d'un garçon de 7 ans admis à l'hôpital, deux jours après avoir bu un extrait d'*Atractylis gummifera* L. pour traiter l'oxyurose. Les symptômes étaient les suivants : douleurs épigastriques, vomissements, anxiété avec aggravation de l'état du malade d'une façon progressive. En dépit du traitement, le garçon est mort, 8 jours après

son admission. En effet, les patients intoxiqués décèdent, souvent, en peu de temps, à l'hôpital où leurs bilans biologiques ne sont pas toujours effectués[125].

Observation 9. Bien que le Centre d'information toxicologique de Madrid ne dispose d'aucune information sur les intoxications à l'*Atractylis gummifera* L., depuis 1991, une intoxication mortelle est survenue à Badajoz, en novembre 2002. La patiente était une femme de 45 ans de la ville de Badajoz, et après 33 jours, elle décède à l'hôpital. Selon l'autopsie, elle est morte suite à une défaillance multi organique avec des symptômes, très probablement, dus à l'ingestion du chardon à glu. Aucune donnée n'a été fournie sur les circonstances de l'intoxication [157].

Observation 10. En 1983 et 1984, cinq personnes ont été, gravement, empoisonnées, à Badajoz (Espagne) et l'une d'elles est décédée, dans un tableau d'insuffisance hépato-rénale. Elles suivaient un traitement populaire, à base de racine de chardon à glu, contre des maladies gastriques [158].

Observation 11. Toujours en Espagne, cinq personnes ont été empoisonnées après avoir pris une infusion d'*Atractylis gummifera* L. Les malades ont présenté une atteinte hépatique étendue et une atteinte rénale. L'un des patients est mort après hémorragie gastro-intestinale mais les quatre autres ont survécu après dialyse. Une hyperleucocytose a été observée dans certains cas [146].

Observation 12. Madani décrit le cas d'une intoxication volontaire, chez une femme enceinte de 24 semaines, par l'ingestion massive de glu d'*Atractylis gummifera* L. ; suite à une prise en charge rapide, l'évolution a été favorable. La quantité ingérée n'a pas été mentionnée l'intoxication par le chardon à glu chez la femme enceinte n'a jamais été rapportée dans la littérature. L'évolution favorable de la patiente et de son nouveau-né n'exclut pas la survenue de lésions fœtales qui pourraient avoir régressé au cours de son développement intra-utérin [159].

Ces différents cas cliniques observés montrent que l'intoxication au chardon à glu est le plus souvent mortelle et que la symptomatologie n'est pas toujours révélatrice d'une intoxication par les plantes. La symptomatologie est dominée par des vomissements, des convulsions et un dysfonctionnement hépato-rénal aboutissant à un coma. L'hypoglycémie irréversible reste un biomarqueur de taille lors d'une intoxication au chardon à glu [112, 117].

IV.5. Traitement :

Actuellement, aucun traitement spécifique de l'intoxication par l'*Atractylis gummifera* L. n'est disponible; toutes les approches thérapeutiques sont, uniquement, symptomatiques.

Un traitement symptomatique palliatif est souvent mis en œuvre par le remplacement des fluides et des électrolytes, le soutien cardiovasculaire et respiratoire, le contrôle des crises et le rétablissement de la fonction rénale.

Certains auteurs préconisent d'inclure l'induction de vomissements, l'évacuation intestinale, le lavage gastrique et l'administration de charbon activé [11].

Ces mesures s'avèrent, le plus souvent, inefficaces en raison de la longueur des délais entre l'ingestion et la prise en charge thérapeutique.

Dans le but de développer de meilleurs traitements, suite à une intoxication à *Atractylis gummifera* L., divers composés ont été évalués.

- Catanzano *et al.* ont montré l'inefficacité de l'hydrocortisone (500 et 25 mg par I.V) administrée à deux enfants empoisonnés au chardon à glu [146].
- Des expériences, *in vivo*, réalisées chez le chien, ont démontré l'efficacité d'un cocktail administré, par voie intraveineuse, de 100 mL d'une solution contenant 6 à 7% de glucose, 0,1% de dinitrophénol, 5 mg d'ATP et 11,25 mg de cytochrome C, suite à une intoxication induite par un extrait d'*Atractylis gummifera* L. dans une solution saline. Ce traitement a corrigé l'hypoglycémie, l'hypotension et l'anurie et a retardé le décès, uniquement, en cas d'administration immédiate après l'extrait [160].
- Ishii a étudié l'activité protectrice du stéviolside, un glycoside isolé de la plante *Stevia rebaudiana*, contre la toxicité hépatique induite par l'ATR. Le stéviolside inhiberait l'action de l'ATR sur la glycolyse, la glycogénolyse, la néoglucogenèse et la captation cellulaire. Le site d'action serait le milieu extracellulaire où le stéviolside interfère avec le transport d'ATR à travers la membrane cellulaire. Le stéviolside a induit, dans le foie de rat perfusé isolé, une diminution des effets de l'ATR [161].

- D'autres molécules à effet cytoprotecteur, contre la toxicité de l'ATR, ont, également, été étudiées : le Vérapamil (VRP) et le dithiothréitol (DTT).

Le DTT, est un agent réducteur sulfhydrile et un chélateur des métaux, il réduit la double liaison méthylène de l'ATR, sachant que ce groupement est très réactif. Il protège contre le blocage de la néoglucogénèse et l'effondrement du GSH dans les reins, mais n'exerce aucun effet protecteur contre la déplétion du GSH et de l'ATP dans les tranches de foie.

Quant au Vérapamil, bloqueur des canaux calciques, il provoque une inhibition de la gluconéogénèse induite par l'ATR et un blocage de la déplétion de l'ATP. Il fournit une protection contre l'épuisement induit par l'ATR des GSHs dans les tranches de foie mais pas dans les tranches de rein.

Le Vérapamil et le dithiothréitol n'exercent d'effet protecteur que lorsqu'ils sont administrés 30 ou 60 minutes avant l'exposition à l'ATR. De ce fait, ils ne présentent aucun intérêt thérapeutique [162].

- Obatomi a étudié le rôle protecteur de la calpaïne (IPC), du stéviósíde et du probénécióde contre la toxicité induite par l'ATR, dans le cortex rénal du rat. L'IPC et le stéviósíde ont empêché l'effondrement de l'ATP et la réduction de la gluconéogénèse, alors que le probénécióde n'offrait aucune protection [163].
- Haouzi et *al.* ont montré, par des tests *in vivo* et *in vitro*, que la perméabilité de l'ATR est contrecarrée par la cyclosporine A (CsA). Elle a inhibé la nécrose et l'apoptose induites par l'ATR sur des cellules hépatiques humaines, en présence d'un précurseur, le « GSH ». La N-acétylcystéine (NAC) réduit, uniquement, l'effet cytotoxique de l'ATR [101].

La recherche actuelle explore, également, la voie de l'immunothérapie ; quelques études ont, déjà, été mises en place pour essayer de produire des fragments Fab polyclonaux, dans les intoxications par les plantes renfermant de la colchicine et des glycosides cardiaques (laurier rose : *Nerium oleander* ; thévétia : *Thevetia pruviana*) [143].

Cette nouvelle approche pourrait s'appliquer à l'intoxication par l'atractyloside. Une étude, réalisée en Tunisie, a tenté de produire des fragments Fab polyclonaux contre les composants toxiques d'*Atractylis gummifera* L. [37].

CHAPITRE V :
IDENTIFICATION BOTANIQUE ET
ANALYSE TOXICOLOGIQUE

La méconnaissance, par les cliniciens, de l'intoxication par les plantes et, dans notre cas, par le chardon à glu, l'évolution rapide et variable de la symptomatologie sont à l'origine de problèmes posés à la prise en charge thérapeutique. La mise en évidence de l'agent responsable avec l'identification de la plante et/ou des principes actifs toxiques « ATR-CATR » devient, dans ces conditions, primordiale [14].

V.1. Identification botanique :

V.1.1. Examen macroscopique de la plante entière

V.1.1.1. Partie aérienne :

L'analyse macroscopique de la partie aérienne de l'échantillon responsable de l'intoxication, permet de révéler les caractères d'une plante herbacée acaule, à tige inapparente (figure 27).



Figure 27: Aspect général d'*Atractylis gummifera* L. en hiver

L'aspect général d'*Atractylis gummifera* L. peut rappeler celui d'autres plantes, surtout quand celles-ci sont jeunes, notamment, par la disposition des feuilles en rosettes ; ce qui peut induire des confusions (figure 28).



Scolymus hispanicus L.

Cynara humilis L.

Figure28: Plantes à l'origine de confusion avec le Chardon à glu.

Cependant, ces plantes se différencient de l'*Atractylis gummifera* L. par certains caractères :

- La tige des espèces *Scolymus hispanicus* L. et *Cynara humilis* L., est dressée.
- L'aspect et la couleur des fleurs : Elles sont ligulées, jaunes pour *Scolymus hispanicus* L. et tubulées, bleu violet pour *Cynara humilis* L.
- **Feuille:** Les feuilles d'*Atractylis gummifera* L. sont basiliaires de couleur verte, lancéolées, longues, disposées en rosette (Figure 29), étalées sur le sol, à lobes dentés piquants ; elles sont plus ou moins aranéeuses et atténuées en pétiole engainant à la base ; elles présentent une nervure centrale très marquée (Figure 30).



Figure 29: Feuilles d'*Atractylis gummifera* L.



Figure 30: Feuilles d'*Atractylis gummifera* L. en rosette

Les espèces *Scolymus hispanicus* L., et *Cynara humilis* L., présentent une nervure médiane blanchâtre très claire (figure 31).



Scolymus hispanicus L.

Cynara humilis L.

Figure31: Feuilles des espèces à l'origine de la confusion avec le Chardon à glu.

- **Fleurs :**

Les fleurs desséchées d'*Atractylis gummifera* L. sont disposées en capitules, entourés de bractées épineuses (figure 32).



Figure 32: Capitule floral desséché d'*Atractylis gummifera* L.

V.1.1.2. Partie souterraine :

- Il s'agit d'un rhizome pivotant, charnu et très volumineux (figure 33).



Figure 33: Rhizome pivotant d'*Atractylis gummifera* L.

- On note la présence de nombreuses ramifications rampantes superficielles plus ou moins obliques (Figure 34).



Figure 34: Ramifications rampantes. Rhizome d'*Atractylis gummifera* L.

- Des rameaux plus minces revêtus de feuilles squameuses brunes et une rosette de vraies feuilles, au sommet de ces dernières ramifications.

V.1.2. Identification des débris :

Lors d'une intoxication, il arrive de rechercher et d'identifier des débris de la plante dans les vomis et le lavage gastrique.

V.2. Analyse toxicologique du végétal et des milieux biologiques :

V.2.1. Techniques d'extraction :

De nombreuses méthodes d'extraction, à partir de la plante ainsi que des milieux biologiques, ont été proposées afin d'isoler les principes actifs, ATR et CATR.

Des techniques d'extraction des principes, à partir de la plante ou du lyophilisat, à froid ou à chaud ont été proposées [38, 113].

- Tocco, a réalisé une extraction aqueuse de l'ATR, au Bain Marie bouillant.
- Danieli a isolé le CATR, par une extraction ménagée, à 40°C, en milieu acétonique [38].

Dans un deuxième temps, les principes actifs sont solubilisés dans de l'éthanol à 56°, à chaud puis cristallisés dans l'alcool à 85°.

- Calmes *et al.* a réalisé une extraction liquide sur un lyophilisat de plante fraîche, avec un mélange eau-méthanol, sous reflux, pendant 30 minutes. Après filtration, le volume est évaporé à sec puis repris avec le solvant d'extraction pour une identification qualitative et/ou quantitative [163].
- Gaillard a développé, à partir des milieux biologiques, un protocole d'extraction liquide-liquide. A 1 mL du sang total, on ajoute 1 mL d'acétone pour précipiter les protéines. Après agitation, pendant 1 minute et centrifugation, le surnageant est transféré dans un autre tube auquel on ajoute 3 mL de chloroforme [164].

Après élimination des graisses dans la phase acétone-chloroforme et centrifugation, la phase aqueuse supérieure limpide est récupérée pour être évaporée à sec, sous jet d'azote, à 90°C. Le résidu est repris par 40 µl d'un mélange acétonitrile-eau (50 :50, v/v) et agité, pendant 20 secondes.

L'extrait est, ensuite, centrifugé, à 7500 tours/min, pendant 3 minutes ; Le volume d'injection, dans le système chromatographique est de 20 µL.

- Steenkamp a mis en oeuvre de nouvelles techniques d'extraction en phase solide (SPE), utilisant des cartouches remplies de silice, greffée par une chaîne carbonée (C18) [165]. Ces techniques ont permis d'extraire l'ATR à partir de la racine et, également, du sang, des urines et des viscères [10].

Ces techniques très pratiques se sont révélées plus rapides et plus performantes pour l'isolement de l'atractyloside et du carboxyatractyloside.

V.2.2. Recherche et identification :

V.2.2.1. Détection chimique :

Diverses réactions de coloration ont été proposées. Elles sont pratiquées, à froid ou à chaud.

- En milieu sulfurique, la solution de glucoside se colore en rouge-brun (**Réactif de Lefranc**). Abandonnée à l'air libre, cette solution dégage une forte odeur d'acide valérianique et sa coloration vire du rouge au violet.
- L'addition de réactif sulfo-formolé (**Réactif de Marquis**) à la solution de glucoside, en milieu sulfurique, engendre l'apparition d'une coloration violette qui vire au violet lilas.
- L'addition de réactif sulfo-molybdique (**Réactif de Froedhe**) à la solution de glucoside entraîne l'apparition d'une couleur jaune orangé à violette stable et persistante.
- L'addition de **résorcine**, en milieu alcalin, à une solution alcoolique d'atractyloside fait apparaître une coloration verte, mais les teintes produites manquent d'intensité. Ce test ne peut être retenu que comme un élément complémentaire d'identification.
- L'addition de p-diméthylaminobenzaldéhyde (**P.D.A.B**) à la solution de glucoside, en milieu sulfurique, entraîne l'apparition d'une coloration violette. Cette réaction permet de déceler des quantités d'hétéroside de l'ordre de 1 µg. C'est la plus sensible des réactions.

V.2.2.2. Détection chromatographique sur couche mince (CCM) :

Différents systèmes CCM, sur gel de silice, ont été utilisés, en faisant appel à différents solvants de migration. Le tableau 3 résume les résultats obtenus à travers les rapports frontaux (Rf).

Tableau 3: Chromatographie CCM des glycosides du chardon à glu. Solvants de migration. Rapports frontaux (Rf)

Système solvant	Mélange (V/V)	Rf
Propanol-acide acétique-eau	5-1-5	0,86
Propanol-acide acétique-éthanol	45-5-5	0,45
Butanol-acide acétique	50-10	0,49
Butanol-acide acétique-éthanol	45-5-5	0,43
Benzène- Butanone-éthanol-eau	30-30-30-10	0,68

Les meilleures séparations sont réalisées avec le mélange butanol-acide acétique [136].

Selon le type de révélateur employé, les taches colorées apparaissent soit à température ambiante, ou après chauffage à l'étuve ; certaines sont fluorescentes en lumière Ultra-violette [136, 166].

❖ Colorations obtenues à froid :

La couleur et la fluorescence des taches doivent être examinées immédiatement après avoir traité les dépôts d'atractyloside par les réactifs, précédemment, présentés (paragraphe VI.2.2.1.).

❖ Colorations obtenues à chaud :

Les dépôts d'atractyloside sont soumis à l'action de divers réactifs à base de phénols ou d'aldéhydes aromatiques. Après pulvérisation, les plaques sont maintenues, pendant 5 minutes, à l'étuve à 150°C. Une fois refroidies, elles sont examinées en lumière visible ou ultraviolette (tableau 4).

Tableau 4: Réactions de caractérisation de l'ATR à chaud

Révéléateur	Coloration	Sensibilité (µg d'ATR)
Pyrocatechol	Rose	3
Résorcine	Mauve pale	1
Furfurol	Rose	1
Aldéhyde anisique	Rose violacé	1
Vanilline	Rose violacé	1
PDAB	Violet franc	1

Le para-diméthyle-amino-benzaldéhyde constitue l'un des révélateurs les plus sensibles ; il donne une coloration stable qui persiste, pendant plusieurs semaines, quand les plaques sont conservées, à l'abri de l'air et à l'obscurité [167, 168].

V.2.3. Méthodes de dosage :

V.2.3.1. Spectrophotométrie UV/Visible :

Cette méthode, dite à l'anthrone, est basée sur le dosage des sucres, provenant des glycosides de la plante. C'est une méthode colorimétrique basée sur la déshydratation intramoléculaire des oses en milieu acide (H₂SO₄). Les dérivés du furfural obtenus se condensent avec l'anthrone pour donner un complexe coloré de couleur violette, qui absorbe à 410nm. Le principe de cette méthode a été validé selon ICH.

La méthode permet de doser de l'atractyloside dans le plasma(ATR) et du carboxyatractyloside (CATR) dans les racines du chardon à glu.

La limite de détection est de 93 µg/mL et la limite de quantification est de 310 µg / mL [169].

V.2.3.2. Chromatographie liquide haute performance (HPLC) :

Plusieurs méthodes de chromatographie liquide haute performance couplées à différents détecteurs (détecteur à lumière dispersée, spectrométrie de masse) ont été développées pour le dosage de l'atractyloside, à partir de la plante et des milieux biologiques.

A. Techniques HPLC-UV :

La première technique, qui fut développée par Calmes, utilise un détecteur à lumière dispersée. Il s'agit d'une chromatographie en phase inverse pour l'identification de l'atractyloside et du carboxyatractyloside dans un extrait méthanolique de racines fraîches d'*Atractylis gummifera* L. La séparation a été obtenue, en 55 minutes, en utilisant, comme phase mobile, un mélange eau-acétonitrile en mode gradient et en présence d'acide trifluoroacétique. La limite de détection de cette technique est de 9 µg d'atractyloside [170].

Riu a obtenu les mêmes résultats mais avec un temps de séparation plus court, de 22 minutes [171].

B. Techniques HPLC-MS (spectrométrie de masse) :

Les techniques HPLC couplées à la spectrométrie de masse, sont beaucoup plus sensibles.

- Steenkamp *et al.* A rapporté une méthode de dosage par HPLC-MS, en employant une phase mobile constituée d'un tampon formiate d'ammonium 10 mM, de méthanol et d'acétonitrile en mode gradient et une phase stationnaire du type Waters Xterra Phenyl 300 mm x2.1 mm, 3 µm. La linéarité était de 100 ng/mL à 10.000 ng/mL [165].
- Une méthode analytique sélective, basée sur la HPLC couplée à un spectromètre de masse à ionisation de pression atmosphérique, a été développée, par Steenkamp, pour la détection de l'ATR. Les limites de détection et de quantification de l'ATR étaient, respectivement, de 100 pg/mL et 250 pg/mL [165, 172].
- Une méthode générale de dosage, par LC-MS/MS, des principaux toxiques végétaux, au niveau sanguin, a été mise au point par Gaillard. La séparation est réalisée en phase inverse, sur une colonne C18 de 150 mm, en utilisant un tampon de formiate d'ammonium à pH=3 et un gradient d'éluion avec de l'acétonitrile. La détection des ions est, généralement, réalisée en mode négatif, Les ions sélectionnés pour le dosage de l'atractyloside sont : $m/z = 725.4; 645.1; 343.2; 322.4$ [164].
- D'autres auteurs se sont basés sur les travaux de Gaillard, tels Zaim et Romeuf, en réduisant le temps de résolution et en augmentant la sensibilité de quantification dans les extraits de plante [164, 173].
- Jeremy *et al.* ont rapporté une technique par HPLC-SM/SM, dosant l'ATR et le CATR, dans le sang total avec des limites de quantification de 0,17 et 0,15 µg / L, respectivement, pour l'ATR et la CATR. Le dosage a été réalisé sur un échantillon issu d'une intoxication non mortelle. L'ATR et le CATR ont été quantifiés par la même méthode dans les racines et les valeurs étaient de 3,7 et 5,4 mg / g respectivement [174].

- Lors d'une expertise post-mortum, on a retrouvé, dans le sang 883,1 $\mu\text{g} / \text{L}$ d'ATR et 119,0 $\mu\text{g} / \text{L}$ de CATR. dans les urines, les concentrations étaient de 230,4 $\mu\text{g} / \text{L}$ d'ATR et 140,3 $\mu\text{g} / \text{L}$ de CATR [175].
- Dans le cadre d'une étude pharmacocinétique, chez le rat, une technique HPLC-SM/SM a permis de quantifier, simultanément, les concentrations plasmatiques d'attractyloside et de carboxyattractyloside. Après précipitation des protéines, les analytes ont été séparés par chromatographie, sur une colonne ZORBAX Eclipse Plus (2,1 x 150 mm id, 5 μm) sous élution par gradient. Dans le mode d'ionisation par électropulvérisation négative, les transitions étaient à m / z 725,3 \rightarrow 645,4 pour l'attractyloside, m / z 769,3 \rightarrow 689,4 pour le carboxyattractyloside et m / z 479,2 \rightarrow 121,1 pour la paeoniflorine (l'étalon interne). La linéarité était de 1 à 500 ng/mL pour l'attractyloside et de 2 à 500 ng/mL pour le carboxyattractyloside. Les rendements d'extraction étaient supérieurs à 85,0 % [176].

VI.2.3.3. Chromatographie en phase gazeuse (CG) :

Les techniques en phase gazeuse sont, généralement, surclassées par celles opérées en phase liquide en raison de la simplicité et la sensibilité de ces dernières, dans le dosage de ces glycosides.

En effet, compte tenu des détecteurs employés, une dérivation suivant la fonction chimique, est nécessaire. Une silylation de toutes les fonctions de la molécule, dans un premier temps, suivie, dans un second temps, de l'acétylation des fonctions alcools et une silylation des sulfates et acides, ont été mises en œuvre pour étudier certains hétérosides [177].

Une méthode par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) a été développée pour la détection de l'attractyloside, au niveau des liquides de lavage gastrique et des extraits de racine, avec une limite de détection de 36 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [178].

VI.2.3.4. Autres méthodes :

Les deux composés, ATR et CATR peuvent être séparés par électrophorèse, par chromatographie sur couche mince et par partage entre l'eau et les solvants organiques. L'électrophorèse sur papier permet de caractériser, facilement, l'atractyloside, mais les résultats obtenus ne sont pas, suffisamment, précis.

En milieu légèrement acide, l'ATR est extractible par le butanol et le CATR reste en solution dans l'eau. Les deux composés peuvent, également, être séparés par chromatographie sur colonne d'alumine. La mauvaise séparation du principe toxique dans le milieu biologique a causé l'abandon de cette technique [179, 180].

Une technique immuno-enzymatique ELISA par compétition a été développée par Bye *et al.* qui ont utilisé un antisérum anti-atractyloside, couplé à une protéine. Cette technique était sujette à des réserves quant à l'exactitude des résultats [181].

PARTIE PRATIQUE

Objectifs du travail :

L'objectif principal est une évaluation du degré de toxicité de l'ATR par des études :

- In vivo pour déterminer la DL50 chez la souris et d'étudier le profil cinétique de notre molécule chez le rat ;
- In vitro pour évaluer le stress oxydatif (GSH, MDA et catalase) sur trois souches cellulaires (cellule RD, HEP2 et A549).

Il est nécessaire de mettre en pratique les objectifs secondaires qui sont : la validation de la méthode analytique qui servira à l'étude du profil cinétique et la détermination de la forme libre.

CHAPITRE I :

DOSAGE DE L'ATRACTYLOSIDE SERIQUE

PAR HPLC

I.1. Matériels et méthodes:

I.1.1. Matériels :

- Le système de chromatographie liquide haute performance utilisé était le modèle **Waters2695**. La détection a été faite avec le détecteur UV-Visible **Waters 2489** HPLC disponible au niveau du laboratoire national de contrôle des produits pharmaceutiques (LNCPP).
- Balance analytique 0,1 mg Kern Als 220-4N ;
- pH mètre Hanna ;
- Centrifugeuse Sigma 2-16PK ;
- Vortex multirax Heidolph ;
- Dispositif de filtration Buchner avec pompe type ILMAC ;
- Vial pour HPLC 1,5 mL ;
- Inserts en verre ;
- Filtre en acétate de cellulose 0,45 micronmètre ;
- Tubes en verre de 5 mL pour extraction ;
- Tubes en plastique de 5mL pour déprotéinisation.

Réactifs chimiques :

- Atractyloside produit pur 99% : SIGMA ALDRICH, lot N° 102130.43-8 ;
- Phosphate de potassium (KH_2PO_4) : SUPELCO N°231-913-4;
- Acide trifluoroacétique : VWR BDH chemical N° 200-929-3 ;
- Acétonitrile grade HPLC SIGMA ALDRICH N° 200-835-2 ;
- Acétone : GPR PECTAPUR, lot N° 13C280512 ;
- Chloroforme : SCHARLAU, lot N° 13076906 ;
- Eau pure.

Matière biologique:

Les poches de plasma frais congelé ont été fournies par le centre de transfusion sanguine de l'hôpital de Bab El Oued.

I.1.2. Méthodes :

I.1.2.1. Préparation des solutions :

- Solution mère d'atractyloside à 1mg/mL.

Atractyloside 10 mg.

Eau distillée / Acétonitrile (V/V) qsp... 10 mL.

- Solution de phosphate de potassium (KH₂PO₄) à 100 µM:

KH₂PO₄ 1,36 g.

Eau distillée qsp..... 1000 mL.

- Tampon phosphate (pH = 3,8):

○ KH₂PO₄ (100 µM)

○ Acide trifluoroacétique (TFA) : 0,25%

- Phase mobile :

Tampon phosphate (phase A) - Acétonitrile (phase B) : mode gradient (70/ 30) (V/V).

I.1.2.2. Préparation des standards:

Au cours des différentes étapes de la validation, les standards d'étalonnage, les standards de validation (contrôles de qualité) ont été préparés dans la même matrice biologique (sérum) que celle des échantillons à analyser.

A partir de la solution mère de l'atractyloside à 1 mg/mL, nous avons préparé les dilutions suivantes (Tableau 5 et 6):

Tableau 5: Préparation des standards d'étalonnage (points de calibration)

Concentrations (µg/mL)	0	10	20	40	60	80	100
Volume prélevé de la solution mère 1 mg/mL (µL)	0	50	100	200	300	400	500
Sérum qsp (mL)	5						

Tableau 6: Préparation des standards de validation (points de contrôle)

Concentrations des contrôles	LIQ	CQI	CQM	CQS
Volume prélevé de la solution mère 1 mg/mL (µL)	50	150	225	375
Sérum qsp (mL)	5			
LIQ : Limite inférieure de quantification (10 µg/mL) CQI : Contrôle de qualité inférieur (3 * LIQ = 30 µg/mL) CQM : Concentration médiane de l'intervalle de dosage (45 µg/mL) CQS : Concentration proche du seuil supérieur de l'intervalle de dosage (75 µg/mL)				

I.1.2.3. Prétraitement de l'échantillon :

Tous les échantillons, les standards d'étalonnage ainsi que les standards de validation ont subi les mêmes étapes de traitement et de dosage.

Précipitation des protéines:

- 500 µL de sérum ;
- Ajouter 500 µL d'acétone ;
- Mélanger au vortex pendant 1 minute.
- Centrifuger pendant 5 minutes à 4000 tr/min.

Extraction liquide - liquide:

- Récupérer le surnageant ;
- Ajouter 1,5 µL de chloroforme ;
- Mélanger au vortex pendant 5 minutes ;
- Centrifuger pendant 5 minutes à 4000 tr/min ;
- Injecter 50 µL du surnageant.

I.1.2.4. Conditions chromatographiques:

Les conditions opératoires nécessaires à l'identification et à la quantification de l'atractyloside sont résumées dans le tableau 7.

Tableau 7: Conditions chromatographiques.

Paramètres	Description
Colonne	C ₈ (150 x 4,6 mm – 5 µm)
Phase mobile	Acétonitrile / Tampon phosphate (100 µM): (30/70)
Mode	Gradient
Débit	1 mL/min
Détection	UV à 200 nm
Température de la colonne	30 °C
Temps d'analyse de préférence	20 min
Volume injecté	50 L

I.2. Validation analytique de la méthode de dosage de l'atractyloside:

Le dosage de l'atractyloside présent dans le matériel végétal a toujours été problématique.

Différentes méthodes ont été décrites pour caractériser et déterminer l'ATR dans différents échantillons de plantes.

Steenkamp et ses collaborateurs [84] ont développé une méthode basée sur l'HPLC couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-ESI-MS). Cette méthode est très sensible et capable de détecter l'ATR dans le matériel végétal frais aussi bien que dans les échantillons lyophilisés.

Calmes et ses collaborateurs [78] ont développé la méthode HPLC pour déterminer à la fois l'ATR et le carboxyatractyloside(CATR), à partir du même échantillon de racine de l'*Atractylis gummifera* L.

Nous avons utilisé cette technique de Calmes pour déterminer l'Atractyloside dans un milieu biologique « le sérum ».

Pendant l'analyse, la spécificité, la linéarité, l'exactitude et la précision ont été évalué de la même façon que la limite de détection et la limite de quantification.

Afin d'évaluer les performances de la méthode de dosage, deux types d'échantillons ont été préparés. Il s'agissait des standards d'étalonnage et de validation. Ces échantillons ont été obtenus en chargeant du sérum à partir d'une solution mère d'atractyloside à **1 mg/ml**. La validation s'est déroulée sur **trois jours**, avec **six** standards d'étalonnage et trois niveaux de standards de validation avec la limite de quantification inférieure selon les recommandations de la SFSTP.

Dans notre validation:

- Nous avons fait Six répétitions par niveau de concentration ;
- Avec Quatre niveaux de concentration (10- 30- 45 et 75 µg/ml) ;
- Et Trois séries de mesures (trois jours) ont été réalisées.

I.2.1. Rendement d'extraction :

Le rendement d'extraction relatif est obtenu en calculant le rapport des signaux mesurés, d'une part, d'un échantillon chargé avec une quantité connue puis extrait (**Aire avant extraction**) et d'autre part, d'un échantillon extrait puis chargé (**Aire après extraction**) de la même quantité de l'atractyloside.

$$R(\%) = (\text{Aire avant extraction}) / (\text{Aire après extraction}) \times 100$$

Nous avons calculé le pourcentage de récupération pour quatre (04) niveaux de concentrations.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 8.

Tableau 8: Etude du rendement de l'extraction de l'atractyloside

Concentration (µg/mL)	Aire avant extraction	Aire après extraction	Rendement (%)
10	178424	276785	71,69
20	357603	553570	70,02
40	728583	1210465	73,41
80	1458566	2420931	70,57
Moyenne du rendement	71,42%		

Les valeurs obtenues varient entre 70,02 et 73,41% (moyenne : 71,42%) et sont jugées satisfaisantes.

I.2.2. Spécificité :

La spécificité est la capacité d'une procédure de permettre une évaluation univoque de l'analyte en présence de composés susceptibles d'être présent (impuretés, produits de dégradation, matrice,.....).

Dans le but de vérifier la spécificité, nous avons analysé six (6) différents échantillons plasmatiques blancs d'origines différentes.

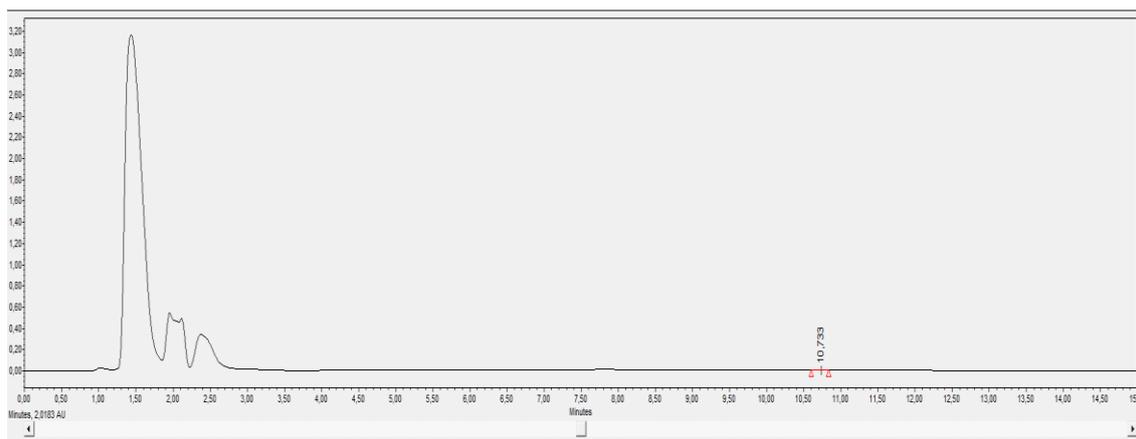


Figure 35: Chromatogramme d'un blanc matrice

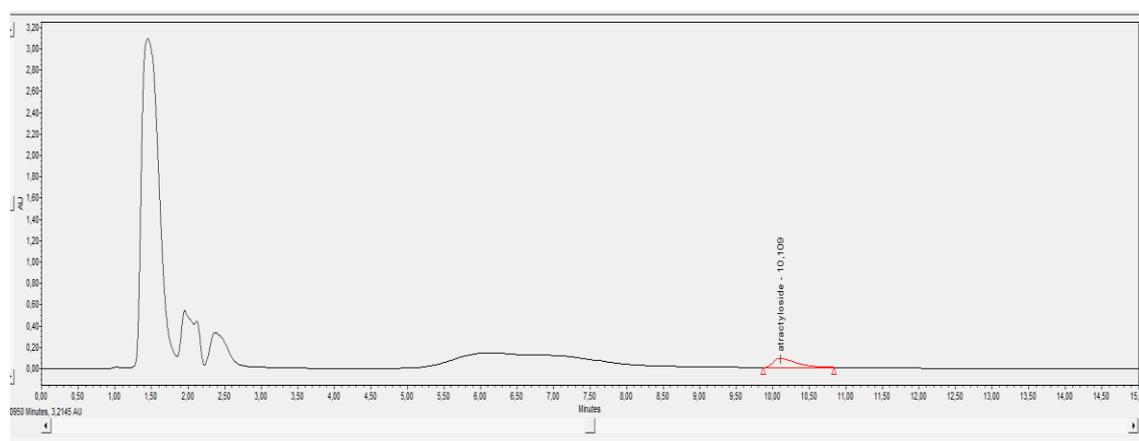


Figure 36: Chromatogramme de l'Atractyloside à 100 µg/mL

L'injection du standard montre uniquement un seul pic correspondant à l'ATR avec un temps de rétention T_r de 10 minutes qui est le même que celui de l'ATR de référence ce qui confirme l'aspect qualitatif (identification) (Figure 36).

L'injection du blanc ne montre aucun pic à ce temps de rétention (Figure 35).

1.2.3. Linéarité :

Premier jour :

Le tableau N°9 et la figure N°37 présentent les résultats de la gamme étalon obtenus le premier jour.

