Université Sidi Mohammed Ben Abdellah
Faculté des Sciences Dhar El Mahraz-Fès
Centre d'Etudes Doctorales
"Sciences et Technologies"

Molécules bioactives, Santé et Biotechnologies

Discipline : Biologie

Spécialité : Physiologie et pharmacologie

Laboratoire : Physiologie - Pharmacologie et Santé Environnementale

THESE DE DOCTORAT

Présenté par

Siham ERRAI

Etude Chimique, Evaluation Toxicologique et Valorisation du Potentiel Pharmacologique d'*Atractylis gummifera L.*, *(Chardon à glu)*

Soutenue le 31 Décembre 2019 devant le jury composé de :

Pr. Badiaa LYOUSSI	**Faculté des Sciences Dhar El Mahraz - Fès**	***Président***
Pr. Bruno ETO	**Faculté de Médecine et de Pharmacie - France**	***Rapporteur***
Pr. My abbes FAOUZI	**Faculté de Médecine et de Pharmacie -Rabat**	***Rapporteur***
Pr. Brahim BOUKATTA	**Faculté de médecine et de pharmacie-Fès**	***Rapporteur***
Pr. Youssef KHABBAL	**Faculté de médecine et de pharmacie-Agadir**	***Examinateur***
Pr. Abdelkader GOURCH	**Faculté des Sciences Dhar El Mahraz - Fès**	***Examinateur***
Pr. Mohammed BENBELLA	**Ecole Nationale d'agriculture de Meknès**	**Invité**
Pr. Mohammed ELMIDAOUI	**Ecole Nationale d'agriculture de Meknès**	**Invité**
Pr. Abdelhadi AIT HOUSSA	**Providence verte, Rabat**	**Invité**
***Pr.* Abdelfattah ABDELLAOUI**	**Faculté des Sciences Dhar El Mahraz - Fès**	**Directeur de thèse**

Année universitaire : 2019-2020



صدق الله العلي العظيم

Remerciement

Une thèse de doctorat peut apparaître comme un document très aride, très froid, rigide, très scientifique évidemment dans notre cas. Le travail d'une thèse représente effectivement des heures de travail difficile, solitaire ; le milieu du laboratoire est empreint de restrictions, de règles, de rigueur dans les manipulations, même dans la tenue vestimentaire. Pourtant, le doctorat en soi est loin d'être dénué de vie, de créativité et d'interactions humaines. Il s'agit avant tout d'un parcours très humain, un projet plein d'influences et d'entraves, de réflexions, d'évolution et de liens tissés. En effet, l'entreprise d'un doctorat en est une de longue haleine et est aussi une épopée souvent parcourue à l'une des époques les plus belles, riches et vivantes de notre évolution comme étudiant, comme jeune adulte et futur professionnel.

L'apprentissage des études doctorales trouve une part précieuse de sa valeur en le fait qu'il est enrichi des parcours parallèles de nos collègues, de nos superviseurs, de nos collaborateurs et aussi de nos proches… Cette section de remerciements est à mon avis la plus satisfaisante à écrire de toute ma thèse. J'ai beaucoup de reconnaissance et d'admiration à témoigner d'abord Je souhaite remercier mon directeur de thèse, Mr. Abdellaoui Abdelfattah, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe. Je lui suis également reconnaissante pour le temps conséquent qu'il m'a accordé, ses qualités pédagogiques et scientifiques, sa franchise et sa sympathie. J'ai beaucoup appris à ses côtés et je lui adresse ma gratitude pour tout cela.

À Pr Benbella, notre inspiration, notre modèle, avec un vrai cœur de père qui est un modèle professionnel pour sa gestion calme de son temps pourtant si chargé de responsabilités importantes et bien sûr pour sa maîtrise remarquable de notre domaine, à la fois comme ingénieur agronome et comme professeur, pédagogue et comme chercheur.

Pr Elmidaoui, merci pour ton ouverture à mon caractère et à ma touche propres en recherche, merci pour la liberté que tu me laisses en me témoignant ta confiance dans mon travail. Ce sont cette confiance et cette liberté qui, à mon avis, me laisse spontanément faire ressortir le meilleur de moi-même dans mon travail et comme personnes. Merci de reconnaître mes efforts et mes difficultés. Merci pour la relation que nous avons pu développer depuis mon entrée à la chaire comme étudiante à l'ENAM, merci aussi de m'avoir dirigée et encouragée à passer au doctorat (malgré mes conditions un peux particulières !) et d'avoir ainsi joué un rôle majeur dans ma découverte de possibilités de carrière qui me motivent vraiment, merci pour ton efficacité qui facilite toujours le lourd processus de la publication d'articles! Merci d'avoir aussi laissé souvent libre cours à ma créativité dans mes présentations. Merci enfin pour ton soutien incroyablement solide, attentif, fiable, cordial dans mon sprint final des dernières semaines…

Merci Pr Khabbal, pour votre contribution précieuse en tant que Professeur en pharmacologie, à mon arrivée dans votre laboratoire, avec ma formation d'ingénieure agronome et une touche d'insécurité, légèrement intimidée d'ailleurs (!), merci pour votre regard plein d'assurance et de sagesse sur mon travail et mon parcours, pour votre délicatesse et votre courtoisie dans nos rapports, merci d'avoir partagé un peu de votre grande expérience en recherche avec moi,

J’adresse de chaleureux remerciements à Pr Badia Lyoussi, pour son attention de tout instant sur mes travaux, pour ses conseils avisés et son écoute qui ont été prépondérants pour la bonne réussite de cette thèse. Son énergie et sa confiance ont été des éléments moteurs pour moi. vous êtes un bel exemple de réussite pour nous, tes étudiants et étudiantes, qui tentons d’absorber un peu de votre énergie fonceuse!, merci pour votre loyauté, votre générosité et tout le bien que vous reflétez

Merci aussi à Dr. Bruno Etho, c’est un honneur de vous avoir comme membre de jury, merci pour votre intérêt envers ma recherche et pour les relations amicales que vous entretenez avec notre équipe Merci d’avoir accepté de siéger sur ce comité comme rapporteur pour ma thèse, merci pour vos conseils d’expert, pour votre enthousiasme et votre aide toujours très généreuse dans mes débuts surtout, sur un sujet qui me semblait si étranger…
Je voudrais remercier les rapporteurs de cette thèse Professeur Faouzi.A, Professeur Bruno.E, et Professeur Bouktta.B, pour l’intérêt qu’ils ont porté à mon travail et pour avoir accepté d’examiner mon travail.

Merci à Pr Oumkhtar du laboratoire de microbiologie de la faculté de médecine pour son implication dans mes travaux. Elle m’a donné des conseils avisés et a été d’une grande ressource pour moi surtout pour la partie d’étude microbienne.

Comme j’adresse de sincères remerciements à Pr. Bousetta pour m’avoir accueilli chaleureusement au sein de son laboratoire d’analyses médicales et avoir pris en charge tous les analyses biochimiques effectuées.

J’adresse également de chaleureux remerciements à Pr Ait Houssa, pour ses conseils sa présence et m’avoir aider à toujours rester en contact avec les dernières pratiques agricoles et actualiser mes connaissance en agronomie, par des formations continues, et de haute qualité, organisé par le centre de formation providence verte.

A Pr Maataoui pour son engagement, son implication, sa modestie et d’avoir accepté de partager son grand savoir avec moi depuis la préparation du mémoire de fin d’étude à l’ENAM, ou on j’ai pu travailler pour la première fois sur des plantes médicinales, et depuis j’ai adoré ce domaine d’où le sujet d’aujourd’hui, je le remercie aussi pour l’énorme effort qu’il a fourni lors des sorties sur terrain chose qui n’est pas nouvelle d’un tel homme de terrain.

Je remercie Pr Faid de m’avoir encouragé à travailler sur cette plante et pour les idées nombreuses qu’il m’a fournies, aussi pour avoir pris la peine de se déplacer plusieurs fois à Fès
Je désire en outre remercier tous les membres du laboratoire de pharmacologie de la faculté de médecine et de pharmacie de Fès ainsi les membres du laboratoire de physiologie végétale de la faculté des sciences dhar el mehraz, les membres du laboratoire central du CHU, et le personnel de l’animalerie, pour leur sympathie, leur amitié. J’ai eu beaucoup de plaisir à travailler avec eux. Le cadre de travail était idéal.

Le deuxième pilier de mon équilibre c’est ma famille. Un grand merci à ma maman sans qui je n’en serais pas là aujourd’hui et à qui je dois tout, merci pour ton amour et ton soutien inconditionnel. Merci aussi d’être tout le temps la personne qui subit les conséquences de mes déplacements et mon absence… J’espère être à ta hauteur dans ce nouveau rôle qui m’attend.

Et merci pour toute la préparation de mon pot de thèse !

Merci surtout à mon très cher papa, ERRAI ALLAL, décédée en 2017, qui m'a élevée avec amour, jusqu'au bout de ses forces, avec son fort caractère, son courage, son calme, sa sagesse et qui m'a fait grandir malgré lui par l'immense épreuve qui l'a emportée et qui nous a à tout jamais secoués, marqués, changés. Je sais que tu aimerais lire ma thèse, je sais que tu aurais aussi aimé faire de la recherche, je sais que tu serais content pour moi, fière, intéressée, j'aurais tellement aimé fêter cet accomplissement avec toi et vivre avec toi toute ces prochaines étapes que je ne devine pas encore... Chère papa je suis très fière d'avoir été ta fille, c'est une chance immense de t'avoir eu dans ma vie, tu es un cadeau et un épatement pour tous ceux qui ont eu le privilège de te connaitre.

Merci mon mari, avec qui j'ai fini mon bac et commencé mes étude à l'ENAM, qui m'a encouragée dans mon passage au doctorat, qui m'a toujours soutenue et qui m'a laissée partir aux en dehors de notre ville, saisir une occasion qui me tenait à cœur malgré ce que ça lui en coûtait. Merci d'avoir voulu souvent penser à moi avant tout, à mon bonheur, merci pour toutes les années de soutien et de partage, j'en garde un souvenir de belle complicité et de sincère dévouement. Tu as longtemps été mon réconfort le plus présent, le plus proche, le plus constant.

A la lumière de ma vie, à mes deux adorables enfants MOHAMMED ISLAM et ALAE, qui ont pu supporter mon planning assez chargé et qui ont pu continuer à être sages en dépit de mon absence. Je vous adresse mes chaleureux remerciements, mon amour inconditionnel et à nous l'avenir inchaellah .

Enfin, je remercie, mes frères et sœur, Abdelaziz, Nezha, Abdelali, Fouzia, Hayat, Jamal,

Mohammed et Souad, de m'avoir supporté et supporter mon absence de presque tous les évènements familiaux ! Merci pour votre soutien au cours de ces années et sans vous je ne serais pas là aujourd'hui.

Merci à ma famille élargie (à mes chères cousines, chers cousins, oncles et ...)

Résumé

L'*Atractylis gummifera L*, est une plante de la famille des Astéracées connue sous le nom de chardon à glue. Ses racines sont traditionnellement utilisées sous forme de décocté ou en fumigation, contre le rhume, les saignements, la syphilis et le cancer. Par mégarde, il arrive que l'*Atractylis gummifera* soit confondue avec l'artichaut par les populations non averties, qui en la consommant, s'exposent à des intoxications très graves. Les victimes, sont très souvent des enfants, qui convulsent, subissent de violentes coliques abdominales, vomissent abondamment et entrent même parfois dans le coma pouvant conduire à la mort qui peut survenir rapidement après quelques heures. Face à une telle situation et compte tenu du fait que cette plante est considérée à la fois toxique et d'un grand intérêt médical, on s'est fixé comme principal objectif de contribuer au renforcement et à l'enrichissement des bases de données scientifiques disponible sur cette plante qui n'a jamais fait l'objet d'étude pharmacologique et de tracer une limite assez claire entre la zone de confiances et de méfiance en cette dernière, par des essai toxico-pharmacologiques. Pour ce faire, on a procédé d'abord à une identification des groupes phytochimiques que contiennent les racines fraîches et sèches de cette plante ; puis à une étude de la toxicité aigüe et chronique, des différentes formes d'extraits téxtés, sur divers lots de rats de type Wistar. Ces rats ont été sacrifiés, en fin d'expérimentations, et leur autopsie a été effectuée. Des tests biologiques et pharmacologiques ont été également déterminés afin de vérifier l'intérêt que revête l'utilisation de ces différents extraits de racines. Les résultats de ces tests ont permis de déceler, dans les extraits des racines de cette plante, la présence, à des teneurs variables suivant le type d'extrait et de sa dose, des tanins, des flavonoïdes, des coumarines, des terpenoides, des quinones et des phénols totaux. Le dosage de ces derniers composés a montré que les teneurs les plus élevées ont été obtenues avec l'extraction à base du méthanol (182.66 ±0.21) suivies de celle de l'Acétate (75.88 ±1.91), du décocté (47.11 ± 0.85), du macéré (39.83 ±1.71) et en dernier à l'extraction à l'Hexane (24.02 ±0.5). L'étude de la toxicité aigüe a montré que le macéré est plus toxique que le décocté et que la DL_{50} (mort de 50% des rats) respective est de 2.32 et 5.01 g/kg du poids pondéral. Alors que dans le cas de la toxicité chronique et bien que le poids n'a pas été significativement affecté, on a noté après autopsie, des lésions hépatiques et rénales importantes chez les rats, montrant ainsi des modifications non négligeables de l'ensemble des paramètres biochimiques déterminés (ALT, AST, GGT). Les deux extraits des racines *d'Atractylis gummifera* (décocté et macéré) bien que présentant des effets sensiblement différents, gardent par leurs activités biologique et pharmacologique, un potentiel fort et positif sur les différentes souches microbiennes testées. Le décocté des racines sèches *d'Atractylis gummifera* a eu une forte activité antimicrobienne même vis-à-vis des souches multi résistantes aux antibiotiques. Globalement, l'activité antimicrobienne du décocté est plus importante que celle du macéré, se distinguant ainsi, par un spectre antimicrobien plus large. En ce qui concerne les activités pharmacologiques, les résultats obtenus semblent très prometteurs, surtout lorsqu' on note des taux d'inhibition pouvant atteindre 98% en activité anti-oxydante et 93% en activité anti-inflammatoire. En conclusion, cette étude a bien montré qu'il serait possible d'atténuer l'effet de la toxicité des racines *d'Atractylis gummifera* en se référant, dans un premier temps, à de simples procédés hydrothermiques, acidifiants (pH=2), d'épuisement, d'hydrothermal (à 100°C pendant 2h = - 50%) ou plus encore à l'utilisation du procédé hydro-épuisement, qui permet de réduire jusqu'à 100% de la toxicité de ces extraits, en agissant directement sur l'élimination totale des substances toxiques (ATR et CATR: solubles dans l'eau), présentes dans les solutions d'extraits des racines. La suggestion d'utilisation de ces extraits, provenant des racines d'Atractylis gummifera, en phytothérapie ou en pharmacologie ou d'autres est discutée.

Mot clé : *Atractylis gummifera*, Atractyloside, carboxyatractyloside, phytochimie, toxicité, pharmacologie, dosage, atténuation.

Abstract

Atractylis gummifera L, is a plant of the Asteraceae family, which is widely known as the glue thistle. Its roots has traditionally been used as a decoction or fumigation, against colds, bleeding, syphilis and cancer. Nonetheless, it happens that the uninformed populations confuse the *Atractylis gummifera* with the artichoke, and by doing so they might expose themselves to very serious and deadly intoxications. The victims are very often children who convulse, suffer from violent abdominal colic, vomit abundantly and sometimes fall in a coma that can quicly lead to death after a few hours. Faced with such situations and taking into account that this plant is considered both toxic and of great medical interest, our main concern is to contribute to strengthening and enriching the available scientific databases on this plant which has never been the subject of previous pharmacological studies. Armed with the previous goals, this research aims at drawing a clear boundary between the zone of confidence and mistrust with regard to this plant, by conducting toxicological-pharmacological tests. To meet this end, we first identified the phytochemical groups contained in the fresh and dry roots of this plant; then we looked at the acute and chronic toxicity tests, different forms of fresh and dry root extracts, on various lots of Wistar rats. These rats, whose autopsy was performed, were sacrificed at the end of the experiments. Biological and pharmacological tests were also conducted to investigate the interest and utility of using these different root extracts. The results of these tests made it possible to detect, out of the roots' extracts of this plant, the presence, at variable contents according to the type of extract and its dose, tannins, flavonoids, coumarins, terpenoids, quinones and total phenols. The determination of the latter compounds showed that the highest levels were obtained with methanol extraction (182.66 ± 0.21) followed by that of Acetate (75.88 ± 1.91), decoction (47.11 ± 0.85). , macerated (39.83 ± 1.71) and finally with Hexane extraction (24.02 ± 0.5). The acute toxicity study showed that the macerate is more toxic than the decoction and that the LD50 (death of 50% of the rats) respectively is 2.32 and 5.01 g / kg of weight. In the case of chronic toxicity and in spite of the fact that the weight was not significantly affected, we noticed, after autopsy, significant liver and kidney damage in the rats, showing significant changes in all biochemicals parameters determined (ALT, AST, GGT). The two extracts of *Atractylis gummifera*'s roots (decocted and macerated) in spite of presenting significantly different effects, keep their biological and pharmacological activities; a strong and positive potential on the different microbial strains tested. Decoction of the dry roots of *Atractylis gummifera* had a powerful antimicrobial activity even with as regards the multi-resistant strains of antibiotics. Generally, the antimicrobial activity of the decoction is far greater than that of the macerated, hence distinguishing itself by a broader antimicrobial spectrum. With respect to pharmacological activities, the results obtained seem very
promising, especially when one notes inhibition rates of up to 98% in the antioxidant activity and 93% in the anti-inflammatory activity. To put in a nutshell, this study has shown that it would be possible to alleviate the effect of of the extracts of the *Atractylis gummifera*'s roots by first referring to simple hydrothermal, acidifying processes (pH = 2), of exhaustion, hydrothermal (at 100 ° C for 2h = -50%) or even more with the use of the hydro-exhaustion process, which allows to reduce up to 100% of the toxicity of these extracts, by acting directly on the total elimination of toxic substances (ATR and CATR: soluble in water), present in the solutions of extracts of the roots. The suggestion of using these extracts, from the roots of

Atractylis gummifera, in herbal medicine or in pharmacology or others is discussed.

Key word: Atractylis gummifera, Atractyloside, carboxyatractyloside, phytochemistry, toxicity, pharmacology, dosage, attenuation.

ملخص

"الداد" هو نبات معروف باسم شوك العلك، تستخدم جذوره في الاستشفاء التقليدي، ضد نزلات البرد والنزيف والزهري والسرطان... لكن نتيجة الاستعمال العشوائي للنبتة من قبل السكان غير المطلعين؛ يحدث أحيانا خلط بينها وبين "الخرشوف"؛ مما يعرضهم لتسممات خطيرة غالبا ما يكون ضحاياها من الأطفال الذين يصابون على اثرها بالشلل والمغص العنيف في البطن والقيء بكثرة وأحيانًا يدخلون في غيبوبة قد تؤدي إلى الوفاة التي يمكن أن تحدث بسرعة بعد بضع ساعات من استهلاك النبتة.

في ظل هدا الوضع، ونظرا لكون هذا النبات يعتبر في نفس الوقت ساما وذو أهمية طبية كبيرة، فإن الهدف الرئيسي من هذا البحث هو المساهمة في تعزيز وإثراء قواعد البيانات العلمية المتاحة على هذا النبات الذي لم يكن يومًا موضع دراسة دوائية لرسم حدود واضحة بما يكفي بين منطقة الثقة وانعدام الثقة في هذا الأخير، من خلال الاختبارات الدوائية والسموم.

للقيام بذلك، تم تحديد المجموعات الكيميائية النباتية الموجودة في الجذور الطازجة والجافة لهذا النبات؛ ثم دراسة التسمم الحاد والمزمن لمختلف المستخلصات على الكثير من الفئران من نوع "وستر"، تم التضحية بهده الفئران في نهاية التجارب وتشريحها. كما تم القيام باختبارات بيولوجية ودوائية. مكّنت نتائج هذه الاختبارات من اكتشاف وجود محتويات متغيرة في مقتطفات جذور هذا النبات وفقًا لنوع المستخلص والجرعة، "الفالفونويد"، و"الكومارين"، و"اليربينويدات"، "الكينونات" و"الفينول الكلي".

أظهر تحديد المركبات الأخيرة أنه تم الحصول على أعلى المستويات من خلال استخراج ب"الميثانول (0.21± 182.66) متبوعًا ب"الأسيتات" (1.91± 75.88)، مغلي (0.85 ± 47.11)، بالمنقوع (1.71± 39.83)، وأخيرا عن طريق الاستخراج بالهكزان (0.5± 24.02).

أوضحت دراسة التسمم الحادة أن المحلول المنقوع أكثر تسمما من المحلول المغلي، وأن التركيز الدي يؤدي إلى موت 81٪ من الفئران هو على التوالي: 2.32 و 5.01 جرام / كيلوغرام من الوزن. بينما في حالة التسمم المزمن، وعلى الرغم من أن الوزن لم يتأثر بشكل كبير، فقد لوحظت في مرحلة ما بعد التشريح أضرار كبيرة في كبد وكلي الفئران، وتغيرات كبيرة في جميع المواد الكيميائية الحيوية (ALT, AST, GGT).

على الرغم من أن تأثيرات منقوع ومغلي جذور الداد مختلفة بشكل كبير، إلا أنهما حافظا على أنشطتهما البيولوجية والدوائية، وإمكانية قوية وإيجابية على مختلف السلالات الميكروبية التي تم اختبارها. وأظهر المحلول المغلي من الجذور الجافة نشاط قوي مضادا للميكروبات حتى في مقابل سلالات مقاومة للمضادات الحيوية بشكل أوسع، أكبر من نشاط المنقوع، وبالتالي المحلول المغلي يميز نفسه عن طريق طيف مضاد للميكروبات.

فيما يتعلق بالأنشطة الدوائية، فإن النتائج التي تم الحصول عليها تبدو واعدة للغاية، خاصة عندما نلاحظ معدلات تثبيط تصل إلى 98% في نشاط مضادات الأكسدة و 93% في نشاط مضاد للالتهابات.

في الختام، أظهرت هذه الدراسة أنه سيكون من الممكن التخفيف من التأثير السمي للجذر عن طريق استخدام الحرارة، الماء، والحمضية)، أو القضاء تماما على سُمِّية النبتة من خلال العمل مباشرة على التخلص التام من المواد السامة.

الكلمات المفتاح:

كربوكسي اتركسيلوسيد ، اتركسيلوسيد ،الكيمياء الحيوية ، السمية ، علم الصيدلة ، الجرعة ، التوهين، الداد.

Sommaire

Introduction	1
1ere partie : Etude bibliographique	4
Généralités sur la phytothérapie et les plantes Médicinales	5
I. Histoire de la phytothérapie et des plantes médicinales	5
I.1. Phytothérapie	5
I.2. Plante médicinale	7
II. Plantes médicinales du Maroc	8
III. Composition chimique des plantes	9
III.1. Huiles essentielles	10
III.2. Composés organiques non volatils	12
a. Les composés phénoliques	12
b. Les terpènes	15
c. Les alcaloïdes	16
d. Les saponines	17
IV. Toxicité des plantes médicinales	18
IV.1. Classification des plantes toxiques	19
VI.2. Approche syndromique	20
Atractylis gummifera (Chardon à glu)	22
I. Description botanique du chardon à glu	22
I.1. Classification	22
I.1.1. . Systématique	22
I.1.2. Nomenclature	22
I.1.3. Famille des Asteraceae	23
I.1.4. Genre Atractylis	24
I.1.5. Espèce d'Atractylis gummifera L.	24
I.2. Description botanique	24
I.2.1. Partie aérienne	25
I.2.2. Partie souterraine	27
I.3. Distribution	28
I.4. Composition chimique et principes actifs d'Atractylis gummifera	29
I.4.1. Composition chimique	29
I.4.2. Principes actifs	29

II. Intoxication par Atractylis gummifera : Répartition, lieux et circonstances	**31**
II.1.1. Mécanisme d'action	**34**
II.1.2. Signes cliniques et biologiques d'intoxication par Atractylis	**35**
II.1.2.1. Signes cliniques	**35**
II.1.2.2. Signes biologiques	**37**
II.1.2.3. Traitement	**38**
III. Usage et propriétés pharmacologiques	**39**
IV. Dosage	**41**
Généralité sur les études toxicologiques	**42**
I. Toxicité aiguë	**42**
II. Toxicité chronique	**43**
II.1. Observations	**43**
II.2. Examen Hématologique	**44**
II.3. Examen Biochimique	**45**
II.4. Examen anatomo-pathologique	**45**
II.5. Histopathologie	**47**
Généralités sur les activités pharmacologiques réalisées in vivo	**50**
I. Données générales sur le comportement et les psychotropes	**50**
I.1. Psychotropes naturels	**50**
I.2. Psychotropes artificielles	**50**
I.3. Comportement et modèle comportemental	**51**
II. Généralités sur l'inflammation et les anti-inflammatoires	**51**
II.1. Inflammation	**51**
II.2. Causes de l'inflammation	**53**
II.3. Inflammation chronique	**53**
II.4. Inflammation aigue	**54**
II.5. Cellules et médiateurs de l'inflammation	**56**
II.6. Anti-inflammatoires	**59**
II.6.1. Anti-inflammatoires conventionnels	**60**
II.6.2. Anti-inflammatoires traditionnels	**61**
III. Généralités sur la douleur et les antalgiques	**61**
III.1. Définition de la douleur	**61**
III.1.1. Types de douleur	**62**
III.1.2. Mécanismes de la douleur	**63**

III.2.Antalgiques	**70**
III.2.1. Les antalgiques opioides	**70**
III.2.2. Les antalgiques non opioides	**71**
III.2.3. Antalgiques traditionnels	**71**
Généralités sur les Activités pharmacologique étudiées in *vitro*	**73**
I. Stress oxydatif et antioxydants	**73**
I.1. Stress oxydatif	**73**
I.2. Antioxydants	**74**
I.2.1. Antioxydants naturels	**75**
I.2.2. Evaluation de la capacité antioxydante par les tests in Vitro	**76**
II. les bactéries et les antibiotiques	**76**
II.1. Définition des bactéries	**76**
II.2. Antibiotiques	**77**
II.3. Antibiotiques traditionnels	**78**
2ème partie : Matériel et Méthodes	**80**
Matériel végétal, Animal et Appareillage	**80**
I. Matériel végétal	**78**
II. Matériel animal	**83**
II.1. Rats	**83**
II.2. Souris	**84**
II.3. Souches microbiennes	**84**
II.3.1 Description des Souches bactériennes	**85**
a- scherichia coli	**85**
b- Klebsiella pneumonia	**85**
c- Pseudomonas aeruginosa	**83**
d- Acinetobacter	**86**
III. Appareillage	**87**
III.1. Soxhlet	**87**
III.2. Rotavapeur	**88**
III.3. Pléthysmomètre	**89**
III.4. Planche à trous	**90**
III.5. L'Automate de Coloration	**91**
III.6. Microtomes	**91**
III.7. Le spectrophotomètre UV	**93**

Extraction et criblage phytochimique	**94**
I. Préparation des extraits	**94**
I.1. Préparation du décocté	**94**
I.2. Préparation du macéré	**94**
I.3. Extraction par solvants	**94**
II. Criblage phytochimique	**95**
II.1. Détection des polyphénols	**95**
II.2. Détection des flavonoïdes	**95**
II.3. Détection des tannins	**95**
II.4. Détection des Quinones	**96**
II.5. Détection des saponines	**96**
II.6. Coumarin	**96**
II.7. Terpenoides	**96**
II.8. Dosage des phénols	**97**
Étude Toxicologique	**98**
I. Etude de la toxicité aigüe : Détermination de la DL50	**98**
II. Etude de la toxicité chronique d'extrait aqueux d'*Atractylis gummifera*	**99**
II.1. Etude histologique	**101**
a-Prélèvement :	**101**
b- Fixation, Inclusion en paraffine coupe et coloration :	**103**
c- Lecture	**104**
II.2. Etude biochimiques	**104**
Activités gummifera in Vivo	**106**
I. Activité antalgique	**106**
I.1. Méthode d'étude des analgésiques vrais pharmacologiques d'Atractylis	**106**
I.2. Méthode d'étude des analgésiques antipyrétiques	**106**
II. Activité psychotrope	**107**
II.1. Test de la traction	**108**
II.2. Test de la cheminée	**108**
II.3. Test de la planche à trous	**109**
II.4. Test de l'activité anti-inflammatoire	**110**
Activités pharmacologique d'*Atractylis gummifera* in *Vitro*	**112**
I. Evaluation du pouvoir antioxydant	**112**
II. Evaluation de l'activité antibactérienne	**112**

II.1. Test de sensibilité aux antibiotiques : Antibiogramme	**112**
II.2. Tests antimicrobiens : Technique de diffusion sur disque.	**114**
II.3. Technique de microdillution : Détermination des concentrations	**114**
II.4. Détermination concentrations minimales bactéricides (CMB)	**114**
3eme Partie : Résultats et discussion	**115**
Criblage phytochimique	**115**
Étude Toxicologique	**119**
I. Toxicité aigüe	**119**
II. Toxicité chronique	**123**
II.1. Comportement des animaux	**124**
II.2. Evolution pondérale	**124**
II.3. Examen anatomopathologique	**125**
II.3.1.Hépatotoxicité	**125**
II.3.2.Nephrotoxicité	**127**
II.4. Biochimie	**131**
Activité in Vitro d'Atractylis gummifera	**136**
I. Activité anti oxydante	**136**
II. Tests anti microbiens	**138**
II.1. Activité anti bactérienne du macéré et du décocté des racines	**138**
II.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et	**141**
Activité pharmacologique in vivo d'*Atractylis gummifera*	**145**
I. Activité antalgique :	**145**
I.1. Test du « TAIL FLICK »	**145**
I.2. Test de Koster à l'acide acétique chez la souris	**146**
II. Etude des psychotropes	**147**
II.1. Test de la traction	**148**
II.2. Test de la cheminée	**148**
II.3. Test de la planche à trous	**149**
III. Activité anti-inflammatoire	**149**
Attenuation of Toxic power of Atractylis gummifera	**152**
New assay method of the atractyloside and carboxyatractyloside in the human blood	**170**
New extraction method of atractyloside and carboxyatractyloside	**189**
Conclusion et recommandation	**201**
Références	**204**

Liste des tableaux

Tableau 1 : Répartition des cas d'intoxications par les plantes en fonction de l'espèce incriminée, CAPM, 1980-2008	19
Tableau 2 : Présentation des espèces bactériennes étudiées	84
Tableau 3 : Concentration et volume des différents extraits d'*Atractylis gummifera* administrés	99
Tableau 4 : Dose et volume *d'Atractylis gummifera*	100
Tableau 5 : Répétition et lot de prélèvement en fonction des différentes durées de traitement	102
Tableau 6 : Antibiotiques utilisés en fonction des espèces bactériennes	113
Tableau 7 : Criblage phytochimique d'*Atractylis gummifera*	116
Tableau 8 : Teneur en phénol des différents types d'extrait d*'Atractylis gummifera*	118
Tableau 9 : teneur en atractyloside des racines d*'Atractylis gummifera* L en fonction de l'époque de récolte (Fassina et al, 1962)	122
Tableau 10 : Classe de toxicité selon Hodge and sterner (2005).	123
Tableau 11 : Poids corporel des rats traités par le décocté en deux doses d'*Atractylis gummifera* au cours de la phase subchronique.	124
Tableau 12 : Effet du décocté d'*Atractylis gummifera* sur les paramètres biochimiques chez les rats Wistar suite à une administration orale Réitérée de la dose de 0,1 g/kg/j pendant 40 jours.	131
Tableau 13 : Effet du décocté d'*Atractylis gummifera* sur les paramètres biochimiques chez les rats Wistar suite à une administration orale Réitérée des deux doses 0,2 g/kg/j pendant 40	132
Tableau 14 : Activités anti oxydantes (%) et concentration efficace (CI_{50}) des différents extraits de la racine d'*Atractylis gummifera*	136
Tableau 15 : Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des différents extraits de la racine d'*Atractylis gummifera*	141
Tableau 16 : Détermination des concentrations bacteriostatiques (CMB) des différents extraits de la racine d'*Atractylis gummifera*.	142
Tableau 17 : Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bacteriostatiques (CMB) des différents extraits de la racine d'*Atractylis gummifera*	144
Tableau 18 : Etude de l'activité antalgique des extraits d*'Atractylis gummifera* par la méthode de TAIL FLICK.	145
Tableau 19: Nombre de crampes en fonction des quatre différents extraits utilisés.	146
Tableau 20: Nombre de chutes par traitement	148
Tableau 21: : Le temps moyen mis par les souris pour remonter le tube en verre en fonction du traitement	149
Tableau 22 : Nombre de trous explorés en fonction du traitement	149
Tableau 23 : Activité anti inflammatoire des différents extraits testés d'*Atractylis gummifera*	150

Liste des figures

Figure 1 : Ancien texte arabe sur la phytothérapie	6
Figure 2 : Structure des phénols	12
Figure 3 : Structure des flavonoïdes	13
Figure 4 : Structure des tanins	14
Figure 5 : Structure coumarine	15
Figure 6 : Monoterpenes and diterpenes	16
Figure 7 : Structure des alcaloides	17
Figure 8 : Structure des saponosides	18
Figure 9 : Shémareprésentatif de la classification des plantes dangereuses par atteinte organique selon le principe actif ; avec quelques exemples de la base de données du CAMP	21
Figure 10 : Tige d'*Atractylis gummifera*	25
Figure 11 : Feuille d'*Atractylis gummifera*	25
Figure 12 : Fleur d'*Atractylis gummifer*	26
Figure 13 : Fruit d'*Atractylis gummifera*	27
Figure 14 : Racine d'*Atractylis gummifera*	27
Figure 15 : Structure de l'atractyloside **(ATR)**	29
Figure 16 : Structure du carboxyatractyloside **(CATR)**	30
Figure 17 : Structure du kaurène	30
Figure 18 : Les plantes les plus incriminées dans les cas d'intoxication déclarés au Centre Anti Poison du Maroc 1980-2011	31
Figure 19 : Progression des intoxications au chardon à glu enregistrées par le Centre Anti Poison du Maroc (CAPM, 2013)	32
Figure 20 : Le système des phosphorylations oxydatives	34
Figure 21 : Anatomie du rats 1	46
Figure 22 : Anatomie du rats 2	47
Figure 23 : Photo micrograph des sections de fois des rats traités par A. gummifera (Mokennon et al, 2017)	48
Figure 24 : Photomicrograph des sections de rien des rats ayant reçu des axtraits hydroethanolic d'*A. gummifera à* 125mg/kg /j (A), 250 mg/kg/j (B&C), et control (D)	49
Figure 25 : Les principales étapes de la réaction inflammatoire(http://www.biologymad.com/Immunology/inflammation.jpg)**.**	52
Figure 26 : Test d'inflammation chez le rat	54
Figure 27 : Inflammation de patte de rats par administration de carragenine	55
Figure 28 : Anatomie de la douleur	62
Figure 29 : Les différentes voies impliquées dans la transmission du message nociceptif (Meunier et al, 2004).	63
Figure 30 : la voie archispinothalamique, la voie paléospinothalamique et la voie néospinothalamique	66
Figure 31 : Les différents types de controles de la douleur	69
Figure 32 : Morphologie microscopique des bactéries	76
Figure 33 : localisation de la zone de prélévement des racines d'*Atractylis gummifera*	81
Figure 34 : Prélèvement des racines *d'Atractylis gummifera*	82
Figure 35 : Fragmentation, Séchage et broyage des racines *d'Atractylis gummifera*	83
Figure 36 : Rats wistar utilisés dans les différentes expérimentations	83
Figure 37 : Escherichia coli	85

Figure 38 : Klebsiella pneumoniae	86
Figure 39: Pseudomonas aeruginosa	86
Figure 40 : Acinetobacter	87
Figure 41 : Représentation schématique d'un extracteur Soxhlet	88
Figure 42 : Rotavapeur	89
Figure 43: Planche à trous	90
Figure 44 : **L'Automate de Coloration**	91
Figure 45 : Microtomes Accu-Cut® SRM™ 200	92
Figure 46 : Le spectrophotomètre UV	93
Figure 47 : Opération de gavage des rats avec les différents extraits d'Atractylis gummifera	99
Figure 48 : Dissection des rats	101
Figure 49 : Fixation des organes des rats dans du formol	102
Figure 50 : Préparation des lames histologique	104
Figure 51 : Prélèvement des échantillons de sang et d'urine pour les analyses biochimiques	105
Figure 52 : Injection intrapéritonéale	107
Figure 53 : Test de traction	108
Figure 54 : Test de planche à trous	109
Figure 55 : Injection intrapéritonéale de la carragenine dans la patte du rat	110
Figure 56 : Appareil de mesure de l'activité anti inflammatoire	110
Figure 57 : LD_{50} de la racine d'*Atractylis gummifera*	119
Figure 58 : Dégradation de la molécule d'ATR par acidification et température (Liang-Yu et al ; 2013)	121
Figure 59 : Comparaison des diamètres d'inhibition obtenu par le décocté, le macéré et les différents antibiotique testés sur huit souches bactériennes : A- Klesilla pneumoniae sensible (KS), **B**- Escrichia coli résistante (ECR), **C**- Klesilla pneumoniae sensible (KS), D- Pseudomonas aeruginosa résistante (PSR8e), E- Pseudomonas aeruginosa sensible (PSS), F- Klepsilla pneumoniae résistante (KR), G- Pseudomonas aeruginosa résistante (PSR21e), **H**- Acinetobacter (AC	140
Figure 60 : Evolution des diamètres d'inhibition obtenu par le macéré et le décocté en fonction des concentrations, sur huit souches microbienne : A- Klesilla pneumoniae sensible (KS), **B**- Escrichia coli résistante (ECR), **C**- Klesilla pneumoniae sensible (KS), D- Pseudomonas aeruginosa résistante (PSR8e), E- Pseudomonas aeruginosa sensible (PSS), F- Klepsilla pneumoniae résistante (KR), G- Pseudomonas aeruginosa résistante (PSR21e), **H**- Acinetobacter (AC	143

Liste des abréviations

ALAT : Alanine amino transférase

ASAT : Aspartate amino transférase

ALP : Phosphatase alcaline

GGT : La gamma-glutamyl transférase

CREA : Créatinine

BILI : Bilirubine

ALB : Albumine

DPPH : 2, 2-diphénylpicrylhydrasyl

GSH : Glutathion

ECS : Escherichia coli sensible

ECR : Escherichia coli résistante

PSS : Pseudomonas aeruginosa sensible

PSR : Pseudomonas aeruginosa résistante

KS : Klebsiella pneumonia sensible

KR : Klebsiella pneumonia résistante

AC : Acinetobacter

ATR : Atractyloside

CATR : Carboxyatractyloside

ANT : Téléporteur adénine nucléotide

ATP : Adénosine triphosphate

ADP : Adénosine diphosphate

PROT PLUS : Protéines plus

INTRODUCTION

L'utilisation des plantes à des fins thérapeutiques est une pratique courante depuis des millénaires. Ce phénomène a eu un regain d'intérêt avec les premières recherches sur les propriétés biologique et pharmacologique des plantes en vue de donner une base scientifique à ces pratiques empiriques (atinkson, 1946 ; mela, 1950 ; osborn, 1943). Actuellement, l'intérêt pour la phytochimiothérapie se retrouve partout dans le monde (de souza et al, 1993 ; do, 1984 ; Emlirawa, 1982 ; Nacoulma, 1996).

Au Maroc, la phytothérapie est considérée comme particulièrement attractive, surtout que notre pays possèdent une grande richesse en plantes (près de 42000 espèces dont près de 600 utilisées en médecine traditionnelle). Riches en molécules et composés organiques d'une diversité structurale qui, autrement, ne pourrait pas être disponibles dans un laboratoire de synthèse chimique (Hamouda et al, 2000).

Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), près de 80% des populations dépendent de la médecine traditionnelle pour des soins de santé primaires, non seulement par manque d'accès aux médicaments et traitements prescrits par la médecine moderne, mais aussi parce que ces plantes ont une réelle efficacité.

Cependant, plusieurs plantes utilisées en médecine traditionnelle contre les maladies ont fait l'objet de nombreuses publications (Babamoussaet al, 1997 ; Kaboré et al, 1995 ; Kaboré et al, 1997 ; Kumulungui, 1997 ….Publications récentes). Mais à notre connaissance, aucun de ces travaux n'a concerné le coté pharmacologique de l'*Atractylis gummifera* et ses activités biologiques.

Il s'agit d'une plante médicinale abondante dans le paysage marocain et largement utilisée par les populations locales et les herboristes qui lui reconnaissent en pharmacopée traditionnelle un grand nombre de vertus. En médecine traditionnelle, *Atractylis gummifera* a été utilisée pour traiter plusieurs maladies, y compris les parasites intestinaux, les ulcères,

l'empoisonnement par morsure de serpent, l'hydropsie et la somnolence. Dans la médecine traditionnelle arabe, elle était utilisée pour cautériser les abcès. La plante était également connue pour ses propriétés antipyrétiques, diurétiques, purgatives et émétiques (Larrey et Pageaux, 1995). Dans la médecine populaire d'Afrique du Nord, elle est encore utilisée pour traiter les ulcères syphilitiques, induire l'avortement et blanchir les dents (Capdevielle et Darraq, 1980, Georgiou et al, 1988). Elle est également utilisée contre les parasites dans la médecine vétérinaire populaire (Viegi et al, 2003).

En usage interne, la racine desséchée est utilisée pour arrêter les hémorragies et pour provoquer les vomissements. Les femmes enceintes qui respirent de la fumée du chardon à glu brûlé trouvent leur accouchement facilité. La plante, particulièrement sa racine, est utilisée comme narcotique. Elle guérit les œdèmes et est utile contre l'épilepsie et la manie (Hamouda et al 2000). En fumigations, on l'emploie dans le traitement des rhumes, des vertiges, des céphalées et des paralysies. En usage externe, la plante semble intervenir, en frictions ou en cataplasmes, dans le traitement des chancres syphilitiques, de la gale, des boutons d'acné, des taches de rousseur sur le visage, des abcès et des furoncles (Hamouda et al, 2000).

L'idée que les plantes sont un moyen naturel de traitement dénué de tout risque, laisse croire le consommateur que naturel est le synonyme d'inoffensif. Or, une plante peut à la fois être utile et toxique. C'est une question de dose : "Potion et poison ont la même racine latine". Les 15 dernières années ont montré que la phytothérapie n'est pas sans risque (Viegi et al, 2003).
Par mégarde, il arrive qu'*Atractylis gummifera* soit souvent confondue à l'artichaut par les populations qui, en la consommant s'exposent très souvent à des intoxications. Dans ces cas, les victimes, très souvent des enfants, entrent en convulsion, subissent de violentes coliques abdominales, des vomissements abondants et entrent parfois dans le coma. La mort de l'enfant peut même survenir rapidement (après quelques heures) (Hamouda et al, 2000). D'où le grand intérêt de travailler sur cette plante à double tranches, une tranche très prometteuse en terme de pharmacologie et activité biologique, et l'autre qui parait aussi très inquiétante et fatale lorsqu'il s'agit de dépassement de dose ou mal administration dont les résultats peut aller jusqu'à la mort.
L'objectif de notre travail est de tracer une limite assez claire entre la confiance et la méfiance en cette plante médicinale toxique tout en combinant les informations et la sagesse traditionnelle à la norme de recherche scientifique, biologique, pharmacologique, toxicologique et chimique. Pour se faire, il revient à envisager le maximum d'activité

pharmacologique en tenant compte des doses létales des diffèrents extraits d'*Atractylis gummifera* utilisés par la population à fin d'éviter toute sorte d'intoxication. De même, la grande problématique d'identification d'*Atractylis gummifera* comme source d'intoxication de passions intoxiquées au sein des services d'urgence, nous a amené à essayer à travers ce travail de proposer une nouvelle méthode de dosage plasmatique très simple et pas couteuse avec des moyens simples et disponibles dans tout les laboratoires. En fin, l'atténuation de la toxicité de cette plante a été envisagée afin de pouvoir bénéficier de ses bonnes vertus sans danger.

Pour répondre à ces objectifs, les tests suivants ont été réalisés :

> **Criblage phytochimique**

> **Etude toxicologique :**

- Toxicité aigue
- Toxicité chronique

℘ Bilan biochimique

℘ Examen histologique

> **Etude pharmacologique** :

℘ Activité Anti-inflammatoire

℘ Activité Anti oxydante

℘ Activité sur le système nerveux central

℘ Activité Anti bactérienne

> **Dosage plasmatique d'*Atractylis gummifera***

> **Atténuation du pouvoir toxique d'*Atractylis gummifera***



1ere partie : Etude bibliographique

Généralités sur la phytothérapie et les plantes Médicinales

I. Histoire de la phytothérapie et des plantes médicinales

I.1. Phytothérapie

Le mot phytothérapie provient de l'expression grec qui signifie essentiellement « soigner avec les plantes ». Il s'agit d'une pratique millénaire basée sur un savoir empirique qui s'est transmis et enrichi au fil d'innombrables générations. La phytothérapie, étymologiquement le traitement par les plantes, est une méthode thérapeutique qui s'appuie sur l'action des plantes médicinales (Valnet et al, 1978).

L'histoire de la phytothérapie est liée à celle de l'humanité, car dans toutes les cultures on a toujours compté sur les valeurs curatives des plantes pour soigner et guérir les hommes (Valnet et al, 1978). Le premier texte sur la médecine par les plantes a été gravé sur des plaques d'argile par les Sumériens, environ 3 000 ans avant Jésus Christ. Ils utilisaient des plantes telles le myrte, le chanvre et le thym. (Schauenberg et Paris, 1977). Au seizième siècle, les ouvrages d'herboristerie furent essentiellement publiés en langues nationales, et non plus en latin. Au 18e siècle, c'est le botaniste suédois Linné qui recensent les classifications des végétaux et les premières descriptions. Cependant, vers la fin du XIXe siècle, elle a connu un rapide déclin en Occident avec l'avènement de la médecine scientifique et l'apparition des médicaments modernes. Mais cette mise à l'écart n'a duré longtemps : les effets secondaires néfastes de la plupart des médicaments de synthèse se sont vite révélés et on a recommencé à s'intéresser aux plantes. C'est en 1986 que la phytothérapie a été officiellement reconnue en France par le ministère de la santé comme une médecine à part entière. Preuve incontestable de leur efficacité, les médicaments recommandés en phytothérapie sont tous titrés en principes actifs, ce qui signifie qu'ils contiennent en concentration plus ou moins forte, mais toujours connue, des substances actives.

Cette décision a été prise non seulement sur la base de leur réputation traditionnelle mais aussi suite aux nombreuses études cliniques qui ont fourni la preuve incontestable de leur efficacité. Les progrès scientifiques et techniques réalisés ces dernières années dans les

domaines de l'agronomie, la chimie végétale et la pharmacologie ont permis de mettre au point des formes thérapeutiques et galéniques encore plus sûres, plus adaptées et toujours plus efficaces. Notre époque est profondément marquée par la recherche d'une vie plus saine, d'un retour à la nature et aux valeurs essentielles, surtout à un moment où le publique est désillusionné devant la médecine moderne. Laquelle en effet, n'a trouvé de remède à tous les maux, en plus de se buter à une résistance accrue des agents pathogènes et à une panoplie d'effets secondaires liés à l'usage des médicaments traditionnels. La phytothérapie, proposent des traitements de fond dont l'action douce aide à prévenir les maladies et à traiter des problèmes chroniques tels que l'arthrose ou l'insomnie, par exemple. Pour cela, la phytothérapie agit en profondeur, sans agresser l'organisme et en stimulant ses bonnes réactions. Résultat : une action plus efficace, durable et surtout dépourvue d'effets secondaires. Le succès de la phytothérapie s'explique également par le niveau de maîtrise technique et scientifique que l'on atteint désormais dans ce domaine. L'agronomie, la chimie et la pharmacologie ont permis, en progressant, de mettre au point des formes thérapeutiques et galéniques plus sûres, plus adaptées, et plus efficaces.



Figure 1 : Ancien texte arabe sur la phytothérapie

Aujourd'hui, la phytothérapie s'appuie à la fois sur la sagesse traditionnelle et sur les découvertes de la médecine moderne. La rencontre relativement récente de ces 2 mondes et le peu de normes qui régissent le domaine font en sorte que la pratique et la formation sont encore très disparates. L'idée que les plantes sont un moyen naturel de traitement dénué de

tout risque. Les consommateurs croient souvent que naturel est le synonyme d'inoffensif. Or une plante peut à la fois être utile et toxique. C'est une question de dose : "Potion et poison ont la même racine latine". L'analphabétisme, les revenus limités de la population marocaine, les effets indésirables liés aux médicaments et en général les facteurs socioculturels, ont augmenté la demande en matière de traitement par les plantes, dans le même temps de nombreuses personnes sans qualification ont investi ce domaine très rentable en prescrivant des recettes à base de plantes sans aucun savoir. Au Maroc, la phytothérapie avec d'autres médecines alternatives est considérée comme particulièrement attractive, notre pays possédant une grande richesse en plantes (près de 42000 espèces dont près de 600 utilisées en médecine traditionnelle). (Quezel and Medail, 1994) Dans le cadre d'une enquête socio-économique et ethnobotanique réalisée sur la médecine traditionnelle au Maroc. Les résultats montrent la place importante qu'occupe les plantes aromatiques et medicinales. Cela implique une incidence non négligeable sur les intoxications liées à l'utilisation de ces plantes pour des buts thérapeutiques. En dehors de l'usage thérapeutique, d'autres étiologies peuvent entraîner des intoxications par des plantes médicinales, telles que la manipulation de ces dernières par l'enfant ou leur usage à des fins criminelles et en sorcellerie. (Quezel and Medail, 1994). Nous disposons de peu de donnés montrant que les risques de la phytothérapie sont cliniquement significatifs. Ceci est expliqué par l'absence de recherche dans ce domaine. On a rapporté récemment que seulement 15% des études cliniques randomisées portant sur l'évaluation des plantes médicinales ont pris en compte les effets secondaires et toxiques de ces plantes. (Valnet et al, 1978)

I.2. Plante médicinale

Selon Schauenberg, On considère comme plante médicinale, toute plante renfermant un ou plusieurs principes actifs capables de prévenir, soulager ou guérir une maladie (Schauenberg et Paris ,1977). L'histoire des plantes médicinales a toujours été associée à l'évolution des civilisations. Dans le monde entier, l'histoire des peuples montre qu'elles ont occupées une place très importante en médecine.

Les égyptiens ont constitué la première législation des plantes médicinales en 'Pharmacopée' dont le nom dérive du mot égyptien ' Farmake' (qui guérit). La recette de l'extrait sur fin du burjoin (*Styrax tonkinensis Caraib*) gravée sur les parois du temple d'Edfou témoigne l'utilisation des plantes aromatiques (Valnet et al, 1978).

En inde, les drogues d'origine végétales entraient dans la composition de formules magiques, moins destinées directement à soigner qu'à soumettre les forces occultes de la nature. Alors qu'à l'époque Romaine, du moins dans les premiers siècles, les experts en matière de botanique étaient toujours des Grecs, et ce n'est que plus tard que les Romains s'attachèrent à l'étude de la flore et à l'élaboration des médicaments qu'ils en pouvaient obtenir.

En chine, l'empereur ≪ Chen-Nong', fut le premier à étudier la phytothérapie et à dégager de l'expérimentation certains effets thérapeutiques ou, au contraire nocifs des plantes. Les plantes aromatiques comme la cannelle (*cinnamomun* zeylanicum *nees*), le poivre noir (*piper nigrum*) et le gingembre (*zingiber officinale rose avaient* leur place dans la médecine chinoise vieille de 3000 ans (Valnet et al, 1978).

Compte au monde arabe, les grands connaisseurs de plantes avaient hérité, de la grande culture des perses, de solides préceptes médicaux. Les auteurs arabo persans comme Ibn al Baytâr (1877-1883) ont ajouté de nombreuses espèces nouvelles à cet arsenal thérapeutique. Depuis cette époque jusqu'à nos jours, les herbes, les bais, les racines n'ont pas cessé d'être l'objet d'étude approfondie, si bien que chaque jour leurs vertus soient mieux reconnues et plus utilement appliqués. Aujourd'hui, malgré la profusion des médicaments purement chimique, les plantes remportent toujours de nouvelles victoires (Encyclopedie, 1970).

II. Plantes médicinales du Maroc

Le Maroc est parmi les cinq premiers pays les plus riches à l'échelle du bassin méditerranéen (Quezel and Medail, 1994) en termes de ressources florestiques. Le climat varié et les conditions écologiques hétérogènes ont favorisé la prolifération de plus de 4200 espèces et sous espèces (Ibn Tattou, 1989).

Au Maroc, les plantes utilisées en médecine traditionnelle sont estimées aux près de 800 espèces spontanées, cultivées ou importées, réparties dans 107 familles et 352 genres (Hmamouchi, 2001). Ces espèces sont impliquées dans plusieurs recettes (plus de 600) et utilisées pour traiter diffentes maladies dont les plus importantes sont les affections concernant le système digestif, le système respiratoire, le système cardiovasculaire et les affections dermatologiques (Hamamouchi, 1999).

D'après les résultats d'une enquête socio-économique réalisée par Hamamouchi en 1999 sur la médecine traditionnelle au Maroc, 71 % des personnes interrogées utilisent les plantes

médicinales pour se soigner (Hamamouchi, 1999). Cependant, plusieurs problèmes de santé et accidents graves peuvent survenir suite à l'utilisation traditionnelle et irrationnelle de ces plantes médicinales. Parmi ces problèmes, la diversité et la complexité des noms vernaculaires qui rend difficile l'identification des plantes à utiliser, l'utilisation de la même plante pour plusieurs affections considérées comme une seule maladie, les produits utilisés sont généralement mal conservés et de mauvaise qualité ce qui risque de les rendre toxiques, les posologies et la durée d'utilisation ne sont pas précises et varient d'un herboriste à l'autre. (Hamamouchi, 1999).

III. Composition chimique des plantes

La composition chimique des plantes aromatiques est complexe, la plupart des scientifiques définissent les substances naturelles comme des composés chimiques qui se trouvent dans des familles et espèces d'origine végétale (Firn, 2004).

Le développement des diverses techniques d'extractions, d'isolement et d'indentification a permis l'utilisation de ces composés dans diverses industries (pharmaceutiques, agroalimentaires, cosmétiques et parfumeries). La liste des plantes entrant précisément dans ce cadre est exhaustive et comme elles sont utilisées sous formes de tisanes, extraits ou préparations complexes, il reste difficile de définir les molécules responsables de l'action bien que certains effets pharmacologiques prouvés sur l'animal aient été attribuées à des composés tels que les alcaloïdes et ces dérivés, les terpènes et les composés polyphénoliques (Kubeczka et al, 1982).

Aujourd'hui, il a été estimé que les principes actifs provenant des végétaux représentent 25% des médicaments prescrits soit un total de 120 composés d'origine naturelle provenant de 90 plantes différentes (Potterat et Hostettmann, 1995). Il est indispensable de connaître la composition des plantes pour comprendre comment elles agissent sur l'organisme (Iserin et al, 2007). Cette composition est constituée de deux fractions. La première fraction dite volatil (COV) est présente dans différents organes de la plante selon la famille ; cette fraction est composée de métabolites secondaires qui constituent l'huile essentielle (Iserin et al, 2007).

La deuxième fraction dite non volatile de la plante, composés organiques non volatils (CONV), est composée essentiellement de coumarines, flavonoïdes (Cisowski, 1985), ainsi de

phénols ou polyphénols jouant un rôle fondamental dans l'activité biologique de la plante (Kubeczka et al, 1982).

III.1. Huiles essentielles

Les huiles essentielles (HE) appelées aussi ' essences ' sont des substances huileuses, volatiles et odorantes qui sont sécrétées par les plantes aromatiques que l'on extrait par divers procédés dont l'entraînement à la vapeur d'eau et l'hydrodistillation (Iserin et al, 2007). La norme AFNOR NF T 75-006 définit l'huile essentielle comme : un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par hydrodistillation. L'huile essentielle est séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques. Les HE se forment dans un grand nombre de plantes comme sous-produits du métabolisme secondaire (Guy, 1997). Elles sont très utilisées dans l'industrie des produits cosmétiques, pharmaceutiques et agro-alimentaire (Kaloustian et al, 2008).

Les huiles essentielles se retrouvent dans des glandes minuscules situées dans une région particulière de la plante telle que les feuilles, écorces ou fruits, et généralement quand elles se produisent dans divers organes de la même plante, elles présentent des compositions chimiques différentes (Conner D.E, 1993).

Les huiles essentielles sont des métabolites secondaires des plantes (Cowan MM, 1999). Ce sont des mélanges complexes et éminemment variables de constituants qui appartiennent principalement à deux grandes familles de composés chimiques : le groupe des composés terpéniques sont représentés principalement par des monoterpènes : (C 10) cinéol, menthol… qui constituent parfois plus de 90 % de l'huile essentielle (Lamarti et al, 1994), et quelques sesquiterpènes : (C15) caryophyllène, humulène… (Loza-Tavera, 1999) bien que des diterpènes (C20) peuvent aussi être présents (Dorman and Deans, 2000). Le groupe des composés aromatiques : des dérivés du phénylpropane, beaucoup moins fréquent, comme le safrol, l'apiol, l'anisaldéhyde, l'eugénol, la vanilline et le cinnamaldéhyde. Elles peuvent également renfermer divers produits issus de processus dégradatifs mettant en jeu des constituants non volatils (qui contribuent souvent aux arômes des fruits) (Bruneton, 1999).

Les monoterpènes et leurs dérivés (alcools, esters, acétates, …) sont les composés les plus abondants dans les huiles essentielles, Ils sont volatils, entraînables à la vapeur d'eau, et sont responsables des saveurs caractéristiques et de l'arôme que possède la plante (Loza-Tavera,

1999 ; Robinson, 1991) ou (Lamarti, 1994). Leur étude chimique est compliquée, par la difficulté d'obtenir ces produits purs du mélange complexe dans lequel ils sont présents et les réarrangements qu'ils peuvent subir (Robinson, 1991). Exemple de quelques monoterpènes : menthol, alpha terpinéol, linalol, lavandulol, géraniol…

Plusieurs facteurs peuvent être responsables du polymorphisme chimique des huiles essentielles. Les plus importants sont le climat, le sol, la période de récolte et la méthode de conservation et d'extraction. Les facteurs génétiques et le cycle végétatif peuvent également influencer sur cette variabilité (Echeverrigaray et al, 2001 ; Hudaib, 2002).

Leur utilisation est liée à leurs larges spectres d'activités biologiques reconnues (Amarti, 2009). L'activité antimicrobienne des huiles essentielles extraites des plantes aromatiques a été largement décrite in vitro ainsi que les activités antispasmodique, diurétique ou expectorante, antioxydante, anti-inflammatoire et elles présentent également un fort pouvoir antifongique (Chami et al, 2005 ; Giordani et Kaloustian, 2006 ; Juhas et al, 2009). L'action antifongique des huiles essentielles est dûe à une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique suivie d'une rupture de celle-ci entrainant une fuite du contenu cytoplasmique et la mort de la levure (Mann et al, 2000).

En effet, les composés terpéniques des huiles essentielles et plus précisément leurs groupements fonctionnels tels que les phénols et les aldéhydes réagissent avec les enzymes membranaires et dégradent la membrane plasmique des levures (Giordani et Kaloustian, 2006).

Par ailleurs, l'application de ses huiles essentielles présente un grand intérêt dans plusieurs domaines. Ainsi, parmi les essences les plus étudiées pour leurs propriétés antibactériennes et antifongiques appartiennent aux Asteracé.

Les variations de la composition des huiles essentielles provenant d'un même phénotype se développant dans le même environnement sont l'expression de différences génotypiques. Elles peuvent être attribuées à des hybridations, à un polymorphisme génétique ou à des mutations.

III.2. Composés organiques non volatils

Les composés organiques non volatils peuvent etre defini comme étant des molécules organiques complexes synthétisées et accumulées en petites quantités par les plantes autotrophes, ils sont divisés principalement en trois grandes familles : Les polyphénols, les terpènes et les alcaloïdes (Lutge et al, 2002 ; Abderrazak et Joël, 2007).

a. Les composés phénoliques

Les polyphénols sont des molécules synthétisées par les végétaux et appartenant à leur métabolisme secondaire, caractérisés par la présence d'au moins d'un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle libre, ou engagé dans une autre fonction tels que : éther, ester, hétéroside…etc. (Bruneton, 1999 ; Lugasi et al, 2003). Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs avec différents pourcentage et sont impliqués dans de plusieurd processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la germination des graines, la maturation des fruits et la rhizogenèse (Crozier et al, 2006).

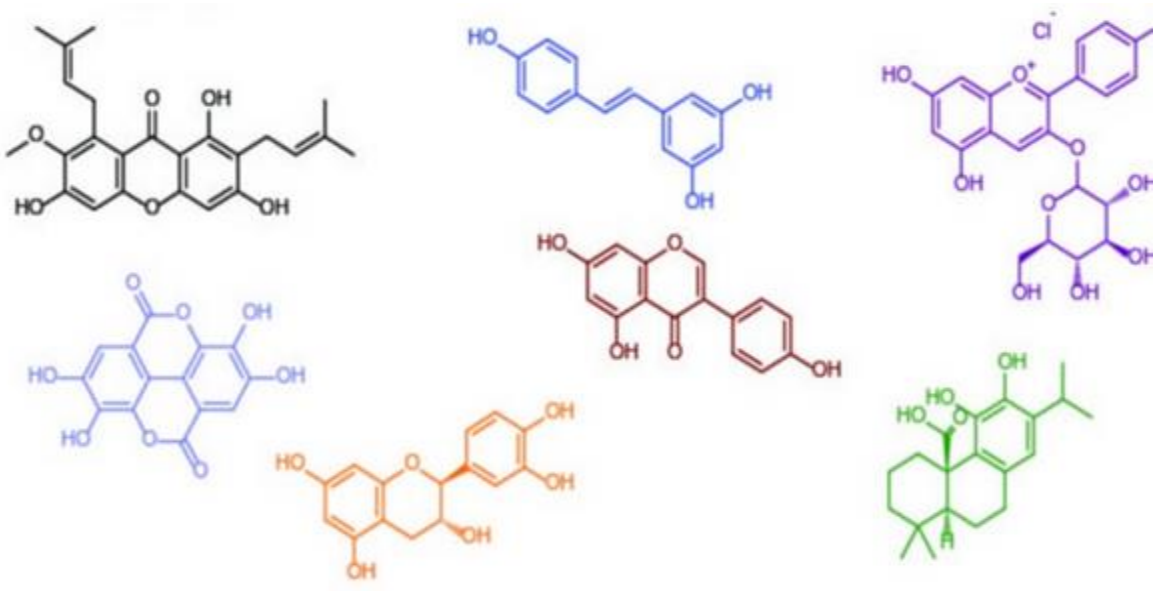


Figure 2 : Structure des phénols

Ces phénols sont solubles dans les solvants polaires. Ce sont surtout des antiseptiques (arbutoside de la busserole), des antalgiques et des anti-inflammatoires. Ils participent à la défense des plantes contre les agressions environnementales. Nommés phytomicronutriments, ils sont regroupés en une classe constituée d'environ 8000 composés. Ces composés sont

divisés en plusieurs catégories dont celle des flavonoïdes, qui représentent plus de la moitié des polyphénols, les tanins, et les coumarines (King et Young, 1999 ; Tapiero et al, 2002).

❖ Les flavonoïdes

Le terme flavonoïde désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols (Seyoum et al, 2006). Les flavonoïdes constituent un groupe de plus de 6 000 composés naturels qui sont quasiment universels chez les plantes vasculaires. Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux. Les flavonoïdes sont rencontrés dans les fruits (notamment du genre Citrus où ils représentent jusqu'à 1 % des fruits frais) et les légumes. Les flavonoïdes sont retrouvés également dans plusieurs plantes médicinales (Bruneton, 1999).

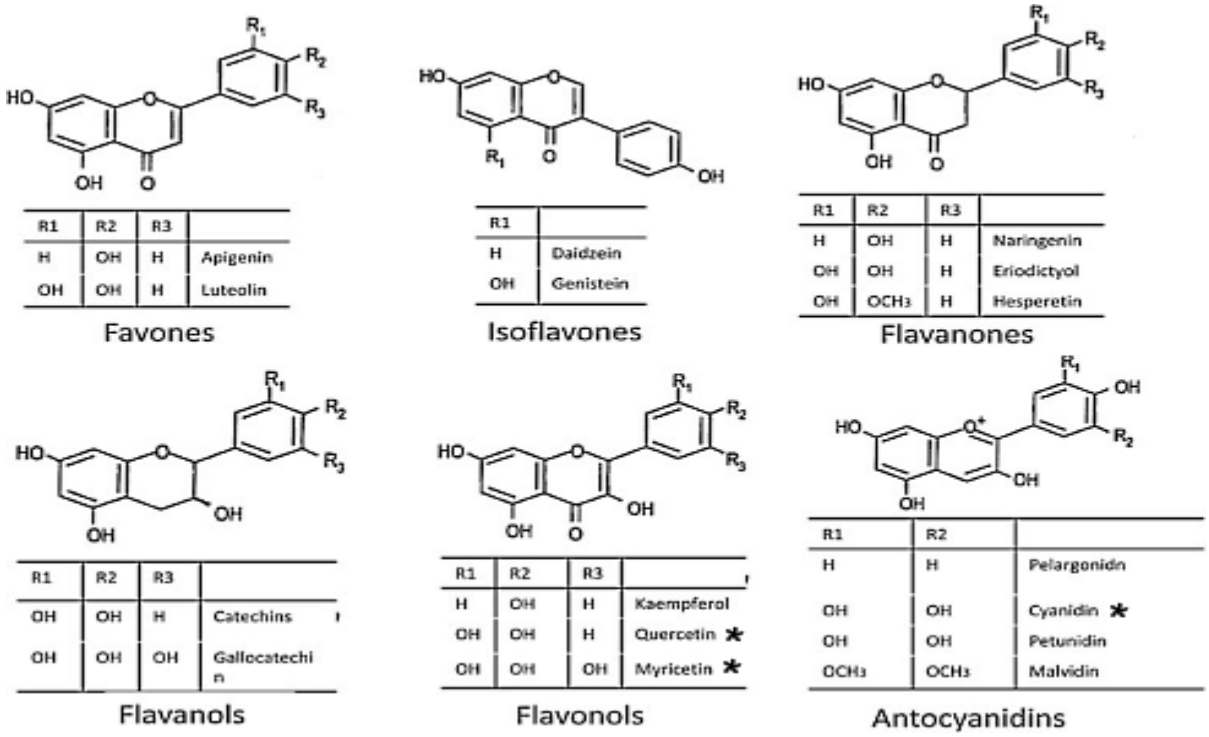


Figure 3 : Structure des flavonoïdes

Tous les flavonoïdes dérivent de l'enchaînement benzo-γpyrone et peuvent être classés selon la nature des différents substituants présents sur les cycles de la molécule et du degré de saturation du squelette benzo-γ-pyrone, dont les classes les plus importantes sont : flavones, isoflavandiols, flavanols, flavondiols, aurones, chalcones, anthocyanins (Effendi et al, 2008). Ils interviennent probablement pour protéger les plantes des herbivores et contrôler le transport des auxines (Judd et al, 2002). Les flavonoïdes hétérosidiques sont hydrosolubles et

solubles dans les alcools. Les flavonoïdes lipophiliques des tissus superficiels des feuilles sont solubles dans les solvants polaires et dans les solvants moyennement polaires (comme par exemple le dichlorométhane) (Bruneton, 1999). Des remèdes à base de plantes renfermant des flavonoïdes ont été (et sont) utilisés en médecine traditionnelle de par le monde. Ils sont particulièrement actifs dans le maintien d'une bonne circulation. Certains ont aussi des propriétés anti-inflammatoire, antioxydante, anti-enzymatique et hépatoprotectrice ; ils jouent un rôle important dans le système de défense et antivirales (Iserin, 2001).

❖ Les tanins

Les tanins sont des substances naturelles polyphénoliques, hydrosolubles, de masse moléculaire comprise entre 500 et 3000, à saveur astringente, ayant en commun la propriété de tanner la peau, cette propriété de tannage provient de la création de liaisons entre les molécules de tannins et les fibres de collagène (Schauenberg et Paris, 2006).

Les tanins représentent généralement la principale partie de l'extrait polyphénolique et sont très répondus dans le règne végétal, particulièrement dans certaines familles : Fagaceae, Polygonaceae, Rosaceae, Myrtaceae, Rubiaceae, Hamamilidaceae… (Khanbabae et Ree, 2001). Ils se localisent dans divers organes : racine ou rhizome (ratanhia, rhubarbe), écorce (chêne, quinquina), feuilles (hamamélis), fleurs (rose rouge), fruit (péricarpe du noyer), graines (kola). On observe surtout une accumulation dans les écorces âgées et les tissus d'origine pathologiques (galles) (Bruneton, 1999).

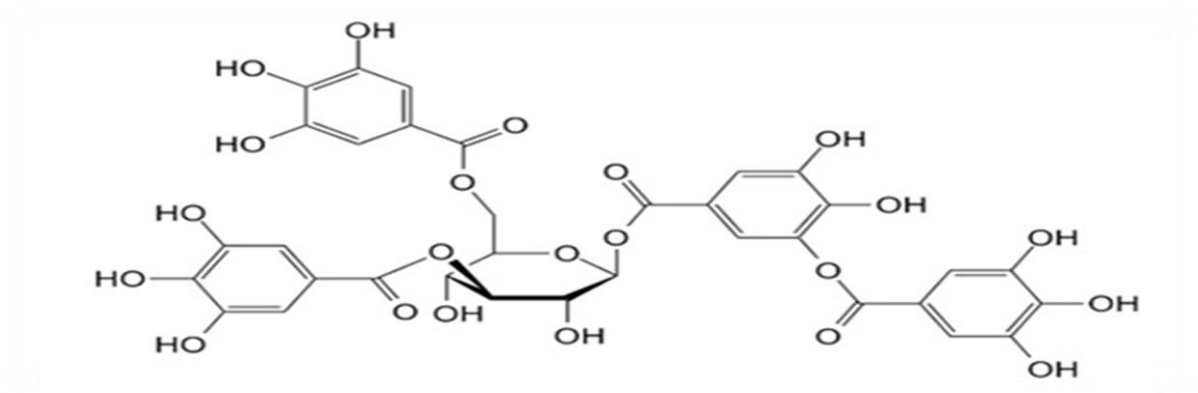


Figure 4 : Structure des tanins

On distingue 2 groupes de tanins différents par leurs structures et également par leurs origines biogénétiques : Tanins hydrolysables, Tanins condensés (Khanbabae et Ree, 2001). Peu de

choses sont connues concernant leur rôle biologique sur la plante mais leur présence confère à cette dernière des propriétés astringente, antiseptique, antioxydante et antidiarrhéique.

❖ **Les coumarines**

Les coumarines sont classées dans la famille des benzopyrones, issues du métabolisme de la phénylalanine via un acide cinnamique, l'acide P-coumarique. Les coumarines, de différents types, se trouvent dans de nombreuses espèces végétales et présentent un grand intérêt en raison de leurs propriétés pharmacologiques, en particulier, leur activité physiologique, bactériostatique et antitumorale ce qui rend ces composés attractifs en tant que nouveaux agents thérapeutiques. Elles sont aussi capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxyles (Igor, 2002).

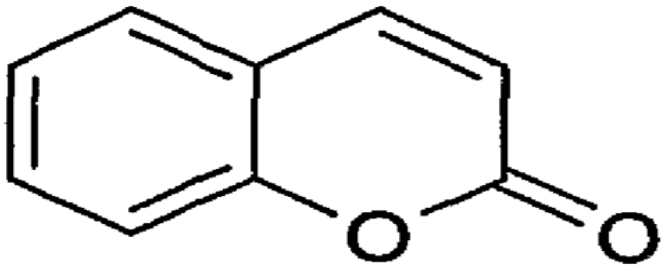


Figure 5 : Structure coumarine

Les coumarines sont cytotoxiques, antivirales, immunostimulantes, tranquillisantes, vasodilatatrices, anticoagulantes (au niveau du cœur), hypotensives ; elles sont également bénéfiques en cas d'affections cutanées (Igor, 2002).

Les coumarines libres sont solubles dans les alcools et les solvants organiques tels que l'éther ou les solvants chlorés dans lesquels ils sont extractibles. Les formes hétérosidiques sont plus ou moins solubles dans l'eau. L'odeur de foin fraîchement coupé de la coumarine est très utilisée en parfumerie et dans les produits cosmétiques (Kansole, 2009).

b. Les terpènes

Les terpènes sont une classe d'hydrocarbures, produits par de nombreuses plantes, surtout les conifères, comme on peut les rencontrer chez les animaux. Tous les terpènes et les stéroïdes

peuvent être considérés comme formés par l'assemblage d'un nombre entier d'unités pentacarbonées ramifiées dérivées de l'isopenténylpyrophosphate (IPP) (Bruneton, 1999).

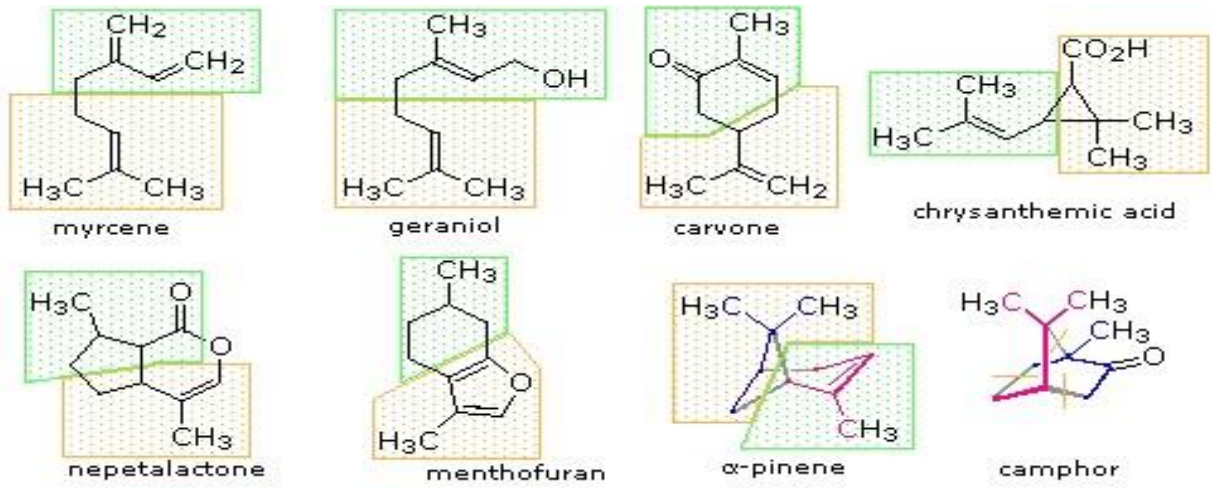


Figure 6 : Monoterpenes and diterpenes

Selon le nombre d'entités isoprène qui sont incorporées dans leurs structures, les trepènes sont subdivisés en : monoterpènes, sesquiterpènes, diterpènes, triterpènes, tetraterpènes et polyterpènes.

c. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes figurent parmi les principes actifs les plus importants en pharmacologie et en médecine (Guignard, 2000). Ce sont des substances organiques azotées, à propriétés basiques ou amers et ayant des propriétés thérapeutiques ou toxiques. Ils ont des structures très diverses et dérivent de différents acides aminés ou de l'acide mévalonique en passant par différentes voies biosynthétiques (Judd et al, 2002).

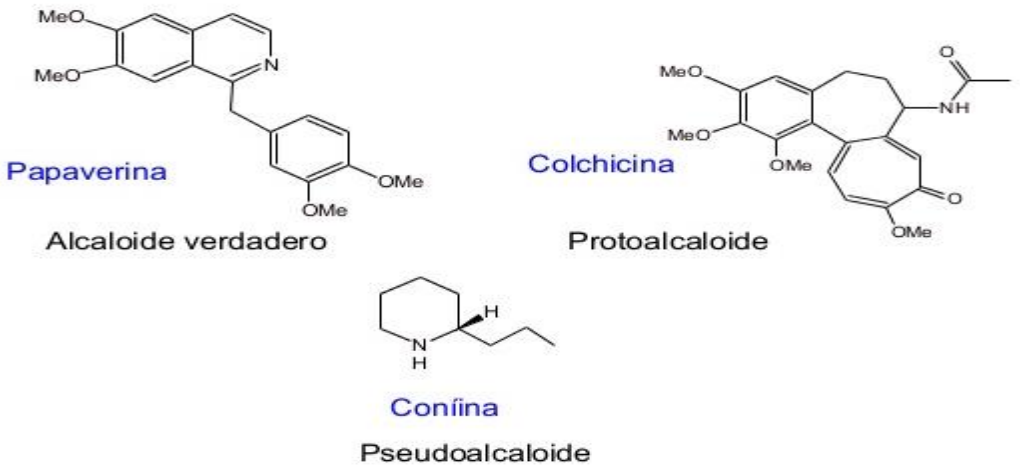


Figure 7 : Structure des alcaloides

De nombreux poisons dangereux comme l'atropine par exemple, sont extraite de la belladone mortellement toxique (Atropa *belladona)* et qui peut cependant être utilisée à faible dose dans une optique thérapeutique**.** Les alcaloïdes sont utilisées comme anticancéreux, sédatifs et pour leur effet sur les troubles nerveux (maladie de Parkinson) (Iserin et al, 2007).

d. Les saponines

Les saponines sont des glycosides très fréquent chez les végétaux et doivent leur nom au fait qu'elles moussent lorsqu'on les mélange avec l'eau**.** Elles sont des constituants de nombreuses plantes médicinales ; elles existent sous deux formes Eberhard et al, 2005) :

- Les saponosides stéroidique : retrouvés exclusivement chez les Angiospermes Monocotylédones : Liliaceae, Agavaceae, Dioscoreaceae … ;
    - Les saponosides triterpénique : principalement chez Angiospermes Dicotylédones : Araliaceae, Caryophyllaceae, Curcubitaceae, Renunculaceae… Ils sont présents dans tous les organes mais surtout les racines, bulbes et les graines.

La structure chimique des stéroïdes est similaire à celle de nombreuses hormones humaines (oestrogène, cortisone). Elles sont souvent expectorantes et facilitent l'absorption des aliments (Eberhard et al, 2005).

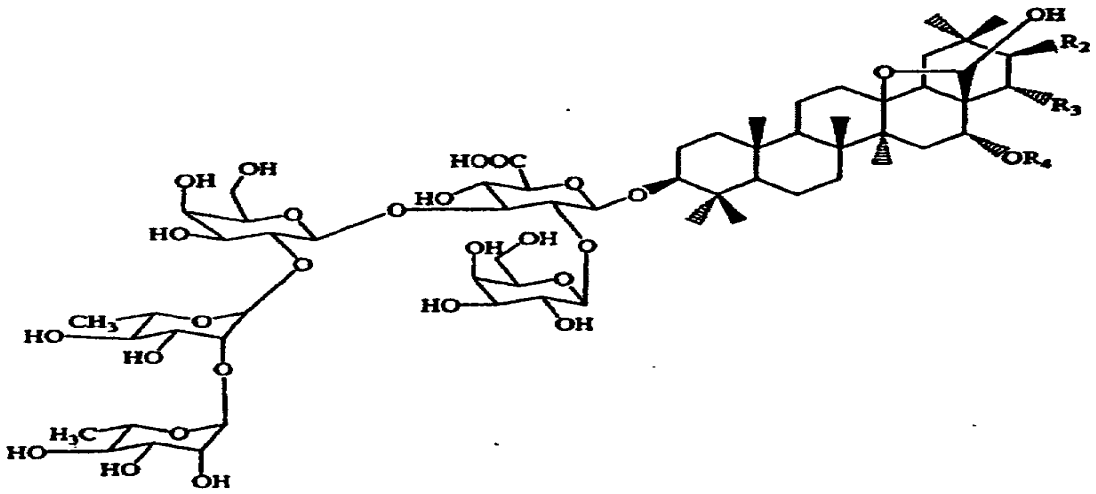


Figure 8 : Structure des saponosides

Les saponines possèdent une grande variété d'activité biologiques telles que : antipyrétique, antalgique, immunomodulatrice, anti-inflammatoire et anticoagulante. Ils ont des propriétés tensioactives et biologiques importantes et sont utilisés dans des domaines variés tels que l'industrie, la pharmacie et la cosmétologie (Lautrette, 2004).

IV. Toxicité des plantes médicinales :

Une plante est considérée toxique lorsqu'elle contient une ou plusieurs substances nuisibles pour l'homme ou pour les animaux et dont l'utilisation provoque des troubles variés plus ou moins graves voire mortels.

Cette définition doit tenir compte des remarques suivantes :

- Le lieu de culture de la plante et le moment de sa cueillette

- La répartition du principe actif entre les diffèrent organes de la plante (racine, feuille, fruit...)

- La notion de dose : certaines plantes utilisées à visée thérapeutique peuvent, à fortes doses, présenter une menace pour la santé de l'homme. C'est le cas par exemple de l'*Atractylis gummifera* ''addad'', la sauge ''salmya'' (Salvia officinalis), l'armoise blanche ''Chih'' (Artemisia herba alba) et l'Absinthe ''Chiba'' (Artemisia arborescens L.), toutes les quatre, sont des plantes médicinales à faible doses mais très toxiques à forte doses.

Cependant, la toxicité de la phytothérapie n'est pas un fait totalement nouveau, puisque les premiers cas bien documentés ont été rapportés dans la littérature il y a maintenant plus de vingt ans, avec parfois une issue fatale. L'incidence des cas d'hépatotoxicité en rapport avec la consommation d'herbes chinoises a par exemple été estimée entre 0,2 % et 1 % (Hamouda et al, 2000).

Différents types d'atteinte hépatique et rénales, allant de simples perturbations modérées du bilan restées asymptomatiques à des hépatites aiguës cytolytiques, cholestatiques ou mixtes, des cas de maladie veino-occlusive, voire des hépatites chroniques pouvant évoluer vers de véritables cirrhoses lors d'utilisations prolongées, ont été décrits au fil du temps.

Divers mécanismes ont été incriminés pour expliquer la toxicité des plantes médicinales. Une toxicité directe de certaines molécules ou un mécanisme immuno-allergique ont notamment été évoqués par plusieurs auteurs.

IV.1. Classification des plantes toxiques

Lors d'une demande d'information concernant une intoxication par une plante, se pose un double problème : d'abord celui des appellations vernaculaires et de la dénomination scientifique qui leur correspond (Centre anti poison du Maroc, 2014).

Tableau 1: Répartition des cas d'intoxications par les plantes en fonction de l'espèce incriminée, CAPM, 1980-2008

Nom latin	Nom usuel	Total	%
-	Mâajoune (Mixture)	1156	26.5
Atractylis gummifera	Chardon à glu ou Addad	461	10,6
Cannabis sativa	Cannabis, Hachich ou Herbe	441	10,1
Peganum harmala	Harmel	201	4,6
Datura stramonium	Datura	156	3,6
Ricinus communis	Ricin, Wriwra ou kharwae	101	2,3
Huile essentielle de Juniperus oxycedrus	Cadier	56	1,3
Lawsonia inermis	Henné	31	0,7
Papaver somniferum	Pavot ou Khachkhacha	31	0,7

Nerium oleander	Laurie rose ou Defla	27	0,6
Myristica fragrans	Gouza ou Noix de muscade	43	1,0
Nigella sativa	Nigelle ou Sanouj	44	1,0
Mandragora autumnalis	Mandragora	23	0,5
Rosmarinus officinalis	Romarin ou Azir	22	0,5
Citrullus colocynthis	Coloquinte ou Hadja	35	0,8
Eugenia caryophyllus	Clou de girofle ou Qoronfol	15	0,3
Autres plantes		1457	33,6

Ensuite, lorsque la dénomination de la plante est précisée, il faut rapidement, connaître sa toxicité afin d'évaluer le risque toxique et dicter la conduite à tenir. Ceci est d'autant plus problématique que les plantes toxiques ne sont pas toujours listées et connues et qu'elles ont des noms très variables d'un pays à un autre et dans un même pays d'une région à une autre.

Afin de répondre à ce besoin, le CAPM a élaboré deux bases de données et a développé une approche syndromique. La méthodologie préconisée est une méthodologie pragmatique continuellement mise à jour. En effet, les plantes toxiques sont incluses dans ces bases de données en fonction de leur présence dans l'environnement marocain et en fonction de leur fréquence d'usage par la population marocaine : 1-Botanicus : cette base de données regroupe et identifie 279 plantes toxiques avec 2294 équivalents de noms communs français, arabe et amazigh. 2- Phytotox : cette base de données répertorie des fiches de toxicité de 120 plantes du Maroc. Chaque fiche comporte la photographie et les dénominations, la nature du composé toxique, la symptomatologie de l'intoxication aiguë et le traitement à instaurer.

VI.2. Approche syndromique

Quand il n'existe aucune indication sur le nom ou la description de la plante en cause, l'approche syndromique permet de remonter vers le groupe des plantes toxiques responsables des symptômes que présente le patient. Il s'agit d'une classification indicative et non exhaustive dans laquelle les plantes toxiques sont reconnues à travers l'appareil atteint de manière prédominante.

A signaler que les plantes toxiques peuvent entraîner plusieurs syndromes souvent associés. Cette classification n'inclue pas les plantes médicinales qui sont gérés par le système marocain de Phytovigilance (centre anti poison du Maroc, 2014).

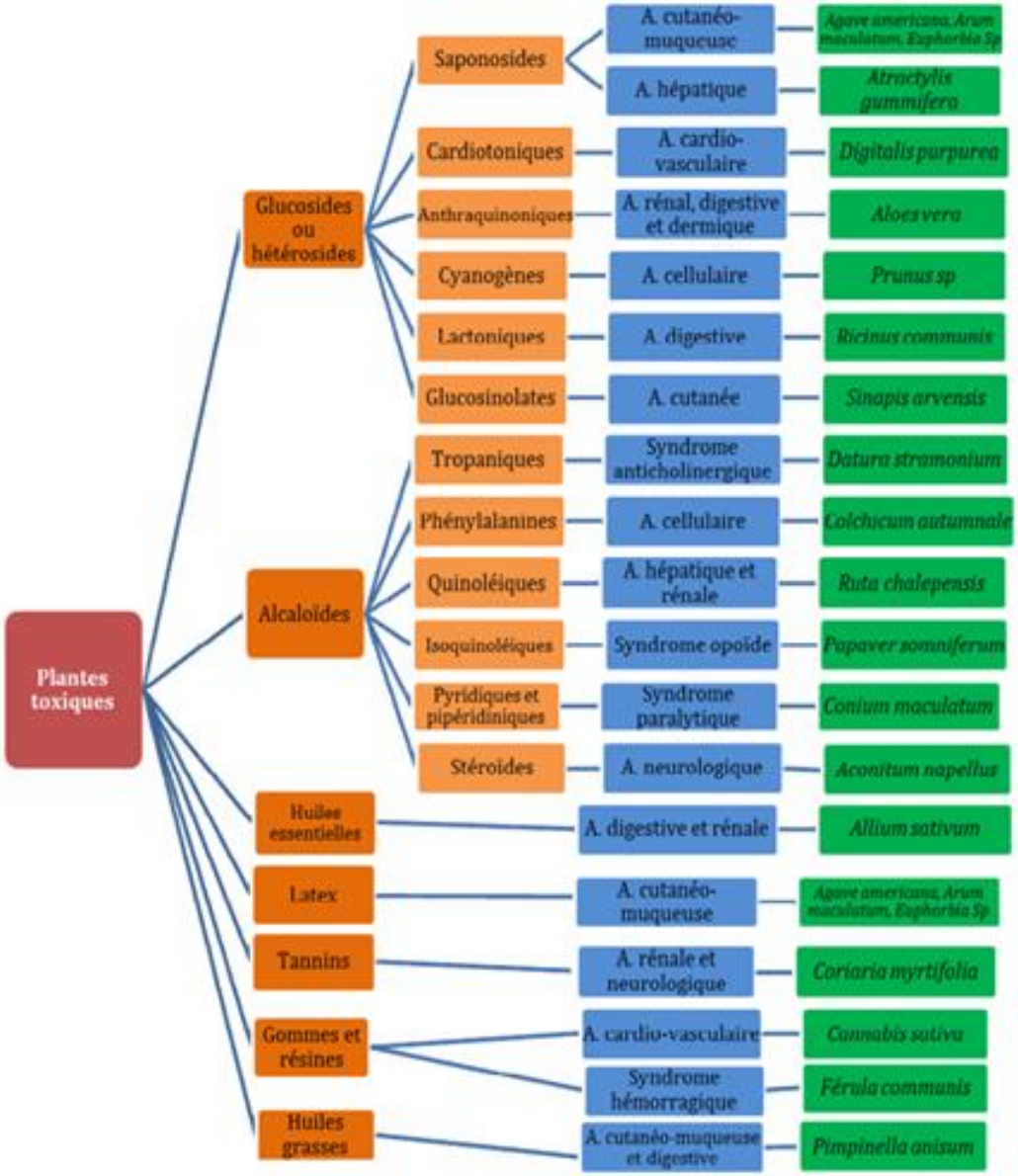


Figure 9 : Schéma représentatif de la classification des plantes dangereuses par atteinte organique selon le principe actif ; avec quelques exemples de la base de données du CAPM.

Légende :

Classe de principe actif
Principe actif
Syndrome ou atteinte organique
Exemple des plantes

Atractylis gummifera (Chardon à glu)

I. Description botanique du chardon à glu

I.1. Classification

I.1.1. Systématique

D'après la classification APGIII (Dupont et al, 2005), l'*Atractylis gummifera* est classé comme suit :

- **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.1.2. Nomenclature

- **Synonymes botaniques** (Aït Youssef et al, 2006)

  - Atractylis gummifera L.
  - Carlina gummifera DC.
  - Carlina gummifera Less.
  - Acarna gummifera Brot.
  - Acarna gummifera Willd.

- **Noms vernaculaires :**
  - Tifroua (Brette et al, 1985),
  - Tabonekkart (Fourment et al, 1942).

- **Noms berbères** :
  - Ahfyûn (Émile Laoust et al 1983),
  - Addâd (Bertrand et al 1991),
  - Haddad (Gattefossé et al 1921),
  - Ddâd (Bellakhdar et al, 1997),
  - Aḍad (Bouquet et al, 1927).
- **Noms arabes :**

  - Chouk el heulk, el-'alk (Lemordant et al, 1977)

  - Dâd, ded, edded, haddad (Hammiche et al, 2013)

  - Djerni, leddad, addad (Botineau et al, 2010)

- **Noms français** (Aït Youssef et al, 2006)
  - Chardon à glu,
  - Caméléon blanc,
  - Chamaeléon blanc,
  - Carthame gummifère.
- **Noms anglais** (Hammiche et al, 2013)
  - Bird-lime,
  - Glue thistl.
- **Nom italien :**

  - Masticogna (Hammiche et al, 2013)

I.1.3. Famille des Asteraceae

Les plantes Astéracées, forment la plus vaste famille des Phanérogames, très répandu d'angiospermes à fleurs. La famille dispose de plus de 23500 espèces actuellement acceptées, réparties dans 1620 genres et 13 sous-familles. (Botineau et al, 2010).

En termes d'evolution, les Asteraceae peuvent etre considérées comme étant les espèces végétales les plus récentes, avec des fleurs extremement réduites, groupement des fleurs en capitule, et une dissémination efficace des graines grâce à des *pappus* surmontant des akènes (Frohne et al, 2009).

Cette famille est aussi caractérisée par la présence d'un appareil sécréteur bien développé et des organes de réserve riches en inuline (Dupont et al, 2005).

Les plantes de cette famille sont reconnue dans le monde entier, surtout dans les régions tempérées (Dupont et al 2005), les régions sèches, comme le Bassin Méditerranéen, l'Afrique australe, le Mexique et Sud-Ouest des états–Unis et les régions arides d'Amérique du Sud (Botineau et al 2010). Comme elles peuvent aussi se developper dans les régions froides (Bruneton et al, 2007).

I.1.4. Genre Atractylis

Atractylis est un genre végétal de la famille des Asteraceae, avec une trentaine d'espèces localisées sur le bord et les iles de la Méditerranée, plusieurs espèces sont présentes au Maroc où *Atractylis gummifera* L., largement abondante, constituent souvent des peuplements denses (Hammiche et al, 2013).

I.1.5. Espèce d'*Atractylis gummifera* L.

L'espèce *Atractylis gummifera* L. a été créée par le botaniste Linné en 1753, sauf que la plante était déjà connue, sous le nom de Caméléon. La majorité des auteurs s'accordent, aujourd'hui à reconnaître l'*Atractylis gummifera* L. appelée autre fois le Caméléon blanc chez les anciens Grecs et les Romains (Fassina et al, 1961).

Après Linné, l'Atractylis a été aussi souvent désignée chez les botanistes par les synonymes de Acarna gummifera W. et Carlina gummifera Less. Alors que dans l'Index Kewensis (1895) ; on utilise la nomenclature linnéenne (Fassina et al, 1961).

I.2. Description botanique

L'*Atractylis gummifera* L. est une plante herbacée, épineuse, peu odorante, et vivace par ses parties souterraines très développées. Cette plante est constituée de deux parties :

- Partie aérienne: tige, feuilles, fleurs et fruits.
- Partie souterraine : racine volumineuse, pivotante et charnue (Bensalah et al, 2001).

I.2.1. Partie aérienne

- Tige :

La plante *d'Atractylis gummifera* est caractérisée par une tige acaule (tige absente ou très courte (Aït Youssef et al, 2006).



Figure 10 : Tige d'*Atractylis gummifera*

- Feuille:

Les feuilles *d'Atractylis gummifera* sont profondément divisées en lobes épineux et groupées en rosettes. Elles commencent à apparaitrent dès l'hiver et sont basilaires, étalée sur le sol (Aït Youssef et al 2006) (Aït Youssef et al, 2006 ; Gaillard et al, 2001) (Figure 10).



Figure 11 : Feuille d'*Atractylis gummifera*

Ces feuilles sont aranéeuses, atténuées en pétiole engainant à la base ; de forme lancéolée, avec une longueur de 10 cm à 25 cm, les bords sont piquants surtout en hiver (Aït Youssef et al, 2006). Alors que la nervure médiane est sillonnée de stries parallèles et grosse de taille (Boutoubet al, 2015)

- **Fleurs**

Les fleurs aussi appelées fleurons '(Boutoub et al 2015) sont de couleur rose, rouge pourpre mauves ou rosâtres, hermaphrodites et duveteuses. Elles apparaissent vers le mois de juin ou jouillet selon l'étage climatique. Ces fleurons sont tous tubulés et résistent assez longtemps après le desséchement des feuilles (Aït Youssef et al, 2006). La corolle est gamopétal (Boutoub et al, 2015) et comporte 5 lobes entourés à leur base par des poils soyeux portés par unovaire uniloculaire et ne renferme qu'un seul ovule (Boutoub et al, 2015).



Figure 12 : Fleur d'*Atractylis gummifera*

- **Bractées :**

Chez les plantes d'Atractylis gummifera, les bractées sont souvent hérissées d'épines (Figure 11) et laissent exsuder à leur base un latex de couleur crème, blanc jaunâtre, qui se solidifie pour devenir une sorte de glu (d'où le nom vernaculaire chardon à glu). Cette glu aussi dénommée ' gomme ' par certains auteurs n'apparait qu'après la fructification de la fleur (Aït Youssef et al, 2006).

- **Inflorescence**

L'inflorescence des plantes d'Atractys gummifera est constitué d'un à plusieurs capitules de fleurs ou fleurons, qui est généralement volumineux, solitaire (quelques fois 2 à 4 capitules floraux peuvent être réunis au centre de la rosette) et mesure de 6 à 10 cm de diamètre; 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 successive (Aït Youssef et al, 2006).

- **Fruit :**

L'ovaire est infère, il donne après fécondation un fruit sous forme d'akène ellipsoïdale, il est velu et surmonté d'une aigrette de poil appelé *pappus* de couleur blanche assurant sa dispersion (Boutoub et al, 2015) (Figure 12).



Figure 13 : Fruit d'*Atractylis gummifera*

I.2.2. Partie souterraine

La racine d'Atractylis gummifera, est charnue à l'état frais, caractérisé par la présence d'un rhizome principal pivotant très developpé (peut atteindre une longueur de 30-40 cm avec un diamètre de 7-8 cm), sans forme définie, accompagné de fines racines et de rhizomes rampants, à section très dure, fibreuse, jaunâtre, laissant apparaitre des stries concentriques (Hammiche et al, 2013).



Figure 14 : Racine d'*Atractylis gummifera*

Apres dessechement, la couleur des racines vire vers le gris terne, alors que l'extérieur devient marron, uniforme et à section blanche (Hammiche et al, 2013). Ces racines dégagent une très légère odeur balsamique, peu nauséabonde dont la saveur est douçâtre sucrée au début, puis chaude et âpre, et laisse finalement dans l'arrière bouche une sensation d'âcreté très persistante (Lefranc et al, 1866).

I.3. Distribution

L'Atractylis gummifera est un chardon distribués dans le monde entier, mais Particulièrement abondant dans les régions méditerranéennes : dans le Nord de l'Afrique (Algérie, Maroc et Tunisie) et dans le sud de L'Europe (Italie, Grèce, Espagne et Portugal) (Lefranc et al, 1866). Elle est présente dans divers pays du Maghreb où elle est très répandue au Maroc, en Algérie et en Tunisie. Au Maroc, cette plante est répondue dans toute l'étendue de la région de Fes Boulmane, Loukous, Benimellal et Marrakeche,

On peut rencontrer les plants d'Atractylis gummifera dans les forêts claires, les terrains herbeux, les terrains de pâturages (Aït Youssef et al, 2006 ; Boutoub et al, 2015 ; Derraji et al, 2014), et s'adapte aussi bien aux argilo-sablonneux ; comme elle pousse de façon abondante dans la nature (à l'état sauvage) au bord des routes, dans les champs en jachère et en proximité des villages, d'où le grand probleme d'intoxication des enfants qui par ignorance prennent du plaisir à macher la gomme sécrétée par la plante du chardon à glu et des fois meme la racine (Boutoub et al 2015 ; Charnot et al, 1945). Sachant que les plants de cette dernière pérsistent dans les champs en toute saison : les feuilles et les fleurs desséchées de l'année précédente s'accrochent au sol et marquent l'emplacement de la plante avant que celle-ci n'ait encore de nouvelles feuilles (Skalli et al, 2002).

I.4. Composition chimique et principes actifs *d'Atractylis gummifera*

I.4.1. Composition chimique

Il faux souligner que très peux de données sur la composition chimique *d'Atractylis gummifera* sont disponible en littérature. D'après une étude réalisée par LEFRANC en 1866, l'analyse des racines d'*Atractylis gummifera* L. récoltée en avril et desséchée à l'ombre, a donné les proportions suivantes pour les composants:Inuline (46,5%), Cellulose (25%), Sucres (8%), Matière minérales (4.5%), Eau (4%).

En plus des hétérosides diterpénique (ATR et CATR), hétérosides flavonoïdique, aspargine, nombreux acides aminés (acide aspartique et glutamique, proline, leucine, valine, et tryptophane) et differents acides organiques (acide acétique, isovalérianique, oxalique et malique), huile essentielle (trace).

D'autre part, Lefranc a aussi fait une étude sur les cendres de la racine d'*Atractylis gummifera* L.; qui en brulant, repand une très forte odeur de caramel, les éléments du résidu sont : La chaux, de la soude, de la magnésie, de la potasse du fer, de l'acide chlorhydrique, de l'acide sulfurique, de l'acide carbonique et de la silice (Lefranc et al, 1866).

I.4.2. Principes actifs

Le premier principe toxique de l'Atractylis Gummifera a été isolé de la racine en 1868 par Lefranc qui l'appela Atractylate de potassium connu après sous le nom d'atractyloside (ATR) (figure 14). Et ce n'est qu'en 1964 que le deuxième principe toxique a été isolé et identifié par DANIELI qui lui attribua le nom de gummiferine, identifié par la suite comme ou 4-carboxyatractyloside (CATR) (Danieli et al 1972, Riccio et al 1973).

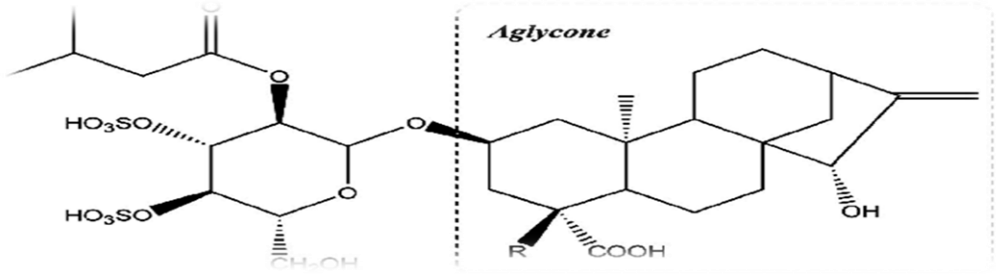


Figure 15 : Structure de l'atractyloside **(ATR)**

Le carboxyatractyloside (CATR) est un composé chimiquement voisin de l'atractyloside (ATR) mais qui diffère par la présence d'un second groupe carboxylique en position C-4' (Ahid et al, 2008). Ce dernier est présent surtout dans les plantes fraiches, car il est très sensible à la temperature et risque d'etre décarboxylé au cours de sechage.

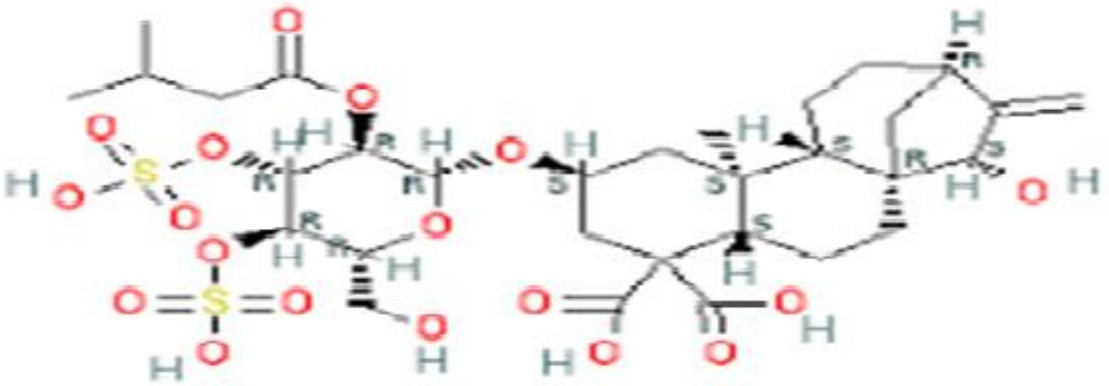


Figure 16 : Structure du carboxyatractyloside (CATR)

La toxicité du CATR est également plusimportante que celle d'ATR, comme on peut aussi trouver ces compsés dans d'autres plantes telles que : *Wedelia asperrima (*Gaillard et al 2001).

L'ATR et le CTR sont des hétérosides de nature diterpénique dérivée du kaurène, très solubles dans l'eau, dans l'alcool à 95° et pratiquement insoluble dans les solvants organiques (Gaillard et al, 2001).

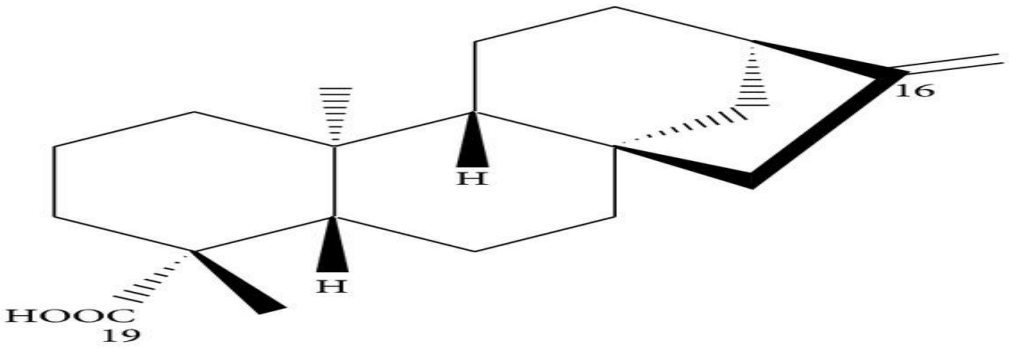


Figure 17 : Structure du kaurène

L'ensemble des parties de la plante contiennent le principe actif l'Atractyloside (ATR) à teneur variable. La racine renferme la plus grande teneur en toxique suivie de la tige, des bractées, de la fleur, de la graine et enfin la feuille en contient le moins (Danieli et al 1972).

II. Intoxication par *Atractylis gummifera :* Répartition, lieux et circonstances

L'effet toxique de *l'Atractylis gummifera* découle de la présence des deux heterosides diterpeniques: ATR et CATR, qui sont des puissants inhibiteurs de la phosphorylation oxydative au niveau des mitochondries.

Les intoxications par cette plante, sont essentiellement accidentelles par confusion avec d'autres plantes comestibles telle que l'artichaut ou par dépassement de dose (Hamouda et al, 2000).

La plus gande partie des intoxications déclarées a été enregistré en printemps, dont malheureusement un grand nombre d'enfants des milieux ruraux (fassina et al, 1978). Comme elles peuvent être aussi criminelle et discrete, du faite de la facilité de se procurer le toxique (racines) à tout moment et en tous lieux (vente libre), de sa saveur très peu marquée, ses résultats à peu près certains et rapides ainsi que pour la difficulté de prouver son emploi par les empoisonneurs. Enfin. L'intoxication peut être suicidaire surtout chez les femmes entre 15 et 30 ans soit par ingestion de la plante seule ou parfois associée à certains médicaments (Hamouda et al, 2000) d'où le nombre élevé des cas d'intoxications par le chardon à glu rapportés dans la littérature (une centaine).

Au niveau du Maroc, une étude réalisée par le Centre Antipoison sur une période de 15 ans (du janvier 1980 à juin 1995), avait enregistré 153 cas d'intoxication par chardon à glu avec trois pics (1985 avec 20 cas, 1988 avec 20cas et cas en 1993 (Hamouda et al, 2000).

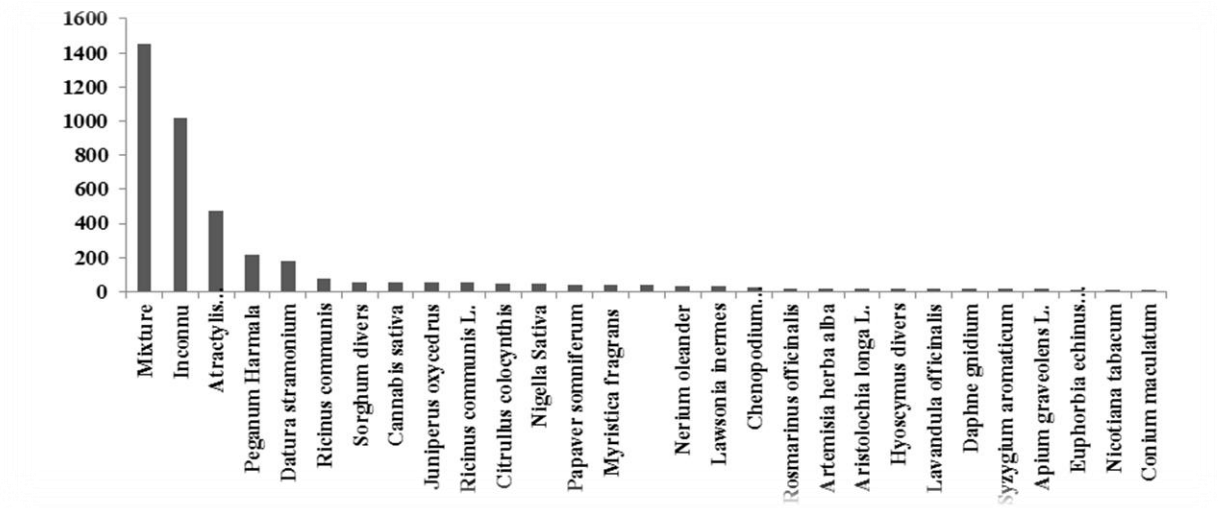


Figure 18 : Les plantes les plus incriminées dans les cas d'intoxication déclarés au Centre Anti Poison du Maroc (période 1980-2011)

***Les mixtures regroupent : le Mâajoune (surtout), Ras El hanout, Lâachoub**.

Au Maroc et dans la plupart des pays méditerranéens, les études montrent que sur l'ensemble des personnes concernées par cette intoxication et qui ont été hospitalisées (240 cas), 98 sont décédées, soit un taux de létalité intrahospitalière de 54 % (parmi les 182 pour lesquels l'évolution est connue). Les victimes sont des enfants de moins de 16 ans dans 72 % des cas, dont plus de 58 % impliquent des enfants de moins de dix ans (Centre Anti Poison du Maroc 1980-2011).

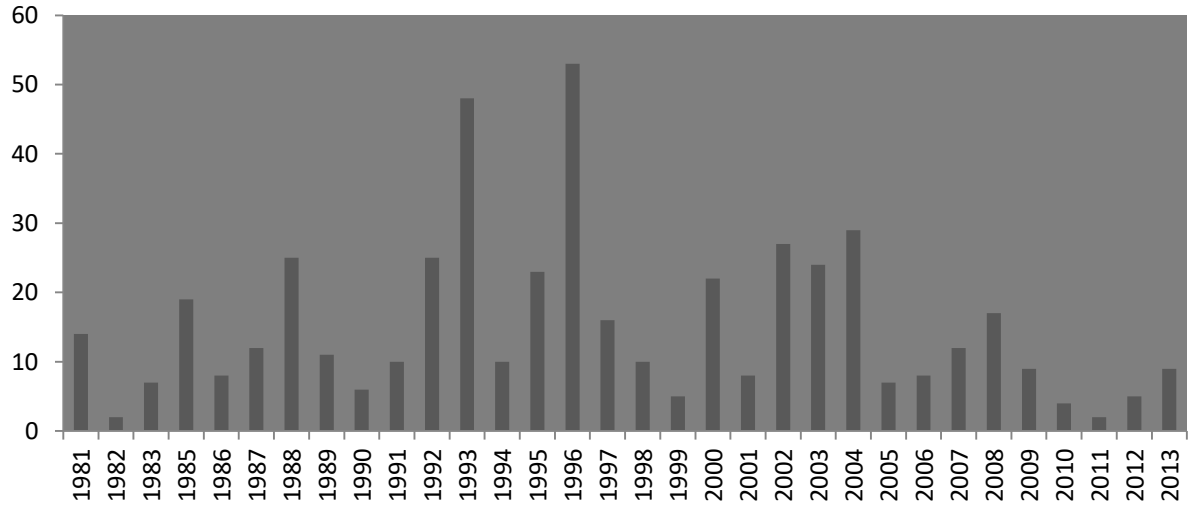


Figure 19 : Progression des intoxications au chardon à glu enregistrées par le Centre Anti Poison du Maroc (CAPM, 2013)

Cependant la toxicité dépend bien de plusieurs facteurs et parametres dont la dose administrée, l'âge du sujet, la partie de la plante ingérée, et la teneur de cette derniere en principes actifs qui dépend à son tour de : la periode de recole, le site et l'etage climatique du prélévement, la nature du matériel végétal (seche ou frais) ainsi que la methode de préparation (à froid ou par procédé thermique) (Errai et al, 2018).

Concernant les doses toxique du chardon à glu, Une étude réalisé par Larabi en 2012 a rapportée une DL_{50} de lordre de 260 g de racine (sèche) chez le rat en cas d'administration par voie orale, et que pour les voies intra-péritonéale, intramusculaire, et sous-cutanée, seulement 10 à 35 g permettent d'atteindre la DL_{50} . Alors que pour l'homme, on ne dispose pas encore de données concernant les doses létales de l'atractyloside (ATR), sachant que la transposition des données animales à l'homme ne peut être appliquée qu'en présence de données relatives à son volume de distribution dans l'organisme (Larabi et al, 2012).

D'après une étude réalisé par Hami et al (2010), sur 182 patients objet de leurs étude (et dont ils disposent de données sur l'évolution) 98 sont décédés, dont 62,2 % sont des enfants de moins de dix ans. D'après les données déclarées, 76 décès sont attribués à une intoxication accidentelle. À signaler qu'il y a en moyenne dix cas d'intoxication et 4,1 décès par année (Hami et al, 2010).

L'analyse statistique des données n'a pas montré de différence significative d'évolution du nombre annuel d'intoxications par cette plante, à la différence du nombre de décès qui connaît une diminution significative avec le temps (Hami et al, 2010).

Selon des statistques publiées par Hami et al en 2010, La majorité des intoxications par le chardon à glu survient en dehors du domicile (63 %) et 37 % des cas surviennent à domicile. L'intoxication par cette plante est accidentelle dans 74 % des cas et volontaire dans une proportion de 22 %, avec cinq cas de suicide.

l'intoxication est accidentelle dans 90 % des cas chez l'enfant âgé de moins de dix ans (79 cas) et dans 75 % du groupe de 10 à 19 ans (68 cas), contrairement à l'adulte de 20 ans et plus dont les cas d'intoxication déclarés sont souvent volontaires (plus de 63 %) (Hami et al, 2010).

II.1.1. Mécanisme d'action

Les deux principes actifs responsale de la toxicité *d'Atractylis gummifera* (ATR et CATR) agissent par inhibition du transport des nucléotides phosphorylés ADP et ATP à travers la membrane mitochondriale interne, ce qui empêche par conséquent la phosphorylation oxydative (Koechel et al, 1993).

L'atractyloside (ATR) intervient au niveau de l'adénine nucléotide translocase ou ADP/ATP translocase (qui est une enzyme chargée du transfert de l'ADP dans la matrice mitochondriale) par voie compétitive grace à son analogie structurale avec ce dernier, et se fixe sur la translocase, l'empêchant ainsi de pénétrer dans la matrice mitochondriale et par conséquent, d'être transformé en ATP (Bruni et al, 1965).

L'un des groupes les plus importants dans la toxicité ATR est le groupe carboxyle C-4' de l'anneau diterpène: sa réduction à l'alcool produit un composé non toxique, atractylitriol. La

toxicité de l'ATR dépend également du groupe méthylène-16 C: la réduction laisse un composé de deux ou trois fois moins puissant que ATR (Bowser et al, 2002).

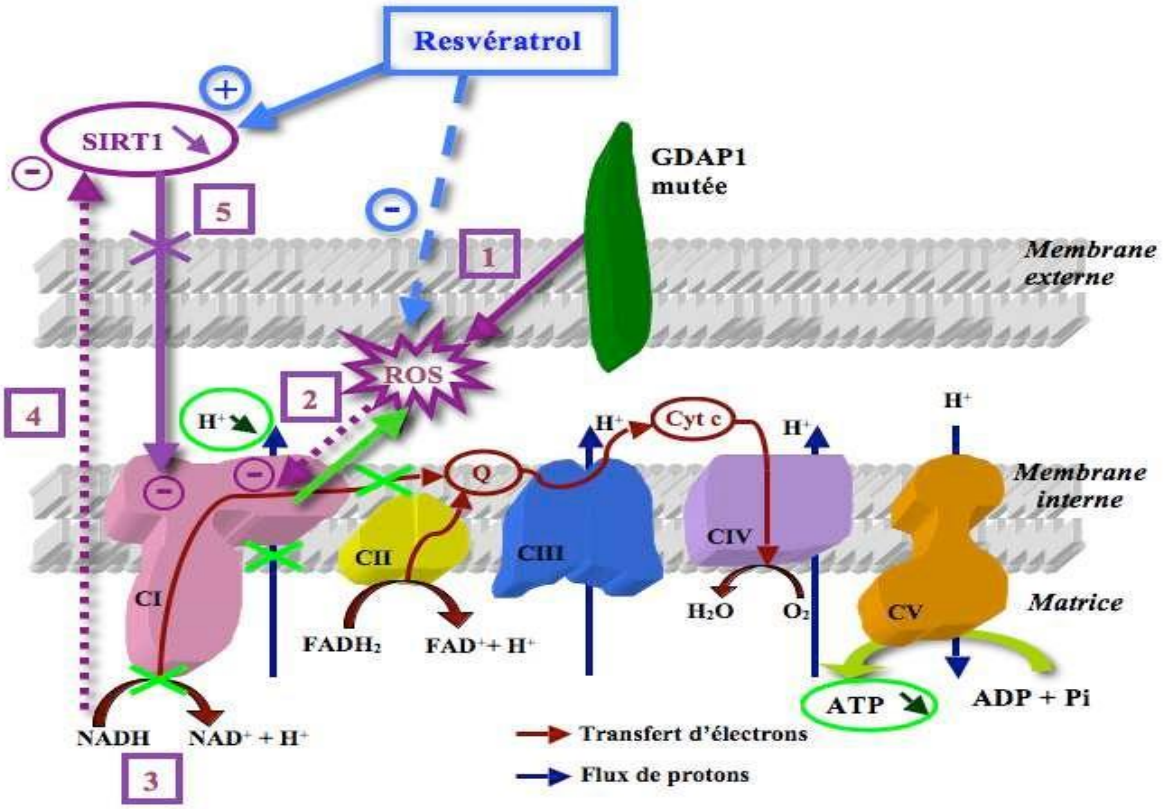


Figure 20 : Le système des phosphorylations oxydatives

Cependant plusieurs travaux ont prouvés et rapportés la gande affinité du carboxyatractyloside (CATR) avec le transporteur (Koechel et al, 1993), une affinité jugé comme étant bien supérieure à celle de l'atractyloside (ATR) ; ce qui a été expliquer par l'interaction établit, entre le groupe carboxylique supplémentaire du CATR et les acides aminés proches du site de fixation (Koechel et al, 1993). Ces deux molécules toxiques sont principalement des inhibiteurs des chaines respiratoires mitochondriales (Bowser et al, 2002).

L'inhibition de la translocase par ces molécules toxiques (ATR et CATR) entraine par conséquent l'inhibition et le blocage de toute la chaine respiratoire (Chardon et al, 1964 ; Bowser et al, 2002), comme ils peuvent également induire une apoptose hépatocytaire. D'autre part, l'atractyloside inhibe aussi la néoglucogenèse, l'oxydation des acides gras, et accélère la glycolyse anaérobie et la glycogénolyse (Bowser et al, 2002).

Bien que, les cellules les plus vulnérables sont celles du foie, du rein, du pancréas et du myocarde, il faut noter qu'aucune information n'est disponible sur la biocinétique et l'accumulation de atractyloside dans les tissus (Bowser et al, 2002).

II.1.2. Signes cliniques et biologiques d'intoxication par Atractylis gummifera

II.1.2.1. Signes cliniques

La toxicité du chardon à glu (Atractylis gummifera L) est bien connue dans les pays méditerranéens comme le Maroc et l'Algérie. 100 cas d'empoisonnement par cette dernière ont été décrits dans la littérature depuis le XIXe siècle (Hamouda et al, 2004).

En 1954 Larribaud a signalé l'empoisonnement de deux enfants âgés de 4 et 6 ans, après ingestion de la racine d'Atractylis gummifera dans une région de Dellys (Algérie). Les enfants ont été admis à l'hôpital avec de violente colique abdominale et des vomissements abondants, suivis par des contractions généralisées, une cyanose, l'agonie et le coma. Le lendemain matin, les deux enfants sont morts. Les résultats des examens histopathologique ont montré des intestins congestionnés, les exsudats péritonéaux et des hémorragies au niveau de l'estomac et les reins (Hamouda et al, 2004).

La sévérité de l'intoxicationpar le chardon à glu, ainsi que le degré de manifestation des signes cliniques dépend de la dose ingérée, du poid et de l'age de la personne empoisonnée; si la dose est faible, l'issue peut être favorable ; C'est ce que l'on observe dans les formes dites bénignes ou digestives car la symptomatologie est dominée par les seuls troubles digestifs (Hammiche et al, 2013), mais si la dose ingéré est importante, le traitement symptomatique ne pourra pasréparer ou restaurer les grandes fonctions organiques atteintes (Hammiche et al, 2013).

Dans le cas bénin sus mentionné, on note une diarrhée, vomissements, douleurs et ballonnement abdominal, ce qui est considéré comme une intoxication légère avec disparition rapide des troubles.

Alors que dans les cas graves on note en plus des troubles digestifs, des douleurs épigastriques, et des vomissements abondants, des céphalées et des vertiges, trouble de transit, les selles deviennent noirâtres, fétides et liquides, la langue peut présenter des myoclonies au cours des vomissements, sensation d'âcreté très persistante dans la bouche, en plus des signes cliniques de l'hypoglycémie: Sueurs, malaise général, baisse de tension après une phase

d'hyperglycémie transitoire, accompagner parfois d'une perte de connaissance brève (Aït Youssef et al, 2006),

Alors que dans les cas d'intoxication très grave, le tableau clinique montre les troubles suivants :

- Complications cardio-vasculaires marquée par des tachycardies et des irrégularités tensionnelle,
- Troubles neurologiques caractérisés par des atteintes du système nerveux central, des convulsions, dilatation de la pupille en plus des crises épileptiques qui s'accompagnent le plus souvent de troubles de la conscience (Aït Youssef et al, 2006),
- Complications respiratoires : Polypnée et apparition progressive d'une insuffisance respiratoire, encombrement tracheo–bronchique, cyanose et troubles de la déglutition (Hammiche et al, 2013),
- Complications hépatiques : Insuffisance hépatocellulaire, diminution puis arrêt de synthese de certains agents de coagulation, et par conséquent : Diarrhée sanglantes, hématuries, suffusions de sang au niveau des bronches et des poumons, entrainant des expectorations hématiques (crachats mêlés de sang) puis des hémoptysies (expectorations sanglantes) (Aït Youssef et al, 2006),
- Complications rénales : Insuffisance rénale aigue avec anurie (Aït Youssef et al, 2006),

Le décès survient généralement 4 à 6 jours maximum après l'ingestion du chardon à glu, suite à une hépatite fulminante, une nécrose hépatocellulaire et arrêt respiratoire, (Aït Youssef et al, 2006).

Aprés autopsie, l'examen montre une atteinte de presque tous les organes vitaux, foie congestionné et nécrosé ; rate, péritoine et muqueuse de l'estomac et des intestins montrant des signes hémorragiques ; reins avec des lésions de tubulo-néphrite ; cerveau avec des signes hémorragiques en plus d'un œdème plus ou moins étendu (Aït Youssef et al, 2006).

II.1.2.2. Signes biologiques

En cas d'intoxication par *l'Atractylis gummifera*, les résultats des examens biologiques sont generalement caractérisée par l'apparition des changements suivant :

- Atteinte de la capacité d'épuration des reins, entre autres, la créatinine (dans les cas les plus graves) ; insuffisance rénale aigue évoluant vers l'anurie,
- Augmentation très marquante des enzymes hépatiques (transaminases 25 à 50 fois plus que les valeurs normales, lactate déshydrogénase, créatine kinase) ce qui indique l'importance de la cytolyse hépatique (Stickel et al, 2001),
- Augmentation de la bilirubine à prédominance conjuguée, qui traduit l'intensité de la cholestase, ainsi que l'urée (Aït Youssef et al, 2006),
- Diminution du taux sanguin de prothrombine,
- Cétonurie (présence de corps cétonique dans les urines) (Aït Youssef et al 2006),
- Protéinurie, et une oligurie traduisant une Hypocoagulabilité sanguine (Hammiche et al, 2013),
- Hématurie positive
- Hypoglycémie, précédée quelque fois d'un pic hyperglycémique et l'acidose (Hammiche et al, 2013),

La démarche de diagnostique est particulièrement difficile. Les règles sont celles habituellement utilisées pour les intoxications médicamenteuses :

- L'histoire clinique,
- La symptomatologie
- La mise en évidence des toxines de la plante dans le liquide d'aspiration gastrique ou dans les urines.

II.1.2.3. Traitement :

Il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement ou antidote spécifique conte l'intoxication par l'*Atractylis gummifera* L. Le traitement est essentiellement symptomatique et évacuateur (Hammiche et al, 2013) :

- L'évacuation digestive doit être effectuée le plus vite possible soit par lavage gastrique, vomissements provoqués, administration de charbon activé et/ou accélération du transit intestinal.
- Traitement symptomatique comporte la perfusion de solutions de glucosé à 5 ou 10 %, le contrôle des troubles respiratoires, le maintien d'une diurèse supérieure à la normale et l'administration de facteurs de coagulation.

- Le traitement physiopathologique inclue la transplantation hépatique, qui permet la survie du patient dans l'attente d'une régénération hépatique et pourra éventuellement être envisagé dans les situations les plus graves. Des recherches actuelles explorent la voie de l'immunothérapie.
- Perfusion d'un sérum isotonique salé ou glucosé contre l'hypo volémie et la déshydratation globale (Aït Youssef et al, 2006), en plus de la perfusion continue du sérum bicarbonaté contre l'acidose,
- Pratiquer la ventilation assistée, même préventivement, contre la dépression respiratoire
- Prévention des accidents secondaires comme les crises épileptiques généralisées avec perte de conscience, risque de fausse route (Aït Youssef et al, 2006),
- Le remplissage vasculaire, pour lutter contre le collapsus cardio-vasculaire.
- Au stade ultérieur, ajouter des apports de vitamine K pour éviter la coagulation sanguine (Aït Youssef et al, 2006),

Tenant compte de la gravité de ce type d'intoxication, l'hospitalisation doit être de règle et en urgence, le traitement symptomatique est toujours insuffisant chez les sujets qui ont ingérés des quantités mortelles *d'Atracylis gummifera* (Skalli et al, 2002).

L'absence d'antidote spécifique a stimulé les études visant à évaluer les divers composés capables de réduire Toxicité ATR. Des recherches actuelles explorent la voie de l'immunothérapie, dans le but de produire des fragments d'anticorps antitoxines qui puissent agir sur les composés toxiques, comme dans le cas d'intoxication par la digoxine et autres glucosides cardiaques ou la colchicine (Hammiche et al, 2013).

Dans une tentative de mettre au point de meilleurs traitements contre *l'Atractylis gummifera,* divers composés ont été évalués Le centre anti poison du Maroc a proposé récemment un traitement à base de la N-acétyle cystéine pour prévenir l'atteinte hépatique résultante de l'empoisonnement par *l'Atractylis gummifera* et une nette amélioration a été observée (Rhalem et al, 210).

En Tunisie, une étude a déjà tenté de produire des fragments polyclonaux (Fab), dirigés contre les composants toxiques *d'Atractylis gummifera* (ATR et CATR). Cette approche par immunothérapie sera probablement plus sûr mais plus cher que les traitements conventionnels (Hamouda et al, 2004).

Alors que le traitement physio étiologique inclut la transplantation hépatique, ce qui permet la survie du patient dans l'attente d'une éventuelle régénération hépatique qui pourra être envisagée dans les cas les plus graves (Eddleston et al, 2003).

L'autre approche pratique, serait de sensibiliser les gens sur la toxicité *d'Atractylis gummifera* et d'apprendre aux enfants à reconnaître les plantes dangereuses.

Pour développer d'avantage ces traitements, nous avons besoin d'en savoir plus sur la pharmacocinétique et la chronique de ces toxiques.

III. Usage et propriétés pharmacologiques

L'Atractylis gummifera L est une plante dotée d'une capacité antioxydante due à sa richesse en polyphénols (flavonoïdes, anthocyanes, tanins) qui sont les principaux agents responsables de cette propriété (Khadhri et al, 2013).

Cette activité dépend de la nature de l'organe étudié ; la feuille possède le pourcentage d'activité antioxydante le plus élevé, vu sa forte teneur en polyphénols principalement les flavonoïdes. La racine présente aussi un pouvoir antioxydant du fait de la présence des anthocyanes et des tanins condensés (Khadhri et al, 2013).

Malgré sa toxicité le Chardon à glu est considéré comme étant une plante presque magique pour les marocains. Cette plante est trés populaire sur tout le Nord-Ouest du continent africain. Les racines d'*Atractylis gummifera* L. sont utilisées contre toutes toutes les lésions infectieuses et inflammatoires de la peau par application externe ou locale et jamais par voie interne, vu que la plante présente une toxicité certaine (Chaumont et al, 2011).

L'*Atractylis gummifera* L. est réputée comme purgative à faible dose (Aït Youssef et al, 2006). Elle est également employée traditionnellement comme plante médicinale dans le traitement de l'hydropisie et comme antihelminthique ; l'espèce était déjà connue pour tuer les chiens et les pourceaux (Aït Youssef et al, 2006).

En plus, le chardon à glu est utilisé dans la pharmacopée traditionnelle, pour le traitement de différentes maladies telle que psoriasis, les ulcères syphilitiques et l'épilepsie. Comme il est réputée par ses propriétés antipyrétiques, diurétiques, émétiques et comme vermifuge (Hmamouchi et al, 1999 ; Belarbi et al, 2013).