Tableau 9: Résultats des aires des pics J1

C µg/mL	Aire du pic
10	89212
20	178801
40	364291
60	546602
80	729283
100	916974

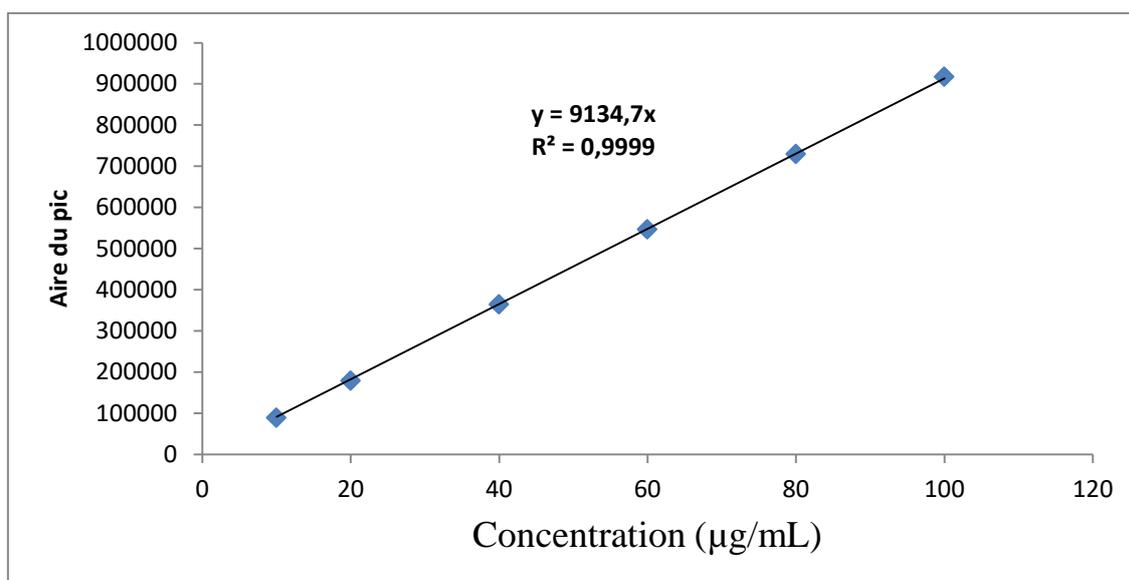


Figure 37: Courbe d'étalonnage du premier jour (J1)

Deuxième jour :

Le tableau N°10 et la figure N°38 affichent les résultats de la gamme étalon obtenus le deuxième jour

Tableau 10: Résultats des aires des pics J2

C µg/mL	Aire du pic
10	86241
20	178516
40	341931
60	524887
80	732917
100	926586

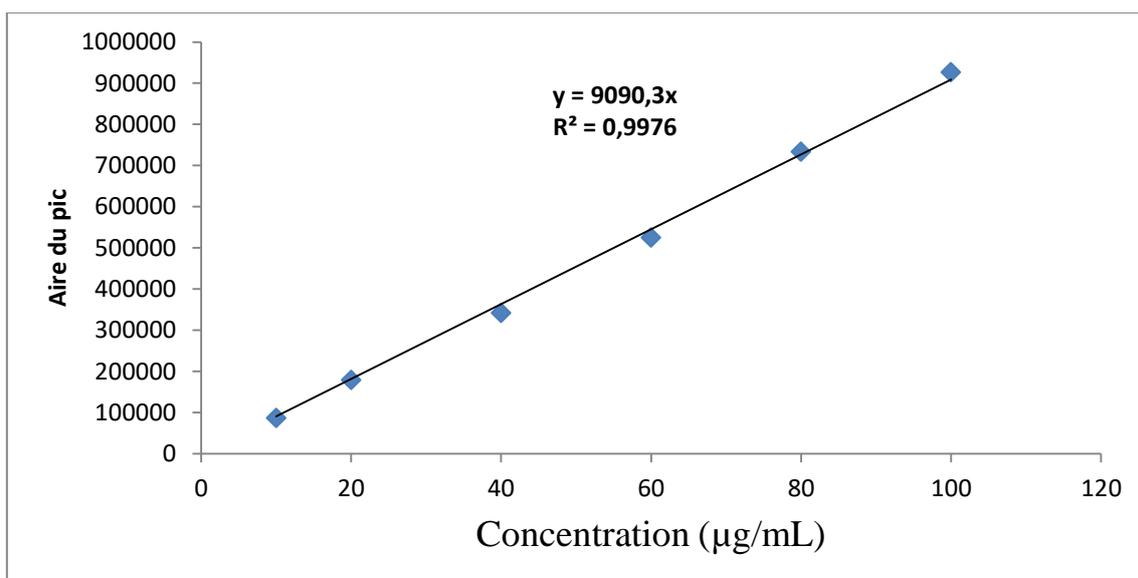


Figure 38: Courbe d'étalonnage du deuxième jour(J2)

Troisième jour :

Le tableau N° 11 et la figure N°39 affichent les résultats de la gamme étalon obtenus le troisième jour.

Tableau 11: Résultats des aires des pics J3

C µg/ml	Aire du pic
10	75043
20	170504
40	348201
60	532473
80	730937
100	943430

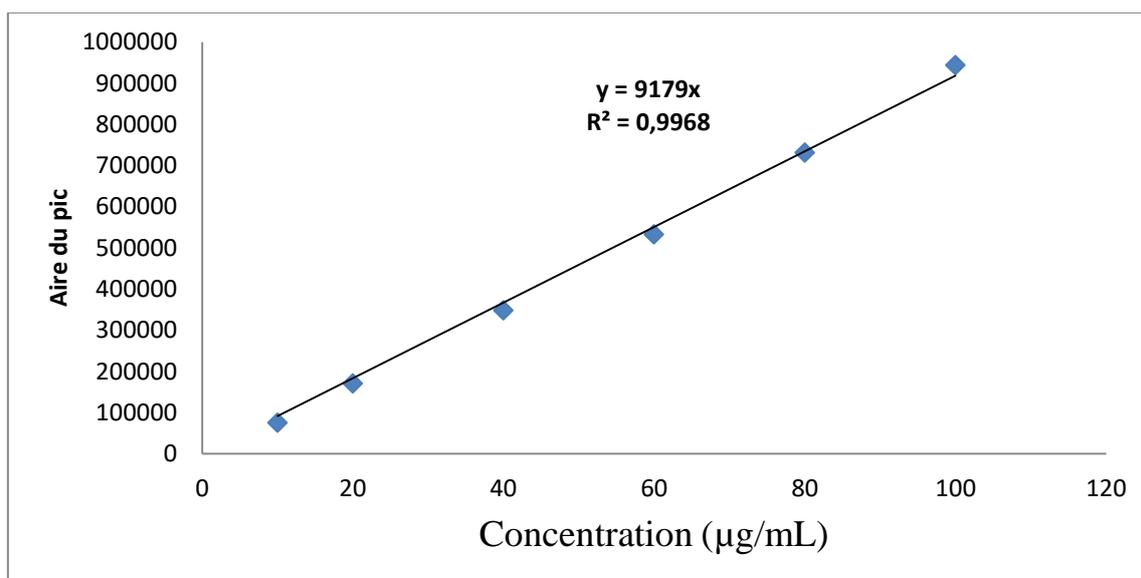


Figure 39: Courbe d'étalonnage du troisième jour (J3)

La comparaison des trois courbes d'étalonnage est résumée dans le tableau N° 12.

Tableau 12: Gammes étalon. Pentes et coefficients de corrélation des trois jours

	Premier jour	Deuxième jour	Troisième jour
Coefficient de détermination (R^2)	0,9999	0,9976	0,9968
Coefficient de corrélation (r)	0,9999	0,9988	0,9984
Pente	9134,7	9090,3	9179

La figure suivante regroupe les trois courbes d'étalonnage.

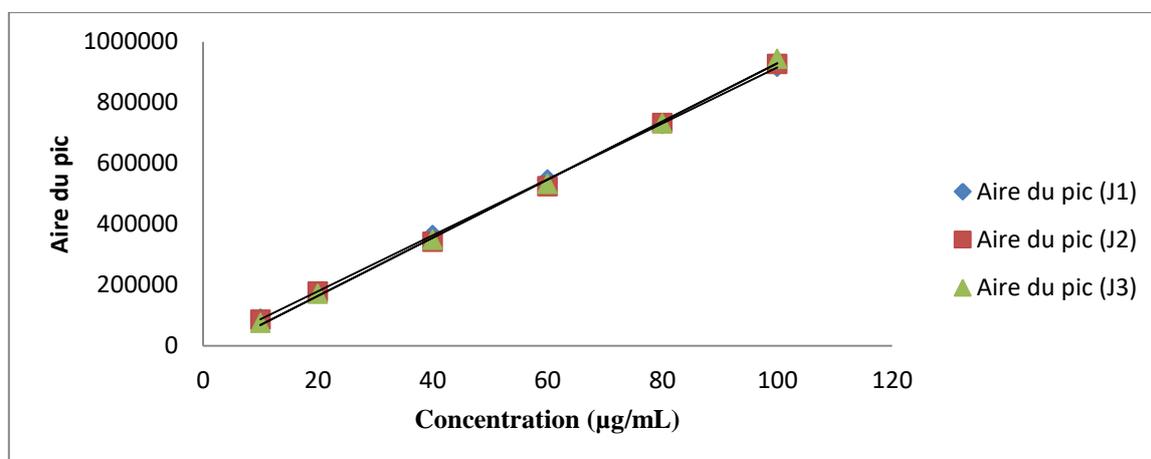


Figure 40: Courbes d'étalonnage : J1-J2-J3

Le test de student ($p = 0,546 > 0,05$) montre qu'il n'y a pas de différence significative entre les courbes de trois jours.

Nous avons établi une courbe moyenne des trois jours de calibration (tableau N°13 et figure N°41).

Tableau 13: Gamme étalon moyenne des 3 jours de calibration

Concentrations ($\mu\text{g/mL}$)	Aire du pic
10	83498,67
20	175940,33
40	351474,33
60	534654,00
80	731045,67
100	928996,67

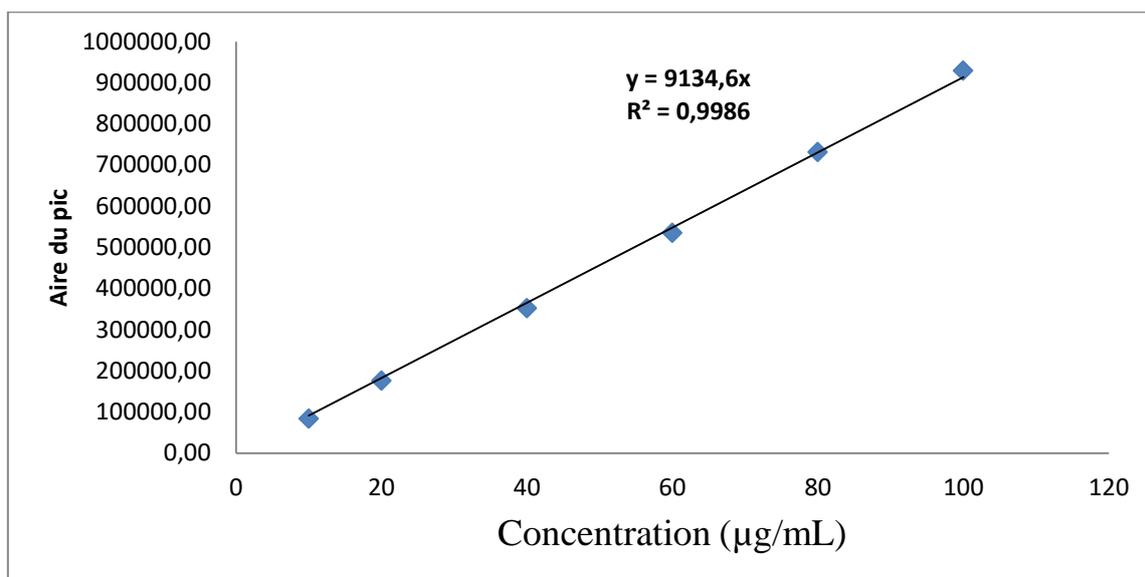


Figure 41: Courbe d'étalonnage moyenne

Une relation linéaire a été trouvée entre l'aire des pics et les différentes concentrations de la gamme de la solution standard injectée ([10 – 100] mg/mL) (Figure 41).

L'homogénéité des variances a été effectuée, les pentes des trois courbes d'étalonnages obtenues étaient statistiquement semblables ($p > 0,05$), le coefficient de Corrélation 0.9986, la pente \pm erreur standard : $9134,6 \pm 44,35$ et l'ordonnée à l'origine: 0.

Les figures 42, 43, 44, 45, 46 et 47 représentent les chromatogrammes de la gamme d'étalonnage.

Chromatogrammes de la gamme d'étalonnage :

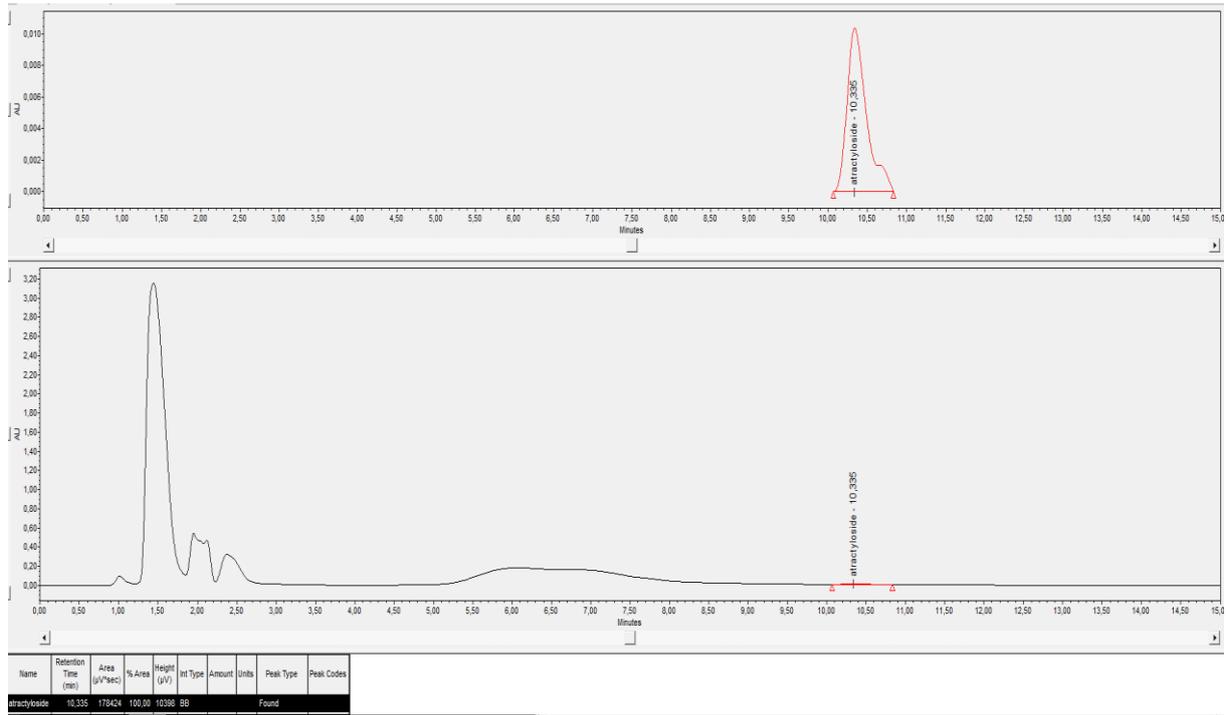


Figure 42: Pic chromatographique de l'Atractyloside à 10 µg/mL

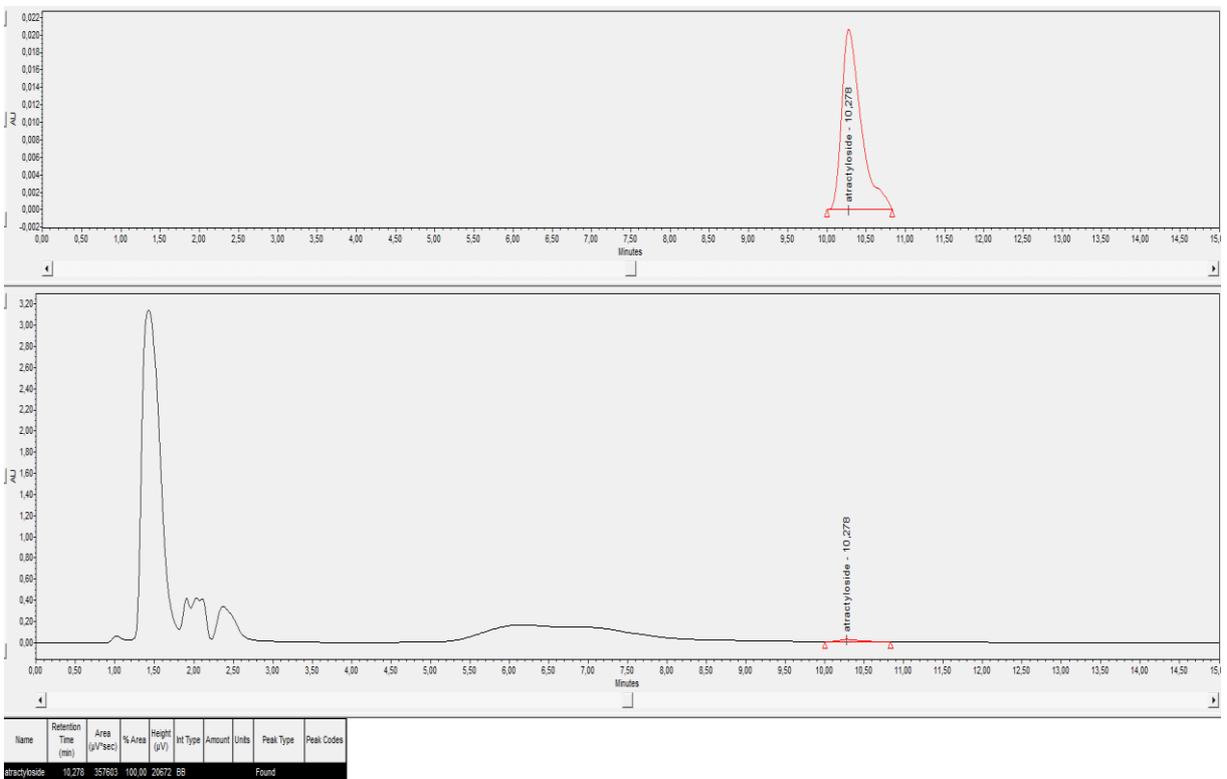


Figure 43: Pic chromatographique de l'Atractyloside à 20 µg/mL

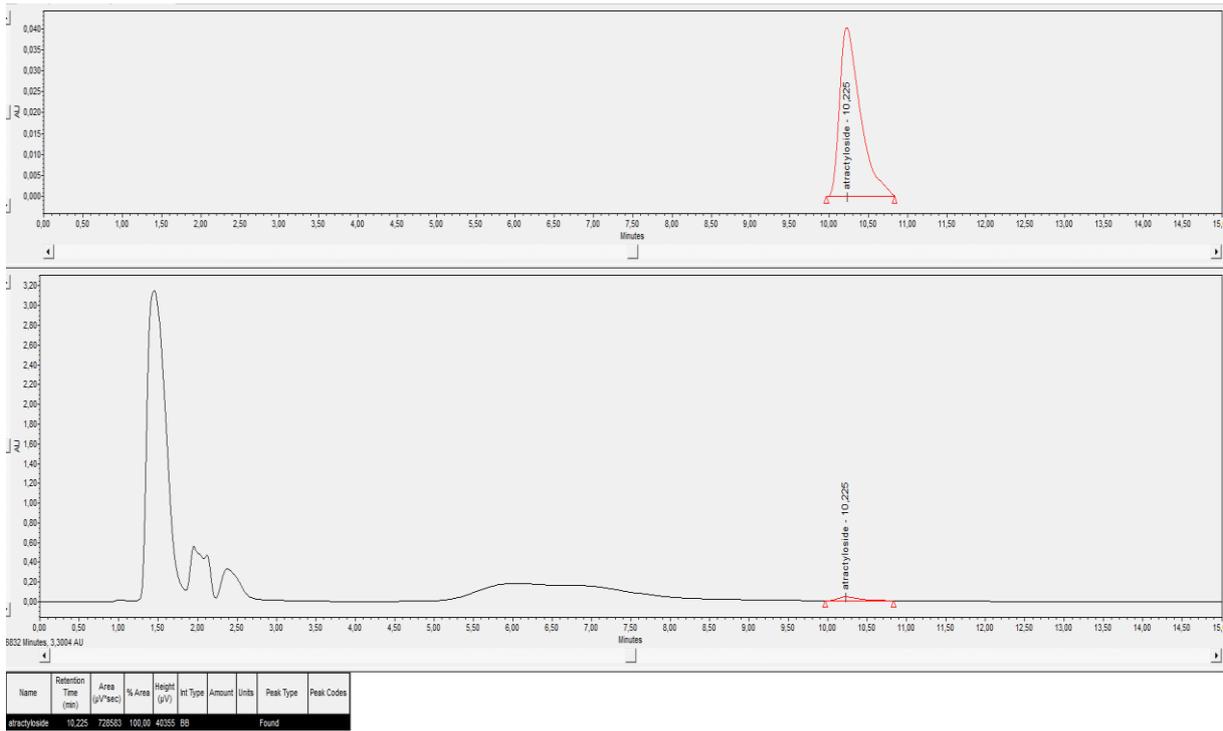


Figure 44: Pic chromatographique de l'Atractyloside à 40 µg/mL

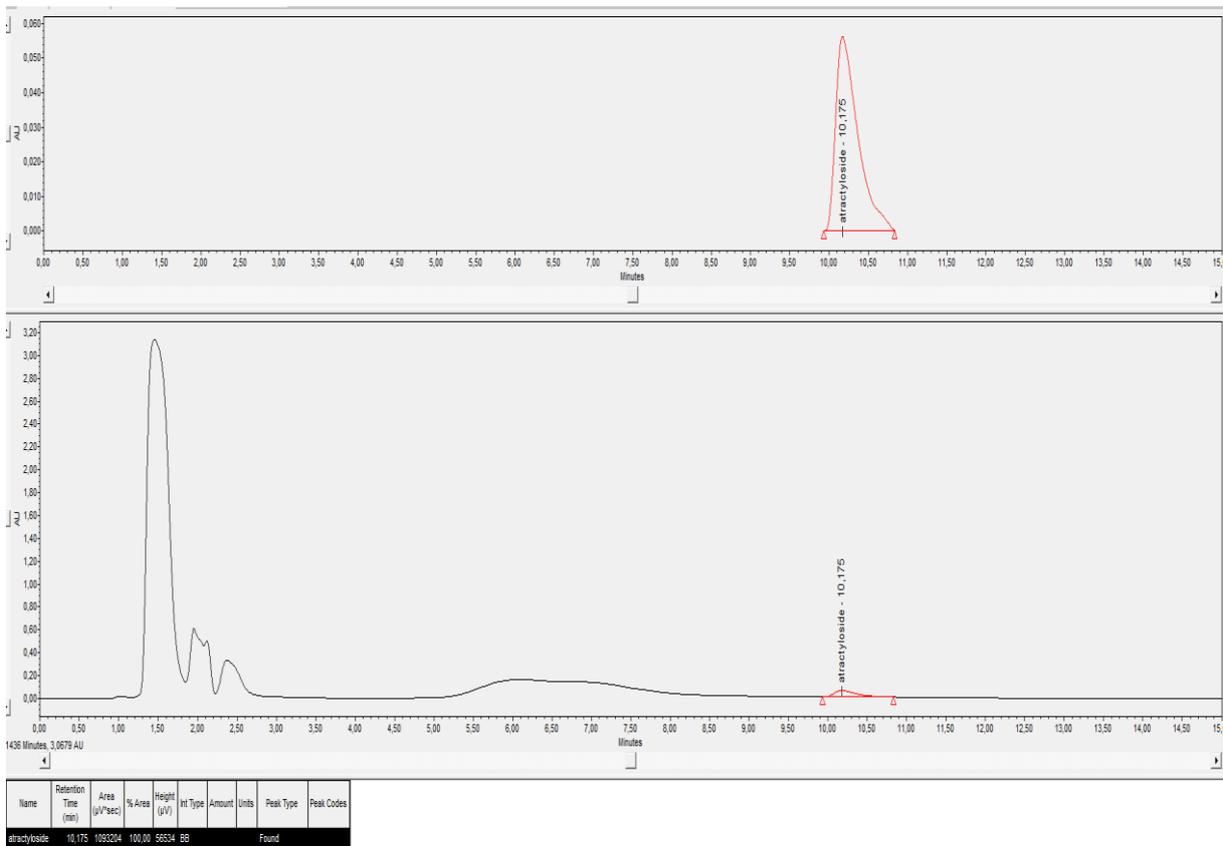


Figure 45: Pic chromatographique de l'Atractyloside à 60 µg/mL

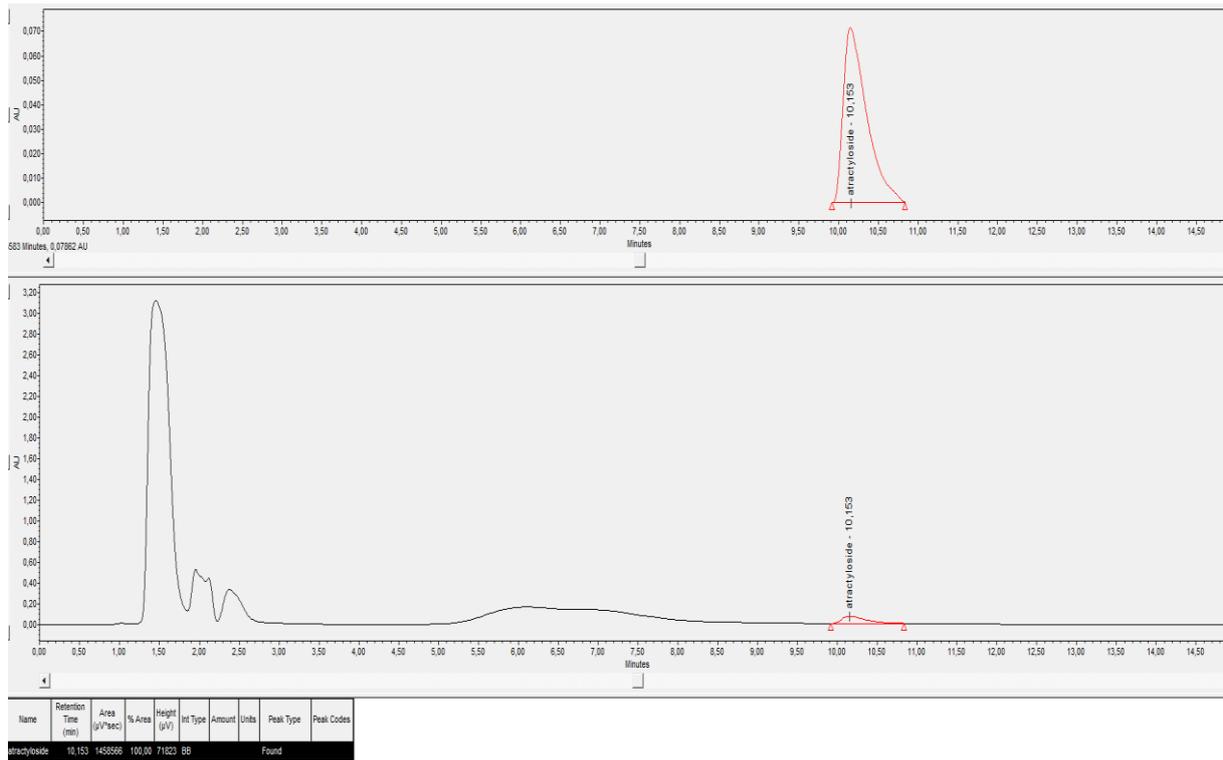


Figure 46: Pic chromatographique de l'Atractyloside à 80 µg/mL

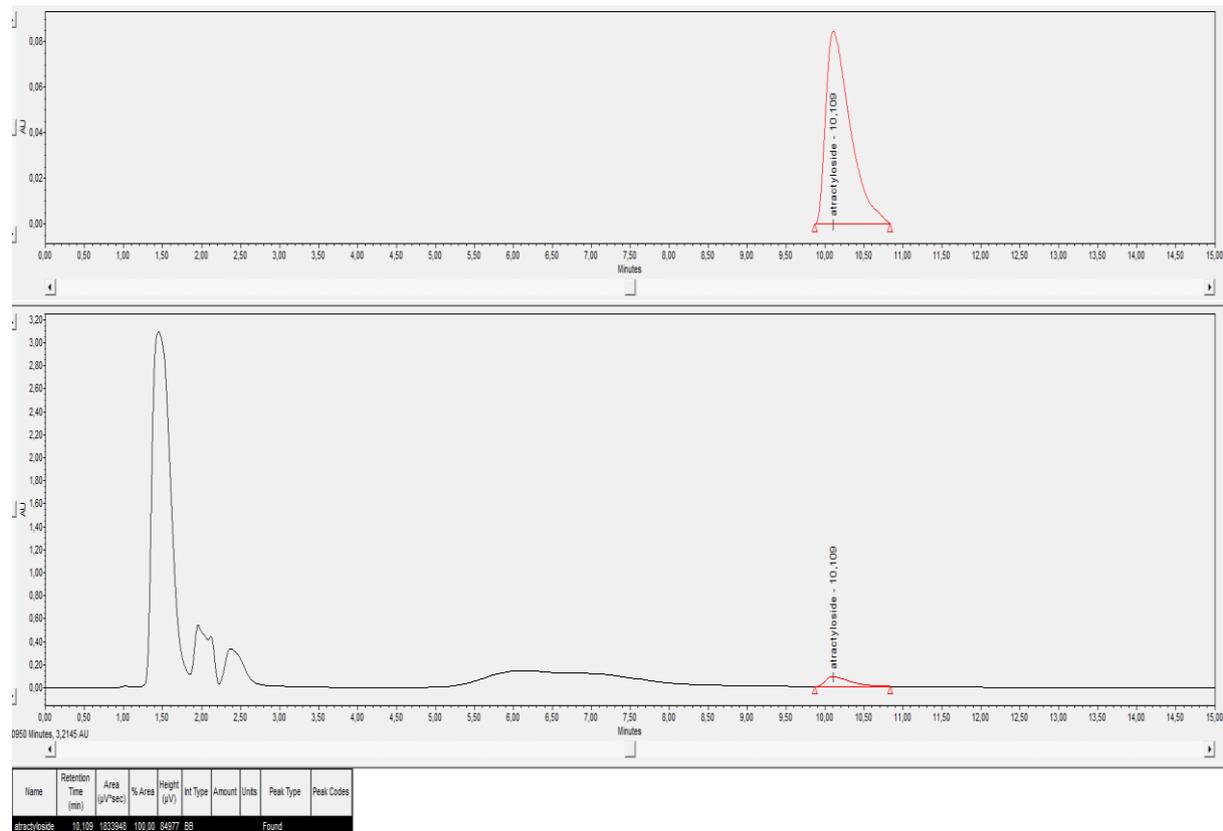


Figure 47: Pic chromatographique de l'Atractyloside à 100 µg/mL

L'exigence de linéarité s'applique aux résultats de la droite (Tableau 14) :

$$\text{Concentrations calculées} = f(\text{Concentrations introduites})$$

Tableau 14: Concentrations calculées des standards de validation des trois jours de validation

Concentration introduites (µg/mL)	Concentration calculées (µg/mL)		
	J1	J2	J3
LIQ 10	9,56	9,64	9,06
	10,04	9,02	8,72
	9,71	9,81	9,68
	9,76	9,14	10,14
	9,93	9,97	9,77
	9,80	9,43	9,87
CQI 30	27,55	26,56	29,41
	26,06	27,18	25,83
	28,38	29,70	29,33
	27,34	27,26	26,99
	27,67	28,90	27,52
	28,47	27,41	30,42
CQM 45	41,69	42,96	40,35
	40,45	40,75	39,84
	40,06	41,36	40,96
	40,03	41,33	42,98
	40,85	41,13	41,40
	39,96	42,35	40,30
CQS 75	70,63	74,75	76,09
	72,25	74,81	70,79
	74,36	72,27	73,02
	76,00	70,42	74,19
	75,49	76,37	71,87
	74,42	74,64	73,95

Une bonne linéarité est obtenue dans le domaine de dosage de 10 à 100 $\mu\text{g/mL}$ ainsi qu'une pente ($a = 0,9382$) et un coefficient de corrélation ($r = 0,9998$) proches de 1. L'ordonnée à l'origine ($b = 0$) est 0 (Figure 48).

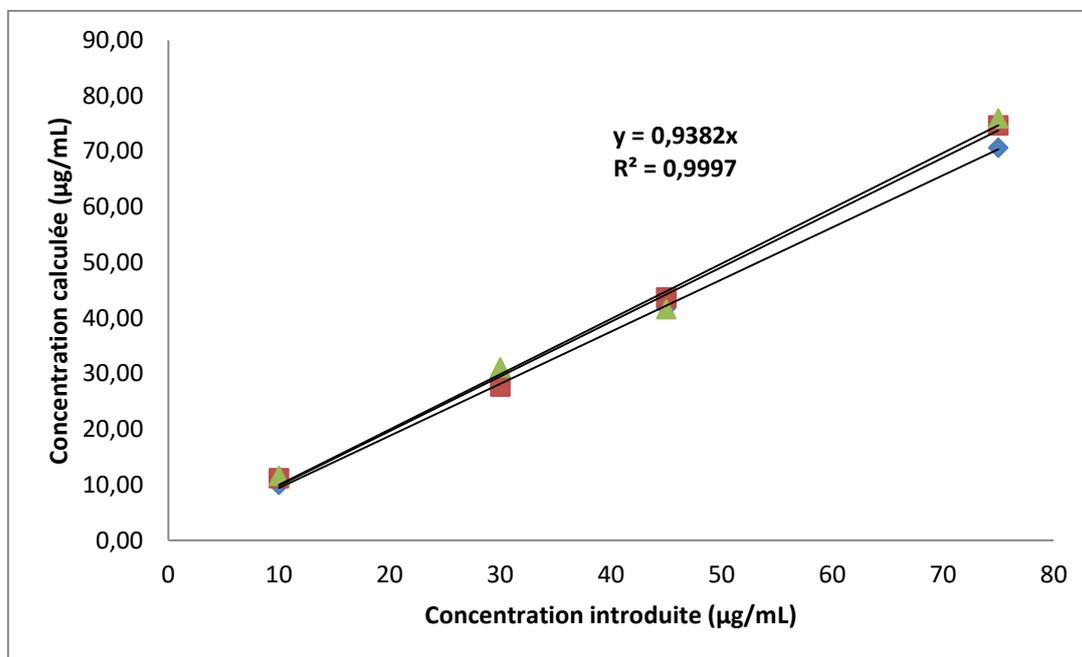


Figure 48: Courbe de linéarité

Les figures 49, 50, 51 et 52 représentent les chromatogrammes des standards de validation.