Le capitule floral était employé au Maroc, en usage externe : sa gomme était brulée pour désinfection (Aït Youssef et al, 2006).Cette gomme est connue pour sa saveur douce, elle avait la réputation de ne pas être toxique (Aït Youssef et al, 2006). Elle sert de piège à oiseaux, et dans les zones rurales il est mâchonné par les enfants en guise de chewing-gum (Hammiche et al, 2013).

Alors que les feuilles étaient réputées comestibles en Tunisie et pour ne contenir que peu de substances toxiques (Aït Youssef et al, 2006).

Compte à la racine, elle est utilisé pour traitement de la gale, des taches de rousseur du visage, des boutons d'acné, des chancres syphilitiques, des abcès et des furoncles (Aït Youssef et al 2006 ; Hammiche et al, 2013). Elle est aussi utilisée comme remède dans le cas des maladies sexuellement transmissibles, (en décoction mélangé avec de l'Origan, de l'alun et du sel gemme) (Aït Youssef et al, 2006).

En application locale pour soulager les entorses (Aït Youssef et al, 2006), et séchée puis brulée comme insecticide (Aït Youssef et al, 2006)

La racine d'Atractylis gummifera est employée par voie aérosol, au moyen de fumigation dans le traitement des paralysies, des céphalées, des rhumes ou dans le traitement de vertiges.

Elle est employée, à des doses plus élevées, comme abortif par les femmes de la compagne, cette pratique provoque fréquemment des accidents – liés à la forte toxicité de la plante et aux circonstances mêmes de l'expulsion de l'embryon – ou du fœtus et du placenta : accidents hémorragiques, infectieux, etc. (Aït Youssef et al, 2006)

En usage interne, la racine desséchée est utilisée après cuisson prolongée dans l'eau, pour arrêter les hémorragies, traiter les œdèmes et l'épilepsie. Elle est utilisée contre la manie (Charnot et al, 1945).

IV. Dosage

La majorité des techniques d'identification et de dosage d'ATR, établit à nos jours, reposent sur la mise en évidence de ce dernier soit par coloration soit par chromatographie (Larabi et al, 2012).

Les réactions colorées de l'Atractyloside sont appliquées sur le lavage gastrique et sont basées sur l'ajout d'un certains nombre de réactifs spécifiques (l'acide sulfurique, le réactif sulfomolybdique de Frochde, l'acide sulfurique/ formaldéhyde). Ces réactifs colorés sont aussi utilisés comme des révélateurs après séparation par chromatographie sur couche mince. Toute fois, le para-diméthyle-amino-benzaldéhyde est considéré comme etant l'un des révélateurs les plus sensibles dont la plus petite quantité d'ATR nettement décelable est de l'ordre de 1µg (Viala et al, 1966).

CALMES (1994), a mit en place la première techniques chromatographiques, et ce après avoir réalisé une extraction liquide (par un mélange eau-méthanol) des racines fraiches d'*Atractylis gummifera* L. Il a aussi dosé l'ATR en phase inverse par un mélange eau_acétonitrile tout en utilisant un détecteur à lumière dispersée, la limite de détection (LD) de la technique est de l'ordre de 9µg d'ATR (Gaillard et al, 1999).

D'autre part, Bye et col ont étudié la détection de l'Atractyloside par une méthode immuno-enzymatique, mais cette dernière était sujette à des réservations quand à l'exactitude quantitative de ses résultats (Bye et al, 1990).

Compte aux autres techniques chromatographiques, elles correspondent toutes à un couplage avec la spectrométrie de masse. La méthode, proposée par (STEENKAMP et al, 1999), utilise une phase mobile composée d'un mélange de tampon formiate d'ammonium à 10 mM, du méthanol et de l'acétonitrile (Larabi et al 2012).

Toute fois, les techniques d'identification par électrophorèse sur couche mince à l'état pur ont montré la possibilité de mesure d'une quantité comprise entre 50 et 150 µg. Toute fois, l'électrophorèse, tout comme la chromatographie sur couche mince, peut séparer les deux composés, ATR et CTR (Gaillard et al, 1999).



Généralité sur les études toxicologiques

L'efficacité d'une substance en pharmacologie n'est pas suffisante pour justifier son introduction en domaine thérapeutique. En effet, en plus de son efficacité, elle ne doit causée aucun effets toxiques ou néfastes pour l'organisme sous sa dose active. Il faut donc bien définir et étudier le rapport bénéfice/risque dans l'indication thérapeutique de chaque substance. Chose qui ne peut être assuré que par l'intermédiaire des tests d'efficacité et de sécurité, (Dupont, 1987 ; Claude, 1985 ; Buenz, 2006).

La toxicologie doit donc veiller à l'innocuité des plantes médicinales. Mais sa position ne doit pas être seulement négative ou impérativement réglementaire, bien au contraire elle doit contribuer aussi à l'innovation. En définitive, elle doit apporter à la phytothérapie et à la consommation des plantes en générale une certaine garantie et assurance. L'évaluation de l'innocuité d'une substance peut être appréciée soit par l'étude de sa toxicité aigue après administration d'une dose unique ou bien par l'étude de sa toxicité chronique après administration répétée (Buenz, 2006).

I. Toxicité aiguë

L'étude de la toxicité aiguë permet de determiner la dose capable de tuer 50 % des animaux de l'expérience (DL_{50}) ainsi que la dose maximale sans impact toxique (DME) autrement dit la dose la plus élevée pour laquelle aucun effet toxique n'est enregistré par rapport au lot témoin (Traore, 1999).

La dose létale 50 % (DL_{50}) correspond à la dose capable de tuer dans des conditions définies, la moitié des animaux mis en expérience dans une même espèce animale. Dans un délai court, fixé au minimum à sept jours et au maximum à quatorze jours. Cette détermination est fondée sur l'évaluation des réponses de tout ou rien : mort ou survie des animaux.

La DL_{50} permet de classer les différentes substances chimiques en 5 catégories :

- $DL_{50} \leq 1$ mg/kg : très hautement toxiques ;
- 1 mg $\leq DL_{50} \leq$ 50 mg/ kg : hautement toxiques ;

- 50 mg ≤ DL_{50} ≤ 500 mg : moyennement toxiques ;
- 500 mg ≤ DL_{50} ≤1000 mg : faiblement toxiques ;
- 1000 mg ≤ DL_{50} ≤5000 mg : très faiblement toxiques.

Des observations peuvent s'avérer nécessaires lorsque les animaux continuent à manifester des signes de toxicité. L'attention portera en surtout sur l'observation des différentes manifestations de tremblement, diarrhée, léthargie, convulsion, salivation, sommeil et coma (Traore, 1999).

Le poids individuel de chaque animal doit être déterminé peu de temps avant l'administration de la substance d'essai et ensuite une fois par jour. Les changements de poids doivent être calculés et enregistrés.

Les troubles de toxicité peuvent ne se manifester qu'après une longue imprégnation de l'organisme, d'où la nécessité de réaliser des essais de toxicité par administration réitérée chez l'animal (Traore, 1999).

II. Toxicité chronique

Les études de toxicité chronique a pour objectif principal de caractériser le profil d'une substance chez une espèce de mammifère, suite d'une exposition prolongée et répétée à cette dernière. Idéalement, la conception et la conduite des essais doivent permettre la détection de la toxicité générale comprenant les effets neurologiques, physiologiques, biochimiques et hématologiques, ainsi que les effets morphologiques (pathologie) liés à l'exposition.

Le choix de la voie d'administration dépend des propriétés physiques et chimiques de la matière active à tester comme il doit tenir compte de celles prévues pour l'emploi thérapeutique et des possibilités de résorption, sachat qui il y a trois principales voies d'administration : l'ingestion orale (le gavage), la pénétration cutanée et l'inhalation.

II.1. Observations

Afin de reussir n'importe quelle étude scientique, il importe de realiser des observations minutieuses. Pour les tests de toxicité chronique, des examens clinique soigneux au moins une fois par jour doivent etres realisés, en plus des observations supplémentaires qui prennent les mesures appropriées pour réduire la perte en animaux de l'étude, par exemple l'autopsie

ou la réfrigération des animaux trouvés morts et par isolement ou sacrifice des animaux affaiblis ou moribonds et minimiser aussi les pertes dues aux maladies, à l'autolyse ou au cannibalisme (Buenz, 2006).

Toutes manifestations cliniques, surtout celles neurologiques, oculaires, ainsi que la mortalité doivent être relevées et enregistrées pour tous les animaux. De la meme manière, la date d'apparition et l'évolution des signes toxiques, y compris les tumeurs suspectées doivent être notées. Chaque animal doit etre pesé au moins une fois par semaine durant toute la période d'essai. Alors que la prise de nourriture sera fixée hebdomadairement, sauf si l'état de santé ou l'évolution du poids des annimaux nécessitent d'autres dispositions.

D'après une étude realisée par Mokennon et al (2017) sur l'évaluation de la toxicité subchronique d'Albizia Gummifera (qui contient les deux molécules toxique ATR et CATR), tous les rats mâles et femelles qui avaient pendant 90 jours reçu par voie orale des doses répétées de 125 mg / kg et de 250 mg / kg de poids corporel n'ont présenté aucune modification notable de leur comportement général par rapport au groupe témoin.

Le poids corporel des groupes traités et témoins augmentait avec la durée et aucune différence significative ($p = 0,05$) n'a été observée entre les valeurs moyennes du poids vif des rats mâles et femelles traités avec 125 mg / kg de poids corporel et des mâles traités avec 250 mg / kg. poids corporel par rapport à leurs contrôles. Cependant, une différence significative a été observée dans le poids corporel moyen des rats femelles traitées avec 250 mg / kg de poids corporel, car il a diminué à la 9e semaine de 8,7% et a encore diminué de 12,8% à la 10e semaine par rapport au groupe témoin (Mokennon et al, 2017).

II.2. Examen Hématologique

L'examen hématologique doit être réalisé chaque mois ainsi qu'à la fin de l'étude et ce sur des échantillons de sang prélevés sur les rats de l'étude. Les prélèvements seront réalisés sur les mêmes rats à chaque fois, et si les observations cliniques indiquent une détérioration de la santé des animaux au cours de l'étude, il faut établir la formule sanguine des animaux concernés.

Cependant des études réalisées par Mokennon et al en 2017, ont montré que l'extrait de graine d'albizia gummifera induit un changement significatif des parametres hématologiques des rats ($p = 0,05$) qui ont reçu 250 mg / kg du poids corporel.

En outre, l'extrait de graine a affecté le poids corporel à 250 mg / kg, Les paramètres tels que WBC, RBC et PLT ont augmenté chez les rats femelles par rapport à leurs témoins, mais de façon non significative. D'autre part, les paramètres hématologiques tels que l'OE et le MCV ont aussi diminué mais les valeurs n'étaient toujours pas significatives.

II.3. Examen Biochimique

Tout comme les l'étude des paramètres hematologique, des échantillons de sang doivent etre prélevés chaque mois et au terme de l'étude, en vue de déterminer la chimie clinique de tous les rats au niveau de tous les lots. De plus, un échantillon de sang doit être prélevé au démarage de l'expérimentation. Ensuite le plasma est préparé à partir des échantillons et les analyses suivantes sont effectuées :

- La teneur totale en protéines ;
- La concentration en albumine ;
- L'examen des fonctions hépatiques
- Le métabolisme des hydrates de carbone;
- L'examen des fonctions rénales.

Cependant l'étude réalisée par Mokennon et al (2017), rapporte qu'à l'exception de l'urée à 250 mg / kg de poids corporel tous les paramètres mesurés n'étaient pas significativement différents entre les groupes de contrôle et et ceux traités par Albizia gummifera

II.4. Examen anatomo-pathologique

Il faut accorder toute l'attention nécessaire à ces observations qui doivent être décrites et rapportées en détail, y compris le diagnostic, vu la grande importance et l'efficacité de cet axamen en terme d'apprésiation et interpretation des mécanismes de toxicité.

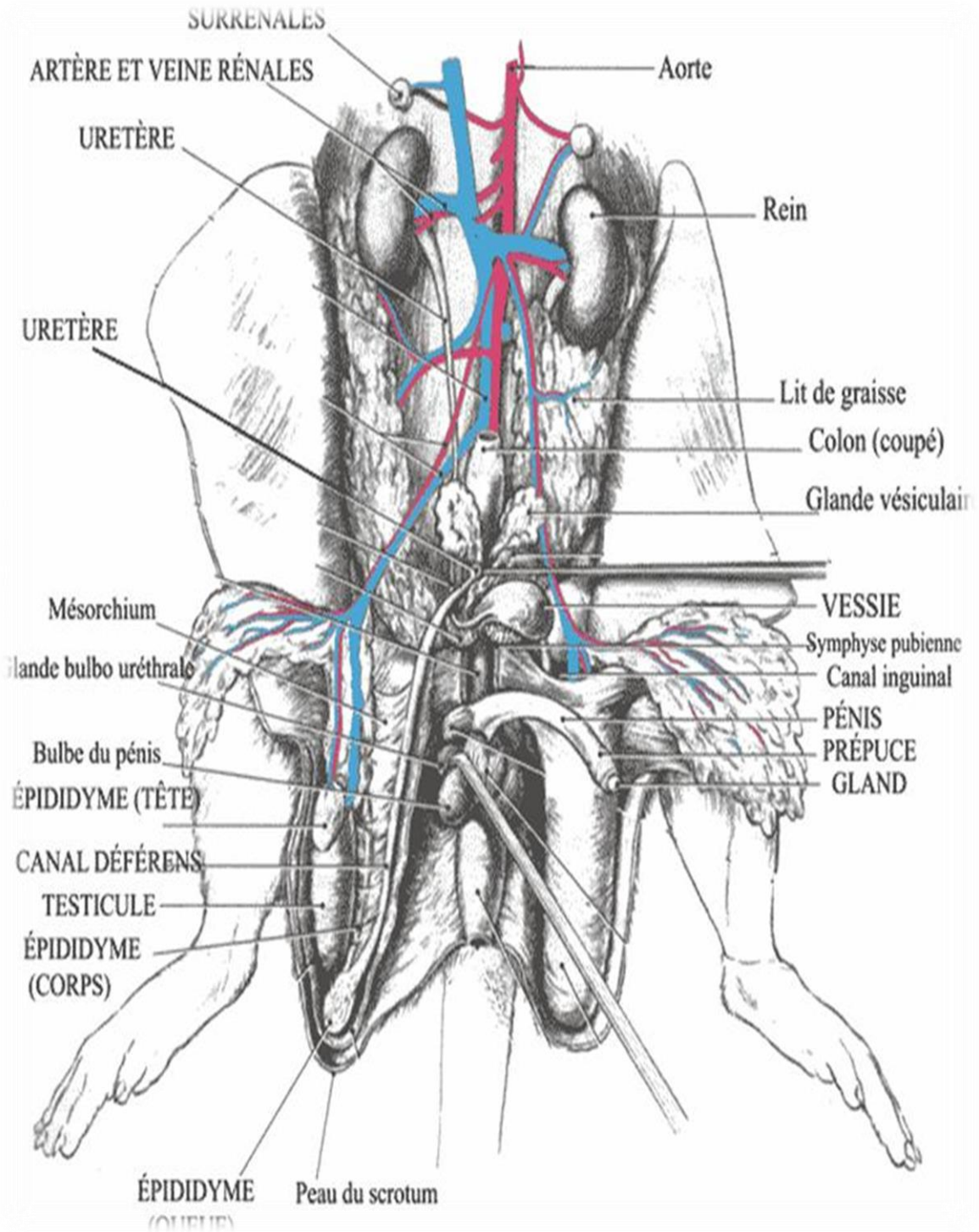


Figure 21 : Anatomie du rats 1

L'autopsie générale des annimaux téstés doit être faite sous la direction d'un spécialiste en anatomo-pathologie des animaux de laboratoire. Toutes les lésions visibles, les tumeurs ou les lésions suspectées d'être des tumeurs, qui sont visibles à l'œil nu, doivent être conservées. On doit essayer d'établir une liaison ou corrélation entre les observations macroscopiques et les résultats microscopiques.

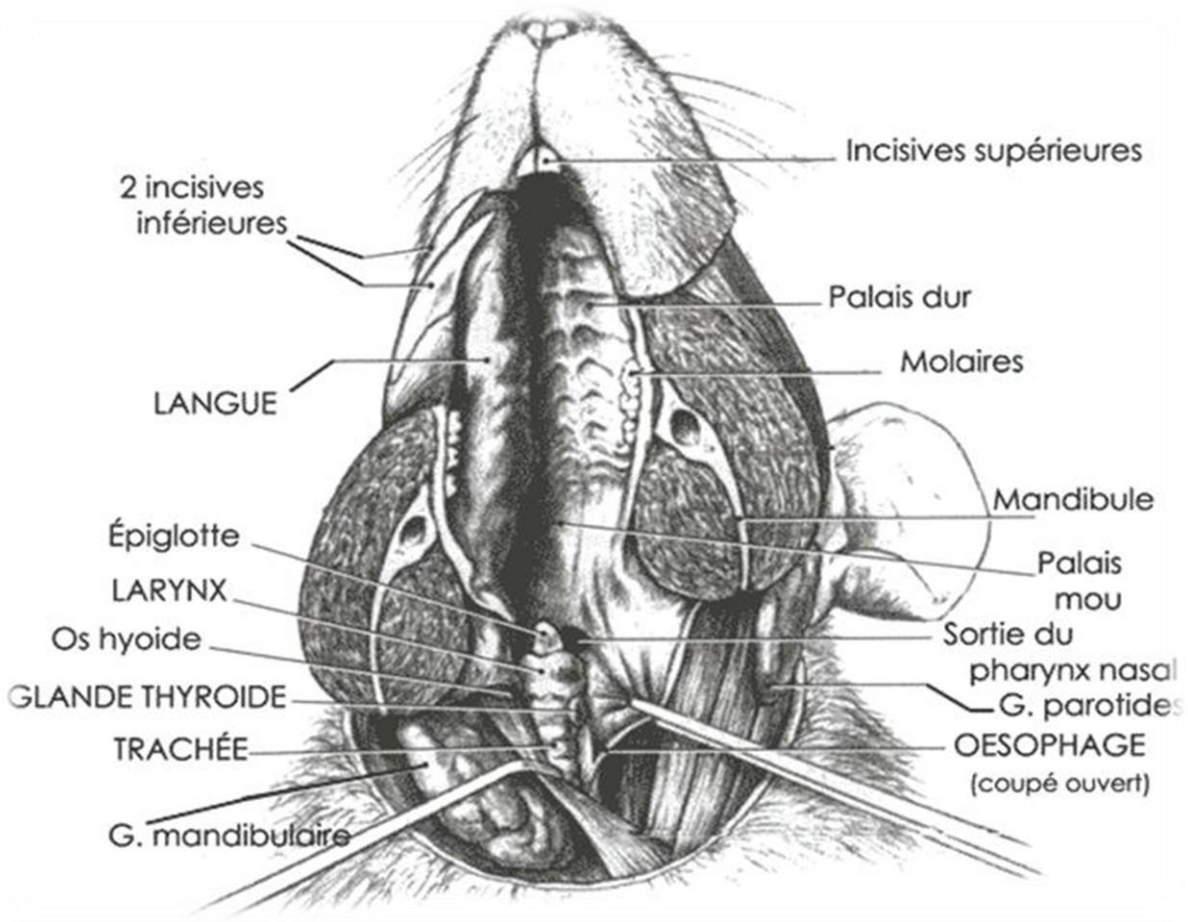


Figure 22 : Anatomie du rats 2

Tous les organes et tissus prélevés de tous les animaux doivent être conservés pour passer à l'examen microscopique.

II.5. Histopathologie

Toutes les lésions visibles à l'œil nu (tumeurs et autres) doivent subir un examen microscopique. On respectant les procédures suivantes :

(a) Examen microscopique de tous les organes et tissus prélevés et conservés, avec une description complète et detaillées de toutes les lésions notées.

(b) reconnaissance de la fréquence des lésions qui apparaissent habituellement chez les animaux de la meme souche (dans des conditions expérimentales semilaires) pour pouvoir évaluer l'importance des changements notés chez les animaux testés au niveau de l'étude.

Dans une étude realisé par Mokennon et al en 2017, des sections de foie colorées au hématoxyline et à l'éosine ont été examinées afin d'évaluer l'effet de l'administration orale subchronique sur 90 jours d'extrait de graine éthanolique de Albizia gummifera sur ces tissu. L'examen au microscope optique des coupes de foie recevant 125 mg / kg a montré une inflammation et des congestions de sang dans la veine centrale, alors que le groupe recevant 250 mg / kg d'A gummifera a également montré des congestions de sang dans la veine centrale et dans les sinusoïdes, une nécrose cellulaire focale et une pycnose (Figure 22).

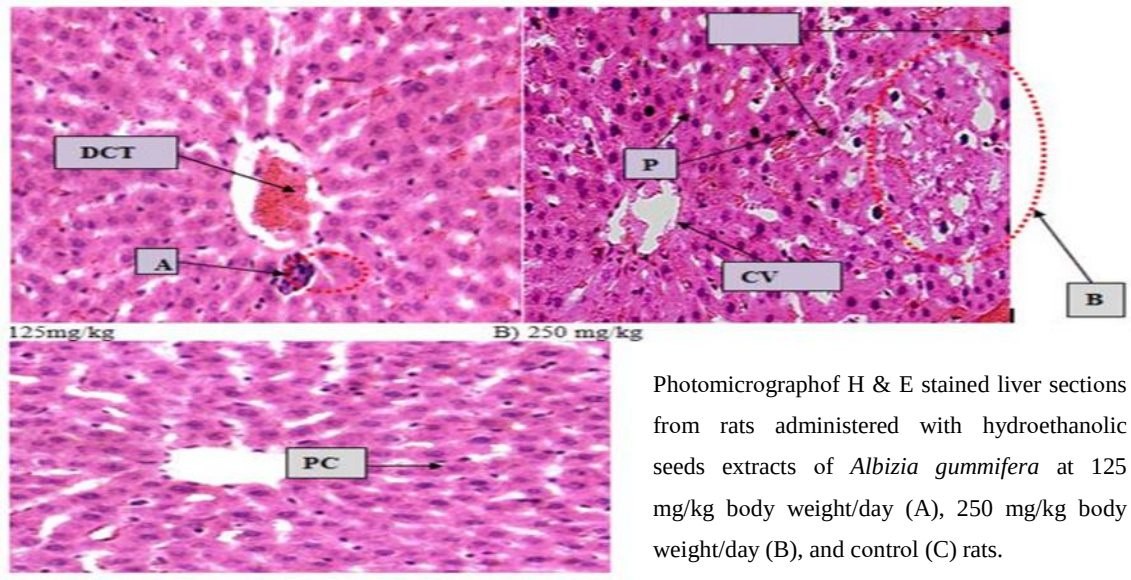


Figure 23 : Photo micrograph des sections de fois des rats traités par Albizia gummifera (Mokennon et al, 2017)

Selon Mokennon et al en 2017, différents changements ont été observés dans les coupes de rat traités à l'extrait hydroéthanolique d'A. *gummifera*, notamment : inflammations autour de la veine centrale (I) et congestion du sang dans la veine centrale (BCCV) chez le rat traité avec 125 mg / kg de poids corporel / jour (A) ; nécrose cellulaire focale (N), congestion de sang dans la veine centrale (BCCV). Alors que chez les rats recevant 250 mg / k de poids corporel / jour (B) des Congestion du sang dans les sinusoïdes (BCS) et la pycnose (P) ont été obsérvé ; Bien qu'il n'y ait pas eu de modifications histopathologiques visibles dans les sections des rats témoins (C).

Au niveau rénal, l'examen histologique chez les rats ayant reçu l'extrait de graines d'A. Gummifera à 125 mg / a montré une congestion sanguine péritubulaire (Figure 23) et également des congestions, une atrophie des glomérules et la formation de protéines focales

dans l'interstitium rénal (Figure 23). Chez les rats ayant reçu 250 mg / kg de poids corporel (Mokennon et al, 2017).

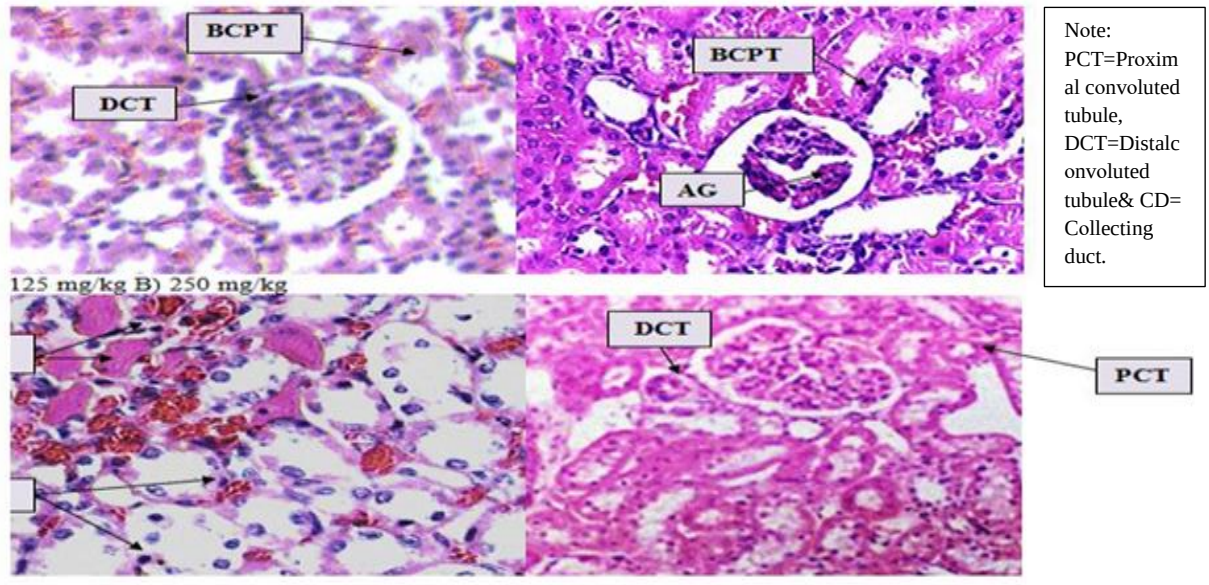


Figure 24 : Photomicrograph des sections de rein des rats ayant reçu des axtraits hydroethanolic d'*A. gummifera à* 125mg/kg /j (A), 250 mg/kg/j (B&C), et control (D) rats. (Mokennon et al. 2017)

En plus de différents changements observés sur les coupes renal des rats: congestion de sang dans les zones péritubulaires (BCPT) chez le rat ayant reçu 125 mg / kg de poids corporel / jour (A); congestion du sang dans les zones péritubulaires (BCPT), atrophie des glomérules (AG) et protéines introduites dans l'interstitial rénal (PC) chez des rats recevant 250 mg / k de poids corporel / jour (B et C); Bien qu'il n'y ait pas eu de modifications histopathologiques visibles dans les sections du rat contrôle (D). Tous les changements ont été observés sous des grossissements de 2000.

Généralités sur les activités pharmacologiques réalisées in vivo

I. Données générales sur le comportement et les psychotropes

I.1. Psychotropes naturels

Les sédatifs à base d'extraits de plante constituent une réelle révolution et alternative par leurs effet calmant et tranquillisant efficace. Dépourvus de tout effets secondaires ou indésirabe, ils sont tout à fait adaptés pour soulager les troubles mineurs du sommeil d'origine nerveuse. Sachant aussi que leur prise, même prolongée, ne provoque pas d'accoutumance (Courvoisier et al, 1957).

Cependant, la phytothérapie traditionnelle attribue à plusieurs plantes des vertus médicinales (calmant par exemple) sans que l'effet ne soit réellement établi. De nombreuses recherches scientifiques menées ces dernières années tendent à améliorer la connaissance sur le potentiel réelle de ces plantes ainsi que leurs mécanismes d'actions (Courvoisier et al, 1957).

L'effet principal d'une plante sédatif peut être déterminé par étude des modèles comportementaux, chez les animaux. Le principe est d'observer le comportement d'un animal, après avoir reçut la substance à tester, face à différentes situations ainsi que son comportement général (Courvoisier et al, 1957).

I.2. Psychotropes artificielles

Les psychotropes sont définis comme étant l'ensemble des substances chimiques d'origine (naturelle ou artificielle) qui possède un tropisme psychologique, c'est-à-dire qui sont capable d'inflencer et modifier l'activité mentale sans préjuger le type de cette modification. Alors que les médicaments psychotropes sont ceux qui agissent de façon sélective sur certaines fonctions du système nerveux central (SNC) surtout sur les structures qui régularisent la vie psychique (humeur, affectivité, perception, conscience et comportement) (Courvoisier et al, 1957).

Selon la classification établie par (Jean Delay et al, 1957), les psychotropes peuvent etre classés en 3 groupes, selon la nature de l'effet exerçé par la substance : dépresseur (leptique),

activateur (analeptique) ou déviateur (dysleptique). Pour chaque groupe les substances ont des effets sur l'état affectif des sujets (l'état intellectuel, la vigilance, la capacité qu'il a à faire les choses).

I.3. Comportement et modèle comportemental

Le comportement peut etre défini comme étant l'ensemble des manifestations motrices d'un individu observables à un moment donné et dans un lieu particulier (Campan et Scapini, 2002). Alors q'un modèle expérimental est définit comme étant une représentation simplifiée d'un processus biologique qui ne peut pas être étudié chez l'etre Hummain soit pour des raisons techniques, économiques ou éthiques.

Un modèle animal de comportement vise principalement à reproduire un désordre, des symptômes ou même un syndrome (Campan et Scapini, 2002). Compte à la conception de ce dernier, plusieurs manipulations sont réalisées, dont des lésions cérébrales, des élevages sélectifs ainsi que l'application d'une diversité de facteurs qui peuvent être impliqués dans l'étiologie du désordre étudié. Ces manipulations conduisent à l'obtention d'un état comportemental utilisé comme outil d'étudier des différents aspects du désordre modélisé : son étiologie, son éventuel traitement et ses bases physiologiques (Campan et Scapini, 2002). Mais expérimentalement, il n'y a pas de méthodes précise pour la classification des psychotropes, d'où la nécessité de faire appel à des tests pharmacologiques, àfin de définir le profil psychopharmacologique des médicaments (effets sédatif, tranquillisant, anxiolytique, et hypnotique) (Cohen et jacquot, 2008 ; Beaulieu, 2006). Pour cela on distingue les tests comportementaux suivants **:** test de la cheminée, test de la traction, test de la planche à trous.

II. Généralités sur l'inflammation et les anti-inflammatoires

II.1. Inflammation

L'inflammation est un mécanisme de défense des tissus vivants, vascularisés, à une agression d'origine physique, chimique ou biologique (figure 1). Elle a pour objectif de reconnaître, détruire et éliminer toutes les substances qui lui sont étrangères àfin de maintenir son intégrité (Dieng, 1993).

Autrement dit c'est un ensemble de phénomènes réactionnels se déclenchant au point agréssé par un agent pathogène. Elle se traduit généralement par quatre symptômes cardinaux : chaleur, Rougeur, douleur, et lésion fonctionnelle (Schorderet et al, 1998).

La détection de l'agression par l'organisme entraine de nombreux systèmes biologiques qui interviennent à des moments et des degrés différents :

- Réactions biochimiques,
- Activation cellulaire,
- Coagulation,
- Fibrinolyse

Dont l'objectif étant d'éliminer la substance étrangère (Lechat et al, 1990 ; Dieng, 1993).

D'autre part, le but de l'inflammation est de mobiliser le système immunitaire pour éliminer l'agent pathogène et réparer les lésions tissulaires. Comme elle peut être néfaste dans le cas ou l'agent pathogène persiste, ou encore lorseque la régulations du processus inflammatoire est anormales.

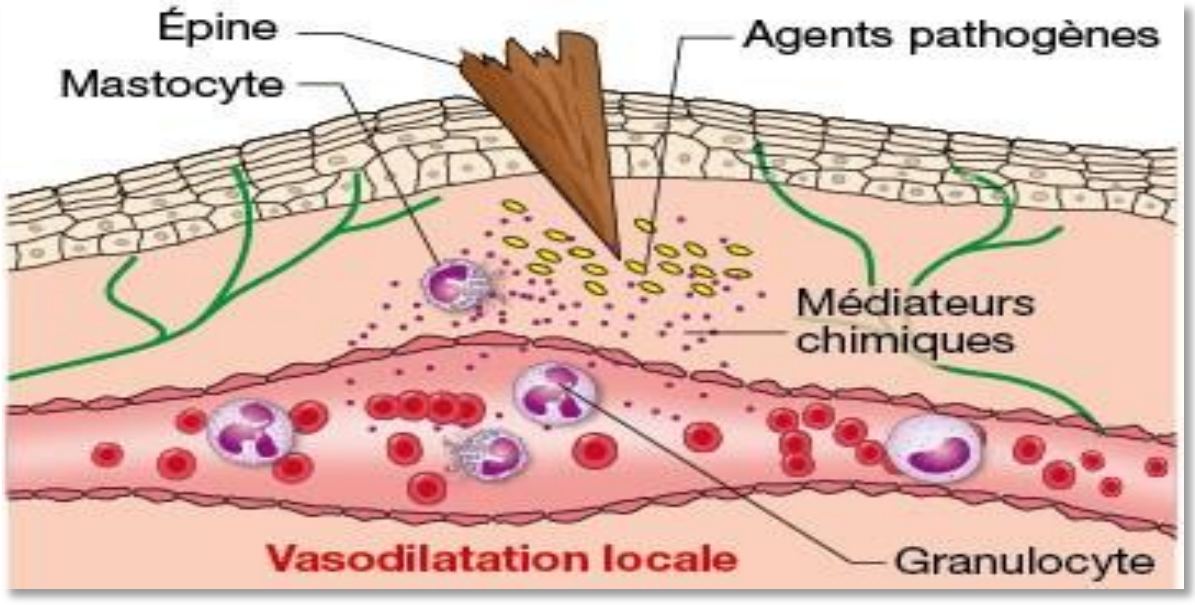


Figure 25 : Les principales étapes de la réaction inflammatoire (http://www.biologymad.com/Immunology/inflammation.jpg)**.**

II.2. Causes de l'inflammation

Les causes de l'inflammation déterminent les lésions cellulaires et tissulaires qui vont déclencher le processus inflammatoir. Ces causes sont généralement d'ordre exogènes, endogènes ou infectieux,

- **Causes exogènes** :

- Agents physiques : traumatisme, piqûre, radiations, froid, électricité, chaleur, coupure
- Agents biologiques : microorganismes pathogènes (virus, bactérie, parasite, champignon) et d'autres agents comme le pollen et les toxines. (Dieng, 1993 ; Bayes, 1997).
- Agents chimiques : acide, substances minérales diverses.. ;

- **Causes endogènes :**

- Causent trophiques : elles sont en rapport avec un défaut de vascularisation ;
- Conflits immunitaires : rencontrés dans les maladies inflammatoires chroniques (Revillard, 2001).

Le même agent pathogène peut entrainer des réactions inflammatoires différentes selon l'hôte d'où l'importance des facteurs liés à cette dernière (en particulier l'état de la défense immunitaires).

Cependant l'inflammation peut avoir deux formes : aigue et chronique :

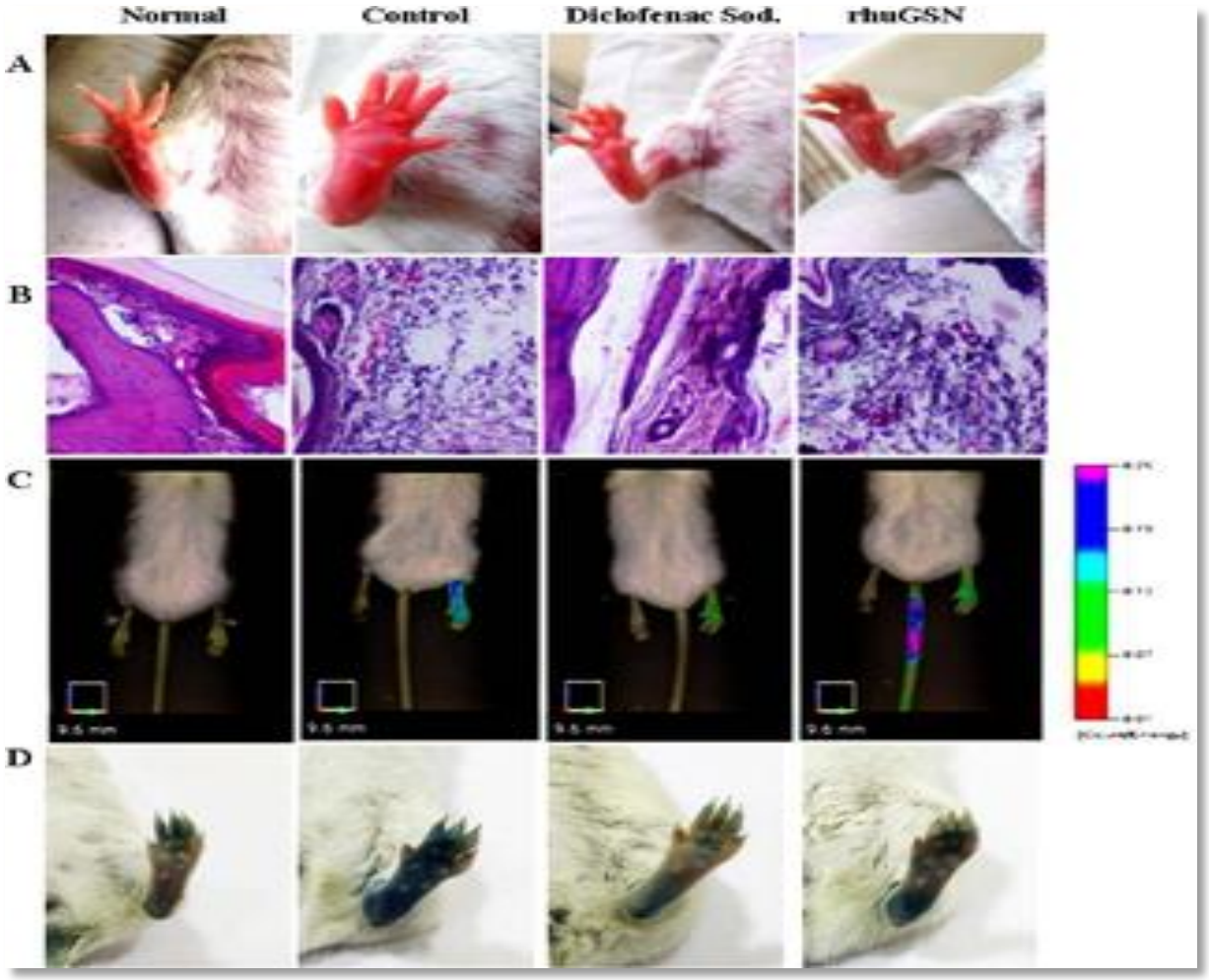
II.3. Inflammation chronique

L'inflammation chronique est une inflammation n'ayant aucune tendance à la guérison spontanée et qui évolue en s'aggravant pendant plusieurs mois ou plusieurs années. Cette inflammation est caractérisée par la présence de lymphocytes, macrophages, et plasmocytes dans les tissus (Meyer et al, 1994). On peut distinguer deux types de conditions de survenue des inflammations chroniques :

- les inflammations aiguës qui évoluent vers une inflammations prolongées sub-aiguës et chroniques lorsque l'agent pathogène persiste dans les tissusa ou lorsque cette

inflammation aiguë récidive de façon répétée dans le même organe en entraînant à chaque fois des destructions tissulaires de moins en moins réparable.

- Lorseque la phase aiguë vasculo-exsudative est passée inaperçue vu qu'elle est brève ou des fois asymptomatique (maladies auto-immunes).



- **Figure 26 :** Test d'inflammation chez le rat

II.4. Inflammation aigue

L'inflammation aiguë est une réponse immédiate à face à une agression de l'organisme. Elle est caractérisée par sa durée limitée, un rétablissemen rapide de l'homéostasie tissulaire, et une installation souvent brutale. Cependant Les inflammations aiguës guérissent généralement spontanément ou avec un traitement, mais risquent de laisser des séquelles si la destruction tissulaire est grave.

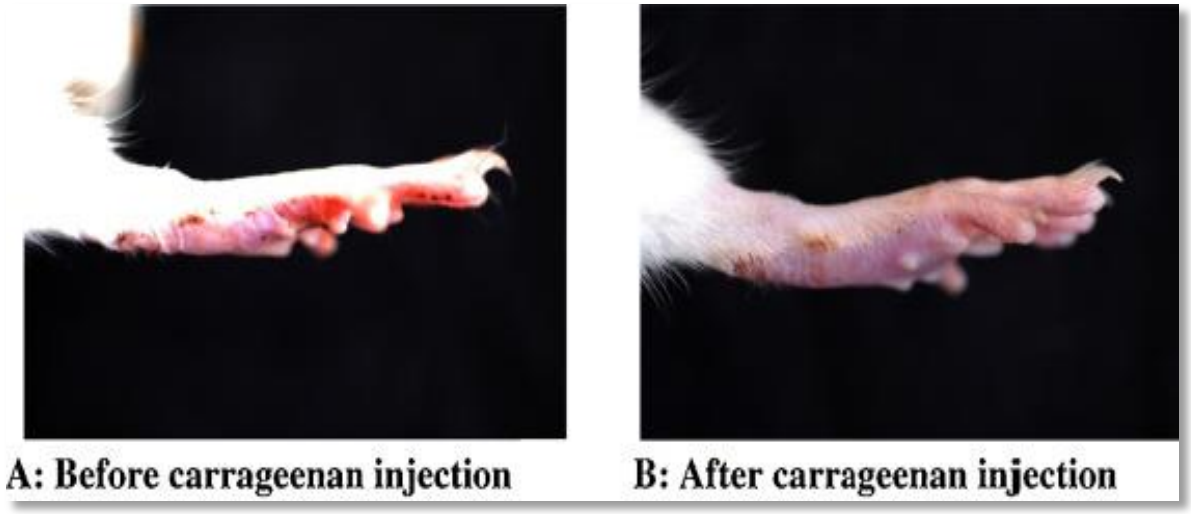


Figure 27 : Inflammation de patte de rats par administration de carragenine

La réaction inflammatoire est un processus dynamique qui se déroule en plusieurs étapes successives : la réaction vasculaire, la réaction cellulaire, la détersion, et finalement la phase de réparation et cicatrisation.

- **La phase vasculo-exsudative:**

Cette phase se traduit cliniquement par une vasodilatation artérielle entraînant un érythème, tuméfaction, douleur et un dégagement de chaleur locale, comme elle cause une altération des micros capillaires par relâchement des cytokines et des substances vasoactives (Cousins et Poweer, 1999). La phase vasculo-exsudative comporte trois phénomènes : une congestion active, un œdème inflammatoire, une diapédèse leucocytaire :

- Congestion active : Il s'agit d'une vasodilatation artériolaire puis capillaire dans la zone atteinte. Localement, il en résulte une augmentation de l'apport sanguin et un ralentissement du courant circulatoire. La congestion est déclenchée rapidement par un mécanisme nerveux (nerfs vasomoteurs) et l'action de médiateurs chimiques.
- Œdème inflammatoire : il résulte du passage de l'exsudat (constitué d'eau et de protéines plasmatiques) dans le tissu conjonctif interstitiel ou les cavités séreuses. cliniquement on assiste à un gonflement des tissus qui, en comprimant des terminaisons nerveuses, engendre une sensation de la douleur
- Diapédèse leucocytaire : il s'agit d'une traversée active des parois vasculaires du à la migration des leucocytes en dehors de la microcirculation et leur accumulation dans le foyer lésionnel,

- **La phase cellulaire**

La phase ou réaction cellulaire est caractérisée par la formation du granulome inflammatoire (tissu de granulation inflammatoire), suite à la migration extra vasculaire (diapédèse) des leucocytes et la libération de cytokines (Kidd and Urban, 2001). A ce stade certaines cellules vont se multiplier localement (cas des fibroblastes, lymphocytes, cellules endothéliales) et vont se transformer ou se différencier. Ainsi plusieurs'évènements au sein de la lésion inflammatoire entre en jeu : la phagocytose d'agents extérieurs, la captation et la présentation d'antigènes, la production de radicaux libres. Alors que les cytokines vont agire au niveau systémique pour augmenter la défense de l'hôte sous forme de fièvre (Kidd and Urban, 2001).

- **La phase de détersion**

La détersion peut être comparée à un nettoyage du foyer lésionnel. Elle correspond à l'élimination des tissus nécrosés, des agents pathogènes ainsi que l'exsudat. La détersion prépare obligatoirement la phase terminale de réparation et régénération (cicatrisation). Si la phase de détersion est incomplète, l'inflammation aiguë risque d'évoluer en inflammation chronique.

- **La phase de régénération**

Le processus de réparation ou régénération implique de nombreux facteurs de croissance et des interactions complexes entre les différentes cellules et matrice extra-cellulaire pour réguler les phénomenes de proliférations et biosynthèses cellulaires.Elle aboutit à une cicatrice si le tissu lésé ne peut régénérer ou lorsque la destruction tissulaire a été très importante ou prolongée, qui aboutit à un tissu conjonctif néoformé, grace à la synthèse de collagène, la multiplication cellulaire (fibroblastes) et la néogénèse vasculaire à partir des capillaires persistants ou localisés en périphérie du site. La surproduction de tissu conjonctif aucours de la cicatrisation aboutit à la formation de cicatrices hypertrophiques et de chéloïdes (Kidd and Urban, 2001 ; Meunier et al, 2004).

II.5. Cellules et médiateurs de l'inflammation

L'inflammation provoquent la production d'un grand nombre de médiateurs qui, directement ou indirectement, assurent la sensibilisation des fibres périphériques.

- **Cellules de l'inflammation**

La majorité des études réalisées sur le processus de l'inflammation, de l'adhérence des leucocytes et la transmigration, montrent que les neutrophiles représentent la grande majorité des leucocytes circulants et prédominants au niveau du site d'inflammation.

Au cours de l'inflammation, le leucocyte est activé par des chimiokines libérées par les cellules endothéliales et les autres cellules cutanées résidentes, ensuite il est dirigé jusqu'au site d'inflammation par le gradient de chimiokines. Il faute noté aussi que le profil des chimiokines sécrétées déterminera par la suite le type des cellules qui vont agir au niveau du site de l'inflammation.

Chez l'homme, des prélèvements de l'infiltrat cellulaire généré montrent que les neutrophiles sont les premiers leucocytes à arriver sur le site de l'inflammation, dès 3 heures (Kubeczka**,** et al, 1982). Ensuite les phagocytes mononucléaires dérivés de monocytes du sang deviennent le type cellulaire le plus abondant. Après c'est les éosinophiles et les basophiles qui deviennent préférentiellement recrutés au niveau du site d'inflammation allergique (Bochner and Schleimer, 1994).

Le principal rôle des leucocytes etant de phagocyter les micro-organismes et les particules non organiques étrangères. Cependant, les neutrophiles et les éosinophiles peuvent phagocyter des particules et disposent de granules capables de tuer les micro-organismes et les parasites ingérées. Compte aux basophiles, ils possèdent des granules avec des médiateurs inflammatoires notamment l'histamine (Bos, 2004).

Il faut noter aussi que les neutrophiles, les basophiles et les éosinophiles sont capables de synthétiser des leucotriènes à partir de l'acide arachidonique et du PAF (Henderson, 1991). Pa conséquent, le recrutement de leucocytes et des granulocytes amplifie la réponse inflammatoire, permettant ainsi une activation autocrine et le recrutement d'autres leucocytes sur le site de l'inflammation, et lorseque l'infiltrat cellulaire est associé à l'exsudation de fluide, un œdème et une destruction tissulaire générés au niveau du site d'application du xénobiotique.

- **Médiateurs de l'inflammation**

Les cellules présentes dans le tissu agréssé ou lésé, telles que les phagocytes mononucléés résidents et les mastocytes, sont les premières cellules activées en cas d'inflammation. En réponse à cette activation, y a libération de l'histamine, des cytokines pro-inflammatoires et d'autres composés actifs només généralement les médiateurs (médiateurs cellulaires / médiateurs plasmatique) de l'inflammation. Les conséquences fonctionnelles de cette activation tant l'élimination du pathogène ou la réparation de la lésion résultante.

- **Médiateurs cellulaires :**

Il s'agit principalement de sérotonine et histamine :

L'histamine est une amine vasoactive, libérée à partir des mastocytes et basophiles lors de la dégranulation des cellules phagocytaires et. Elle est retrouvée au niveau de l'épiderme de la muqueuse gastro-intestinale et du système nerveux. Elle a des propriétés chimiotactiques pour les phagocytes (Capron, 1998). L'histamine est tesponsable de l'augmentation de la perméabilité vasculaire, et permet localement la contraction des muscles lisses. Elle agit aussi au niveau du système nerveux et provoque la sensation de douleur.

Compte à la sérotonine, elle est stockée dans les plaquettes sanguines et dans les cellules chromaffines de la muqueuse intestinale libérée, et stimule les fibres lisses vasculaires et la disjonction des cellules endothéliales (Miossec, 2003).

Conceranant les prostaglandines et les leucotriènes ils interviennent dans les processus inflammatoires aigus comme chroniques et ils sont formés à partir de l'acide arachidonique.

Alors que les leucotriènes sont aussi responsable de l'augmentation de la perméabilité capillaire et exercent une chimio-attractivité sur les polynucléaires. Les prostaglandines produisent à leurs tours une vasodilatation locale, qui favorisent l'œdème comme ils dépriment certains mécanismes immunitaires et potentialisent les effets algogènes de la bradykinine (Miossec, 2003).

Compte aux cytokines, ce sont des petites protéines sécrétées par les lymphocytes, les macrophages, les fibroblastes, les cellules endothéliales, les plaquettes et d'autres types cellulaires, telles que les cellules épithéliales en réponse à divers stimuli. Elles permettent la

communication entre les cellules immunes et l'orientation de la réponse en fonction de la nature du signal détecté au cour de l'inflammation (Miossec, 2003). Les cytokines pro-inflammatoires sont principalement l'interleukine IL-1, l'IL-2, l'IL-6, l'IL-8 et le tumor necrosis factor (TNF aplha).

En plus du PAF acether, phosphoglycéride issu de la dégradation des phospholipides membranaires, qui est considéré comme vasodilatateur et agent d'augmentation de la perméabilité capillaire (Cousins et Poweer, 1999).

- **Médiateurs plasmatiques :**

Pour les médiateurs plasmatiques on cite principalement : les Kinines plasmatiques, le système du complément et les facteurs de la coagulation. Les kinines plasmatiques sont des polypeptides plasmatiques, vasodilatatrices qui participent à l'augmentent la perméabilité vasculaire et favorisent la libération des prostaglandines. Les kinines la plus active est la bradykinine produite suite à l'activation du facteur de Hageman, suite à la rencontre du collagène après le déclenchement d'une lésion vasculaire. Ce peptide participe au déclenchement de la sensation douloureuse (tout comme l'histamine, les prostaglandines et la bradykinine) (Meyer et al, 1994).

Alors que le système du complément entraîne la fixation sur la particule cible de C3 responsable de l'opsonisation et de C5, C6, C7 et C8 qui sont responsables de la lyse avec libération de fragments peptidiques, les anaphylatoxines, ce qui provoque une inflammation locale (Meyer et al, 1994).

Tandi que les facteurs de la coagulation sont des fibrines qui sédimentent au niveau du site de l'inflammation à la phase aiguë est le résultat de l'activation de la fibrinogénèse (Miossec, 2003).

II.6. Anti-inflammatoires

Le processus de défense de l'organisme peut parfois évoluer de façon anormale et déclencher des maladies auxquelles on oppose des médicaments dits anti-inflammatoires pouvant être conventionnels ou traditionnels.

II.6.1. Anti-inflammatoires conventionnels

Les anti-inflammatoires sont nombreux et appartiennent à des familles de médicaments différents puisqu'on y trouve des analgésiques, des corticoïdes, des antihistaminiques (Yvan, 1997). Ils sont une classe de médicaments subdivisée en deux catégories.

- **Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)**

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) constituent une classe thérapeutique très utilisée en raison de leur forte activité antipyrétique, antalgique et anti-inflammatoire. Ils sont indiqués comme traitement contre de nombreus problème de santé, comme le ca des douleurs ostéomusculaires, des affections rhumatologiques, en traumatologie, dans les coliques néphrétiques … (Yvan, 1997).

Tous les anti-inflammatoires non stéroïdiens AINS ont le meme mode d'action et qui consiste à diminuer la production des prostaglandines par l'inhibition de la cyclooxygénase. Les AINS inhibent aussi la synthèse des prostaglandines et la formation de superoxydes par action sur la cyclooxygénase et la lipooxygénase. Ils sont également capable de stabiliser la membrane lysosomiale empêchant ainsi la libération des composés proinflammatoires et l'élaboration des kinines.

Les prostaglandines sont directement impliquées dans l'inflammation, la douleur et l'hyperthermie.

- **Anti-inflammatoires stéroïdiens(AIS)**

Les anti-inflammatoires stéroïdiens correspondent aux médicaments à base de corticoïdes. Ils sont représentés principalement par la cortisone et l'hydrocortisone. Les corticoïdes naturels sont constitués de deux hormones stéroïdiennes principales : l'aldostérone et le cortisol.

Le cortisol, appelé aussi hydrocortisone, présente des propriétés anti-inflammatoire, anti-diurétique, anti-natriurétique et kaliurétique.

Les corticoïdes augmentent aussi la synthese de la lipocortine, inhibant par conséquent la phospholipase A2 et la libération de l'acide arachidonique. Par contre ils diminuent la migration des polynucléaires, des monocytes-macrophages vers le site de l'inflammation ainsi

que la production de certains médiateurs tel que l'histamine, la sérotonine, la bradykinine, les cytokines, les ions superoxydes.

II.6.2. Anti-inflammatoires traditionnels

Les plantes médicinales, ont de nombreux effets positifs sur la santé. Utilisé depuis longtemps en tradition, ces plantes affichent entre autres vertus, des propriétés anti-inflammatoires que les chercheurs comparent à celles de l'aspirine ou de la cortisone. Ils sont donc indiqué pour soulager de nombreux cas d'inflammations : rhumatisme, tendinite, névralgie, sciatique, arthrite. Aujourd'hui c'est un fait reconnu et prouvé que les substances anti-inflammatoires d'origine végétale présentent un intérêt croissant vu qu'elles disposent de plusieurs avantages par rapport aux anti-inflammatoires classiques, et qu'elles sont dépourvus d'effets secondaires (Santangelo et al, 2007).

Pour les substances anti inflammatoire d'origine végétales sont présumés agir en bloquant les voies de la cyclooxygénase et la lipooxygénase ainsi que par d'autres mécanismes. Comme ils pouvaient agir (grace aux polyphénols) sur les activités enzymatiques du métabolisme de l'acide arachidonique (AA) : la phospholipase A2, cyclooxygénase et lipooxygénase (Santangelo et al, 2007).

L'inhibition de ces enzymes par les polyphénols réduit par consequant la production des médiateurs d'inflammation (Kim et al, 2004). Cependant, des études menées par Gallego en 2010 ont montré que des flavonoïdes comme la lutéoline ou l'apigénine inhibent la production de cytokines (comme IL-4, IL-5 et IL-13), que la quercétine inhibe la production de TNF-α par des macrophages stimulés au lipopolysaccharide (LPS), et que le kaempférol inhibe l'impact et la sécrétion du TNF-α, de l'IL-1β ou de l'IL-6 aux niveaux des mastocytes (Gonzalez-Gallego et al, 2010).

III. Généralités sur la douleur et les antalgiques

III.1. Définition de la douleur

La douleur est définie comme étant «une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable, associée à des lésions tissulaires réelles ou potentielles, ou décrite dans des termes évoquant une telle lésion» (International Association for the Study of Pain). La transmission douloureuse est un phénomène pathologique complexe impliquant des

mécanismes électrophysiologiques et neurochimiques, résultant de l'activation des récepteurs nociceptifs par une variété de stimuli douloureux.Et qui se déroule en 3 étapes (Besson, 1990):

- l'élaboration de l'influx au niveau du nocicepteur et sa transmission dans la fibre nerveuse périphérique (la perception douloureuse joue le rôle d'alarme).
- le relais et la modulation au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière (transmission de l'influx, blocage ou amplification, convergence des différents influx).
- l'intégration au niveau du cerveau qui le transforme en message conscient: sensation douloureuse avec une composante sensori-discriminative,

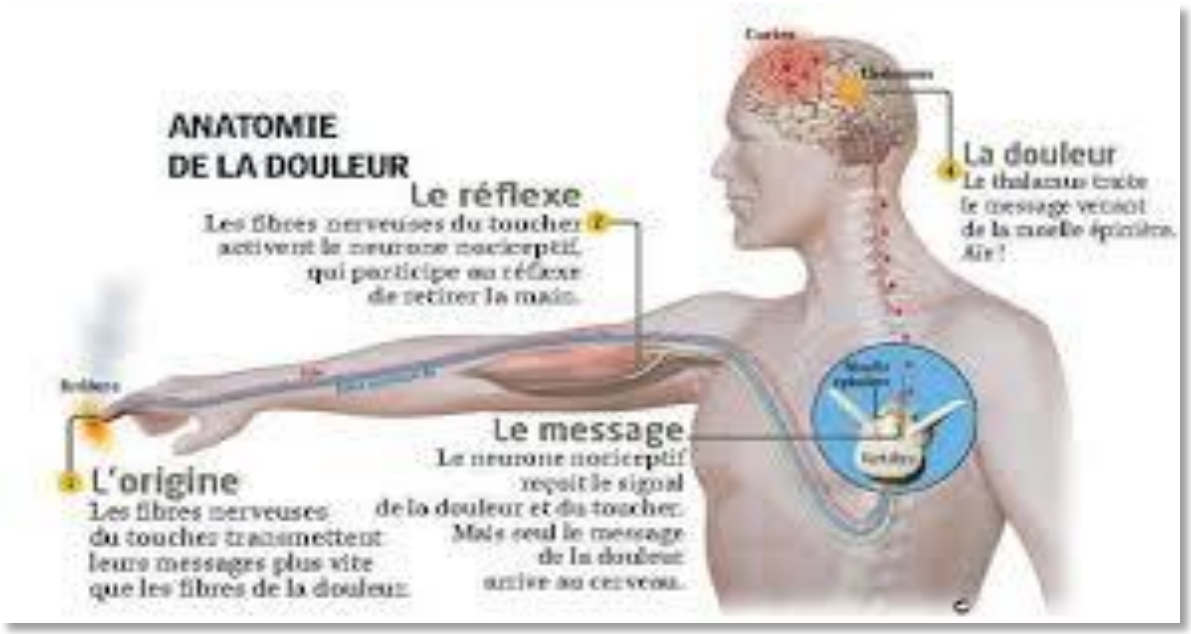


Figure 28 : Anatomie de la douleur

La douleur constitue le symptôme, ou le premier signal d'un phénomène pathologique. Par son intensité et sa durée, elle peut devenir, un vrai syndrome, affectant les grandes fonctions organiques et capable d'aggraver l'état du malade (Wright, 1973).

III.1.1. Types de douleur

Différents types de douleur peuvent être distingués selon la durée, l'intensité, l'origine et le mécanisme sous jacent (Guirmand et Le Bars, 1996). Sur le plan clinique, on parle de : douleur aigue qui se manifeste par une sensation désagréable, où le patient ressent une menace de son intégrité corporelle. Cela provoque des réactions musculaires et

comportementales. C'est une douleur alarme. Quand la lésion guérit (cicatrisation), le système nociceptif revient à son état initial.

Alors que la douleur chronique correspond à toute stimulation nociceptive qui se prolonge et dure au-delà de 6 mois, ce qui entraîne des modifications structurelles du système nerveux central, liées à la plasticité neuronale. En plus de la douleur psychogène (d'origine somatique, sans cause identifiable), la douleur nociceptive et la douleur neuropathique.

III.1.2. Mécanismes de la douleur

L'origine de la douleur est la stimulation des différents nocicepteurs correspondant aux extrémités des neurones sensoriels. Il est aussi important de rappeler que la douleur représente une modalité sensorielle complexe accompagnée de plusieurs aspects : affectifs et cognitifs et aussi associée à des réponses neurovégétatives; d'où la complexité des voies impliquées dans la transmission des messages nociceptifs (Almeida et al, 2004).

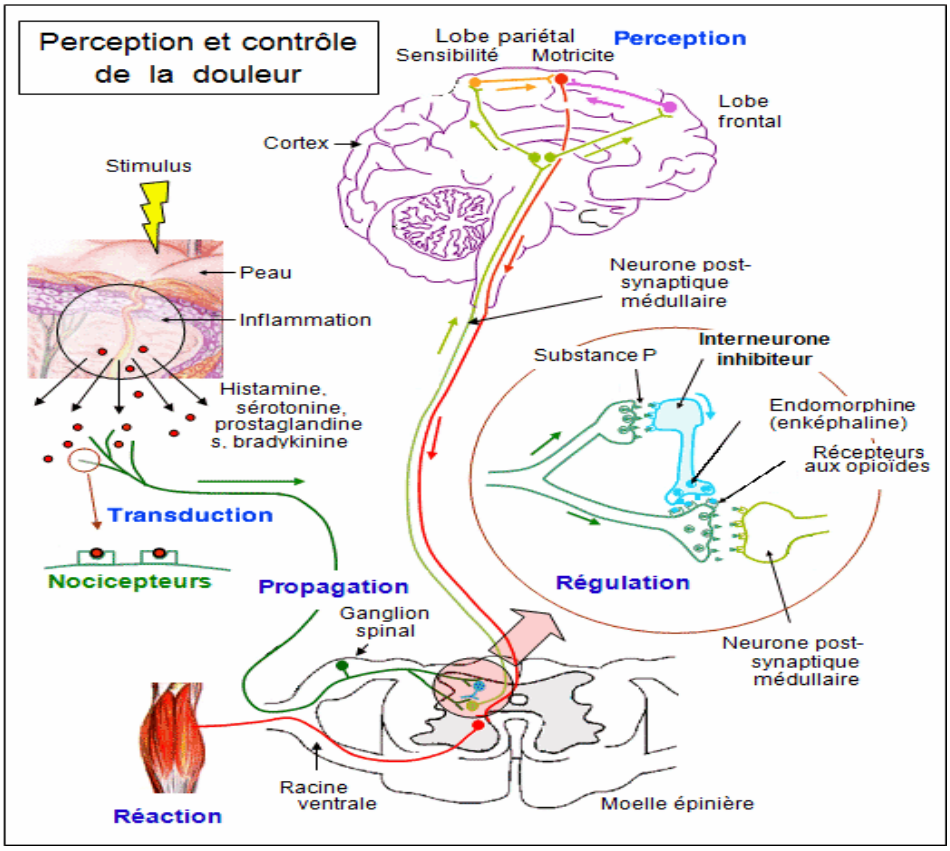


Figure 29 : Les différentes voies impliquées dans la transmission du message nociceptif (Meunier et al, 2004).

- **La périphérie**

Il faut savoir que le message nociceptif prend naissance à la périphérie. C'est le résultat de la mise en jeu de terminaisons libres amyéliniques constituant des arborisations plexiformes au niveau des tissus cutanés, musculaires, articulaires, ainsi qu'au niveau des parois des viscères.

Ce message est transmis par la suite à la moelle épinière par les fibres Aδ peu myélinisées et C amyéliniques des nerfs périphériques, et dont les corps cellulaires sont situés au niveau des ganglions spinaux. Les premières interviennent dans la douleur tu type rapide, les secondes intéressant dans la douleur lente. Chez l'Homme, les sensations douloureuses peuvent résulter d'une stimulation des fibres de gros diamètre Aa et Ce, après blocage des fibres fines Aδ et C (Le Vante et al, 1978 ; Purves et al, 2000).

- **La moelle épinière**

Récemment d'autres voies anatomiques sont décrites, l'accent a été mis sur l'implication des colonnes dorsales dans la transmission de la douleur viscérale.

Les neurones nociceptifs se projettent principalement vers trois sites : la formation réticulée, le mésencéphale et le thalamus latéral. Les fibres primaires rejoignent la moelle épinière par les racines postérieures et le relais médullaire se fait alors avec deux types de neurones :

- les neurones nociceptifs spécifiques ne véhiculent que des stimuli nociceptifs. Ils sont plus localisés dans les couches superficielles (I et II).
- Les neurones nociceptifs non spécifiques, appelés aussi, neurones convergents, peuvent véhiculer à la fois des stimuli nocifs ou non. Ils sont localisés dans les couches profondes (V) (Purves et al, 2000).

Ces neurones peuvent recevoir des influx véhiculés par des fibres fines d'origine cutanée, d'origine viscérale ou musculaire. La région spinale est particulièrement riche en récepteur P, considérée comme l'un des neurotransmetteurs essentiels de la sensibilité douloureuse au niveau médullaire (Purves et al, 2000).