Chromatogrammes des standards de validation:

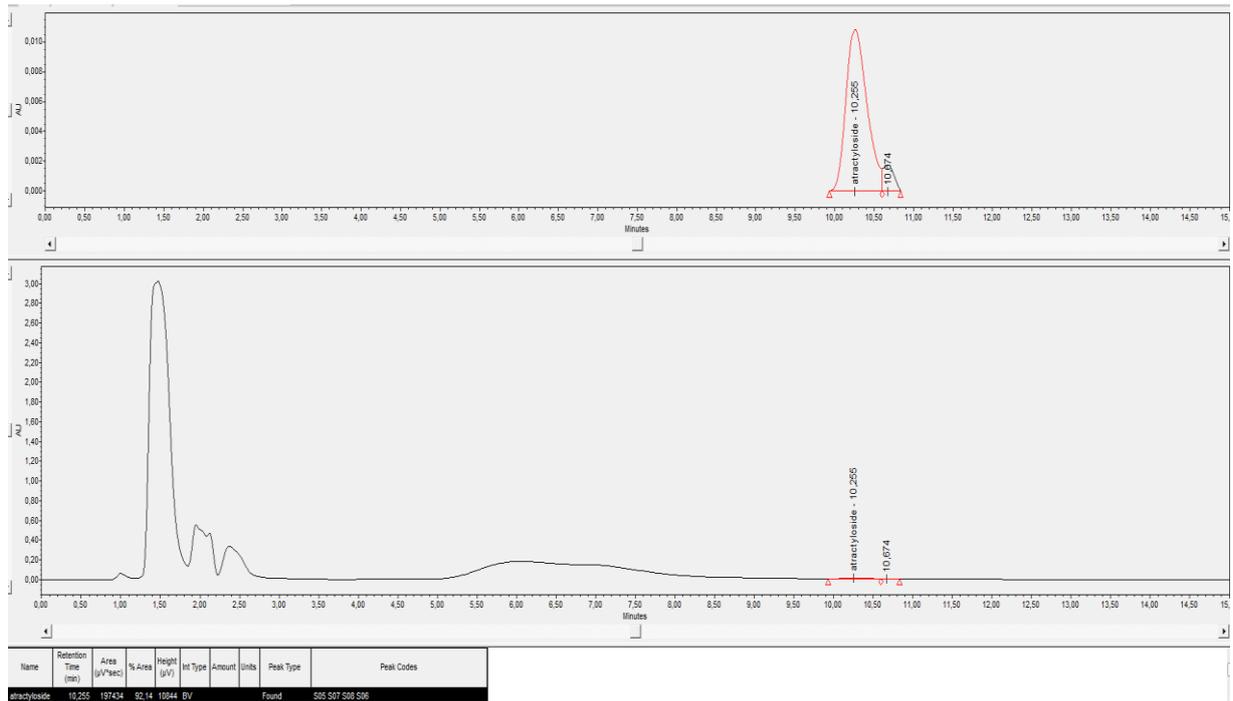


Figure 49: Pic chromatographique de l'Atractyloside à 10 µg/mL(LIQ)

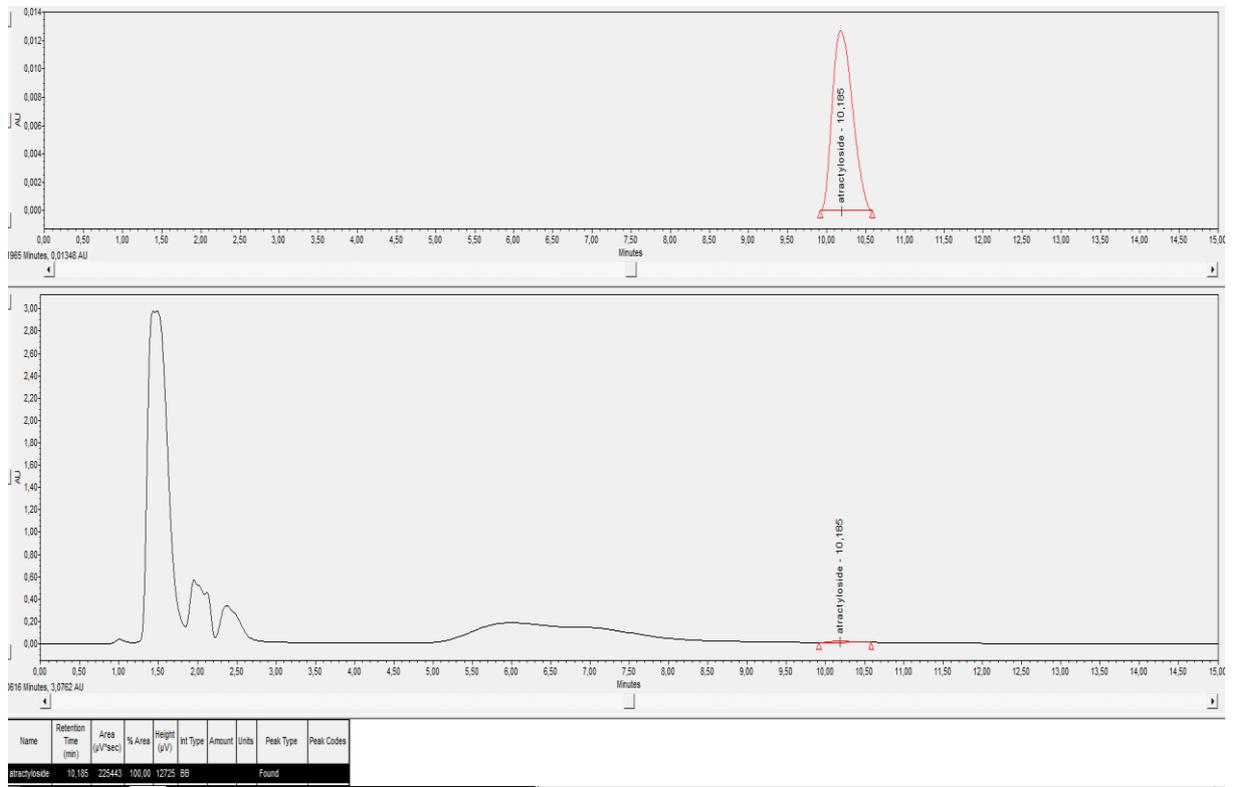


Figure 50: Pic chromatographique de l'Atractyloside à 30 µg/mL(CQI)

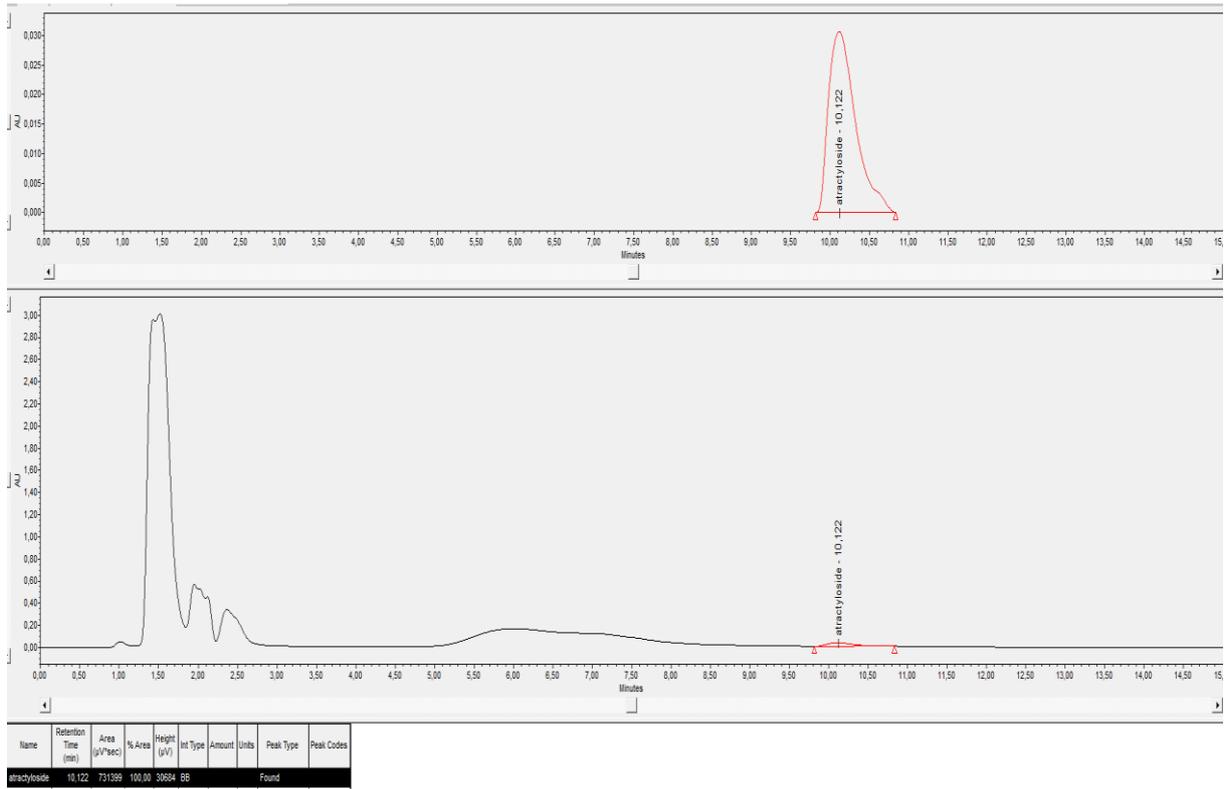


Figure 51: Pic chromatographique de l'Atractyloside à 45 µg/mL(CQM)

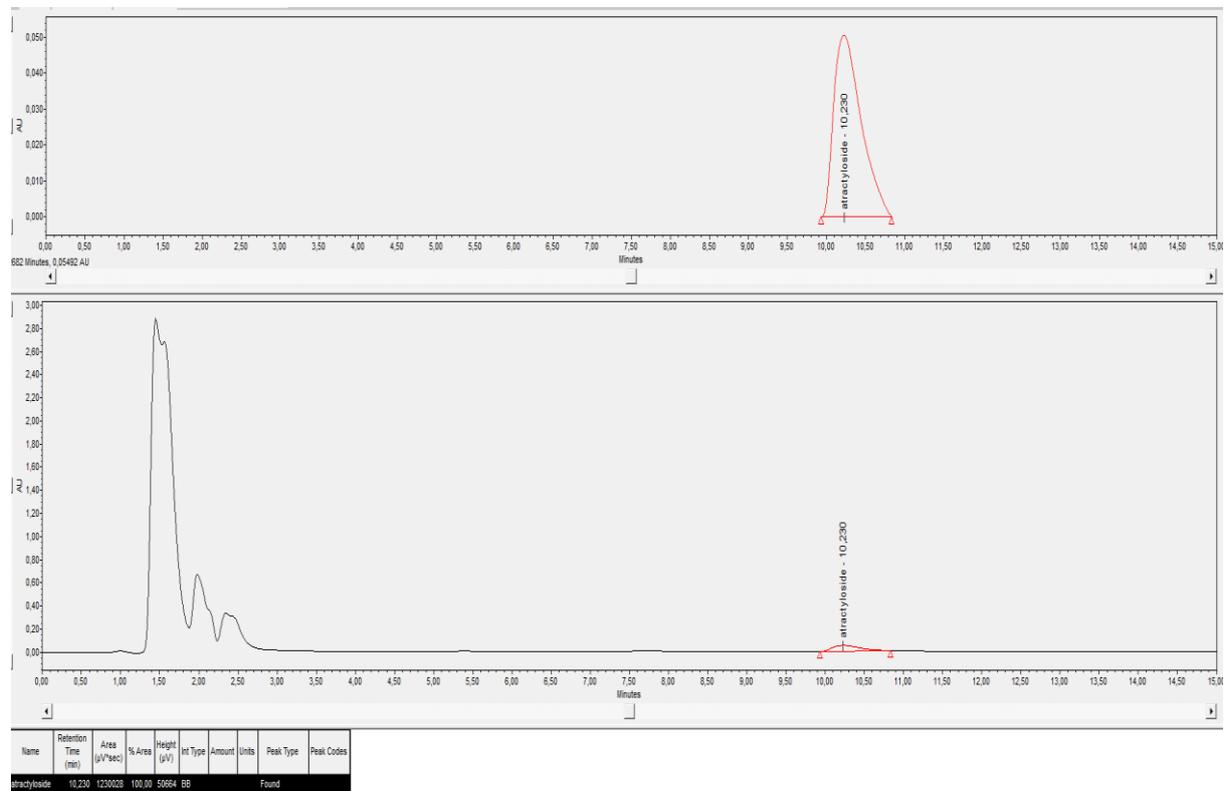


Figure 52: Pic chromatographique de l'Atractyloside à 75 µg/mL(CQS)

1.2.4. Justesse :

La justesse exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une série de résultats d'essais et la valeur qui est acceptée soit comme une valeur conventionnellement vraie, soit comme une valeur de référence acceptée. La justesse fournit une indication sur l'erreur systématique.

Les paramètres qui peuvent être utilisés pour évaluer la justesse sont (recouvrement et le biais) :

- Le recouvrement (R%) : par rapport aux concentrations introduites.

$$R (\%)_i = \frac{\mu_i}{X_i} * 100$$

- Le biais : absolu (B), relatif (B%)

$$B_i = \mu_i - X_i$$

$$B (\%)_i = \frac{\mu_i - X_i}{X_i} * 100$$

B_i : Biais absolu.

$B (\%)_i$: Biais relatif.

$R (\%)_i$: Recouvrement.

X_i : Concentration introduite.

μ_i : Concentration calculée

1.2.4.1. Justesse intra-série :

La justesse, en termes de biais relatif, ne devrait pas excéder 15%, sauf pour la limite inférieure de quantification qui doit être à 20%.

Les données ayant servi pour les calculs de la justesse de trois jours sont résumées dans les tableaux 15, 16 et 17.

Tableau 15: Paramètres de justesse pour la première série (J1).

Xi (µg/mL)	Concentration calculée (µg/mL) J1	µi (µg/mL)	R(%) i %	Bi (µg/mL)	B(%) i %	Limite d'acceptation
LIQ 10	9,56	9,80	97,99	-0,20	-2,01	< 20 %
	10,04					
	9,71					
	9,76					
	9,93					
	9,80					
CQI 30	27,55	27,58	91,93	-2,42	-8,07	< 15 %
	26,06					
	28,38					
	27,34					
	27,67					
	28,47					
CQM 45	41,69	40,51	90,01	-4,49	-9,99	
	40,45					
	40,06					
	40,03					
	40,85					
	39,96					
CQS 75	70,63	73,86	98,48	-1,14	-1,52	
	72,25					
	74,36					
	76,00					
	75,49					
	74,42					

Tableau 16: Paramètres de justesse pour la deuxième série (J2)

Xi (µg/mL)	Concentration calculée (µg/mL) J2	µi (µg/mL)	R(%) i %	Bi (µg/mL)	B(%) i %	Limite d'acceptation
LIQ 10	9,64	9,50	95,02	-0,50	-4,98	< 20 %
	9,02					
	9,81					
	9,14					
	9,97					
	9,43					
CQI 30	26,56	27,83	92,78	-2,17	-7,22	< 15 %
	27,18					
	29,70					
	27,26					
	28,90					
	27,41					
CQM 45	42,96	41,65	92,55	-3,35	-7,45	< 15 %
	40,75					
	41,36					
	41,33					
	41,13					
	42,35					
CQS 75	74,75	73,88	98,50	-1,12	-1,50	< 15 %
	74,81					
	72,27					
	70,42					
	76,37					
	74,64					

Tableau 17: Paramètres de justesse pour la troisième série (J3)

Xi (µg/mL)	Concentration calculée (µg/mL) J3	µi (µg/mL)	R(%) i %	Bi (µg/mL)	B(%) i %	Limite d'acceptation
LIQ 10	9,06	9,54	95,41	-0,46	-4,6	< 20 %
	8,72					
	9,68					
	10,14					
	9,77					
	9,87					
CQI 30	29,41	28,25	94,16	-1,75	-5,84	< 15 %
	25,83					
	29,33					
	26,99					
	27,52					
	30,42					
CQM 45	40,35	40,97	91,05	-4,03	-8,95	< 15 %
	39,84					
	40,96					
	42,98					
	41,40					
	40,30					
CQS 75	76,09	73,32	97,76	-1,68	-2,24	< 15 %
	70,79					
	73,02					
	74,19					
	71,87					
	73,95					

La justesse de tous les standards de validation, ainsi que la LIQ de trois jours de validation, sont dans les limites d'acceptation (CQI, CQM et CQS < 15% et LIQ < 20%).

I.2.4.2. Justesses inter-série :

La justesse inter-série est évaluée par le recouvrement et le biais relatif.

La valeur cible de recouvrement est de 100% (la concentration calculée est égale à la concentration introduite).

La limite d'acceptabilité est de [85-115] % ($\pm 15\%$).

Les données ayant servi pour les calculs de la justesse des trois jours de validation sont résumées dans le tableau 18.

Tableau 18: Calcul des recouvrements

Xi (µg/mL)	Concentration calculée (µg/mL)			µi (µg/mL)	R(%) i %	Limite d'acceptation
	J1	J2	J3			
LIQ 10	9,56	9,64	9,06	9,60	95,97	[85-115] %
	10,04	9,02	8,72			
	9,71	9,81	9,68			
	9,76	9,14	10,14			
	9,93	9,97	9,77			
	9,80	9,43	9,87			
CQI 30	27,55	26,56	29,41	27,71	92,37	
	26,06	27,18	25,83			
	28,38	29,70	29,33			
	27,34	27,26	26,99			
	27,67	28,90	27,52			
	28,47	27,41	30,42			
CQM 45	41,69	42,96	40,35	41,08	91,28	
	40,45	40,75	39,84			
	40,06	41,36	40,96			
	40,03	41,33	42,98			
	40,85	41,13	41,40			
	39,96	42,35	40,30			
CQS 75	70,63	74,75	76,09	73,55	98,07	
	72,25	74,81	70,79			
	74,36	72,27	73,02			
	76,00	70,42	74,19			
	75,49	76,37	71,87			
	74,42	74,64	73,95			
Moyenne de limite d'acceptation	94,42%					

Nous constatons que le recouvrement (94,42 %) est conforme aux exigences de la validation des procédures analytiques [85-115] %.

La valeur cible de biais relatif est de 0 (la concentration calculée est égale à la concentration introduite)

La limite d'acceptabilité : $\pm 15\%$.

Tableau 19: Biais absolu et biais relatif

Xi ($\mu\text{g/mL}$)	Concentration calculée ($\mu\text{g/mL}$)			μ_i ($\mu\text{g/mL}$)	Bi ($\mu\text{g/mL}$)	B(%) i %	Limite d'acceptation
	J1	J2	J3				
LIQ 10	9,56	9,64	9,06	9,60	- 0,40	- 4,03	< 20%
	10,04	9,02	8,72				
	9,71	9,81	9,68				
	9,76	9,14	10,14				
	9,93	9,97	9,77				
	9,80	9,43	9,87				
CQI 30	27,55	26,56	29,41	27,71	- 2,29	- 7,63	< 15%
	26,06	27,18	25,83				
	28,38	29,70	29,33				
	27,34	27,26	26,99				
	27,67	28,90	27,52				
	28,47	27,41	30,42				
CQM 45	41,69	42,96	40,35	41,08	- 3,92	- 8,72	< 15%
	40,45	40,75	39,84				
	40,06	41,36	40,96				
	40,03	41,33	42,98				
	40,85	41,13	41,40				
	39,96	42,35	40,30				
CQS 75	70,63	74,75	76,09	73,55	- 1,45	- 1,93	< 15%
	72,25	74,81	70,79				
	74,36	72,27	73,02				
	76,00	70,42	74,19				
	75,49	76,37	71,87				
	74,42	74,64	73,95				
Moyennedu biais	- 5,58						

Le biais moyen est de **-5,58 %**, ce qui largement acceptable (<15%).

Après calcul du recouvrement et du biais, nous pouvons conclure que la technique est **juste**.

I.2.5. Fidélité : Précision :

La fidélité exprime l'étroitesse de l'accord entre une série de mesure provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène dans des conditions prescrites.

La fidélité traduit la distribution des erreurs aléatoires, elle peut être évaluée à trois niveaux: la répétabilité (variations intra-jour), la fidélité intermédiaire (variations inter-jour) et la reproductibilité (variations inter-laboratoire).

Elle est exprimée en écart-type et en coefficient de variation :

$$CV = \frac{\sigma}{\mu_i} * 100$$

σ : écart-type

μ_i : Moyenne des concentrations calculées.

Les valeurs des coefficients de variation (CV) de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire ne devraient pas excéder 15% pour les standards de validation.

Le tableau 20 ci-dessous donne les valeurs des coefficients de variation (CV) de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire des trois courbes d'étalonnage.

Tableau 20: Estimateurs (écarts types et CV) de la fidélité des trois courbes d'étalonnage

Xi (µg/mL)	Concentration calculée (µg/mL)			µi (µg/mL)	σ _{R,i}	σ _{FI,i}	CV _{R,i} %	CV _{FI,i} %	Limite d'acceptation
	J1	J2	J3						
LIQ 10	9,56	9,64	9,06	9,60	0,39	0,40	4,10	4,13	< 20 %
	10,04	9,02	8,72						
	9,71	9,81	9,68						
	9,76	9,14	10,14						
	9,93	9,97	9,77						
	9,80	9,43	9,87						
CQI 30	27,55	26,56	29,41	27,71	1,24	1,07	4,46	3,85	< 15 %
	26,06	27,18	25,83						
	28,38	29,70	29,33						
	27,34	27,26	26,99						
	27,67	28,90	27,52						
	28,47	27,41	30,42						
CQM 45	41,69	42,96	40,35	41,08	0,91	0,87	2,23	2,11	
	40,45	40,75	39,84						
	40,06	41,36	40,96						
	40,03	41,33	42,98						
	40,85	41,13	41,40						
	39,96	42,35	40,30						
CQS 75	70,63	74,75	76,09	73,55	2,23	1,90	3,03	2,59	
	72,25	74,81	70,79						
	74,36	72,27	73,02						
	76,00	70,42	74,19						
	75,49	76,37	71,87						
	74,42	74,64	73,95						
Moyenne							3,45	3,17	
<p>σ_R : écart type de la répétabilité (variations intra-jour) ; σ_{FI} : écart type de la fidélité intermédiaire (variations inter-jour).</p>									

Le coefficient de répétabilité ($CV_R = 3,45\%$) et le coefficient de la fidélité intermédiaire ($CV_{FI} = 3,17\%$) sont conformes aux limites fixées ($< 15\%$).

L'exactitude est l'expression de la somme de la justesse et de la fidélité.

- La justesse fournit une indication sur l'erreur systématique, elle est estimée au moyen du pourcentage de recouvrement et de biais relatif. La valeur de recouvrement est de **94,42%** ([85 – 115] %) et la valeur de biais relatif est de **-5,58%** ($< 15\%$) ce qui prouve la justesse de notre méthode.
- La Fidélité : Les valeurs des coefficients de variation (CV) de la répétabilité **3,45%** (variations intra-jour) et de la fidélité intermédiaire **3,17%** (variations inter-jour) confirment que notre méthode est précise.

Notre méthode est juste et précise donc elle est exacte.

I.2.6. Limites de détection et de quantification :

I.2.6.1. Limite de quantification (LQ) : est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites avec une exactitude définie.

1-Elle est déterminée soit par essais de répétabilité et de la fidélité intermédiaire sur des concentrations de plus en plus faible, Soit obtenue à partir de l'estimation de l'écart-type du blanc : $LQ=10 \times SB$.

Dans notre étude, la plus basse concentration de courbe d'étalonnage a été acceptée comme limite de quantification par les critères suivants :

- Justesse (B%) = - **4,03**
- Fidélité (%) : $CV_R= 4,10 / CV_{FI}= 4,13$

Dans ce cas La justesse, en terme de biais relatif, et la fidélité n'ont pas excédé la limite d'acceptation (<20%).

2-Elle peut également être déterminée à partir de la droite de régression : $y= ax+b$

$$LQ = \frac{(b+(10* Sb))}{a}$$

Sb : Ecart type de l'origine à l'ordonnée.

Dans notre étude la limite de quantification déterminée à partir de la droite de régression moyenne ($y = 9356,5x - 15819$ et $Sb = 11604,45$) est de $10,71 \mu\text{g/mL}$.

En conclusion : la limite de la concentration quantifiée est de **10 $\mu\text{g/mL}$** .

I.2.6.2. Limite de détection (LD) : le seuil de détection correspond à la plus petite quantité d'une substance à examiner dans un échantillon pouvant être détectée, mais non quantifiée comme une valeur exacte.

1-Elle peut être calculée en effectuant n mesures répétées du blanc (B) dans une même série, et on calcule l'écart type S, exprimé en concentration. La LD est donc calculée comme suite : $LD = 3 \times SB$.

2- Elle peut également être estimée en tenant compte de la droite de régression $y= ax+b$.

$$LD = \frac{(b+(3* Sb))}{a}$$

Sb : Ecart type de l'origine à l'ordonnée.

Dans notre étude, la limite de détection déterminée à partir de la droite de régression moyenne ($y = 9356,5x - 15819$ et $S_b = 11604,45$) est de $2,03 \mu\text{g/mL}$.

En conclusion : le seuil de détection de notre méthode est de **$2 \mu\text{g/mL}$** .

I.2.7. Sensibilité :

La sensibilité est la capacité d'une méthode à pouvoir faire la discrimination entre deux concentrations très voisines.

En pratique : C'est la variation ΔX que peut différencier une méthode pour une variation minimale significative ΔY de la réponse. Cette valeur ΔX :

- Sera d'autant plus faible que la pente b sera forte.
- Sera d'autant plus forte que la dispersion des points autour de la droite sera élevée.

Comme il s'agit d'une droite d'étalonnage, la sensibilité est donnée directement par la pente de la droite. On parle de la sensibilité de la calibration.

Tableau 21: Valeurs des pentes pour les 3 jours de validation

Jour	Pente
J1	9134,7
J2	9090,3
J3	9179
Courbe moyenne	9134,6

Nous remarquons que la sensibilité est relativement constante d'un jour à l'autre (Tableau N°21).

Nous pouvons conclure que la sensibilité de la technique est **suffisante**.

I.2.8. Profil d'exactitude :

La commission SFSTP a proposé une approche globale pour obtenir un outil de décision appelé « profil d'exactitude » à la fois pratique et visuel. Il repose sur le calcul pour chaque niveau "i" de concentration, l'intervalle de tolérance à partir des estimations disponibles de la justesse et de la fidélité de la procédure après la phase de validation au niveau de la concentration en question (Figure 53).

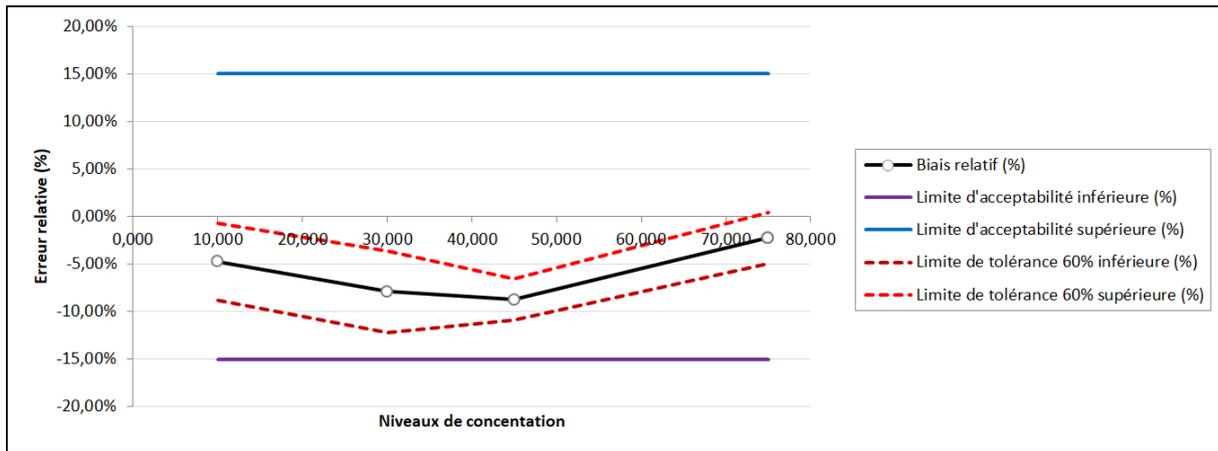


Figure 53: Profil d'exactitude de la technique de dosage de l'Atractyloside

Les intervalles de tolérance de tous les standards de validation sont inclus dans les limites $\pm 15\%$, la méthode peut être considérée comme **exacte**, pour un intervalle de concentration allant de **10 à 100 $\mu\text{g/mL}$** (Tableau N°22).

I.2.9. Résumé des données de la validation :

Le tableau 22 récapitule les performances analytiques de la technique de dosage de l'atractyloside par HPLC.

Tableau 22: Performances analytiques de la technique de dosage de l'Atractyloside par HPLC

Critères de validation	Performances
Rendement d'extraction (%)	71,42
Temps de rétention (Tr) (min)	10
Intervalle de dosage (µg/mL)	[10 - 100]
Linéarité : Equation de la droite Coefficient de corrélation	$y = 9134,6x$ 0,9986
Limite de détection (LD) (µg/mL)	2
Limite de quantification (LQ) (µg/mL)	10
Justesse Recouvrement moyen (%) Biais relatif (%)	94,42 -5,58
Fidélité CV répétabilité (%) CV fidélité intermédiaire (%)	3,45 3,17

CHAPITRE II :
ANALYSE TOXICOCINETIQUE DE
L'ATRACYLOSIDE

Dans ce chapitre, nous montrons nos résultats d'une analyse toxico-cinétique (TK) de l'atractyloside. Le principal objectif était:

- La caractérisation du profil TK de l'ATR chez le Rat WISTAR, en déterminant ces paramètres TK individuels ainsi que la variabilité interindividuelle (VII) de ces paramètres.

II.1. Matériels et méthodes :

II.1.1. Analyse non compartimentale :

II.1.1.1 Plan et population d'étude :

L'analyse TK a été réalisée sur 108 rats répartis en trois lots de 36 rats.

Il s'agit d'une étude In Vivo incluant des lots de 3 rats par unité de temps de prélèvement.

Trois essais ont été réalisés à des périodes différentes soit 36 rats par essai ;

Les prélèvements ont été effectués au niveau du sinus rétro-orbitaire sur un tube capillaire héparine;

Nous avons réalisé un pool de sérum sur les trois rats à un chaque point de la cinétique.

Tableau 23: Caractéristiques des rats

	Valeur
Nombre total	108
Race	WISTAR
Sexe (male)	108
Poids (gr)	180

II.1.1.2 Schéma d'administration :

Les rats ont reçu une dose de 140mg/kg d'ATR par voie orale.

La dose choisie et administrée est subléthale, elle a été calculée par rapport à la DL50 qui est de 210 mg/kg chez le rat WISTAR, ce qui nous donne DL50/1,5.

II.1.1.3 Prélèvements TK et analyse de sang :

Les échantillons de sang pour la mesure des concentrations plasmatiques de l'atractyloside ont été prélevés à 5, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 360, 480 et 600 minutes après administration orale.

Les concentrations plasmatiques de l'atractyloside ont été mesurées par une méthode chromatographique (HPLC/UV) validée dans le chapitre I.

Le premier lot des trois rats est utilisé comme lot témoin.

Une approche standard en deux étapes a été réalisée :

1/ Les paramètres TK de l'atractyloside ont d'abord été estimés pour chaque lot par analyse non compartimentale (NCA) en utilisant le logiciel Monolix[®] (version 2019R1, Antony, France).

2/ Des statistiques récapitulatives des paramètres TK ont été calculées dans une deuxième étape.

La concentration plasmatique maximale (C_{max}) et temps nécessaire pour atteindre la concentration plasmatique maximale (T_{max}) ont été déterminés directement à partir des profils des concentrations plasmatiques de l'ATR.

La constante de vitesse d'élimination ($\lambda z = k_{el}$) a été obtenue par analyse de régression linéaire sur les trois derniers points de la concentration transformée en logarithme en fonction du temps.

La demi-vie terminale ($t_{1/2}$) a ensuite été calculée comme $\ln 2/k_{el}$.

L'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques-temps (AUC) et l'aire sous la courbe du premier moment (AUMC) ont été calculées en utilisant la règle trapézoïdale log-linéaire jusqu'au dernier temps d'échantillonnage ($AUC_{0-600min}$ et $AUMC_{0-600min}$) et extrapolées à l'infini en utilisant λz ($AUC_{0-\infty}$ et $AUMC_{0-\infty}$).

La clairance orale apparente (CL/F , où F représente la biodisponibilité), le volume de distribution apparent pendant la phase terminale (V_z/F) et le temps de séjour moyen (MRT) ont été calculés comme $dose/AUC_{0-\infty}$, $dose/(\lambda z * AUC_{0-\infty})$ et $AUMC_{0-\infty}/AUC_{0-\infty}$, respectivement.

Le traitement statistique des données et l'analyse toxicocinétique des concentrations plasmatiques en fonction du temps ont été réalisées par le logiciel R[®] à l'aide du package ggplot2.

II.1.2. Analyse de la fraction libre:

II.1.2.1. Principe:

En 1962, Hummel et Dreyer ont publié un rapport préliminaire intitulé « Mesure des phénomènes de liaison aux protéines par filtration sur gel ». Leur méthode, conçue pour détecter l'interaction de liaison réversible entre les macromolécules d'une protéine et des molécules de bas poids moléculaire.

La dialyse à l'équilibre (DE) repose sur le principe de filtration. Une cellule de dialyse est composée de deux réservoirs séparés par une membrane en cellulose semi perméable.

Cette membrane est perméable aux substances libres et imperméables aux substances liées aux protéines.

Il est recommandé de procéder à un prétraitement de la membrane de dialyse, en l'imprégnant de tampon phosphate à pH=7,4 avant l'essai. L'échantillon de plasma à analyser et le tampon sont placés dans leurs réservoirs respectifs, de part et d'autre de la membrane semi-perméable.

L'objectif d'une étude de la liaison par DE est de s'approcher des conditions physiologiques pour obtenir un équilibre de liaison proche de celui retrouvé chez un individu. Pour cela le système de dialyse est placé à température physiologique (37°C).

En effet, le pH et la température sont des conditions expérimentales influençant l'équilibre de liaison. Il est donc essentiel de maîtriser ces paramètres pour l'analyse de la forme libre. Par ailleurs, le système est maintenu en rotation continue pendant toute la durée de la dialyse afin d'arriver plus rapidement à l'équilibre de liaison.

A la fin de la dialyse, la concentration de la substance explorée dans le réservoir « tampon » est en équilibre avec la concentration libre dans le réservoir « plasma ». Ainsi, la concentration dans le réservoir « plasma » représente la concentration totale. La fraction libre est alors calculée selon le rapport suivant :

$$F_u = \frac{\text{Concentration tampon}}{\text{Concentration plasma}} * 100$$

Le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre est une étape indispensable dans l'analyse par DE. Pour une interprétation exacte des résultats, la concentration libre dans le réservoir « tampon » doit être mesurée à l'équilibre de liaison. Ainsi, la première étape d'une validation de méthode par DE consiste à définir le temps de dialyse nécessaire pour atteindre cet équilibre. Ce dernier est considéré atteint lorsque la f_u ne varie plus au cours du temps.

Des phénomènes d'adsorption au dispositif, appelés liaisons non-spécifiques (LNS), peuvent survenir avec la membrane semi-perméable et/ou les cellules de dialyse, ce phénomène est peu important.

Les travaux de validation pré-analytique ou analytique ont été conduits avec la technique de DE, qui est la méthode de référence pour l'étude de la forme libre.

II.1.2.2. Matériels :

- Dispositif pour la dialyse à équilibre rapide (RED) Maxi-ThermoScientific ;

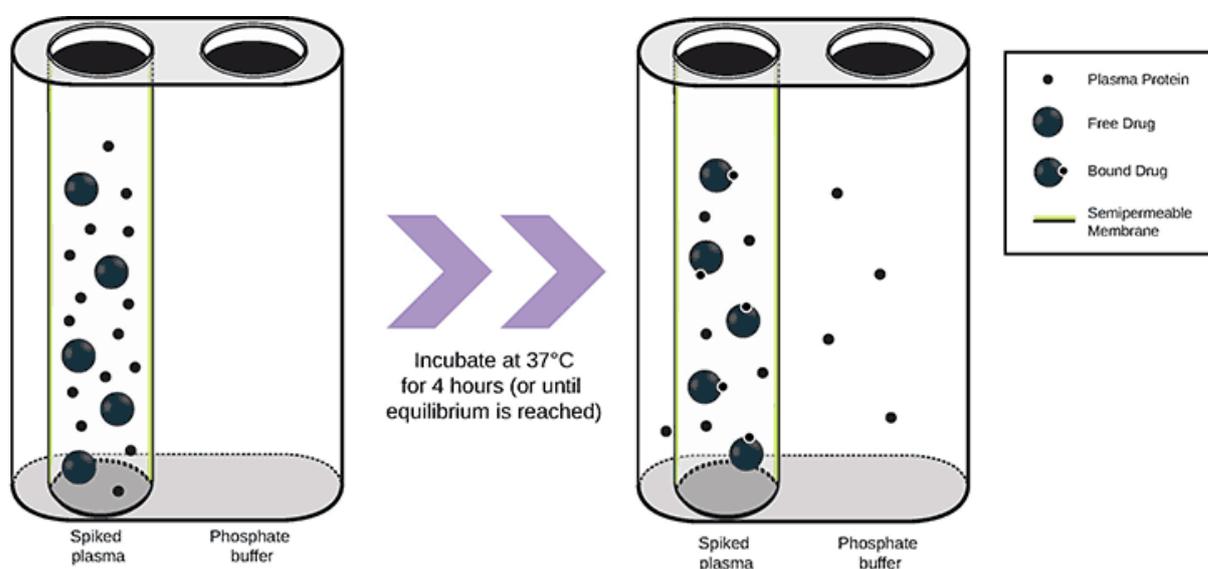


Figure 54: Dispositif de dialyse à équilibre rapide

- Agitateur orbital Rotamax 120Heidolph ;
- Incubateur C170 BINDER® ;
- Phosphate di sodique Anhydre (Na_2HPO_4) ; SUPELCO N°231-913-4 ;
- Phosphate mono potassique (KH_2PO_4). SUPELCO N°401-073-4.