La mise en évidence des fibres ascendantes se projetant à la fois aux niveaux réticulaire et thalamique est une preuve anatomique supplémentaire de l'importance et de la complémentarité de ces deux structures (Purves et al, 2000).

- **Les Voies ascendantes**

Du stimulus périphérique à la perception par le cerveau où s'élaborent différentes réponses comportementales, le circuit de la douleur emprunte plusieurs voies souvent redondantes. Ceci n'est pas surprenant vu l'importance de la douleur pour l'intégrité de l'organisme (Brooks et Tracey, 2005).

Ces multiples voies nociceptives commencent toutes de la même façon. Le signal douloureux en provenance par exemple de la peau voyage d'abord dans un nerf afférent formé des fibres nerveuses des neurones sensoriels en " T " situé dans un ganglion spinal (ou rachidien). Les fibres qui entrent ensuite dans la moelle épinière se divisent immédiatement et parcourent une courte distance de un ou deux segments de la moelle épinière vers le haut ou vers le bas. Elles forment ainsi ce qu'on appelle le faisceau de Lissauer avant d'aboutir dans la région externe de la corne dorsale (Brooks et Tracey, 2005).

La zone particulière de la corne dorsale où les différentes fibres (A-alpha, bêta, delta et C) vont faire synapse n'est pas aléatoire et correspond à une organisation spatiale très précise (Willis et Wislund, 1997).

On a donc trois grandes voies " extralemniscales " (par opposition à la voie lemniscale) véhiculant la douleur et apparues successivement au cours de l'évolution : la voie archispinothalamique, la voie paléospinothalamique et la voie néospinothalamique (Brooks et Tracey, 2005).

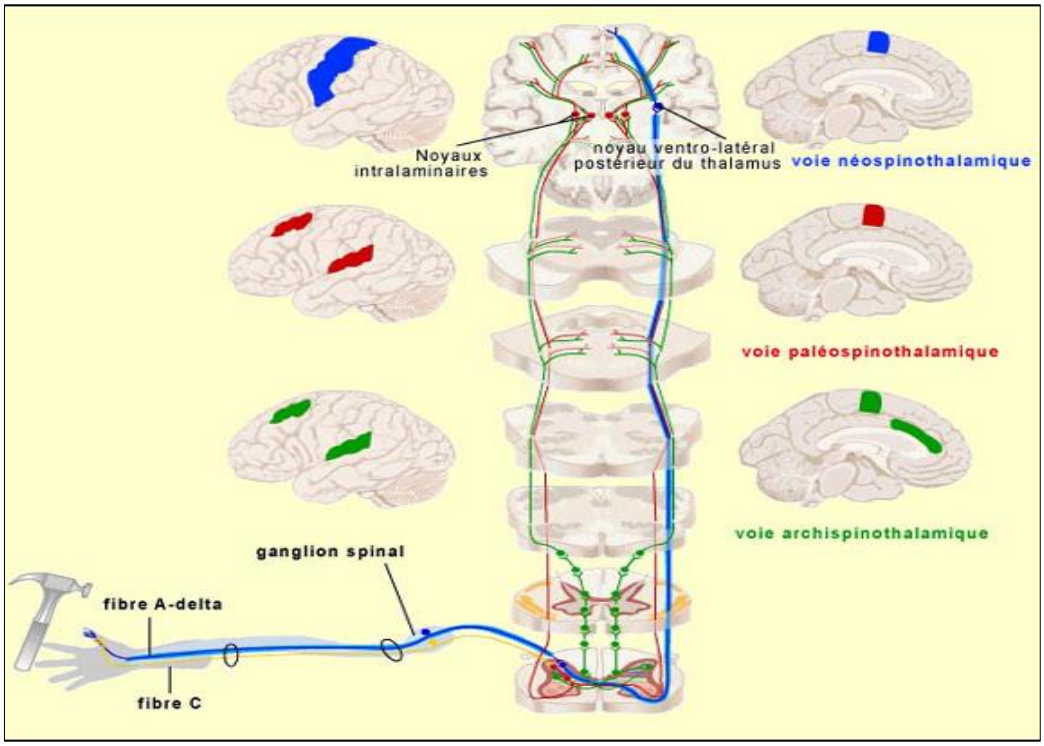


Figure 30 : la voie archispinothalamique, la voie paléospinothalamique et la voie néospinothalamique.

La voie archispinothalamique, le plus ancien chemin que peuvent emprunter les stimuli douloureux pour se rendre au cerveau, est une voie multisynaptique diffuse. Elle rejoint d'abord la région de la formation réticulée et de la substance grise périaqueducale, puis les noyaux intralaminaires du thalamus, en plus d'envoyer des collatérales à l'hypothalamus et à différents noyaux du système limbique, contribuant aux réactions viscérales, autonomes et émotionnelles à la douleur (Willis et Wislund, 1997).

Toujours selon une classification phylogénétique (qui n'est pas la seule possible), une voie dite paléospinothalamique composée de fibres de petit calibre à conduction lente est apparue ensuite. Cette voie, toujours sans organisation somatotopique, se projette largement sur la formation réticulée à tous les niveaux du tronc cérébral, contribuant ainsi à deux phénomènes importants. D'abord l'éveil général du système nerveux central par le système réticulaire ascendant. Ensuite, l'activation de certains noyaux du tronc cérébral qui sont à l'origine des voies descendantes du contrôle de la douleur (Willis et Wislund, 1997).

Les terminaisons de la voie paléospinothalamique se poursuivent également dans les noyaux intralaminaires du thalamus. Les neurones de ces derniers, les troisièmes des voies nociceptives afférentes (après les neurones des ganglions spinaux et ceux de la corne dorsale

de la moelle épinière) vont envoyer leurs projections à différentes régions corticales dont le cortex frontal, le cortex cingulaire et le cortex insulaire (Brooks et Tracey, 2005).

La voie nociceptive la plus récente d'un point de vue évolutif, n'existant que chez les mammifères supérieurs, est la voie néospinothalamique. C'est cette voie qu'emprunte la composante rapide de la douleur qui nous informe de la nature du stimulus douloureux (piqûre, brûlure, etc) et de sa localisation précise sur notre corps. C'est aussi cette voie, habituellement appelée simplement " spinothalamique ", qui véhicule la sensation de température (Brooks et Tracey, 2005).

La voie spinothalamique est formée d'axones des neurones spécifiques de la corne ventrale de la moelle épinière qui, contrairement aux voies archi et paléospinothalamiques, vont tous décusser, c'est-à-dire traverser du côté controlatéral de la moelle épinière. Les voies archi et paléospinothalamiques font en effet des connexions bilatérales dans les structures cérébrales qu'elles innervent parce que certaines collatérales ne décussent pas et montent directement du même côté (Brooks et Tracey, 2005).

Les axones de la voie spinothalamique poursuivent donc leur chemin du côté controlatéral en montant dans la partie antérieure et latérale de la moelle épinière, d'où son autre nom de " cordon ventro-latéral " (certains disent aussi " antéro-latéral "). Les axones pénètrent ensuite dans le bulbe rachidien où ils sont rejoints par les axones du noyau spinal du trijumeau véhiculant la sensibilité nociceptive de la face (voir encadré) ainsi que par la voie lemniscale médiale responsable du toucher (Brooks et Tracey, 2005).

La plupart des fibres du faisceau néospinothalamique issues des parties du corps situées sous le cou vont se terminer dans le noyau ventro-latéral postérieur du thalamus. Les neurones de ce noyau, troisième de la voie néospinothalamique, envoient quant à eux leur axone au cortex somatosensoriel primaire (Willis et Wislund, 1997).

- **Les voies descendant de la douleur**

Le cerveau ne constitue pas un récepteur passif de messages sensitifs, mais un véritable centre d'interprétation et de corrections constantes. Tout le monde sait par exemple qu'en se concentrant sur une douleur, ou au contraire en pensant à autre chose, on influence sa perception (Price, 2002).

Les voies nerveuses qui partent des centres supérieurs générant ces états psychologiques exercent leur influence sur des régions sous-corticales et sont donc forcément des voies descendantes (Aboufatima et al, 2002 ; Price, 2002).

Le contrôle inhibiteur diffus nociceptif " CIDN ", est connu depuis fort longtemps puisqu'il est à l'origine du phénomène du masquage d'une douleur par une autre douleur. On sait que dès l'antiquité, de pointes de métal brûlantes étaient appliquées pour soulager certaines douleurs (Guirimand et Le Bars, 1996). C'est vers la fin des années 1970 qu'on élabore formellement l'hypothèse qu'une stimulation nociceptive localisée peut amener une inhibition généralisée des afférences nociceptives situées ailleurs sur le corps. Lorsqu'on enregistre par exemple chez le rat l'activité électrique dans un neurone nociceptif de la moelle épinière qui répond à une stimulation douloureuse appliquée sur l'extrémité de d'une de ses pattes, on note que cette réponse nociceptive peut être inhibée par des stimulations douloureuses en de nombreux points ailleurs sur le corps. On note aussi que les stimuli non nociceptifs sont totalement inefficaces et que l'importance de l'inhibition est proportionnelle à l'intensité du stimulus douloureux appliqué et à sa durée (Aboufatima et al, 2002 ; Price, 2002).

Dans le modèle proposé par Le Bars et ses collègues, le CIDN faciliterait la détection des messages nociceptifs en réduisant l'activité des neurones convergents non concernés par cette douleur. Le plus grand contraste ainsi créé entre le champ du neurone activé et la mise sous silence des neurones non concernés permettrait de mieux identifier la localisation précise de cette douleur (Guirimand et Le Bars, 1996). Les afférences nociceptives ne font pas que transmettre le signal douloureux vers les centres supérieurs. Elles laissent également au passage des connexions dans le mésencéphale et le tronc cérébral, plus précisément dans la substance grise périaqueducale (SPGA) et dans le noyau raphé magnus (NRM). Ceux-ci vont ensuite retourner des efférences vers le bas en direction des différents niveaux de la moelle épinière et, avec l'aide des interneurones inhibiteurs, produire ainsi une inhibition diffuse (Guirimand et Le Bars, 1996).

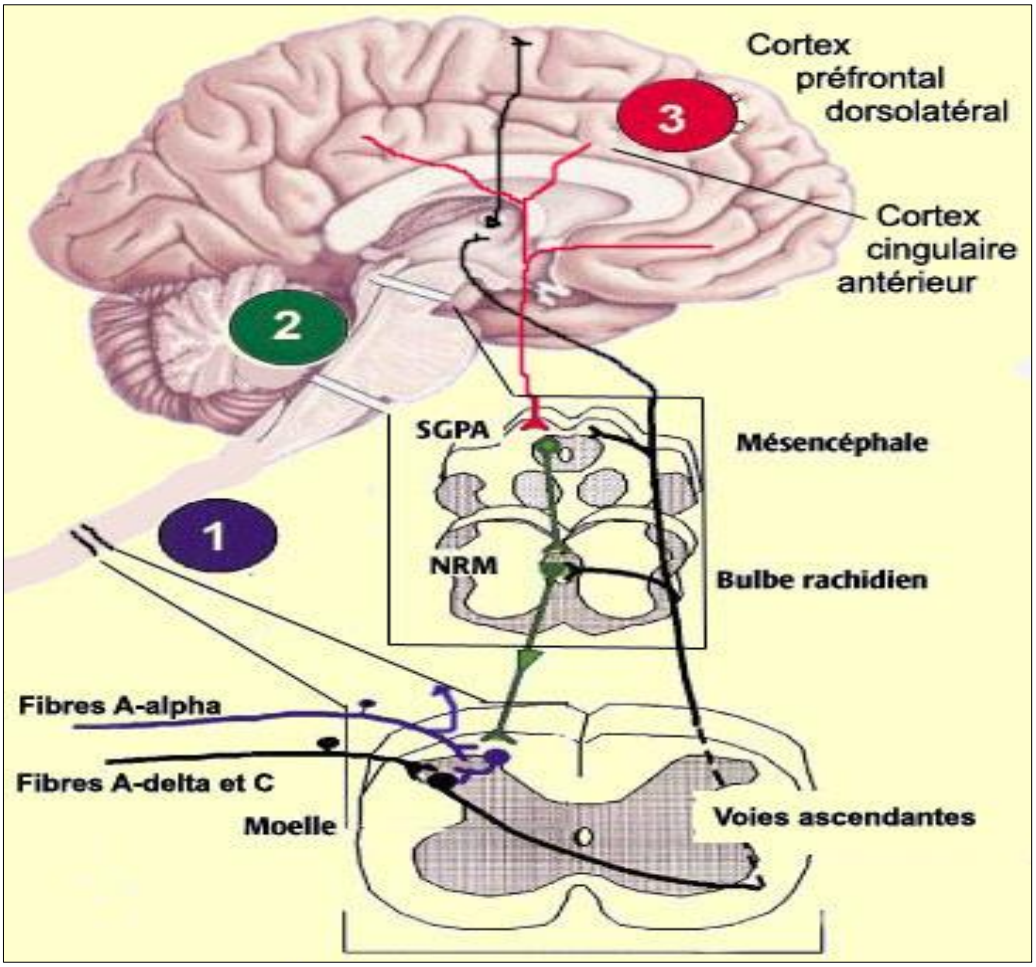


Figure 31 : Les différents types de controles de la douleur

*En vert : les contrôles inhibiteurs diffus induits par des stimulations nociceptives
*En mauve : les contrôles segmentaires d'origine périphérique non douloureuse
*En rouge : les contrôles descendants d'origine supraspinale (ou centrale) associés à des facteurs psychologiques

La substance grise périventriculaire ainsi que sa continuation, envoient des projections descendantes vers la moelle épinière et le cervelet, mais aussi des projections ascendantes au thalamus et aux lobes frontaux (Aboufatima et al, 2002 ; Price, 2002). Les axones de tous ces neurones se réunissent pour former un faisceau descendant, le funiculus dorsolatéral, dont les terminaisons vont rejoindre les interneurones inhibiteurs situés dans la corne dorsale de la moelle épinière. Ces interneurones peuvent donc subir, en plus de l'influence segmentaire d'origine périphérique, une activation d'origine centrale (Guirimand et Le Bars, 1996).

Les interneurones de la corne dorsale exercent leur inhibition en libérant des opiacés endogènesqui vont agir sur des récepteurs spécifiques situés tant sur les terminaisons des afférences nociceptives primaires que directement sur les neurones convergents. En agissant

ainsi à la fois au niveau pré et post-synaptique, l'inhibition est doublement efficace, diminuant l'importance du message nociceptif transmis et réduisant les probabilités du neurone suivant d'émettre des potentiels d'action en l'hyperpolarisant (Willis et Wislund, 1997).

III.2. Antalgiques

Un antalgique ou analgésique supprime ou atténue les sensations douloureuses par action périferique et/ou centrale sans provoquer une perte de conscience ou une dépression des autres sensations contrairement aux anesthésiques. Ils sont généralement répartis en deux :

- Analgésiques opiacés
- Analgésiques non opiacés.

III.2.1. Les antalgiques opioides

Les analgésiques opoides (morphiniques) sont des substances d'origine végétale dont les effets centraux sur la douleur sont connus depuis l'Antiquité. L'analgésie morphinique est sélective, elle supprime ou atténue les sensations douloureuses, sans altérer les autres sensations en gardant l'état de conscience par augmentation du seuil de perception de tous les stimuli douloureux (Touitou, 1993).

A noté que, la durée et l'intensité de l'analgésie dépendent aussi bien de la voie d'administration, que de la sensibilité individuelle et la dose. La morphine soulage bien les douleurs sourdes, les douleurs viscérales et les douleurs aiguës (Touitou, 1993).

Pour expliquer le mécanisme d'action morphinique, il est admis qu'il y aurait une action directe au niveau médullaire sur la transmission de l'influx douloureux et une action indirecte au niveau du tronc cérébral par renforcement des contrôles inhibiteurs sur la conscience et la sensation de la douleur, les régions les plus sensibles sont les structures du cerveau moyen (Touitou, 1993).

Au niveau du système nerveux central, la morphine est dotée d'une action analgésique dose-dépendante. Elle peut agir sur le comportement psychomoteur et provoquer, selon les doses et le terrain, sédation ou excitation. Sur les centres respiratoires et celui de la toux, la morphine exerce, dès les doses thérapeutiques, une action dépressive. Les effets dépresseurs respiratoires de la morphine s'atténuent en cas d'administration chronique. La triple action sur

le centre du vomissement, éventuellement sur le centre cochléovestibulaire ainsi que sur la vidange gastrique (cf infra), lui confère des propriétés émétisantes variables. La morphine provoque enfin un myosis d'origine centrale (Touitou, 1993).

Sur le muscle lisse, la morphine diminue le tonus et le péristaltisme des fibres longitudinales et augmente le tonus des fibres circulaires, ce qui provoque un spasme des sphincters (pylore, valvule iléo-cæcale, sphincter anal, sphincter d'Oddi, sphincter vésical) (Touitou, 1993).

A noté que, La morphine est utilisée dans la prise en charge de : douleurs intenses, douleurs cancéreuses.

III.2.2. Les antalgiques non opioides

Les antalgiques non opioides (non morphiniques) regroupent l'ensemble des médicaments symptomatiques des douleurs dont le mécanisme d'action est indépendant des récepteurs opioïdes (le néfopam, voire le paracétamol) mis à part, leur site d'action principal se situe au sein du foyer algogène d'où leur ancienne dénomination « d'antalgiques périphériques » (Touitou, 1993). Ils ont en commun leur capacité d'hiniber la cyclo-oxygénase, et sont classés en trois groupes selon leur profil pharmacodynamique :

- Les antalgiques purs Floctafénine
- Les antalgiques antipyrétiques
- Les antalgiques antipyrétiques antiinflammatoires

Ce genre de médicaments a une action analgésique beaucoup moins forte que celle des analgésiques centraux comme la morphine. Leurs effets analgésiques se manifestent sur les douleurs peu intenses (céphalées, névralgie, arthralgie, maux de dents…). Certains sont antipyrétiques, car ils normalisent une température élevée, en agissant sur le centre de la thermorégulation (Touitou, 1993).

III.2.3. Antalgiques traditionnels

Plusieurs étude réalisées dans le domaine des analgésiques, montrenet que les plantes et leurs extraits continueront d'être une source très importante de nouveaux médicaments et substances dotées de propriétées antalgiques. Ces plantes sont riches en molécules actives agissant souvent en synergie. Chaque famille chimique de principes actifs (flavonoïdes, alcaloïdes, etc) peut avoir un effet pharmacologique différent (Colot, 1972).

Les plantes médicinales qui ont la propriété d`être antalgique ont pour fonction de soulager la douleur. La morphine fait partie des médicaments antalgiques, qui ont été isolée depuis des sources naturelles (Colot, 1972).

Les méthodes d'études des antalgiques sont très nombreux on cite (Colot, 1972) :

- **Test de Randall et Selitto**

Il consiste à soumettre à une pression mesurée la patte du rat qui réagit par un cri, l'animal analgésié ne réagit pas.

- **Test d'Amour et Smith**

Il s'agit de focaliser un rayon lumineux calorifique sur la queue de la souris, en moins de 6 secondes la souris déplace la queue. L'animal est considéré analgésié s'il n'y a pas de réponse au bout de 12 secondes.

- **Test à la plaque chauffante ou hot plate test**

Le stimulus est également thermique, la souris est placée sur une plaque à la température de 56°C. Si elle n'est pas analgésiée, elle se lèche la patte en moins de 8 secondes. Les réactions de groupes de souris naïves sont comparées.

- **Test de Charpentier**

La base de la queue du rat est stimulée électriquement, l'animal présente une réaction de fuite avec cris. Le seuil d'intensité de courant électrique déterminant le cri et sa variation après analgésie sont évalués.

- **Test de Tail Flick**

La queue du rat est stimulée par la chaleur, il s'agit d'un appareil constitué d'une ampoule émettant de la chaleur irradiante de 55 à 60 °C. Le seuil d'inhibition de la douleur se situe à 6 secondes, un temps supérieur à 6 secondes révèle une action analgésique centrale type morphine.

- **Test de Koster ou writhing test**

Une solution de phénylbenzoquinone ou d'acide acétique à 3 % est injectée par la voie intrapéritonéale à la souris ou au rat. Sur des groupes d'animaux la dose analgésique empêchant le phénomène de torsion induit par le stimulus chimique est déterminée.

Dans notre étude nous avons utilisé cette méthode avec l'acide acétique à 3 % et la méthode de test Tail Flick

Généralités sur les Activités pharmacologique étudiées in *vitro*

Depuis quelques années, les plantes aromatiques et medicinales, ont commencé à etre considérées comme une véritable source d'antioxydants naturels et d'agents antimicrobiens (Bandoniene et al, 2000).

I. Stress oxydatif et antioxydants

Les antioxydants sont des molécules capables de neutraliser ou de diminuer les dommages cellulaires causés par ce qu'on appelle : un radical libre. Ils jouent un rôle très important dans le métabolisme humain (Yepez et al, 2002).

Les réactions biochimiques qui ont lieu dans notre organisme produisent des radicaux libres (molécule ou fragment moléculaire qui contient un ou plusieurs électrons libres non appariés) initiant des réactions d'oxydation en chaîne qui ont une action néfaste sur les cellules de notre corps car ce sont des composés qui ont tendance à attirer les électrons d'autres atomes et molécules pour gagner leur stabilités , tout en abîmant les cellules et en accélérant le processus de leur vieillissement.

Normalement, le corps humain maintient un équilibre entre la génération des antioxydants et la production des radicaux libres ou pro-oxydants en produisant simultanément les deux types de substances dans le processus métabolique. Le déséquilibre entre ces deux types de composés conduit à un phénomène dangereux appelé stress oxydatif (Yepez et al, 2002).

I.1. Stress oxydatif

Le stress oxydatif est une circonstance anormale, il est défini comme étant le déséquilibre entre la génération des radicaux libres et la capacité du corps à les neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs grâce aux systèmes de défense antioxydantes (Boyd et al, 2003). Il correspond à une perturbation du statut oxydatif intracellulaire (Morel et Barouki, 1999).

Dans chaque organisme vivant, une production physiologique des radicaux libres se fait de manière continue. Dans des conditions pathologiques ou provoquées par des facteurs

exogènes, une surproduction de ces réactifs est possible, ce qui peut produire des dégâts tissulaires à travers des changements des modifications oxydatives des biomolécules cellulaires. Et donc ce sont les antioxydants qui peuvent empêcher les dégâts cellulaires causés par les radicaux libres de l'oxygène (Valko et al, 2007).

I.2. Antioxydants

Un antioxydant, peut etre défini comme étant une substance susceptible d'inhiber directement la production, de limiter la propagation ou et de détruire les ERO ou espèces réactives de l'oxygène (Favier, 2003). Ils peuvent agir par formation des produits finis non radicaux, par interruption de la réaction en chaîne de peroxydation, ou par intervention rapide avec un radical d'acide gras avant que celui-ci ne puisse se lier avec un nouvel acide gras, alors que d'autres antioxydants absorbent l'énergie excédentaire de l'oxygène singlet pour la transformer en chaleur.

Les antioxydants agissent selon deux mécanismes principaux :

- Neutralisation des radicaux libres et inhibition des réactions en chaine initialisées par ces derniers.
- Déstruction des hydroperoxydes (composés intermédiaires formant des radicaux libres en interrompant la liaisonO-O), et par conséquent diminution de la vitesse de formation des radicaux libres (Ribeiro et al, 2001).

Biologiquement, les composés antioxydants participe à la protèction des systèmes cellulaires contre les effets des processus extrêmement nocifs qui causent l'oxydation excessive en complexant les catalyseurs, en réagissant avec l'oxygène, ou des agents de terminaisons capables de piéger les ERO, ils agissent en formant des produits non radicalaires.

On peut dire aujourd'hui que le fait de garder et maintenir l'équilibre entre les antioxydants et les radicaux libres sont la stratégie préventive contre plusieurs pathologies menaçant au vrai sens la santé humaine dernièrement (Hale, 2003).

D'autre part, on trouve aussi les antioxydants synthétiques qui sont utilisés actuellement dans plusieurs domaines notamment la production des produits cosmétiques et l'industrie agro-alimentaires. Récemment, plusieurs études ont traiter le sujet de la toxicité élevée des

antioxydants synthétiques utilisés dans l'industrie alimentaire, comme, par exemple, le butylhydroxytoluène (BHT), l'hydroxyanisol butyle (BHA), le tert-butylhydroquinone (TBHQ), etc. (Ribeiro et al, 2001 ; Marongiu et al, 2004). Le fort besoin de réduire le recour à l'usage des antioxydants synthétiques (maintenant limitée dans plusieurs pays en raison de leurs possibles effets néfaste sur la santé humaine) impose d'orienter le marché vers les antioxydants biologiques d'origine naturelle et stimule la recherche dans ce sens, afin d'avoir un bon alternatif des antioxydants synthétiques (Herodez et al, 2003). Sachant que les plantes représentent une source très riche et renouvelable d'antioxydants naturels (Ribeiro et al, 2001).

I.2.1. Antioxydants naturels

Les plantes médicinales constituent un énorme trésor d'antioxydants naturelles, qui se trouvent sous forme de mélange complexe, permettant à la plante de se protéger contre le stress oxydatif dû aux effets synergiques ou additifs (Pratt, 1980 ; Moure et al, 2001). Cependant, les chercheurs commencent à s'intéresser très particulièrement aux composés naturels dotées de propriétés antioxydantes (Potterat, 1997). Notant que plusieurs extraits de plantes sont utilisés pour préserver et conserver les aliments, de plus, il a été aussi démontré que plusieurs produits naturels (antioxydants) avaient des propriétés médicinales, par exemple : anti-cancérigène, anti-inflammatoire (Madhavi et al, 1995).

Les antioxydants d'origine naturels sont présents dans toutes les plantes supérieures et dans toutes les parties de la plante. Parmi eux il y a les flavonoïdes qui constituent la catégorie la plus étudiée, le mécanisme antioxydant des flavonoïdes le mieux décrit par les chercheurs est leurs capacité à piéger les radicaux libres : radical hydroxyle, l'anion superoxyde et les radicaux peroxydes. Les flavonoïdes inhibent et stabilisent les radicaux libres grâce à leur groupement hydroxyle (C_3OH) fortement réactif (Ghedira, 2005). Comme ils peuvent aussi protéger les membranes cellulaires par leur action à différents niveaux sur la peroxydation lipidique.

I.2.2. Evaluation de la capacité antioxydante par les tests in Vitro

Vu que l'action principale des antioxydants consiste à piéger les radicaux libres, plusieurs méthodes ont été développées et validé à partir de ce concept à fin de tester l'efficacité des agents antioxydants à piéger ces radicaux libres (ABTS, DPPH, FRAP …).

II. les bactéries et les antibiotiques

II.1. Définition des bactéries

Ce sont des micro-organismes unicellulaires, procaryotes (ne possèdent pas de noyau), avec un ADN chromosomique circulaire situé au niveau du cytoplasme. Plusieurs bactéries contiennent une autre structure d'ADN extra-chromosomiquen appelée plasmide. Elles sont entourées d'une paroi complexe et possedent le plus parfois des flagelles. Elles sont divisées en bactéries proprement dites (Bacteria) et bactéries primitives (Archaea). Toutes les bactéries qui causent des pathologies appartiennent à ce qu'on appelle Bacteria.

Les bactéries ont généralement un diamètre inférieur à 1 µm. On peut les voir à l'aide du microscope optique, à l'état frais ou après coloration. Leur forme peut être sphérique (cocci), en bâtonnet (bacilles), incurvée (vibrions) ou spiralée (spirochètes). Les détails de leurs structures ne sont visibles que par la microscopie électronique. (Nauciel et Vildé, 2005).

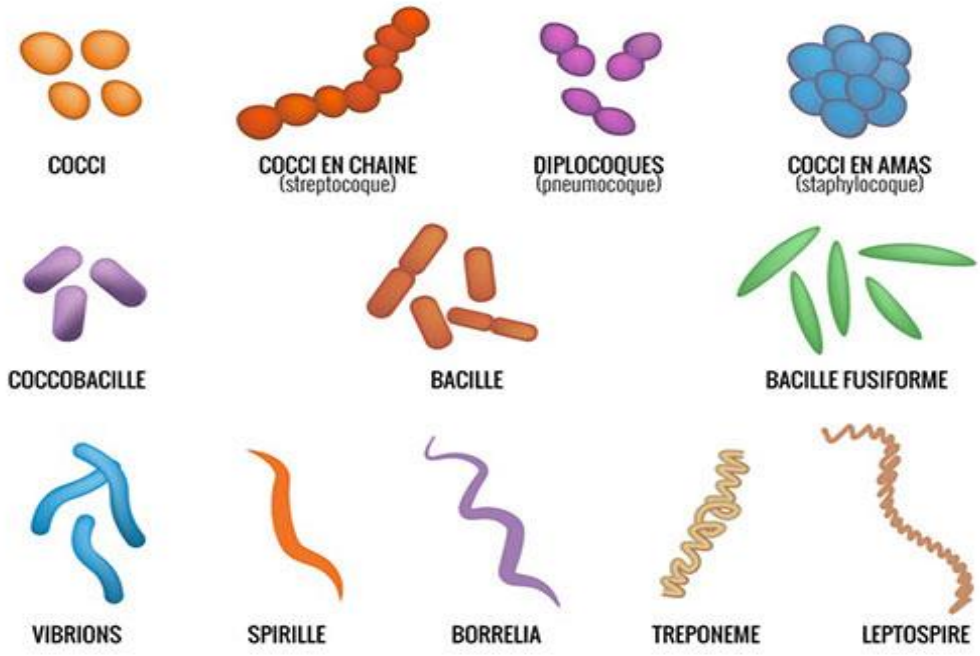


Figure 32 : Morphologie microscopique des bactéries

Les bactéries peuvent étre classées en fonction de plusieurs paramètres :

- Morphologie microscopique : coque, bacile, en chainette …
- Morphologie macroscopique : taille, forme, couleurs de colonies …
- Résultat de la coloration de gram : gram + ou gram –
- Temperature de croissance
- Besoin réspiratoires : aérobie, anaérobie …
- Mobilité
- Présence de spores
- Besoins nutritionnels

II.2. Antibiotiques

Un antibiotique est une substance chimique capable d'inactiver la croissance et la multiplication d'une bactérie, ou meme sa destruction en agissant sur une ou plusieurs étapes métaboliques indispensable à la vie de ces bactéries ou d'autres microorganismes (Khiati, 1998 ; Garnier Delamare, 1992 ; Berche et al, 1989), mais ne présentent pas de toxicité pour les autres cellules humaines ou animales (Leclerc et al, 1995).

On distingue deux types d'antibiotiques (Garnier Delamare, 1992 ; Khiati, 1998) :

- Les antibiotiques bactéricides : qui tuent les bactéries (tels que les bêtalactamines, les aminosides, les polypeptides).
- Les antibiotiques bactériostatiques : qui ralentissent la croissance bactérienne pouvant aller jusqu'à l'arret de la croissance bactérienne (essentiellement tétracyclines, phénicols, macrolides).

L'origine des antibiotiques était limité à des substances biologique produites par des champignons, et s'est élargi plus tard pour comprendre d'autres produits synthétisés possédant la même action antibactérienne (Garnier Delamare, 1992).

Chaque antibiotique a un spectre d'action bien précis, qui correspond à la flore microbienne sur laquelle il exerce une activité bactéricide ou bactériostatique, il est d'autant plus large, que le nombre des espèces microbiennes sensibles est élevé. Le spectre d'action varie d'un antibiotique à l'autre (Garnier Delamare, 1992).

Ainsi, les antibiotiques peuvent etre classés (Dupont et Drouhet, 1987 ; Leminor et Veron, 1989) selon leur mode d'action en :

- Antibiotiques inhibant la synthèse du peptidoglycane.
- Antibiotiques agissant sur les enveloppes membranaires.
- Antibiotiques inhibant la synthèse des protéiques.
- Antibiotiques inhibant la synthese ou le fonctionnement des acides nucléiques.

Cependant, l'utilisation intense et abusive des antiiotiques, peut etre à l'origine d'apparition de deux phénomènes inquiétants : les effets secondaires liés aux médicaments et l'acquisition d'autre part d'une certaine résistance aux antibiotiques par les bactéries, d'où l'attention croissante et particulière vers les antibiotiques naturels (Namiki, 1990). Actuellement, les chercheurs concentrent leurs efforts pour trouver des substances naturelles, inhibitrices idéales, de large spectre d'activité et surtout sans effets secondaires, à commencer par le potentiel antibacterien que promette les plantes médicinales (PAM).

II.3.Antibiotiques traditionnels

En plus des antibiotiques d'origine microbienne (Paris and Moyse, 1965), les plantes et leurs extraits ont été aussi utilisés au cours des siècles comme remèdes pour la cure ou l'allégement des maladies. Effectivement, plusieurs recherches ont montré que pas mal de végétaux supérieurs renferment des agents antimicrobiens très efficaces (Mitsher et al, 1972 ; Matasyoh et al, 2009). Plusieurs themes de recherches scientifiques ont étudié l'activité antimicrobienne des extraits de plantes médicinales telles que fennel (*Foeniculumvulgare*), peppermint (*Menthapiperita*), thyme (*Thymusvulgaris*) et même les graines et les feuilles d'olivier, ils ont rapporté que certains extraits disposent d'une forte activité contre les bactéries et les microorganismes comme les champignons, les levures et les virus (Jürgen et al, 2009). D'autres groupes de chercheurs ont franchi une étape plus avancée, ils ont isolé et identifié les métabolites responsables de cette activité antimicrobienne des extraits de plantes, ce qui constitue une plateforme prometteuse pour l'industrie pharmaceutique, la médecine alternative, et la thérapie naturelle (Huang et al, 2008).

Cependant, la présence d'un grand nombre de composés bioactifs dans le meme extrait végétale, nous conduit à l'évidence que l'activité antibactérienne de ce dernier ne peut être

due à un seul mécanisme d'action mais plutôt à la combinaison de divers mécanismes (Burt, 2004). Notant que, la membrane des cellules bactériennes est la principale cible des substances et molécules bioactives. Les extraits et leurs composants par leur hydrophobicité, s'unissent avec les lipides de la membrane cellulaire tout en changeant sa structure et par conséquent sa fonction. La perte du caractère différentiel de la perméabilité de la membrane cytoplasmique est fréquemment identifiée comme étant la cause de la mort cellulaire. Toutefois, certains auteurs voient que la perte des fonctions de la membrane explique seulement en partie l'activité antimicrobienne des huiles essentielles (Walsh et al, 2003).

Les huiles essentielles peuvent aussi agir sur les protéines membranaires. Ils sont capables de s'accumuler au niveau de la couche lipidique et d'interférer avec l'interaction lipide-protéine. De plus, une interaction directe entre les composés lipophiles et la partie hydrophane de la protéine peut avoir lieu (Juven et al, 1994).

2ème partie : Matériel et Méthodes

Matériel végétal, Animal et Appareillage

I. Matériel végétal

Afin de pouvoir répondre aux objectifs de notre travail et effectuer les tests nécessaires, nous avons collecté les racines fraiches d'*Atractylis gummifera* dans l'un de ces habitats naturels au Maroc entre le mois de Mai et juin 2014 à Moulay yaakoub relevant de la région de Fès-Meknès.

Cette zone de prélèvement se situe à une altitude d'environ 460 m au-dessus du niveau de la mer, et se caractérise par un relief accidenté avec des sols fertiles (figure 33). Alors que le climat de la zone de prélèvement est un climat continental.

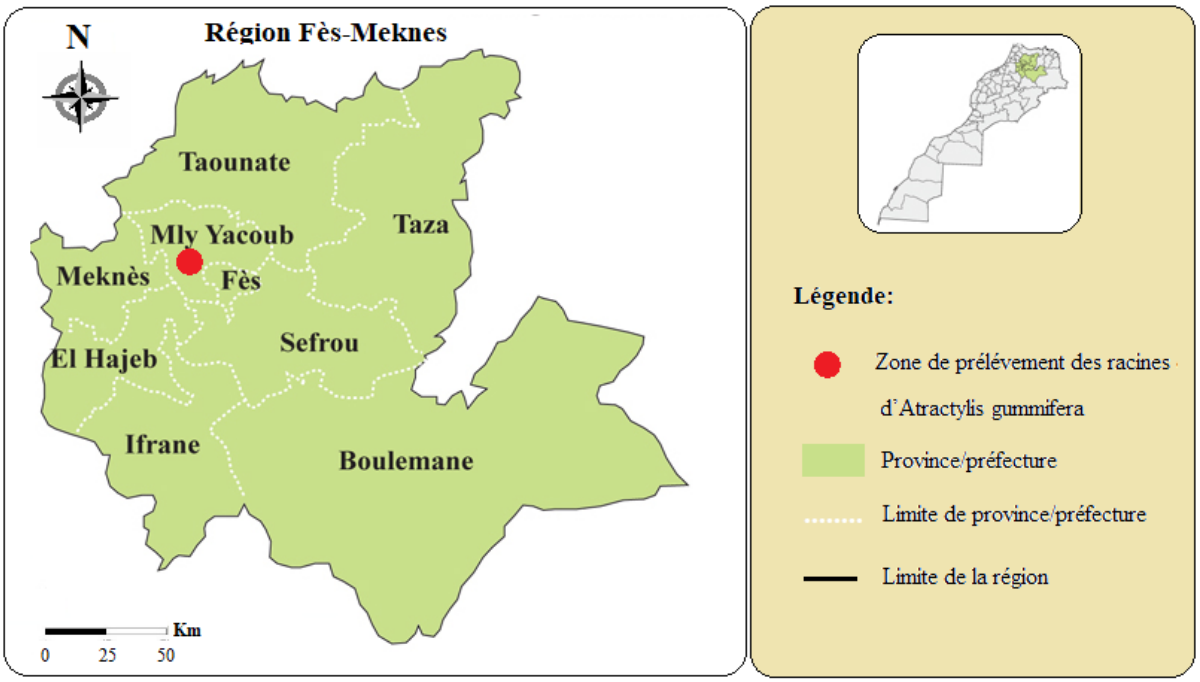


Figure 33 : localisation de la zone de prélèvement des racines d'*Atractylis gummifera*

Une fois que nous avons pu reperer les plants de *l'Atractylis gummifera*, grace à sa partie aérienne bien décrite en literature et après identification sur terrain à l'aide du Professeur Maatoui du Départment des Sciences et Techniques de Production Vegetale (STPV) de l'Ecole Nationale d'Agriculture de Meknes, nous avons récolté une bonne quantité de racine de cette derniere, et ce à l'aide d'une sappe (Figure 34).



Figure 34 : Prélèvement des racines *d'Atractylis gummifera*

Les racines ont été d'une grosse taille (entre 40 et 60 cm de longueur et 20 à 30 cm de largeur), charnues, accompagnées de fines racines et de rhizomes rampants, à section dure, fibreuse, jaunâtre, laissant apparaitre des stries (figure 34).

Ensuite, les racines récoltées ont été nettoyées et fragmentées en petits morceaux de 1 à 3 cm de diamètre puis séchées à température ambiante à l'abri de la lumière solaire, afin de préserver au maximum l'intégrité des molécules.

A fin d'obtenir une poudre fine et préparer les extraits à étudier, les racines ont été bien broyées à l'aide d'un broyeur.



Figure 35 : Fragmentation, Séchage et broyage des racines *d'Atractylis gummifera*

II. Matériel animal

Les animaux utilisés dans les différents tests de toxicité et de pharmacologie objet de la présente étude sont des rats et des souris.

II.1. Rats :

Les rats utilisés sont de sexe mâle, type Wistar, pesant entre 220 et 250 g, et provenant de l'élevage de l'animalerie centrale de la Faculté des Sciences Dhar el mahraz de Fès (figure 36).



Figure 36 : Rats wistar utilisés dans les différentes expérimentations

Dès leur réception au laboratoire, les rats ont été placés aléatoirement en groupe de 6 rats dans des cages standards pour une période d'acclimatation de 2 semaines avant d'être utilisés dans les différents tests.

Pendant cette période, les animaux avaient un accès libre à la nourriture et à l'eau et ont été maintenus dans une animalerie à température constante (22 ± 2) °C soumise à un cycle de lumière/obscurité de 12/12h.

II.2. Souris :

Les souris utilisées sont des deux sexes, de la souche Balb/c, d'une race suisse, provenant de l'élevage de la faculté de médecine de Rabat. Le poids des Souris est compris entre 25 et 35 g. Elles ont été maintenues dans les mêmes conditions que celles des rats Wistar.

II.3. Souches microbiennes :

Les germes qui ont été testés pour déceler le pouvoir antimicrobien des extraits *d'Atractylis gummifera* sont des souches bactériennes cliniques, toutes recueillies auprès des patients du centre hospitalier universitaire Hassan II de Fès (CHU) et identifiées par le professeur Oumokhtar de la faculté de médecine et de pharmacie de Fès (tableau 2). Tout au long des tests, les bactéries ont été conservées par des repiquages successifs sur le milieu de culture gélose nutritive au soja (TSA).

Tableau 2 : Présentation des espèces bactériennes étudiées

Espèce	**Nombre de souches bactériennes**	**Code arbitraire**
Eschrichia coli	2 souches	ECS / ECR
Pseudomonas aeruginosa	3 souches	PSR21e / PSS PSR8e
Klebsilla pneumoniae	2 souches	KS / KR
Acinetobacter	1 souche	AC

II.3.1 Description des Souches bactériennes

a- scherichia coli

Eecerichia coli est une Bacille (bactérie en forme de bâtonnet), Gram négatif, aéro-anaérobie facultatif, appartenant à la famille des Entérobactéries, mesurant de 2 à 4 µm de long et d'un diamètre d'environ 0,6 µm, (OMS, 2006).

Escherichia coli possède un génome à ADN double brin circulaire de 4,6 millions de paires de bases, qui est entièrement séquencé. Elle se réplique très rapidement à 37°C, toutes les 20 minutes, ce qui permet de multiplier facilement de l'ADN ou des protéines d'intérêt. , (OMS, 2006).

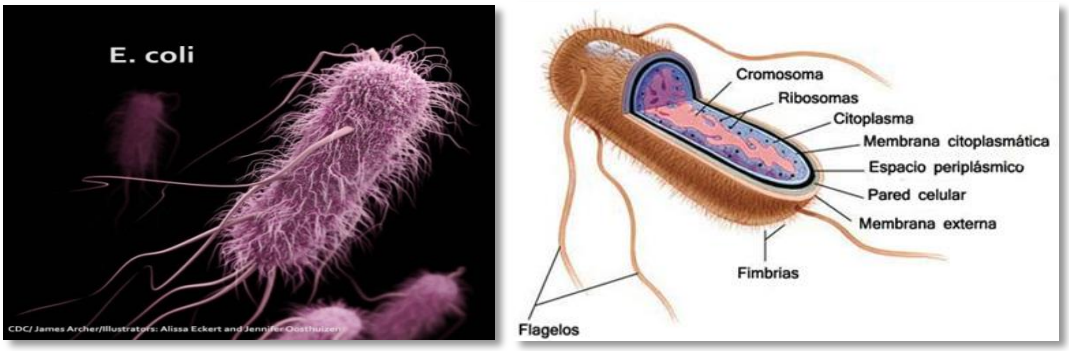


Figure 37 : Escherichia coli

C'est une bactérie communément trouvée dans les intestins de Mammifères, humains compris. Il en existe différentes formes dont certaines sont pathogènes, provoquant des infections intestinales, infections urinaires ou génitales, (OMS, 2006) (figure 37).

b- Klebsiella pneumonia

Les espèces du genre *Klebsiella* utilisées dans le présent travail, sont des bactéries en forme de bâtonnet, Gram négatif, non mobiles et généralement encapsulées, qui appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae*. Ces bactéries sont commensales de l'intestin humain, mais aussi des voies aériennes supérieures. Produisent de la lysine-décarboxylase, mais pas d'ornithine-décarboxylase, et donnent en général un résultat positif au test de Voges-Proskauer, (OMS, 2006). Leur taille varie de 0,3 à 1,0 µm de largeur et de 0,6 à 6,0 µm de longueur et forment généralement des colonies mucoïdes. (OMS, 2006). Klebsiella

pneumoniae est naturellement résistante aux pénicillines grâce à un gène chromosomique (figure 38).

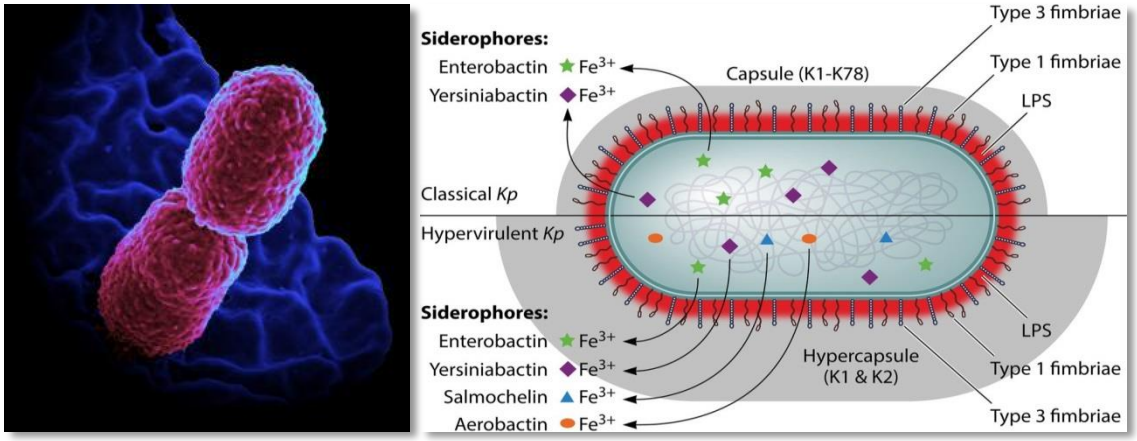


Figure 38 : Klebsiella pneumoniae

c- Pseudomonas aeruginosa

La souche Pseudomonas aeruginosa utilisé en test est une bactérie de la famille des Pseudomonadaceae en forme de bâtonnet, gram négatif, aérobie stricte, cytochrome-oxydase positive, mobile par cils polaires produisant les pigments de fluorescéine et de pyocyanine. Les cellules de P. aeruginosa mesurent de 0,5 – 1 µm × 1,5 – 4 µm. Cette bactérie métabolise une grande variété de composés organiques et est résistante à plusieurs antibiotiques et désinfectants (OMS, 2006).

Cette bactérie préfère les milieux humides et se trouve au niveau de la peau, de l'appareil respiratoire supérieur, de l'oreille et du tube digestif, (OMS, 2006) (figure 39).

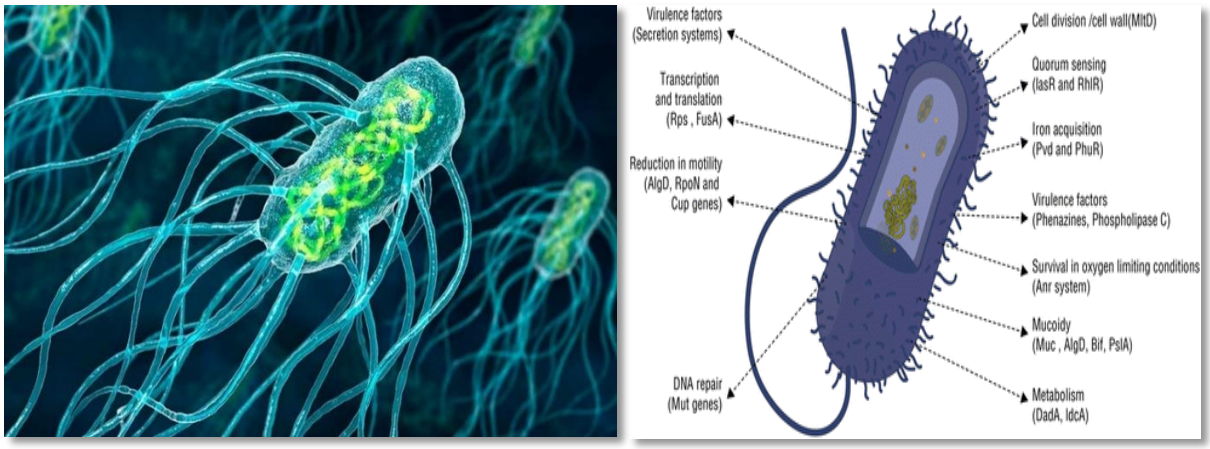


Figure 39 : Pseudomonas aeruginosa

d- Acinetobacter

Le genre Acinetobacter comprend des bacilles ou coccobacilles dont la structure de la paroi cellulaire est typique des bactéries Gram négatif. Ce sont des bactéries asporulées, parfois capsulées, souvent groupées en paires mais aussi en chaînes de longueur variable. Dans la phase exponentielle de croissance, leur diamètre varie typiquement de 0,9 à 1,6 µm et leur longueur de 1,5 à 2,5 µm (figure 40).



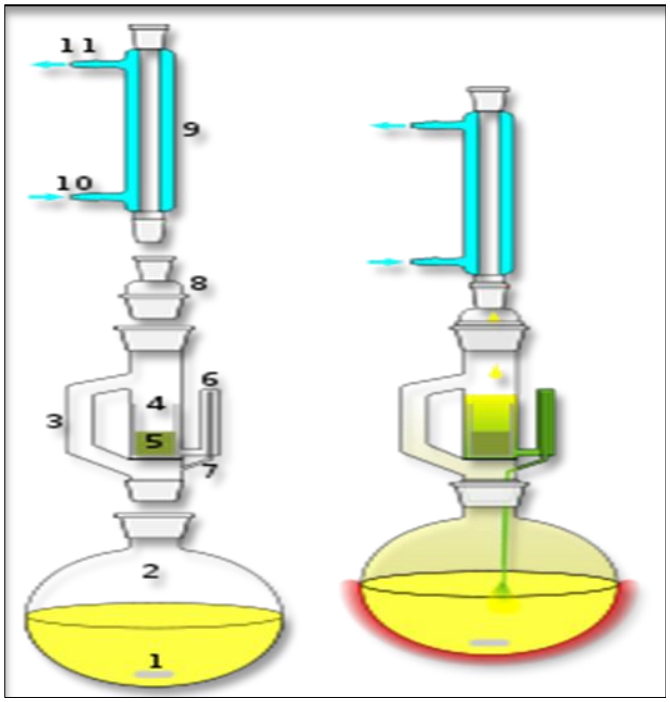
Figure 40 : Acinetobacter

III. Appareillage

Afin de réaliser nos essais toxicologiques et pharmacologiques, on a fait appel à plusieurs appareils, comme ceux utilisés en découpage et coloration des lames histologiques, le soxhlet en extraction par solvant, le pletismomètre en activité anti inflammatoire et la planche à trous en activité psycotrophe.

III.1. Soxhlet

Le soxhlet que nous avons utilisé est composé d'une colonne en verre, dans laquelle est placée une cartouche en papier-filtre épais rempli de poudre de racine sèche *d'Atractylis gummifera*, d'un tube siphon et un autre de distillation. Dans le montage, l'extracteur est placé sur un ballon contenant le solvant d'extraction surmonté par un réfrigérant. Le ballon est chauffé, provoquant l'évaporation du solvant (acétate, eau, méthanol et hexane) qui passe dans le tube adducteur, puis se condense grâce au réfrigérant, et retombe dans le corps de l'extracteur (figure 41).



1 Agitateur magnétique

2 Ballon à col rodé

3 Retour de distillation (tube d'adduction)

4 Corps en verre

5 Filtre

6 Haut du siphon

7 Sortie du siphon

8 Adaptateur d'expansion

Figure 41 : Représentation schématique d'un extracteur Soxhlet

III.2. Rotavapeur

L'évaporateur rotatif nous a permis d'évaporer rapidement le solvant à une température relativement basse. Il est relié à un système permettant d'abaisser la pression au sein du dispositif (une pompe par exemple). Le ballon (1) contient le mélange dont on veut évaporer le solvant. Le solvant s'évapore et les vapeurs ainsi formées sont condensées par le réfrigérant dans un récipient différent du ballon (1) : le ballon de récupération (2). Ainsi, l'évaporation est considéré terminée lorsque : le volume du solvant récupéré dans le ballon (2) n'augmente plus et que la masse du contenu du ballon (1) est constante.

Après évaporation du solvant (figure 42), on récupère :

- soit un solide si le produit synthétisé est solide à température et pression ambiantes,
- soit une huile si le produit synthétisé est liquide à température et pression ambiantes.

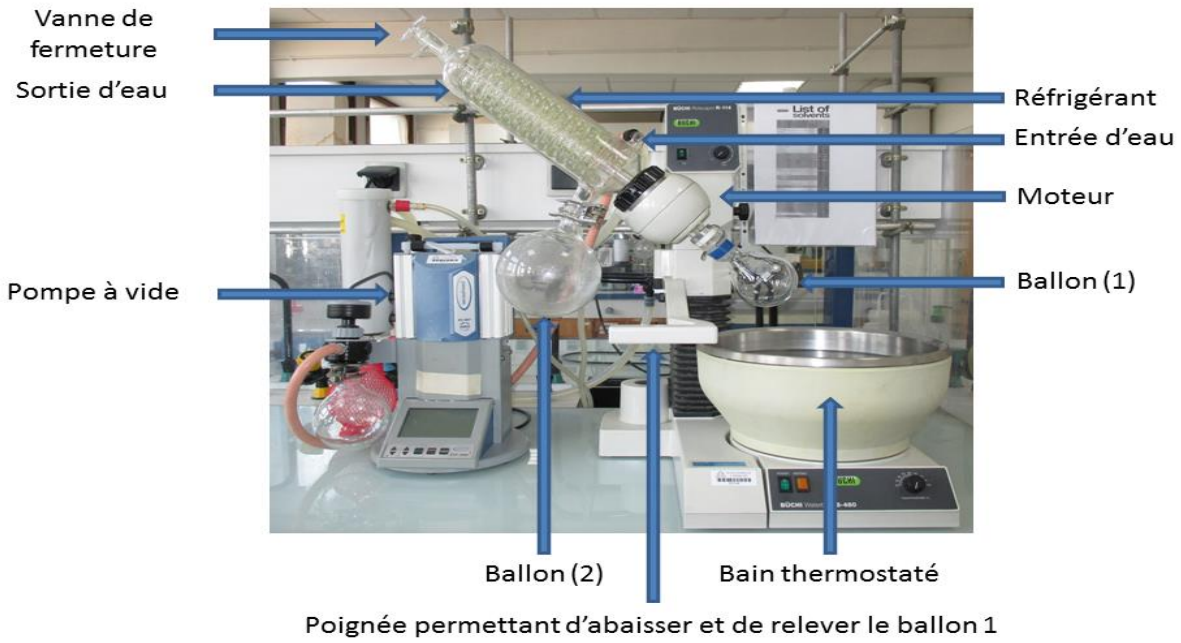


Figure 42 : Rotavapeur

III.3. Pléthysmomètre

Le pléthysmomètre nous a permis de mesurer l'efficacité des agents anti-inflammatoires. Il s'agit d'un appareil conçu pour la mesure précise et rapide de l'inflammation et de l'œdème chez les rongeurs de laboratoire comme les rats et les souris.

Il est composée d'une cellule de mesure contenant de la solution saline dans laquelle on plonge la patte du rat, la petite différence du niveau de la solution après immersion de la patte est mesurée par un transducteur de conception et est affichée sur un appareil numérique. Ce changement de volume est calibré en millilitre (ml) durant la phase d'étalonnage. La solution de remplissage de Pléthysmomètre contient NaCl 9 ‰ et quelques gouttes de Triton X-100 (Fluka Biohcemica).

Le montage de traumatisme est constitué d'un tube en plexiglas de 12 mm de diamètre intérieur et de 50 cm de longueur, et une tige d'acier de 10 mm de diamètre pesant environ 50g. On laisse tomber le poids à travers le tube au dessus de la patte pour induire l'œdème par un agent physique, la patte postérieure gauche est déposée sous le tube vertical en plexiglas (Riesterer et Jacques, 1970).

III.4. Planche à trous

La planche à trous utilisée dans le présent travail, mesure 40 cm x 40 cm par 2.2 cm d'épaisseur et comporte 16 trous de 3 cm de diamètre régulièrement espacés. Elle est faite en Perspex gris de finition matte pour éviter les reflets pouvant perturber le comportement de la souris. Les mouvements d'exploration des trous sont automatiquement détectés par des cellules infrarouges. Des émetteurs et des récepteurs miniatures à IR sont incorporés dans les parois de chaque trou. L'unité de contrôle affiche les résultats sur un écran LCD (figure 42). Le comptage du nombre de trous explorés est révélé au bout de chaque minute pendant 5 min ; (les moyennes sont calculées pour chaque minute et pour l'ensemble des 5 minutes). Pendant toute la durée de l'essai, l'observateur doit être rigoureusement silencieux et immobile (Boissier et al., 1964).

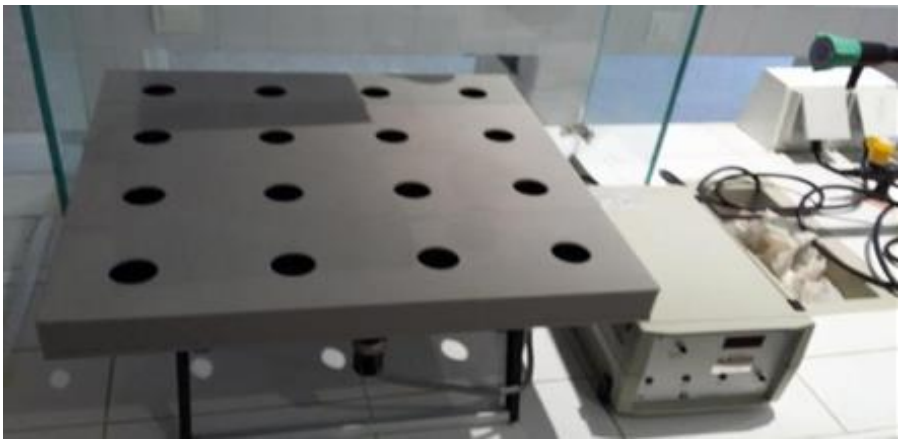


Figure 43: Planche à trous

III.5. L'Automate de Coloration

L'Automate de Coloration Tissue-Tek® DRS™ 2000 dispose de plusieurs protocoles de coloration dans un mode d'accès aléatoire. Le DRS 2000 peut colorer jusqu'à 11 séries de 40 lames à la fois : 27 réservoirs, 1 station de séchage, et une configuration sur deux niveaux pour une performance optimale (figure 44).

Ecran de traitement complet, afin de déterminer rapidement ou se trouve un panier de lames dans le système et d'obtenir le temps restant de traitement pour chaque panier. Plus de 20 protocoles de coloration programmables, qu'on peut renommer et qui peuvent comprendre

jusqu'à 50 étapes. Les procédures de qualité sont simplifiées grâce à un logiciel permettant de gérer les réactifs. Programmation de multiples protocoles, de manière précise et simple.



Figure 44 : L'Automate de Coloration

Quelle que soit la station de départ choisie, chaque panier déposé est automatiquement pris en charge et passe successivement dans les réservoirs de coloration ou de rinçage. Les paniers sont ensuite entreposés dans la station de fin définie par l'utilisateur, les lames sont prêtes à être montées avec la monteuse de lames compatible conçue pour un montage automatisé.

III.6. Microtomes

Les microtomes sont des outils de coupe pour l'élaboration de préparations qui sont utilisés en microscopie. Afin de répondre aux hautes exigences de ces préparations, les microtomes permettent d'effectuer des coupes extrêmement fines (des coupes d'une épaisseur de 0,1 jusqu' 100 µm). Pour pouvoir analyser des objets, ceux ci devaient être suffisamment fins pour que la lumière puisse passer à travers. Le microtome utilisé dans cette étude a été du modèle Accu-Cut® SRM™ 200 Rotary Microtome (figure 45).

- Caractéristiques :
  - Mécanisme d'alimentation micrométrique de précision, avec système monobloc.
  - Mode de rognage automatique.
  - Mouvement vertical du spécimen.
  - Montage direct de tous les porte-échantillons.
  - Conception ergonomique du microtome.
  - Dispositif de verrouillage de sécurité, pour verrouiller le volant.
  - Compteur de section avec remise à zéro.

- Alimentation grossière avant ou latérale.
- Section bac à déchets.
- Système de porte-couteaux breveté.



Figure 45 : Microtomes Accu-Cut® SRM™ 200

Le microtome est un outil indispensable pour obtenir des coupes fines voire très fines avant leur fixation, coloration et observation microscopique. C'est aussi un matériel dangereux dont il faut connaître parfaitement le protocole d'utilisation afin de réduire les survenues de coupures avec contamination possible par les agents biologiques pathogènes contenus dans les échantillons à examiner.

- Emplois :

1. Vérifier le blocage du volant puis reculer le cylindre du porte objet et insérer la cassette dans la pince.
2. Fixer le porte lame de rasoir ou la lame de rasoir et régler l'angle de coupe à environ 45° puis mettre ensuite les protège-doigts.
3. Régler les parallélismes (vertical et horizontal) du bloc / fil du rasoir et contrôler tous les blocages : blocs, lames de rasoirs, porte rasoir
4. Régler l'épaisseur de coupe pour dégrossir le bloc puis la régler à l'épaisseur souhaitée pour former le ruban qui sera conservé.
5. Réaliser un ruban en libérant puis tournant le volant régulièrement. Décoller du rasoir un ruban de 5 à 6 coupes, à l'aide du bistouri. Poser le ruban sur une feuille de papier et l'identifier.
6. Bloquer le volant puis protéger le fil de la lame de rasoir avant de changer de bloc

7. Adopter le port de gants anti coupure sur les gants de protection étanche sur les deux mains.
8. Travailler si possible sur des prélèvements fixés (formaldéhyde-glutaraldéhyde) afin de réduire le risque de contamination.

III.7. Le spectrophotomètre UV

Le spectrophotomètre UV / VIS Jasco V-530, est conçu pour mesurer le spectre d'absorption d'un échantillon à des longueurs d'onde comprises entre 190 et 1100 nm. Les sources lumineuses utilisées dans le V-530 sont une lampe au deutérium (D2) (190 à 350 nm) pour la région UV et une lampe à halogène (WI) (340 à 1100 nm) pour la région VIS / NIR. La lumière de la source de lumière converge et entre dans le monochromateur. La lumière est dispersée par le réseau dans le monochromateur et converge vers la fente de sortie. La lumière qui a traversé la fente de sortie est monochromée. Cette lumière est divisée en deux faisceaux, l'un allant à l'échantillon à mesurer et l'autre à l'échantillon de référence tel qu'un solvant. La lumière qui a traversé l'échantillon et l'échantillon de référence est alternativement incidente sur la photodiode au silicium (figure 46).

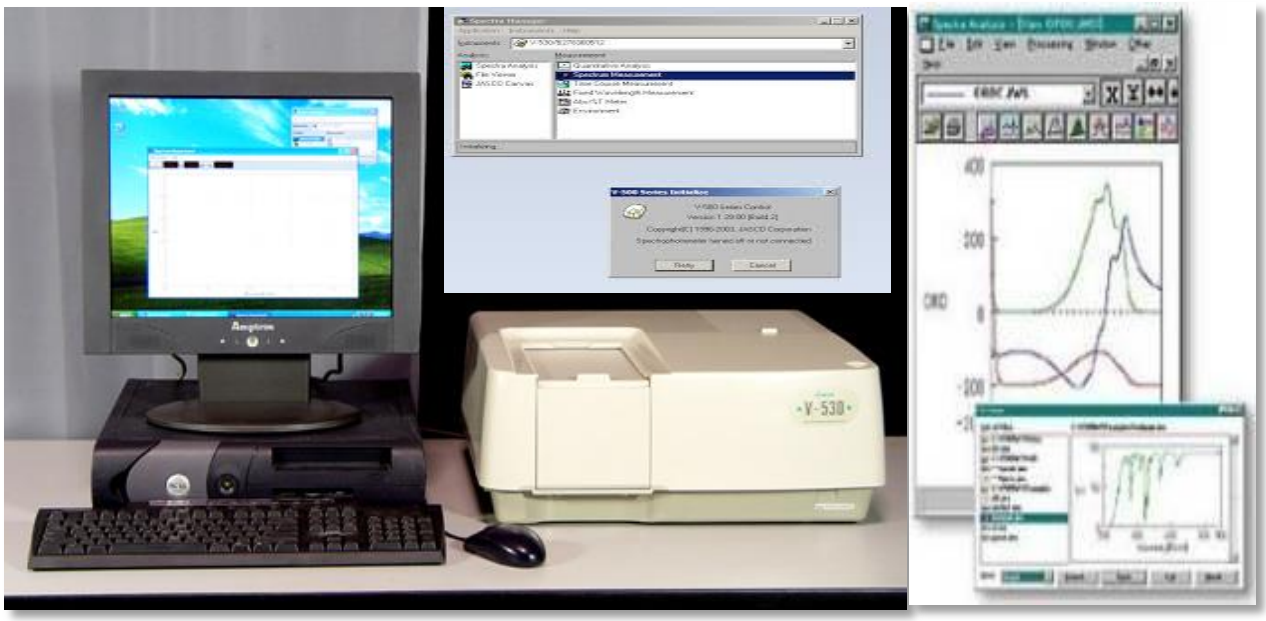


Figure 46 : Le spectrophotomètre UV

Extraction et criblage phytochimique

I. Préparation des extraits

S'inspirant des méthodes traditionnelles, nous avons préparé des extraits aqueux des racines d*'Atractylis gummifera* : décocté et macéré.

I.1. Préparation du décocté

Pour préparer le décocté, nous avons utilisé 100 g de poudre de racine sèche d*'Atractylis gummifera* dans 200 ml d'eau distillée. L'ensemble a été porté à ébullition pendant 20 minutes. La suspension a été ensuite retirée du feu et laissée à température ambiante jusqu'à refroidissement complet puis filtrée et conservée à 4 ° C jusqu'à son utilisation.

I.2. Préparation du macéré

Pour le macéré, nous avons introduit dans un mortier 100 g de poudre de racines d'*A*tractylis *gummifera* et 200 ml d'eau distillée.

L'ensemble de la préparation a ensuite été mélangé délicatement à l'aide d'un pilon avec des mouvements réguliers de la main pendant plus d'une heure afin de faciliter la libération de substances végétales. Puis, le mélange a été filtré et stocké à 4 ° C**.**

I.3. Extraction par solvants

Pour tester l'activité antioxydante d*'Atractylis gummifera* nous avons procédé à des extractions par solvant en soxhlet, c'est une méthode classique pour l'extraction solide-liquide, simple et convenable permettant de répéter infiniment le cycle d'extraction avec un solvant frais jusqu'à épuisement complet du soluté dans la matière première.

Le solvant condensé s'accumule dans l'extracteur jusqu'à atteindre le sommet du tube siphon et retourne dans le ballon, accompagné des substances extraites. Ainsi, le solvant contenu dans le ballon s'enrichit progressivement de composés solubles.

II. Criblage phytochimique

Les extraits aqueux obtenus ont servi à la réalisation d'un screening phytochimique préliminaire, il s'agit d'une analyse qualitative basée sur des réactions de coloration et/ou de précipitation en vue de mettre en évidence les grands groupes chimiques présent dans les racines de cette plante. A cet effet, plusieurs types de réactifs ont été utilisés. Nous nous sommes servis des techniques analytiques décrites dans les travaux de Brunton et al (1993).

Les résultats sont classés selon l'apparition en :

- Une réaction franchement positive est représentée par : +++
- Une réaction moyennement positive est représentée par : ++
- Une réaction faiblement positive est représentée par : +
- L'absence de la substance est représenté par : -

II.1.Détection des polyphénols

Les polyphénols sont mis en évidence par la réaction au chlorure ferrique ($FeCl_3$). À 2 ml des différents extraits (décoctés et macérés) est ajoutée une goutte de solution alcoolique de chlorure ferrique à 2%. Le chlorure ferrique provoque en présence de dérivés polyphénoliques l'apparition d'une coloration bleu noirâtre ou verte plus ou moins foùncée.

II.2.Détection des flavonoïdes

Pour mettre en évidence la présence des flavonoïdes, la réaction dite 'cyanidine'' a été utilisée. 10 ml de chaque extrait a été repris dans 5 ml d'alcool chlorhydrique dilué 2 fois.

En ajoutant 2 à 3 copeaux de magnésium, on assiste à un dégagement de chaleur puis à une coloration rose-orangée ou violacée. L'addition de 3 gouttes d'alcool isoamylique a intensifié cette coloration qui a confirmé la présence de flavonoïdes.

II.3. Détection des tannins

Les tannins catéchiques sont identifiés par le réactif de STIASNY (Formol 30%, HCl concentré : 1/0,5). 15 ml du réactif de STIASNY a été ajouté à chaque extrait, le mélange a été maintenu au bain- marie à 80 °C pendant 30 min. L'observation d'un précipité en gros flocons caractérise les tanins catéchiques.

Les tannins galliques sont identifiés par ajout de $FeCl_3$. En effet, nous avons filtré 5 ml de chaque extrait. Le filtrat est recueilli et saturé par l'acétate de sodium. L'addition de 3 gouttes de $FeCl_3$ à 2% provoque l'apparition d'une coloration bleu-noir intense dénotant la présence de tanins galliques.

II.4. Détection des Quinones

Pour mettre en évidence les Quinones, nous avons utilisé le réactif de BORNTRAEGEN. En effet, un aliquote de résidu dissout dans 5 ml d'acide chlorhydrique au 1/5, est chauffée au bain-marie pendant 30 min.

Après refroidissement, il est extrait par 20 ml de chloroforme. 0.5 ml de l'ammoniac dilué 2 fois a été ajouté à la solution chloroformique. Une coloration rouge ou violet constituait le signe de la présence de quinones.

II.5.Détection des saponines

Pour mettre en évidence les saponines, pour chaque extrait, nous avons introduit 10 ml de l'extrait aqueux dans un tube à essai. Le tube est agité pendant 15 secondes puis laissé au repos pendant 15 min. Une hauteur de mousse persistante, supérieure à 1 cm indique la présence de saponoside.

II.6.Coumarin

On pèse 1 g de matériel végétal sec broyé et on le place dans un tube à essai, couvert par du papier filtre imbibé avec NaOH dilué. Le tube est ensuite placé dans un bain marie bouillant pendant quelques minutes. Le papier filtre est ensuite examiné sous lumière UV. Une fluorescence jaune indique la présence des coumarines.

II.7. Terpenoides

A une quantité de 1 g du matériel végétal broyé, on ajoute 5 mL d'hexane, puis une sonication pendant quelques minutes a été faite. Après une agitation de 30 min et une filtration, la migration du filtrat a été effectuée sur une plaque préparative de gel de silice, le solvant utilisé est le benzène.

Après migration, la plaque est pulvérisée avec le chlorure d'antimoine puis mise à l'étuve à 110°C pendant 10 min. Toute fluorescence décelée après ce traitement prouve que le matériel testé contient des terpènoïdes.

II.8.. Dosage des phénols

La teneur des phénols a été déterminée par spectrophotométrie selon la méthode de Folin Cioclateu (slinkard, 1977). Pour chaque type d'extrait, on a introduit dans un tube à essai 0.5 ml d'une dilution connue, 2.5 ml de Folin-Ciocalteu dilué à 10% et 2 ml d'une solution de carbonate de sodium à 7% (v/v). L'absorbance a été lue à 760 nm (Jasco v-530) après 2 heures de réaction à la température ambiante dans l'obscurité.

L'acide gallique a été utilisé comme standard pour la construction de la courbe d'étalonnage. Les teneurs totales en phénols ont été exprimées en milligrammes d'équivalents en acide gallique par gramme de poudre (mg GAE / g DW).

Étude Toxicologique

La toxicité d'une substance peut être appréciée soit par l'étude de sa toxicité aigüe après administration d'une dose unique ou bien par l'étude de sa toxicité chronique après administration répétée de la substance. Dans les conditions de ces expérimentations, on s'est interessé particulièrement à l'évaluation de la toxicité aigüe et chronique des extraits aqueux d'*Atractylis gummifera* (décocté et macéré).

I. Etude de la toxicité aigüe : Détermination de la DL_{50}

La première étape dans la recherche pharmacologique débute par l'étude de la toxicité et en particulier la toxicité aigue. Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à tester la toxicité aigue, par voie orale, car c'est la voie usuelle impliquée dans les conditions normales pour l'Homme,

A fin de déterminer la DL_{50} des extrait aqueux d'*Atractylis gummifera*, nous avons travaillé sur 7 lots de 6 rats chacun. Le lot des rats utilisé comme témoin a reçu uniquement de l'eau distillée. Pour les 6 autres lots, nous avons administré à chacun des lots de 6 rats des extraits de concentration respective de 0.5 mg/ml, 5mg/ml, 50 mg/ml, 125 mg/ml, 250 mg /ml et 500 mg/ml de racine d'*Atractylis gummifera*, correspondant respectivement à 0.01 g/Kg ; 0.1 g/Kg 1 g/Kg ; 2.5 g/Kg ; 5 g/Kg et 10 g/Kg d'*Atractylis gummifera* par kg de poids corporel.

Après avoir soumis les rats à un jeûne de 12 heures, l'extrait a été administré, par gavage, à l'aide d'une canule d'intubation comportant un embout légèrement recourbé.

Le gavage a été réalisé avec 20 ml/Kg de poids corporel de rats soit 5 ml pour les rats de 250 grammes. Après l'administration de l'extrait, les animaux ont été observés aussitôt, puis toutes les 30 minutes, pendant 8 heures, le premier jour et 4 fois par jour, durant 48 heures. Pendant cette période d'observation, les signes cliniques ainsi que le nombre de morts ont été notés (figure 47).

Tableau 3 : Concentration et volume des différents extraits d'*Atractylis gummifera* administrés aux rats

Niveau de dilution par rapport à la solution Mère (100 g/ kg)	SM	SM/2	SM/4	SM/10	SM/100	SM/1000
Concentration de la solution administrée en g de racine d'*Atractylis gummifera* par mL d'eau distillé (g/ml)	0,5	0,25	0,125	0,05	0,005	0,0005
Quantité de racine d'*Atractylis gummifera* en g par Kg de poids corporel (g/Kg)	10	5	2.5	1	0,1	0,01
Volume de solution (en ml) administré par gavage au rats pesant 250 g	5	5	5	5	5	5

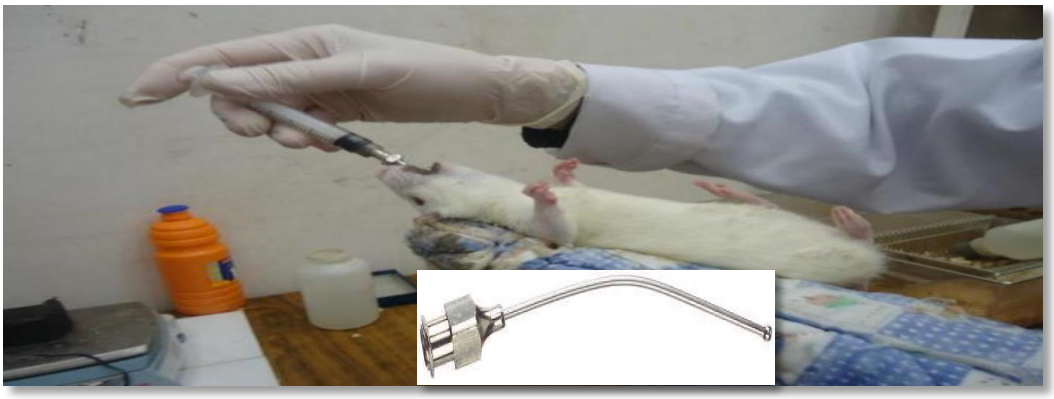


Figure 47 : Opération de gavage des rats avec les différents extraits d'Atractylis gummifera

La courbe donnant le pourcentage de mortalité en fonction de la dose nous a permis de calculer la dose correspondante à 50 % de mortalité.

II. Etude de la toxicité chronique d'extrait aqueux d'*Atractylis gummifera*

La toxicité chronique est l'étude de l'effet d'une substance quelconque sur des animaux de laboratoire auxquels on administre une dose de façon réitérée, pendant une longue période.

L'étude de la toxicité chronique va nous permettre :

- D'évaluer la toxicité d'une substance administrée à plusieurs reprises, cette toxicité résulte du produit lui-même et/ou de ses métabolites.
- De mettre en évidence des altérations fonctionnelles et/ou anatomopathologiques provoquées par l'administration réitérée et établir leur apparition en fonction de la posologie.
- De définir les limites de l'innocuité expérimentale.
- D'apprécier le degré de réversibilité des effets toxiques.

La toxicité chronique par voie orale a été réalisée sur une durée de 40 jours. Un lot a servi de lot témoin et n'a reçu que de l'eau distillée puisqu'elle est le véhicule pour les deux extraits aqueux alors que les deux autres groupes ont reçu deux doses différentes du décocté d*'Atractylis gummifera*.

Les doses utilisées sont inférieures à la DL_{50} , et n'ont pas causées la mort d'animaux lors de l'étude de la toxicité aigue. Pour ce faire, nous avons travaillé avec des doses correspondant à 1/10 et 1/20 de la $DL_{50,}$ soit 250 mg/kg et 500 mg/kg.

Tableau 4 : Dose et volume *d'Atractylis gummifera*

Lots	Volume (ml)	Dose (mg/kg)	Volume gavé (ml/kg)	Nombre d'animaux
Témoin	_	_	20	36
Décocté 1	1	250	20	36
Décocté 2	2	500	20	36

Et afin d'évaluer l'impact des extraits sur certains organes et sur le métabolisme des animaux, nous avons réalisé des prélèvements sanguins en vue d'effectuer des tests hématologiques et biochimiques en relations avec la fonction hématologique, hépatique et rénale,

Ainsi que des sacrifices de rats à fin de pouvoir récupérer les organes et évaluer le degré et l'importance des lestions engendré au niveau de chacun de ces derniers en fonction du temps d'exposition au traitement et de la concentration d'extrait utilisé.

Pendant toute la période de l'essai, nous avons suivi le poids corporel des rats par la pesée chaque quatre jour, en plus d'observation de tout changement relatif à leur comportement.

II.1.Etude histologique

Afin d'évaluer l'impact du décocté *d'Atractylis gummifera* sur certains organes et sur le métabolisme des animaux, nous avons prélèvé (Apres sacrifice) le cœur, les poumons, le foie, les reins, le cerveau et la rate pour réaliser des analyses histopathologiques (figure 48).

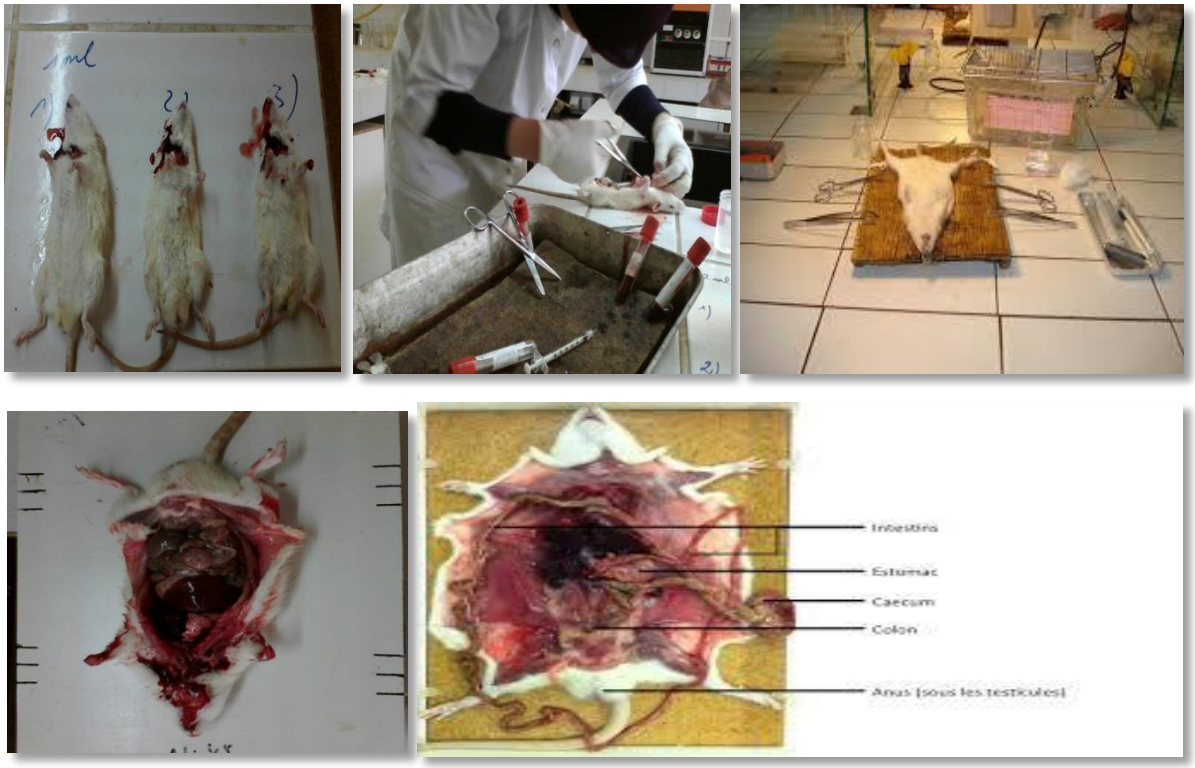


Figure 48 : Dissection des rats

a-Prélèvement :

Les prélèvements histologiques ont été effectués au laboratoire de physiologie végétale de la Faculté des Sciences Dhar Elmehraz, alors que la fixation, l'inclusion, la coloration et la lecture ont été faites au laboratoire central de CHU de Fès.

Ces dernières ont consisté à la recherche d'éventuelles conséquences lésionnelles du traitement sur ces organes, par des analyses macroscopiques et microscopiques.

Pour chaque organe, le prélèvement a été fait le plus tôt possible après l'euthanasie tout en évitant de comprimer ou malaxer les tissus. Chaque organe a été ensuite conservé dans un flacon contenant le formol à 10% afin d'éviter sa dessiccation puis fermé, étiqueté et envoyé

immédiatement au laboratoire de CHU de Fès. Chaque organe a fait l'objet d'une analyse microscopique (figure 49).



Figure 49 : Fixation des organes des rats dans du formol

Les prélèvements ont été effectués, en plusieurs temps différents ; T0 : Prélèvement témoin, avant le traitement. T1 = 2h, T2=6h ; T3 = 12h, T4=24h ; T5 = 48h, T6=4 jours (j) ; T7 = 8 j, T8=12 j ; T9 = 16 j ; T10=20 et T11= 40 j de traitement. Les rats sont mis à l'observation continue durant 40jours.

Tableau 5 : Répétition et lot de prélèvement en fonction des différentes durées de traitement

Temps après traitement	Numéro du lot	Nombre de rats sacrifiés
2h	Lot 1	3
	Lot 2	3
	Lot 3	3
6h	Lot 1	3
	Lot 2	3
	Lot 3	3
12h	Lot 1	3
	Lot 2	3
	Lot 3	3
24h	Lot 1	3
	Lot 2	3
	Lot 3	3

48h	Lot 1	3
	Lot 2	3
	Lot 3	3
J4	Lot 1	3
	Lot 2	3
	Lot 3	3
J 8	Lot 1	3
	Lot 2	3
	Lot 3	3
J 12	Lot 1	3
	Lot 2	3
	Lot 3	3
J 16	Lot 1	3
	Lot 2	3
	Lot 3	3
J 20	Lot 1	3
	Lot 2	3
	Lot 3	3
J 40	Lot 1	3
	Lot 2	3
	Lot 3	3

b- Fixation, Inclusion en paraffine coupe et coloration :

Tous les prélèvements ont été enrobés en paraffine après déshydratation (passages successifs dans différents bains d'alcool de concentration croissante : 80°, 95° et 100°) puis éclaircissement dans du toluène. Cette étape d'imprégnation en paraffine a été réalisée dans un automate (HMP 110- MICROM).

Les prélèvements ont été ensuite inclus en paraffine dans une station d'enrobage et coupés à une épaisseur de 3 µm à l'aide d'un microtome à mouvement vertical (Accu-Cut® SRM™ 200). Les coupes ont été étalées sur lame de verre et la coloration a été faite par l'Automate de Coloration (Tissue-Tek® DRS™ 2000) (figure 50).



Figure 50 : Préparation des lames histologique

c- Lecture

L'évaluation des lésions histologiques est réalisée par un pathologiste ; ces lésions ont été classées en fonction de leur sévérité : minime (grade 1), faible (grade 2), modérée (grade 3), marquée (grade 4) ou sévère (grade 5)**.**

II.2. Etude biochimiques

Afin d'évaluer l'impact du décocté d'*Atractylis gummifera* sur certains organes et métabolisme des animaux, nous avons réalisé des prélèvements de sang et d'urine en vue d'effectuer des tests hématologiques et biochimiques en relation avec la fonction hématologique, hépatique et rénale. Les prélèvements ont été effectués au laboratoire de physiologie de la faculté des sciences de dhar elmahraz, alors que les analyse ont été effectuées au laboratoire Sais par Pr Nabil Boussetta.

Les prélèvements sanguins et urinaires ont été effectués, en plusieurs temps différents ; T0 : Prélèvement témoin, avant le traitement. T1 = 2h, T2=6h ; T3 = 12h, T4=24h ; T5 = 48h, T6=4 j ; T7 = 8 j, T8=12 j ; T9 = 16 j ; T10=20j et T11= 40 j de traitement (figure 51).

Les rats sont systématiquement euthanasiés et les prises de sang ont été faites à l'aorte abdominale. Alors que les urines ont été prélevées directement de la vessie à l'aide d'une seringue.



Figure 51 : Prélèvement des échantillons de sang et d'urine pour les analyses biochimiques

Pour chaque rat, au moment de l'autopsie, le sang et les urines ont été prélevés dans des tubes héparinés (1,3 ml de sang) pour les analyses biochimiques, puis centrifugés pour séparer le plasma. Ensuite les paramètres suivants ont été analysés le jour même de prélèvement avec l'automate Cobas 6000 (Roche) :

- AST (Aspartate aminotransférases),
- ALT (Alanine aminotransférases),
- GGT (Gamma glutamyltransférases),
- bilirubine,
- protéines totales,
- albumine,
- urée et créatinine.
- phosphatase alcaline (ALP)
- glutathion (GSH)

Activités *gummifera* in *Vivo*

I. Activité antalgique

I.1. Méthode d'étude des analgésiques vrais pharmacologiques d'*Atractylis*

- **Test du « TAIL FLICK »**

La méthode consiste à tremper la queue d'un rat dans de l'eau chaude et étudier avant et après l'administration de l'extrait (macéré/décocté) supposée analgésique, le réflexe de retirement de la queue, en constituant 04 groupes de 06 rats pour chaque type d'extrait. Les lots reçoivent par gavage, les différents traitements comme suit :

- Lot 1 : lot témoin, par sérum salé à la dose 10 ml/kg ;
- Lot 2 : lot à traiter, par le décocté à la dose 100 mg/kg ;
- Lot 3 : lot à traiter, par le macéré à la dose 100 mg/kg ;
- Lot 4 : Le lot référence a reçu la morphine à la dose de 5 mg/kg par voie IP.

Le temps que met l'animal pour retirer sa queue est mesuré et considéré comme temps de réaction. On mesure le temps de réflexe, et de retirement de la queue tous les ¼ heures, dont un temps de «réaction normale de réflexe» de chaque rat est entre 2 et 4 secondes, et un temps supérieur à 6 secondes indique un effet inhibiteur sur la douleur.

I.2. Méthode d'étude des analgésiques antipyrétiques

- **Test de Koster à l'acide acétique chez la souris.**

Ce test consiste à rechercher une éventuelle protection vis à vis des crampes et torsions abdominales provoquées par l'injection (IP) d'acide acétique chez la souris. Les lots reçoivent oralement 30min avant l'injection de la solution d'acide acétique 3% par voie intrapéritonéale (IP) les différents traitements comme suit :

- Lot 1 : lot témoin, par l'eau distillé un volume de 0,2 mL ;
- Lot 2 : lot à traiter, par le décocté à la dose 100 mg/kg ;

- Lot 3 : lot à traiter, par le macéré à la dose à 100 mg/kg ;
- Lot 4 : lot référence a reçu Perfalgan 0,1ml (25mg/kg).



Figure 52 : Injection intrapéritonéale

L'injection provoque un syndrome douloureux qui se manifeste par des contorsions caractéristiques avec étirement des pattes postérieures et de la musculature dorso-ventrale. Le nombre d'étirements est comptabilisé 20 minutes après injection de l'acide acétique.

Le pourcentage de protection P est calculé comme suit :

$$\% = (Nb\ C\ Lt - Nb\ C\ Le / Nb\ C\ Lt) \times 100$$

Nb C Lt : Nombre moyen des crampes dans le lot témoin.
Nb C Le : Nombre moyen des crampes dans le lot traité.

Les moyennes de contorsions dans les groupes traités ont été comparées au groupe témoin. Une valeur de $p < 0,05$ est considérée comme significative et $n = 6$ représentent le nombre de rat dans chaque groupe.

II. Activité psychotrope

Dans le cadre de notre étude, nous avons utilisé les méthodes comportementales pour évaluer l'activité psychotrope de nos extraits.

L'étude consiste à tester l'action des extraits *d'Atractylis gummifera* sur l'activité psychique. Les effets sédatifs des substances psycholeptiques sont mis en évidence chez la souris sur une série de trois tests d'équilibration et de curiosité simples et différents :

- Test de la traction.
- Test de la cheminée.
- Test de la planche à trous

Les Médicaments utilisés pour tous ces tests :

- Chlorpromazine (LARGACTIL), ampoules injectables dosées à 25 mg.
- Thiopental (NESDONAL), soluté injectable à 10%. Test de la planche à trous.

II.1. Test de la traction

Cette méthode teste le réflexe de rééquilibration de l'animal. Elle consiste à suspendre la souris par les pattes antérieures à un fil métallique tendu horizontalement, et on compte le temps mis par la souris pour amener au moins une des pattes postérieure à toucher le fil. Une souris normale effectue un rétablissement en moins de 5 secondes (figure 53).



Figure 53 : Test de traction

II.2. Test de la cheminée

Cet essai, évaluant l'exploration et le désir de fuite, consiste à placer une souris dans une éprouvette de 30 cm dont la tête est en bas ; on note le temps mit par la souris pour sortir à reculons, les souris sont en sédation si le temps dépasse 30 secondes.

II.3. Test de la planche à trous

Ce test est conçu pour étudier le comportement de la souris confrontée à un nouvel environnement.

Il permet de mettre en évidence l'action inhibitrice des psycholeptiques sur une des composantes du comportement d'investigation, la réaction d'exploration, réaction en rapport à la fois avec la curiosité et avec le désir de fuite de l'animal. Pour ce faire, on a utilisé l'appareil de planche à trous model **LE-8825**, la planche mesure 40 cm x 40 cm par 2.2 cm d'épaisseur et comporte 16 trous de 3 cm de diamètre régulièrement espacés. Elle est faite en Perspex gris de finition matte pour éviter les reflets pouvant perturber le comportement de la souris (figure 54).

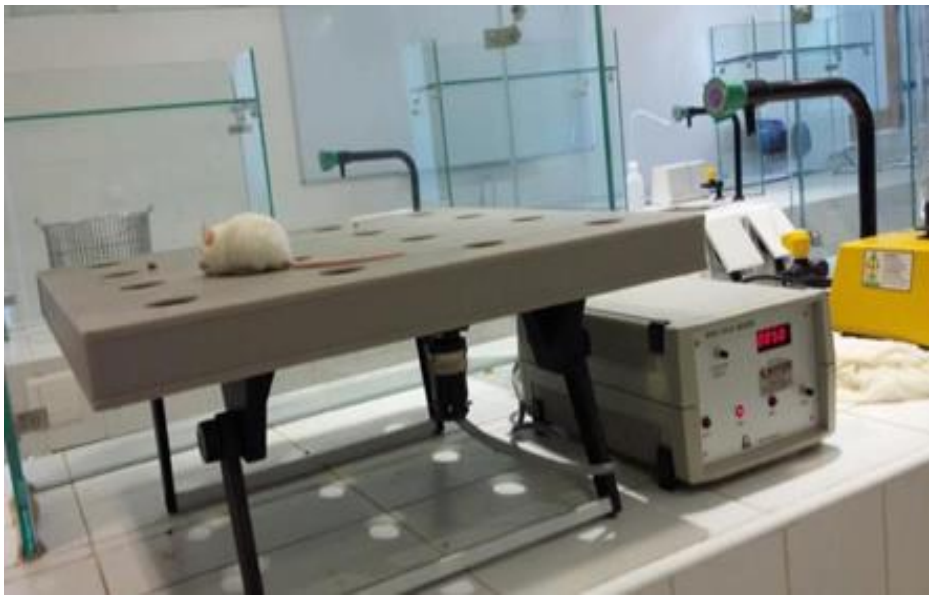


Figure 54 : Test de planche à trous

Toutes les souris sont maintenues dans leurs cages jusqu'au 30 minutes après l'administration des extraits d'Atractylis *gummifera* (100 mg/kg), cette propriété permet aux souris de ne pas acquérir une curiosité avant le test. Le comptage du nombre de trous explorés est révélé au bout de chaque minute pendant 5 min ; (les moyennes sont calculées pour l'ensemble des 5 minutes). Pendant toute la durée de l'essai, l'observateur doivent être rigoureusement silencieux et immobile**.**

II.4. Test de l'activité anti-inflammatoire

La recherche de propriétés anti-inflammatoires a été réalisée sur le modèle de l'œdème plantaire induit chez le rat (Wistar mâles, 250–270 g) par l'injection d'une suspension à 1 % (0,2 mL) de carragenine dans la patte droite ; technique inspirée de celles décrites par Winter et al (1962) et Adeyemi et al. 2002.



Figure 55 : Injection intrapéritonéale de la carragenine dans la patte du rat

Les produits testes ont été administres par voie orale 30 min avant l'injection de la carragenine. Les rats ont été mis à jeun 24 heures avant le traitement et divisés en quatre groupes de 12 rats chacun. Le groupe A témoin non traité, le groupe B a reçu du décocté (5 mg/ml), les groupe C a été traité avec 5 mg/ml du macéré d'*Atractylis gummifera*, et les rats du groupe D ont été traités avec l'indométacine, anti-inflammatoire non steroıdien de référence, à la dose de 100 mg/kg PC (12,5 mg/ml).



Figure 56 : Appareil de mesure de l'activité anti inflammatoire

L'évaluation de l'œdème a été suivie par l'enregistrement du diametre de la patte inflammée à T_0 ; 1,5 ; 3 ; 6 et 12 heures après l'injection de l'agent phlogogene.

Pour chaque groupe traité, les volumes moyens obtenus à ces différents relèves (Dt) ont été comparés à celui obtenu avant tout traitement (D0), permettant ainsi de calculer les pourcentages d'œdème (pourcentage d'inflammation), a` partir de la formule :

$$\text{Inflammation } \% = \frac{(\text{Dt} - \text{D0})}{\text{D0}} \text{ X } 100$$

Tandis que le pourcentage d'inhibition de l'œdème a été´ calculé à partir de la formule : (Lanhers et al, 1992).

$$\text{Inhibition } \% = \frac{(\text{Dt} - \text{D0})\text{témoin} - (\text{Dt} - \text{D0})\text{traité}}{(\text{Dt} - \text{D0})\text{témoin}} \text{ X } 100$$

Activités pharmacologique d'*Atractylis gummifera* in *Vitro*

I. Evaluation du pouvoir antioxydant

La capacité des extraits à piéger le radical DPPH a été mesurée en utilisant la méthode de Wu, Chen et Shiou (2003). 0,1 ml de diverses concentrations des 'extraits ou d'étalon a été ajouté à 1,5 ml de solution éthanolique contenant 0,1 mmole de DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle). Les mesures d'absorbance ont été lues à 517 nm. L'absorbance du mélange a été mesurée à 517 nm avec un spectrophotomètre (Jasco V-530) après 30 min de temps d'incubation à température ambiante dans l'obscurité. Le pourcentage d'inhibition a été calculé par l'équation suivante:

$$I\ (\%) = (1 - \underline{A_s}) * 100$$

$$A_b$$

Où As est l'absorbance du contrôle, et Ab est l'absorbance de l'échantillon. BHT a servi de contrôle positif. Les valeurs de CI50 ont été calculées comme la concentration d'une inhibition de 50% du radical DPPH.

II. Evaluation de l'activité antibactérienne

II.1. Test de sensibilité aux antibiotiques : Antibiogramme

Dans le but de mieux caractériser nos isolats bactériens, les souches bactériennes ont été soumises à un antibiogramme selon les conditions du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie au laboratoire du Professeur Bouceta à Fès (SFM, 2010). Les souches bactériennes en phase exponentielles sont alors utilisées pour préparer des inocula de concentration 10^7CFU/ml qui seront ensemencés sur milieu de culture Müeller-Hinton. Les disques d'antibiotiques sont ensuite apposés sur le milieu de culture puis les boites de Pétri sont incubées à 37°C pendant 18 à 24h. Les antibiotiques utilisés sont consignés dans le tableau 5 ci-après.

Tableau 6 : Antibiotiques utilisés en fonction des espèces bactériennes

Espèces bactériennes	***Escherichia coli***	***Klebsiella pneumonia***	***Pseudomonas aeruginosa***	***Acinetobacter***
Antibiotiques	Oxaciline ceftizoxime cefaclor ofloxacin vancomycine penicilline amoxiciline ticarciline fosfomycine	silpham Oxaciline cefaclor vancomycine penicilline amoxiciline ticarciline fosfomycine Nitrofuranioine Céfalotine Cefotaxime Colistine	Trmetoprime imipenème Amikacine pipériciline Ceftazidime ciprofloxacine Ticarciline Colistine penicilline vancomycine ofloxacine Kanamycine Nitrofuranioine cefaclor ceftizoxime Oxaciline	silpham Oxaciline cefaclor ceftizoxime ofloxacine Kanamycine Nitrofuranioine vancomycine penicilline

II.2. Tests antimicrobiens : Technique de diffusion sur disque.

Dans les conditions de stérilité, les inocula bactériens de 10^8 cfu/ml sont préparés dans la saline stérile à partir de culture bactériennes des différentes souches en phase exponentielle sur milieu gélosé au tryptone et au soja (TSA). Les boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre contenant le milieu TSA sont inoculées à l'aide d'un étaloir. Des disques de papier filtre stérile de 6 mm de diamètre sont été placés dans le centre des boites de Pétri inoculées. Puis, vingt (20) µl d'extrait à tester (macéré, décocté) sont posés sur ces disques de papier filtre. L'activité des différents extraits est évaluée en mesurant le diamètre des zones d'inhibition en millimètres (mm) après 18 à 24 heures d'incubation à 37 ° C. Les expériences sont faites en cinq répétitions. Les tests de l'antibiogramme sont utilisés comme témoins positifs.

II.3. Technique de microdillution : Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

La détermination des CMI des differents extraits de racine d'*A. gummifera* est réalisée par la méthode de macrodilution en milieu liquide. Le milieu de culture choisi pour ce faire est le bouillon cœur-cerveau introduit dans des tubes stériles à un volume de 2,5 ml par tube. Les extraits sont dilués de sorte à obtenir la gamme finale de dilution suivante d 1/2 - d 1/25 – 1/50- d 1/100 – 1/250- 1/500 par rapport à la solution mère initialement préparée et stockée. Un volume de 0,5 ml est ensuite prélevé de chaque dilution et introduit dans chaque tube de milieu de culture. Les inocula sont quant à eux préparés de sorte à obtenir concentration finale de 10^5 cfu/ml dans chaque tube. L'eau stérile est utilisée comme témoin négatif à la place de l'extrait. Après homogénéisation, les tubes sont incubés à 37°C pendant 18 à 22h. Après incubation, les tubes sont observés à l'œil nu pour détecter la présence ou l'absence de turbidité (croissance bactérienne) dans les tubes. La CMI est la plus petite concentration (dilution) d'extrait pour laquelle aucune croissance n'est observée à l'œil nu.

II.4.Détermination concentrations minimales bactéricides (CMB)

Les tubes contenant des dilutions où il n'y a pas de croissance bactérienne visible sont ensemencés sur milieu de culture TSA à partir de 1ml prélevé par tube. Une incubation et lecture des boites de Petri dans les mêmes conditions que précédemment est faite. La plus faible concentration présentant une disparition complète des bactéries est la concentration minimale bactéricide.

3ème Partie : Résultats et discussion

Criblage phytochimique

La mise en évidence des différentes classes des métabolites secondaires constituant la plantes, nous a permis d'avoir une idée sur ses activités pharmacologiques et biologiques. Dans la présente étude, nous avons réalisé des tests phytochimiques sur les extraits aqueux (Décoctés et macérés) de la racine *d'Atractylis gummifera*. Ces tests sont en relation avec l'intensité du précipité et de la coloration qui sont à leurs tours proportionnelles à la quantité de la substance recherchée.

Ainsi :

- Une réaction franchement positive est représentée par : +++
- Une réaction moyennement positive est représentée par : ++
- Une réaction faiblement positive est représentée par : +
- L'absence de la substance est représentée par : -

Les résultats de la composition des racines *d'Atractylis gummifera* par screening phytochimique sont reportés dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Criblage phytochimique d'*Atractylis gummifera*

Groupes chimique	**Décocté**		**Macéré**	
	50g/l	500g/l	50g/l	500g/l
Polyphénols	+	+++	+	++
Coumarin	+	++	+	++
Terpenoide	+	++	+	++
Quinon	+	++	+	+
Tanin	+	++	+	++
Flavonoide	+	++	+	++
Saponoside	-	+	-	+

Cette étude nous a permis de déceler que les racines *d'Atractylis gummifera* contiennent aussi bien des tanins, des flavonoïdes, des coumarins, des terpenoides, des quinon et sdes phénols dont la teneur varie en fonction du type d'extraction et de la dose utilisée.

D'après l'étude réalisée par LEFRANC en 1866, l'analyse de la partie racinaire d'*Atractylis gummifera* L récoltée en avril et desséchée à l'air, donne des valeurs en proportions très variées selon qu'il s'agisse d'insuline (46,5%), de sucres (8%), de cellulose (25%), de matières minérales (4.5%) ou de l'eau (4%), en plus des hétérosides diterpéniques (atractyloside et carboxyatractyloside), des hétérosides flavonoïdiques (orientine, homo-orientine, corymboside, néocorymboside), des aspargines, des acides aminés (acide aspartique et glutamique, proline, leucine, valine, et tryptophane), des acides organiques (acide acétique, isovalérianique, oxalique et malique) et des traces d'huile essentielle.

Cependant, l'étude quantitative des extraits d*'Atractylis gummifera* que nous avons élaborée au moyen des dosages spectrophotométriques, avait pour objectif de déterminer la teneur en phénols totaux. La principale raison du choix de cette substance réside dans le fait que la majorité des propriétés antioxydantes, pharmacologique et antimicrobiennes des plantes leur sont attribués.

Les polyphenols sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, polleins, fruits et graines) et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogenèse, la germination des graines ou la maturation des fruits (Crozier et al, 2006). Ces phénols sont solubles dans les solvants polaires. Ce sont surtout des antiseptiques (arbutoside de la busserole), des antalgiques et des anti-inflammatoires (Garnero, 2000). On suppose que les plantes, en les produisant, cherchent à se prémunir contre les infections et les insectes phytophages.

Il existe une très grande variété de phénols, de composés simples à des substances plus complexes. Les phénols sont principalement des anti-inflammatoires et antiseptiques, les principales classes de composants phénoliques sont : les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des polyphénols, les tanins, et les coumarines (King et Young, 1999 ; Tapiero et al, 2002).

Cependant, Les phénols sont estimés par plusieurs méthodes, dont la plus utilisée est celle de Folin-Ciocalteu. Ce réactif est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique (H3PW12O40) et d'acide phosphomolybdique (H3PMO12O40). Il est réduit par les phénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (Boizot et Charpentier., 2006). En présence des polyphénols, le complexe Folin-Ciocalteu change sa couleur et vire du jaune

au bleu, ce qui permet de mesurer l'intensité de la couleur à longueur d'onde de 765 nm (Huang et al, 2005).

Les résultats du dosage des phénols totaux montrent que la plus faible teneur a été enregistrée dans le cas de l' Hexane (24.02 ±0.5) suivie par le macéré (39.83 ±1.71), le décocté (47.11 ± 0.85) et l'Acétate (75.88 ±1.91), alors que la meilleure teneur a été observée, comme le montre le tableau 8, chez l'extrait Méthanolique (182.66 ±0.21).

Tableau 8 : Teneur en phénol des différents types d'extrait d*'Atractylis gummifera*

	Type d'extrait				
Teneur en phénol	Décocté	Macéré	Acétate	Méthanol	Hexane
(mg GAE / g DW)	47.11 ± 0.85*	39.83 ±1.71*	75.88 ±1.91**	182.66 ±0.21***	24.02 ±0.50

*les valeurs suivies d'un même symbole ne sont pas significativement différentes au seuil de probabilité de 5% selon le test de S-N-K.

La teneur en polyphenol peut nettement varier d'une étude à l'autre, même pour la même plante, et ce à cause d'intervention de différents éléments d'ordre interne ou externe, qui peuvent interagir et influencer la composition chimique. En effet, Djeridane et al. (2006), ont montré dans une étude réalisée sur onze plantes médicinales que la teneur en phénols totaux d'un extrait éthanolique de feuilles a été de l'ordre de 20,38 mg EAG/g Ps. Ce même auteur en 2007, soit une année après, a trouvé des teneurs 5 fois plus élevées (103.4 mg EAG/g Ps) pour la meme plante. Cette différence dans les teneurs peut être attribuée, entre autres, aux conditions environnementales et expérimentales, à la période et le lieu de collecte d'échantillons et/ou aux facteurs génétiques...

Cependant, les teneurs en polyphénols totaux des extraits d'*Atractylis gummifera* dosées dans cette étude sont relativement identiques à celles obtenues par d'autres auteurs comme Bruneton (1999) sur des plantes appartenant à la même Famille (Asteracéa).

Toutefois, la teneur en phénol, n'a pas encore fait, à notre connaissance, l'objet de détermination sur les racines *d'Atractylis gummifera* du Maroc.

De notre avis, nous estimons que l'ensemble des résultats du screening phytochimique expliquent en partie, et ce de façon rationnelle, l'engouement des tradithérapeutes à utiliser les plantes médicinales, notamment le chardon à glu aux fins de soins antiinflammatoires, anti bactériens et autres. De nombreux exemples issus des travaux scientifiques tirés de la bibliographie étayent notre hypothèse (BRUNETON J, 1999). Par ailleurs, les résultats des tests biologiques et pharmacologiques nous permettront de confirmer ou d'infirmer notre assertion.

Étude Toxicologique

I. Toxicité aigüe

La toxicité d'*Atractylis gummifera* est due à la présence des deux glycosides diterpénoïdes Atractyloside (ATR) et Carboxyatractyloside (CATR), produits par plusieurs plantes, dont le chardon à glu, présent dans la région méditerranéenne. Toutefois, une étude réalisée par Liang-Yu et al en 2013 sur ces deux molécules toxiques, a montré que le CATR (qui est d'une toxicité beaucoup plus élevée que ATR) est extrêmement sensible à la température, d'où l'idée et la nécessité de tester à la fois la toxicité du décocté et du macéré à fin de mettre en évidence cet impact thermique, sur la stabilité des molécules contenues dans les extraits de racine d'*Atractylis gummifera*, et revérifier les valeurs de DL_{50} souvent très variable d'un travail à l'autre.

L'administration par voie orale du décocté et macéré sous 5 concentrations chacun (0,01 ; 0,1 ; 1 ; 2,5 ; 5 et 10 g/Kg) a montré que la DL_{50} du décocté de la racine sèche d'Atractylis gummifera, démontrée par la présente étude a été de l'ordre de (5,01g/Kg), alors que la toxicité la plus élevée a été enregistrée dans le cas du macéré, avec une DL_{50} de l'ordre de (2,32g/Kg). Les résultats de ce test sont indiqués dans la figure 57.

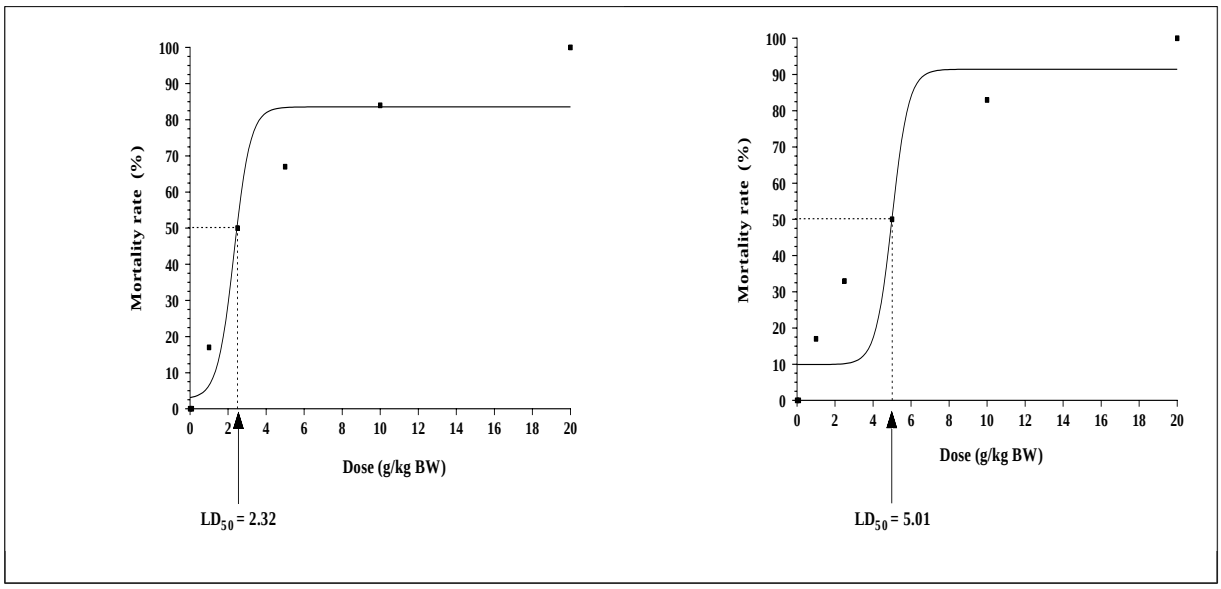


Figure 57 : LD_{50} de la racine d'*Atractylis gummifera*

Les deux principes actifs responsale de la toxicité d*'Atractylis gummifera* (ATR et CATR) agissent par inhibition du transport des nucléotides phosphorylés ADP et ATP à travers la membrane mitochondriale interne, ce qui empêche par conséquent la phosphorylation oxydative (Koechel et al, 1993).

L'atractyloside (ATR) intervient au niveau de l'adénine nucléotide translocase ou ADP/ATP translocase par voie compétitive grace à son analogie structurale avec ce dernier, et se fixe sur la translocase, l'empêchant ainsi de pénétrer dans la matrice mitochondriale et par conséquent, d'être transformé en ATP (Bruni et al, 1965).

Toutefois, les résultats obtenus par le présent travail montrent que la toxicité de la racine d'*Atractylis gummifera* dépend aussi bien du type d'extrait employé (Décocté/macéré) que de la concentration administrée. Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par Mokennon et al (2017).

Sur la base de ces résultats, il apparait que la DL_{50} du macéré est plus élevée que celle du décoté. Cette différence de valeurs obtenue entre les deux extraits, peut trouver son origine dans la différence de leur composition chimique, plus particulièrement en terme de disponibilité des deux heterosides (ATR et CATR) qui varient du point de vu structurel. En outre, cette différence structurelle, entre ces deux composés, influence énormément l'impact de la molécule en terme de toxicité, surtout lorsque l'on sait que CATR est beaucoup plus toxique qu'ATR (Vignais et al, 1978) et qu'elle est facilement transformable en ATR (figure 56) par décorboxylation suite à un traitement thermique comme l'ont rapporté d'ailleurs Lemasters et al. (1979) et Obatomi et al. (1998). Cette conversion d'ATR élucidée par la figure 56, trouverait son explication, selon Danieli et al. (2005), dans la formation d'ATR, qui est cinétiquement favorisée, et d'épi-ATR dans la plante, résultant d'une décarboxylation enzymatique du CATR ou d'une isomérisation d'ATR en épi-ATR. Ces résultats vont dans le même sens que ceux qu'on a obtenu dans cette étude et donnent plus de sens aux teneurs élevées en CATR dans le macéré émanant d'extractions élaborées à froid. Par ailleurs, nous trouvons aussi utile de souligner les travaux de Vignais et al. (1978) qui ont montré également que l'un des groupes les plus importants dans la toxicité d'ATR est le groupe carboxyle C-4' de l'anneau diterpène : sa réduction à l'alcool produit un composé non toxique, atractylitriol.

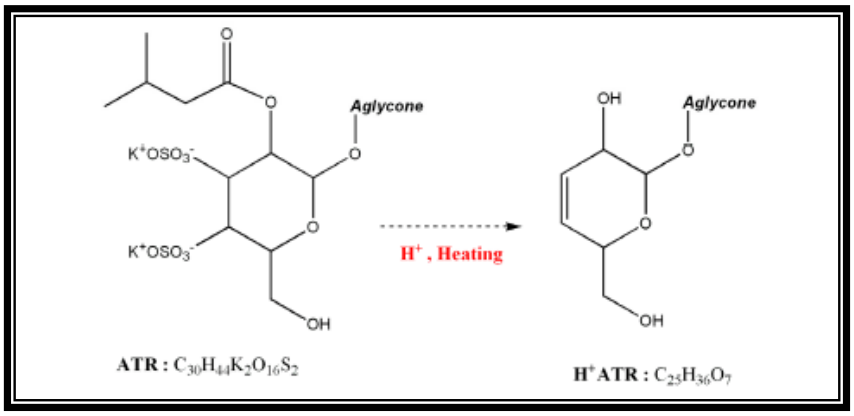


Figure 58 : Dégradation de la molécule d'ATR par acidification et température (Liang-Yu et al ; 2013)

La toxicité de l'ATR dépend également du groupe méthylène - 16 C dont la réduction laisse un composé de deux ou trois fois moins puissant qu'ATR. L'acétylation des deux groupes libres hydroxyles d'ATR, C-15 d'atractyligenin et C-6 du groupe hydroxyle libre sur la molécule de glucose, diminue de 100 fois la puissance ihibitrice d'ATR (Vignais et al, 1978). Ce qui rejoint et explique nos résultats. Cependant, les dérivés obtenus par l'élimination de l'acide isovalérique ou les groupes sulfate sont également moins efficaces que ATR (Vignais et al, 1978). Par exemple, Fontana et al. (1994) ont étudié les effets des deux atractylosides de Coffea arabica sur le métabolisme glucidique chez le rat par une mesure de niveaux de glycémie, lactate et pyruvate, ainsi que l'hépatique musculaire et le glycogène cardiaque. Dans cette étude, les analogues ATR ont été utilisés à une dose d'environ 150 mg / kg, ce qui correspond à la DL_{50} en ATR chez le rat, lorsqu'il est administré par la voie s.c (Luciani et Carpenedo, 1978), le 2-O- atractyligenin a montré la même activité que atractyloside, à l'inverse de l'autre glycoside analogique sans le groupe isovalérique, était presque inactif.

L'hétérogénéité entre les valeurs de DL_{50} obtenue dans les études ultérieures peut être due ou expliquée par plusieurs facteurs, notamment le climat de la zone de prélévement de la plante, la composition du sol, le moment de la récolte (stade de developpement physiologique), la méthode d'extraction en plus des facteurs génétiques, influençant la teneur en glucosides diterpénoïdes du rhizome d'*Atractylis gummifera*. Une étude quantitative a montré qu'*Atractylis gummifera* d'origine sicilienne avait une teneur en ATR plus élevée que celle d'origine sarde, même si les deux plantes avaient été acclimatées sur un même territoire différent de l'habitat d'origine (Toth, 1964, Fassina 1962).

Toutefois, Plusieurs auteurs dont Viala et Cano en 1965, puis Contessa et Fassina en 1978, ont montré que la teneur en atractyloside des parties hypogées du végétal est plus importante en hiver qu'en printemps. Pour les parties souterraines du chardon à glu récoltées dans la région d'Alger en décembre et en avril, les taux respectifs sont de 1,34 g et 0,97 g en hétérosides par 100 g de plante sèche (Abtroun et al, 1986). Au Maroc, Romeuf et al. (2006) rapportent des teneurs de 0,2%.

La toxicité diffère également entre les différentes espèces d'animaux utilisées dans les essais de laboratoire et entre les différentes souches de la même espèce (rats par exemple : albinos et Wistar) utilisées. Chez les rats albinos, ATR n'est pas toxique à des doses allant jusqu'à 200 mg / kg, alors que chez les souches Wistar, 60 mg / kg peuvent entraîner la mort.

La toxicité est plus élevée chez les chiens que chez les souris et les rats, suggérant une toxicité encore plus élevée chez l'homme (Luciani et Carpenedo, 1978). La toxicité rénale diffère également entre les différentes espèces : par exemple, les lapins et les cochons d'Inde ne montrent pas de nécrose rénale aux doses d'ATR qui sont néphrotoxique chez le rat (Carpenedo et al, 1974). La toxicité diffère également chez les rats mâles entre albinos souches et Wistar : pour les rats albinos ATR n'est pas toxique à des doses allant jusqu'à 200 mg / kg, alors que les souches Wistar 60 mg/kg peut conduire à la mort.

Tableau 9 : teneur en atractyloside des racines d*'Atractylis gummifera* L en fonction de l'époque de récolte (Fassina et al, 1962)

	Periode de recolte	**Teneur en ATR**
Sardinia	June	0.12±0.013
	Octobre	0.19±0.036
	decembre	0.33±0.045
Sicily	May	1.21±0.038
	décembre	1.57±0.101

Selon les normes qui classent les substances selon leur DL_{50} et d'après les résultats obtenus dans cette étude (tableau 10), le macéré et le décocté des racines d*'Atractylis gummifera* sont considéré comme étant légèrement toxique à non toxique . Ces résultats sont comparables à ceux trouvés par Santi et al en 1955, qui ont procédé aussi par gavage des rats avec de l*'Atractylis gummifera* et qui l'ont classé parmi les substances légèrement toxiques (1100 mg / kg).

Tableau 10 : Classe de toxicité selon Hodge and sterner (2005).

Toxicity rating	Commonly used terms	LD_{50}
1	Extremely toxic	Less than mg/Kg
2	Highly toxic	1-50mg/Kg
3	Moderately toxic	50-500mg/Kg
4	Slightly toxic	500-5000m/Kg
5	Practically non toxic	5000- 50000mg/Kg

Mais même si La DL_{50} obtenue au niveau de ce travail est considérée comme étant légèrement toxique à non toxique ; il ne faut pas omettre le phénomène de bioaccumulation et où le toxique peut s'accumuler dans le corps mais son action toxique n'apparaîtra que lorsqu'elle sera mobilisée dans les tissus dans lesquels il s'est déposé. Ces résultats nous incitent à s'intéresser de plus près aux problèmes de la toxicité chronique, comme à bien d'autres pour mieux mettre en exergue les quelques paramètres physico-chimiques impliqués dans le processus de toxicité.

Le changement de comportement, le vertige et la réduction d'activité des rats observés au cours des essais montrent une large distribution et un effet toxique général sur le corps même sur le système nerveux central. La mortalité se manifeste à des doses supérieures à 0,1 g / kg, ce qui n'exclut pas les effets néfastes sur le consommateur en cas d'ingestion répétée, d'ingestion prolongée dans le temps et d'ingestion de fortes doses quotidiennes. Sachant qu'il n'existe pas de données sur les doses létales d'atactyloside chez l'être humain, la transposition de données animales à l'être humain ne peut être appliquée en raison de l'absence de données cinétiques sur le volume de distribution de l'atractyloside, valeur essentielle pour le calcul de la toxicité.

II. Toxicité chronique

Les résultats de la toxicité chronique du décocté des racines d'*Atractylis gummifera* sont répartis en quatre points :

- Comportement des animaux ;
- Evolution du poids corporel des animaux ;
- Analyse des constantes biochimiques du sang et des urines ;

- Examen anatomopathologique des organes des animaux sacrifiés.

II.1. Comportement des animaux

Durant toute la période du traitement, aucune mortalité n'a été enregistrée ni dans le lot des témoins ni dans les lots des rats traités.

Les rats traités avec du décocté manifestent une légère sédation, pendant environ 15 à 20 minutes, juste après l'administration de l'extrait puis reprennent leur état normal.

Et aucun changement notable lié au comportement général n'a été enregistré chez les rats traités par les extraits d'*Atractylis gummifera* par rapport au groupe témoin.

II.2. Evolution pondérale

Au cours des 40 jours d'évaluation de la toxicité subchronique, tous les rats ont reçu de l'*Atractylis gummifera* par voie orale avec une dose répétée de 0.25 g / kg et de 0.5 g / kg de poids corporel selon les groupes de traitement. Les résultats de l'évolution pondérale des animaux des deux groupes traités sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 11 : Poids corporel des rats traités par le décocté en deux doses d'*Atractylis gummifera* au cours de la phase subchronique.

Jour de mesure après traitement	Témoin	0.25 g/kg/j d'*Atractylis gummifera*	0.5 g/kg/j d'*Atractylis gummifera*
Jour n° 1	206.17 ± 13.62	202.24 ± 31.52	217.74 ± 21.64
Jour n° 4	210.52± 12.72	204.45 ± 10.81	220.12 ± 21.37
Jour n° 8	218.19 ± 11.70	209.59 ± 19.58	222.67 ± 24.38
Jour n° 12	223.47± 11.59	211.70 ± 24.66	226.13 ± 26.31
Jour n° 16	228.61± 13.62*	217.96 ± 31.59*	232.97 ± 26.81*
Jour n° 20	234.45 ± 15.12*	221.96 ± 30.05*	235.99 ± 24.36*
Jour n° 24	239.75 ± 17.96*	225.98 ± 30.96*	238.81 ± 17.41*
Jour n° 28	243.03 ± 18.52*	231.88 ± 28.41**	240.90 ± 26.65*
Jour n° 32	251.27 ± 19.21**	234.26 ± 27.50**	244.24 ± 19.95**
Jour n° 36	254.69 ± 21.88**	239.88 ± 38.38**	251.26 ± 17.00**
Jour n° 40	265.28 ± 27.46 **	241.6 ± 37.72**	255.62 ± 13.53 **

*les valeurs suivies d'un même symbole ne sont pas significativement différentes au seuil de probabilité de 5% selon le test de S-N-K.

En comparaison avec le poids corporel du premier jour de l'expérience, un gain significatif et normal du poids a été noté, au bout de 40 jours, aussi bien chez les rats témoins que chez ceux traités par les deux extraits testés. Toutefois, une différence est observée entre les deux lots. Quant au poids des animaux traités avec les extraits d'*Atractylis gummifera* il reste inférieur, bien que statistiquement non significatif, à celui des animaux non traités.

Le poids des rats témoins a connu une augmentation de 31% au cours des 40 jours d'essai, alors que le gain pondéral enregistré dans le cas des groupes traités avec 0.25 g/kg/j et 0.5 g/kg/j d'extrait aqueux d'*Atractylis gummifera* a été successivement de l'ordre de 19.4% et 17.39%. Ce qui fait une différence d'évolution pondérale de l'ordre de 11.6% entre le groupe témoin et le groupe traité avec 0.25 g/kg/j d'extrait d'*Atractylis gummifera* face à une différence d'évolution pondérale plus importante (13.61%) noté entre le groupe témoin et le groupe traité par 0.5 g/kg/j . Des résultats analogues ont été d'ailleurs trouvés par Mokennon et al. en 2017.

II.3. Examen anatomopathologique

II.3.1. Hépatotoxicité

Les observations faites sur les lames histologiques montrent des lésions tissulaires différentes selon la dose et la durée du traitement. A la dose de 0.25 g/kg/j nous avons observé dès le 2ème jour des noyaux clarifiés, le quatrième jour des infiltrations lymphocytaires des espaces portal, en plus des noyaux clarifiés avec une légère augmentation de taille. Des observations similaires ont été enregistrées le 8ème et le 12ème jour mais de façon plus prononcée. Mais dès le 16ème jour des suffusions hygiques ont été apparues. Cependant, ce n'est qu'à partir du 20ème jour qu'on a commencé à observer quelques ≪ hyaline droplets ≫ (déports protéiques éosinophiles) dans le cytoplasme des cellules des tubes contournés. Ils sont en plus grande quantité au 40ème jour en plus d'apparition de quelques foyers de nécrose tubulaire, une basophilie faible à modérée, quelques tubules dilates et une infiltration de cellules inflammatoires modérées minime à faible au dernier prélèvement (40ème jour).

A la dose de 0.5 g/kg/j, les noyaux clarifiés, l'augmentation (ballonnement) des tailles de noyaux ainsi que des infiltrations lymphocytaires des espaces ont marqué la première moitié de la période de traitement, nécrose tubulaire apparait légèrement dès le 16ème jour, avec également des ≪ hyaline droplets ≫ (grade 2 à 3). Au 20 jour, on observe les mêmes lésions mais en plus grande quantité, avec une basophilie des cellules tubulaires. Au 40ème jour, la

nécrose tubulaire est plus marquée chez tous les animaux, associée à une basophilie marquée, mais également l'inflammation et la dilatation tubulaire (grade 2 à 3). Des protéines sont également visibles en quantité minime à faible.

La racine du chardon à glu a déjà été incriminée pour des hépato et néphrotoxicité fatals que ce soit sur l'homme ou sur les animaux domestiques se nourrissant sur les plantes contenant de l'atractyloside. Avec une grande ressemblance entre les résultats histologiques des organes humains et animaux (Stuart et al, 1981 ; Martin et al, 1986).

D'Apres Larrey et al. (1995), une nécrose tubulaire est provoquée suite à l'administration d'ATR, manifesté par des anomalies métaboliques locales ou processus systémiques, caractérisés par une perte de coloration en bordure de brosse pour les cellules proximales, aplatissement diffus de cellules entraînant une dilatation de la lumina, une perte de cellules individuelles de la muqueuse, et l'élimination des cellules dans la lumina (larrey et al, 1995).

Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par Larrey et al. (1995), et en désaccord avec ceux trouvés par Saidu et al. (2007), et qui ont rapporté des états normaux de tissus de foie, de rein et du cœur de rat, après une exposition aiguë et subchronique de 28 jours aux 'extrait aqueux de feuille d'Albizia chevalieri. Cependant, un tel désaccord entre les résultats peut être lié soit à la différence de dose en ATR et CATR, contenu dans l'extrait testé, ou à la durée d'exposition à ce dernier.

L'évaluation de la toxicité d'*Atractylis gummifera* montre une hépatotoxicité, caractérisée par des altérations histopathologiques du foie. De plus, l'*Atractylis gummifera* à forte dose induit une hépatotoxicité plus grave que l'exposition à une faible dose, une vacuolisation hépatocellulaire, une nécrose et une infiltration de cellules inflammatoires ont été observées lors de l'examen. Par conséquent, ces résultats expliquent au moins en partie, l'hépatotoxicité de l'*Atractylis gummifera* rapportée dans la médecine traditionnelle.

L'Atractyloside pur produit également des lésions semblables chez les animaux (Carpenedo et al, 1974). Histologiquement, une dégénérescence centrolobulaire au niveau du foie a été généralement marquée (Caravaca-Magarinos et al. 1985 ; Georgiou et al. 1988 ; Hedili et al, 1989) et nécrose tubulaire proximale du rein (Bhoola 1983 ; Koechel et Krejci, 1993).

Les glycosides kaurene (ATR et CATR) induisent une hépatotoxicité chez la souris par le biais de son induction d'un stress oxydatif comme la peroxydation des lipides dans le foie, une

mort rénale et une nécrose hépatique (Pegel, 1981).Cependant, le principal composé toxique isolé de la plante a été identifié comme étant le carboxyatractyloside, un glycoside de kaurène précédemment appelé xanthostrumarium, et les ingrédients potentiellement toxiques comprennent plusieurs lactones sesquiterpéniques (par exemple, les guaianolides, les germacranolides et les éléménolides). Islam (2010) a découvert que les extraits au méthanol de plantes et de plantules matures présentaient une toxicité significative en induisant des anomalies significatives dans l'histopathologie du foie et des reins de rat et ont suggéré que le 11-hydroxy-11-carboxy-4-oxo-1 (5), 2 (Z) -xanthadien-12,8-olide, le daucostérol, le stigmastérol et le lasidiol-10-anisate pourraient être les principaux composés toxiques (Islam et *al*, 2010).

Plusieurs études ont démontré que l'exposition aux ATR et CATR induisait une toxicité sur le foie (Witte et al, 1990 ; Yin et al, 2008). Le mécanisme de toxicité a été proposé comme une perturbation de la phosphorylation oxydative, processus essentiel pour le métabolisme énergétique et le système de transfert de la cellule (Kamboj et Saluja, 2010). Il a été trouvé également que l'Atractyloside peut altérer les fonctions cataboliques et anaboliques in vivo (Georgiou et al, 1988), et sa consommation sous forme séchée (Coffea arabica) a été associée à un cancer du pancréas (Pegel, 1981).