II.1.2.3. Méthodes :

- **Préparation des solutions :**

- **Solution de phosphate di sodique Anhydre (Na_2HPO_4) à 133mM (Solution A):**

Na_2HPO_4 18.89 g.

Eau distillée qsp..... 1000 ml.

- **Solution de phosphate mono potassique (KH_2PO_4) à 133mM (Solution B):**

KH_2PO_4 9.08 g.

Eau distillée qsp..... 500 ml.

- **Solution Tampon (pH = 3,8):**

- Solution A : 80,4 ml

- Solution B : 19,6 ml

- **Méthode de la dialyse :**

La dialyse à l'équilibre rapide est composée d'une plaque à 96 puits pour 48 échantillons car chaque échantillon possède une paire de deux chambres. Il s'agit d'une plaque à usage unique avec des inserts.

- Au cours de notre travail nous avons procédé à des dialyses de trois fois deux échantillons de sérum saturés en atractyloside à des concentrations variables de 60, 80 et de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$.
- 100 μL des échantillons contenant chaque analyte ont été placés dans la chambre d'échantillonnage et 600 μL de tampon ont été placés dans la chambre tampon.
- Le pH est un facteur susceptible d'influencer la liaison des substances aux protéines plasmatiques. Le pH du tampon utilisé dans notre étude correspond au pH physiologique (pH=7,4).
- La plaque a été incubée à 37°C sous agitation. Après 4 heures 250 μL de chaque chambre tampon ont été retirés et les concentrations d'analyte ont été mesurées par HPLC/UV.
- Nilsson a suggéré qu'un essai de DE sur une période inférieure à six heures n'entraînait pas de modification suffisante du pH pour perturber l'équilibre de liaison [182]. Nous en avons donc déduit que le pH n'avait pas influencé nos résultats, vu que la durée de la dialyse été de quatre heures pour nos échantillons.

L'absence d'équipements dans le laboratoire ne nous a pas permis d'évaluer les facteurs de variabilité comme le taux de CO_2 et la différence de pression oncotique entre les deux compartiments de la dialyse.

II.1.3. Analyse de l'induction enzymatique :

II.1.3.1. Plan et population d'étude :

Vingt-quatre rats males WISTAR répartis en douze lots de deux rats par lot ont été utilisés pour cette étude ;

Le poids moyen de nos rats est de 180 ± 5 gr ;

Les prélèvements ont été réalisés sur tube capillaire hépariné au niveau du sinus rétro-orbitaire de l'œil.

Pour chaque unité nous avons réalisé un pool de sérum sur les deux rats au temps 5, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 360, 480 et 600 minutes.

II.1.3.2. Molécule inductrice :

Phénobarbital : GMP ; LABORATOIRE BIOGALENIQUE (Certificat de conformité en Annexe).

II.1.3.3. Schéma d'administration :

Les rats ont reçu par voie orale une dose de 140 mg/mL d'atractyloside correspondant à la même dose subléthale qui nous a permis de réaliser le profil cinétique de l'ATR.

Ces mêmes rats ont été traités au préalable pendant sept jours avec une solution de phénobarbital à 20 mg/mL par voie intra péritonéale, avec des doses quotidiennes de 20 mg/kg [183].

Le lot témoin a subi le même protocole d'induction sauf l'administration de l'ATR.

Les rats doivent être privés de nourriture pendant la nuit, avant le gavage.

On a procédé à l'étude toxicocinétique dans les mêmes conditions que la phase initiale dans le but de faire une étude comparative des différents paramètres cinétiques.

II.2. Resultats :

II.2.1. Analyse non compartimentale :

Comme décrit dans le protocole de l'étude, les rats ont reçu une dose de 140 mg/kg par voie orale. Les profils des trois lots (ID1-2-3) sont consignés dans le tableau 24 avec tous les paramètres toxicocinétiques.

Tableau 24: Paramètres toxicocinétiques plasmatiques individuels de l'Atractyloside chez le rat, après une administration orale unique de 140 mg/kg

ID	Dose (mg)	T _{max} (min)	C _{max} (mg/L)	AUC _{0-600min} (min.mg/L)	R ²	AUC _{0-∞} (min.mg/L)	AUC _{ext} (%)	t _{1/2} (min)	V _z /F (L)	CL/F (L/min)	MRT (min)
1	25	90	67,9	14781	0,82	15072	1,93	85,5	0,20	0,0017	226
2	25	90	66,9	15868	0,99	17483	15,3	165	0,34	0,0014	281
3	25	90	71,5	17258	0,79	17552	1,67	76,8	0,16	0,0014	233

ID1 : Données poolées ;

ID2 : Données TK après induction enzymatique ;

C_{max}: Concentration plasmatique maximale ;

T_{max} : Temps nécessaire pour atteindre la concentration plasmatique maximale ;

AUC_{0-600min} : Aire sous la courbe concentration plasmatique-temps de 0 à 600minutes;

R²: Coefficient de détermination ajusté ;

AUC_{0-∞}: Aire sous la courbe concentration plasmatique -temps du temps zéro à l'infini;

AUC_{ext}(%): Pourcentage de contribution de la partie extrapolée àAUC_{0-∞} ;

t_{1/2} : Demi-vie terminale;

V_z/F : Volume de distribution apparent ;

CL/F : Clairance orale apparente;

MRT: Temps de résidence moyen.

Le profil des concentrations plasmatiques moyennes en atractyloside en fonction du temps sont présentés dans les figures 55 et 56 respectivement.

Le profil TK de l'atractyloside est comparable entre les lots1 et3.

Le profil TK du lot 2 n'a pu être compléter du faite que deux rats sur trois sont morts juste avant la dixième heure d'exposition

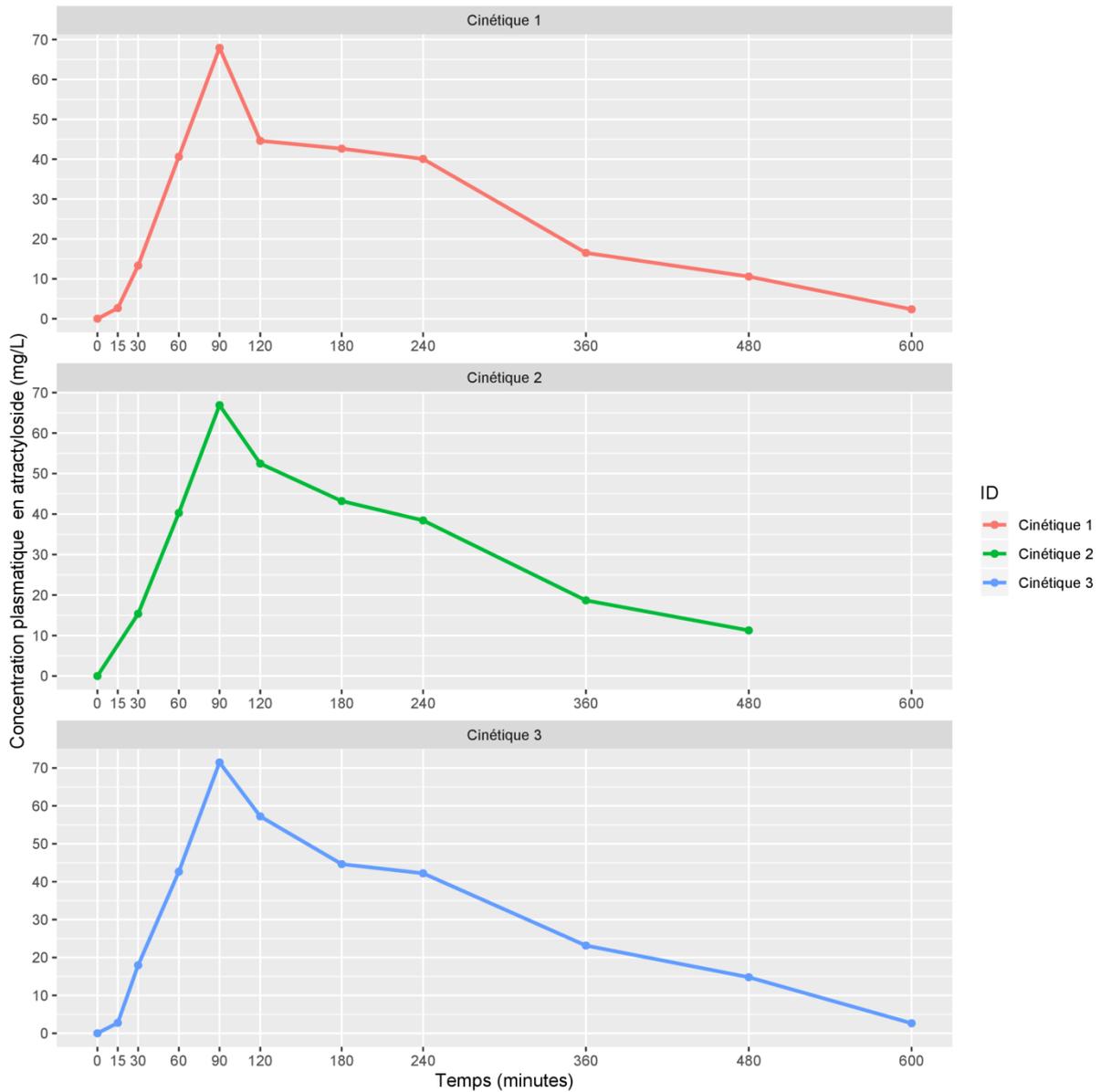


Figure 55 : Profils individuels des concentrations plasmatiques de l'Atracyloside en fonction du temps après une administration orale unique de 140 mg/kg

Afin de finaliser notre étude on a établi un modèle d'étude statistique sur les paramètres TK de l'atractyloside des trois lots d'essais qui sont représentées dans le tableau 25, ainsi que le tracé de la courbe moyenne de la cinétique de l'ATR suite à une administration d'une dose de 25mg (figure 56).

Tableau 25: Résumé des paramètres toxicocinétiques plasmatiques de l'Atractyloside chez le rat, après une administration orale unique de 140 mg/kg

Paramètre TK	n	Moyenne	SD	CV (%)
T_{max}(min)*	3	90	-	-
C_{max}(mg/L)	3	68.8	2.39	3.48
AUC_{0-600min}(min.mg/L)	3	15969	1242	7.77
AUC_{0-∞} (min.mg/L)	3	16702	1412	8.45
t_{1/2} (min)	3	109	48.4	44.4
V_z/F (L)	3	0.23	0.09	40.3
CL/F (L/min)	3	0.0015	0.00013	8.89
MRT_∞ (min)	3	247	29.9	12.1

C_{max} : concentration plasmatique maximale ;

T_{max} : temps nécessaire pour atteindre la concentration plasmatique maximale ;

AUC_{0-600min} : aire sous la courbe concentration plasmatique-temps de 0 à 600minutes;

R²: coefficient de détermination ajusté ;

AUC_{0-∞}: aire sous la courbe concentration plasmatique -temps du temps zéro à l'infini;

AUC_{ext}(%): pourcentage de contribution de la partie extrapolée àAUC_{0-∞} ;

t_{1/2} : demi-vie terminale;

V_z/F : volume de distribution apparent ;

CL/F : clairance orale apparente;

MRT: temps de résidence moyen.

***T_{max}**, exprimé comme médiane

SD : Écart-type

CV : Coefficient de variation en pourcentage

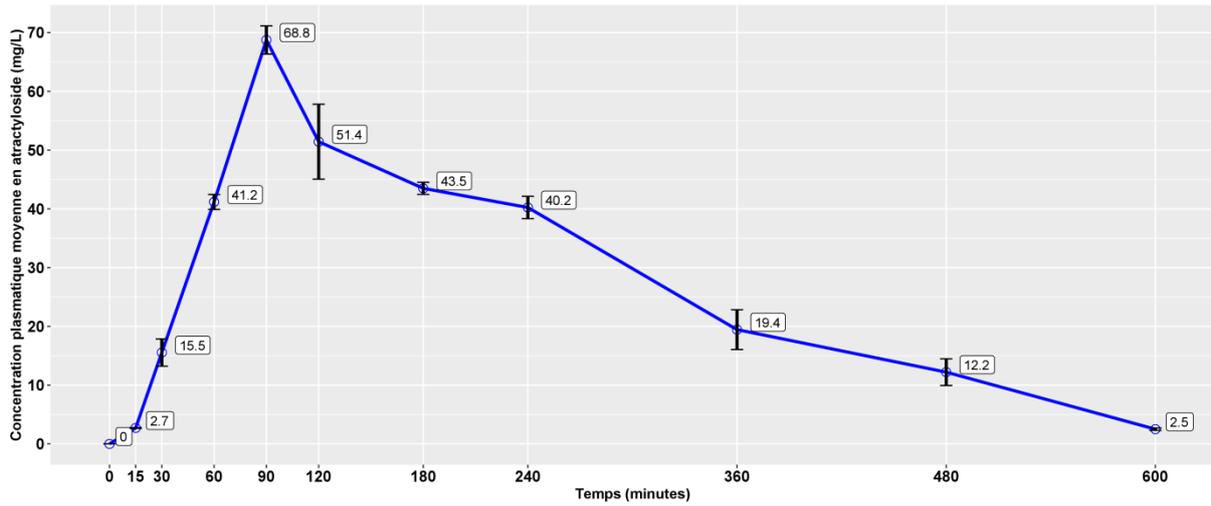


Figure 56 : Profil des concentrations plasmatiques moyennes (\pm écart type) en Atracyloside en fonction du temps après une administration orale unique de 140 mg/kg

II.2.2. Analyse de la fraction libre:

Après 4 heures sous agitation on a procédé à la récupération des aliquotes des solutions tampons pour une analyse quantitative de l'ATR qui correspond à la fraction libre diffusible. L'analyse a été réalisé deux fois pour la même concentration afin d'obtenir une concentration diffusible moyenne.

Les concentrations sur sérum sont les AUC et concentrations moyennes de l'ATR déjà effectué lors de la validation de la méthode de dosage, cette concentration correspond à la quantité d'ATR total (libre et lié aux protéines)

Les résultats sont consignés dans le tableau 26 et révèlent que l'ATR est faiblement lié aux protéines.

Tableau 26: Mesure de pourcentage de la fraction liée et libre

Dialyse	Aire du pic tampon	C tampon	Aire du pic sérum	C sérum	% de la fraction liée	% de la fraction libre
DE60	336339	37,84	534654	58,83	35,68	64,32
	340101					
DE80	511533	56,73	731045,67	85,17	33,39	66,61
	518367					
DE100	584708	65 ,08	928996,67	100,98	35,55	64,45
	601503					
moyenne					34,88	65,12
variance					1,65	1,65
Ecart type					1,28	1,28

DE : Dialyse à l'équilibre

$$\text{Pourcentage de la fraction liée} = \frac{\text{concentration sérum} - \text{concentration tampon}}{\text{concentration sérum}} * 100$$

$$\text{Pourcentage de la fraction libre} = \frac{\text{Concentration tampon}}{\text{Concentration sérum}} * 100$$

Intervalle de confiance (95%) de la fraction liée [31,67 - 38,06]

Intervalle de confiance (95%) de la fraction libre [61,93 - 68,32]

II.2.3. Analyse de l'induction enzymatique :

La mise en place du protocole d'induction et l'évaluation des paramètres TK de l'ATR dans les mêmes conditions analytiques lors de l'étude cinétiques sont notifiés dans le tableau 27.

Tableau 27: Etude comparative des paramètres toxicocinétiques plasmatiques de l'Atractyloside chez le rat, avant et après induction au phénobarbital

ID	Dose (mg)	T _{max} (min)	C _{max} (mg/L)	AUC _{0-600min} (min.mg/L)	R ²	AUC _{0-∞} (min.mg/L)	AUC _{ex t} (%)	t _{1/2} (min)	Vz/F (L)	Cl/F (L/min)	MRT (min)
1	25	90	68,8	15831	0,82	16125	1,82	81,2	0,18 2	0,0016	229
2	25	120	4,2	1595	0,99	2955	53,8	532	6,49	0,0085	774

Le profil du tracé cinétique des concentrations de L'ATR suite à l'induction n'a pu être finalisé du fait de la mort des rats du dernier lot avant la sixième heure.

On note toutefois de prime à bord, un écrasement de l'AUC suite à l'induction (figure 57).

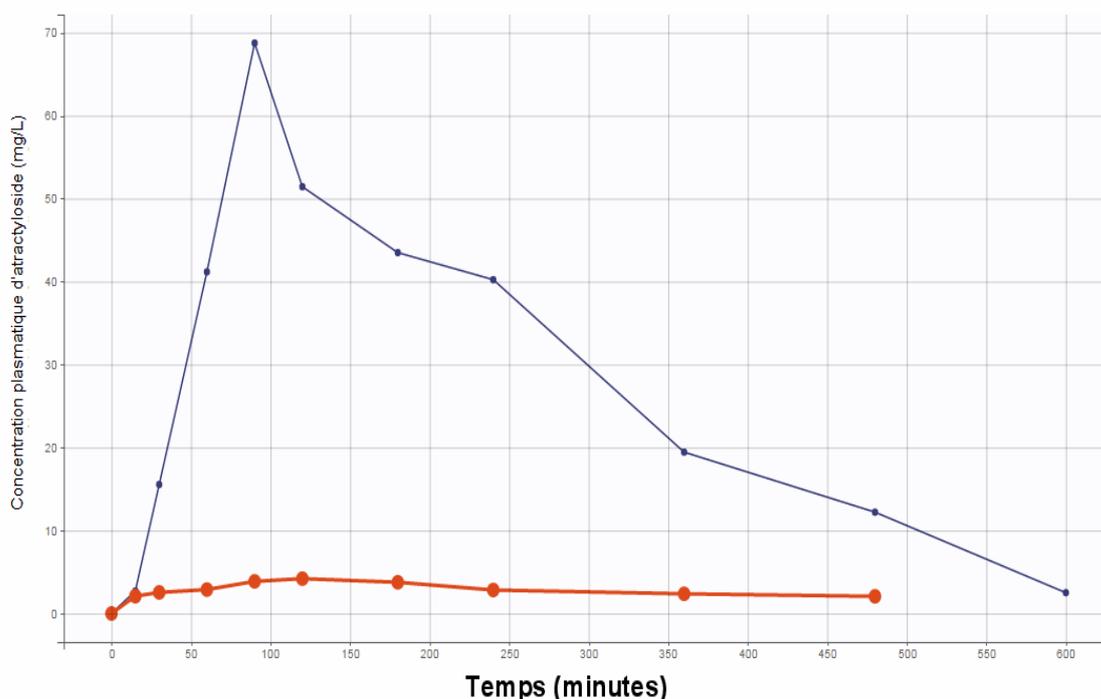


Figure 57: Profil des concentrations plasmatiques moyennes en Atractyloside en fonction du temps après une induction enzymatique

CHAPITRE III :
ETUDE DE LA TOXICITE IN VIVO ET IN
VITRO

III.1. Matériels et méthodes:

III.1.1. Etude in vivo :

La **DL50** correspond à la dose capable de tuer, dans des conditions déterminées, la moitié des animaux mis en expérience chez la même espèce animale.

III.1.1.1. Réactif animal :

- **Espèce** : souris ;
- **Race** : NMRI ;
- **Sexe** : mâle ;
- **Poids** : 20 ±2 grammes ;
- **Age** : 2 mois ;
- **Nombre** : 42 ;
- **Elevage** : LNCPP ;
- **Conditions de stabulation** :
 - # 10 souris par cage en polypropylène contenant de la sciure.
 - # Alimentation : granulé pour rongeurs et eau de ville ad libitum.
 - # Température : 24°C.
 - # Hygrométrie : 50%.
 - # Eclairage : 12/24H.

III.1.1.2. Equipements et consommable :

- Balance SCALTEC ;
- Verrerie ;
- Seringues ;
- Portoir ;
- Grilles de fond ;
- sonde gastrique métallique.

III.1.1.3. Mode opératoire :

- **Répartition des animaux en lots :**

Les 42 souris préalablement mises à jeun pendant 12 heures sont réparties de façon randomisée et équitablement sur 07 lots : un groupe témoin et six groupes essais recevant chacun une dose d'atractyloside administrée par voie orale. Les doses en mg/kg de poids corporel utilisées à cet effet sont : 50, 75, 100, 150, 200, 250.

- **Voie d'administration :**

Les différentes doses d'atractyloside sont administrées par voie orale dans un volume de 0,5mL d'eau physiologique à l'aide d'une sonde de gavage.

- **Durée d'observation**

Après administration les animaux sont mis en observation pendant 14 jours. S'il y a apparition des signes de toxicité, la durée d'observation est indéterminée

- **Examens**

L'heure de la mort et le nombre de morts doivent être notés ainsi que les symptômes.

- **Evaluation**

- Etablir la relation entre la dose administrée et l'intensité des effets observés.
- Calcul de la DL50 avec ses limites de confiance

- **Calcul de la DL50 :**

Méthode de Karber et Behrens

$$DL50 = DL100 - \frac{\Sigma(a.b)}{n}$$

- a: Différence entre deux doses successives
- b: Moyenne de morts entre deux doses successives
- n: Nombre moyen d'animaux par lot

Méthode de Miller et Tinter

La méthode consiste à :

- porter sur un papier log-probits, les % de mortalité (transformés en probits) en fonction du log- dose
- comme les probits des 0% et 100% tendent vers l'infini (voir tableau ci-après), ceux-ci sont remplacés par des valeurs corrigés :
 - correction 0% : $y_0 = 50/n$
 - correction 100% : $y_{100} = (100n-50)/n$

n=nombre d'animaux utilisés dans chacun de ces lots

- L'écart type de la DL50 : $\sigma = (DL84\% - DL16\%)/2$.
- L'écart type à la moyenne: $\delta = 2\sigma/\sqrt{2N'}$

N'= nombre total d'animaux ayant donnés des pourcentages de mortalité compris entre 6.7 et 93.3.

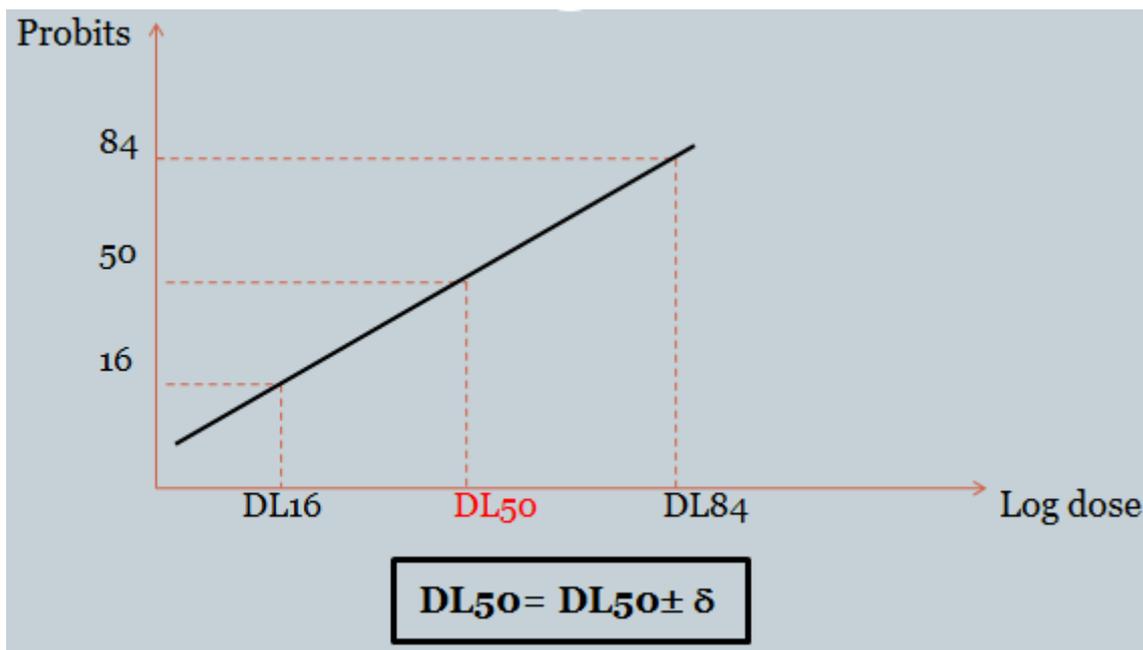


Figure 57 bis : Courbe de pourcentage de mortalité (transformés en probits) en fonction du log- dose.

III.1.2. Etude in vitro:

On appelle culture cellulaire, le maintien en dehors de l'organisme, des cellules non organisées en tissu mais capables de se diviser in-vitro et d'exprimer des métabolismes et des fonctions spécifiques dans des conditions expérimentalement contrôlées.

III.1.2.1. Matériels biologiques :

Lignées cellulaires :

- Lignée cellulaire A549 (issue de cellule épithéliale basale alvéolaire humaine adénocarcinomique) au 12^{ème} passage fournie par l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA).
- Lignée cellulaire HEP2 (issue de cellule de carcinome laryngé humain) au 34^{ème} passage(IPA).
- Lignée cellulaire RD (issue de cellule de rhabdomyosarcome humain) au 8^{ème} passage(IPA).

Les trois lignées cellulaires ont été cultivées dans des flasques de 75cm² dans un milieu de culture complet liquide de type Dulbecco Modified Eagle's Medium (DMEM) 1X complet supplémenté avec 10% de sérum bovin fœtal (SVF), 100 ug/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine.

Ces lignées sont mises en incubation dans un environnement contrôlé, à l'intérieur d'une enceinte humidifiée (37°C ; 5% CO₂ ; 95% d'air), avec un changement du milieu tous les deux jours.

Trypsination :

La trypsination est une étape importante dans l'entretien des cellules en culture en permettant de :

- Détacher les cellules adhérentes de leur support de culture et de les dissocier entre elles.
- Digérer enzymatiquement par la trypsine, les protéines de la matrice extracellulaire formant les jonctions entre les cellules et créant un tapis cellulaire.

Lors des repiquages ou passages quand les cellules arrivent à confluence, on dissocie les cellules pour pouvoir les diluer dans un milieu frais. Une mauvaise optimisation du protocole de trypsination a des conséquences sur la mortalité, l'adhésion des cellules au support, la croissance et la morphologie.

Une fois les cellules devenues confluentes, le milieu est enlevé, la couche cellulaire lavée avec le tampon phosphate (PBS) salin afin d'éliminer les débris cellulaires, ensuite trypsinée avec un mélange trypsine-EDTA 0.25 puis laissée en incubation dans une étuve à 37° pendant 3 minutes. L'action de la trypsine est bloquée en rajoutant un milieu de culture (DMEM complet). Une numération cellulaire sur cellule de Malassez est réalisée après ajout du bleu de trypan. Cette dernière étape nous permet de connaître à la fois le nombre et la viabilité cellulaire grâce au bleu de trypan(Gibco) qui colore en bleu les cellules mortes. Si la viabilité cellulaire est inférieure à 80%, les cellules en culture ne sont pas admises dans l'essai. Les résultats sont exprimés par nombre de cellules/mL :

$$N = \frac{n \times P \times S \times 1}{F}$$

F : facteur de dilution

P : nombre des périmètres

S : surface des périmètres

n=nombre de cellules comptées

III.1.2.2. Evaluation de la cytotoxicité d'ATR par l'essai de relargage du rouge neutre :

A. Principe

Par cette technique, la cytotoxicité est appréciée après contact de 24 et 48 heures des différentes concentrations d'ATR avec une monocouche cellulaire.

Le paramètre permettant d'évaluer cette cytotoxicité, est la concentration d'ATR entraînant 50% de mortalité cellulaire (CI₅₀). Cette dernière est déterminée indirectement en mesurant le relargage du rouge neutre qui est un colorant assimilé uniquement par les cellules viables.

B. Matériels :

- **Cellules :**

Trois lignées cellulaires A549, HEP2 et RD ont été utilisées dans cet essai. Les cellules ont été cultivées dans le milieu DMEM additionné de 10% de sérum de veau fœtal (décomplémenté à 56° C pendant 30 minutes), de pénicilline, de streptomycine et de L-glutamine ; et maintenues en atmosphère humide contrôlée (37° C - 5% CO₂, 88% d'hygrométrie).

- **Equipements :**

- Balance de précision : Pioneer ;
- Hotte à flux laminaire vertical :Telstar ;
- Incubateur à CO₂ : Memmert ;
- Microscope inversé : Leica ;
- Agitateur pour microplaques : IKA ;
- Lecteur de microplaque automatique : Zenyth 200rt ;
- Congélateur à -80°C : Angelantoni ;
- Congélateur à -20°C : Liebher.

- **Petit matériel**

- Micropipettes de 5 mL, 200 µL et 1000 µL (Eppendorf) ;
- Distributeur automatique ;
- Système de numération de cellules (cellule de Malassez) ;
- Tubes en polypropylène stériles, gradués (50, 15 mL) (Gibco) ;
- Pipettes en verre stériles (25, 10, 5, 2, 1 mL) ;
- Erlène Meyer (250 mL).

- **Consommable**

- flasques de 75cm²(Gibco) ;
- Embouts stériles pour micropipettes de 5 ml, 200 µL et 1000 µL (Gibco) ;
- Seringues stériles(Combitips) de 5 ml pour distributeur automatique ;
- Microplaques 24 puits pour culture cellulaire(Gibco) ;
- Microplaques 96 puits non stériles(Gibco).

- **Réactifs**

- Milieu de culture complet liquide de type Dulbecco Modified Eagle's Medium (DMEM) 1X (Gibco) ;
- Sérum de veau foetal (SVF)(Gibco) ;
- Solution de pénicilline (10000UI/mL)(Gibco) ;
- Solution de streptomycine (10000 µg/mL)(Gibco) ;
- Solution gentamycine (10 mg/mL)(Gibco) ;
- Trypsine(Gibco)-EDTA 0,25(Sigma Aldrich);
- L-glutamine 200 mM dans le milieu de culture(Gibco) ;
- Solution de rouge neutre à 0,05 mg/mL dans le milieu de culture(Gibco) ;

- Eau distillée stérile(Gibco) ;
- Diluant hydrophile : chlorure de sodium à 0.9% (Saidal) ;
- Solution de révélation : Acide acétique glacial (Sigma Aldrich)à 1% dans l'éthanol(Sigma Aldrich) à 50°.

C. Méthode :

• Ensemencement des cellules (J₁) :

Pour évaluer la cytotoxicité de notre produit sur 24 et 48 heures de contact avec les cellules mises en essai, deux microplaques de 96 puits sont utilisées pour chaque lignée cellulaire soit une microplaque pour un temps d'incubation.

Les cellules sont trypsinées et comptées conformément aux procédures internes au laboratoire de pharmaco-toxicologie du LNCPP.

Les cellules sont ensuite ensemencées sur deux microplaques de 96 puits, à raison de 10 000 cellules par puits sous un volume de 0,1 mL de milieu de culture (DMEM) complet, sans agitation. Chaque concentration d'atractyloside est testée sur trois puits (triplicata). Trois autres puits sont réservés pour le témoin négatif où les cellules ne sont pas traitées.

Les microplaques sont placées pendant 24 heures à l'incubateur à CO₂, réglé à la température 37°C, 5% de CO₂ et 88% d'hygrométrie.

• Préparation des solutions des différentes concentrations d'ATR (J₀) :

Les dilutions d'ATR sont faites extemporanément en masse/volume et réalisées avec du chlorure de sodium à 0.9%. Les concentrations en mg/ml d'atractyloside testées sont dans l'ordre croissant : 0,05-0,25-0,5-2-3-6.

• Contact d'ATR avec les cellules (J₀) :

Chaque puits est préalablement rincé avec 0,2 ml de PBS maintenu à température ambiante, avant d'être traité à raison de 100 µL par concentration d'ATR. Le temps de contact est de 24 heures pour la première microplaque et de 48 heures pour la deuxième.

• Préparation de la solution colorante (J₀ et J₁) :

Une solution mère de rouge neutre à 0.4% est diluée au 1/80 dans du milieu de culture (DMEM) complet puis mise pendant 18 à 24 heures à l'incubateur dont les conditions atmosphériques sont contrôlées (37°C, 5% de CO₂ et 88% d'hygrométrie). La solution de révélation est préparée à J₀ et J₁ respectivement pour les essais de cytotoxicité de 24 et 48 heures.

- **Préparation de la solution de révélation (J₁) :**

Une solution à 1% d'acide acétique glacial dans l'éthanol à 50 °C est préparée le jour de la révélation de la cytotoxicité au niveau de la première microplaque soit J₁. Cette solution se conserve plusieurs semaines.

- **Coloration cellulaire (J₁ et J₂) :**

La coloration cellulaire se fait après 24 et 48 heures d'incubation d'ATR avec les cellules mises en essai respectivement pour la première et la seconde microplaque. Après élimination des dilutions d'atractylosidetestées, la solution colorante de rouge neutre centrifugée à 3000 g pendant dix minutes est déposée à raison de 0,1 ml par puits.

La microplaque est placée trois heures à l'incubateur à CO₂ réglé à la température 37°C, 5% de CO₂ et 88% d'hygrométrie.

Après ce temps de contact, la solution colorante contenue dans les différents puits est éliminée avant de procéder au rinçage.

- **Rinçage :**

5 rinçages successifs sont effectués. Pour chaque rinçage, il faut utiliser 0,2 mL de PBS maintenu à température ambiante.

Les rinçages sont pratiqués verticalement, de la hauteur du puits, en employant une micropipette et un embout dont l'orifice d'ouverture est de 3 mm de diamètre.

Le surnageant est aspiré après chaque rinçage. Après le dernier rinçage, les puits restent dépourvus de milieu en attendant la phase de révélation.

- **Révélation de la cytotoxicité :**

Après traitement complet de la microplaque, 0,1 ml par puits de la solution de révélation (acide acétique à 1% dans l'éthanol à 50°) est déposé. La microplaque est agitée modérément pendant 15 minutes.

- **Lecture :**

La lecture de la densité optique du rouge neutre contenu dans la solution de révélation est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre à 540 nm contre le blanc (acide acétique 1% dans de l'éthanol 50%).

- **Expression et interprétation des résultats :**

Après lecture, on obtient une valeur de densité optique (DO) par puits. Le pourcentage de mortalité cellulaire est calculé, pour chaque concentration d'ATR, selon la formule ci-après :

$$\% \text{ mortalité cellulaire} = 100 - \frac{\text{DO}_{\text{moyenne des puits traités}}}{\text{DO}_{\text{moyenne des puits témoins}}} \times 100$$

La courbe des pourcentages de mortalité cellulaire en fonction des concentrations d'ATR est tracée; la concentration inhibitrice 50 (CI₅₀) entraînant 50% de mortalité cellulaire est alors calculée par analyse de régression linéaire.

Pour le traçage de la courbe et la détermination de la CI₅₀, le logiciel STATISTICA version 6 a été utilisé.

III.1.2.3. Evaluation in vitro du stress oxydatif généré par l'atractyloside :

- **Principe :**

Le stress oxydant implique un ensemble complexe de paramètres et ne peut donc être mis en évidence par une seule méthode ; nous avons donc choisi le dosage de trois bio- marqueurs oxydatifs. Ces bio-marqueurs se répartissent selon deux axes :

La mesure de dommage oxydatif au niveau des lipides : Malondialdéhyde (MDA).