Selon une étude réalisée par Yang Wang et al (2011), les examens histopathologiques des organes de souris qui ont subi une injection intrapéritonéale d'atractyloside à la dose de 50, 125 et 200 mg/kg pendant 5 jours, ont révélé qu'il n'y avait pas de blessures visibles.

II.3.2. Nephrotoxicité

L'observation directe des lésions tissulaires rénales au microscope est la technique la plus sensible pour dépister les effets néphrotoxiques de l'Atractylis (Goodsaid et al. 2009 ; Haschek et al, 2010). Les premières lésions observées en histologie pour les deux lots traités sont la clarification des noyaux (24h) et des suffusions hygiques. A partir du 16ème jour, on commence à observer des congestions sanguines, péritubulaires, atrophie des glomérules et formation de protéines focales coulées dans l'interstitium rénal. Alors qu'au-delà du 20ème jour, on note la présence des hyalines droplets et les nécroses commencent à devenir plus marquées (grade 2 -3) pour les deux doses administreés (0.25 g/kg/j et 0.5 g/kg/j).

Ces dépôts protéiques éosinophiles pourraient correspondre à une accumulation de protéines dans les lysosomes des cellules rénales due à une modification métabolique. En effet, le rein est un site de catabolisme de protéines de faible poids moléculaire (l'albumine, les chaînes légères d'immunoglobuline, la parathormone et le glucagon). Ces protéines passent dans le tubule proximal par endocytose (Maack et al, 1979).

Les vacuoles se déplacent dans la cellule vers les lysosomes, où elles fusionnent pour que s'effectue l'hydrolyse. Les acides aminés résultant de la dégradation rejoignent la circulation sanguine. Si cette balance est modifiée par augmentation du taux protéique filtré ou diminution du catabolisme, il existe une accumulation de protéines formant les hyalines droplets dans les lysosomes des cellules rénales (Greaves, 2007). Les aminosides entrainent une toxicité tubulaire directe (Cittanova-Pansard and Jacob 2007). Ils sont très peu métabolisés et éliminés essentiellement par filtration glomérulaire, puis ils sont réabsorbés et s'accumulent dans le rein conduisant à une atteinte des cellules tubulaires proximales (Laurent et al, 1983 ; Giuliano et al, 1986 ; Sohn et al, 2003 ; Polat et al, 2006 ; Nykjaer et al,

2009 ; Stojiljkovic et al, 2009). Les cellules tubulaires subissent des altérations métaboliques à l'origine d'une diminution de l'ATP intracellulaire (Devarajan 2006).

Les extraits de racine d'*Atractylis gummifera* ont causé une distribution de protéines éosinophiles interluminales, congestion et nécrose mineure dans le tissu rénal. Ceci est en accord avec une étude précédente sur extrait aqueux de feuille d'A. Chevalieri qui a provoqué une congestion et moulage de protéines tubulaires éosinophiles (Saidu, 2007).

D'autres informations importantes sur les effets toxiques des ATR viennent d'être étudiées in vitro utilisant des tissu rénaux (Obatomi et al, 1998 ; Obatomi et Bach, 1998). Cette méthode a permis de comparer la fuite enzymatique, la viabilité mitochondrial, le changements dans les niveaux d'ATP, la peroxydation lipidique, l'oxidation et la réduction des glutathion (GSH) au niveau des tissus rénaux et hépatiques provenant de différents animaux.

La néphrotoxicité d'ATR n'implique que les cellules du tubule proximal, alors que les cellules glomérulaires ne semblaient pas être touchées (Carpenedo et al, 1974). Dans les cellules du tubule proximal, ATR a provoqué un appauvrissement de GSH cellulaire (Obatomi et Bach, 1998). L'ATR peut agir en interférant avec le transport des cellules, la présence d'un fragment sulfate permet à ATR de passer par le transport d'anions, puis d'etre

accumulé dans les cellules rénales. Ce qui permet à l'ATR d'inhiber la captation des anions organiques de façon dose-et temps-dépendante (Koechel et Krejci, 1992 ; Obatomi et al, 1998).

L'effet toxique d'*Atractylis gummifera* découle de l'ATR, qui est un puissant inhibiteur de la phosphorylation oxydative dans les mitochondries. Cette action est exercée en particulier dans les cellules riches en mitochondries, comme les hépatocytes et dans les cellules épithélium des tubules proximal, qui contiennent des transporteurs qui permettent à ATR de traverser la membrane de la cellule.

ATR interagit avec le téléporteur adénine nucléotide (ANT) (Roux et al, 1996), une protéine mitochondriale contenu dans la membrane intérieure. ANT a deux fonctions principales : il est responsable d'antiport de l'ATP et de l'ADP, un important Système pour la phosphorylation oxydative et elle fait partie du complexe du port de transition de perméabilité, un pore non spécifique impliquée dans la perméabilisation des membranes mitochondriales, un important événement au cours de l'apoptose (Haouzi et al, 2002).

ATR et l'ADP interagir à la fois d'une manière similaire avec ANT parce qu'ils se ressemblent dans la géométrie et la distribution de charge (Stewart et Steenkamp, 2000): le caractère polaire des groupes sulfate dans la RTA correspond au groupe phosphate dans ADP; le glucose dans le groupe glycoside de ATR correspond au ribose de l'ADP et l'anneau condensé de ATR ressembler à la fraction purine de l'adénine.

La liaison sélective d'ATR à ANT présente deux conséquences importantes. Tout d'abord, ATR inhibe le transport ADP et inhibe l'accès à la phosphorylation des ADP mitochondriales supplémentaires au site situé dans le compartiment mitochondrial, ce qui bloque la phosphorylation oxydative et les réactions d'oxydation du cycle de Krebs (Quintanilla et al, 1979 ; Kholodenko et al, 1988).

En second lieu, ATR induit à l'ouverture de la transition de perméabilité mitochondriale ATN contenant des pores conduisant à la perméabilisation de la membrane et la libération de protéines solubles intermembranaires, y compris le cytochrome c. La translocation du cytochrome c des mitochondries vers le cytosol est une étape cruciale dans Fasinduced apoptose (Vancompernolle et al, 1998).

Les effets toxiques dus à l'inhibition de la phosphorylation mitochondrial sont la nécrose hépatique et l'insuffisance rénale chez les animaux et les humains. La toxicité aiguë de l'ATR diffère selon l'espèce animale et la voie d'administration. La toxicité est plus élevée chez les chiens que chez les souris et les rats, suggérant une toxicité encore plus élevé chez l'homme (Luciani et Carpenedo, 1978). La toxicité rénale diffère également entre les différentes espèces : par exemple, les lapins et les cochons d'Inde ne montrent pas de nécrose rénale aux doses ATR qui sont néphrotoxique chez le rat (Carpenedo et al, 1974). Toxicité diffère également chez les rats mâles entre albinos souches et Wistar : pour les rats albinos ATR n'est pas toxiques à des doses allant jusqu'à 200 mg / kg, alors que les souches Wistar 60 mg / kg peut conduire à la mort. Luciani et Carpenedo (1978) décrit l'action des ATR dans les différentes espèces. Les principaux effets sont sur le métabolisme glycidique: ATR épuise le glycogène in vivo par inhibition de la synthèse de glycogène, il augmente la concentration en acide lactique sanguin et la consommation d'oxygène diminue. Animaux empoisonné avec ATR meurent généralement dans des convulsions hypoglycémiques.

Également lorsque le composé est administré par voie intraveineuse il y a une caractéristique intéressante de l'empoisonnement ATR, qui est la longue durée de latence entre l'administration de l'ATR et l'apparition des premiers symptômes toxiques. Après une phase initiale d'hyperglycémie provoqués par l'épuisement des muscles squelettiques et le glycogène hépatique une phase d'hypoglycémie s'ensuit et qui a des conséquences importantes sur tout l'organisme, comme la dépression respiratoire, hypoxémie, acidose due l'augmentation de l'acide lactique dans le plasma, et enfin des convulsions. Donc la toxicité d'ATR après vagotomie et pancréatectomie (Santi, 1958) ne dépendre ni de l'interaction avec le système nerveux autonome ni des glandes impliquées dans le contrôle glycémique (Santi, 1958).

Dans une étude sur les rats, Hopps et al (1997) ont décrit les effets de l'ATR et certaines de ses dérivées sur la fonction rénale. Ils ont déterminé l'excrétion urinaire d'enzymes (bêta-Nacetyl- d glucosaminidase, alanine amino peptidase, gammaglutamyltransferase), des électrolytes (Na+, K+ et Cl-), les concentrations urinaires et du sang en créatinine chez les rats traités avec ATR, et deux dérivées atractyligenin ATR (un manque à la fois du groupe sulfate et de groupe isovalérate, l'autre n'ayant pas les seuls groupements sulfates). Ces expériences ont montré qu'ATR est hautement toxique pour les reins, comme le montre la

réduction de la clairance de la créatinine, tandis que l'atractyligenin laisse la fonction rénale pratiquement inchangée.

La toxicité ATR est liée à sa structure chimique et augmente lorsque les groupes hydroxyle en C-4 sont estérifié avec l'acide isovalérique ou lorsque les groupes hydroxyle en C-3 et C-4 sont estérifiés avec de l'acide sulfurique.

Ces changements suggèrent qu'ATR peut induire des effets toxiques par un processus oxydatif impliquant son groupement méthylène produisant ainsi un radical libre. Les produits intermédiaires n'ont pas été identifiés, mais des réactifs tels que l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène ou un groupe radical d'hydroxyle peuvent être impliqués (Obatomi et al, 1998).

II.4. Biochimie

Les différents paramètres biologiques et biochimiques ont été déterminés pour évaluer l'impact des racines d'*Atractylis gummifera* sur les différents métabolismes et organes cibles (tableau 12)

Tableau 12 : Effet du décocté d'*Atractylis gummifera* sur les paramètres biochimiques chez les rats Wistar suite à une administration orale Réitérée de la dose de 0.25 g/kg/j pendant 40 jours.

	Paramètres								
prélévement	**ALT**	**AST**	**GGT**	**CREA**	**UREE**	**PROT PLUS**	**BILI**	**ALB**	**ALP**
Temoin	97±0.71	31±1.2	6.2 ±0.82	5,9± 0.3	0,88±0.9	75±1.2	1,3±0.65	31,2±1.4	1082±1.7
2H	67 ± 1.5	183 ± 3.65	**8.5 ± 0.17***	**7,8 ±0.75***	0,6± 0.005	**68 ± 0.45***	1,4 ± 0.13	**24,6 ± 2.74***	249 ± 3.34
6H	**75 ± 7.52***	**162,6 ± 0.25***	7,3 ± 0.54	7.21 ± 0.01	**0.57± 0.06**	90 ± 0.79	**0,5 ± 0.09***	34,7 ±3.15	**654 ± 5.68***
12H	101.7 ± 0.17	274,3 ± 0.15	14 ± 0.79	6 ± 0.16	0,53± 0.36	89 ± 2,93	0;9 ± 0.04	29 ± 2.24	721 ± 2,93
24H	215,66 ± 0.54	108 ± 0.03	16 ± 0.02	5,5 ± 0.3	00,45± 0.15	84.6 ± 0.36	1 ± 0.79	24 ± 0.28	983 ±7.33
2J	199,75± 0.05	121 ± 2,11	11,8 ±3.06	**6,25 ± 0.36***	0,65± 0.01	83,25 ± 3.34	**1,22 ± 0.3****	**26,9 ± 0.15***	1223 ± 4.96
4J	**113 ± 0.12****	**286 ± 0.54****	**9,25 ± 0.15***	5,4 ± 0.54	1,57± 1.51	**70 ± 1,97***	2,27 ± 0.11	39,4 ± 2.40	**942 ± 2,1****
8J	137± 1.26	218 ± 3.65	16 ± 3.06	2,8 ±0.04	**0,61± 0.03**	33,5± 2,93	2,4± 0.36	39,6 ± 0.26	842 ± 1,97
12J	134 ± 0.63	274 ± 5.68	14 ± 0.16	**5,2 ± 0.79***	0,67± 0.09	59,6 ± 0.15	2,63± 1.51	43,6 ± 0.22	1232 ± 3.34
20J	150,33 ± 0.05	**266 ± 4.8****	16,6 ± 0.25	6 ± 0.39	0,63± 0.10	66,33± 0.34	1,63 ± 0.14	42 ± 0.17	1762 ± 1.64
40 j	**188.5 ± 0.02 *****	256 ± 0.63	**10 ±7.25***	7.2 ± 0.29	**0.73± 0.12**	**73 ± 0.18***	**2.65 ± 0.41 *****	**45.3 ± 0.20 ****	**1625± 4.27 *****

***les valeurs suivies d'un symbole different sont significativement différentes au seuil de probabilité de 5% selon le test de S-N-K.**

Les dosages biochimiques sanguins sont modifiés seulement après le deuxième jour, et ce pour les deux doses. Ces résultats sont précoces par rapport à ceux trouvés dans des études ultérieures réalisées sur la néphrotoxicité de quelques substances toxiques d'origine naturelles (Goodsaid et al, 2009 ; Sohn et al, 2003 ; Polat et al, 2006).

L'administration orale d'*Atractylis gummifera* (ATR et CATR) entraîne une augmentation significative en Alanine aminotransférase (ALAT), aspartate aminotransférase (AST) et la phosphatase alcaline (ALP) par rapport aux témoins.

Tableau 13 : Effet du décocté d'*Atractylis gummifera* sur les paramètres biochimiques chez les rats Wistar suite à une administration orale Réitérée des deux doses 0.5 g/kg/j pendant 40 jours.

	Paramètres								
prélèvement	**ALT**	**AST**	**GGT**	**CREA**	**UREE**	**PROT PLUS**	**BILI**	**ALB**	**ALP**
Temoin	97±0.71	31±1.2	6.2 ±0.82	5,9± 0.3	0,88±0.9	65±1.2	1,3±0.65	31,2±1.4	1082±1.7
2H	60 ±0.2	134 ± 1.03	**5±0.16***	**5,8± 0.36 ***	**0,66±0.11***	**60± 0.16***	1.5 ± 1.51	**24 ± 3.15***	685 ± 5.25
6H	68 ± 0.54	**129,5 ± 3.34***	5± 0.14	9,9 ± 0.22	0.68 ± 0.21	81 ± 1.12	**1 ± 0.13***	29,6 ± 2.24	**356.58 ± 1.12***
12H	**93 ±1.83***	150 ± 1.07	6± 0.17	6,4±0.09	0,71± 0.09	92± 3.34	1 ± 0.3	36 ± 0.20	244.3 ± 2,93
24H	111,33	212,3 ± 2.27	11±1,97	5,46±0.15	0,54± 0.01	93 ± 0.78	1,33 ± 0.36	28,2 ± 0.15	301.3 ± 4.26
2J	119.66	**248,33 ± 1.61****	5.4± 0.36	**6.2±0.14***	1,33±0.28	86± 0.79	1,33 ± 0.12	28,2 ± 0.17	280.6 ± 5.68
4J	112 ± 0.09	293 ± 2.12	9,33 ± 0.13	8,53 ± 0.29	**0,76± 0.2***	**63 ± 0.26***	2,3 ± 0.15	**38,06 ±2.40****	856.6 ± 4.61
8J	114,6 ± 0.54	356 ± 4.26	**8,66±0.04****	4,2±0.16	0,7± 0.15	**75,33 ± 0.22****	**1.37 ± 0.03***	30 ± 0.17	**961 ± 1,97****
12J	**131 ±0.03****	**356 ± 4.26*****	11,33±2,93	5,2± 0.3	0,61± 1.51	62,33 ± 0.18	2. 81 ± 0.14	**54,43 ± 0.12*****	1735 ± 3.34
20J	93,5 ± 0.2	273 ± 0.92	10,5± 0.12	6,4± 0.09	0,72± 0.79	61,33 ± 0.41	25,95 ± 0.09	47± 0.39	1365 ± 2.61
40 j	**185.7 ±0.13*****	264 ± 0.54	**11± 0.16*****	**6± 0.79***	**0.8 ± 0.33***	**83 ± 0.52****	**2.84 ± 0.01****	41.2 ± 0.27	**1660 ±7.33*****

***les valeurs suivies d'un symbole different sont significativement différentes au seuil de probabilité de 5% selon le test de S-N-K.**

L'ALT est principalement localisé dans le tissu hépatique, et des traces se trouvent dans les muscles squelettiques et le tissu cardiaque. Au niveau cellulaire, elle se situe dans le cytoplasme et les mitochondries. Ce marqueur biochimique pourrait quitter les tissus endommagés en cas de lésion histopathologique en particulier pendant une nécrose hépatocellulaire (Amacher, 2002 ; Choudhari, 2007 ; Dufourn, 2000]. Alors que l'AST est localisé dans le foie, le cœur, les muscles, le cerveau et les tissus des reins. De même, au niveau cellulaire, ils sont localisés dans le cytoplasme et les mitochondries et peuvent également quitter les tissus endommagés en cas de nécrose hépatocellulaire (Choudhari, 2007 ; Dufourn 2000). Quant à l'ALP, elle est localisée dans le foie, les voies biliaires, les os, le placenta, les reins et les intestins. Au niveau cellulaire, ils sont localisés dans la membrane.

Il pourrait y avoir aussi plus de production et de diffusion dans le sang en cas de lésions hépatobiliaires et de cholestase (Ozer 2008, Belansky 2013). L'Albumine est produite et localisée dans les tissus du foie et est libérée dans le sang en cas de dysfonctionnement hépatique, voire même sa synthèse en diminution (Saukkonen, 2006)

Les taux élevés d'ALT, ALP et AST observés dans le plasma, indiquent que L'*Atractylis gummifera* pourrait induire une lésion des hépatocytes en influant sur le métabolisme des acides gras et comme la voie de phosphorylation oxydative est un processus de génération d'ATP, cette observation ne peut que confirmer l'hypothèse selon laquelle les cellules sont passées à la glycolyse pour compenser la perte en ATP. Les mitochondries étaient censées être appauvries en ATP et non fonctionnelles.

L'augmentation d'acétate pourrait favoriser cela car elle stimule la croissance par la formation d'un supplément d'ATP (Marty-Teysset et al, 1996).

De même, les dosages effectués sur les rats traités montrent une augmentation de la quantité du GGT, une enzyme liée à la membrane et impliquée dans le métabolisme du GSH qui semble présenter des propriétés auto protectrices et inhibitrice de la mort cellulaire (Lee et al. 2008). GSH est considéré comme le tampon redox le plus important de la cellule et protecteur contre différentes formes d'oxydation des protéines. En absence totale de GSH, un stress oxydant provoque l'endommagement des composants cytoplasmiques et nucléaires des cellules ainsi que l'inhibition de leurs activités traductionnelles et transcriptionnelles. Cependant, de faibles concentrations de GSH protègent exclusivement les fonctions nucléaires, et cette protection est suffisante pour assurer la survie cellulaire au cours du stress oxydant.

En outre, il a été signalé que la GGT possède une action protectrice contre les effets toxiques des médicaments induits par les effets antioxydants (Zeng et al, 2012) et atténue les dommages hépatiques dus à l'activation des cellules de Kupper, les macrophages résidents du foie qui jouent un rôle crucial dans l'élimination des endotoxines d'origine intestinale du sang et diminue l'inflammation et le statut oxydatif (Seabra et al, 1998).

La GSh est une enzyme de détoxification et biotransformation des xénobiotiques ; son augmentation correspond probablement à des mécanismes de défense des cellules rénales (Rodilla et al, 1998). Cela pourrait expliquer la corrélation entre les observations

histologiques (nécrose tubulaire) et l'augmentation progressive de la quantité de GGT dans le rein lors du traitement.

L'augmentation du taux protéique et d'ALB pourraient correspondre à une accumulation de protéines dans les lysosomes des cellules rénales due à une modification métabolique. En effet, le rein est un site de catabolisme de protéines de faible poids moléculaire (l'albumine, les chaînes légères d'immunoglobuline, la parathormone et le glucagon). Ces protéines passent dans le tubule proximal par endocytose (Maack et al, 1979).

Les vacuoles se déplacent dans la cellule vers les lysosomes, où elles fusionnent pour effectuer une hydrolyse. Les acides aminés résultant de la dégradation rejoignent la circulation sanguine. Si cette balance est modifiée par augmentation du taux protéique filtré ou diminution du catabolisme, il existe une accumulation de protéines formant les hyaline droplets dans les lysosomes des cellules rénales (Greaves, 2007). Les aminosides entrainent une toxicité tubulaire directe (Cittanova-Pansard and Jacob, 2007). Ils sont très peu métabolisés et éliminés essentiellement par filtration glomérulaire, puis ils sont réabsorbés et s'accumulent dans le rein conduisant à une atteinte des cellules tubulaires proximales (Laurent et al, 1983 ; Giuliano et al, 1986 ; Sohn et al, 2003 ; Polat et al, 2006 ; Nykjaer et al ,2009; Stojiljkovic et al, 2009). Les cellules tubulaires subissent des altérations métaboliques à l'origine d'une diminution de l'ATP intracellulaire (Devarajan, 2006).

Les résultats montrent que les niveaux de créatinine ont diminué après l'administration d'*Atractylis gummifera*. Sachant que la diminution du taux de créatinine a été identifiée comme biomarqueur des dommages au foie (Du et al, 2013). Alors que La BILI est un bon indicateur d'hepatotoxicité, ce qui explique son augmentation au niveau des résultats obtenus dans le présent travail.

En général, l'urée augmente en cas de maladies rénales intrinsèques aiguës et chroniques, qui se caractérise par une diminution du volume de sang circulant efficacement dans les reins (Halaris, 1975). Ceci explique pourquoi le niveau d'urée augmente dans le sang. C'est un des bons indicateurs de lésion rénale.

Pris dans leur ensemble, les résultats montrent que les l'*Atractylis gummifera* induit une hépatotoxicité et nephrotoxicité chez le rat par le biais de son induction d'un stress oxydatif. Nous avons constaté que les métabolites altérés sont principalement impliqués dans le

métabolisme des acides biliaires, le métabolisme des acides gras, le métabolisme énergétique et certains métabolismes des acides aminés. Ce qui concorde avec les résultats trouvés par yang et al (2010) et qui ont rapporté une augmentation des taux plasmatiques de lipoprotéines de basse densité (LDL), de β-HB, de glutamate, de choline, de lactate, d'acétate, d'acétone, une diminution de la valine et du glucose chez le rat traité au Xanthium strumarium L et qui ont conclu que le mécanisme toxicologique du Xanthium strumarium Lest associé au métabolisme énergétique et lipidique.

Activité in Vitro d'Atractylis gummifera

I. Activité anti oxydante

L'ensemble des extraits étudiés révèlent des propriétés anti- oxydantes intéressantes, ce qui se manifeste par des valeurs importantes de l'activité anti oxydante qui varient entre 92.06% pour l'extrait obtenu par l'hexane et 99.15% pour l'extrait méthanolique. Les résultats sont représentés dans le Tableau 14.

L'efficacité d'un antioxydant peut être définie comme sa capacité à fixer des Radicaux libres, donc à arrêter la propagation de la réaction en chaine. Afin d'évaluer cette efficacité, la méthode au diphényl-picryl hydrazyl (DPPH) est utilisée. Le degré de décoloration indique le potentiel piégeur des antis oxydants présents dans les extraits (Yi et al, 2008). L'analyse statistique montre que les solvants utilisés présentent des différences Significatives ($p<0,05$) (tableau 14) L'extrait au Méthanol présente l'activité anti radicalaire la plus élevée (99,15%), tandis que l'activité la plus faible (82,60 %) est obtenue avec l'Hexane. Les activités anti radicalaires des extraits obtenues avec le méthanol, l'acétate, le macéré, l'eau et l'hexane sont présentées par des pourcentages d'inhibitions égales à 99.15 ; 98.44 ; 96.87 ; 95.67 et 82,60 %, respectivement. Des résultats similaires sont indiqués par Ksouri et al. (2007) et Mohsen et al. (2009), qui ont travaillé respectivement sur le maïs et l'origan. Il s'avère que les extraits Méthanoliques sont très efficaces pour le piégeage des radicaux DPPH grâce à leur teneur élevée en acides phénoliques et flavonoïdes glycosides (Kouri et al, 2007). Alors que La CI50 a varié de 0.11 mg/ml en cas de l'extrait méthanolique à 178 µg/ml dans le cas de l'extraction par hexane (tableau 14).

Tableau 14 : Activités anti oxydantes (%) et concentration efficace (CI_{50}) des différents extraits de la racine d'*Atractylis gummifera*

Extrait	AA % (Test DPPH)	IC $_{50}$ (mg/ml)
Méthanol	99.15 ±0.27	0.11 (R^2 = 0.961)
Acétate	98.44 ±0.01	0.15 (R^2 = 0.872)
Macéré	96.87 ±0.54	1.58 (R^2 = 0.943)*
Décocté	95.67 ±0.13	1.72 (R^2 = 0.914)*
Hexane	82.60 ±0.01	178 (R^2 = 0.940)**

*les valeurs suivies d'un même symbole ne sont pas significativement différentes au seuil de probabilité de 5% selon le test de S-N-K.

* Valeurs représentées en moyenne ± l'écart-type de trois mesures différentes.

* DPPH : diphényle-picryl-hydrazyl

Ces résultats vont dans le même sens que ceux de Lapornik et al. (2005), qui ont montré que l'activité anti radicalaire la plus élevée a été celle des extraits de Méthanol 70%. Ceci pourrait trouver son explication dans le fait que le Méthanol et l'éthanol sont efficaces dans la dégradation des parois cellulaires qui ont un caractère non polaire et entraine la libération des anthocyanines et autres polyphénols à partir des cellules. Les faibles activités anti radicalaires obtenues avec l'hexane pourraient être expliquées par le fait que ce solvant n'est pas adéquat pour l'extraction des composés phénoliques de la matricaire. Ceci signifie que la polarité du solvant affecte sa capacité à dissoudre certains groupes de composés antioxydants et influence ainsi l'estimation de l'activité anti oxydante.

Les études menées par Gulçin et al. (2003) et Tepe et al. (2005), indiquent que le solvant d'extraction a une influence sur l'activité anti oxydante des extraits. La variation dans l'activité anti oxydante pourrait être due à la quantité et /ou à la nature des substances anti oxydantes présentes dans les extraits de la matricaire.

Alors que Pour les extraits aqueux préparés avec deux procédés différents (décocté et macéré), la différence des résultats peut être attribuée à l'effet de la température sur la structure, la stabilité et la présence des molécules à propriété anti oxydante. Selon Cai et al. (2004), il existe une relation entre le pouvoir anti oxydant et la structure des composés phénoliques (nombre et position des groupements hydroxyles sur le noyau aromatique de la molécule, glycosylation et présence d'autres groupements donneurs de protons). Kähkönen et al. (1999) n'ont constaté aucune corrélation entre la teneur en polyphénols et l'activité anti oxydante des plantes. Selon ces auteurs, la teneur en polyphénols ne prédit pas l'activité anti oxydante du fait que différents composés phénoliques répondent différemment au dosage par la méthode de Folin-Ciocalteu, et que l'activité anti oxydante d'un composé phénolique dépend de sa structure. Il est difficile d'expliquer la relation existant entre les antioxydants et l'activité anti oxydante d'un végétal en se basant sur la seule analyse quantitative, du fait qu'il existe une relation non seulement avec le taux d'antioxydants mais aussi de l'interaction entre eux et avec d'autres constituants (Yoo et al, 2008).

II. Tests anti microbiens

II.1. Activité anti bactérienne du macéré et du décocté des racines *d'Atractylis gummifera*

La figure 57 illustre les diamètres d'inhibitions obtenus par application du macéré et du décocté des racines d*'Atractylis gummifera* sur les différentes souches bactériennes étudiées (ECS, ECR, PSS, KS, KR, PSR8e, PSR21e, AC). Comparé à ceux des antibiotiques tels que l'oxacillin, la vancomycine, l'amoxilin, la cefador, l'ofloxacin et la pénicilline.

Le screening des propriétés antimicrobiennes des deux échantillons d'extraits montre que tous possèdent une activité significative. Les extraits sont actifs aussi bien sur les bactéries à Gram positif que négatif.

L'effet anti bactérien le plus marquant du macéré a été enregistré dans le cas de l'Acinetobactere (17.4 mm) suivi par ECS avec un diamètre d'inhibition de l'ordre de 16.4 mm,

Les résultats obtenus montrent que le macéré des racines d*'Atractylis gummifera* est doté d'une activité anti microbienne très prometteuse même pour les souches résistantes telles que ECR, KR, PSR8e et la PSR21e. En comparaison avec les antibiotiques de référence testés tels que l'oxacillin, la vancomycine, l'amoxilin, la cefador, l'ofloxacin et la pénicilline, le macéré a montré une capacité inhibitrice significativement supérieure. Avec des diamètres d'inhibitions allant de 14.4 mm dans le cas de PSR2le à 17.4 mm dans le cas de l'AC.

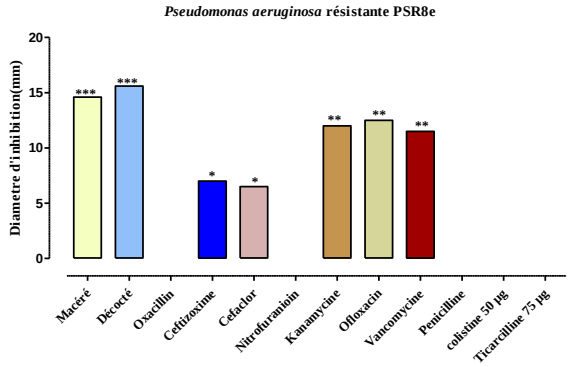
L'activité anti microbienne ne dépend pas seulement de la présence des composés phénoliques, mais également de la présence de divers métabolites secondaires, de l'emplacement, et le nombre des groupes d'hydroxyles.

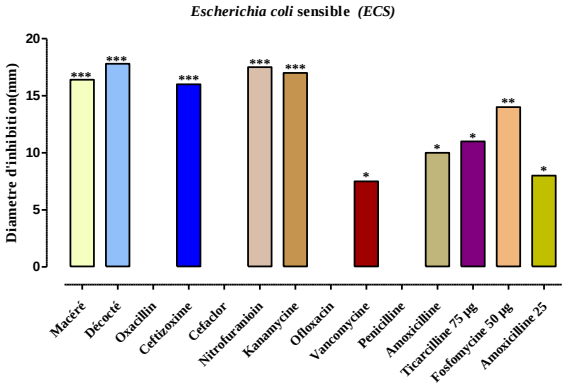
Concernant le décocté et Comme le montre la figure 57, l'effet Antibactérien du décocté appliqué sur les différentes souches bactériennes sensibles et résistantes utilisées dans la présente étude (ECS , ECR, PSS, KS, KR, PSR8e , PSR21e, AC) s'est manifesté de façon très claire avec des diamètres d'inhibition de l'ordre de 17,8 ; 17 ; 16,8 ; 16,4 : 16,.8 ; 15,66 ; 15,8 et 18.4 mm successivement sur ECS, ECR, KS, KR, PSS, PSR8e. PSR21e et AC. Les résultats obtenus montrent que le décocté tout comme le macéré des racines d*'Atractylis gummifera* sont dotés d'une activité anti microbienne très prometteuse.

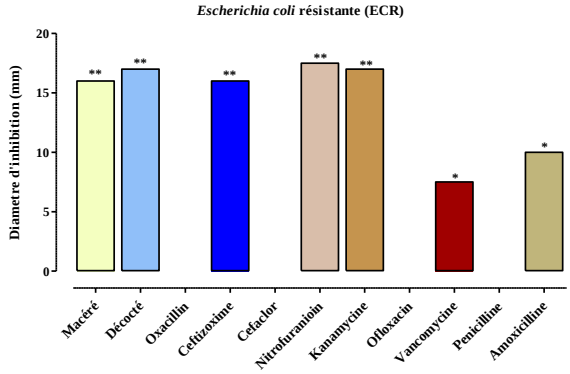
A l'analyse des résultats de la figure 59, il ressort manifestement que le décocté d*'Atractylis gummifera* a une activité antibactérienne aussi bien sur les bactéries Gram positives (Gram+) que négatives (Gram-), sur différentes familles bactériennes, et présente à cet effet un spectre d'action large. Cette activité antibactérienne large est conférée par la présence des biomolécules comme les tanins, les flavonoïdes et les phénols dont les propriétés antibactériennes ont été démontrées

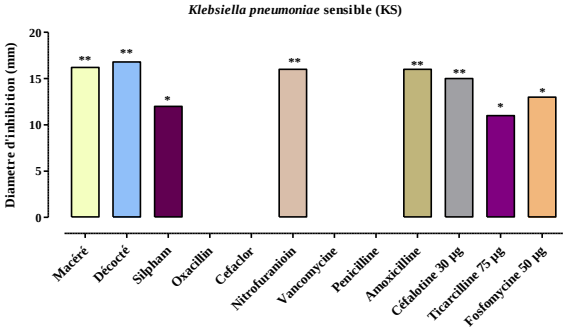
Les souches de Pseudomonas aeruginosa se révèlent être les plus résistantes, ce qui est lié à leur grande capacité à développer des résistances à de nombreux agents antimicrobiens, d'où leur implication fréquente dans les infections hospitalières (Mann et al, 2000). Nos résultats concordent avec ceux obtenus par de nombreux auteurs (Biondi et al, 1993 ; Yilmaz et al, 2013 ; Millezi et al, 2012) ayant souligné la faible sensibilité des souches de Pseudomonas aeruginosa vis-à-vis des huiles essentielles, notamment celle de L. nobilis.

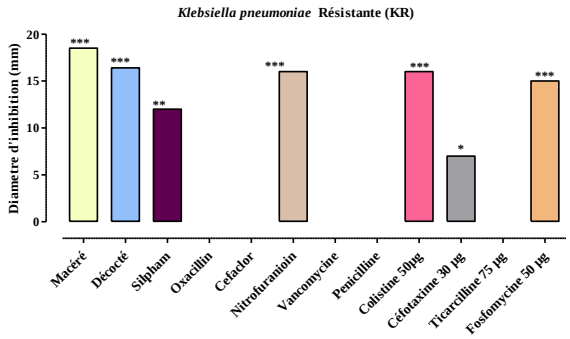
Apres comparaison entre les diamètres d'inhibition dans le cas du macéré et du décocté, on trouve que le décocté montre des diamètres d'inhibition plus importants que ceux enregistrés par le macéré sans que la différence soit significative, et qui peut être expliquée par l'effet de la méthode d'extraction sur la disponibilité des molécules actives responsables des activités biologiques telles que les phénols. D'un autre coté ces résultats sont homogènes et peuvent expliquer l'usage traditionnel du décocté en désinfection. En effet, cette utilisation commune ne peut être conférée qu'à sa forme plus bénéfique et moins toxique (5 fois moins toxique) et à la dégradation des substances toxiques contenues dans les racines d'*Atractylis gummifera* (ATR, CATR) après exposition à la température (Errai et al, 2018).

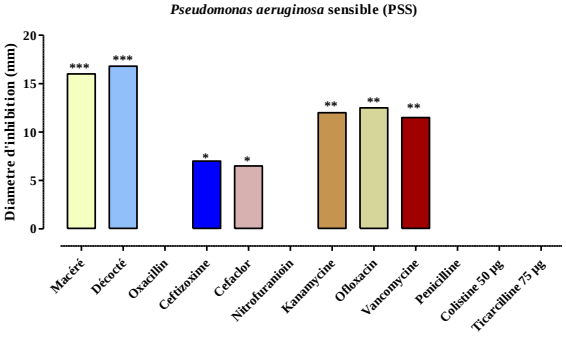

Pseudomonas aeruginosa résistante PSR8e
Diametre d'inhibition(mm)
Macéré
Décocté
Oxacillin
Ceftizoxime
Cefaclor
Nitrofuranioin
Kanamycine
Ofloxacin
Vancomycine
Penicilline
colistine 50 µg
Ticarcilline 75 µg

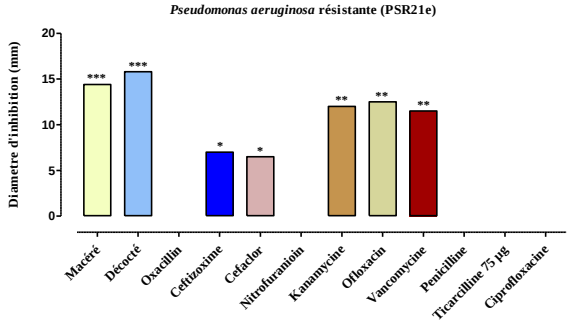

Escherichia coli sensible (ECS)
Diametre d'inhibition(mm)
Macéré
Décocté
Oxacillin
Ceftizoxime
Cefaclor
Nitrofuranioin
Kanamycine
Ofloxacin
Vancomycine
Penicilline
Amoxicilline
Ticarcilline 75 µg
Fosfomycine 50 µg
Amoxicilline 25

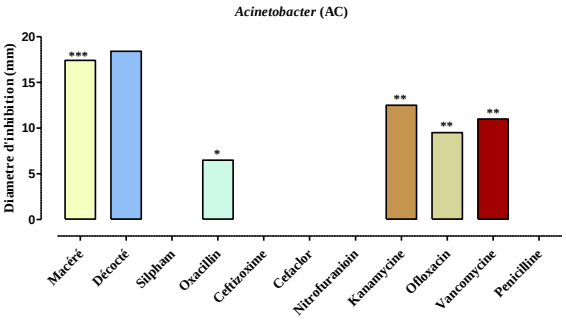

Escherichia coli résistante (ECR)
Diametre d'inhibition (mm)
Macéré
Décocté
Oxacillin
Ceftizoxime
Cefaclor
Nitrofuranioin
Kanamycine
Ofloxacin
Vancomycine
Penicilline
Amoxicilline


Klebsiella pneumoniae sensible (KS)
Diametre d'inhibition (mm)
Macéré
Décocté
Silpham
Oxacillin
Cefaclor
Nitrofuranioin
Vancomycine
Penicilline
Amoxicilline
Céfalotine 30 µg
Ticarcilline 75 µg
Fosfomycine 50 µg


Klebsiella pneumoniae Résistante (KR)
Diametre d'inhibition (mm)
Macéré
Décocté
Silpham
Oxacillin
Cefaclor
Nitrofuranioin
Vancomycine
Penicilline
Colistine 50µg
Céfotaxime 30 µg
Ticarcilline 75 µg
Fosfomycine 50 µg


Pseudomonas aeruginosa sensible (PSS)
Diametre d'inhibition (mm)
Macéré
Décocté
Oxacillin
Ceftizoxime
Cefaclor
Nitrofuranioin
Kanamycine
Ofloxacin
Vancomycine
Penicilline
Colistine 50 µg
Ticarcilline 75 µg


Pseudomonas aeruginosa résistante (PSR21e)
Diametre d'inhibition (mm)
Macéré
Décocté
Oxacillin
Ceftizoxime
Cefaclor
Nitrofuranioin
Kanamycine
Ofloxacin
Vancomycine
Penicilline
Ticarcilline 75 µg
Ciprofloxacine


Acinetobacter (AC)
Diametre d'inhibition (mm)
Macéré
Décocté
Silpham
Oxacillin
Ceftizoxime
Cefaclor
Nitrofuranioin
Kanamycine
Ofloxacin
Vancomycine
Penicilline

des diamètres d'inhibition obtenu par le décocté, le macéré et les différents antibiotique testés sur huit souches bactériennes : A- Klesilla pneumoniae sensible (KS), **B**- Escrichia coli résistante (ECR), **C**- Klesilla pneumoniae sensible (KS), D- Pseudomonas aeruginosa résistante (PSR8e), E- Pseudomonas aeruginosa sensible (PSS), F- Klepsilla pneumoniae résistante (KR), G- Pseudomonas aeruginosa résistante (PSR21e), **H**- Acinetobacter (AC)

*les valeurs suivies d'un même symbole ne sont pas significativement différentes au seuil de probabilité de 5% selon le test de S-N-K.

La sensibilité des souches médicales, même celles multi-résistantes aux antibiotiques (Pseudomonas), aux extraits d*'Atractylis gummifera*, suggère leur possible utilisation en thérapeutique comme alternative naturelle aux agents chimiothérapeutiques dont le spectre d'action est en réduction continue. Cependant, aucune recherche ne s'est intéressée à l'étude de l'activité antimicrobienne de l*'Atractylis gummifera*

II.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bacteriostatiques (CMB)

Nos résultats montrent que les deux formes d'extraits aqueux ont eu une activité antibactérienne en inhibant la croissance des germes bactériens selon une relation dose-réponse (tableau 15). Cela nous a donc permis de déterminer les différents paramètres antibactériens à savoir la CMI et la CMB. Les plus faibles valeurs de paramètres antibactériens ont été obtenues avec la souche de référence d'ECS/R, KS/R et AC. Pour ces germes, la CMI a été égale à (5 mg/ml).

Tableau 15: Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des différents extraits de la racine d'*Atractylis gummifera*

CMI	Dillution téstée													
	Solution Mére		Solution Mére/2		SM/25		SM/50		SM/100		SM/250		SM/500	
	Décocté	Macéré	Décocté	Macéré	Décocté	Macéré	Décocté	Macéré	Décocté	Macéré	Décocté	Macéré	Décocté	Macéré
ECS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
ECR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
KS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
KR	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+
PSS	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
PSR8e	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
PSR21e	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
AC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

Les plus fortes valeurs ont été obtenues avec la souche de PSEUDO avec une CMI de l'ordre de 20 mg/ml. On suppose donc que la CMB pourrait se situer au-delà de cette concentration. Alors que pour la CMB chez les deux type d'extraits, les souches les plus sensible été ECS/R et KS avec une CMI de 5 mg/ml suivi de AC (10 mg/ml) et les souches les plus résistante été KR, PSS, PSR8E et PSR21e avec une CMB de l'ordre de 20 mg/ml.

Tableau 16 : Détermination des concentrations bacteriostatiques (CMB) des différents extraits de la racine d'*Atractylis gummifera*

	Dillution téstée													
	Solution Mére		**Solution Mére/2**		**SM/25**		**SM/50**		**SM/100**		**SM/250**		**SM/500**	
	Décocté	**Macéré**	**Décocté**	**Macéré**	**Décocté**	**Macéré**	**Décocté**	**Macéré**	**Décocté**	**Macéré**	**Décocté**	**Macéré**	**Décocté**	**Macéré**
ECS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
ECR	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+
KS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
KR	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
PSS	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
PSR8e	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
PSR21e	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
AC	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+

L'evaluation de la CMI a été aussi realisée par méthode de diffusion sur disque, on étudiant chaque concentration à part et ce pour les deux types d'extrait (figure 60). Cependant les resultas entre les deux méthodes concorde et semble homogene sauf que la deuxième méthode nous fourni plus d'information (en plus de la qualifiée (+/-) elle nous quantifie l'activité par un diamètre d'hinibition).

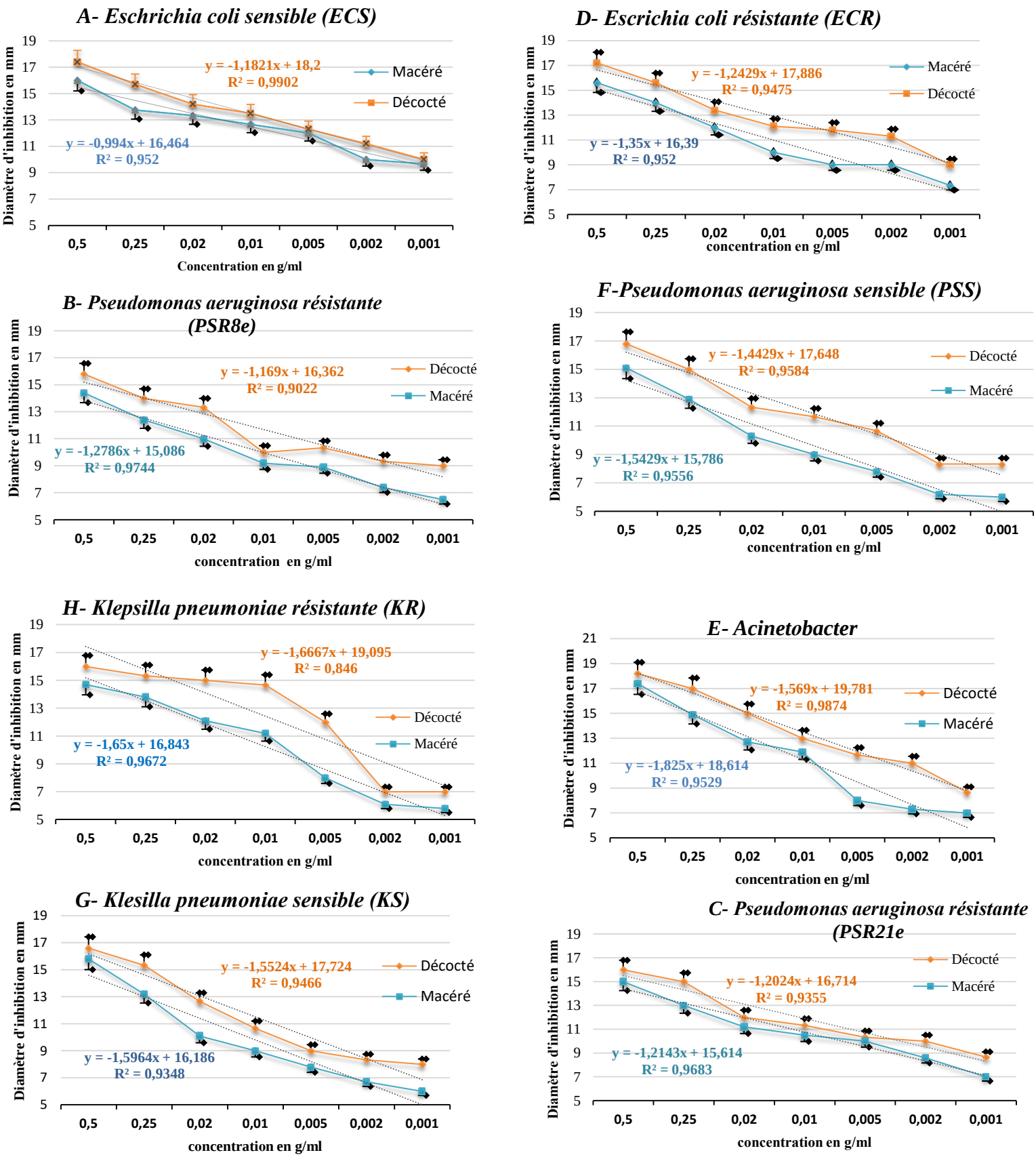


Figure 60 : Evolution des diamètres d'inhibition obtenu par le macéré et le décocté en fonction des concentrations, sur huit souches microbienne : A- Klesilla pneumoniae sensible (KS), **B**- Escrichia coli résistante (ECR), **C**- Klesilla pneumoniae sensible (KS),

D- Pseudomonas aeruginosa résistante (PSR8e), E- Pseudomonas aeruginosa sensible (PSS), F- Klepsilla pneumoniae résistante (KR), G- Pseudomonas aeruginosa résistante (PSR21e), **H**- Acinetobacter (AC)

Cependant, l'inhibition a augmentée avec l'augmentation de la concentration des extraits, et la concentration minimale inhibitrice est inversement proportionnelle avec l'efficacité antifongique des extraits étudiée. Les CMI et les CMB varient d'une bactérie à l'autre. Mais de façon global les deux extrait aqueux (décocté et macéré) ont un effet bactéricide et bacteriostaque sur toutes les souches bactérienne testé au niveau de ce travail.

Tableau 17 : Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bacteriostatiques (CMB) des différents extraits de la racine d'*Atractylis gummifera*

	Décocté				**Macéré**			
	CMI	**CMB**	**CMB/CMI**	**Interprétation**	**CMI**	**CMB**	**CMB/CMI**	**Interprétation**
ECS	**0,005**	**0,005**	**1**	**Bactericide**	**0,005**	**0,005**	**1**	**Bactericide**
ECR	**0,005**	**0,005**	**1**	**Bactericide**	**0,005**	**0,005**	**1**	**Bactericide**
KS	**0,005**	**0,005**	**1**	**Bactericide**	**0,005**	**0,005**	**1**	**Bactericide**
KR	**0,005**	**0,02**	**4**	**Bacteriostatique**	**0,005**	**0,02**	**4**	**Bacteriostatique**
PSS	**0,01**	**0,02**	**2**	**Bacteriostatique**	**0,01**	**0,02**	**2**	**Bacteriostatique**
PSR8e	**0,01**	**0,02**	**2**	**Bacteriostatique**	**0,02**	**0,02**	**1**	**Bacteriostatique**
PSR21e	**0,01**	**0,02**	**2**	**Bacteriostatique**	**0,01**	**0,02**	**2**	**Bacteriostatique**
AC	**0,005**	**0,01**	**2**	**Bacteriostatique**	**0,01**	**0,02**	**2**	**Bacteriostatique**

Activité pharmacologique in vivo d'*Atractylis gummifera*

I. Activité antalgique :

I.1. Test du « TAIL FLICK »

L'effet des deux types d'extraits (décocté/et macéré) d'*Atractylis gummifera* augmente significativement avec le temps de réaction. L'impact du décocté sur la douleur est assez prononcé par rapport au macéré. Après 30 minutes, la différence de réaction entre le macéré et le décocté a été de l'ordre de 5 secondes, et de 20.7 secondes en comparaison avec celle de la morphine 5mg/kg qui est très élargit (tableau 18).

Tableau 18 : Etude de l'activité antalgique des extraits d'*Atractylis gummifera* par la méthode de TAIL FLICK.

	15 min	30 min	45 min	60 min	90 min
Témoin	4.03 ± 0.05	4.2 ± 0.09	5 ± 0.14	4.3 ± 0.2	5.2 ± 0.3
Morphine	10 ± 0.22 *	42 ± 0.44**	78 ± 0.56**	80 ± 0.46**	96 ± 0.7***
Macéré	5 ± 0.12	16.2 ± 0.25*	21.4 ± 0.41*	28.6 ± 0.45*	36.9 ± 0.23*
Décocté	5.3 ± 0.19	21.3 ± 0.66*	28.5 ± 0.1*	36.7 ± 0.13*	46.8 ± 0.22*

*les valeurs suivies d'un même symbole ne sont pas significativement différentes au seuil de probabilité de 5% selon le test de S-N-K.

*Témoin = Eau physiologique

Les groupes chimiques comme les tanins, les saponosides, les flavonoïdes, les coumarines et les anthocyanoside, sont extractibles par l'eau. Ce qui peut expliquer l'effet antalgique des extraits aqueux *d'Atractylis gummifera*. Selon des études antérieures, l'activité analgésique des extraits serait due à la présence des stérols (campestérol, β-sitostérol, lupéol), saponines, composés phénoliques ou alcaloïdes. L'effet antalgique de ces composés a été confirmé chez plusieurs plantes médicinales comme Aloe vera, Jatropha curcas, Jasminum amplexicaule, Ficus glome rata, Stylosanthes fruticosa, Elephantopus tomentosus et Citrullus colocynthis

D'après nos résultats, la suppression de la douleur est assez rapide dans le cas du décocté à la dose de 100mg/kg que le macéré à la même dose, bien que les résultats de ces deux types d'extraits restent moins importantes que celle de la morphine à la dose de 5mg/kg. Pour ce test, seuls les analgésiques centraux augmentent le temps de latence au saut de l'animal. La morphine agit au niveau central et son pouvoir analgésique est dû à une activité agoniste des récepteurs opioïdergiques, associée à une activité inhibitrice de recapture neuronale de la sérotonine et de la noradrénaline. Cette activité est renforcée par le contrôle descendant inhibiteur au niveau spinal. Les deux extraits d*'Atractylis gummifera* ont significativement inhibé la douleur induite par la chaleur. Ces résultats suggèrent que les extraits agiraient via les mêmes mécanismes que la morphine et seraient par conséquent un inhibiteur des processus centraux de la douleur (Ekoumou et al, 2003).

I.2. Test de Koster à l'acide acétique chez la souris

Le groupe témoin ayant reçu de l'eau physiologique présente après injection intrapéritonéale de l'acide acétique à 1%, une moyenne de contorsion de 87 ± 3.2 sur une durée de 20 minutes. Le temps d'apparition de ces contorsions est de 5 minutes (tableau 19). L'administration intrapéritonéale du Perfalgan à la dose de 25 mg/kg, prévient de façon significative l'apparition de contorsions liées à l'administration de l'acide acétique (26 ± 4,5) ($p<0,001$; n=6). L'administration des deux extraits de racine d*'Atractylis gummifera* diminue de façon importante, l'apparition de contorsions chez les souris avec des valeurs approximatives de 49 ± 2.1 et 43± 3,3 respectivement pour le macéré et le décocté mais pas assez élargi comme celle de la référence, ce qui conduit à un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 43% et 50% pour une concentration de 100mg/kg du macéré et du décocté face à un taux de 70% dans le cas du Perfalgan.

Tableau 19 : Nombre de crampes en fonction des quatre différents extraits utilisés.

Lots	Nombre de crampes	% P
Témoin	87 ± 3.2	/
Perfalgan	26 ± 4.5**	70 %
Macéré	49 ± 2.1*	43 %
Décocté	43 ± 3.3*	50 %

*les valeurs suivies d'un même symbole ne sont pas significativement différentes au seuil de probabilité de 5% selon le test de S-N-K.

L'administration intrapéritonéale (IP) d'acide acétique chez les rats a entrainé de vives contractions abdominales. Ces contractions sont dues à la production et à la libération des médiateurs algogènes via les cyclooxygénases (COX) et la biosynthèse des prostaglandines (Elisabetsky et al, 1995). Ces médiateurs libérés sensibilisent les nocicepteurs cholinergiques et histaminiques péritonéaux. Le test à l'acide acétique a permis la mise en évidence des effets analgésiques de faibles intensités, mais ce potentiel analgésique est non spécifique (Asongalem, 2004). En effet, il n'est pas aisé d'indiquer si ce potentiel analgésique résulte d'une action périphérique ou d'une action centrale (Hirose et al, 1984). L'administration du Perfalgan (25mg/kg) en traitement préventif aux souris a inhibé de façon significative l'action algogène de l'acide acétique. Cette activité analgésique résulte, comme l'ont expliqué certains auteurs dont Labars et al (2001), de la suppression de la formation des médiateurs de la douleur dans les tissus périphériques.

Les résultats obtenus montrent que les extraits *d'Atractylis gummifera* présentent un effet analgésique significatif en réduisant le nombre de contorsions abdominales. Ceci suggère que ces extraits possèderaient des composés qui agiraient selon le même mécanisme que la référence, et par ce fait, inhiberaient la synthèse des prostaglandines. Sachant que tous les analgésiques sont dotés de la propriété inhibitrice des contorsions abdominales induites par l'acide acétique, ce test serait bien indiqué et extrêmement utile pour effectuer un premier tri des substances possédant une action analgésique, sans pour autant donner avec précision le mode d'action de la substance testée. Il en va cependant de soi que dans tous ces tests, la dose de 100mg/kg a été, pour les deux types d'extraits (décocté et macéré), efficace et a significativement inhibée les différents modèles de douleur, avec des pourcentages d'inhibition respectifs de l'ordre de 43% et 50% comparés au témoin négatif traité avec l'eau distillée. A l'issue de ces résultats, il ressort que les deux extraits d'AG possèderaient des propriétés analgésiques, centrale et périphérique, dont l'activité analgésique centrale de l'extrait a été évaluée en testant son effet sur la douleur induite par un stimulus thermique (l'eau chaude) par le test de TAIL-FLICK, et périphérique sur la douleur induite par un stimulus chimique (injection d'acide acétique) par le test de Koster.

II. Etude des psychotropes

Cette étude a permis, grâce à des essais (tests) pharmacologiques appropriés, de mettre en évidence l'activité psychique de l'animal sous l'action des drogues.

II.1. Test de la traction

Après avoir attaché les souris à un fil métallique par les pattes antérieures pour les faire suspendre. Tous les animaux du lot témoin n'ayant reçu que de l'eau physiologique et ceux du lot 3 ayant été traités par le macéré à la dose de 100 mg/kg, ont effectué un rétablissement d'équilibre en moins de 5 secondes ce qui nous amène d'ailleurs à considérer que la réaction était bien positive. Par contre, les animaux du lot traité, avec le décocté à la concentration de 100mg/kg, ont été déséquilibrés et ont fini par chuter (deux souris sur six perdent leur équilibre). Des effets similaires ont été obtenus sur le lot ayant été traité par la thiopental, à la dose 30 mg/kg, Alors que les animaux ayant été traités par la chlorpromazine, à la dose de 10 mg/kg, ont tous chuté et ne parvenaient plus à rétablir un équilibre qui amène au moins une des pattes postérieures à toucher le fil. Cet effet est considéré comme une action sédative et la réaction est alors dite négative (tableau 20)

Tableau 20 : Nombre de chutes par traitement

Type de traitement	Témoin	thiopental	Chloropromazine	Macéré	Décocté
Nombre de souris	6	6	6	6	6
Nombre de chute	0	3	6	0	2
Réponse (+) ou (-)	+	+	-	+	+

II.2. Test de la cheminée

Le lot Témoin (traité à l'eau) et le lot traité au thiopental, à la dose 20 mg/kg, ont répondu positivement au test (réaction positive),. Par contre, les lots ayant subi l'action de la chlorpromazine, à la dose 5mg/kg, et les lots ayant été traités par les deux extraits aqueux *d'Atractylis gummifera* (décocté/macéré) (tableau 21), les animaux n'ont pas répondu favorablement au test, et leur comportement a été jugé trop long (réaction négative).

Tableau 21 : Le temps moyen mis par les souris pour remonter le tube en verre en fonction du traitement

Type de traitement	Témoin	Thiopental	Chloropromazine	Macéré	Décocté
Nombre de souris	6	6	6	6	6
Nombre de souris échappées	6	6	0	0	0
Réponse (+) ou (-)	+	+	-	-	-

II.3. Test de la planche à trous

Le nombre de trous explorés par les souris au bout de 5min sous l'action du Thiopental (20mg/kg) est, comme le montre le tableau 21, approximativement le même que celui du lot témoin (32 Vs 38), tandis que les animaux auxquels a été injecté la chlorpromazine (3 mg/kg), ont exploré seulement 6 trous et la réaction des animaux au cours de l'essai a été très longue et inhibée (action sédative).

Tableau 22 : Nombre de trous explorés en fonction du traitement

Type de traitement	Témoin	Thiopental	Chlorpromazine	Décocté	Macéré
Nombre de trous exploré au cours de 5 minutes	38	32	6	19	23
T moy = somme ti moy /5	7.6±1.7	6.4 ±6.6	1.2 ±2.4 **	3.8±9.2*	4.6±1.3*

*les valeurs suivies d'un même symbole ne sont pas significativement différentes au seuil de probabilité de 5% selon le test de S-N-K.

La différence du comportement des animaux au cours du test, ainsi que les moyennes sont calculées pour chaque lot au bout de 5 minutes (tableau n 22). La réaction des souris sous l'action du macéré (100 mg/kg) a été un peu plus allongée. En effet, le nombre des trous explorés a été de 23 contre 38 pour le lot témoin. Pour le décocté (100mg/kg), on a constaté que la réaction était inhibée, et que la curiosité des animaux avec le désir de fouir était réduite par rapport au lot témoin.

III. Activité anti-inflammatoire

L'essai primordial le plus largement utilisé pour évaluer l'activité d'un nouvel agent anti-inflammatoire est sa capacité à réduire l'œdème local induit dans la patte de rat par l'injection

d'un agent irritant. Cet œdème dépend de la participation des kinines et des leucocytes nucléaires avec leurs facteurs pro-inflammatoire comprenant des prostaglandines (Kidd and Urban, 2001 ; Meunier et al, 2004). Le développement de l'œdème dans la patte du rat après l'injection du carragénine a été décrit comme événement biphasé. La phase initiale, observée autour d'une heure, est attribueé au dégagement de l'histamine et de la sérotonine. La deuxième phase de gonflement est due au dégagement des substances prostaglandine-like. On a signalé que la deuxième phase de l'oédeme est sensible aux agents anti-inflammatoires stéroidaux et non stéroidaux (Kim et al, 2004).

L'injection de 0,1 ml de carragénine à 1% dans une solution saline isotonique sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure gauche du rat a induit la création de l'œdème qui a augmenté progressivement avec un maximum à 12 heures (28%).

Le lot traité oralement par le macéré (100 mg/Kg) a montré une inhibition de l'œdème dans les deux phases du modèle expérimental et plus spécialement dans la dernière phase. Ainsi, le macéré a réduit l'augmentation de volume de la patte avec un pourcentage d'inhibition de 40% à 1h30 min ($p<0,01$). A six heures, le taux d'inhibition était de 61.11% ($p<0,01$) et il a passé à 81.50% après 12 heures (tableau 23).

Tableau 23 : Activité anti inflammatoire des différents extraits testés d'*Atractylis gummifera*

	Temps				
Traitement	30 min	1h 30 min	3 heures	6 heures	12 heures
Groupe A	1.54 ±0.3	2.08 ±0.5	2.23 ± 0.6	2.49 ±0.1	2.5 ± 0.2
Groupe B (% d'inhibition de l'inflammation) (décocté)	1.2 ±0.2	1.5 ±0.25 **(50.46%) a***	1.50 ±0.13 **(56.25%) a***	1.39±0.16 **(75.79%) b****	1.22±0.15 **(93.93%) c***
Groupe C (% d'inhibition de l'inflammation) (macéré)	1.5 ±0.00	1.81 ±0.1 **(40.74%) a***	1.73 ±0.074 **(57.4 %) b***	1.72 ±0.046 **(61.11 %) b***	1.39±0.024 **(81.50 %) c***
Groupe D (% d'inhibition de l'inflammation)	0.83±0.1	0.83 ±0.5 **(68.52%) a****	0.84±0.6 **(71.43%) a****	0.8±0.1 **(80.95%) ab ****	0.95±0.0 **(88.57%) b***

*les valeurs suivies d'un même symbole ne sont pas significativement différentes au seuil de probabilité de 5% selon le test de S-N-K (comparaison des traitements).
*les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de probabilité de 5% selon le test de S-N-K (comparaison en fonction des durées pour le meme traitement).

Il ressort également de ce tableau que le lot traité par le décocté (100 mg/kg) a montré une inhibition de l'œdème dans les deux phases du modèle expérimental spécialement dans la dernière phase. Ainsi, le décocté a réduit l'augmentation de volume de la patte avec un

pourcentage d'inhibition de 50.46% à 1h30 min ($p<0,01$), et de 75,79% ($p<0,01$) à 6h et de 93.9% après 12 heures.

Pour le lot de référence à une heure, l'indométacine a réduit le volume de l'œdème avec un % d'inhibition de 68,52% et de 71,43% à trois heures et 80,95% à six heures. Les résultats sont exprimés dans le tableau 22. Les résultats de l'activité anti-inflammatoire obtenus ont été comparés à ceux de l'indométacine (groupe D) et à ceux du contrôle (groupe A).

Nous constatons que l'inflammation causée par la carragènine augmente en fonction du temps et atteint un maximum à 12 heures.

L'administration de l'indométacine (100 mg/kg PC) prévient de façon significative l'évolution de l'inflammation au niveau plantaire de la patte du rat à la quatrième et à la cinquième heure après l'administration de la carragenine (respectivement de 71,43 _ 81 %). L'administration du macéré aux doses de 100 mg/kg PC prévient de façon significative ($p < 0,05$) l'œdème plantaire chez le rat à partir de la deuxième heure du traitement. Le traitement avec ces doses provoque un effet inhibiteur de l'inflammation important et significativement différent du contrôle qui persiste au bout de 48h après l'injection de la carragenine. A la troisième heure, le décocté aux doses indiquées montre respectivement un pourcentage d'inhibition de 75.7 % et de 93.9 % significative ment différent du groupe traité par le sérum physiologique (Tableau 23).

L'évaluation du pourcentage d'inhibition montre que le macéré et le décocté possèdent une activité´ anti-inflammatoire très intéressante (Tableau 20). Celle-ci pourrait être due à la richesse de ces extraits en composés bioactifs, principalement en polyphénols et flavonoïdes. Les résultats obtenus dans ce travail sont en accord avec ceux trouvés par Akkol et al (2008).

Les résultats relatifs aux tests d'attenuation du pouvoir toxique *d'Atractylis gummifera*, à la nouvelle méthode de dosage plasmatique ainsi qu'à la nouvelle méthode d'extraction d'Atractyloside et Carboxyatractyloside proposée dans ce travail, seront présentés sous forme de travaux d'articles.

Attenuation of Toxic power of Atractylis gummifera

Siham Errai
Laboratory of Physiology, Pharmacology Health and Environment Unit of Bioremediation and Environment Department of Biology. Faculty of Sciences Dhar EL Mahraz, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, BP : 1796, Fès, Maroc.
E-mail: siham.errai1@usmba.ac.ma
Tel: +38869418

Youssef Khabbal
Laboratory of pharmacology. Faculty of Medicine and Pharmacy, University of Fez BP. 1893; Km 2, Sidi Hrazem Road, Fez 30000, Morocco.