- La détermination des antioxydants enzymatique et non enzymatiques : catalase et Glutathion (GSH).
- Afin de déterminer l'effet oxydant d'atractyloside, ces bio-marqueurs sont dosés dans les cellules traitées en comparaison avec les cellules non traitées (témoin négatif).

- **Matériels :**

Equipements :

- Balance de précision 0,1 mg : Kern 220-4N ;
- Agitateur : type Vortex ;
- Centrifugeuse : Sigma2-16PK ;
- Spectrophotomètre : Biotek ;
- Bain-marie : Memmert ;
- Vortex : Heidolph ;
- Micropipette ;
- pH mètre : Hanna ;
- Chronomètre ;
- Tubes à vis ;
- Consommable ;
- Microplaque de 96 puits ;
- Embouts ;
- Micro-tubes.

Réactifs chimiques :

- Acide Thio barbiturique (TBA) à 0.8% : Sigma Aldrich ;
- Acide acétique à 20% : VWR ;
- Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à 0.2% : VWR ;
- Acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) : Sigma Aldrich ;
- Dodécyl Sulfate de Sodium (SDS) à 8.1% : Fisher ;
- Tampon phosphate à pH=7.4 ;
- Eau distillé.

A. Dosage de malondialdéhyde (MDA) :

• **Principe :**

La détermination des TBARS (Thio Barbituric Acid réactive Substance) a été effectuée selon la méthode de **YAGI** modifiée par **SESS** et **coll (1992)**. Il s'agit d'une méthode de dosage indirecte des radicaux libres. Elle mesure les substances issues de la lipopéroxydation et réagissant avec l'acide thiobarbiturique (TBA). Son principe est le suivant : chaque molécule de Malondialdéhyde (MDA) issue de la lipopéroxydation réagit avec deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA). La réaction s'effectue en milieu acide, à chaud et conduit à la formation d'un complexe de couleur rose susceptible d'un dosage spectrophotométrique à une longueur d'onde 532 nm. D'autres aldéhydes issus de la lipopéroxydation réagissent de la même manière. La coloration obtenue correspond à l'ensemble des substances réagissant (TBARS), cependant, les résultats sont exprimés en malondialdéhyde (MDA) [184].

• **Mode opératoire :**

- Dans des tubes à vis, déposer 375µL de TBA (0,8%) + 375µL d'acide Acétique (20%) + 50 µL de SDS (8,1%) + 100µL d'eau distillée + 100µL de surnageant cellulaire.
- Agitation pendant 10 secondes à l'aide de vortex.
- Chauffage à 100°C dans un bain marie pendant 1 heure (réaction en milieu acide et chaud).
- Refroidissement brutal à +4°C (permet l'arrêt de la réaction).
- Centrifugation à 3000 tours/mn pendant 10 mn.
- Mesure de l'absorbance à l'aide spectrophotomètre UV-Visible à 532 nm.

- **Expression des résultats :**

Les concentrations du MDA sont exprimées en $\mu\text{mol/L}$. Le calcul se fait en utilisant la loi de

Beer-Lambert : $A = \epsilon \cdot l \cdot C$

A : Absorbance

ϵ_{MDA} : Coefficient d'extinction molaire du MDA = $156 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$

l : Trajet optique (cm) = 0,625 cm.

C : Concentration de la substance dans la solution.

B. Mesure du glutathion (GSH) :

- **Principe :**

Le dosage du glutathion (GSH) est déterminé par la méthode colorimétrique d'**Ellman (1959)**. Le dosage du GSH se fait selon une réaction mettant en jeu le groupement sulfhydrile du GSH. En effet ce dernier réagit avec l'acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) en produisant un composé jaune : l'acide 5-thio-2-nitrobenzoïque (TNB). La mesure de son absorbance à 405 nm permet de connaître le taux de GSH dans l'échantillon [185].

- **Mode opératoire :**

- Dans chaque puits de microplaque, déposer 100 μL de tampon GSH (pH= 7,1) + 50 μL de DNTB ;
- Addition de 50 μL de surnageant cellulaire ;
- Agitation pendant 10 mn ;
- Incubation à 37°C pendant 20 mn ;
- Lecture de l'absorbance à 405 nm.

- **Expression des résultats :**

Les concentrations du GSH sont exprimées en mmol/L . Le calcul se fait en utilisant la loi de

Beer-Lambert : $A = \epsilon \cdot l \cdot C$

C. Evaluation de l'activité enzymatique de la catalase (CAT) :**• Principe :**

L'activité enzymatique de CAT est déterminée par la méthode de **Clairborne (1985)**. Le principe est basé sur la disparition de H_2O_2 en présence de la source enzymatique à 25°C selon la réaction suivante [186]:

Catalase**• Mode opératoire :**

Pour l'évaluation de l'activité enzymatique de CAT, un mélange est constitué de 950 μL de tampon phosphate (KH_2PO_4 , 50 mM, pH 7,4), 50 μL de surnageant cellulaire, et 500 μL de H_2O_2 ajouté juste avant la lecture. L'absorbance est lue à 240 nm chaque 30 secondes pendant 2 minutes.

• Expression des résultats :

L'activité enzymatique est calculée en terme d'unité internationale par minute et par millilitre de liquide (UI / min/mL de liquide).

$$K = \frac{2,3}{\Delta t} \log \frac{A_1}{A_2}$$

K : la constante de vitesse de disparation de H_2O_2

A1 : absorbance optique au temps 1

A2 : absorbance optique au temps 2

Δt : Intervalle de temps en minute

$$U = \frac{K}{V}$$

V : volume de surnageant utilisé en mL.

U : activité enzymatique de la catalase.

III.2. Résultats :

III.2.1. Etude In vivo:

III.2.1.1. Résultats de l'essai de la toxicité aiguë :

Tableau 28: Résultats de l'essai de toxicité aiguë d'Atractyloside chez la souris

Lots	I	II	III	IV	V	VI
Doses (mg/kg/per os)	50,00	75,00	100,00	150	200	250
Nombre d'animaux par lot	06	06	06	06	06	06
Nombre d'animaux morts	00	01	02	03	06	06
% de morts	00	16,66	33,33	50	100	100
a	25	25	50	50	50	50
b	0,50	1,50	2,50	4,50	6,00	6,00
ab	12,5	37,5	125	225	300	300
a : différence entre deux doses successives b : moyenne de morts entre deux doses successives n : nombre moyen d'animaux par lot						

III.2.1.2. Détermination de la DL50 selon la méthode KARBER et BEHRENS :

- $\Sigma ab/n=700/6=116,7$
- $DL50=DL100-(\Sigma ab/n)=83,3\text{mg/kg/per os}$

DL50=83, 3 mg/kg/per os

III.2.1.3. Détermination de la DL50 selon la méthode MILLER et TAINTER :

- Correction du 0% : $Y_0=50/6=8,33\%$
- Correction du 100% : $Y_{100}= (100 \times 6 - 50)/6=91,66\%$
- DL50 graphique: **115 mg/kg/per os**
- l'écart type : $\sigma=(DL_{84}-DL_{16})/2=(200-67)/2=66,5$
- L'écart type à la moyenne : $\delta=2 \sigma / \text{racine carrée } 2N'=2 \times 66,5 / \text{racine carrée } 2 \times 18=22,16$

DL50=115±22,16 mg/kg/per os

Lors de cette étude de la toxicité aiguë à dose unique par voie orale chez les souris, nous avons remarqué une action sédatrice après l'administration de l'Atractyloside qui disparaît plus ou moins vite en fonction de la concentration ingérée. Par contre à partir de la dose de 200 mg/kg, juste après l'administration, les souris ont présenté des torsions abdominales et sont restées inertes jusqu'à la mort.

Tableau 29: Récapitulatif des différentes manifestations cliniques observées chez les souris traitées par voie orale par différentes doses d'Atractyloside

Temps d'observation (jours)	Manifestations cliniques générales observées avec les différentes doses d'Atractyloside (mg/kg/per os)						
	00 (témoin)	50.00	75.00	100.00	150	200	250
J ₁	Absence d'effets observés, gain pondéral	Absence d'effets observés, évolution pondérale stationnaire	Absence d'effets observés, évolution pondérale stationnaire	Hypoactivité, anorexie, régression pondérale chez toutes les souris	Hypoactivité, anorexie, régression pondérale chez toutes les souris	Hypoactivité, anorexie, régression pondérale chez toutes les souris	Hypoactivité, anorexie, régression pondérale chez toutes les souris
J ₂	Idem	Idem	Hypoactivité anorexie, régression pondérale chez toutes les souris	Idem	Idem	Idem + mort d'une souris	Idem + mort de 03 souris
J ₃	Idem	Idem	Idem	Idem	Idem + mort d'une souris	Idem + mort de 02 souris	Idem + mort d'une souris
J ₄	Idem	Idem	Idem	Idem	Hypoactivité, anorexie, régression pondérale chez les souris restantes	Idem + mort d'une souris	Idem + mort de 02 souris
		Absence d'effets			Idem +	Idem +	

J₅	Idem	observés, gain pondéral	Idem	Idem	mort d'une souris	mort d'une souris	//
J₆	Idem	Idem	Idem + mort d'une souris	Idem + mort d'une souris	Idem + mort d'une souris	Idem + mort d'une souris	//
J₇	Idem	Idem	Hypoactivit éanorexie, régression pondérale chez les souris restantes	Idem + mort d'une souris	Absence d'effets observés, gain pondéral	//	//
J₈	Idem	Idem	Regain de vitalité, évolution pondérale stationnaire	Regain de vitalité, évolution pondérale stationnaire	Regain de vitalité, évolution pondérale stationnaire	//	//
J₉	Idem	Idem	Idem	idem	Idem	//	//
J₁₀	Idem	Idem	Absence d'effets observés, gain pondéral	idem	Idem	//	//
J₁₁	Idem	Idem	Idem	idem		//	//
J₁₂	Idem	Idem	Idem	Absence d'effets observés, gain pondéral	//	//	//
J₁₃	Idem	Idem	Idem	Idem	//	//	// //
J₁₄	Idem	Idem	Idem	Idem	//	//	//

III.2.2. Etude in vitro:**III.2.2.1. Résultats des essais de cytotoxicité :****A. Résultats de l'essai de cytotoxicité in vitro d'Atractyloside sur les cellules RD :****Tableau 30: Résultats de l'essai de cytotoxicité in vitro d'Atractylosidesur les cellules RD**

Concentrations (mg/mL)	24 heures d'incubation			48 heures d'incubation		
	Densité optique	Viabilité (%)	Cytotoxicité (%)	Densité optique	Viabilité (%)	Cytotoxicité (%)
00 (témoin)	0,142	100	00	0,142	100	00
	0,141					
	0,135					
Moyenne	0,139			0,246		
0,05	0,136	100	00	0,208	87,39	12,61
	0,154					
	0,134					
Moyenne	0,141			0,215		
0,25	0,131	100	00	0,204	84,56	15,44
	0,140					
	0,154					
Moyenne	0,141			0,208		
0,5	0,135	97,12	2,88	0,190	72,77	27,23
	0,126					
	0,144					
Moyenne	0,135			0,179		
2,00	0,107	75,54	24,46	0,146	60,17	39,83
	0,095					
	0,115					
Moyenne	0,105			0,148		
3,00	0,075	63,31	36,69	0,148	59,35	40,65
	0,076					
	0,114					
Moyenne	0,088			0,146		
6,00	0,056	38,85	61,15	0,051	24,80	75,20
	0,035			0,073		

	0,072			0,060		
Moyenne	0,054			0,061		

Tableau 31: Récapitulatif des résultats de la cytotoxicité d'Atractylosidesur les cellules RD

Concentrations (mg/mL)	Cytotoxicité (%)	
	Après 24 heures d'incubation	Après 48 heures d'incubation
00	00	00
0,05	00	12,61
0,25	00	15,44
0,5	2,88	27,23
2,00	24,46	39,83
3,00	36,69	40,65
6,00	61,15	75,20

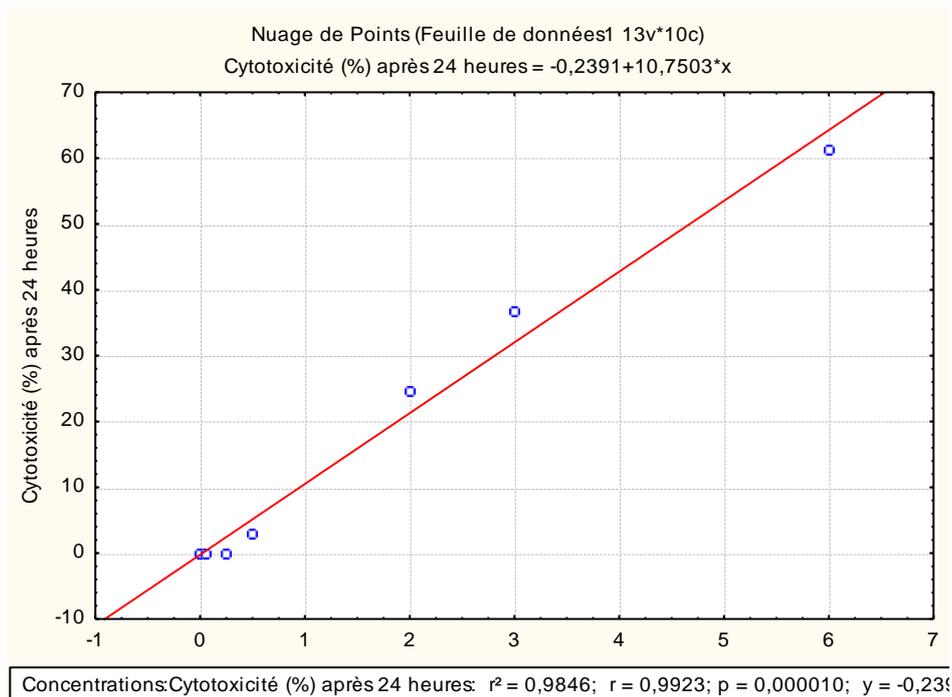


Figure 58: Cytotoxicité de l'Atractylosidesur les cellules RD après 24 heures d'incubation.

En utilisant le logiciel STATISTICA version 6, la concentration inhibitrice 50% (CI₅₀) peut être calculée par régression linéaire.

Equation de la droite : $y = -0,23 + 10,75 x$

Coefficient de corrélation : $r = 0,9923$

Concentration inhibitrice 50% : $CI_{50} = [50 - (-0,23)] / 10,75$

$CI_{50} = 4,67 \text{ mg/mL}$

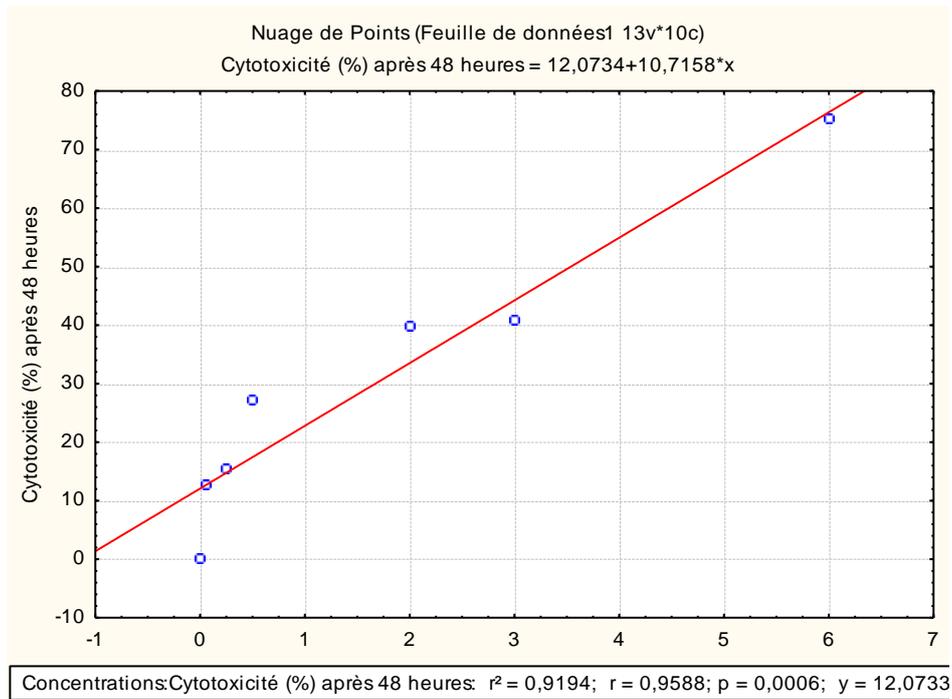


Figure 59: Cytotoxicité de l’Atractyloside sur les cellules RD après 48 heures d’incubation

En utilisant le logiciel STATISTICA version 6, la concentration inhibitrice 50% (CI_{50}) peut être calculée par régression linéaire.

Equation de la droite : $y = 12,07 + 10,71 x$

Coefficient de corrélation : $r = 0,9588$

Concentration inhibitrice 50% : $CI_{50} = [50 - 12,07] / 10,71$

$CI_{50} = 3,54 \text{ mg/mL}$

Tableau 32: Les CI_{50} d'Atractyloside sur cellules RD à différents temps d'incubation

CI_{50} d'attractyloside sur cellules RD (mg/mL)	
Après 24 heures d'incubation	Après 48 heures d'incubation
4,67	3,54

L'augmentation du temps de contact des cellules RD avec l'attractyloside a augmenté la cytotoxicité de ce dernier.

B. Résultats de l'essai de cytotoxicité in vitro d'Atractyloside sur les cellules A549 :**Tableau 33: Résultats de l'essai de cytotoxicité in vitro d'Atractyloside sur les cellules A549**

Concentrations (mg/mL)	24 heures d'incubation			48 heures d'incubation		
	Densité optique	Viabilité (%)	Cytotoxicité (%)	Densité optique	Viabilité (%)	Cytotoxicité (%)
00 (témoin)	0,422	100	00	0,448	100	00
	0,432			0,446		
	0,316			0,429		
Moyenne	0,390			0,441		
0,05	0,424	105,4	00	0,398	90,02	09,98
	0,401			0,387		
	0,408			0,405		
Moyenne	0,411			0,397		
0,25	0,418	99,74	0,26	0,378	84,58	15,42
	0,364			0,381		
	0,384			0,360		
Moyenne	0,389			0,373		
0,5	0,340	89,49	10,51	0,327	70,29	27,23
	0,350			0,314		
	0,372			0,289		
Moyenne	0,349			0,310		
2,00	0,314	85,12	14,88	0,259	53,89	46,11
	0,325			0,211		
	0,357			0,243		
Moyenne	0,332			0,237		
3,00	0,272	71,53	28,46	0,198	47,16	52,83
	0,298			0,215		
	0,266			0,213		
Moyenne	0,279			0,208		
6,00	0,254	64,10	35,89	0,176	37,56	62,43
	0,245			0,167		
	0,250			0,154		
Moyenne	0,250			0,061		

9,00	0,164	44,61	55,39	0,112	25,92	74,07
	0,178			0,127		
	0,180			0,104		
Moyenne	0,174			0,061		

Tableau 34: Récapitulatif des résultats de la cytotoxicité d’Atractyloside sur les cellules A549

Concentrations (mg/mL)	Cytotoxicité (%)	
	Après 24 heures d’incubation	Après 48 heures d’incubation
00	00	00
0,05	00	09,98
0,25	0,26	15,42
0,5	10,51	27,23
2,00	14,88	46,11
3,00	28,46	52,83
6,00	35,89	62,43
9,00	55,39	74,07

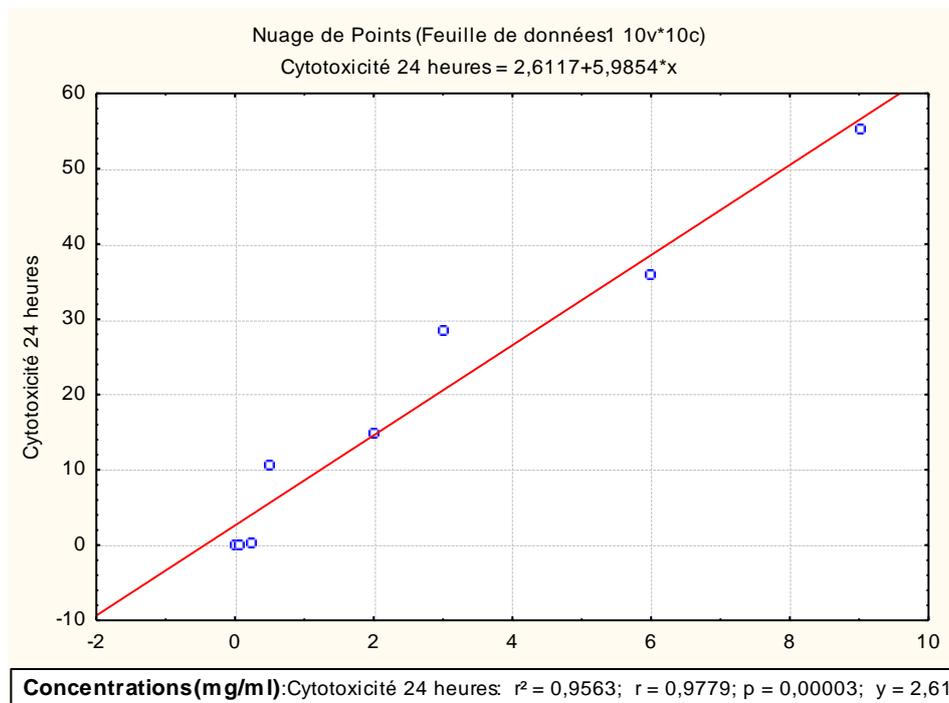


Figure 60: Cytotoxicité de l’Atractylosidesur les cellules A549après 24 heures d’incubation

Equation de la droite : $y = 2,61 + 5,98 x$

Coefficient de corrélation : $r = 0,9779$

Concentration inhibitrice 50% : $CI_{50} = [50 - 2,61] / 5,98$

$$CI_{50} = 7,92 \text{ mg/mL}$$

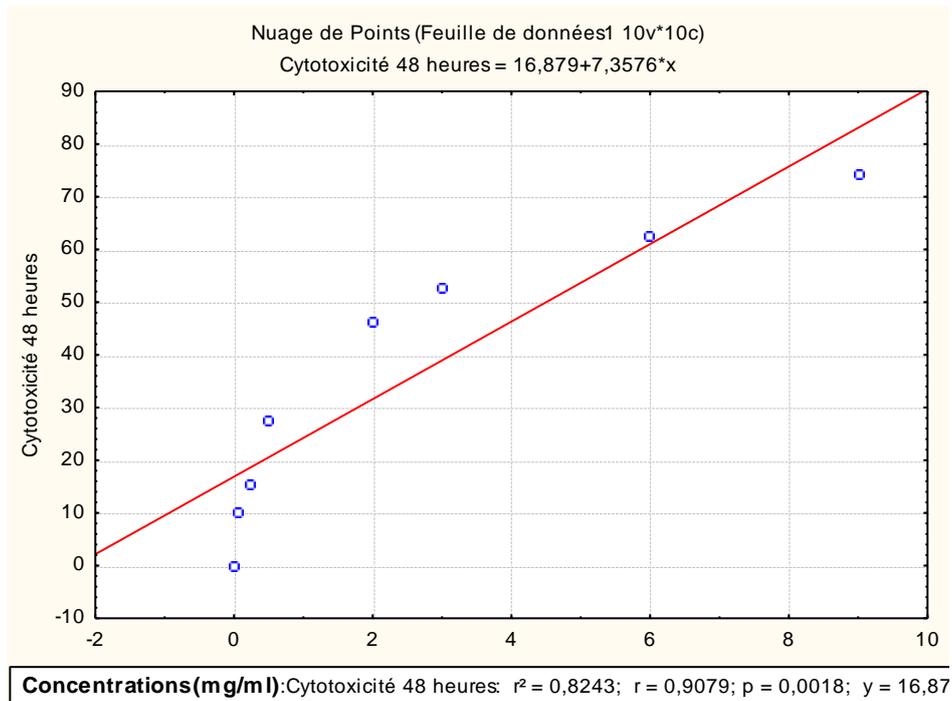


Figure 61: Cytotoxicité de l'Atractyloside sur les cellules A549 après 48 heures d'incubation

Equation de la droite : $y = 16,87 + 7,36 x$

Coefficient de corrélation : $r = 0,9079$

Concentration inhibitrice 50% : $CI_{50} = [50 - 16,87] / 7,36$

$$CI_{50} = 4,50 \text{ mg/mL}$$

Tableau 35: Les CI₅₀ d'Atractyloside sur les cellules A549 à différents temps d'incubation

CI₅₀ d'attractyloside sur cellules A549(mg/mL)	
Après 24 heures d'incubation	Après 48 heures d'incubation
7,92	4,50

L'augmentation du temps de contact des cellules A549 avec l'attractyloside a augmenté la cytotoxicité de ce dernier.

C. Résultats de l'essai de cytotoxicité in vitro d'Atractyloside sur les cellules HEP2 :

Tableau 36: Résultats de l'essai de cytotoxicité in vitro d'Atractyloside sur les cellules HEP2

Concentrations (mg/mL)	24 heures d'incubation			48 heures d'incubation		
	Densité optique	Viabilité (%)	Cytotoxicité (%)	Densité optique	Viabilité (%)	Cytotoxicité (%)
00 (témoin)	0,473 0,476 0,480	100	00	0,533 0,498 0,511	100	00
Moyenne	0,496			0,514		
0,05	0,471 0,469 0,469	94,76	05,24	0,378 0,365 0,389	77,24	22,76
Moyenne	0,470			0,397		
0,25	0,459 0,481 0,453	93,55	06,45	0,354 0,376 0,345	72,56	27,44
Moyenne	0,464			0,373		
0,5	0,453 0,442 0,453	90,52	09,48	0,308 0,301 0,289	60,31	39,69
Moyenne	0,449			0,310		
2,00	0,474 0,444 0,451	91,93	08,07	0,259 0,282 0,272	46,11	53,89
Moyenne	0,456			0,237		
3,00	0,460 0,439 0,454	90,92	09,08	0,232 0,238 0,207	40,46	59,54
Moyenne	0,451			0,208		
6,00	0,414 0,405 0,400 0,406	81,85	18,15	0,216 0,197 0,194 0,061	39,36	60,64

9,00	0,311	61,49	55,39	0,144	29,57	70,43
	0,313			0,157		
	0,296			0,155		
Moyenne	0,305			0,152		

Tableau 37: Récapitulatif des résultats de la cytotoxicité d'Atractyloside sur les cellules HEP2

Concentrations (mg/mL)	Cytotoxicité (%)	
	Après 24 heures d'incubation	Après 48 heures d'incubation
00	00	00
0,05	05,24	22,76
0,25	06,45	27,44
0,5	09,48	39,69
2,00	08,07	53,89
3,00	09,08	59,54
6,00	18,15	60,64
9,00	55,39	70,43

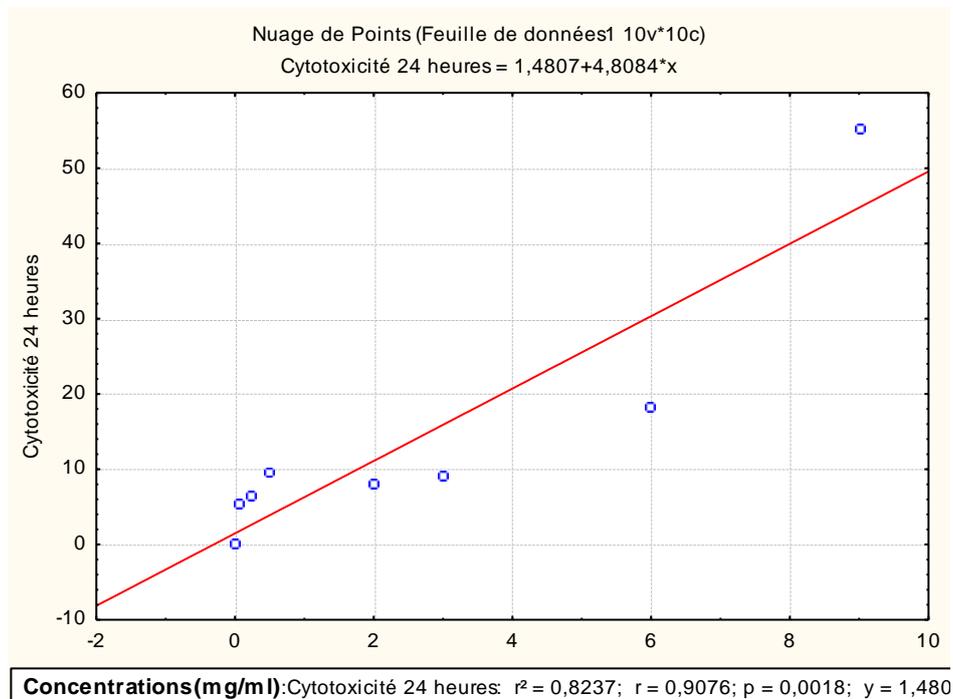


Figure 62: Cytotoxicité de l'Atractyloside sur les cellules HEP2 après 24 heures d'incubation

Equation de la droite : $y = 1,48 + 4,8 x$

Coefficient de corrélation : $r = 0,9076$

Concentration inhibitrice 50% : $CI_{50} = [50 - 1,48] / 4,8$

$CI_{50} = 10,1 \text{ mg/mL}$

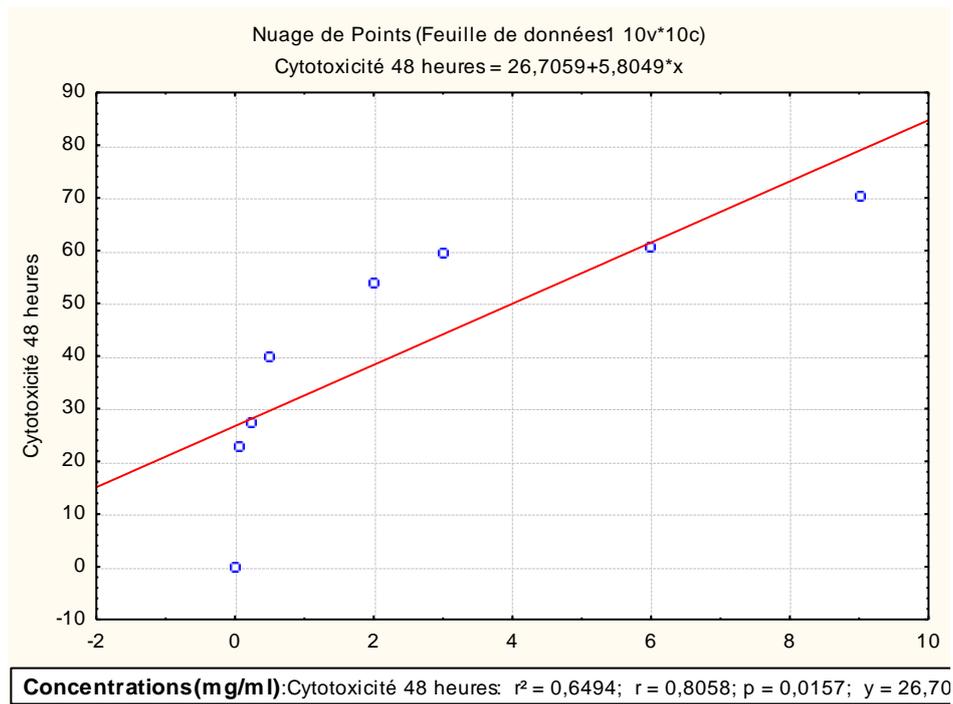


Figure 63: Cytotoxicité d’Atractylosidesur les cellules HEP2après 48 heures d’incubation

Equation de la droite : $y = 26,7 + 5,8 x$

Coefficient de corrélation : $r = 0,8058$

Concentration inhibitrice : $CI_{50} = [50 - 26,7] / 5,8$

$CI_{50} = 4,01 \text{ mg/mL}$

Tableau 38: Les CI_{50} d'Atractyloside sur cellules HEP2 à différents temps d'incubation

CI_{50} d'attractyloside sur cellules HEP2(mg/mL)	
Après 24 heures d'incubation	Après 48 heures d'incubation
10,01	4,01

L'augmentation du temps de contact des cellules HEP2 avec l'attractyloside a augmenté la cytotoxicité de ce dernier.

Tableau 39: Récapitulatif des résultats des essais de cytotoxicité in vitro de l'Atractyloside sur les différentes lignées cellulaires

Lignées cellulaires utilisées dans les essais de cytotoxicité in vitro	CI_{50}(mg/mL)	
	Temps d'incubation(heures)	
	24	48
RD	4,67	3,54
A549	7,92	4,50
HEP2	10,01	4,01

II.2.2.2. Résultats de l'étude de quantification des bio-marqueurs du stress oxydatif :**A. Evolution des bio-marqueurs du stress oxydatif dans les cellules RD :**

L'évolution des bio-marqueurs du stress oxydatif dans les cellules RD après 24 et 48 heures d'incubation avec différentes concentrations d'atractyloside est présentée dans les tableaux 40 et 41.

Tableau 40: Evolution des concentrations du malondialdéhyde (MDA) dans les cellules RD après 24 et 48 heures d'incubation avec différentes concentrations d'Atractyloside

Concentrations ATR (mg/mL)	24 heures d'incubation		48 heures d'incubation	
	Densité optique	[MDA] (moles/L)	Densité optique	[MDA] (moles/L)
00 (témoin)	0,0332	<u>0,34</u>	0,0399	<u>0,41</u>
	0,0399	<u>0,41</u>	0,0458	<u>0,47</u>
	0,0351	<u>0,36</u>	0,0371	<u>0,38</u>
Moyenne		<u>0,37</u>		<u>0,42</u>
0,05	0,0361	<u>0,41</u>	0,0293	<u>0,30</u>
	0,0429	<u>0,44</u>	0,0312	<u>0,32</u>
	0,0371	<u>0,38</u>	0,0390	<u>0,40</u>
Moyenne		<u>0,41</u>		<u>0,34</u>
0,25	0,0341	<u>0,35</u>	0,0341	<u>0,35</u>
	0,0351	<u>0,36</u>	0,0390	<u>0,40</u>
	0,0302	<u>0,31</u>	0,0351	<u>0,36</u>
Moyenne		<u>0,34</u>		<u>0,37</u>
0,5	0,0488	<u>0,50</u>	0,0488	<u>0,50</u>
	0,0468	<u>0,48</u>	0,0478	<u>0,49</u>
	0,0536	<u>0,55</u>	0,0410	<u>0,42</u>
Moyenne		<u>0,51</u>		<u>0,47</u>
2,00	0,0624	<u>0,64</u>	0,0556	<u>0,57</u>
	0,0575	<u>0,59</u>	0,0536	<u>0,55</u>
	0,0614	<u>0,63</u>	0,0605	<u>0,62</u>
Moyenne		<u>0,62</u>		<u>0,58</u>
3,00	0,176	<u>1,8</u>	0,0722	<u>0,74</u>
	0,185	<u>1,9</u>	0,0692	<u>0,71</u>
	0,224	<u>2,3</u>	0,0692	<u>0,71</u>

Moyenne		<u>2</u>		<u>0,72</u>
6,00	0,107	<u>1,1</u>	0,0975	<u>1,00</u>
	0,156	<u>1,6</u>	0,0975	<u>1,00</u>
	0,185	<u>1,9</u>	0,0917	<u>0,94</u>
Moyenne		<u>1,2</u>		<u>0,98</u>

Tableau 41: Evolution des concentrations du glutathion réduit (GSH) dans les cellules RD après 24 et 48 heures d'incubation avec différentes concentrations d'Atractyloside

Concentrations (mg/mL)	24 heures d'incubation		48 heures d'incubation	
	Densité optique	[GSH] (moles/L)	Densité optique	[GSH] (moles/L)
00 (témoin)	0,1	<u>11,80</u>	0,112	<u>13,20</u>
	0,108	<u>12,70</u>	0,108	<u>12,70</u>
	0,103	<u>12,10</u>	0,106	<u>12,50</u>
Moyenne		<u>12,20</u>		<u>12,80</u>
0,05	0,116	<u>13,60</u>	0,116	<u>13,67</u>
	0,118	<u>13,85</u>	0,113	<u>13,24</u>
	0,110	<u>12,99</u>	0,115	<u>13,53</u>
Moyenne		<u>13,48</u>		<u>13,48</u>
0,25	0,0978	<u>11,50</u>	0,101	<u>11,90</u>
	0,101	<u>11,84</u>	0,108	<u>12,67</u>
	0,0882	<u>10,38</u>	0,106	<u>12,48</u>
Moyenne		<u>11,24</u>		<u>12,35</u>
0,5	0,0948	<u>11,15</u>	0,0978	<u>11,50</u>
	0,0782	<u>09,20</u>	0,0825	<u>09,70</u>
	0,0718	<u>08,45</u>	0,0817	<u>09,61</u>
Moyenne		<u>09,60</u>		<u>10,27</u>
2,00	0,0752	<u>08,85</u>	0,0816	<u>09,60</u>
	0,0826	<u>09,72</u>	0,0842	<u>09,90</u>
	0,0564	<u>06,63</u>	0,0836	<u>09,84</u>
Moyenne		<u>08,40</u>		<u>09,78</u>
3,00	0,0537	<u>06,32</u>	0,0604	<u>07,10</u>
	0,0463	<u>05,45</u>	0,0493	<u>05,80</u>
	0,0387	<u>04,55</u>	0,0546	<u>06,42</u>
Moyenne		<u>05,44</u>		<u>06,44</u>
6,00	0,0265	<u>03,12</u>	0,0349	<u>04,10</u>
	0,0179	<u>02,10</u>	0,0285	<u>03,35</u>
	0,0258	<u>03,03</u>	0,0247	<u>02,90</u>
Moyenne		<u>02,75</u>		<u>03,45</u>

Tableau 42: Evolution de l'activité enzymatique de la catalase dans les cellules RD après 24 et 48 heures d'incubation avec différentes concentrations d'Atractyloside

Après 24 heures d'incubation							
Concentrations ATR (mg/mL)	Densité Optique mesurée à différents temps					Vitesse de disparition de H ₂ O ₂ (10 ⁻³)	Activité enzymatique de la CAT (10 ⁻¹ UI/mL)
	0 min	0,5 min	1 min	1,5 min	2 min		
00,00	0,465	<u>0,461</u>	0,459	0,450	<u>0,446</u>	21,42	04,28
00,05	0,458	<u>0,455</u>	0,448	0,446	<u>0,441</u>	19,89	03,98
00,25	0,471	<u>0,470</u>	0,467	0,463	<u>0,459</u>	15,30	03,06
00,50	0,468	<u>0,458</u>	0,456	0,452	<u>0,448</u>	13,77	02,75
02,00	0,452	<u>0,449</u>	0,446	0,443	<u>0,442</u>	09,18	01,83
03,00	0,459	<u>0,456</u>	0,454	0,452	<u>0,450</u>	07,65	01,53
06,00	0,467	<u>0,465</u>	0,464	0,463	<u>0,461</u>	04,59	00,92
Après 48 heures d'incubation							
Concentrations ATR (mg/mL)	Densité Optique mesurée à différents temps					Vitesse de disparition de H ₂ O ₂ (10 ⁻³)	Activité enzymatique de la CAT (10 ⁻¹ UI/mL)
	0 min	0,5 min	1 min	1,5 min	2 min		
00,00	0,465	<u>0,460</u>	0,457	0,451	<u>0,448</u>	16,83	03,36
00,05	0,462	<u>0,460</u>	0,458	0,455	<u>0,450</u>	13,77	02,75
00,25	0,475	<u>0,474</u>	0,470	0,468	<u>0,465</u>	12,24	02,45
00,50	0,459	<u>0,451</u>	0,449	0,447	<u>0,444</u>	09,18	01,83
02,00	0,470	<u>0,468</u>	0,467	0,465	<u>0,463</u>	07,03	01,40
03,00	0,452	<u>0,451</u>	0,450	0,448	<u>0,447</u>	05,81	01,16
06,00	0,457	<u>0,456</u>	0,454	0,453	<u>0,452</u>	05,81	01,16

Tableau 43: Récapitulatif de l'évolution des biomarqueurs du stress oxydatif dans les cellules RD après 24 heures d'incubation avec différentes concentrations d'Atractyloside

Concentrations d'attractyloside (mg/mL)	00	0,05	0,25	0,5	2,00	3,00	6,00
Concentrations du MDA (moles/L)	0,37	0,41	0,34	0,51	0,62	2,00	1,20
Concentrations du glutathion réduit (moles/L)	12,2	13,48	11,4	09,6	08,4	05,44	2,75
Activité de la catalase (10^{-1} UI/mL)	04,28	03,98	03,06	02,75	01,83	01,53	00,92

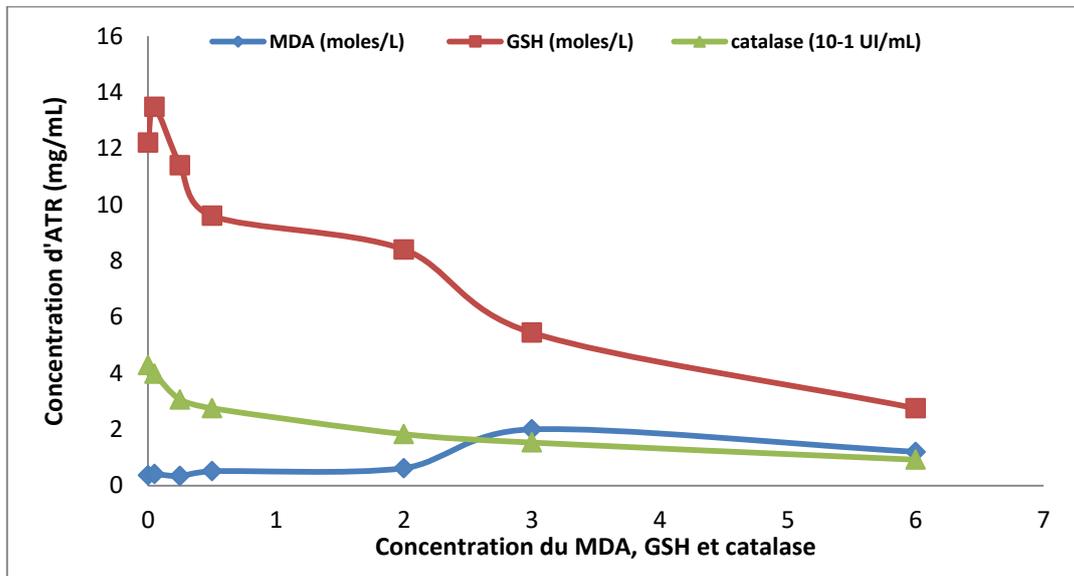


Figure 64: Evolutions des biomarqueurs du stress oxydatif dans les cellules RD après 24 heures d'incubation avec l'Atractyloside

Tableau 44: Tableau récapitulatif de l'évolution des biomarqueurs du stress oxydatif dans les cellules RD après 48 heures d'incubation avec différentes concentration d'Atractyloside

Concentrations d'attractyloside (mg/mL)	00	0,05	0,25	0,5	2,00	3,00	6,00
Concentrations du MDA (moles/L)	0,42	0,34	0,37	0,47	0,58	0,72	0,98
Concentrations du glutathion réduit (moles/L)	12,8	13,48	12,35	10,27	09,78	06,4	3,45
Activité de la catalase (10⁻¹ UI/mL)	03,36	02,75	02,45	01,83	01,40	01,16	01,16

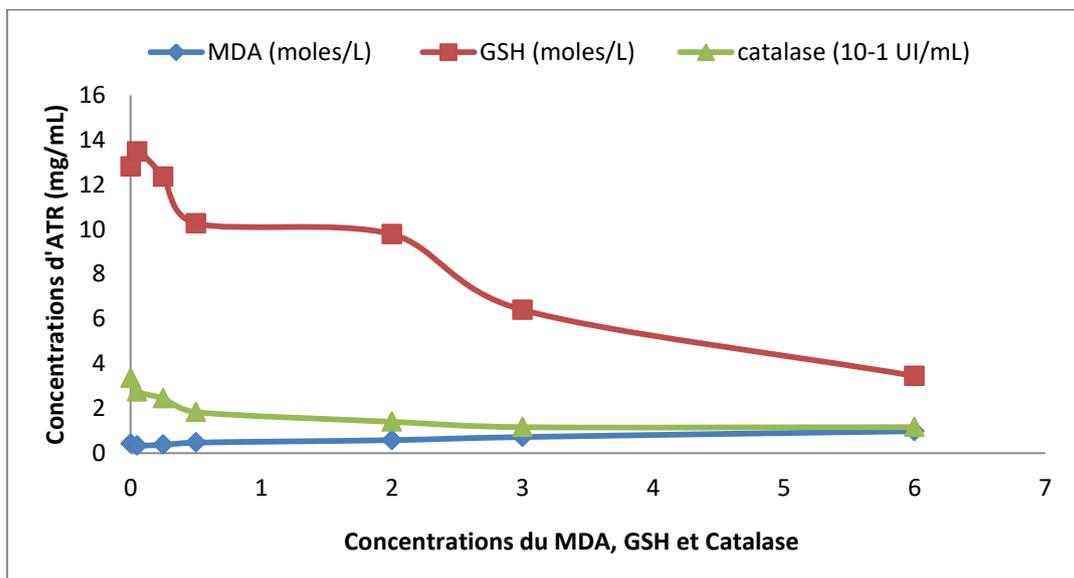


Figure 65: Evolutions des biomarqueurs du stress oxydatif dans les cellules RD après 48 heures d'incubation avec l'Atractyloside

B. Evolution des bio-marqueurs du stress oxydatif dans les cellules A549 :

L'évolution du malondialdéhyde dans les cellules A549 après 24 et 48 heures d'incubation avec différentes concentrations d'atractyloside est présentée dans le tableau 45.

Tableau 45: Evolution des concentrations du malondialdéhyde (MDA) dans les cellules A549 après 24 et 48 heures d'incubation avec différentes concentrations d'Atractyloside

Concentrations (mg/mL)	24 heures d'incubation		48 heures d'incubation	
	Densité optique	[MDA] (moles/L)	Densité optique	[MDA] (moles/L)
00 (témoin)	0,0380	<u>0,39</u>	0,0273	<u>0,28</u>
	0,0380	<u>0,39</u>	0,0380	<u>0,39</u>
	0,0322	<u>0,33</u>	0,0341	<u>0,35</u>
Moyenne		<u>0,37</u>		<u>0,34</u>
0,05	0,0390	<u>0,40</u>	0,0322	<u>0,33</u>
	0,0380	<u>0,39</u>	0,0361	<u>0,37</u>
	0,0283	<u>0,29</u>	0,0312	<u>0,32</u>
Moyenne		<u>0,36</u>		<u>0,34</u>
0,25	0,0468	<u>0,48</u>	0,0390	<u>0,40</u>
	0,0410	<u>0,42</u>	0,0351	<u>0,36</u>
	0,0410	<u>0,42</u>	0,0341	<u>0,35</u>
Moyenne		<u>0,44</u>		<u>0,37</u>
0,5	0,0546	<u>0,56</u>	0,0497	<u>0,51</u>
	0,0468	<u>0,48</u>	0,0458	<u>0,47</u>
	0,0536	<u>0,55</u>	0,0507	<u>0,52</u>
Moyenne		<u>0,53</u>		<u>0,50</u>
2,00	0,0926	<u>0,95</u>	0,0702	<u>0,72</u>
	0,0819	<u>0,84</u>	0,0634	<u>0,65</u>
	0,0799	<u>0,82</u>	0,0653	<u>0,67</u>
Moyenne		<u>0,87</u>		<u>0,68</u>
3,00	0,0848	<u>0,87</u>	0,0780	<u>0,80</u>
	0,0946	<u>0,97</u>	0,0917	<u>0,94</u>
	0,0839	<u>0,86</u>	0,0848	<u>0,87</u>
Moyenne		<u>0,90</u>		<u>0,87</u>
6,00	0,151	<u>1,55</u>	0,0907	<u>0,93</u>
	0,132	<u>1,35</u>	0,0907	<u>0,93</u>
	0,127	<u>1,30</u>	0,0965	<u>0,99</u>
Moyenne		<u>1,40</u>		<u>0,95</u>

L'évolution du glutathion réduit dans les cellules A549 après 24 et 48 heures d'incubation avec différentes concentrations d'atractyloside est présentée dans le tableau 46.

Tableau 46: Evolution des concentrations du glutathion réduit (GSH) dans les cellules A549 après 24 et 48 heures d'incubation avec différentes concentrations d'Atractyloside

Concentrations (mg/mL)	24 heures d'incubation		48 heures d'incubation	
	Densité optique	[GSH] (moles/L)	Densité optique	[GSH] (moles/L)
00 (témoin)	0,0931	<u>10,95</u>	0,105	<u>12,37</u>
	0,0867	<u>10,20</u>	0,0915	<u>10,76</u>
	0,0931	<u>10,95</u>	0,0864	<u>10,17</u>
Moyenne		<u>10,70</u>		<u>11,30</u>
0,05	0,0921	<u>10,84</u>	0,0971	<u>11,42</u>
	0,0958	<u>11,27</u>	0,104	<u>12,18</u>
	0,0931	<u>10,95</u>	0,0876	<u>10,30</u>
Moyenne		<u>11,00</u>		<u>11,30</u>
0,25	0,103	<u>12,10</u>	0,096	<u>11,29</u>
	0,0865	<u>10,18</u>	0,0982	<u>11,56</u>
	0,101	<u>11,92</u>	0,0952	<u>11,20</u>
Moyenne		<u>11,40</u>		<u>11,35</u>
0,5	0,0791	<u>09,30</u>	0,0859	<u>10,10</u>
	0,0694	<u>08,16</u>	0,0820	<u>09,65</u>
	0,0709	<u>08,34</u>	0,0940	<u>11,06</u>
Moyenne		<u>08,60</u>		<u>10,27</u>
2,00	0,0694	<u>08,17</u>	0,0816	<u>09,60</u>
	0,0638	<u>07,50</u>	0,0678	<u>07,98</u>
	0,0734	<u>08,63</u>	0,0648	<u>07,62</u>
Moyenne		<u>08,10</u>		<u>08,40</u>
3,00	0,0445	<u>05,23</u>	0,0565	<u>06,65</u>
	0,0466	<u>05,48</u>	0,0514	<u>06,05</u>
	0,0390	<u>04,59</u>	0,0499	<u>05,87</u>
Moyenne		<u>05,10</u>		<u>06,19</u>

6,00	0,0302	<u>03,55</u>	0,0350	<u>04,12</u>
	0,0204	<u>02,40</u>	0,0298	<u>03,50</u>
	0,0173	<u>02,03</u>	0,0311	<u>03,66</u>
Moyenne		<u>02,66</u>		<u>03,76</u>

L'évolution de l'activité enzymatique de la catalase dans les cellules A549 après 24 et 48 heures d'incubation avec différentes concentrations d'atractyloside est présentée dans le tableau 47.

Tableau 47: Evolution de l'activité enzymatique de la catalase dans les cellules A549 après 24 et 48 heures d'incubation avec différentes concentrations d'Atractyloside

Après 24 heures d'incubation							
Concentrations ATR (mg/ml)	Densité Optique mesurée à différents temps					Vitesse de disparition de H ₂ O ₂ (10 ⁻³)	Activité enzymatique de la CAT (10 ⁻¹ UI/mL)
	0 min	0,5 min	1 min	1,5 min	2 min		
00,00	0,477	<u>0,469</u>	0,465	0,461	<u>0,455</u>	19,89	03,98
00,05	0,463	<u>0,462</u>	0,459	0,457	<u>0,454</u>	10,71	02,14
00,25	0,468	<u>0,465</u>	0,462	0,459	<u>0,457</u>	10,71	02,14
00,50	0,456	<u>0,454</u>	0,453	0,452	<u>0,450</u>	04,59	00,92
02,00	0,461	<u>0,458</u>	0,455	0,452	<u>0,449</u>	04,59	00,92
03,00	0,470	<u>0,468</u>	0,467	0,465	<u>0,464</u>	04,59	00,92
06,00	0,454	<u>0,452</u>	0,451	0,450	<u>0,449</u>	03,06	00,61
Après 48 heures d'incubation							
Concentrations ATR (mg/mL)	Densité Optique mesurée à différents temps					Vitesse de disparition de H ₂ O ₂ (10 ⁻³)	Activité enzymatique de la CAT (10 ⁻¹ UI/mL)
	0 min	0,5 min	1min	1,5 min	2 min		
00,00	0,472	<u>0,468</u>	0,465	0,461	<u>0,457</u>	15,3	03,06
00,05	0,451	<u>0,450</u>	0,448	0,446	<u>0,444</u>	07,65	01,53
00,25	0,452	<u>0,450</u>	0,449	0,447	<u>0,445</u>	07,34	01,47
00,50	0,467	<u>0,466</u>	0,464	0,462	<u>0,461</u>	06,12	01,22
02,00	0,466	<u>0,465</u>	0,464	0,462	<u>0,461</u>	04,59	00,92
03,00	0,470	<u>0,469</u>	0,467	0,466	<u>0,465</u>	04,59	00,92
06,00	0,455	<u>0,454</u>	0,453	0,452	<u>0,451</u>	03,06	00,61

Tableau 48: Récapitulatif de l'évolution des bio-marqueurs du stress oxydatif dans les cellules A549 après 24 heures d'incubation avec différentes concentrations d'Atractyloside

Concentrations d'attractyloside (mg/mL)	00	0,05	0,25	0,5	2,00	3,00	6,00
Concentrations du MDA (moles/L)	0,37	0,36	0,44	0,53	0,87	0,9	1,4
Concentrations du glutathion réduit (moles/L)	10,7	11,0	11,4	08,6	08,1	05,1	2,66
Activité de la catalase (10⁻¹ UI/mL)	03,98	02,14	02,14	00,92	00,92	00,92	00,61

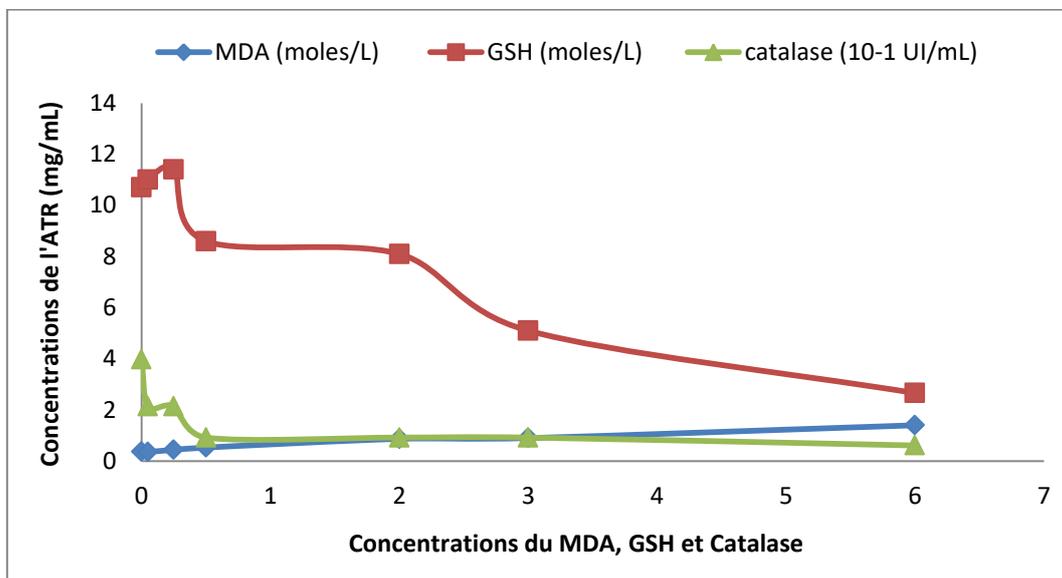


Figure 66: Evolution des biomarqueurs du stress oxydatif dans les cellules A549 après 24 heures d'incubation avec l'Atractyloside

Tableau 49: Tableau récapitulatif de l'évolution des biomarqueurs du stress oxydatif dans les cellules A549 après 48 heures d'incubation avec différentes concentrations d'Atractyloside

Concentrations d'attractyloside (mg/mL)	00	0,05	0,25	0,5	2,00	3,00	6,00
Concentrations du MDA (moles/L)	0,34	0,34	0,37	0,5	0,68	0,87	0,95
Concentrations du glutathion réduit (moles/L)	11,3	11,3	10,35	10,27	08,4	06,19	3,76
Activité de la catalase (10^{-1} UI/mL)	03,06	01,53	01,47	01,22	00,92	00,92	00,61

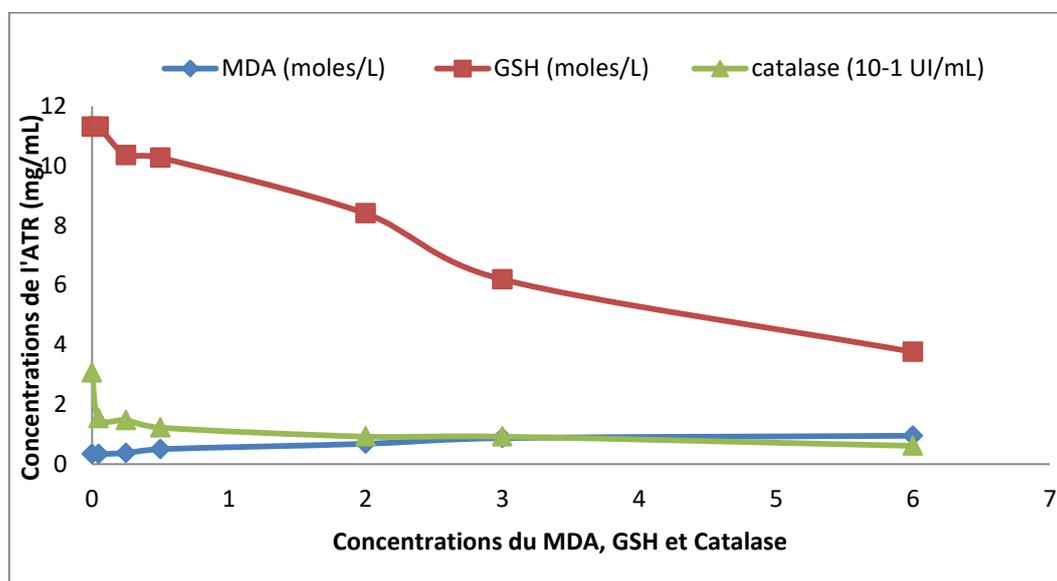


Figure 67: Evolution des biomarqueurs du stress oxydatif dans les cellules A549 après 48 heures d'incubation avec l'Atractyloside

C. Evolution des bio-marqueurs du stress oxydatif dans les cellules HEP2 :

L'évolution du malondialdéhyde (MDA) dans les cellules HEP2 après 24 et 48 heures d'incubation avec différentes concentrations d'atractyloside est présentée dans le tableau 50.

Tableau 50: Evolution des concentrations du malondialdéhyde (MDA) dans les cellules HEP2 après 24 et 48 heures d'incubation avec différentes concentrations d'Atractyloside

Concentrations (mg/mL)	24 heures d'incubation		48 heures d'incubation	
	Densité optique	[MDA] (moles/L)	Densité optique	[MDA] (moles/L)
00 (témoin)	0,0410	<u>0,42</u>	0,0468	<u>0,48</u>
	0,0458	<u>0,47</u>	0,0390	<u>0,40</u>
	0,0419	<u>0,43</u>	0,0429	<u>0,44</u>
Moyenne		<u>0,44</u>		<u>0,44</u>
0,05	0,0361	<u>0,37</u>	0,0361	<u>0,37</u>
	0,0361	<u>0,37</u>	0,0410	<u>0,42</u>
	0,0390	<u>0,40</u>	0,0371	<u>0,38</u>
Moyenne		<u>0,38</u>		<u>0,39</u>
0,25	0,0439	<u>0,45</u>	0,0351	<u>0,36</u>
	0,0429	<u>0,44</u>	0,0468	<u>0,48</u>
	0,0419	<u>0,43</u>	0,0380	<u>0,39</u>
Moyenne		<u>0,44</u>		<u>0,41</u>
0,5	0,0595	<u>0,61</u>	0,0527	<u>0,54</u>
	0,0507	<u>0,52</u>	0,0497	<u>0,51</u>
		<u>0,52</u>	0,0507	<u>0,52</u>
Moyenne		<u>0,55</u>		<u>0,55</u>
2,00	0,0692	<u>0,71</u>	0,0770	<u>0,79</u>
	0,0663	<u>0,68</u>	0,0683	<u>0,70</u>
	0,0751	<u>0,77</u>	0,0683	<u>0,70</u>
Moyenne		<u>0,72</u>		<u>0,73</u>
3,00	0,0965	<u>0,99</u>	0,0917	<u>0,94</u>
	0,0897	<u>0,92</u>	0,0848	<u>0,87</u>
	0,0975	<u>1,0</u>	0,0868	<u>0,89</u>
Moyenne		<u>0,97</u>		<u>0,90</u>

6,00	0,107	<u>1,1</u>	0,146	<u>1,5</u>
	0,0887	<u>0,91</u>	0,141	<u>1,45</u>
	0,0907	<u>0,93</u>	0,122	<u>1,25</u>
Moyenne		<u>0,98</u>		<u>1,40</u>

L'évolution du glutathion réduit (GSH) dans les cellules HEP2 après 24 et 48 heures d'incubation avec différentes concentrations d'atractyloside est présentée dans le tableau 51.

Tableau 51: Evolution des concentrations du glutathion réduit (GSH) dans les cellules HEP2 après 24 et 48 heures d'incubation avec différentes concentrations d'Atractyloside

Concentrations (mg/mL)	24 heures d'incubation		48 heures d'incubation	
	Densité optique	[GSH] (moles/L)	Densité optique	[GSH] (moles/L)
00 (témoin)	0,0918	<u>10,80</u>	0,107	<u>12,65</u>
	0,0859	<u>10,10</u>	0,109	<u>12,82</u>
	0,0825	<u>09,70</u>	0,106	<u>12,44</u>
Moyenne		<u>10,2</u>		<u>12,63</u>
0,05	0,104	<u>12,20</u>	0,0888	<u>10,45</u>
	0,0876	<u>10,30</u>	0,0967	<u>11,38</u>
	0,0893	<u>10,50</u>	1,07	<u>11,85</u>
Moyenne		<u>11,00</u>		<u>11,22</u>
0,25	0,0924	<u>10,87</u>	0,0991	<u>11,67</u>
	0,0905	<u>10,65</u>	0,0969	<u>11,40</u>
	0,0810	<u>09,53</u>	0,101	<u>11,9</u>
Moyenne		<u>10,35</u>		<u>11,65</u>
0,5	0,0841	<u>09,89</u>	0,0909	<u>10,70</u>
	0,0805	<u>09,47</u>	0,0918	<u>10,80</u>
	0,0802	<u>09,44</u>	0,0782	<u>09,2</u>
Moyenne		<u>09,60</u>		<u>10,23</u>
2,00	0,0677	<u>07,97</u>	0,0802	<u>09,44</u>
	0,0603	<u>08,15</u>	0,0731	<u>08,60</u>
	0,0476	<u>05,60</u>	0,0697	<u>08,20</u>
Moyenne		<u>07,24</u>		<u>08,74</u>

3,00	0,0519	<u>06,10</u>	0,0540	<u>06,35</u>
	0,0501	<u>05,89</u>	0,0467	<u>05,50</u>
	0,0664	<u>07,81</u>	0,0506	<u>05,95</u>
Moyenne		<u>06,60</u>		<u>05,93</u>
6,00	0,0268	<u>3,15</u>	0,0353	<u>04,15</u>
	0,0217	<u>02,55</u>	0,0280	<u>03,30</u>
	0,0230	<u>02,70</u>	0,0357	<u>04,20</u>
Moyenne		<u>02,80</u>		<u>03,88</u>

L'évolution de l'activité de la catalase dans les cellules HEP2 après 24 et 48 heures d'incubation avec différentes concentrations d'atractyloside est présentée dans le tableau 52.

Tableau 52: Evolution de l'activité enzymatique de la catalase dans les cellules HEP2 après 24 et 48 heures d'incubation avec différentes concentrations d'Atractyloside

Après 24 heures d'incubation							
Concentrations ATR (mg/mL)	Densité Optique mesurée à différents temps					Vitesse de disparition de H ₂ O ₂ (10 ⁻³)	Activité enzymatique de la CAT (10 ⁻¹ UI/mL)
	0 min	0,5 min	1 min	1,5 min	2 min		
00,00	0,469	<u>0,468</u>	0,465	0,462	<u>0,448</u>	27,54	05,51
00,05	0,457	<u>0,455</u>	0,452	0,449	<u>0,447</u>	10,71	02,14
00,25	0,464	<u>0,462</u>	0,460	0,459	<u>0,458</u>	07,65	01,53
00,50	0,467	<u>0,466</u>	0,464	0,463	<u>0,460</u>	07,65	01,53
02,00	0,467	<u>0,466</u>	0,464	0,462	<u>0,461</u>	06,12	01,22
03,00	0,457	<u>0,455</u>	0,454	0,452	<u>0,451</u>	04,59	00,92
06,00	0,474	<u>0,473</u>	0,472	0,471	<u>0,470</u>	03,06	00,61
Après 48 heures d'incubation							
Concentrations ATR (mg/mL)	Densité Optique mesurée à différents temps					Vitesse de disparition de H ₂ O ₂ (10 ⁻³)	Activité enzymatique de la CAT 10 ⁻¹ (10 ⁻¹ UI/mL)
	0 min	0,5 min	1 min	1,5 min	2 min		
00,00	0,474	<u>0,468</u>	0,467	0,464	<u>0,458</u>	13,77	02,75
00,05	0,477	<u>0,474</u>	0,473	0,470	<u>0,468</u>	07,65	01,53

00,25	0,457	<u>0,455</u>	0,453	0,452	<u>0,450</u>	06,12	01,22
00,50	0,451	<u>0,450</u>	0,448	0,447	<u>0,446</u>	04,59	00,92
02,00	0,463	<u>0,460</u>	0,459	0,458	<u>0,456</u>	04,59	00,92
03,00	0,465	<u>0,463</u>	0,461	0,460	<u>0,459</u>	04,59	00,92
06,00	0,469	<u>0,468</u>	0,467	0,466	<u>0,464</u>	04,59	00,92

L'évolution des différents biomarqueurs du stress oxydatif dans les cellules HEP2 après 24 et 48 heures d'incubation avec différentes concentrations d'atractyloside est résumée dans le tableau 53.

Tableau 53: Récapitulatif de l'évolution des biomarqueurs du stress oxydatif dans les cellules HEP2 après 24 heures d'incubation avec différentes concentrations d'Atractyloside

Concentrations d'atractyloside (mg/mL)	00	0,05	0,25	0,5	2,00	3,00	6,00
Concentrations du MDA (moles/L)	0,44	0,38	0,44	0,55	0,72	0,97	0,98
Concentrations du glutathion réduit (moles/L)	10,2	11,0	10,35	09,6	07,24	06,6	2,8
Activité de la catalase (10⁻¹ UI/mL)	05,51	02,14	01,53	01,53	01,22	00,92	00,61

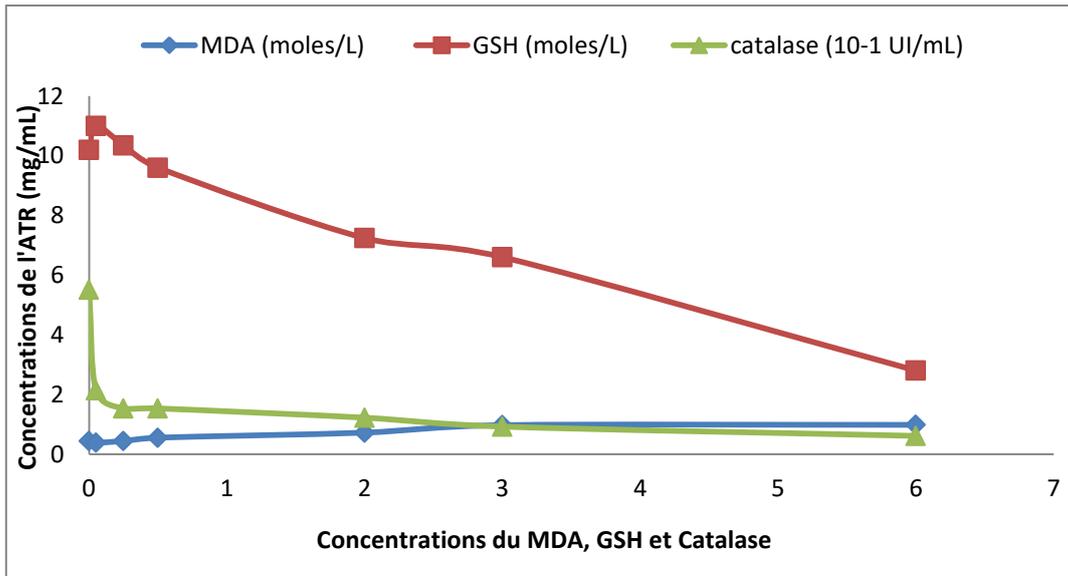


Figure 68: Evolutions des biomarqueurs du stress oxydatif dans les cellules HEP2 après 24 heures d'incubation avec l'Atractyloside

Tableau 54: Récapitulatif de l'évolution des bio marqueurs du stress oxydatif dans les cellules HEP2 après 48 heures d'incubation avec différentes concentrations d'Atractyloside

Concentrations d'attractyloside (mg/mL)	00	0,05	0,25	0,5	2,00	3,00	6,00
Concentrations du MDA (moles/L)	0,44	0,39	0,41	0,55	0,73	0,9	1,4
Concentrations du glutathion réduit (moles/L)	12,63	11,22	11,65	10,23	08,74	05,93	3,88
Activité de la catalase (10⁻¹ UI/mL)	02,75	01,53	01,22	00,92	00,92	00,92	00,92

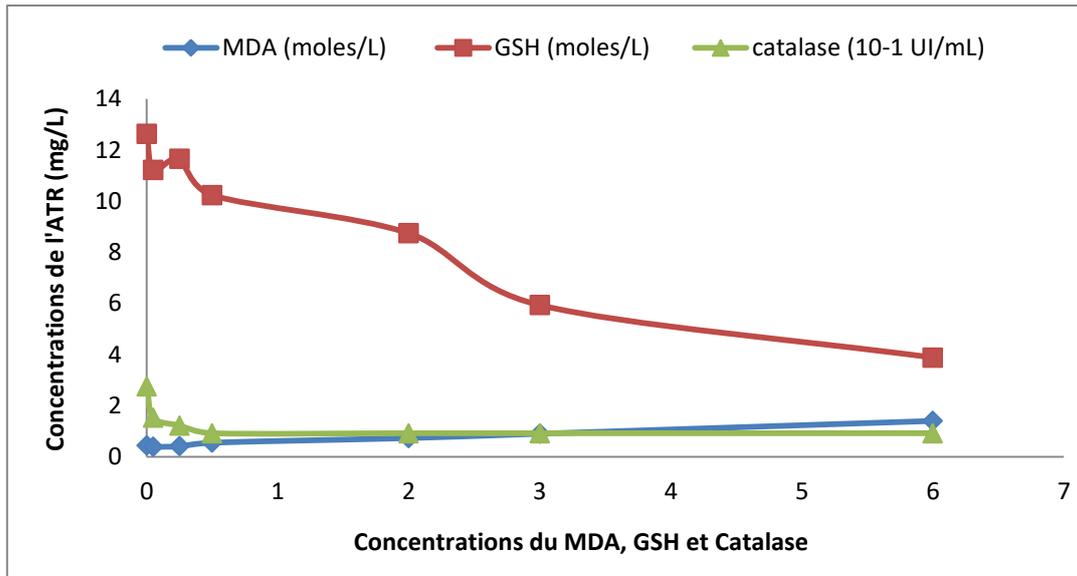


Figure 69: Evolutions des biomarqueurs du stress oxydatif dans les cellules HEP2 après 48 heures d'incubation avec l'Atractyloside

CHAPITRE IV: DISCUSSION

IV.1. Validation de la méthode analytique:

La plus petite concentration de standard d'atractyloside détectée par notre méthode et qui caractérise la limite de quantification (LQ) a été fixée à 10 µg/mL; Quant à la limite de quantification nous avons calculé la limite de détection (LD) qui égale à 2 µg /mL. Les valeurs obtenues indiquent que la méthode est fiable pour déterminer des concentrations plasmatiques en cas d'intoxication aigue.