Badia Lyoussi
Laboratory of Physiology, Pharmacology Health and Environment Unit of Bioremediation and Environment Department of Biology. Faculty of Sciences Dhar EL Mahraz, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, BP : 1796, Fès, Maroc.

Mohammed Faid
Institue Agronomic and Vétairinary medecine Hassan II, Rabat, Morocco

Mohammed El Midaoui
Departement of Agronomy and Plant Breeding, National School of Agriculture, Meknes, Morocco.

Abdelouahed Maataoui
Departement of Agronomy and Plant Breeding, National School of Agriculture, Meknes, Morocco.

Mohammed Benbella
Departement of Agronomy and Plant Breeding, National School of Agriculture, Meknes, Morocco.

Abdelfattah Abdellaoui
Laboratory of Physiology, Pharmacology Health and Environment Unit of Bioremediation and Environment Department of Biology. Faculty of Sciences Dhar EL Mahraz, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, BP : 1796, Fès, Maroc.

Abstract

Atractylis gummifera is a plant belonging to the Asteraceae family which is known for its toxicity due to the presence of the two hetero glucosides Atractyloside (ATR) and carboxyatractyloside (CATR). Despite this toxicity and fatal poisoning, the plant is still widely used in traditional medicine for therapeutic purposes such as fumigation against colds, dizziness and headache, infusion against bleeding during childbirth, anti-syphilis as well as against boils, as a purgative, emetic and worming. Many studies reported in the literature are concerned with the toxicity of Atractylis gummifera specially in areas where it frequently grow. In absence of a specific antidote likely to mitigate the toxicity of this plant, the search for factors that attenuate its toxic power is of extreme importance. The Effect of some parameters such us pH and Temperature on the toxically compound ATR and CATR has been a subject of previous works on several herbal medicine decoctions except for this species plant for wich no work was undertaken on the Effect of pH, temperature, exhaustion technical and conservation of the degradation of the toxicity compounds of Atactylis gummifera known as ATR and CATR. The aim of this study was to develop a method which will mitigate or abolish the toxicity power of Atractylis gummifera in order to reduce risk factors related to the use of medicinal herbs such as Atractylis gummifera in the pharmaceutical industry and ethnopharmacology.The attenuation of the toxicity of Atractylis gummifera extract by hydrothermal treatments.This attenuation was observed at high and moderate temperatures, and increased with increasing of incubation time: approximatly 50% of toxicity could be removed by hydrothermal processing at 100°C for 2 hours. Acidification also enhances the efficiency of the attenuation of the toxicity at pH=2. Furthermore, the hydro-exhaustion allows reducing of toxicity of these extracts to 100% probably by total elimination of toxic substances (ATR and CATR: water soluble) contained in the root extract. The attenuation of the toxicity of Atractylis gummifera is possible through to a simple and practice mechanism of the hydrolysis of sulfate and isovalerate groups and whose efficiency can be increased by acidification and hydrothermal treatment.

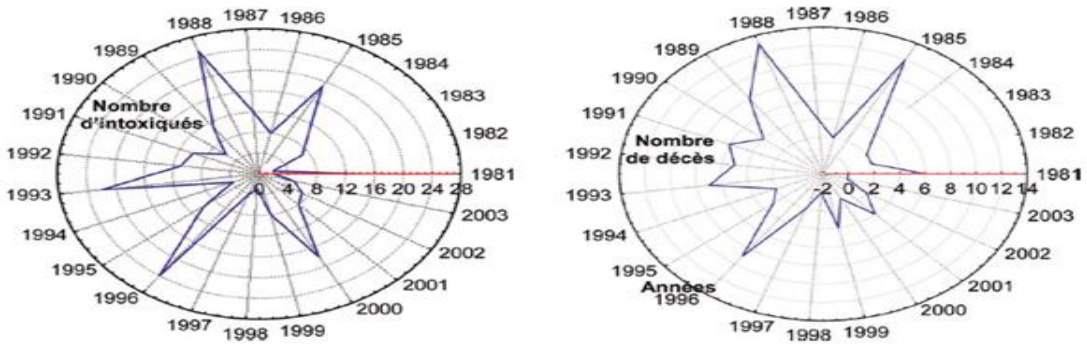
Keywords: *Atractylis gummifera*, Toxicity, Attenuation

1. Introduction

Therapy plants, also known as herbal medicine, can prevent and even cure some disorders of the body naturally. This therapy however requires caution because of misuse of a plant may not result in the betterment but the disease. However, numerous cases of hepatic and renal injury and even death were associated with the use of herbal medicines (Larrey et al, 2011; Stickel et al, 2007; Stickel et al, 2005; Haller et al, 2002).

The safety of several commercially available herbs has recently come into question due to reports of adverse reactions with prescription drugs and the use of inappropriate dose which far exceeds the lethal dose. The safe and effective use of medicinal herbs has therefore been identified as a top research priority (Burns et al, 2010; Cheng et al, 2010; Fakchich, 2014). During the year 2014, Poison Control Center of Morocco (CAPM) has identified 381 cases of poisoning by plants with an increase of 50% compared to 2013 (Figure 1).

Figure 1: Number of reported poisoning victims and deaths in Morocco (Poison Control Center of Morocco., 2013)



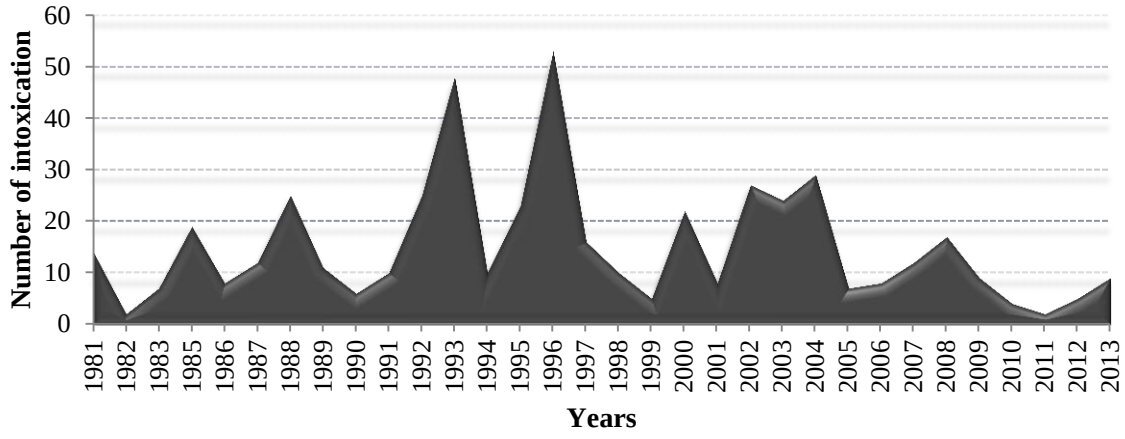
Atractylis gummifera is an acaulescent perennial medicinal herb with a long woody root up to 30–40cm long and 7–8cm diameter. It has deeply divided prickly long leaves in a rosette 30–70mm wide; pink florets in 3–7cm wide capitula with middle bracts with three long apical spines. It grows in Northern Africa and Southern Europe in moist soils of cultured grounds and waste places**.** (Vallejoa et al, 2009).

Atractylis gummifera is still widely used in traditional medicine for therapeutic purposes such as fumigation against cold, dizziness and headache, infusion against bleeding during childbirth, anti-syphilis, gangrene, hemorrhoids, skin cancer,

poultice dries, heal wounds, as well as against boils, as a purgative, emetic and worming (Otero, 1983).

Interestingly, the effectiveness of the remedy as an anti-inflammatory and anticancer agent is supported by pharmacological studies (Gaudeau et al, 1991; El-Hilaly, 2003). According to the Poison Control Centre of Morocco, the *Atractylis gummifera* ranks first plants responsible for poisoning, of 487 cases reported between 1980 and 2013 (Poison Control Center of Morocco., 2013) covers years for wich CAPM center has data on evolution of patients witch showed that 53.8% died, of which 62.2% are children under ten years. According to the reported data, 77.5% of deaths are attributed to accidental poisoning. Noteworthy, there is an average of ten cases of intoxication and 4.1 deaths per year (Figure 1; Figure 2).

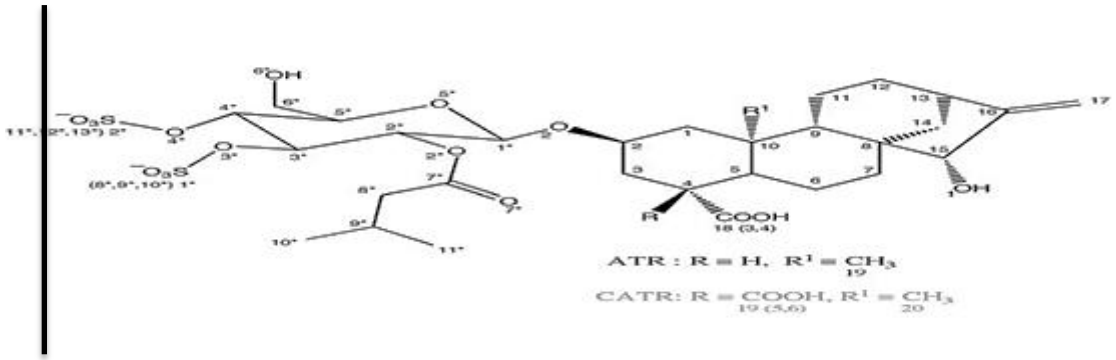
Figure 2 : Progression of intoxications by *Atractylis gummifera* reccordet by the Poisoning Control Center of Morocco. (2013)



However, the toxicity of *Atractylis gummifera* is due to the presence of two toxic diterpenoid glucosides: atractyloside(ATR) and carboxyatractyloside (CATR). The toxicity and chemical profiles of ATRs are highly dependent on the variations in both species and processing (Obatomi et al, 1998; Kedrov et al , 2010). Interest in these compounds was stimulated by the high toxicity of the sulphated glucoside and aglycone, which has been responsible for many deadly poisonings (Laurens et al., 2001, Steenkamp et al., 2004). The compound 4-carboxyatractyloside (CATR), which is more toxic than a compound ATR, is found in fresh, but not dried plants because it is decarboxylated to ATR during ageing or desiccation (Obatomi et al, 1998; Steenkamp et al., 2006).

The structures of ATR and its analogue CATR are illustrated in Figure 3. The effect of pH and temperature on the ATR has been the subject of several previous works related to medicinal herbs, except *Atractylis gummifera* (Liang et al, 2013; Chien et al, 2012).

Figure 3: Atomic numbering of ATR and CATR (Jean-F S et al 2012)



Furthermore, there is no report to our knowledge on the effect of pH, temperature, leaching and conservation on the degradation of the toxicity of *Atactylis gummifera* known for its high (ATR and CATR) contents.

The objective of this study being to find a method which will allow mitigating or degrading the toxicity of *Atractylis gummifera* extract via Hydro-processing, pH, Temperature and conservation providing the results that can help assess the safety and risks of medicinal herbs in the pharmaceutical industry and ethnopharmacology.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Fresh *Atractylis gummifera* roots used in the present study were collected in Moulay yakoub, Fez on Mai 2014 at Morocco. The plant of *Atractylis gummifera* was identified first at the site of samply by Pr Maataoui Department of Agronomy and Plant Breeding, National School of Agriculture, Meknes, Morocco and then confirmed by Pr Bari, botanist at the Department of Biology, Faculty of Science (Fez) at the laboratory. Roots of this plant

were then cleaned, separated in two lots. One of the lot was called Lot1 was stored in the refrigerator at a temperature of 4 to 6°C). The second lot labelled Lot 2 was let dry under shade at the Laboratory of Biological Department, University of Dhar El Mehraz Fez for four weeks.

2.1.1. Dilution of aqueous extracts of fresh and dried root of *Atractylis gummifera*

a. Aqueous extract preparation of fresh root samples

The purpose of this technique was to study the impact of six successive dilutions on toxicity of *Atractylis gummifera* root extract (table 1).

A sample of the 100g of *Atractylis gummifera* root named Lot1 was prepared by cutting very small and thin slices of root. The root sample was immersed in 200ml of distilled water. The mixture was allowed to break down for 4 hours in a shaker bath at room temperature (20°C). The water root extract was obtained by filtering the reset of the root sample in an Erlenmeyer flask. The concentration of the root aqueous extract was 0.5g/mL. Taking in consideration the average rat body weight (RBW) of Westers which is around 250g, the concentrations of aqueous extract of root of *Atractylis gummifera* tested appeared in table 1.

Table 1: Concentration of aqueous extract of fresh root of *Atractylis gummifera* (g.Kg/RBW) tested in the experiment.

Weight (g) of root extract per Kg of BW of rat	**10g/KgRBW**	**5g/Kg/RBW**	**1g/KgRBW**	**0,1g/KgRBW**	**0,01g/Kg RBW**
Volume of aqueous extract of root (mg/L) per KgRBW	0,5	0,25	0,05	0,005	0,0005
Volume of root aqueous extract ingested per rat weighing 250g	5ml	5ml	5ml	5ml	5ml

b. Preparation of aqueous extract of dried root

The same experiment was conducted using the same conditions for the root sample of dried root under shade. Dilutions tested are presented in table 1.

2.1.2. Technical exhaustion

The first aqueous extract of a sample of 100g fresh root named E1 was obtained by using the same procedure as in the 2.1.1 experiment above. The aqueous extract E1 was then filtered in an Erlenmeyer. The remainder of E1 after its filtration was diluted a second time and filtered under E1 conditions to obtain aqueous extract E2. The cake of E2 was recovered, diluted and filtered using the same procedure as for E1 and E2 to obtain the last aqueous extract E3.

The preparation of aqueous extracts (E'1, E'2 and E'3) of dried roots of *Atractylis gummifera* was based on the procedures used in the experiments 2.1.1 and in 2.1.2 for fresh root.

2.1.3. Toxicity of root extracts under differing temperatures and exposure durations.

A thirty new aqueous extracts were prepared. Fifteen for dried sample root and fifteen for fresh sample root. Preparation conditions and procedures followed were identical to those described for the dilution effect in sections 2.1.1. These extracts were used to test the effect of five temperatures levels (20, 40, 60, 80, and 100°C) combined to three durations (30, 60 and 120mn) on *Atractylis gummifera* root aqueous extract toxicity.

2.1.4. Effect of pH on toxicity of the extract.

Four samples of 100g of dried root of *Atractylis gummifera* were immersed in a 200ml of distilled water and let to decay under 20°C during four hours. The residue of the four samples was successively filtrated in an Erlenmeyer. The pH of each filtered sample was recorded (pH=5.8) and the filtrate was stored until use. Knowing the pH of the four samples was 5.8. One of the four samples was randomly selected and considered as pH1. The pH of the remaining samples was adjusted by adding either H2SO4 or NaOH to obtain the pH2 =2 for the second sample, the pH3=10 for the third sample and à the pH4 =12 for the fourth sample.

2.2. Assays on rats

Male *Westar* rats with an average weight of 250g were used for this study. Animals were checked for abnormality and any other disease symptoms. The animals were bred and housed in the animal house.

The rats were randomly divided into lots of 6 rats each which were kept in the animal house at ambient temperature around 25°C, with a photoperiod of 12hlight/12hdark and a free access to a standard pellet feed and tap water ad libitum. Animals were acclimatized for at least one week before using them in our experiments. The animals were exposed only once to every experiment.

Prior to the assays, animals were subjected to a fasting period of 24 hours. Extracts doses to be tested for their toxicity were administered by force-feeding with a special probe; the research was conducted in accordance to the ethical rules on animal experimentation. Animal lots were examined for mortalities and abnormal behaviour after 24 hours. DL_{50} were defined as the lowest concentration that had killed 50% of Westar rats.

2.2.1. Toxicity of diluted aqueous of fresh root of *Atractylis gummifera*.

A lot of six male Westars were randomly affected to each aqueous extract of the six dilutions presented in table1 section 2.1.1. Westars of each group assigned to a dilution of aqueous root extract were individually feed by 5ml of this extract. Fourteen eight hours after feeding, the number of dead and alive Westars was counted. The same procedure was followed in testing toxicity of the dry extract.

2.2.2. Toxicity of root extracts under differing temperatures and exposure durations

A lot of six Westar was randomly affected to each combination (temperature)x(treatment time). Westar were individually feed with 5ml of the extract. Fourteen eight hours after feeding the number of dead and alive rats were counted for each combination.

2.2.3. Effect of four levels of pH of the aqueous root extract on its toxicity.

A 5 ml of each root filtrate was administered orally per Westar and repeated to get an effective of six Westar for a given pH. The number of dead or alive Westars was counted

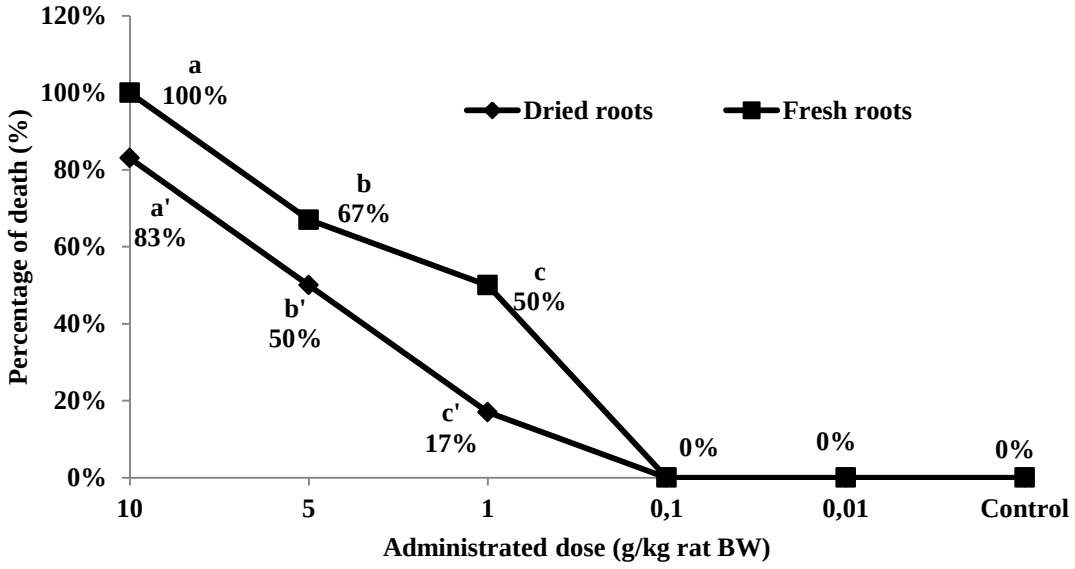
24h after the treatment for each lot of rats and each pH level. The procedure described above for dry root sample was followed for fresh sample to test the impact of the pH of the aqueous solution on Westar.

3. Results

3.1. Toxicity of diluted aqueous extracts of Fresh and dried roots of *Atractylis gummifera.*

Oral administration to rats of 6 different doses of aqueous extracts of fresh and dried root of *Atractylis gummifera*, has led to a change in physical activity and behavior of the tested rats. They showed a reduction in their movement and a generalized shaking of their bodies. No significant difference between the doses of aqueous extracts of fresh or dried root on the percentage of Westars death was revealed by statistical analysis of the results. However, when aqueous extracts of fresh root and aqueous extract of dried root were analyzed apart, four dose groups were identified for each root form (fresh or dried) as shown in Figure 4: 10g / kg (rat body weight = RBW) > 5g / kgRBW> 1g / kgRBW> 0.1g / kgRBW = 0.01g / kgRBW = Control.

Figure 4: Effect of five dilution levels on toxicity of aqueous water fresh root extracts of Atractylis gummifera .*Values followed by the same letter were not significantly different at p=0,05 according to N-S-K test;



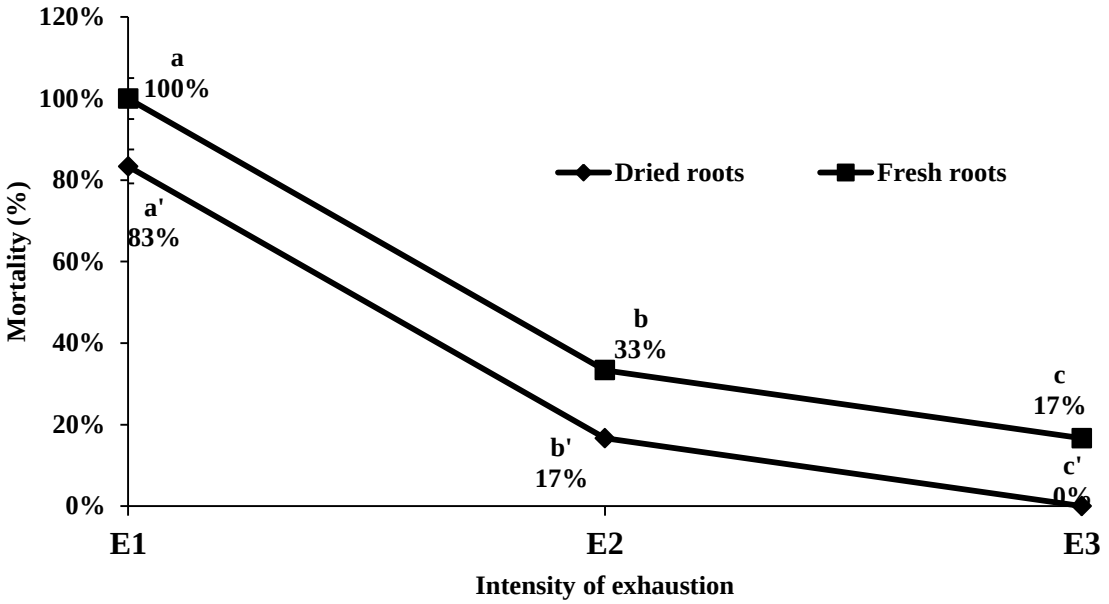
Furthermore, the dilution of the aqueous extracts of fresh or dried roots induced a reduction of the effect of the toxicity of the aqueous extracts on rats. The reduction appears to be more pronounced in the case of the dried root aqueous extract for which the mortality percentage ranged from 100% recorded at the concentration of 10 g / kg RBW to 17% at the dose of 1g / kg BW. On the other hand, the aqueous extract of the fresh root showed a higher death rate: 100%, 67%, 50% and 0% respectively for 10, 5, 0.1 and 0.01 g / kg RBW.

The results showed clearly that beyond an intake of 0.01 g / kg RBW, the rate of mortality became important for the root aqueous extract of the fresh root as well as for the aqueous extract of the dried root (Figure 4). The LD_{50} is thus reached at a concentration of 1g/kg RBW of the aqueous extract of fresh root and only at a concentration of 5g / kg RBW of dried root, which equals an LD_{50} dose 5 times lower than the one of the fresh dried root aqueous extract. These rates decline as well as the reduction of the concentration of the solution of the aqueous extract to cancel below 1g/kg RBW (Figure 4).

3.2. Exhaustion effect on toxicity of fresh and dried root aqueous extracts

The results of the experiment showed that for the first extraction (E1 and E'1), the mortality rate of Westars was the highest for the water extract of the fresh root (rate = 100%) and high for the aqueous extract of dried root (rate = 83%). In addition, the percentage of dead rats decreased as the number of extraction performed on the initial sample increased (Figure 5). Moreover, the results also showed that the drying of the root alone brought down the Westars mortality by 27%. The percentage of mortality among the other treatments were 33% (E2) and 17% (E3) for Westars batches nourished with the aqueous extract of the fresh root and 17% (E'2) to 0% (E'3) for Westars lots feed with aqueous extracts of dried root (Figure 5).

Figure 5: The decrease of mortality level as the exhaustion treatment increased for fresh root (E1, E2, E3) and dried root (E1', E2', E3') of *Atractylis gummifera*.*Values followed by the same letter were not significantly different at p=0,05 according to N-S-K test;

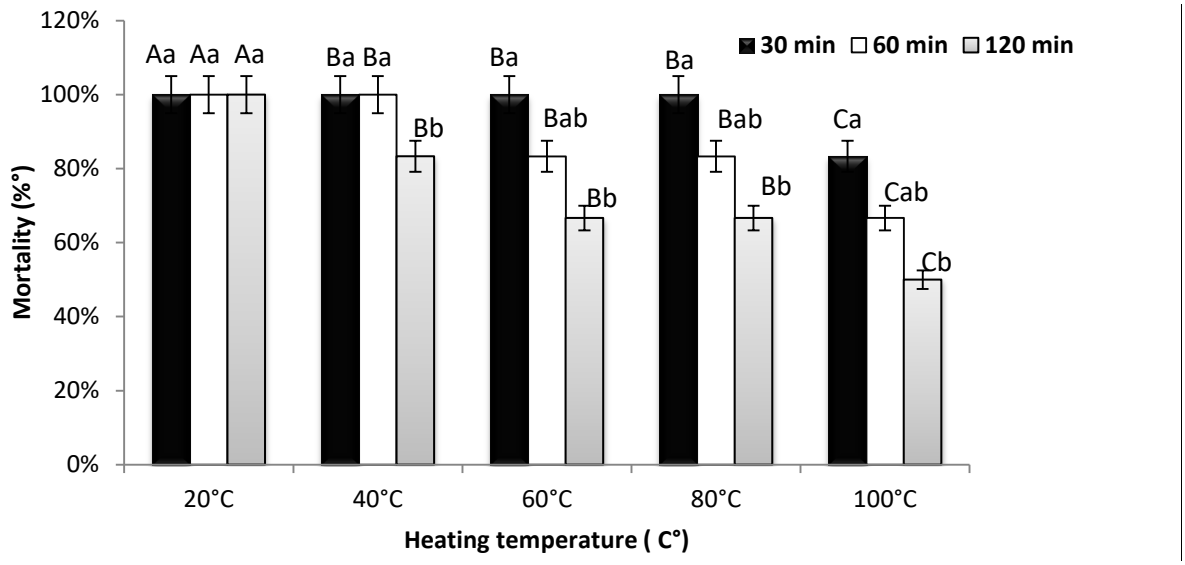


It turns out that the first aqueous extraction of the fresh root E1 and of the dried root E'1 reduced considerably the content of toxic substances (ATR and CATR) in the aqueous extract of root of *Atractylis gummifera*. The batches of rats feed with the first two aqueous (E1, E'1) showed the highest mortality rates for E1 (100%) and the high lethality rate for E'1 (83%). The mortality rates in the second (E2) and third depletion (E3), were relatively smaller. They went from 33% to 17% and 17% to 0% for batches supplied with the extracts from fresh or dried roots respectively (Figure 5) these finding showed also that four weeks of drying under shade caused a significant and important decrease in rats' death. These results allowed us to conclude that longer drying would probably further reduced the toxicity of the aqueous extract.

3.3. Effect temperatures and exposure durations on Toxicity of water root extracts

The analysis of variance revealed a significant effect of temperature and duration of exposure of the aqueous extract of fresh root of *Atractylis gummifera* on its toxicity. The response of Westars rats to toxicity of the aqueous extract was used to assess the impact of treatment on the attenuation of toxicity. An increase of the temperature of the aqueous extract of the fresh root from 20°C to 100°C, the rates of mortality deceased steeply. The highest percentage of rats death (100%), were observed when the aqueous extract was subjected to temperatures ranging from 20°C to 80°C for fixed periods (Figure 6).

Figure 6: Impact of differing temperature and exposure duration on toxicity of aqueous extract of fresh root of *Atractylis gummifera* *Values followed by the same letter were not significantly different at p=0,05 according to N-S-K test;

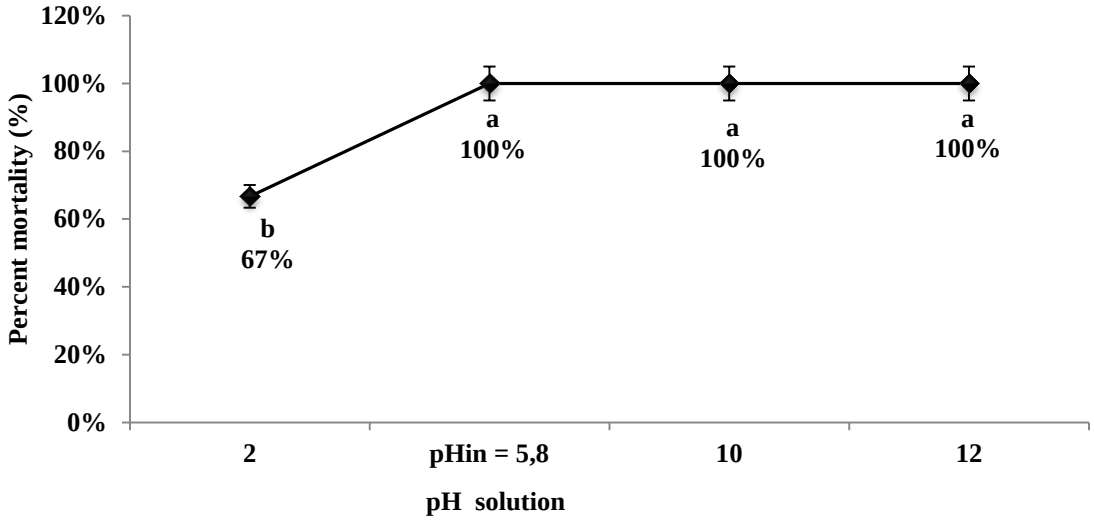


By subjecting the aqueous extract of the fresh root of *Atractylis gummifera* to five temperatures (20 to 200°C in steps of 20°C) for 60mn, the rate of *Westars* deaths decreases from 83% to 67% at 100 °C and from 100% to 83% for both 80°C and 60°C (Figure 6). Samples of aqueous extract of the fresh root having undergone five temperatures (20°C to 100°C by increment of 20°C for 120mn were used to feed the *Westers*. The mortality rates ranged from 50% at 100 °C to 100% at 20 °C. The mortality rate reached 83% at 40 ° C. The percentage of dead rats was equal for temperatures 60°C and 80 °C (Figure 6). These results would suggest that heat treatment of aqueous water extract from of the fresh root at 100°C for 4 hours would probably reduce the concentration of active substances below the LD_{50}.

3.4. pH change

For more characterization of the crude active principle of *Atractylis gummifera*, different pH were applied to the extract. The range of the pH studied concerned acidic and basic pH values ranging from pH 2 to pH 12. Results in figure 7 show effect of the pH=2 on the active principle in the plant, so no mortality was observed in rats fed by the extracts at different pH>2. This may demonstrate high acido-basic stability to the active principle. These physico-chemical properties may help determining the high risk of the plant toxicity being resistant to many factors including temperature, extraction and pH.

Figure 7: Effect of the pH of the aqueous extract solution of *Atractylis gummifera* root on its toxicity *Values followed by the same letter were not significantly different at p=0,05 according to N-S-K test;



4. Discussion

Results of the first experiment showed that the toxicity of aqueous extract of root of *Atractylis gummifera* used to feed Westears varied depending on whether we use fresh or dried root. Indeed LD_{50} of aqueous extract of fresh root had toxicity 5 times higher than that of dried root. Similar results were reported by Liang-Yu Chen (2013) on *Atractylis gummifera*. They suggested to store harvested samples for a long period before use. They didn't specify the duration of the storage period before use. Our results showed that a drying period of the root of *Atractylis gummifera* for weeks under shade resulted in a significant decrease of aqueous extract toxicity. Diluted dried root aqueous extract induced higher decrease of death rates for four treatments out of five (Figure4). These results might mean that a longer drying period might be a way of decreasing the concentration of toxic compound and hence it's the lethacy risk. In a study conducted by Amine Larabi (2012), the author reported that Atractyloside content of *Atractylis gummifera* root collected from 6 sites in Algeria varied among sites. From 0,10% to 0,27%. In addition, Fassina G et al (1961) reported that content of atractylode in roots of *Atractylis* varied in time and it content in leaves in shoots were high in winter and spring seasons. Romeuf et al (2006) reported for several periods of sampling an average content of heterosides not exceeding 0,2%. In addition, aqueous solution of *Atractylis gummifera* is composed of two molecules with different levels of toxicity. This toxicity seemed to be higher for ACTR than ATR.

However, ACTR possesses the characterictic of beeing hydrosoluble and therefore its toxicity level tends to decrease under the effect of the dilution of the aqueous extract of the roots, both fresh and dry. Indeed, for this reason results accomplished in this study showed a significant and declining toxicity effect of aqueous extract of fresh and dried root of *Atractylis gummifera* as the number exhaussions increased (E1>E2=E3). On the other hand the toxiciy decrease of aqueous solutions of fresh and dried root of *Actractylis gummifera* on Westars was also provoked by the acidity of aqueous extract especially if the pH was maintained et pH = 2, value at which the death rate of westars was 67%. On the contrary higher acidic pH such as 5.8 resulted in death 100% of Westers like pH =10 and pH = 12.

The degradation of ATR by hydrothermal treatments as is shown in Figure 6. At high and moderate temperatures, degradation of ATR was observed and increased with incubation time. Acidification also enhances the efficiency of degradation 33% at pH=2 and approximately 50% of ATR could be removed by hydrothermal processing at 100°C for 2 hours (Figure 6) This is consistent with the results reported by Liang and al. (2013); Chien and al. (2012). Thereby, temperature effect on toxicity of aqueous of root extract remains dependent on duration of exposition**.** Results showed that the higher de duration of exposition of aqueous root extract to temperature the lower the rate of Westers. The LD_{50} was recorded at 100°C only when the duration of exposition of aqueous extract was 120mn.

This result suggests that doubling the exposition time at this temperature might probably result in a more degradation of toxic compounds and hence to a decrease of aqueous extract toxicity Solution. This suggestion is supported by results of the experiment where fresh and dried root were compared. In these case results showed for all experiments a 4 week drying under reduced substantially the toxicity of the aqueous extract. The study of toxicity of aqueous extract of *Atractylis gummifera* roots showed that lethal doses of aqueous extract LD_{50} was 1000mg/kg BW for fresh root and 5000mg/KgRBW for dried root. According to Hodge and Sterner (2005) toxicity scale of Aqueous extract of *Atractylis gummifera* are very toxic as illustrated by the dilutions experiment (table 2).

Table 2: Toxicity classes according to Hodge and sterner (2005).

Toxicity rating	Commonly used terms	LD_{50}
1	Extremely toxic	Less than mg/Kg
2	Highly toxic	1-50mg/Kg
3	Moderately toxic	50-500mg/Kg
4	Slightly toxic	500-5000m/Kg
5	Practically non toxic	5000- 50000mg/Kg

Finally, results showed that lethal concentration for fresh root was 1g/kg RBW while that of dried root was 5g/ kg RBW.

5. Conclusion

The results of this work show that the attenuation of the root toxicity of *Atractylis gummifera*, before being used in pharmaceutical industry is possible. By choosing the right sampling site (wetland) at the right stage (avoiding summer and spring). Thus the harvested samples

Must be dried and kept for a good period to be rid of a large part of its toxicity by the hydro-thermal and acidifying process, or of its totality by exhaustion and leaching of the toxic substances (ATR, CATR) known by their water-soluble character. As recommending that:

- It will be necessary to try with other species, Knowing that toxicity is higher in dogs than in mice and rats, suggesting an even higher toxicity in humans.
- Study the interaction between these parameters (fresh root, dry root, site, stage, T °C, pH, exhaustion)
- Study the effectiveness of these methods on other plants that contain the same toxic substances.
- Study the impact of these methods on the attenuation of the root toxicity of *Atractylis gummifera* by another route of administration.
- Try to develop effective antidotes against these poisons in case of poisoning in order to save human lives.

References

[1] Burns, J.J., Zhao, L., Taylor, E.W., Spelman, K., 2010. "The influence of traditional herbal formulas on cytokine activity", Toxicology 278, pp. 140–159. doi:10.1016/j.tox.2009.09.020.

[2] Centre Antipoisons du Maroc., 2013. "Bilan des intoxications au chardon à glu 2013".Rapport Annuel du centre antipoison du Maroc.

[3] Chen, L.-Y., Hu, A., Chang, C.-J., 2013. "The degradation mechanism of toxic atractyloside in herbal medicines by decoction", Molecules (Basel, Switzerland) 18, pp. 18–28. doi:10.3390/molecules18022018.

[4] Cheng, H.M.; Li, C.C.; Chen, C.Y.; Lo, H.Y.; Cheng, W.Y.; Lee, C.H.; Yang, S.Z.; Wu, S.L.; Hsiang, C.Y.; Ho, T.Y. 2010. " Application of bioactivity database of Chinese herbal medicine on the therapeutic prediction, drug development, and safety evaluation", J. Ethnopharmacol. 132, pp. 429–437.

[5] Chien, H.C; Chiu,C.-M. ; Hu, A.; Wu H-C.; Ye, S-P.; Ho, K.-C; and Chen, L.Y. 2012. "Toxicity attenuation of atractyloside in traditional chinese medicinal herbs after hydrothermal processing", J. Biochemistry 53, pp. 459-465.

[6] El-Hilaly J, Mohamed H, Badiaa L ; "Ethnobotanical studies and economic evaluation of medicinal plants in Taounate province (Northern Morocco)", Journal of Ethnopharmacology 86, pp. 149–158.

[7] Fassina G, Veronese G. 1961. "Analysis of extracts of Atractylis gummifera. IV. Chromatographic studies of the pigments of the rhizome", Boll Soc Ital Biol Sper. 37, pp. 518–520.

[8] Fakchich J, Elachouri M ; 2014. "Ethnobotanical survey of medicinal plants used by people in Oriental Morocco to manage various ailments", Journal of Ethnopharmacology. 154 , pp. 76–87.

[9] Gaudeau, C., Gouthiere, L., 1991. "Medicaments a base d'Atractylis gummifera et varietes alba, lyrata, ovata, humilis, cancellata et leurs derives dans le traitement des pathologies cancereuses de pathologies inflammatoires et pathologies immuno-depressives", French Patent FR2658420-A1. http://www.patfr.com/ 199108/FR2658420.html.

[10] Haller, C., Dyer, J., Ko, R., Olson, K., 2002. "Evidence-based case reviews: making a diagnosis of herbal-related toxic hepatitis", Western journal of

medicine.2002, pp. 39-44.

[11] Hodge, A and Sterner B., 2005. "Toxicity Classes", In Canada Center for occupational health and safety.

[12] Larabi I.A., Azzouz M., Abtroun R., Reggabi M., Alamir B., 2012. "Determinations of levels of atractyloside in the roots of Atractylis gummifera L. collected from six different areas of Algeria", Ann Toxicol Anal. 24, pp. 81-86.

[13] Kedrov, A., Hellawell, A., Klosin, A., 2010. "Probing the interactions of carboxy-atractyloside and atractyloside with the yeast mitochondrial ADP/ATP carrier", Structure. 18, pp. 39-46.

[14] Larrey, D., Faure, S., 2011. "Herbal medicine hepatotoxicity: a new step with development of specific biomarkers", Journal of hepatology.2011. 54, pp. 599601.

[15] Laurens, J., Bekker, L., 2001. "Gas chromatographic–mass spectrometric confirmation of atractyloside in a patient poisoned with Callilepis laureola", journal of Chromatography B. 765, pp.127-133.

[16] Liang-Yu Chen, Anren Hu and Chih-Jui Chang., 2013. "The degradation Mecanisme of toxic Atractyloside in herbal medicines by decoction", Molecules. 2013. 18, pp. 2018-2028.

[17] Obatomi, D., Bach, P., 1998. "Biochemistry and toxicology of the diterpenoid glycoside atractyloside", Food and chemical toxicology. 36, pp. 335-346.

[18] Otero, J.M., 1983. "Medicina popular en La Siberia", Alminar 44, pp. 6.

[19] Steenkamp, P., Harding, N., 2006. "Identification of atractyloside by LC–ESI–MS in alleged herbal poisonings", Forensic Science internationnal, .163, pp. 81-92.

[20] Steenkamp, P.A., Harding, N.M., Heerden, F.R. van, Wyk, B.-E. van, 2004. "Determination of atractyloside in Callilepis laureola using solid-phase extraction and liquid chromatography–atmospheric pressure ionisation mass spectrometry", Journal of Chromatography A 1058, pp. 153–162. doi:10.1016/j.chroma.2004.07.099.

[21] Stickel, F., Schuppan, D., 2007. "Herbal medicine in the treatment of liver diseases. Digestive and liver disease ", official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver 39, pp. 293–304. doi:10.1016/j.dld.2006.11.004.

[22] Stickel, F., E. Patsenker, and D. Schuppan. 2005. "Herbal hepatotoxicity", J. Hepatol. 43, pp. 901-910.

[23] Vallejoa J., Perala D., Gemiob P., Carrascoc M., Heinrichd M., Pardo-de-Santayanae M., (2009). "Atractylis gummifera and Centaurea ornata in the Province of Badajoz (Extremadura, Spain). Ethnopharmacological importance and toxicological risk", Journal of Ethnopharmacology 126, pp. 366–370.

[24] Jean-Frédéric Sanchez , Brice Kauffmann , Axelle Grélard , Corinne Sanchez b, Véronique Trézéguet ,Ivan Huc , Guy J.-M. Lauquin ., 2012. "Unambiguous structure of atractyloside and carboxyatractyloside", Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 22, pp. 2973–2975.

NEW ASSAY METHOD OF THE ATRACTYLOSIDE AND CARBOXYATRACTYLOSIDE IN THE HUMAN BLOOD

Siham Errai
Laboratory of Physiology, Pharmacology and Environment Health, Unit of Bioremediation and Environment Department of Biology. Faculty of Sciences Dhar EL Mahraz. Sidi Mohamed Ben Abdellah University, BP : 1796, Fès, Morocco.
E-mail: siham.errai1@usmba.ac.ma
Tel: +38869418

Youssef Khabbal
Laboratory of pharmacology. Faculty of Medicine and Pharmacy, University of Fez BP. 1893; Km 2, Sidi Hrazem Road, Fez 30000, Morocco.

Badia Lyoussi
Laboratory of Physiology, Pharmacology and Environment Health, Unit of Bioremediation and Environment Department of Biology. Faculty of Sciences Dhar EL Mahraz. Sidi Mohamed Ben Abdellah University, BP : 1796, Fès, Morocco.

Mohammed Faid
Institue Agronomic and Vétairinary medecine Hassan II, Rabat, Morocco

Mohammed El Midaoui
Laboratory of Biology. Department of Sciences and Techniques of Plant Production. National School of Agriculture of Meknes. Morocco.

Abdelouahed Maataoui
Laboratory of Biology. Department of Sciences and Techniques of Plant Production. National School of Agriculture of Meknes. Morocco.

Mohammed Benbella
Laboratory of Biology. Department of Sciences and Techniques of Plant Production. National School of Agriculture of Meknes. Morocco.

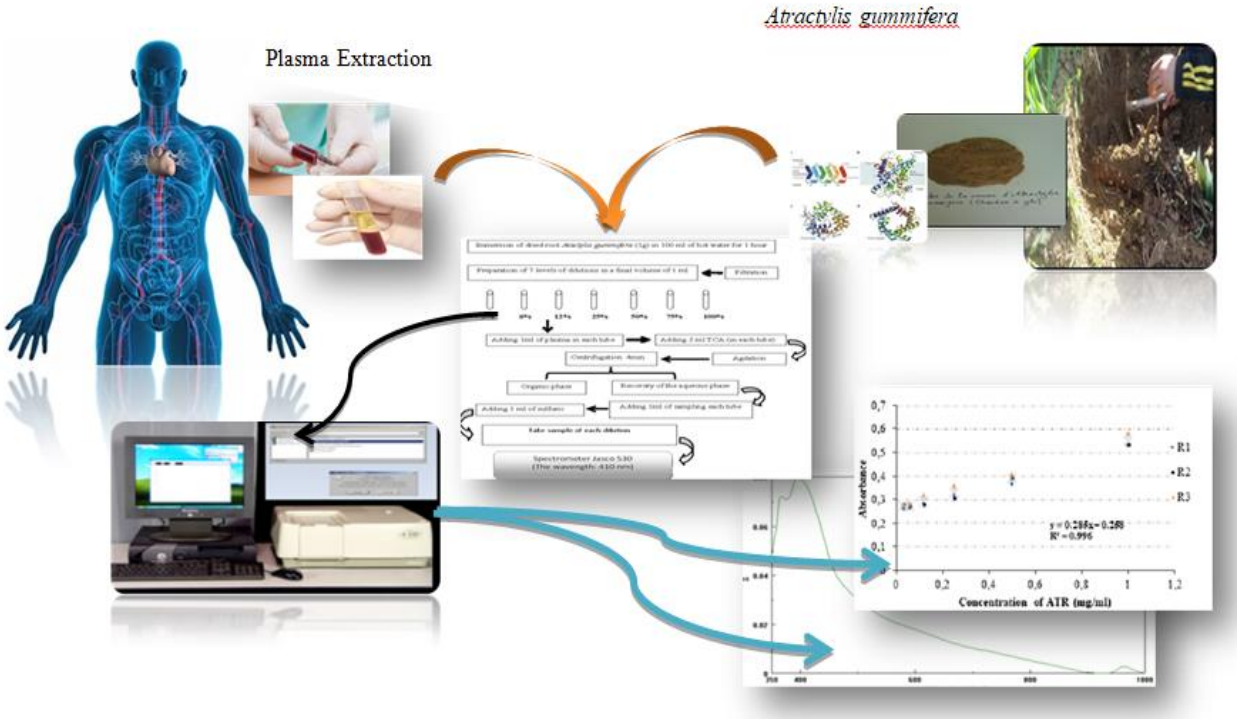
Abdelfattah Abdellaoui
Laboratory of Physiology, Pharmacology and Environment Health, Unit of Bioremediation and Environment Department of Biology. Faculty of Sciences Dhar EL Mahraz. Sidi Mohamed Ben Abdellah University, BP :1796, Fès, Morocco.

Abstract

Atractylis gummifera L. or thistle glue, is a plant of the Asteraceae family, known in Arabic as Addad or Choûk El-Eulk. It is a plant of the Mediterranean region, found in North Africa and southern Europe. In Morocco, the plant is frequently found in the wild life, and is characterized by the production of a highly toxic glycoside called atractyloside (ATR). The main purpose of this work is to develop a new plasma assay method of Atractyloside and carboxyatractyloside in human blood, with simple and practical materials to save lives in danger. Root samples were collected in the region of Fés boulmane, and extracts by the new dosing method, were analyzed by the system of ultra-violet spectrometery (JASCO-530). The validation of our method is based on the recommendations of ICH guidelines for the adaptation of new analytical techniques. The coefficient of determination is 0.99, the limit of detection, limit of quantification, replicability and repetability are respectively 93 µg/ ml, 310 µg / ml, 6.97 % and 7.71 %. While the sensitivity is 0.29, which reduces the risk of interference in the dosage of the active ingredient of the thistle glue plant. Many methods for the determination of atractyloside and carboxyatractyloside are published, often based on the use of liquid chromatography, gas or techniques cumbersome, complex and lacking in sensitivity and specificity. The results of our study show that this new method is practical, simple and applicable to all types of laboratories.

Keywords: *Atractylis gummifera*, Atractyloside, Carboxyatractyloside, Assay, Plasmatique determination

Graphical abstract



I. Introduction

Atractylis gummifera is a thistle of the Asteraceae family, known in Arabic as Addâd or choûk el-eulk (Daniele et al., 2005). It is a herbaceous plant, prickly, fragrant, perennial by its underground part consisting of a flexuous rhizome and taproots. distributed worldwide but especially abundant in the Mediterranean regions: in Northern Africa (Algeria, Morocco and Tunisia) and in Southern Europe (Italy, Greece, Spain and Portugal) (David et al., 1996).

Atractylis gummifera L, is an acaulescent perennial medicinal herb with a long woody root up to 30–40cm long and 7–8cm diameter. It has deeply divided prickly long leaves in a rosette 30–70mm wide; pink florets in 3–7cm wide capitula with middle bracts with three long apical spines . It grows in Northern Africa and Southern Europe in moist soils of cultured grounds and waste places. (Vallejoa and Perala; 2009, Errai and al 2018).

In traditional medicine, *Atractylis gummifera* is still widely used for therapeutic purposes such as fumigation against colds, dizziness and headache, infusion against bleeding during childbirth, anti-syphilis, gangrene, hemorrhoids, skin cancer, poultice dries,heal wounds,

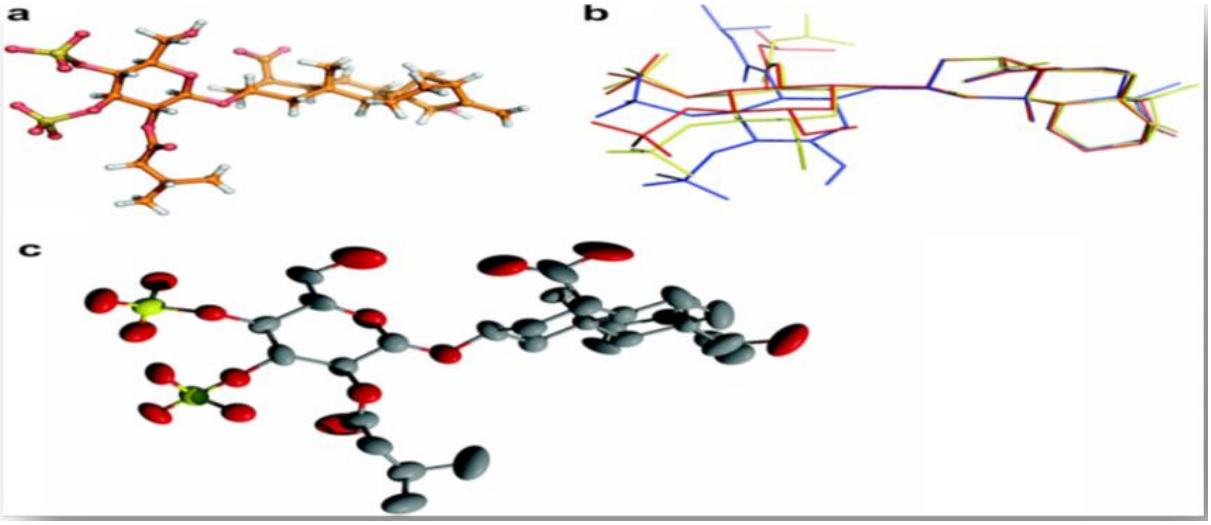
as well as against boils, as a purgative, emetic and worming (Otero, 1983). Interestingly, the effectiveness of the remedy as an anti-inflammatory and anticancer agent is supported by pharmacological studies (Gaudeau and Gouthiere, 1991; El-Hilaly, 2003 ; Fakchich, 2014).

This plant is the source of several cases of severe poisoning, often accidental (confusion with wild artichoke). According to the Poison Control Centre of Morocco, The *Atractylis gummifera* ranks first plants responsible for poisoning, of 487 cases reported between 1980 and 2013 (CAPM , 2013).

Despite the plant's well-known toxicity, its ingestion continues to be a common cause of poisoning. The toxicity of *Atractylis gummifera* resides in atractyloside and carboxyatractyloside, two diterpenoid glucosides capable of inhibiting mitochondrial oxidative phosphorylation. Both constituents interact with a mitochondrial protein, the adenine nucleotide translocator, responsible for the ATP/ADP antiport and involved in mitochondrial membrane permeabilization (Daniele C et al., 2005).

All the underground parts of this plant contain two toxic diterpenoid glucosides: atractyloside (ATR) and carboxyatractyloside (CATR) (Fig. 1).

Figure 1 : ATR crystal structure. (a) one of the 3 ATR molecules of the asymmetric unit is represented (drawn with the program PyMol), (b), superimposition of the 3 ATR molecules from the asymmetric unit, (c) thermal ellipsoid representation of one of the 3 ATR molecules with thermal motion probability of 30% (drawn with the program Mercury)(Jean-Frédéric S, 2012)



However, ATR was isolated from the roots of *Atractylis gummifera* for the first time by Lefranc (1868). The corresponding aglycone (atractyligenine) is a non-volatile diterpene of the (−) kaurene family, with a perhydrophenanthrenic structure (Piozzi et al., 1978).

CATR was isolated for the first time in 1964 and called gummiferin and subsequently identified as 4-carboxyatractyloside (Danieli et al., 1971). CATR differs from ATR owing to the presence of a second carboxylic group in position C-4_ of the diterpene ring (Luciani et al., 1978).

The Poisoned patients manifest characteristic symptoms such as nausea, vomiting, epigastric and abdominal pain, diarrhoea, anxiety, headache and convulsions, often followed by coma. No specific pharmacological treatment for *Atractylis gummifera* intoxication is yet available and all the current therapeutic approaches are only symptomatic (David et al., 1996).

Aim of the present work is the development of a new and simple method for determining of the plasma levels of atractyloside and Carboatractyloside in the roots of *Atractylis gummifera* using blood from healthy patients to the Fez University Hospital Center Morocco. In addition, the emergence of the number of Deaths and poisoning by this plant starts to become a major public health problem. To the best of our knowledge, the Determining the plasma levels of atractyloside and carboxyatractyloside contained in the roots of thistle glue of Moroco Has not-been the carried out before..

II. Materials and methods

II.1. Plant material

With the aim of meeting the objectives of our work and carrying out the necessary tests, we gathered the fresh roots of Atractylis gummifera from one of its natural habitats in Morocco between May and June 2014 in Moulay Yaakoub in the region of Fez-Meknes. The area where we have chosen our study to be carried out in is at an altitude of about 560 m above sea level, and is characterized by a rugged ground, with different altitudes ranging from 350 m to 500 m, and fertile soils. The climate of this area is a continental one characterized by a minimum temperature of 10 ° and a maximum of more than 30 °, but on the day of taking the samples, the temperature was around 37 ° c (figure 2).

Figure 2: Sampling area of *Atractylis gummifera* roots



Once we have located the plants of Atractylis gummifera, thanks to its aerial part that was well described in the literature and after having confirmed it by one of the most recognized botanists, Professor Maatoui of the Department of Science and Production Techniques of the National School of Agriculture in Meknes, we harvested a good amount of roots from the latter, using a sappe (see figure 3).

The roots were quiet large (between 40 and 60 cm long and 20 to 30 cm wide), fleshy, with fine roots and having creeping rhizomes, hard, fibrous, yellowish sections. (Figure 3)

Figure 3: Collection of the roots of *Atractylis gummifera*



Afterwards, the harvested roots were cleaned and broken up into small pieces of 1 to 3 cm in diameter; these fragments were then dried at room temperature away from sunlight, with the purpose of preserving the integrity of the molecules. The plant material was then coarsely grounded in a blade mill to get a fine powder and get the extracts to be studied prepared

II.2. Blood samples

The samples of human blood were collected at the Hassan II Hospital Center (CHU) in Fes, in glass tubes. After that, they were centrifuged to get the plasma separated with the aim of analyzing on the same day of receiving the blood.

Figure 5: Blood samples



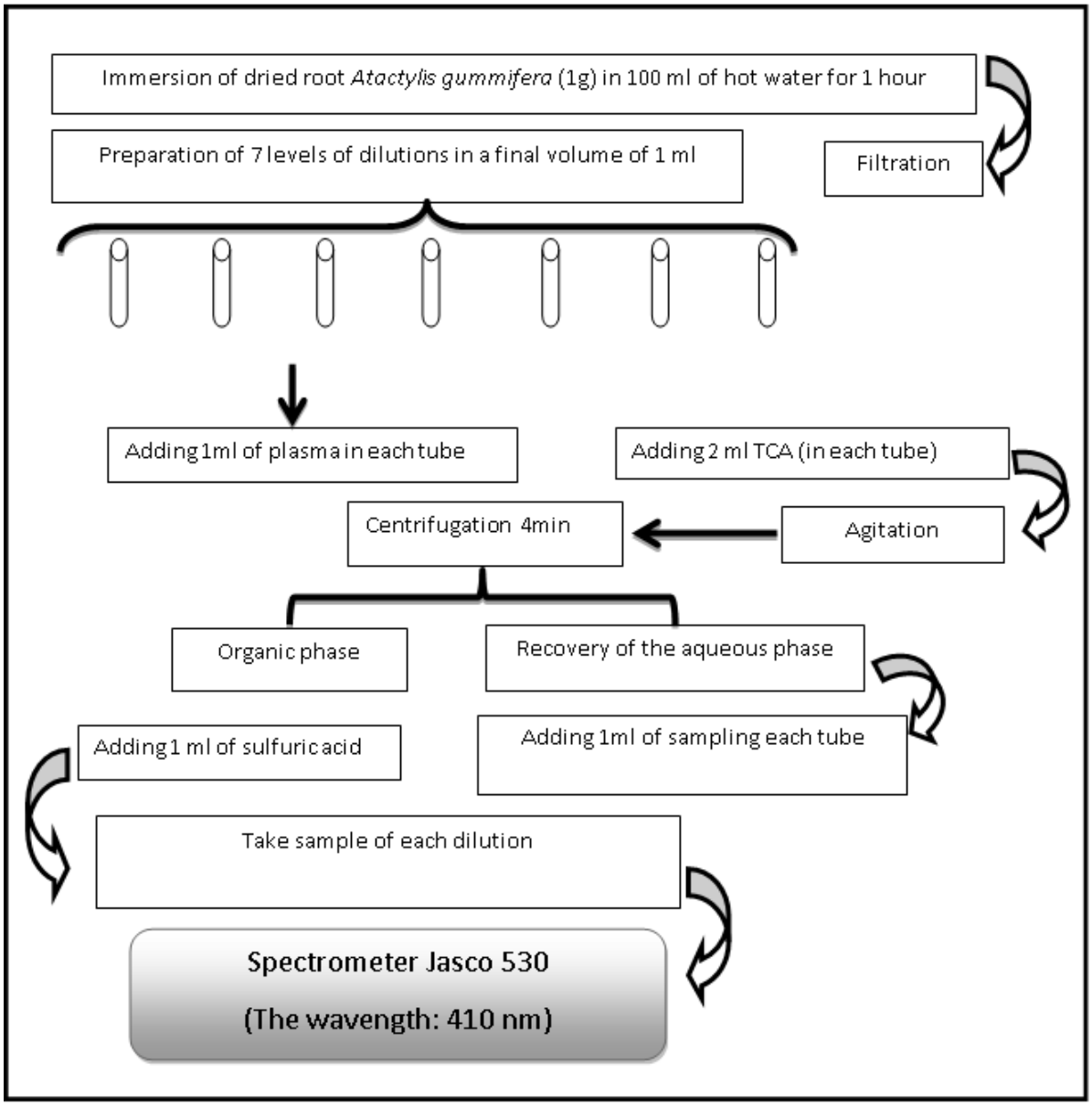
II.3. Extraction method:

II.3. Extraction method:

On a daily basis, a six-concentration standard range was prepared (0.03, 0.06, 0.12, 0.24, 0.5, 1 mg / ml) from a stock solution of 1 mg of glutton with 1 ml of distilled water.

To a volume of 1 ml of the calibration range in 6 ml glass tubes, 1 ml of plasma, 2 ml of TCA are successively added. After centrifugation, 1 ml of the liquid phase is recovered in glass tubes. 1 ml of sulfuric acid was added giving a violet color (Figure 6).

Figure 6: Method of preparation of samples assayed spectrometer.



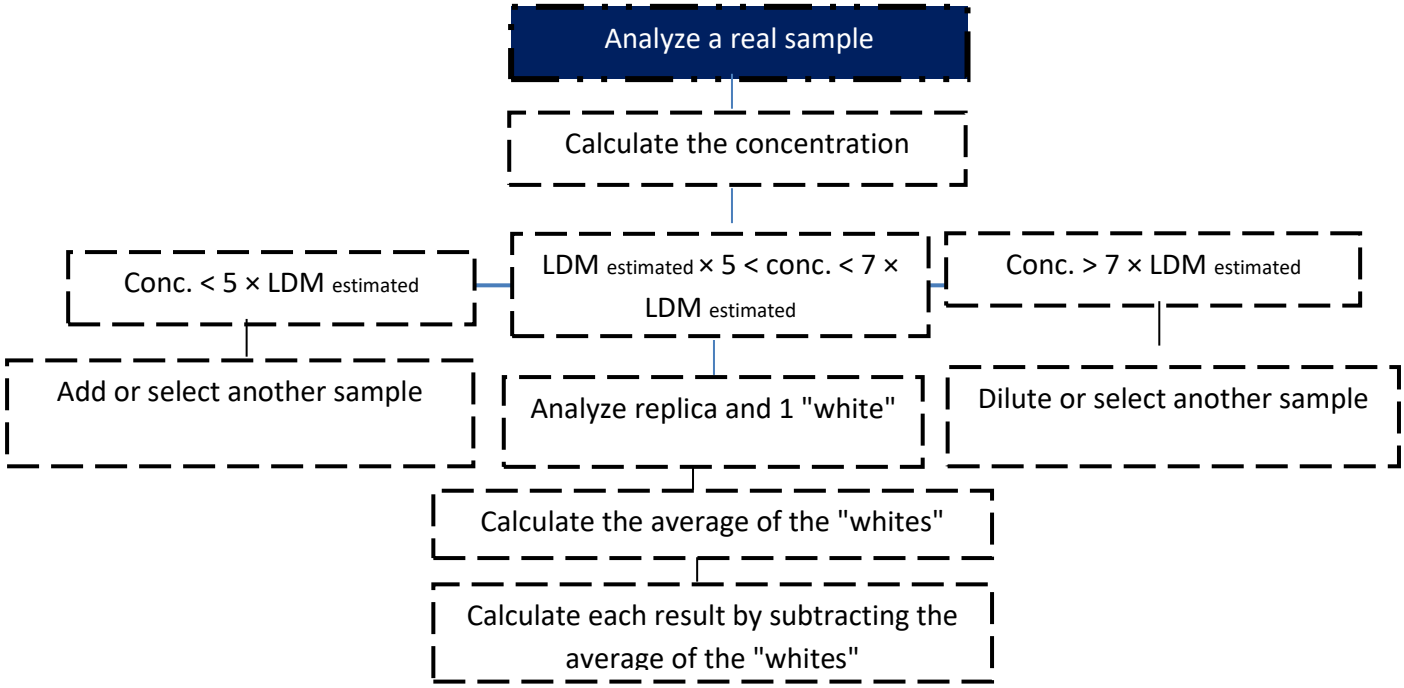
II.4. Dosage and analysis by UV spectrometer:

The spectrometric instrument used (Jasco-V-530) is made up of a light source, double beam. The data acquisition system associated to the spectrophotometer makes it possible to draw the curve giving the absorbance of the mixture as a function of concentration.

With the aim of testing and validating our new assay method, we looked for the maximum absorption of our sample and which was of the order of λ = 410 nm (figure 7).

II.5. Validation

We based the validation of our method on the recommendations of the ICH guidelines for the adaptation of new chromatographic techniques. From the estimated detection limit (estimated MDL), proceed with the forthcoming steps:



From the obtained results, calculate:

- Arithmetic mean of replica

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i-1}^{n} xi}{n}$$

- Standard deviation of replica:

$$S(n) = \sqrt{\frac{\sum_{i-1}^{n} (\bar{x} - xi)^2}{n-1}}$$

or

x: arithmetic mean of a series of measurements;

xi: individual measures;

n: number of measurements;

s: standard deviation of a series of measures.

II.5.1. limit of detection

The detection limit of a method refers to the lowest concentration for a compound analyzed in an actual matrix that, when it undergoes all the steps of a complete method, including chemical extractions and pretreatment, produces a detectable signal with a reliability

defined statistically different from that produced by a "white" under the same conditions. This is the concentration equivalent to 3 times the standard deviation corresponding to the concentration indicated in II.5.

$$LDM = 3 \times s$$

Where, LDM: detection limit of the method; s: standard deviation of replica.

II.5.2. limit of quantification

The quantification limit of a method is the minimum concentration that can be quantified using an analytical method with a defined reliability. This is the equivalent concentration at 10 times the standard deviation obtained when establishing the MDL.

$$LQM = 10 \times s$$

II.5.3. Linearity

The linearity limit is the highest reliable level of measurement that can be used taking into consideration all the factors to be invloved in a method. It was established through the study of the ability (within the dosing interval) to produce results directly proportional to the concentration of analyte in a sample.

II.5.4.Repeatability

Repeatability at a given level concordes with the narrowness of the agreement between the individual results obtained on the same sample tested for the same sample under the same conditions: same laboratory, same operator, same batches of reagents, even equipment and in a reduced time interval.

II.5.5.Replicability

Replicability at a given level corresponds to the close agreement between the successive individual results obtained on the same sample tested in the same laboratory and under the following conditions: same analyst, same device, and the same day. The value will be determined from the following equation:

$$\frac{t_{(0,975;n-1)} \times S_1}{\sqrt{n}}$$

where s1: standard deviation of a series of measurements referring to replicability.

III. Results

The validation of our method was based on the recommendations of the ICH guidelines for the adaptation of new chromatographic techniques.