Selon Calmes, le chromatogramme du standard d'*Atractylis gummifera* L. obtenu dans les mêmes conditions opératoires concernant le gradient d'élution acétonitrile-eau en présence de TFA et après 55 min a révélé un temps de rétention à 13,13 min, alors qu'il est de 10 min dans notre étude avec un temps de lecture de 20 min [78].

Cette différence est expliqué par la différence de deux paramètres en l'occurrence la colonne, pour Calmes c'est une colonne C8- 25 cm de long alors que dans notre étude la validation a été réalisé sur une colonne C8 -150 cm x 4,6 mm- 5 µm.

Le second paramètre étant la température du four de la colonne elle est programmée à 60°C pour Calmes et à 30°C pour notre étude.

Il faudrait souligner également que les analyses ont été réalisées sur deux types d'appareils différents.

IV.2. Etude in vivo/ in vitro:

Il est reconnu chez *Atractylis gummifera* L. a un effet hépatotoxique foudroyant lequel est attribué à deux glycosides qui sont atractyloside et carboxy atractyloside. L'étude de la toxicité aiguë de ces deux molécules chez le rat a montré que la carboxy atractyloside est 50 fois plus toxique que l'atractyloside pour lesquelles les valeurs de la DL50 exprimée en mg/kg de poids corporel sont respectivement **2,9** et **143 mg/kg**.

Les DL50 chez la souris est deux fois plus pour la voie intrapéritonéale par rapport à celle du rat selon Luciani et al [88].

Sur le plan bibliographique on a remarqué que selon les auteurs la DL50 chez le rat pour la voie IP est de 210 mg/kg selon Luciani et de 143 mg/kg selon Bhoola [124].

Selon l'échelle de classification Edouard Bastarache-Hodge-Sterner, l'atractyloside et la carboxy atractyloside sont classés extrêmement toxiques et ultra toxiques respectivement. Les valeurs de la DL50 trouvées dans nos travaux expérimentaux sont en adéquation avec ceux de la littérature qui sont de :

DL50 = 83,3 mg/kg/per os selon la méthode KARBBER et BEHRENS

DL50 = 115±22,16 mg/kg/per os selon la méthode MILLER et TAINTER

Nos résultats sont cohérents avec ceux d'Abtroun réalisés suite à l'administration chez la souris par voie orale de cristaux solubilisés dans l'eau. Ces derniers ont été récupérés suite à des extractions répétés de la plante et précipitation successive. Les DL50 étaient de 48 mg/kg pour la plante de la région de Khemis Meliana et de 94mg/kg pour celle de la région de Ténés [80].

Les résultats de la DL50 et leurs impacts sur la phosphorylation oxydative ont montré des sites spécifiques de l'ATR. Les chercheurs ont identifié des sites spécifiques ADP/ATP (pore) où les nucléotides sont fixés et transportés de part et d'autre entre le cytosol et la mitochondrie. Aussi, la plupart des effets de l'ATR in vivo sont expliqués par le ralentissement de la phosphorylation oxydative induite par l'inhibition du transporteur ADP/ATP (ANT) dans les mitochondries.

Dans notre étude, la survie de certaines souris et leur rétablissement après l'administration du produit pourraient s'explique par le fait que les récepteurs des nucléotides adényliques (ANT : translocase des nucléotides adényliques) n'ont semblablement pas tous été occupés par

l'ATR. Par conséquent, l'échange ADP/ATP pourra toujours se faire avec un maintien partiel de la phosphorylation oxydative.

Le récepteur ANT ayant une durée de vie courte, la régénération et le renouvellement des récepteurs ANT vont donc permettre l'élimination du toxique fixé et la récupération des animaux par la suite. Ceci nous montre l'importance de la dose dans l'intoxication par *Atractylis gummifera* L.

Si c'était le cas, il y aurait une plus haute fréquence d'intoxication par l'utilisation de la plante en médecine traditionnelle et du fait de la consommation du café.

Etant donné la quantité d'analogues ATR présents dans les grains de café, le risque couru par la consommation du café est vraisemblablement négligeable. De plus, aucun rapport publié n'a décrit de toxicité induite par la consommation du café.

Les études in Vivo ont démontré que l'atractyloside même à des concentrations élevées ne présente pas de cytotoxicité à des temps d'exposition de 2, 4 et 6 heures; celle-ci n'apparaît qu'après 24 et 48 heures d'incubation aux mêmes concentrations utilisées précédemment. Ceci dénote que le mécanisme emprunté par l'atractyloside pour induire la mort cellulaire est probablement de type apoptotique et non pas nécrotique.

Les valeurs des différentes CI_{50} obtenues sur les lignées cellulaires utilisées dans nos travaux expérimentaux reflètent la faiblesse de la cytotoxicité d'atractyloside sur les cellules non hépatocytaires. Bien que dans nos travaux on n'a pas expérimenté les hépatocytes, les résultats obtenus constituent une preuve tangible de la toxicité de l'atractyloside au niveau du foie et ceci probablement après métabolisation in situ. Peut-on s'interroger alors l'éventualité d'une réaction de carboxylation ?

Les CI_{50} sont variables dans le temps et d'une souche à l'autre :

L'augmentation du temps de contact des différentes souches cellulaires avec l'atractyloside a augmenté la cytotoxicité de ce dernier, ce qui supposera la formation d'une molécule secondaire responsable de la toxicité.

L'évaluation in vitro sur les trois souches RD, A549 et HEP2 a révélé :

- Une augmentation du taux du MDA de l'ordre de 62 à 82%
- Une diminution de la concentration des glutathion réduit (GSH) de l'ordre de 67 à 80%.
- Une diminution de l'activité de la catalase et de la sulfoxydismutase (SOD) de l'ordre de 66 à 85%.

Tableau 55: Taux du MDA, GSH et Catalase sur les trois souches RD, A549 et HEP2 après 24 et 48 heures d'incubation

Type de cellules	Après 24 heures d'incubation (mg/mL)	Après 48 heures d'incubation (mg/mL)
cellules RD	4,67	3,54
cellules A549	7,92	4,50
cellules HEP2	10,01	4,01

Ces résultats sont révélateurs d'un effondrement de la balance anti-pro-oxydante en faveur du stress oxydatif.

L'atractyloside entraîne accidentellement des lésions au niveau des cellules, qui incapables de les réparer, enclenchent l'apoptose pathologique dite également apoptose intrinsèque où la mitochondrie joue un rôle prépondérant.

Les études d'Alpa Popat en 2001 ont pu mettre à jour une toxicité indirecte de l'atractyloside. Une incubation de 24 h avec l'extrait de l'Impila (plante ayant pour principe actif l'atractyloside) produit une toxicité significative sur les cellules Hep G2 à toutes les concentrations testé. Les cellules hépatiques G2 (Hep G2) sont également utilisées comme un système modèle pour les études du métabolisme hépatique et de la toxicité des xénobiotiques. La cytotoxicité est dose dépendante avec une CL50 de 3,5 mg/ml. Une toxicité de près de 100% a été observée à une concentration de 6,7 mg/ml.

L'évaluation du stress oxydatif a montré qu'une incubation de 6 h a provoqué une déplétion totale de la GSH, déplétion dose-dépendante dans les cellules Hep G2.

Cet épuisement est survenu après 3 h seulement de contact (l'on constate une diminution de 61% par rapport au témoin) [32, 187].

Les travaux de JIAN YIN et *al.* renforcent alors notre hypothèse. Leur étude visait à déterminer l'hépatotoxicité induite par l'atractyloside en utilisant des hépatocytes de rat et humains en culture monocouche.

Après un traitement de 48 heures, l'atractyloside a induit une hépatotoxicité dépendante de la concentration en fonction du taux de viabilité cellulaire et de la teneur en glutathion intracellulaire (GSH) de rat.

Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que les hépatocytes in vitro, en particulier les hépatocytes humains, pourraient être un outil utile pour le dépistage de l'hépatotoxicité à base de plantes in vitro.

Une CI 100 en moins de 6 h sur ce type de cellule dénote d'un effet nécrotique suite à une transformation hépatique [188].

Dans notre cas il semblerait lorsque la transition de perméabilité mitochondriale est prolongée dans le temps, il se produit un ensemble de perturbations :

- diminution de la synthèse d'ATP suite au dé-couplément de la phosphorylation oxydative ;
- aggravation de la déplétion intracellulaire en ATP suite à l'augmentation de son hydrolyse ;
- dissipation du gradient électrochimique des protons et perturbation de l'homéostasie ionique ;
- sortie dans le cytoplasme de substances apoptogènes tels que l'AIF (Apoptosis Inducing Factor) et le cytochrome c responsables de la formation d'apoptosomes.
- induction de l'apoptose cellulaire par :
 - la voie des caspases induite par le cytochrome c,
 - la voie de l'AIF indépendante des caspases.

IV.3. Etude toxicocinétique de l'atractyloside :

En l'absence de données bibliographiques sur la cinétique de l'atractyloside chez l'homme et chez l'animal, nous allons essayer d'apporter le maximum d'éclaircissements sur notre étude.

Nous avons choisi une cinétique non-compartmentale selon les recommandations des Guideline on the Investigation of Bioequivalence de 2010, de Gabrielsson et *al.*, et de Sacks et *al.* [189, 190, 191].

Nous remarquons que:

- la comparaison de T_{max} , C_{max} , $AUC_{0-\infty}$ a montré que le profil TK de l'atractyloside était comparable entre les trois lots de rats.
- La C_{max} moyenne était de 68.8 mg/L et le T_{max} était de 90 minutes.
- La variabilité inter-lot sur les paramètres d'exposition (C_{max} , $AUC_{0-\infty}$, AUC_{0-600}) et la clairance (Cl/F) était faible ~ 3 à 8%, probablement liée à la forte homogénéité physiologique des rats et l'ajustement de la dose administrée par rapport au poids.
- Pour le lot 2, l'absence de valeurs à 5, 15 et 600 minutes a conduit à une surestimation de l' $AUC_{0-\infty}$. Les valeurs des paramètres TK ($t_{1/2}$ et le V_z/F), n'ont donc pas pu être déterminées avec précision.
- Pour la cinétique non-linéaire (d'ordre zéro), c'est généralement le cas le plus retrouvé en toxicocinétique, parce que c'est à ces niveaux d'exposition que les processus de transport, métabolisation et/ ou excrétion sont saturés, donc pour ce cas de l'atractyloside, on trouve que le profil suggère aussi que la molécule a un effet du premier passage hépatique (d'autant plus que le rat est mort dans 480 min) ce qui probablement est la conséquence d'une induction enzymatique.
- Ceci a été constaté par une réduction drastique des concentrations plasmatiques et ce qui a "libéré" (dé-saturé) probablement le processus d'excrétion extra-hépatique de la molécule.
- Une diminution exponentielle (linéaire dans une échelle semi-logarithmique) des concentrations durant la phase terminale d'élimination l'illustre parfaitement.

Afin de compléter notre étude cinétique on s'est proposé d'évaluer la fraction libre de la molécule. L'étude *in vitro* a pu être réalisée par la méthode de dialyse en surchargeant des échantillons du sérum par l'atractyloside suivi du protocole opératoire.

Nous avons constaté que la fraction libre de notre molécule est située en moyenne entre **61 et 68%**.

Vu que seule la forme libre est active, l'effet escompté doit être rapide si l'hypothèse de l'activité toxique de l'atractyloside était liée à la molécule mère. Ce n'est point le cas car les premières manifestations chez les souris suite à l'administration des DL50 ne sont apparues qu'après 48 h, ainsi que le délai d'apparition des morts chez le rat suite à l'administration de doses subtoxiques après 480 min.

IV.4. Test d'induction et hypothèse d'un ou des métabolites toxiques :

Selon le test d'induction réalisé par Angélica de Fátima et *al.* en 2008, et Paul. E et *al.* en 1981 et suite à l'évaluation des paramètres cinétiques, on remarque que globalement la TK de l'ATR était fortement réduite par l'administration concomitante d'une substance inductrice enzymatique [183, 192].

La comparaison de T_{max} , C_{max} , $AUC_{0-\infty}$ a montré que la clairance est multipliée par un facteur de **5** et une réduction drastique de la C_{max} par un facteur de **16** et l' $AUC_{0-\infty}$ par un facteur de **5**.

Dans ce type d'étude, si l'objectif est de tester l'effet d'un inhibiteur ou inducteur, la demi-vie n'est pas le paramètre de choix idéal de comparaison mais c'est plutôt la clairance, parce que, la $t_{1/2}$ est estimée, en analyse non-compartmentale, en se basant sur la phase terminale d'élimination et ne tient pas en compte l'AUC à l'inverse de la clairance. Pour la valeur élevée (532min) par rapport à l'administration de l'ATR sans inducteur, cette vitesse d'élimination moins rapide, suggère que la cinétique de l'ATR est non-linéaire (saturable) à des concentrations sub-toxiques et qu'elle est au maximum.

Le fait de la diminution des concentrations plasmatiques par induction enzymatique, a induit à une réduction de la vitesse d'élimination et donc le $t_{1/2}$ devient plus élevé, pour cela et afin de comparer les 2 profils, et au vu que l'on a utilisé une approche non compartmentale, le paramètre PK le plus adapté serait alors la clairance [193].

CONCLUSION GENERALE

Le monde végétal constitue une source fondamentale de nourriture, de remèdes traditionnels et de substances toxiques. Pour cette raison, les plantes représentent une cause fréquente d'intoxication.

Le tableau clinique et para clinique d'une intoxication par les plantes est rarement spécifique. L'expertise toxicologique est souvent l'unique moyen d'apporter la preuve spécifique d'une telle intoxication.

La rapidité d'apparition des signes cliniques et l'absence de coordination entre cliniciens et toxicologues aboutit le plus souvent à des décès.

Il est à préciser que les statistiques des décès liés au chardon à glu ne sont pas bien documentées et mis à jour, car ils surviennent souvent en arrière-plan à d'autres causes plus facilement expliquées.

Les seuls rapports de données, publiés entre 1992 et 2000 font état de 1500 décès par an en Afrique du Sud, *l'Atractylis gummifera* L. représente 32% de ces cas. Durant cette même période au Maroc, le centre anti poison a enregistré 17% intoxications mortels par les plantes. Le chardon à glu vient en premier lieu avec 102 intoxications soit 87,9% du nombre total des cas enregistrés.

En Algérie, entre 1991 et 2009 et selon les dernières données mises à disposition par le centre anti poison d'Alger, sur les 1554 cas d'intoxications enregistrées par les plantes, 170 sont dus au chardon à glu. Le taux de mortalité est de 37%.

Sur un autre registre, l'on note la constance des lacunes quant à la détection de certains principes actifs dans les milieux biologiques et en particuliers parmi les phytotoxines.

Les toxicologues sont très souvent confrontés à des difficultés analytiques surtout lorsque l'anamnèse d'un cas n'est pas accessible. De plus, il n'existe pas méthode de routine pour le dosage de l'ATR dans les échantillons biologiques qui répondent aux critères de spécificité requis soit dans le cadre de l'urgence ou dans le cadre médico-légal.

Le premier constat qui s'impose est que, les décès liés à une intoxication par les plantes sont plus fréquentes dans les zones rurales des pays en voie de développement ou l'accès aux soins est limité et/ou la médecine traditionnelle est plus répandue. Dans certaines régions du Maghreb, ces intoxications représentent un problème de santé publique provoquée par des phénomènes socioculturels ou des comportements ancestraux.

Malgré cela, un pouvoir bénéfique des plantes tel que *l'Atractylis gummifera* L. n'est pas à occulter. Ce pouvoir est plutôt lié à l'atractyloside utilisé comme médicament de par son pouvoir antioxydant.

Les succès relatifs de certaines pratiques traditionnelles ouvrent de nouvelles voies à la recherche. Ceci permettrait une exploration sur les assises scientifiques d'une part et une valorisation de l'héritage ancestral d'autre part toute en évaluant le facteur de risque toxicologique.

L'atractyloside présente ainsi, une structure et des propriétés physico-chimiques particulières qui nécessitent le développement de méthode de détection spécifique. Une autre difficulté en analyse toxicologique réside dans la stabilité du principe actif dans le milieu biologique, ce qui rend l'expertise dans le cadre de l'urgence ou en post-mortem difficile.

Dans notre travail les points positifs sont la mise au point d'une technique d'évaluation qualitative et quantitative de l'atractyloside dans le sérum surtout en cas d'intoxication aiguë et/ou mortelle mais également dans un autre milieu biologique tels le contenu gastrique ou les viscères plus particulièrement le foie.

Il nous a permis de faire une approche sur le profil cinétique ainsi que la distribution plasmatique de notre principe actif. Cette détermination pourrait expliquer la rapidité de la réponse au vue de l'importance de la fraction libre.

De plus, l'on est souvent confronté à une complexité de l'interprétation des résultats pour établir une relation de causalité (concentrations-effets).

Cependant, il y a lieu de savoir qu'aucun traitement spécifique n'est disponible contre l'intoxication à *l'Atractylis gummifera* L. Toutes les approches thérapeutiques actuelles sont uniquement symptomatiques.

La seule approche en cours de développement, est celle de l'immunothérapie qui reste au stade initial alors que celle entreprise pour la digitaline, la colchicine et le laurier rose, donne des résultats. Le seul aléa est que cette dernière méthode est plus coûteuse que les traitements conventionnels bien qu'elle soit la plus prometteuse.

De manière plus pratique, on recommande le développement des traitements pharmacologiques plus efficaces en passant impérativement par la connaissance sur la pharmacocinétique et le métabolisme de l'atractyloside.

La détermination du pouvoir inducteur sur la toxicité de l'atractyloside est un autre point fort de notre travail validant l'hypothèse de la formation de métabolites toxiques potentialisant l'effet toxique *l'atractylis gummifera* L.

On suggère sur le plan thérapeutique lors d'une intoxication par *l'atractylis gummifera* L. de développer un traitement soit par précipitation au stade de la phase cinétique soit par inhibition du mécanisme de dégradation afin d'éviter la formation de métabolites réactifs responsable du stress oxydatif.

Les points a développé dans le cadre de notre travail est une évaluation qualitative et quantitative des métabolites par chromatographie liquide haute performance avec un détecteur de masse (SM-SM) ainsi qu'une évaluation de la toxicité in vitro sur des cellules hépatiques et leurs perturbations sur les indicateurs du stress oxydant

Enfin, la meilleure recommandation serait la formation médicale, la prévention contre la vente anarchique des plantes médicinales, la nécessité d'instaurer une réglementation stricte dans le cadre du commerce et la sensibilisation sur les risques d'une intoxication par les plantes. Les pouvoirs publics et les médias sont appelés à jouer un rôle plus offensif à travers des campagnes de sensibilisation et de prévention.

BIBLIOGRAPHIE

1. Dupont F, Guignard JL. Botanique : Les familles de plantes. 16e éd. ElsevierMasson; 2015. 1 vol xv ISBN: 9782294741173.
2. Aït Youssef M. Plantes médicinales de Kabylie. Paris : Ibis Press; 2006. ISBN: 2-910728-57.
3. Dioscorides PA. De materia Medica Libri quinque III. 93. Max Wellman Ed; 1906. BerrBerolini.
4. Hort A. Theophrastus: Enquiry into plants and Moror work on odours and weathers signs. London: Harvard University Press; 1916. ISBN 9780674990777.
5. Santi R, Luciani S. Atractyloside: Chemistry, Biochemistry and Toxicology. Italy: Piccin Medical, Padova; 1978. 135.
6. Mathioli PA. Nei Sei Libri della materia medicinale di pedacio Dioscoride anazarbeo. Libri III, Erasmo, Valgrisi V., Costantini B., (Eds), Venezia; 1957: 333.
7. Daniele C, Dahamna S, Firuzi O, Sekfali N, Saso I, Mazzanti G. *Atractylis gummifera* L. poisoning : an ethno pharmacological review. J. Ethnopharmacologie. 2005;97: 175-181.
8. Larabi IA, Azzouz M, Abtroun R, Reggabi M. Détermination des teneurs en atractyloside dans les racines d'*Atractylis gummifera* L. Ann Toxicol Anal. 2012; 24(2): 81-86. DOI: 10.1051/ata/2012009.
9. Hammiche V, Merad R, Azzouz M. Plantes médicinales à usage thérapeutique du pourtour méditerranéen. Ed Springer; 2013. p. 63-74.
10. Steenkamp V, Stewart MJ, Zuckerman M. Detection of poisoning by impila (*Callilepis Laureola*) in a mother and child. Human Experimental Toxicology. 1999; 18: 594-597. DOI: 10.1191/096032799678839428
11. Ben Salah N, Zaghdoudi I, Zhioua M, Hamouda C, Amamou M, Thabet H. Quelques spécialités de chez nous: intoxications par les plantes, la chloralose et le méthanol [En ligne]. 2001. Disponible: <http://www.samu.org>.
12. Merad R. Contribution à la connaissance de la pharmacopée traditionnelle Algérienne [Thèse de doctorat : Pharmacie]. Université d'Alger ; 1973.
13. Brette JP. Phytothérapie traditionnelle kabyle [Thèse de doctorat: Médecine]. Université PARIS 5; 1985.
14. Gattefossé J. Les plantes dans la thérapeutique indigène du Maroc. Paris: Larose; 1921. Notice n 10:73-123.

15. Bellakhdar J. La pharmacopée marocaine traditionnelle: Médecine arabe ancienne et savoirs populaires. Paris,Casablanca: Ibis Press; Editions Le Fennec; 1997. 764 p.ISBN: 2-910728-03-X.
16. Larribaud J. Tindouf et le Sahara occidental. Revue des archives de l'Institut Pasteur, Alger ; 1952.
17. Boukef MK. Médecine traditionnelle et pharmacopée : Les plantes dans la médecine traditionnelle tunisienne. Paris, France: Agence de coopération culturelle et technique; 1986. VIII, 350. ISBN: 9290280859.
18. Fiori A, Paoletti C. Flora Analitica d'Italia. Eds, Piccin Medical, Padova, Italy; 1973.
19. Arnaud JM. Contribution à l'étude du fruit du chardon à glu [Thèse de doctorat : Pharmacie]. Université d'Alger ; 1957.
20. Fourment P, Stanislas E, Arnaud J. Le fruit du chardon à glu, *Atractylis gummifera* L. Bulletin société d'histoire naturelle de l'Afrique du Nord 47 pp187-190.
21. Bruneton J. Toxic plants. Dangerous to humans and animals. Ed Tec and Doc Paris; 1999.
22. Naslafka A. Les végétaux toxiques en milieu Marocain. Monographie de 62 plantes. Thèse de Médecine, Rabat, N°118.
23. Tourte P. Contribution à l'étude de la racine du chardon à glu *Atractylis gummifera* L., [Thèse de doctorat : Pharmacie]. Université d'Alger ; 1960.
24. Bezanger L, Beauquesne M, Pinkas M, Torck M, Trotin F. Plantes médicinales des régions tempérées. Maloine, Paris ; 1980.
25. Debelmas AM, Delaneau P. Guide des plantes dangereuses. Maloine, Paris ; 1978.
26. Pottier P, Flore de la Tunisie : Angiospermes-Dicotylédones-Gamopétales. Tunis : Publications Scientifiques Tunisiennes ; 1981.
27. Lefranc E. Etude botanique, chimique et toxicologique sur l'*Atractylis gummifera* L.: (El haddad des arabes). Paris: Librairie Germer- Bailliere; 1866.
28. Charnot A. La Toxicologie au Maroc Mémoires de la Société des sciences naturelles du Maroc. Rabat ; 1945. n° 47 (vol. 826).
29. Paris M., Hurabielle M. Abrégé de matière médicale, pharmacognosie. Tome I. Paris: Masson ; 1981.
30. Lefranc M. sur l'acide atractylique et les atractylates. C.R. académie ; 1869 : 954-956
31. Sandali A. Intoxication à l'Addad [Thèse de médecine]. Rabat ; 1970. N° 38.
32. Obatomi DK, Bach PH. Biochemistry and toxicology of the Diterpenoid Glycoside Atractyloside, Food Chem. Toxicol; 1998, 36: 335-346.

33. Contessa AR, Fassina G. Pharmacognosy of *Atractylis gummifera* in atractyloside: chemistry, biochemistry and toxicology. Piccin Medical Books Italy; 1978.
34. Gaillard Y, Cheze M, Pépin G. Intoxications humaines par les végétaux supérieurs: revue de la littérature. *Annales de Biologie Clinique* ; 2001, 59(6) :764-765.
35. Obermann H, Spiteller G. Die strukturen der,, Koffee-Atractylosid *Chem Ber* 109; 1976: 3450-3461.
36. Wunschendorff H, Brandel P. Etude chimique de l'atractylate de potassium, *Bull. Soc. Chem et Biol* ; 1931, N°13 pp758-763.
37. Bombardeli E, Danieli B, Bonati A, Gabetta B. Carboxyatractyloside a new glycoside from *Atractylis gummifera* *Fitotherapia*; 1971, 42: 91-93.
38. Danieli B, Bombardeli E, Bonati A, Gabetta B. Structure of the diterpenoid Carboxyatractyloside *Phytochemistry*; 1972, 11: 3501-3504.
39. Stanislas E. Les constituants toxiques de *Atractylis gummifera* L. *Toulouse pharmaceutique* ; 1964, 10 (1) ; pp75.
40. Riccio P, Scherer B, Klingenberg M. Isolation of a new atractyloside type compound. 1973, volume 31, N° 1 *FEBS Letters* pp 95.
41. Lugasi A, Hovari J, Sagi K, Biro L. The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta biologica*; 2003, Volume 47(1-4) pp119-125.
42. Bruneton J. *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. 4e édition Paris, Cachan: Éd. Tec & doc; Éd. médicales internationales; 2009. ISBN: 2743011882.
43. Boizot N, Charpentier JP. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Cahier des Techniques de l'INRA* ; 2006, 79-82.
44. Khadhri A. Composés phénoliques et activités antioxydantes de deux extraits de Chardon à glu: *Atractylis gummifera* L. *Revue Soc. Sci. Nat de Tunisie* ; 2013.
45. Medic sanic M, Jasprica I, Smolic Bubalo A, Et Mornar A. Optimization of Chromatographic Conditions in Thin Layer Chromatography of Flavonoids and Phenolic Acids. *Croatica Chemica Acta*; 2004. p 361-366.
46. Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Ther* ; 2002. 96 (2-3):67-202.
47. Skerget M, Kotnik P, Hadolin M, Hras AR, Simoncic M, Knez Ž. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*; 2005, 89(2):191-198.

48. Dacosta Y. Les phytonutriments bioactifs. Paris: Éditions Y. Dacosta; 2003. 317 p. ISBN: 978- 2-951822-00-9].
49. Leonard E, Yan Y, Koffas MA. Functional expression of a P450 flavonoid hydroxylase for the biosynthesis of plant-specific hydroxylated flavonols in *Escherichia coli*. *MetabEng*; 2006, 8(2):172–181.
50. Andersen OM, Markham KR. Flavonoids: Chemistry, biochemistry, and applications. Boca Raton, Fla, London: CRC; 2006. ISBN: 9780849320217.
51. Capdevielle P, Darraq R. Poisoning by bird-lime thistle. *Med. Trop*; 1980, 40, pp:137-142.
52. Mohib M. Plantes médicinales utilisées en médecine traditionnelle dans la province de Taza [Thèse de Médecine]. Rabat ; 1981, N° 25.
53. Karimine F. Les intoxications végétales en pédiatrie [Thèse de médecine]. Rabat ; 1986, N° 421.
54. Bellakhdar J. Herb drugs and herbivists in the Maghrib. *Estuvia Cultures Islamicae*; 1982, N° 19.
55. Akhmis M. Médecine, magie et sorcellerie au Maroc. Ed. Benemed, Casablanca ; 1985.
56. Larrey D, Pageaux GP. Hepatotoxicity of herbal remedies and mushrooms. *Seminars in Liver Disease*; 1995, 15 : 183-188.
57. Viegli L, Pieroni A, Guarrena PM, Vangelisti R. A review of plants used in folk veterinary medicine in Italy as basis for a databank. *J. Ethnopharmacol*; 2003, 89:pp221-244.
58. Yang Wang, Ting Han, Li-Ming Xue, Ping Han, Qiao-Yan Zhang, Bao-Kang Huang, Hong Zhang, Qian-Liang Ming, Wei Peng, Lu-Ping Qin. Hepatotoxicity of kaurene glycosides from *Xanthium strumarium* L. fruits in mice *Pharmazie*; 2011, 66(6):445-9.
59. Nikles S, Heuberger H, Hilsdorf E, Schmücker R, Seidenberger R, Bauer R. Influence of Processing on the Content of Toxic Carboxyatractyloside and Atractyloside and the Microbiological Status of *Xanthium sibiricum* Fruits. *Planta Med*; 2015, 81(12/13): pp:1213-1220.
60. Surriya A, Barkatullah, Haroon K. Pharmacology of *Xanthium* species. A review *J. Phyto-pharmacology*; 2016, 5(3): 126-127.
61. Bouabid K, Lamchouri F, Toufik H, Boulfia M, Senhaji S, Faouzi MEA. *In vivo* anti-diabetic effect of aqueous and methanolic macerated extracts of *Atractylisgummifera* L. *Bangladesh J. Pharmacol*; 2019, 14: 67-73.

62. Bouabid K, Lamchouri F, Toufik H. Inventory of poisonings and toxicological studies carried out on *Atractylisgummifera* L. A review *Plant Science Today*; 2019, 6(4): pp:457-46.
63. Mejdoub K, Mami IR, Belabbes R, Dib MA, DjabouN, Tabti B. Chemical Variability of *Atractylisgummifera* Essential Oils at Three Developmental Stages and Investigation of Their Antioxidant, Antifungal and Insecticidal Activities. *Curr. Bioact. Compd*; 2019.
64. Talakal TS, Dwivedi SK, Sharma SR. In vitro and in vivo antitrypanosomal activity of *Xanthium strumarium* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*; 1995, 49(3): p. 141-145.
65. Khadhri A, El mokni R, Smiti S. Composés phénoliques et activités antioxydantes de deux extraits de chardon à glu: *Atractylisgummifera*, Review. *Social. Science Nature* ; 2015; 39:44-52.
66. Bouabid K, Lamchouri F, Toufik H, Boulfia M. phytochemical investigation, *in vitro* and *in vivo* antioxidant properties of aqueous and organic extracts of toxic plant: *Atractylisgummifera* L. *Journal of Ethnopharmacology*; 2020, Vol 253.
67. Errai S, Khabbal Y, Lyoussi B, Abdellaoui A. Attenuation of Toxic Power of *Atractylisgummifera*. *European Journal of Scientific Research*; 2018, Vol. 150 No 3, pp. 311-321.
68. Treshchalin I D, Golibrodo V, Treshchalin M, Eremkin N. Profil toxicologique d'Aimpiladans une expérience chronique sur des rats. *Russian journal of biotherapy*; 2017-tome 16-N°3-pp79-85
69. Gaudeau et Gouthière. Médicaments a base d'*attractylisgummifera* et variétés alba, lyrata, ovata, humilis, cancellata et leurs dérivés dans le traitement des pathologies cancéreuses de pathologies inflammatoires et pathologies immuno-dépressives. 1991. Demande de brevet d'invention N° d'enregistrement national 90-02373.
70. Wenxiang F, Linhong F, Chengyi Peng, Qing Zhang, Li Wang, Lin Li, Jiaolong Wang, Dayong Zhang, Wei Peng, Chunjie Wu. Traditional Uses, Botany, Phytochemistry, Pharmacology, Pharmacokinetics and Toxicology of *Xanthium strumarium* L. A Review *Molecules*; 2019, 19;24(2):359.
71. Stanislas E. Vignais PM sur les principes toxiques d'*Atractylisgummifera* L. compte rendu de l'académie scientifique ; 1964, 259 pp4872-4875.
72. Rezig M. contribution à l'étude de l'intoxication par le chardon à glu [Thèse de doctorat : Médecine]. Université d'Alger ; 1967.
73. Piazzini SE, Riparbelli G, Sordi S, Cantagalli P, Pocchiari F. The structure and stereochemistry of atractyligenin tetrahedron. 1966, vol8, N°11 : pp :515-529.

74. Ahid S, Ait El Cadi M, Meddah B, Cherrah Y. *Atractylisgummifera*L.de l'intoxication aux méthodes analytiques. Ann Biol Clin N°7 ; 2012, (3): 263-8.
75. Liang-Yu Chen, Anren Hu, Chih-Jui Chang.The Degradation Mechanism of Toxic Atractyloside in Herbal Medicines by Decoction MoleculesN°18; 2013, pp2018-2028.
76. Hedhili A, Warnet J, Thevenin M. Biochemical investigation of *Atractylisgummifera* L. hepatotoxicity in the rat. Arch Toxicol; 1989, 63(suppl13):312-315
77. Bye SN. The development of assays for atractyloside and its localisation in rat tissue,1991,These de doctorat Département de Biochimie University Natal Afrique du Sud.
78. VignaisPM,Vignais PV,Defaye G. Structure activity relationship of atractylosideand diterpenoid derivatives, chemistry, biochemistry and toxicology; 1978: 39-68
79. Fontana G, Mantire G,Vetri P, HoppsV. Effects on carbohydrate metabolism of coffeaattractyloside. Fitotherapie;1994, 65(1) :29-33.
80. AbtrounR. Elaboration d'un fichier analytique et toxicologique pour le centre d'information, de contrôle et de traitement des intoxications graves Thèse pour diplôme en sciences médicales]. Université d'Alger; 1986.
81. Richer H, Spitteller G. Uereinneus Atractyligenin Glycosid aus grünem Kaffeebohnen.ChemischeBerichte; 1978, 111: 3506-3509.
82. Winkler HH, Bygrave FL, Lehninger AL. Characterisation of the atractylosidesensitive adenine nucleotide transport system in rat liver mitochondria. J BiolChem; 1968, 243: 20.
83. Roux P, Le Saux A, Fiore C, Schwimmer C, Dianoux AC, Trezeguet V, VignaisPV, Lauquin GJ, BrandolinG.Fluorometric titration of the mitochondrial ADP/ATP carrier protein in muscle homogenate with atractyloside derivatives. Analytical Biochemistry; 1996, 234: 31-37.
84. Raisonnier A. Respiration mitochondriale, revue biochimie métabolique N°13 ; 2004, pp74-97.
85. Pebay-PeyroulaE. Détermination de la structure du transporteur ADP/ATP protein membranaire d'intérêt physiologique majeur, Nature N°46; 2003, pp 39-44.
86. Larrey D. plantes médicinales: intérêt thérapeutique et risque d'hépatotoxicité.Encyclopédie médicochirurgicale. Edition scientifique et médicales Elsevier. Paris ; 2001.
87. Pinto Da Cunha M, Geubel A. Phytothérapie et hépatotoxicité. Louvain médical" ; 2002, Vol. 121 N°10, p. 407-414.

88. Luciani S, Caarpenedo F. Pharmacognosy of *atractylis gummifera*.L. Piccin Médical Books; 1978, pp1-11.
89. Fiore C, Trezeguet V, Lesaux A, Roux P,Brandelin G, Vignais PM. The mitochondrial ADP/ATP carrier: structural, physiological and pathological aspect P.V. *Biochimie*; 1998, 80 pp137-150.
90. Haouzi D, Cohen I, Vieira HLA, Poncet D,Boya P, Castedo M, Vadrot N,Belzacq AS, Fau D, Brenner C, Feldmann G, Kroemer G. Mitochondrial permeability transition as a novelprinciple of hepato-renal toxicity in vivo. *Apoptosis*; 2002,7: 395–405.
91. LemastersJ, Sowers A. Phosphate Dependence and Atractyloside Inhibition of MitochondrialOxidative Phosphorylation. *Journal of biological chemistry*; 1979,Vol 254 N° 4 pp1248-1251.
92. Graba MN, Azzouz M. Toxicologie et dosage de l'ATR [Mémoire pour L'obtention diplôme d'études en sciences médicales spécialisées]. Département de pharmacie Alger; 2006.
93. LauquinGJ, Vignais PV. Interaction of bongkreic acid with the mitochondrialadenine nucleotide translocator, *Biochemistry* N°15; 1976, pp2316-2322.
94. Klingenberg M, Grebe K, Schreeck B. The binding of atractylate and carboxyatractylate to mitochondria. *European journal of biochemistry*; 1975, 52:pp351-363.
95. BojanovskiD,SchlimmeE,WangCS,Alaupovic P. Studies onthe adenine nucleotide translocase from rat liver mitochondria.Isolation,partial caracterisation and immunochemical properties of carboatractyloside binding protein. *Europeen journal Biochemistry*; 1976,11 ;71(2) pp 539-548.
96. Quintanilla AP, Levin ML, Lastre CC, Yokoo H, Levin NW. Effect of diuretics on ADP incorporation in kidney mitochondria. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*; 1979, 211:456–459.
97. Kholodenko BN, Zhilinskene VI, Borutaite VI,Ivanovene LI, Toleikis AI.The role of adenine nucleotide translocator in the regulation of oxidative phosphorylation in heart mitochondria. *Biokhimia*; 1988, 53:1009–1012.
98. Vancompernelle K, Van Herreweghe F, Pynaert G, Van de Craen M. Atractyloside-induced release of cathepsin B, a protease with caspase-processing activity. *FEBS*; 1998, 438:150–158.
99. Kroemer G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Natural medecine* N°3; 1997,pp614-620.

- 100.** Streicher Scott J, Lapidus R, Sokolove PM. Use of atractyloside and tight binding inhibitor theory to determine the concentration of functional mitochondrial adenine nucleotide translocators in a reconstituted system. *Anal Biochemistry* ; 1993, 210(1) pp69-76.
- 101.** Haouzi D, Cohen I, Vieira HLA, Poncet D,Boya P, Castedo M, Vadrot N, Belzacq AS, Fau D, Brenner C, Feldmann G, Kroemer G. Mitochondrial permeability transition as a novel principle of hepatorenal toxicity in vivo. *Apoptosis*; 2002, 7:395–405.
- 102.** Malekova L, Kominkova V, Ferko M, StefanikP, Krizanova O, Ziegelhöffer A. Bongkrelic acid and atractyloside inhibits chloride channels from mitochondrial membranes of rat heart*Biochimica et BiophysicaActa*; 2007,1767 pp: 31–44.
- 103.** ObatomiDK, Peter B, Bach H.Inhibition of mitochondrial respiration and oxygen uptake inisolated rat renal tubular fragments by atractyloside*Toxicology letters*; 1996, 89 155-161.
- 104.** PetejovaN, MartinekA, ZadrazilJ, Teplan V.Acute toxic kidney injury. *Renal Failure*; 2019, 41(1) pp 576-594.
- 105.** Stewart MJ, Steenkamp V. The biochemistry and toxicity of atractyloside:a review. *Therap. Drug Monit*; 2000, 22:641-649.
- 106.** Nogue S, Sanz P, BoteyA. Insuffisance rénale aigue due à une intoxication par le chardon à glu. *Presse médicale* 21; 1992, 1 pp130.
- 107.** Poccha F. Effet de l'ATR et de l'insuline sur le métabolisme du glucose dans le muscle du diaphragme du rat in vitro. *Annale institut supérieur sanita* ; 1966,2,N°2/3 pp304-317.
- 108.** Skalli S, Alaoui I, Pineau A. L'intoxication par le chardon à glu. *Rev Sante Publique du Maroc* ; 2002, 2395 :284-86.
- 109.** Georgiou M, Sianidou L. Hepatotoxicity due to *Atractylisgummifera* L. *ClinToxicol* 1988; 26:487-93.
- 110.** Santi R, Cascio G. Ricerche farmacologiche sul principio at-tivo dell*Atractylisgummifera*.I. Azione generale. *Arch Ital SciFarmacol*. 1955; 5: 354–363.
- 111.** Santi R. Potassium atractylate,a new inhibitor of the carboxylic acid cycle. *Nature*; 1958, N°182:pp257-258.
- 112.** Koechel D, Krejci AM. Extrarenal and direct renal actions of atractyloside contributeto its acute nephrotoxicity in pentobarbital anaesthetized dogs. *Toxicology* 1993, 79:pp: 45-66.

113. Masri W, Hedhili A, Amamoub M. Intoxication par *Atractylisgummifera L*:à propos de deux cas cliniques.Revue francophone des laboratoires ; 2009, 413 :87-91.
114. Obatomi DK, Bach PH. Biochemistry and toxicology of the diterpenoidglycosideAtractyloside. Food ChemToxicol36; 1998, pp: 335-46.
115. Andersen OM, Markham KR. Flavonoids: Chemistry, biochemistry, and applications. Boca Raton, Fla., London: CRC; 2006, ISBN: 9780849320217.
116. Santi R. Pharmacological properties and mechanism of action of atractyloside. Journal pharmacie et pharmacologie N°10 ; 1964, pp 432-437.
117. Bucher Th,Sies H. Inhibitors tools in cell research, 20éme colloque de biologie-chimique– Berlin; 1969.
118. Krejci ME,Koechel AD. Acute effect of atractyloside and stéviocide,inhibitors on renal function and ultrastucture, Toxicology; 1992, 72:3 pp:299-313.
119. Hopps V, Vetri P, Biondi F, Fontana G, Mantia G, Venturella F,Cascio G. Effects of atractyligenin and some of its naturalderivates on renal function. Fitoterapia; 1997, 48,pp: 26-34.
120. Obatomi DK, Thanh NTK, Brant S, Bach PH. The toxic mechanism andmetabolic effects of atractyloside in precision-cut pig kidney and liver slices. Archives of Toxicology; 1998, 72: 524–530.
121. Obatomi DK, Brant S, Bach P. Toxicity of atractyloside in precision-cut rat and porcine renal and hepatic tissue slicestoxicology and applied pharmacology; 1998, N°148, pp:35–45.
122. Carpenedo F, Luciani S, Scaravilli F, Palatine P, Santi R.Nephrotoxic effect of ATR in rats. Archives of Toxicology; 1974, 32,pp:169–180.
123. Seedat YK, Hitchcock PJ. Acute renal failure from *Callilepis laureola*. S Afr Med J; 1971, 45(30):832–3.
124. Bhoola KA. Clinico-pathologic and biochemical study of the toxicity of*Callilepislaureola*(Impila) [M. D.]. Durban: University of Natal; 1983, pp: 28–33.
125. Georgiou M, Siandon L, Hatziz T, Papadatos J, Kouselini SA. Hepatotoxicity due to *Atractylisgummifera L*.Clin. Toxicol.; 1988, 26: 487-493.
126. Miclowiz S, Tebbi Z, Galinski R, Lemaigre G. A propos de l’atteinte hépatique dans l’intoxication par le chardon à glu. Rev.Tossical.speriment.clin ; 1976, 1-2 pp :81-84.
127. Wainwright J, Schonland MM. Toxic hepatitis in black patients in natal. S Afr Med J; 1977, 51(17), pp: 571–573.

128. Neame PB, Pillay VK. Spontaneous hypoglycaemia, hepatic and renal necrosis following the intake of herbal medicines. *S Afr Med J*; 1964, 38:729–32.
129. Song R, Bian H, Huang X, Zhao KS. Atractyloside induces low contractile reaction of arteriolar smooth muscle through mitochondrial damage. *J Appl Toxicol*; 2013, 33(10):1192.
130. Song R, Bian H, Huang X, Zhao KS. Atractyloside induces low contractile reaction of arteriolar smooth muscle through mitochondrial damage. *J App Toxicol*; 2012, 32(6):402–8.
131. ShugAL, Bittar NS, Koke JR. Ischemic-like change produced in canine heart by atractyloside. *Recent Adv. Stu. Cardiac Struct. Metabol*; 1976, 26-29 (12) pp167-174.
132. Gilmour RF, Williams ES, Farmer BB, Zipes DP. Effets de la carnitine et de l'atractyloside sur l'activité électrique cardiaque canine. *American Journal of Physiology*; 1981, 241, 4, pp :506-512
133. Dahamna S. Biochemical and histological indicators of *atractylisgummifera* l. toxicity [Thèse Doctorat Biologie animal]; 2007.
134. Hamouda C, Hedhili A, Zhioua M, Amamou M. A review of acute poisoning from *Atractylisgummifera* L. *Veterinary and Human Toxicol.*; 2004, 46: 144-146.
135. Bruneton J. Plantes toxiques : Végétaux dangereux pour l'Homme et les animaux. Tec et Doc, Lavoisier, Paris, 2^{ème} édition ; 2001.
136. Balansard G. Le chardon à glu. Communication au premier colloque international « la pharmacopée Arabo-islamique hier et aujourd'hui » Rabat-Maroc ; 1994.
137. Hardin JW, Arena JM. Human poisoning from native and cultivated plants. Jouglard J 1977 Intoxications d'origine végétale. EMC 16065 A10, Paris
138. Benbouziane FZ, Beneddra M, Belarbi N. Contribution à une étude botanique et chimique du chardon à glu, *atractylisgummifera* L., famille des asteraceae [Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du diplôme de Docteur en Pharmacie] ; 2016.
139. Bouzidi A, Mahdeb N, Allouche L, Houcher B. Études épidémiologiques sur les plantes toxiques dans les régions de Setif et Bordj Bouarreridj. *Bulletin d'information toxicologique* ; 2002.
140. Berrezoug H, Berradia A. Contribution à la prise en charge des intoxications par les végétaux : aide à la diagnose des plantes toxiques de la région de Tlemcen [Mémoire pour l'obtention du diplôme de docteur en pharmacie]. Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen; 2014.

141. Rebgui H, Soulaymani-Bencheikh R, Hami H, Ouammi L, Hadrya F, Soulaymani A, Mokhtari A. Les déterminants des intoxications par les plantes. Cas de la région de Fès-Boulemane, Maroc. *Antropo* ; 2013, 30, pp :71-78.
142. Belarbi N, Rhalem N, Soulaymani A, Hami H, Mokhtari A, SoulaymaniBencheikh, R. Intoxication par l’*Atractylisgummifera*-L au Maroc (1992-2008) .*Antropo*; 2013, 30, 97-104.
143. Eddleston M, Persson H. Acute plant poisoning and antitoxin antibodies. *Journal of Toxicology and Clinical Toxicology* 2003, 41: 309–315.
144. Larribaud J. Deux cas d’empoisonnement par le chardon à glu observés à Dellys, *Archive de l’institut Pasteur d’Algérie* ; 1953, 23-29
145. Hamouda C, Amamou M, Thabet H. Plant poisoning from herbal medication admitted to a Tunisian Toxicology intensive care unit 1983-1993. *Vet.HumToxicol* 2000, 42: 137-141.
146. Catanzano G, Delons S, Benyayia TD. A propos de deux cas d’intoxication par le chardon à glu (*Atractylisgummifera* L.). Evolution clinique et liaisons anatomo-pathologiques. *Maroc Méd* ; 1969, 49, 529: 651-655.
147. Lemaigre G, Tebbi Z, Galinsky R, Michowicz S, Abelanet R. Hépatite fulminante par intoxication due au chardon à glu (*Atractylisgummifera*-L). *Nouv Presse Med* ; 1975, 4 pp: 286.
148. Caravaca-Magarinos L. Renal and hepatic injuries in human intoxication with *Atractylisgummifera*. *Nefrologia*; 1985, 5: 205-210.
149. Nogue S, Sans P, Botey A, Esforzado N, Blanche C, Alvarez L. Insuffisance rénale aiguë due à une intoxication par le Chardon à glu (*Atractylisgummifera* L.). *Press Médicale*; 1992, 21 :130.
150. Kotsiou A, Tesseromatis C. Hepatotoxicity of herbal medicinal products. *Journal of Medicinal Plants Studies* 2017; 5(3) : 80-88
151. Yin J. Effects of glycyrrhizic acid on cocklebur-induced hepatotoxicity in rat and human hepatocytes. *Phytotherapy Research*, 2008. 22(3): p. 395-400.
152. Stickel F, Patsenker E, Schuppan D, Herbal hepatotoxicity. *Journal of Hepatology* 43 (2005) 901–910
153. Mentouri Z, Aberkane A, Galinski R. A propos de nouvelles données cliniques et biologiques concernant l’intoxication par le chardon à glu. *Annales médicales de Nancy* ; 1976, pp 367-368.

154. Alamir B, Abtroun R, Luc de Haro. Circumstances of lethal Mediterranean thistle *Atractylisgummifera* poisonings: Experience of the Algiers Poison Centre. XXXIII International Congress of the European Association of Poisons Centers and Clinical Toxicologists (EAPCCT) Denmark; 2013.
155. Skalli S, Alaoui I, Pineau A, Zaid A, Soulaymani A. L'intoxication par le chardon à glu (*Atractylisgummifera* L.) : à propos d'un cas clinique. *Bull Soc Pathol Exot* ; 2002, 95, 4, pp:284-286
156. Zaim N, Guemouri L, Lamnaouer D, Benjouad A. Étude de quatre cas d'intoxication par *Atractylisgummifera* L. *Thérapie*; 2008, 63(1):49–54.
157. Vallejo JR, Peralá D, Gemiob P, Carrascoc MC, Heinrichd M. *Atractylisgummifera* and *Centaurea ornata* in the Province of Badajoz (Spain). *Journal of Ethnopharmacology*; 2009, 126 pp: 366–370
158. Caravaca Magarinos F, Cubero Gomez JJ, Arrobas Vaca M. Renal and hepatic injuries in human intoxication with *Atractylisgummifera*. *Nefrologia*; 1985, 5, 205–210.
159. Madani N. Intoxication par le chardon à glu chez une femme enceinte. *Presse Medicale*; 2006, 35, pp: 1828–1830.
160. Chardon G, Viala A, Vignais P, Stanislas E. Poisoning due to the birdlime thistle, *attractylisgummifera* l. Attempt at treatment of the dog poisoned by an extract. *Thérapie*; 1964, 19:1313–1322.
161. Ishii EL, Bracht A. Stevioside, the sweet glycoside of *Stevia rebaudiana*, inhibits the action of atractyloside in the isolated perfused rat liver. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*; 1986, 53: 79–91.
162. Obatomi DK, Blackburn RO, Bach PH. Effects of the calcium channel blocker verapamil and sulphhydryl reducing agent dithiothreitol on atractyloside toxicity in precision-cut rat renal cortical and liver slices. *Food and Chemical Toxicology*; 2001, 39:1013–1021.
163. Obatomi DK, Blackburn RO, Bach PH. Adenine nucleotide and calpain inhibitor protect against atractyloside-induced toxicity in rat renal cortical slices in vitro. *Archives of Toxicology*; 2001, 7:487–496.
164. Gaillard Y, Pepin G. Poisoning by plant material: review of human cases and analytical determination of main toxins by high-performance liquid chromatography–(tandem) mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*; 1999, vol. 733:181-229

165. Steenkamp PA, Harding NM, Van Heerden FR, Vanwyk BE. Identification of Atractyloside by LC-ESI-MS in alleged herbal poisonings. *Forensic Science International*; 2006, 163: 81-92.
166. Domanach J. Réactions colorés de l'atractylate de potassium : limites de sensibilités, *Bulletin de la société de pharmacie d'Alger*; 1960, N°1, pp :69-73.
167. Viala A, Cano JP. Limites de sensibilité des réactions de coloration de l'atractyloside appliquées sur couche mince de gel de silice. *Bull Soc Pharm* 1966; N°59.
168. Fassina G. Dosage colorimétrique de l'atractylate de potassium, *Bull. Soc. Ital. Biol* 1960, N°36 pp: 1419-1421
169. Errai S, Khabbal Y, Lyoussi B, Faid M, El Midaoui M, Maataoui A, Benbella M, Abdellaoui A. New Assay Method of the Atractyloside and Carboxyatractyloside in the Human Blood. *European Journal of Scientific Research*; 2019, Vol. 152 No 1, pp. 63-74
170. Steenkamp PA, Harding NM, Van Heerden FR, Ben-Erik VW. Determination of atractyloside in *Callilepis laureola* using solid-phase extraction liquid chromatography-atmospheric pressure ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr A*; 2004, 1058 : 153-162.
171. Rui Duo coll. Determination of carboxyatractyloside and atractyloside in Xanthii by HPLC, *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, Sichuan Academy of Chinese Medicine*; 2012, 37(15):2313-2316
172. Romeuf L, Cherrah Y, Ahid S *et al.* Identification et dosage de l'atractyloside et du carboxyatractyloside par CLHP-SM2 et CLHP-SM3 dans le chardon à glu (*Atractylis gummifera* L.) *Annales de Toxicologie Analytique* ; 2006, 18: 233
173. Zaim N, Guemouri L, El Abbadi N *et al.* Determination of atractyloside from *Atractylis gummifera* L. by HPLC method. *PhysChem News*; 2007, 38: 7-12
174. Jeremy C, Ludovic R, Jerome G, Cedric P, Fabien B, Laurent F and Yvan G. A Validated Method for Quantifying Atractyloside and Carboxyatractyloside in Blood by HPLC-HRMS/MS, a Non-Fatal Case of Intoxication with *Atractylis gummifera* L. *Journal of Analytical Toxicology*; 2014, 38 :619-627.
175. Carlier J, Romeuf L, Guitton J, Bevalot F, Fanton L, Gaillard Y. A validated method for quantifying atractyloside and carboxyatractyloside in blood and urine by HPLC-HRMS/MS, a non-fatal case of intoxication with *Atractylis gummifera* L. *Toxicologie analytique et Clinique*; 2014, Vol 26 - N° 2S pp S16-S17.
176. Hong Pan Feng Yang Dai Yuan Xiang Fuguo Sh. Simultaneous quantification of atractyloside and carboxyatractyloside in rat plasma by LC-MS/MS: Application to a

- pharmacokinetic study after oral administration of XanthiiFructus extract. Journal of separation science; 2020, vol 43 pp590-597.
177. Defaye G, Ulrich J. Spectres de masse de dérivés de l'Atractyloside, Organic mass Spectrometry ; 1973, vol 8 :89-94.
178. Laurens JB, Bekker LC, Stenkamp V. Gas chromatography-mass spectrometric confirmation of atractyloside in patient poisoned with *Callilepislauzeola*. Journal of chromatography B; 2001, 765 :127-133.
179. Stanislas E, Viala A, Tourte P. Séparation et identification de l'atractylate de potassium par électrophorèse sur papier. Toulouse pharmaceutique ; 1960.
180. Cano JP. Identification and assay of atractyloside in extracts of thistle glue, *Atractylisgummifera* L., after separation by thin layer electrophoresis. Bull SocPharma Marseille; 1965
181. Bye SN, Coetzer THT, Dutton MF. An enzyme immunoassay for atractyloside, the nephrotoxin of *Callilepislauzeola*. (Impila). Toxicon; 1990, 28:997.
182. Nilsson LB. The bioanalytical challenge of determining unbound concentration and protein binding for drugs. Bioanalysis; 2013. 5(24): 3033-3050.
183. Angélica de F. De Assunção Braga I, Acta Cirúrgica Brasileira ; 2008- Vol.23 :4.
184. Yagi K. Simple fluoremetric assay for lipoperoxid in blood plasma, 1976, Biochemical medicine Vol15:1212-1216.
185. Lushchak UI. Glutathion homeostasis and function, 2011, Journal of amino acid:1-26
186. Claiborne A. Catalase activity Methods oxygen radical research 2005 Boca Raton: CRC press
187. Alpapopata B, Neil H, Sheara B, Malkiewicz I. Mechanism of *Impila*(*Callilepislauzeola*)-induced cytotoxicity in Hep G2 cells. Clinical Biochemistry; 2002, 35: pp:57-64
188. Jian Yin et al. Effects of glycyrrhizic acid on cocklebur-induced hepatotoxicity in rat and human hepatocytes. Phytotherapy Research; 2008, 22(3): 395-400.
189. Guideline on the investigation of bioequivalence, European Medicines Agency, London, 20 January 2010, CPMP/EWP/QWP/1401/98 Rev. 1.
190. Gabrielsson J, Weiner D. Non-compartmental analysis. In Computational toxicology. Humana Press; 2012: 377-389.
191. Sacks LV, Shamsuddin HH, Yasinskaya YI, Bouri K, Lanthier ML, Sherman RE. Scientific and regulatory reasons for delay and denial of FDA approval of initial applications for new drugs, 2000-2012. JAMA; 2014, 311(4):378-384.

- 192.** Paul E, Reilly B. Department of biochemistry university of Queensland St Lucia. Australia Biochemical education; 1981, 9: 2.
- 193.** Calmes M, Crespin F, Maillard C, Olivier E, Balansard G. High performance liquid Chromatographic determination of atractyloside and carboxyatractyloside from *Atractylisgummifera L.* J chromat. A 1994, 663: 119-22.

ANNEXE

精华制药集团南通有限公司检验报告

NANTONG JINGHUA PHARMACEUTICAL CO. LTD.
CERTIFICATE OF ANALYSIS

No.20, 3 Haibin Road, Yanhai Economic Development Zone, Rudong,
Nantong Jiangsu China, 226407
Tel: 86-513-85609405/85609406

苯巴比妥

PHENOBARBITAL

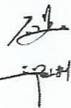
Batch No.	BBT2018030	Manufacture Date	Apr. 24, 2018
Total Quantity	503.000KG	Report Date	May. 9, 2018
Commercial Quantity	500.000KG	Re-test Date	Apr. 23, 2021
Inspection No.	180100139		

TEST	SPECIFICATIONS (Ph.Eur.)	RESULTS
Characteristics	A white, crystalline Powder or colourless crystals	Complies
Identification	B. IR C. TLC D. chemical test	Complies
Melting Point	≈ 176°C (≤ 2°C)	175.0 ~ 176.0°C (1.0°C)
Appearance of solution	Clear, ≤ Y6	< Y6
Acidity	Complies	Complies
Related substances	≤ 0.5%	< 0.5%
Loss on drying	≤ 0.5%	0.23%
Sulphated ash	≤ 0.1%	0.05%
Assay (Calculated on the dried basis)	99.0 ~ 101.0%	99.94%

Conclusion The product meets the requirements of Ph.Eur.7.0

Analyst 徐亚楠

May. 9, 2018



Supervisor 顾东林

May. 9, 2018

Chief of Laboratory 蔡子

QA Release Date



TOXICOLOGIE DU CHARDON A GLU « *Atractylis gummifera* L. »
Etude analytique, toxicocinétique et évaluation in vivo et in vitro du principe actif
« Atractyloside »

Résumé

Le chardon a glu ou *Atractylis gummifera* L., est utilisé en médecine traditionnelle pour ses propriétés cicatrisantes en application locale (syphilis, furoncle, abcès), sous forme de tisane comme diurétique, purgatif, antipyrétique, abortif et émétique. Sa toxicité aiguë diffère selon l'espèce animale et la voie d'administration. La symptomatologie est dominée par une nécrose hépatique et une insuffisance rénale.

Pour cela l'objectif de notre travail est d'évaluer, par des tests in Vivo et in Vitro, le pouvoir toxique de l'attractyloside principe actif du chardon à glu, pour lequel, une méthode de dosage sanguin, par HPLC, est mise au point et validée.

Le pouvoir toxique est évalué, in vivo, par l'estimation de la DL50 chez la souris et par une étude cinétique suite à l'administration d'une dose subtoxique chez le rat. L'étude est complétée par l'estimation du pourcentage de liaison de la molécule ainsi que de vérifier la probabilité de la formation d'une toxicité liée à un métabolite intermédiaire. Le pouvoir d'induire un stress oxydatif a été également exploité (Glutathion, MDA et catalase).

Cette méthode a été validée avec une limite de quantification de 10 µg /mL et une limite de détection de 2 µg /mL. L'étude cinétique de l'attractyloside réalisée sur des rats de race Wistar a montré que tous les processus de transport, de métabolisation et/ ou d'excrétion sont saturés, ceci suggère que la cinétique est non-linéaire. La concentration maximale est de 68,8 µg/mL avec un temps de demi-vie de 90 min et une concentration maximale de 68,8 µg/mL quant à la fraction libre elle est de l'ordre de 65%. Notre étude sur la toxicité in vivo selon les méthodes de Karber/Behrens et Miller et Tainter a donné une DL50 de 115±22,16 mg /kg.

L'étude in vitro sur les trois souches RD, A549 et HEP2 a révélé une augmentation du taux du MDA, une diminution de la concentration des glutathion réduit et une diminution de l'activité de la catalase qui est de l'ordre de 66 à 85% en moyenne ce qui dénotent d'un stress oxydatif induit par l'attractyloside suite à un phénomène apoptotique.

Le test d'induction, par le phénobarbital, a révélé une diminution de la valeur de la concentration maximale par un facteur de 16 et une diminution de l'AUC par un facteur de 5. Le taux de mortalité est plus important et le délai est plus court ce qui suggère que la toxicité de l'attractyloside est due à la molécule mère et/ou à ses métabolites.

Vu qu'aucun traitement spécifique n'est disponible et que toutes les approches thérapeutiques actuelles sont uniquement symptomatiques la maîtrise du sort de la molécule in vivo pourrait nous permettre de palier à la sévérité de la toxicité aiguë par le chardon à glu ou toute autre plante dans le même contexte.

Mots clés : *Atractylis gummifera* L., Chardon à glu, Toxicité in vivo, Toxicité in vitro, Toxicocinétique, Dosage plasmatique par HPLC/UV, Test d'induction enzymatique

**GLUE THISTLE TOXICOLOGY “*Atractylis gummifera* L.
Analytical, toxicokinetic and in vivo and in vitro evaluation of the active ingredient**

Abstract

Glue Thistle or *Atractylis gummifera* L., is used in traditional medicine for its healing properties in localized application (syphilis, boils, abscesses), in the form of herbal tea as diuretic, purgative, antipyretic, abortive and emetic. Its acute toxicity differs depending on the animal species and route of administration. The symptomatology is dominated by liver necrosis and kidney failure.

The objective of our study is to evaluate, through in Vivo and in Vitro tests, the potential toxicity of atractyloside active ingredient of Glu Thistle, for which a method of blood assay by HPLC is developed and validated.

The toxic potency was evaluated in vivo by estimating the LD50 in mice and by kinetic study after subtoxic dose administration in rats. The study is completed by estimating the molecule binding percentage. This involves checking the probability of metabolite-related toxicity. The power to induce oxidative stress has also been exploited (Glutathione, MDA and catalase).

This method has been validated with a limit of quantification of 10 µg/mL and a limit of detection of 2 µg/mL. The kinetic study of atractyloside in Wistar rats showed that all transport, metabolization and/or excretion processes are saturated, suggesting that the kinetics are non-linear. The maximum concentration is 68.8 µg/mL with a half-life of 90 min and a maximum concentration of 68.8 µg/mL, while the free fraction is about 65%.

In vivo toxicity study was conducted using the Karber/Behrens and Miller and Tainter methods that yielded a LD50 of 115±22.16mg/kg.

The in vitro study of the three strains RD, A549 and HEP2 revealed an increase in MDA levels, a decrease of glutathione reduced concentration and a decrease of catalase activity which is of the order of 66 to 85% on average that denotes an oxidative stress induced by atractyloside following an apoptotic phenomenon.

The induction test, by phenobarbital, showed a decrease in the value of the maximum concentration by a factor of 16 and a decrease in the AUC by a factor of 5. Mortality rate is higher and the delay is shorter suggesting that the toxicity of atractyloside is due to the parent molecule and/or its metabolites.

Since no specific treatment is available and all current therapeutic approaches are only symptomatic, controlling the fate of the molecule in vivo could allow us to overcome the severity of acute toxicity by the Glue Thistle or any other plants in the same context.

Keywords: *Atractylis gummifera* L., Glue Thistle, In vivo toxicity, In vitro toxicity, Toxicokinetics, Plasma HPLC/UV assay, enzymatic induction test.

دراسة التسمم بشوك العلك *Atractylis gummifera* L.

دراسة تحليلية وخواص حركية وتقييم في الجسم الحي والخلوي العنصر النشط "Atractyloside"

ملخص

يستخدم الأداد الصمغي أو *Atractylis gummifera* L.، في الطب التقليدي لخصائصه العلاجية كمحفز لالتئام الندوب عند استخدامه موضعياً (الزهرى، الدم، الخراج)، وكمد للبول، مسهل، خافض للحرارة، مجهض، ومقيئ عند استخدامه في شكل شاي عشبي. تختلف سميته الحادة باختلاف نوع الحيوان وطريقة تناوله. غالباً ما يهيمن النخر الكبدى والفشل الكلوي على الأعراض المصاحبة للتسمم.

لهذا الغرض، يتمثل الهدف من عملنا هذا في تقييم سمية مادة الأترأكتيلوزيد، المادة النشطة في نبات الأداد الصمغي، من خلال إجراء اختبارات على الكائنات الحية وأخرى في المختبر، وسيتم من أجل ذلك تطوير وإثبات طريقة لقياس كمية الأترأكتيلوزيد في الدم باستخدام تقنية HPLC.

سيتم تقييم السمية في الجسم الحي، من خلال تقييم الجرعة المميته (DL50) عند الفأر، وإجراء دراسة حركية عن طريق إعطاء جرعة ما دون السمية للجرذ. اكتملت الدراسة بتقدير نسبة ارتباط المركب، وكذلك التحقق من احتمال تشكّل سمية مرتبطة بمستقلب وسيط. كما تم استغلال القدرة على إحداث الإجهاد التأكسدي (الجلوتاثيون، مالونديالدهيد MDA والكتالاز).

تم التحقق من صحة هذه الطريقة بحد كمي أقصى للقياس قدره 10 ميكروغرام / مل، وحد أدنى للكشف قدره 2 ميكروغرام / مل. أظهرت الدراسة الحركية للأترأكتيلوزيد والتي أجريت على جردان سلالة Wistar أن جميع عمليات النقل والاستقلاب و / أو الإخراج مشبعة، وهذا يشير إلى أن الحركية غير خطية. بلغ زمن نصف العمر 90 دقيقة، وقد التركيز الأقصى بـ 68.8 ميكروجرام / مل، بينما بلغت الأجزاء الحرة نسبة 65٪.

أعطت دراستنا حول السمية في الجسم الحي تبع الطرق Karber Behrens ، Miller ، و Tainter قيماً للجرعة المميته DL50 بمقدار 22.16 + 115 مجم / كجم.

كشفت الدراسة في المختبر التي أجريت على السلالات الثلاثة RD و A549 و HEP2 عن زيادة في مستوى MDA، وانخفاض في تركيز الجلوتاثيون المرجع (GSH)، وكذا انخفاض في نشاط الكاتالاز و الذي بلغ 66 إلى 85٪ في المتوسط، مما يدل على الإجهاد التأكسدي الناجم عن الأترأكتيلوزيد بعد ظاهرة استماتة الخلايا.

كشف اختبار التحفيز، باستخدام الفينوباربيتال، عن انخفاض في قيمة الحد الأقصى للتركيز بعامل 16 وانخفاض في AUC بمقدار 5. كما ارتفع معدل الوفيات وانخفضت المدة الزمنية. مما يشير إلى أن سمية الأترأكتيلوزيد ترجع إلى المركب الأم و / أو مستقلباته. نظراً لعدم توفر علاج محدد وكون جميع الأساليب العلاجية الحالية مبنية على مبدأ علاج الأعراض فقط، فإن التمكن من إدراك مصير هذا المركب في الجسم الحي يمكن أن يسمح لنا بالتغلب على شدة التسمم الحاد بنبات الأداد الصمغي وأي نباتات أخرى في ذات السياق.

الكلمات المفتاحية: *Atractylis gummifera* L. ، الأداد الصمغي، السمية في الجسم الحي، السمية في المختبر، الحركة السمية، قياس التراكيز في مصل الدم بتقنية HPLC / UV ، اختبار التحفيز الإنزيمي (الحت).

Nom et Prénom : Mohamed Habib BELMAHI

Titre : **TOXICOLOGIE DU CHARDON A GLU « *Atractylis gummifera* L. »**

Etude analytique, toxicocinétique et évaluation in vivo et in vitro du principe actif « Atractyloside »

Thèse en vue l'Obtention du Diplôme de Doctorat en Sciences Médicales en Toxicologie

Résumé

Le chardon a glu ou *Atractylis gummifera* L., est utilisé en médecine traditionnelle pour ses propriétés cicatrisantes en application locale (syphilis, furoncle, abcès), sous forme de tisane comme diurétique, purgatif, antipyrétique, abortif et émétique. Sa toxicité aiguë diffère selon l'espèce animale et la voie d'administration. La symptomatologie est dominée par une nécrose hépatique et une insuffisance rénale.

Pour cela l'objectif de notre travail est d'évaluer, par des tests in Vivo et in Vitro, le pouvoir toxique de l'atractyloside principe actif du chardon à glu, pour lequel, une méthode de dosage sanguin, par HPLC, est mise au point et validée.

Le pouvoir toxique est évalué, in vivo, par l'estimation de la DL50 chez la souris et par une étude cinétique suite à l'administration d'une dose subtoxique chez le rat. L'étude est complétée par l'estimation du pourcentage de liaison de la molécule ainsi que de vérifier la probabilité de la formation d'une toxicité liée à un métabolite intermédiaire. Le pouvoir d'induire un stress oxydatif a été également exploité (Glutathion, MDA et catalase).

Cette méthode a été validé avec une limite de quantification de 10 µg /mL et une limite de détection de 2 µg /mL .

L'étude cinétique de l'atractyloside réalisée sur des rats de race Wistar a montré que tous les processus de transport, de métabolisation et/ ou d'excrétion sont saturés, ceci suggère que la cinétique est non-linéaire. La concentration maximale est de 68,8 µg/mL avec un temps de demi-vie de 90 min et une concentration maximale de 68,8 µg/mL quant à la fraction libre elle est de l'ordre de 65%.

Notre étude sur la toxicité in vivo selon les méthodes de Karber/Behrens et Miller et Tainter a donnée une DL50 de 115+22,16 mg /kg.

L'étude in vitro sur les trois souches RD, A549 et HEP2 a révélé une augmentation du taux du MDA, une diminution de la concentration des glutathion réduit et une diminution de l'activité de la catalase qui est de l'ordre de 66 à 85% en moyenne ce qui dénotent d'un stress oxydatif induit par l'atractyloside suite à un phénomène apoptotique.

Le test d'induction, par le phénobarbital, a révélé une diminution de la valeur de la concentration maxima par un facteur de 16 et une diminution de l'AUC par un facteur de 5. Le taux de mortalité est plus important et le délai est plus court ce qui suggère que la toxicité de l'atractyloside est due à la molécule mère et/ou à ses métabolites.

Vu qu'aucun traitement spécifique n'est disponible et que toutes les approches thérapeutiques actuelles sont uniquement symptomatiques la maîtrise du sort de la molécule in vivo pourrait nous permettre de palier à la sévérité de la toxicité aiguë par le chardon à glu ou toute autre plantes dans le même contexte.

Mots clés : *Atractylis gummifera* L. Chardon à glu, Toxicité in vivo, Toxicité in vitro, Toxicocinétique, Dosage plasmatique par HPLC/UV, Test d'induction enzymatique

Directeur de Thèse : Professeur Mohamed REGGABI Université d'Alger

Soutenu le : 11 Octobre 2020