The results of the analytical validation obtained are outlined in Tables II and II. These displays the specificity, precision and efficiency that typifies this technique; with other key benefits that are essentially simplicity, speed and adaptation to the conditions of all types of laboratories.

Before proceeding to the validation of our new plasma Atractyloside and Carboxyatractyloside assay, contained in the roots of Atractylis gummifera, we began by looking for the maximum absorption of our sample and which was of the order of λ = 410 nm (see figure 7).

Figure 7: UV spectrum of the aqueous extract of Atractylis gummifera

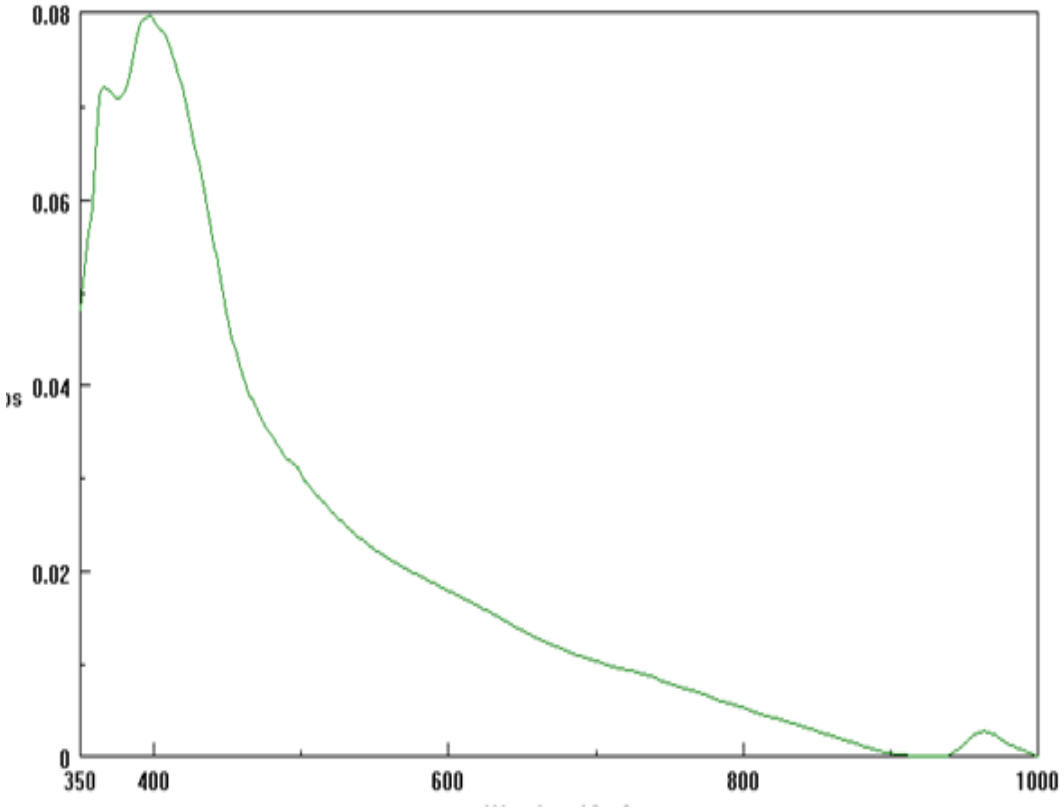
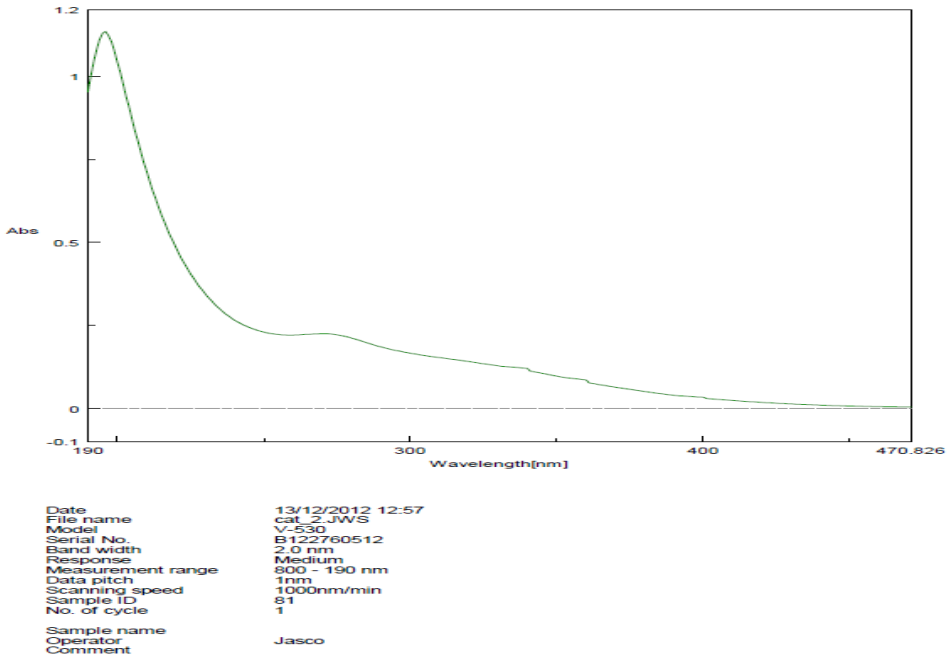


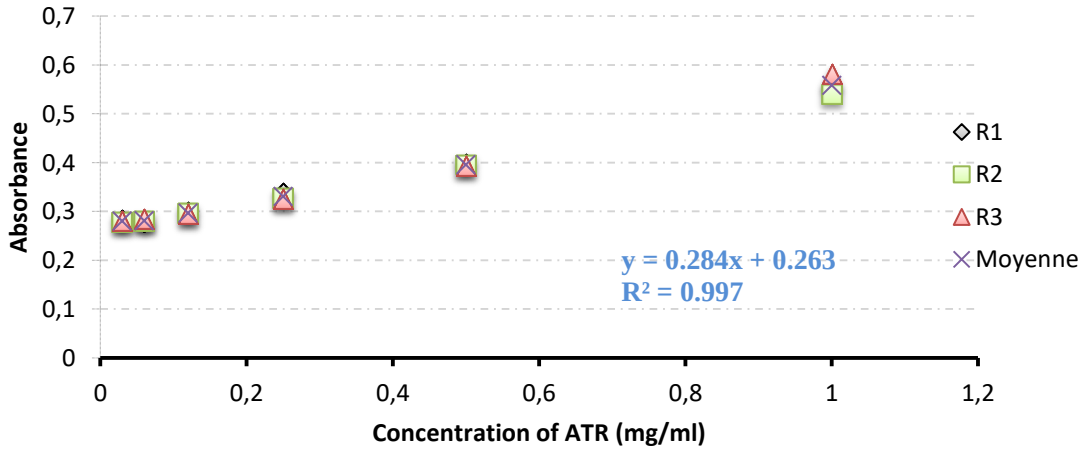
Figure 8: UV spectrum of the resulting final preparation of the extraction process



Then, repeatability, linearity and fidelity were verified. The results of the present study demonstrate that the regression line, determined from 6 concentration levels (each point represents an average derived from a series of five determinations), has good linearity with the function y = 0.2847 x + 0.2639, a regression coefficient r = 0.9972 and a coefficient of determination of about 1 (Fig 9).

Figure 9 : Linearity Test

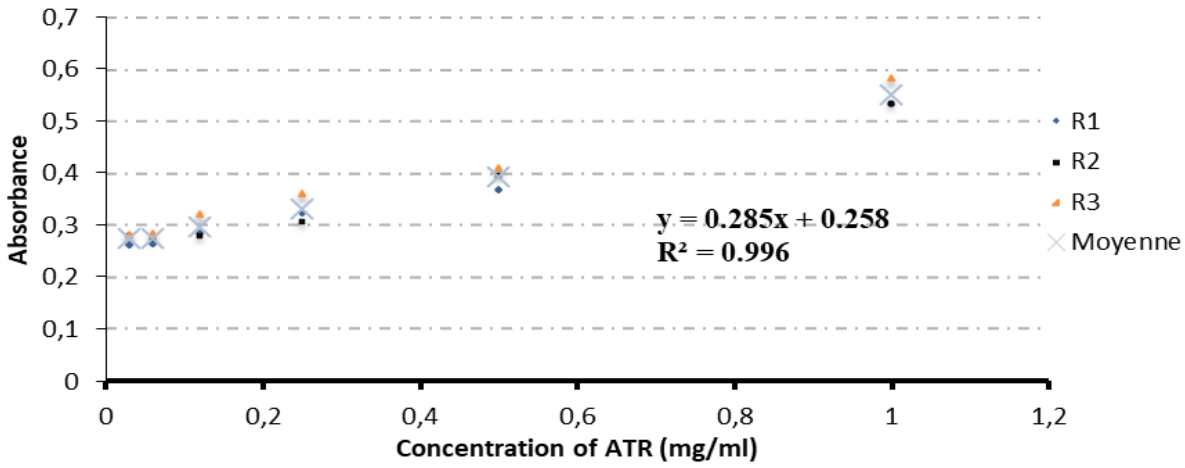
.



Repeatability test counts and repeatability results are determined from intraday absorbance values (Table I). Data recorded on the same day demonstrated good linearity and a coefficient of determination close to 1 (r = 0.99).

Intermediate precision was evaluated by analyzing the results derived from within the same laboratory, changing one or more factors (day, operator, equipment, etc.) for a given time interval (Fig. 10).

Figure 10: Repeatability Test



The "LDD" limit of detection was estimated by reference to the lowest amount of analyte detectable by the method, whereas for the LOQ limit of quantification we determined the lowest concentration that could be measured with an acceptable degree of fidelity. and accuracy (precision> 80% or bias <20%).

Table I: Repeatability Test

Concentration of ATR (mg/ml)	Repeat n°1	Repeat n°2	Repeat n°3	Mean	standard deviation	CV
0,03	0,260	0,280	0,279	0,273	0,011	0,041
0,06	0,264	0,274	0,283	0,273	0,009	0,034
0,12	0,283	0,280	0,320	0,294	0,022	0,076
0,25	0,321	0,308	0,360	0,330	0,027	0,082
0,5	0,366	0,396	0,408	0,390	0,022	0,055
1	0,531	0,534	0,581	0,549	0,028	0,052

Within the established conditions, the limit of detection is 93 µg / ml, the limit of quantification is equal to 310 µg / ml and the sensitivity is 0.29.

Repeatability was assessed by analyzing the same sample under the same conditions: same laboratory, same operator, same batches of reagents, same equipment and in a short time interval, the results are presented in Figure 10.

Figure 11: Fidelity Test

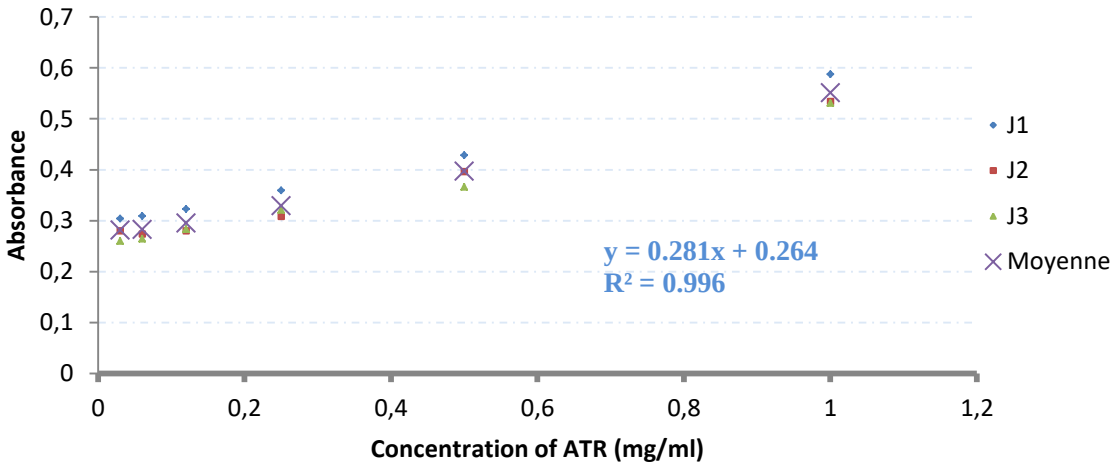


Table II provides a summary of the results having to do with precision methods (inter-day values) for the determination of Atractyloside and Carboxyatractyloside. In

accordance with the results found in repeatability, values recorded from day to day kept the same trend in linearity with a coefficient of determination r = 0.99.

Table II: Fidelity Test

Concentration of ATR (mg/ml)	Day n°1	Day n°2	Day n°3	Mean	Standard deviation	CV
0,03	0,304	0,280	0,260	0,281	0,022	0,078
0,06	0,309	0,274	0,264	0,282	0,024	0,084
0,12	0,323	0,280	0,283	0,295	0,024	0,082
0,25	0,359	0,308	0,321	0,329	0,026	0,080
0,5	0,428	0,396	0,366	0,397	0,031	0,078
1	0,587	0,534	0,531	0,550	0,031	0,057

IV. Discussion

The dried roots are used for medicinal purposes or as an insect repellent (Georgiou et al., 1988). They are used as therapeutic fumigation against colds, vertigo and headache and infusion against hemorrhage during delivery. Furthermore, these dried roots are also used as anti-syphilitic and against boils, purgative, emetic and as dewormer, but unfortunately,

the root of the thistle has already been incriminated for hepato and fatal nephrotoxicity either in humans or in domestic animals feeding on plants containing atractyloside (Stuart et al 1981, Martin et al, 1986) and with great resemblance between the histological results of human and animal organs.

As stated in (Capdevielle and Darraq, 1980), in humans, symptoms begin 6-36 h after ingestion of rhizome extracts of Atractylis gummifera. Palpable symptoms are gastrointestinal problems, including nausea, vomiting, epigastric and abdominal pain, and diarrhea (Capdevielle and Darraq 1980, Georgiou et al., 1988).

Along similar lines, some reports also describe general anxiety, headaches, drowsiness, arrhythmia, and seizures (Hamouda et al., 2000). Generally, these symptoms are followed by coma (Capdevielle and Darraq, 1980).

Laboratory results (marked increase in SGOT, SGPT, and bilirubin) may pinpoint severe hepatocellular injury and acute renal failure (Georgiou et al, 1988; Nogue et al, 1992). Histopathological autopsy examination affirms massive gastrointestinal hemorrhage, necrosis of the hepatic parenchyma with collapse of interstitial connective tissue and accumulation of macrophages (Caravaca-Magarinos et al., 1985).

However, several assay techniques have been described earlier but they lacked validity. The first of the chromatographic techniques that was developed is that done by Calmes et al, in 1994. After a liquid extraction with a water-methanol mixture from fresh roots of Atractylis gummifera L., reverse phase ATR and CATR assay with a water-acetonitrile mixture was performed using a dispersed light detector. The detection limit of the technique is estimated at 9 μg ATR (Calmes et al 1994).

The other chromatographic techniques described all conform to a coupling with mass spectrometry: a general method for the determination of the main vegetable toxicants in the blood by LC-MS-MS was developed by Gaillard and Pepin in 1999. The separation is carried out on a C18 column using an ammonium formate buffer at pH 3 and an elution gradient with acetonitrile. The detection of ions is generally carried out in negative mode (Gaillard et al in 1999)

Steenkamp et al. suggested another method. They used a mobile phase that is made up of a mixture of ammonium formate buffer, methanol and acetonitrile, with a linearity range ranging from 1 ng / ml to 160 μg / ml. (Steenkamp et al 2006)

A GC-MS method has been developed for the detection of atractyloside in gastric lavage fluids and Callilepsis laureola root extracts, with a detection limit of 0.0451 mmol / L [Laurens et al 2001] .

A competition ELISA immunoenzymatic technique has been developed for diagnostic purposes. The results generated have been confirmed by different chromatographic techniques [Bye et al 1990].

The dosage of sugars in solution can be carried out by the so-called anthrone method. It is a colorimetric method based on the intramolecular dehydration of oses in acid medium (H2SO4). The furfural derivatives obtained condense with the anthrone to give colored products (violet). The color differences obtained give a certain specificity to the technique. The results are read on a spectrophotometer where the principle of our method has been validated according to ICH.

However, the whole of the parts of the plant contain the active ingredient Atractyloside (Atr) with variable content. The root contains the highest toxic content followed by the stem, bracts, flower, seed and finally the leaf contains the least (Obatomi and Bach, 1998). Several factors determine the toxicity of Glu thistle (the dose, the age of the subject being intoxicated, the amount and nature of the food substance ingested). Indeed, according to Lefranc, a dose of 100g of fresh root milk infusion or taken in kind, would be fatal for an adult. While according to Charnot, an individual of 60 kg would be killed by 480g of root approximately.

ATR and CATR were also isolated from other plants of different genera, including Callilepsis laureola, Xanthium strumarium, Iphiona aucheri and Wedeila glauca (Obatomi and Bach, 1998). ATR analogues have also been found in aqueous extracts of green beans and roasted Coffea arabica. In particular, three glycosides have been identified: 2-O- (2-O-isovaleryl-beta-D-glucopyranosyl) -atractyligenin, 2-O-beta-D-glucopyranosyl-atractyligenin and 2-O- (3-O- betad-glucopyranosyl-2-O-isovaleriyl-beta-D-glucopyranosyl) -tractyligenin (Obermann and Spiteller, 1976, Richer and Spiteller, 1978).

Several factors, including climate,extraction method, soil composition, timing of harvest and genetic factors, influence the diterpenoid glucoside content in the rhizome of Atractylis gummifera (Errai S and al 2018).For example, differences in ATR content in the rhizome of Atractylis gummifera grown in Sardinia or Sicily (Fassina et al., 1962). A greater amount of ATR was found in the rhizomes harvested in autumn or winter, than in spring or summer, in agreement with a higher content in reserve, substances and compounds active in the underground part of a plant during the quiescence period.

And finally, a quantitative evaluation study showed that Atractylis gummifera of Sicilian origin had a higher ATR content than that of Sardinian origin, even though both plants were acclimatized in the same territory different from the native habitat. origin (Toth, 1964).

ATR contains multiple polar groups and is soluble in water but has relatively low solubility in organic solvents.CATR differs from ATR because of the presence of a second carboxylic group at the C-4 'position. CATR of diterpene is present in fresh plants, not in dried plants, because it is decarboxylated from ATR during aging or desiccation. CATR is also more toxic than ATR (Luciani and Carpenedo, 1978).

V. Conclusion

The new method of plasma determination of atractyloside (ATR) and carboxyatractyloside (CATR) in the roots of thistle glue (*Atractylis gummifera*) showed a coefficient of determination of 0.99. The limit of detection, limit of quantification, replicability and repetability are respectively 93 µg/ ml, 310 µg / ml, 6.97 % and 7.71 %., while the sensitivity is 0.29, which reduces the risk of interference in the dosage of the active ingredient of the thistle glue plant. Many methods for the determination of atractyloside and carboxyatractyloside are published, often based on the use of liquid chromatography, gas or techniques cumbersome and complex.

This new method is validated according to ICH norms and has the advantage of being simple, practical and applicable to all laboratories regardless of their levels.

References

1- Daniele C, Dahamna S, Firuzi O., 2005. Atractylis gummifera L. poisoning: an ethnopharmacological review. Ethnopharmacol. 28;97(2):175-81.
2- David K, Obatomi P, Bach H. Inhibition of mitochondrial respiration and oxygen uptake in isolated rat renal tubular fragments by atractyloside. Toxicology Letters 89 (1996) 155-161.
3- Centre Antipoisons du maroc. Bilan des intoxications au chardon à glu au CAP du maroc (années 1991-2011), 2013.
4- Piozzi, F., 1978. The chemistry of atractyloside. In: Santi, R., Luciani, S. (Eds.), Atractyloside: Chemistry, Biochemistry and Toxicology. Piccin, Padova.

5- Danieli, B., Bombardelli, E., Bonati, A., Gabetta, B., 1971. Carboxyatractyloside, a new glycoside from Atractylis gummifera L. Fitoterapia 42, 91–93.

6- Luciani, S., Carpenedo, F., 1978. Effects of atractyloside and carboxyatractyloside in the whole animal. Chemistry, Biochemistry and Toxicology. Piccin, Padova, pp. 109-124.

7- Gaillard Y, Cheze M, Pepin G. Human poisoning by higher plants: review of the literature. Annales de Biologie Clinique. Volume 59, Number 6, 764-5, November-December 2001.

8- Cano JP. Identification and assay of atractyloside in extracts of thistle glue, Atractylis gummifera L., after separation by thin layer electrophoresis. Bull Soc Pharma Marseille. 1965 2b.

9- Calmes M, Crespin F, Maillard C, Olivier E, G. Balansard HighPerformance liquid chromatographic determination of atractyloside and carboxyatractyloside from Atractylis gummifera L. J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 1994, 663: 119-122.

10- PA Steenkamp. Identification of atractyloside by LC-ESI-MS in Alleged herbal poisonings. Forensic Sci Int.2006: 163 (1-2): 81-92.

11- Gaillard Y, Pepin G. Poisoning by plant material: review of human cases and anlytical determination of main toxin by highperformance liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry. J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 1999; 733: 181–229.

12- Laurens J. Gas chromatographic-mass spectrometric confirmation of atractyloside in a patient poisoned with Callilepis laureola. J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 2001; 765: 127–133.

13- Bye SN, Coetzer HT, Dutton MF. An enzyme immuno-assay for atractyloside, the nephtotoxin of Callilepis laureola (implila). Toxicon. 1990; 28(8): 997–1000.

14- Jean-Frédéric Sanchez, Brice Kauffmann, Axelle Grélard, Corinne Sanchez, Véronique Trézéguet, Ivan Huc, Guy J.-M. Lauquin. Unambiguous structure of atractyloside and carboxyatractyloside. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 22 (2012) 2973–2975

15- Errai siham., Youssef Khabbal ., Badia Lyoussi., Mohammed Faid., Mohammed El Midaoui., Abdelouahed Maataoui., Mohammed Benbella., Abdelfattah Abdellaoui . Attenuation of Toxic Power of Atractylis Gummifera.European

NEW EXTRACTION METHOD OF ATRACTYLOSIDE AND CARBOXYATRACTYLOSIDE

S. Errai [a,*], Y. khabbal [b], A. Elmidaoui [d], M. Benbella [d],B. Lyoussi [a], A. Abdellaoui [a]

a. Laboratory of Physiology, Pharmacology Health and Environment Unit of Bioremediation and Environment Department of Biology. Faculty of Sciences Dhar EL Mahraz, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, BP : 1796, Fès, Maroc.

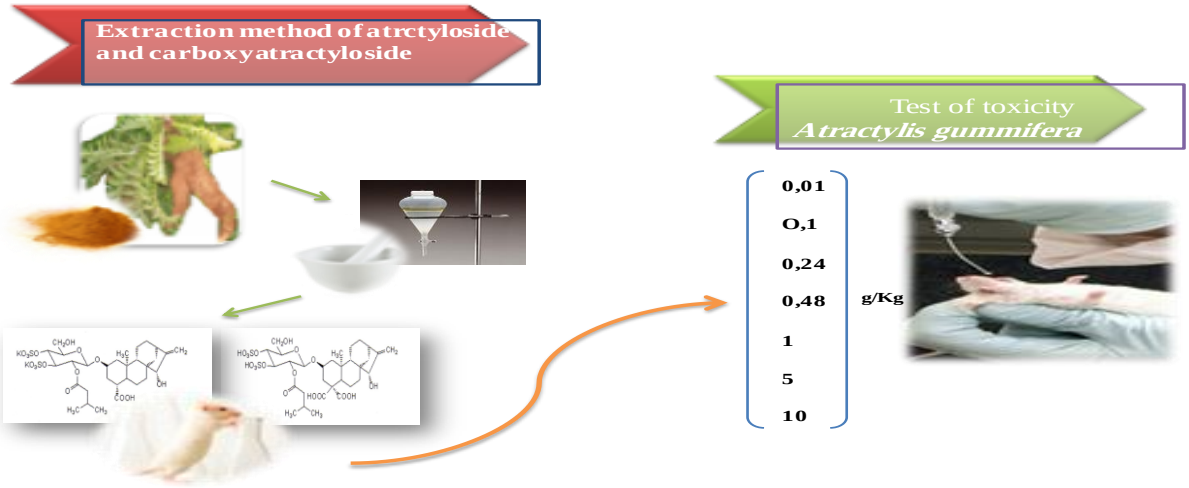
b. Laboratory of pharmacologie. Faculty of Medicine and Pharmacy, University of Fez BP. 1893; Morocco

c. National School of Agriculture, Meknes, Morocco

*For correspondence: Email: siham.errai1@usmba.ac.ma

Abstract

The evaluation of lethal doses (LD_{50}) of *Atractylis gummifera*'s toxic principles namely, atractyloside, and carboxyatractyloside has already been the subject of sporadic studies. However, most of these studies are old and based on the use of products resulting from improper extraction technique. Thus, we found useful to initiate a work to enrich and update data on *Atractylis gummifera*'s DL50. This work includes assessment of the plant's toxic power and validation of a new extraction method to obtain the highest yield of active principle from the plant. Roots of *Atractylis gummifera* used for this study were collected in August 2014 in Morocco. They were first dried under shade then, reduced to powder to undergo the new extraction method. The resulting extract was administered to Wistar rats by gavage. The results presented here, indicate that the extraction method is more effective than others techniques already published and the DL50 value of *Atractylis gummifera* found in this study is 0.48 g / Kg.



1- Introduction

Atractylis gummifera L. (Asteraceae) is a thistle found in Mediterranean regions. Despite the plant's well-known toxicity, its ingestion continues to be a common cause of poisoning. Toxicity of *Atractylis gummifera* is caused by two diterpenoid glucosides: atractyloside (ATR) and carboxyatractyloside (CATR), which can inhibit mitochondrial oxidative phosphorylation. Both constituents interact with adenine nucleotide translocator, a mitochondrial protein responsible for the ATP/ADP antiport and involved in mitochondrial membrane permeabilization [1]. ATR was isolated from the roots of *Atractylis gummifera* for the first time by Lefranc (1868). The corresponding aglycone (atractyligenine) is a non-volatile diterpene from the (−) kaurene family, with a perhydrophenanthrenic structure (Fig.1) [4]. Whereas CATR, also called gummiferin was isolated for the first time in 1964 and subsequently identified as 4-carboxyatractyloside [5]. CATR differs from ATR owing to the presence of a second carboxylic group in C-4 position of the diterpene ring [6]. All the underground parts of this plant contain two toxic diterpenoid glucosides: atractyloside (ATR) and carboxyatractyloside (CATR) (Fig. 1)

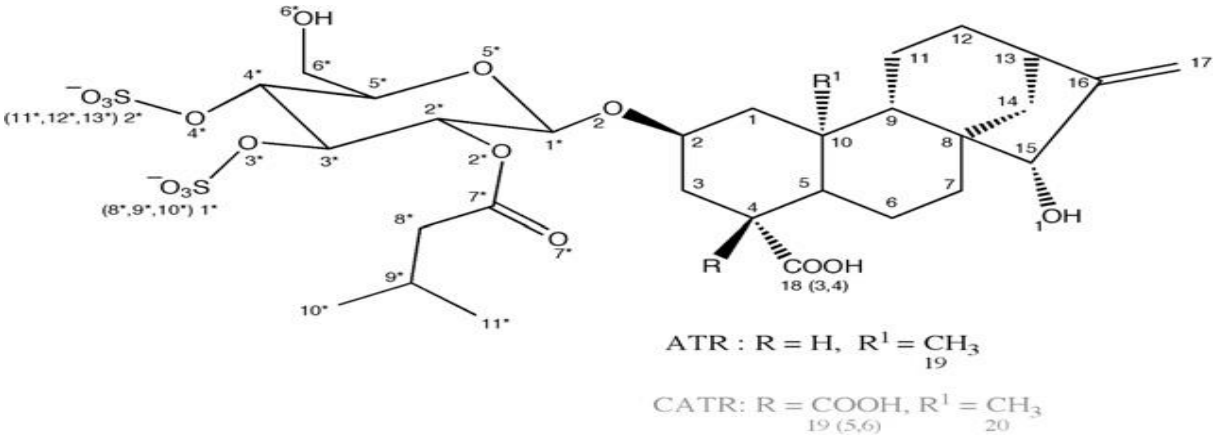


Fig.1: Structure of atractyloside (A) and carboxyatractyloside (B).

In Morocco, due to these compounds, *Atractylis gummifera* is involved in several cases of severe poisoning, often accidentally (confusion with wild artichoke). According to the National Poison Control Centre, *Atractylis gummifera* ranks first among plants responsible for poisoning, with 487 reported cases between 1980 and 2013 [3]. Poisoned patients manifest characteristic symptoms such as nausea, vomiting, epigastric and abdominal pain, diarrhea, anxiety, headaches and convulsions, often followed by coma.

Unfortunately, no specific pharmacological treatment for *Atractylis gummifera* intoxication is yet available and all the current therapeutic approaches are only symptomatic [2].

Moreover, no data on atractyloside lethal doses are available for human beings. Studies have only been performed on animal model and transposing animal data to humans cannot be applied because of the lack of information on the distribution volume of atractyloside.

However, Santi and Arnaud in 1955 [7,8] report that 1,1g/Kg of atractyloside corresponds to the LD50 in rats model while Larabi et al in 2012 [9] report that 260 g of dry root corresponds to the LD50 in rats by oral ingestion, and by intraperitoneal, intramuscular and subcutaneous routes, only 10 to 35 g can reach the LD50.

The significant gap between these values might be due either to the difference in ATR content within the roots used for the cited works, or to the difference in the administration way or to the extraction method of ATR from *Atractylis gummifera*'s roots. Thus, we decided to re-examine the DL50 value in rats by oral administration, using a new method for atractyloside and carboxyatractyloside extractions.

2. Material and Methods

2.1. Plant material

Fresh *Atractylis gummifera* roots used in the present study were collected in Moulay yakoub, Fez on Mai 2014 at Morocco. The plant of *Atractylis gummifera* was identified first at the site of samply by Pr Bari, botanist at the Department of Biology, Faculty of Science (Fez) at the laboratory. Roots of this plant were then cleaned, and then dry under shade at the Laboratory of Biological Department, University of Dhar El Mehraz Fez for four weeks.

2.3. Animal material

Male Westar rats with an average weight of 250g were used for this study. Animals were checked for abnormality and any other disease symptoms. The animals were bred and housed in the animal house.

The rats were randomly divided into lots of 6 rats each which were kept in the animal house at ambient temperature around 25°C, with a photoperiod of 12hlight/12hdark and a free access to a standard pellet feed and tap water ad libitum. Animals were acclimatized for at

least one week before using them in our experiments. The animals were exposed only once to every experiment.

Prior to the assays, animals were subjected to a fasting period of 24 hours. Extracts doses to be tested for their toxicity were administered by force-feeding with a special probe; the research was conducted in accordance to the ethical rules on animal experimentation. Animal lots were examined for mortalities and abnormal behaviour every 30 min during the first 6 hours then once every 2 hours for 3 days. DL_{50} were defined as the lowest concentration that had killed 50% of Westar rats.

2.4. Decoction preparation

For the preparation of decoction, we have put fresh root 100g of crushed *atractylis gummifera* in 200 ml of water additionally distilled, all was brought to the boil for 20 min then let reweighed for 2 hours. The water root extract was obtained by filtering the reset of the root sample in an Erlenmeyer flask. The concentration of the root aqueous extract was 0.5g/mL. Taking in consideration the average rat body weight (RBW) of Westers which is around 250g, the concentrations of aqueous extract of root of *Atractylis gummifera* tested appeared in table 1.

Table 1: Concentration of aqueous extract of fresh root of *Atractylis gummifera* (g.Kg/RBW) tested in the experiment.

Weight (g) of root extract per Kg of BW of rat	10g/Kg	5g/Kg	1g/Kg	0.48g/Kg	0.24g/Kg	0,1g/Kg	0,01g/Kg
Volume of aqueous extract of root (g/mL)	0,5	0,25	0,05	0.024	0.012	0,005	0,0005
Volume of root aqueous extract ingested per rat weighing 250g	5ml	5ml	5ml	5ml	5ml	5ml	5ml

2.5. Extraction method

Roots of Atractylis gummifera were weighed and extracted in cold methanol, chloroform, water (12 : 5 : 3 v/v/v) as described in following scheme. The combined extracts were cleared and concentrated in vacuum at 25°C. Dilutions tested are presented in table 1.

2.5. Efficiency of the method

Check the relevance of this new extraction technique in terms of exhaustion toxic substances; we based on the evaluation of LD_{50} of roots extracts. Oral ingestion of these

decoction and solvent extract showed a change in rat physical activity and behaviour. We observed a reduced activity for hours before rat's death. Mortality rates observed during experiment are reported in Figures 2 and 3.

2.6. Study of the acute toxicity of *Atractylis gummifera*

We used eight batches of 12 rats, of which one was a control. Each animal was identified by a number and different brand. After 24h of fasting, the weight of each rat was taken and they start receiving a given dose by lot using an oral ingestion. The used method of calculation of LD_{50} and its confidence limits was described in 1944 by Miller and Tainter, which consist to give directly on a log paper the percentage of mortality as a function of the dose's log. The standard deviation of the LD_{50} was calculated using the following relationship:

$$\frac{\textbf{lethal dose 84\% – lethal dose 16\%}}{2}$$

The mean deviation of the LD_{50} was estimated by the following formula

$$\text{Mean deviation} = \frac{\mathbf{2S}}{\mathbf{2N'}}$$

Where, N' was the total number of animals in the batches with a mortality percentage between 7 and 93%.

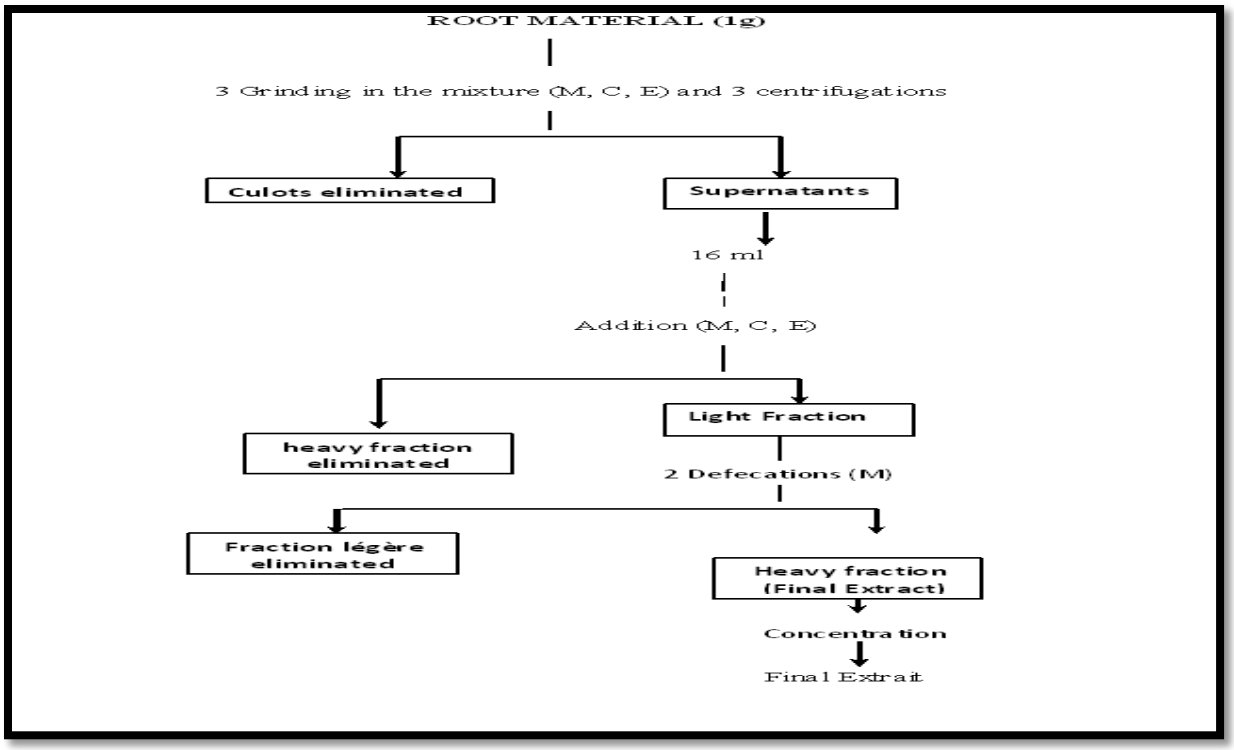


Fig 2: Experimental protocol of carboxyathracthyloside extraction from dry plant material (root or shoot). M, C and E are respectivly for methanol, chloroform and water.

3- Results

Oral ingestion of these extracts showed a change in rat physical activity and behaviour. We observed a reduced activity for hours before rats death. Mortality rates observed during experiment are reported in table 1. Above the dose of 0,24g/Kg, mortality rate is more important. It reaches 50% at 0,48 g/kg and 100% at 5 g/kg.

Table 1: Mortality rates after oral administration of extract and decoction doses to Wistar Rats

dose of Aractylis g en g/Kg	Tested Rats	Decoction		NEXM	
		Dead Rats	Mortality %	Dead Rats	Mortality %
0,01	6	0	0%	0	0%
0,1	6	0	0%	0	0%
0,24	6	0	0%	0	0%
0,48	6	0	0%	3	50%
1	6	1	50%	6	100%
5	6	3	67%	6	100%
10	6	5	100%	6	100%

***NEXM: New Extraction Methode**

According to Santi R et Arnaud (1955), 1,1 g of dry roots corresponds to rat DL_{50} by oral administration (VO) while 10 à 35 g lead to the DL_{50} by intra-péritoneale (IP), intramuscular (IM), and subcutaneous (SC) ways .

Based on these results, this extraction technique lead to an exhaustion of the plant material: 10-fold more efficient than maceration,2-fold more efficient than the others techniques already published. Through this new extraction method, DL_{50} of Atractylis gummifera roots is 0,48g/Kg.

According to the results of the statistical analysis, the percentage of mortality recorded in the groups of rats treated with the decoction and the extract was strongly correlated with the types of extract as well as the administered dose (g / kg) of the *Atractylis gummifera* plant.

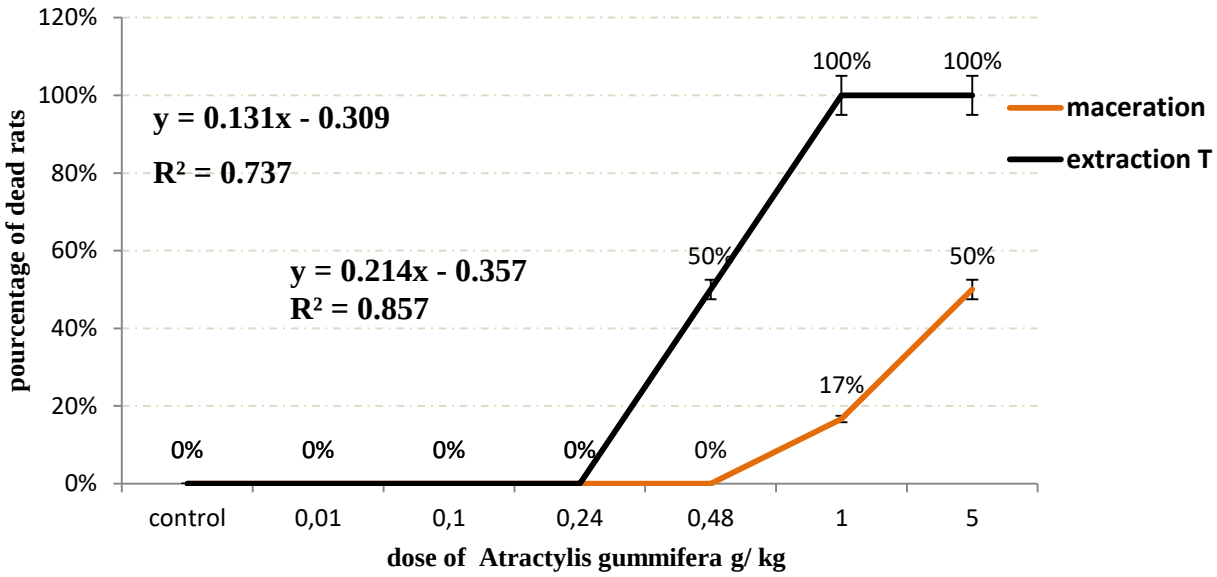


Fig 3: percentage of dead rats

These correlations are of the order of 0.924 and 0.710 respectively in the groups having received the decoction and the extract.

At the end of acute toxicity assessment test, the DL_{50} obtained is 0,48g/kg in rats in case of oral administration of the extract. According to HODGE and STERNER **[10]** toxicity scale for chemical substances these DL_{50} (**0,48g/kg**) allow us to classify this extract as moderately toxic substance (cluster 3) and the decoction as low toxic substance (cluster 4)

Table 2: toxicity scale for chemical substances by HODGE and STERNER

Toxicity rating	Commonly used terms	LD_{50}
1	Extremely toxic	Less than mg/Kg
2	Highly toxic	1-50mg/Kg
3	Moderately toxic	50-500mg/Kg
4	Slightly toxic	500-5000m/Kg
5	Practically non toxic	5000- 50000mg/Kg

Finally, results showed that lethal concentration for decoction was 5 g/kg while that of NEXM was 0.48 g/ kg.

4- Discussion

Atractyloside (ATR) and carboxyatractyloside (CATR) are diterpenoid glycosides produced by several plants among which *Atractylis gummifera* which is found in the

Mediterranean area. These substances are sometimes responsible for human intoxication (gastrointestinal hemorrhage, hepatic necrosis). Toxicity is explained by their high-affinity binding to and inhibition of the mitochondrial adenine nucleotide carrier (Ancp). The Ancp is a member of the mitochondrial carrier family catalyzing a 1:1 exchange between the uptake of ADP into the mitochondrial matrix and the release toward the cytosol of the ATP produced by ATP synthase. Both ATR and CATR have been extensively used to understand the function of Ancp; they block the carrier in one inhibited conformation by interacting with residues within its cavity facing the inter membrane space thereby preventing ADP/ATP binding.

The first chemical characterization of atractyloside and was described in 1868.1 has an empirical formula of C30H44K2O16S2 and a molecular mass of 802.13 [protonated form ATR: C30H46O16S2, molecular mass 726 [22]. The compound contains multiple polar groups and is soluble in water but has relatively poor solubility in organic solvents.

The carboxylate group common to CATR and ATR is now interacting with R279 (in a helix 6) via a water molecule while the extra carboxylate specific of CATR forms a salt bridge with R79 (in a helix 2) better explaining the increase of CATR affinity as compared to ATR[11] .

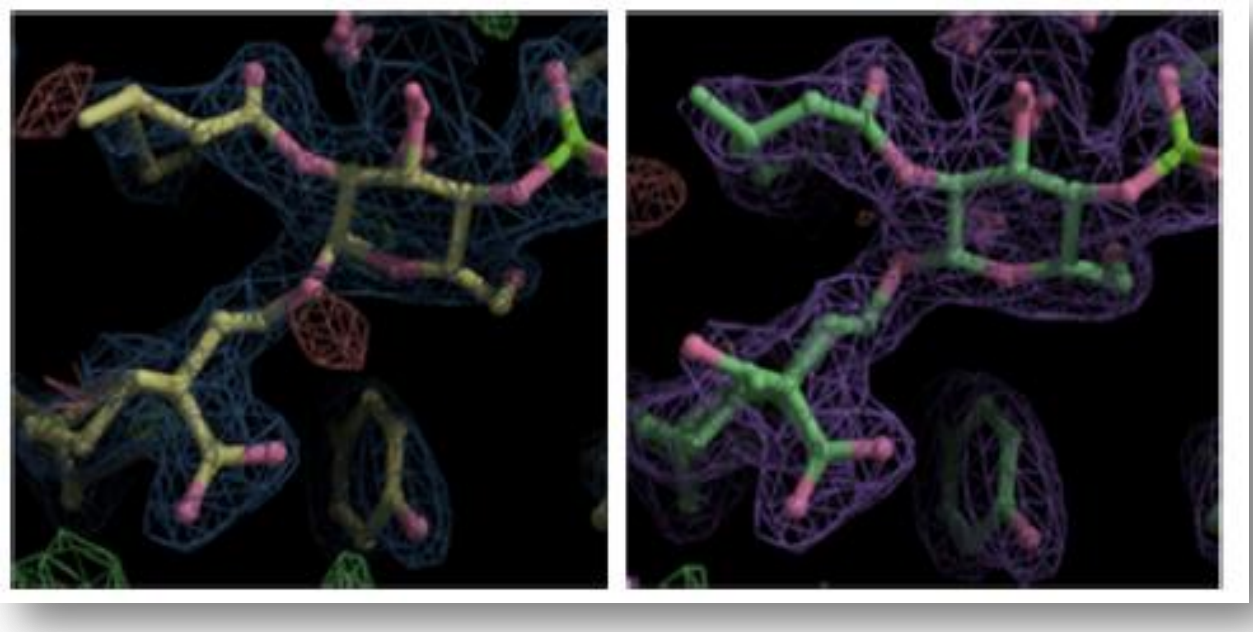


Fig 4: Electron density maps superimposed to CATR enantiomers. Left: map calculated on 1OKC structure with a-D-glucoside-(_)-kauren. Right: map calculated on refined 1OKC structure with b-D-glucoside-(_)-kauren. 2FoFc maps (blue and violet) are contoured at 1 r, and FoFc at _3 r (red) and 3 r (green) [11].

However, these differences in structure influence the impact of the molecule in terms of toxicity, something that has been reported by several studies and that showed that the CATR and much more toxic than the ATR. In vivo and at the end of this evaluation test for acute general toxicity, the LD50 is quantified at 0.48 g / kg in rats when oral administration of the extract (ATR + CATR) and 5g / kg in the case of decoction (ATR + CATR). By comparing this value with the standards that classify the substances according to their LD50, this LD50 classifies the extract used as a medium toxic substance and decocted it as being slightly toxic, this result is comparable with the acute toxicity study performed on the substance. Atractylis gimmifra in 1955 by Santi and whose oral lethal dose is also classified among the moderately toxic substances (1100 mg / kg).

Table 3: Correlation between the dose of Atractyloside and the lethal amount of the root [7-8].

Animal	Administration mode	DL50 mg/kg	Deadly quantity D'ATR (g)
Mouse	IP	434	10
Rat	IM	431	10
	SC	155	35
	VO	1100	260
	IP	210	50

According to Santi R et Arnaud (1955), 1,1 g of dry roots corresponds to rat DL50 by oral administration (VO) while 10 à 35 g lead to the DL50 by intra-péritoneale (IP), intramuscular (IM), and subcutaneous (SC) ways .

Based on these results, this extraction technique lead to an exhaustion of the plant material, 2-fold more efficient than decoction and the others techniques already published . Through this new extraction method, DL50 of *Atractylis gummifera* roots is 0,48g/Kg. This is attributed to the high efficiency of the new technique proposed in terms of depletion toxic substances. Knowing, that ATR and epi-ATR occur in the root since both are obtained from extraction at low temperature, it is possible to convert CATR to ATR by heating [1,2] . This is explained by Danieli et al. [3] in a mechanism according to which the formation of ATR is kinetically favored. The formation of epi-ATR in the plant may be the result of enzymatic decarboxylation of CATR or an isomerization of ATR to epi-ATR. This also easily explains the results.

The LD50 obtained by this new extracting method is considered moderately toxic. But we must not forget the bioaccumulation phenomenon, the toxic may accumulate in the body but its toxic action appears only when it is mobilized in the tissues in which it was deposited. This

shows us the necessity to perform chronic toxicity studies and others to know some physicochemical parameters.

Behavior change, dizziness and reduced activity of rats in this experience show a broad distribution and a general toxic effect from the body to the central nervous system. Mortality is manifested in doses exceeding 0.48 g / kg, this does not exclude adverse effects on the consumer in case of repeated ingestion, prolonged ingestion in time and in the case of high daily doses ingestion. Knowing that there is no data on lethal doses of atractyloside in humans, transposition of animal data to humans cannot be applied due to the lack of kinetic data on volume of distribution of atractyloside, that is an important value needed to calculate the "Human Equivalent Concentration toxicity.

Concluding remark

The new method of extraction allowed us to obtain the new LD_{50} of *Atractylis gummifera* which was 0.48 g / kg. Therefore, this technique leads to an exhaustion of the plant material, 2-fold more efficient than decoction and the others techniques already published. This obtained LD_{50} would be a support for the clinician in assessing the degree of toxic impregnation in the case of acute poisoning or in case of need of atractyloside or carboxyatractyloside for laboratory tests.

Additional information

Atractyloside (ATR) and carboxyatractyloside (CATR) are diterpenoid glycosides produced by several plants like *Atractylis gummifera*. These substances are sometimes responsible for human intoxication [1]. Toxicity was explained by their high-affinity binding and inhibition of the mitochondrial adenine nucleotide carrier (Ancp) [2]. The Ancp is a member of the mitochondrial carrier family catalyzing a 1:1 exchange between the uptake of ADP into the mitochondrial matrix and the release toward the cytosol of the ATP produced by ATP synthase. Indeed, several studies have shown that CATR is much more toxic than the ATR **[**3] .

Based on these results, the solvent extraction technique described here (Figures 1) led to a 2-fold more efficiency than decoction and others techniques already published [4, 5]. Through this new extraction method, LD_{50} of *Atractylis gummifera* roots is 0.48g/Kg. This

could be attributed to the high efficiency of the new technique proposed in terms of depletion toxic substances from the plant material.

Conflict of interest

All the authors indicate no actual or potential conflict of interest, including any inancial, personal or other relationships with other people or organizations.

Références

1- Daniele C, Dahamna S, Firuzi O., 2005. Atractylis gummifera L. poisoning: an ethnopharmacological review. Ethnopharmacol. 28;97(2):175-81.

2- David K, Obatomi P, Bach H. Inhibition of mitochondrial respiration and oxygen uptake in isolated rat renal tubular fragments by atractyloside. Toxicology Letters 89 (1996) 155-161.

3- Centre Antipoisons du maroc. Bilan des intoxications au chardon à glu au CAP du maroc (années 1991-2011), 2013.

4- Piozzi, F., 1978. The chemistry of atractyloside. In: Santi, R., Luciani, S. (Eds.), Atractyloside: Chemistry, Biochemistry and Toxicology. Piccin, Padova.

5- Danieli, B., Bombardelli, E., Bonati, A., Gabetta, B., 1971. Carboxyatractyloside, a new glycoside from Atractylis gummifera L. Fitoterapia 42, 91–93.

6- Luciani, S., Carpenedo, F., 1978. Effects of atractyloside and carboxyatractyloside in the whole animal. Chemistry, Biochemistry and Toxicology. Piccin, Padova, pp. 109-124.

7- Santi R, Cascio G. Ricerche farmacologiche sul principio attivo dell_Atractylis gummifera. I. Azione generale. Arch Ital Sci Farmacol. 1955; 5: 354–363.

8- Arnaud J. Contribution à l'étude du fruit du chardon à glu, Atractylis gummifera. Thèse Doct. Pharm. Université d'Alger.1957.

9- Jean. Sanchez ;Brice K, Axelle G, Corinne S, Véronique T, Ivan H, Guy J. Unambiguous structure of atractyloside and carboxyatractyloside. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 22 (2012) 2973–2975

10- Islam, A., Mohamed, A., Rania, A., 2012. Déterminations des teneurs en atractyloside dans les racines d'Atractylis gummifera L. provenant de six régions d'Algérie. Ann Toxicol Anal 24(2): 81-86

11- M. LOMP0; S. OUEDRAOG0; S. SOURABIE ; I.P. GUISSOU, Valorisation d'une plante médicinale anti-inflammatoire, Institut de Recherche en Sciences de la Santé

(lRSS) Département Médecine-Phannacopée Traditionnelle Pharmacie, Faculté des Sciences de la Santé, Vol .l0, Ouagadougou, 1988, p : 68-79

Conclusion et recommandation

Notre pays, le Maroc, est doté d'une biodiversité végétale immense, qui suscite un grand intérêt à être découverte. Une grande partie de cette flore, que constitue cette biodiversité, est représentée par de larges gammes d'espèces médicinales. Dans cette étude, on s'est intéressé en particulier à une plante connue sous le nom commun du chardon à glu (*Atractylis gummifera* L). Elle est considérée à la fois toxique, pour les populations, surtout rurales, qui la côtoient le plus souvent, et utile pour la médecine par son utilisation dans un intérêt plutôt médicale. Ce travail s'est fixé, comme premier objectif l'identification des groupes phytochimiques que contiennent les racines fraîches et sèches de cette plante, et d'aborder, dans un deuxième temps, l'étude relative à la toxicité égue et chronique des différentes formes d'extraits de ces racines, utilisées aussi bien en pratique qu'au quotidien par les populations plus ou moins avisées. D'autre coté nous avons réalisé des tests biologiques et pharmacologique afin de pouvoir vérifier scientifiquement l'intérêt de son usage en médecine traditionnel et explorer des nouvelle potentialités que peuvent avoir cette plante, ainsi que le développement d'une méthode de dosage d'Atracyloside et prospection des voies d'atténuation de sa toxicité. En définitive, les conclusions, des résultats des différentes expérimentations et d'analyses obtenus, peuvent être schématisées et présentées comme suit :

- les racines *d'Atractylis gummifera* contiennent aussi bien des tanins, des flavonoïdes, des coumarin, des terpenoide , des quinon et des phénols dont la teneur varie en fonction du types d'extraction et de la dose utilisée.

- Les résultats du dosage des phénols totaux montrent que la plus faible teneur a été enregistrée dans le cas de l' Hexane (24.02 ±0.5) suivi par le macéré (39.83 ±1.71), le décocté (47.11 ± 0.85) et l'Acétate (75.88 ±1.91), alors que la meilleure teneur a été observée chez l'extrait Méthanolique (182.66 ±0.21),

- Compte à l'étude de la toxicité aigüe, il ressort que le macéré est plus toxique que le décocté et que la DL_{50} de la racine sèche *d'Atractylis gummifera* du Maroc utilisé en décoction est de l'ordre de 5.01 g/kg et de 2.32 g/kg dans cas du macéré.

- Au niveau des etudes de toxicité chronique le poids n'a pas été significativement affecté mais on note des lésions hepatiques et rénales avec des modifications des paramètres

biochimiques importants (ALT, AST, GGT). Augmentation des bilirubines et diminution de la créatinine.

- Les deux extraits *d'Atractylis gummifera* (décocté et macéré) semblent présenter un intérêt et haut potentiel par leurs activités biologique et pharmacologique. Cependant, les deux extraits (décocté et macéré) ont réagi positivement et différemment sur les souches microbiennes testées.

- Le décocté des racines sèches *d'Atractylis gummifera* a témoigné d'une forte activité antimicrobienne même vis-à-vis des souches multi résistantes aux antibiotiques. Globalement, l'activité antimicrobienne du décocté est plus importante que celle du macéré avec un spectre antimicrobien large et à des doses plus faibles.

- En ce qui concerne les activités pharmacologiques, les résultats obtenus sont très prometteurs, avec des taux d'inhibitions allant jusqu'à 98 % en activité antioxydante et 93 % au niveau de l'activité anti-inflammatoire,

- l'atténuation de la toxicité *d'Atractylis gummifera* est possible grâce à des procédés hydrothermiques, acidifiants et d'épuisement. Cependant, Cette dégradation est noté à des températures élevées et modérées et augmentait avec l'augmentation de la durée d'incubation: environ 50% de la toxicité pouvait être éliminée par un traitement hydrothermal à 100 ° C pendant 2 heures, l'acidification améliore également l'efficacité de l'atténuation de la toxicité à pH = 2. De plus, l'hydro-épuisement permet de réduire la toxicité de ces extraits à 100% probablement par l'élimination totale des substances toxiques (ATR et CATR: solubles dans l'eau) contenues dans l'extrait de racine.

- La nouvelle méthode de détermination plasmatique *d'Atractylis gummifera*, a montré un coefficient de détermination de 0,99, un coefficient de corrélation de 0,99, une limite de détection de 1,23 µg/ml, limite de quantification de 3,72 µg/ml et une sensibilité de l'ordre de 0,29, ce qui diminue le risque de toute interférence pour le dosage du principe actif de la plante du chardon à glu.

A notre connaissance, c'est la première fois que de tels résultats sont ainsi clairement démontrés pour cette plante. Nos travaux ayant été réalisés à partir d'extrait aqueux, ceci pourrait justifier donc certaines utilisations thérapeutiques de cette plante en médecine traditionnelle et pourraient indiquer la possibilité de leur usage thérapeutique par les sociétés

compétentes en respectant les doses létales. La présence de tanins, flavonoïde et phénol dans les extraits de cette plante pourrait justifier les propriétés antimicrobiennes observées car ces substances ont des propriétés antibactériennes connues.

Ce travail va nous ouvrir des horizons de recherche ciblés dans le domaine des plantes utilisées en médecine traditionnelle, notamment en termes de mise en évidence des principes actifs et évaluation de leurs activités biologiques et pharmacologique. Sachant que notre pays possède une biodiversité importante dont chaque plante se caractérise par un réservoir assez important de métabolites secondaires avec des caractéristiques thérapeutiques et pharmacologiques particulières qui demandent d'être exploitées par des recherches plus approfondies. A cet effet, il est important de :

►Déterminer de nouvelles substances bioactives naturelles pouvant répondre aux différents problèmes de la santé et d'être un alternatif de médicaments synthétiques.

►Développer des médicaments à base des plantes.

►Orienter les recherches scientifiques vers la réalisation des études approfondies et complémentaires qui seront nécessaires et devront pouvoir confirmer les performances mises en évidence.

- Développer des antidotes contre l'atractyloside et le carboxyatractyloside
- Sensibiliser les gens de la compagne de la gravité et du danger que présente cette plante en cas de dépassement de dose ou d'usage inappropriée.

Et finalement nous conseillant l'utilisation de la racine *d'Atractylis gummifera* comme anti inflammatoire, anti oxydant et anti bactérien mais qu'a des dose inferieur au 1/10 de la DL_{50} et que pour des usage externe de préférence, on attendant que les firmes pharmaceutique développent de nouveaux produits naturel à base de cette plante et qui soit dépourvu de ATR et CATR qui sont la sources de sa toxicité.

Références

Aït Youssef M. Plantes médicinales de Kabylie. Ibis Press. Paris; 2006. ISBN:2-910728-57-9.

Andersen O. M., Markham K. R. Flavonoids: Chemistry, biochemistry, and applications. BocaRaton, Fla., London: CRC; 2006. ISBN: 9780849320217.

Aboufatima R., Chait A., Dalal A., Zyad A., De Beaurepaire R., (2002). Antinociceptive effets of single and repeated intacerebroventriculary and intraperitoneallyinjections of CT evaluated by tail flick test in rats and writhing test in mice. Reviews in biology and biotechnology, 2:38-43.

Aouadhi S. Atlas des risques de la phytothérapie traditionnelle [Master spécialisé en toxicologie]. Faculté de médecine de Tunis; 2010.

Ahid S., Ait El Cadi M., Meddah B., Cherrah Y. *Atractylis gummifera* L. :de l'intoxication aux méthodes analytiques. Ann Biol Clin 2012. 2012;7 (3): 263-8.

Almeida T.F., Roizenblatt S., Tufik S. (2004). Afferent pathways: a neuroanatomical review. Brain research, 1000, 40-56.

Abedi L. Travaux pratiques de pharmacognosie. université d'Alger; 2003.

Boutoub O. Validation statistique du Dosage du carboxyatractylatosidedu chardon à glu par spectrophotométrie UV [Licence en Sciences & Techniques]. FÈS: UNIVERSITÉ SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH; 2015.

Boussliman Y., Ait El Cadi M., Eljaoudi R, Laatiris A., Bouklouze A., Cherrah Y. Les plantes toxiques au Maroc. Médecine du Maghreb. 2012.

Boudjouref M. Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienned'extraits d'*Artemisia campestris* L. [Mémoire Pour l'obtention du diplôme de Magister].Université Ferhat Abbes, Sétif; 2011.

Bruneton J. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 4e édition revue et augmentée. Paris, Cachan: Éd. Tec & doc; Éd. médicales internationales; 2009. 1 vol. (1269. ISBN: 2743011882.

Boizot, N., Charpentier, J.-P. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Cahier des Techniques de l'INRA, 79-82. 2006.

Bouakaz I. Etude phytochimique de la plante Genista Microcephala. [Mémoire de magister]. batna; 2006.

Biaye M. Actions pharmacologiques des tanins [Thèse Présentée et soutenue pour obtenir le grade de docteur en pharmacie (Diplome d'état)]. Université de Dakar; 2002.

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.

Bibdigital.rjb.csic.es/Imagenes/F (611)POT_Fl…/POT_Fl_Tun_2_432.pdf.

Bandoniene, D., Pukalskas, A., Venskutonis, P.R. et Gruzdiene, D. (2000). "Preliminary screening of antioxidant activity of some plant extracts in rapeseed oil." Food Research International, 33: 785-791.

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.

Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. International Journal Food Microbiology; 94; 223-253.

Bruni A., Luciani S., Bortignon C. Competitive reversal by adenine nucleotides of atractyloside effect on mitochondrial energy transfer. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects. 1965;97(3):434–441. doi:10.1016/0304-4165(65)90154-6.

Berche P, Gaillard J-L, Simonet M, (1989). Bactériologie: bactéries des infections humaines. Médecine-Sciences Flammarion.

Buenz EJ. (2006). Developed countries should be the focus for effectively reducing chronic disease. J. Epidemiol. Community Health; 60(7): 562-3.

Bowser DN, Petrou S, Panchal RG, Smart ML, Williams DA. Release of mitochondrial Ca2+ via the permeability transition activates endoplasmic reticulum Ca2+ uptake. FASEB J. 2002;16(9):1105–1107. doi:10.1096/fj.01-0828fje.

Boyd B., Ford C., Koepke Michael C., Gray K., Horn E, McAnalley S. et McAnalley B. (2003). Etude pilote ouverte de l‟effet antioxydant d‟Ambrotose AOTM sur des personnes en bonne santé. GlycoScience & Nutrion 4, 7p.

Benchiheub M. Etude des protéases de quelques plantes endémiques. Purification, propriétés, mécanisme d'action et applications technologiques. Thèse Université Constantine ; 2015.

Besson J.M. (1990): « Le nocicept»; ion Moniteurs des pharmacies et des laboratoires; pp : 8- 13.

Courvoisier S., Ducort R,. Garhini S., Ghetti V,. (1957). Psychotropic Drugs, Edit., Elsevier Amsterdam, 373.

Bayes O.M. (1997). Contribution à l‟étude de l‟activité anti-inflammatoire de la pulpe de fruit de Balanites aegyptiaca L. (Zygophyllaceae). Thèse pharmacie, Bamako. 67 p.

Beaulieu P. (2006). Pharmacologie de la douleur. Les Presses de l‟Université, Montréal. 608

Boullard B. Plantes médicinales du monde: Réalités et croyances. Paris: Estem; 2001. 636 p.

ISBN: 2843711177.

Brooks J., Tracy I. (2005). From nociception to pain perception: imaging the spinal and supraspinal pathways. Journal of Anatomy, 207, 19-33.

Boissier JR, Simon P, Lwoff JM, (1964). L‟utilisation d‟une réaction particulière de la souris (Méthode de la planche à trous) pour l‟étude des médicaments psycho tropiques. Thérapie 22 : 467-468.

Boukri N. Contribution à l'étude phytochimique des extraits bruts des épices contenus dans le mélange Ras-el-hanout [Mémoire de mastèr en science de la nature et de la vie]. Université KASDI MERBAH Ouargla; 2014.

Belarbi N., Rhalem N., Soulaymani A., Hami H., Mokhtari A., Soulaymani B. R. Intoxication par l'*Atractylis gummifera* L. au Maroc (1992-2008). Antropo, 30, 97-104. 2013.

Chaumont JP, Millet-Clerc J. Phyto-aromathérapie appliquée à la dermatologie. Paris: Editions. Tec & Doc Lavoisier; 2011. ISBN: 2743013362

Calmes M., Crespin F., Maillard C., Ollivier E., Balansard G. High-performance liquid chromatographic determination of atractyloside and carboxyatractyloside from Atractylis gummifera L. Journal of Chromatography A. 1994;663(1):119–122. doi:10.1016/0021-9673(94)80503-2.

Capdevielle P., Darracq R. L'intoxication par le charcon à glu ,*Atractylis gummifera* L. [Poisoning by bird-line thistle (*Atractylis gummifera* L.) . 1980;40(2):137–142.

Claude JR. (1985). Investigations toxicologiques pour un nouveau médicament. Sem. Hop. Paris.

Chardon G., Viala A., Vignais P., Stanislas E. L'intoxication par le chardon à glu , *Atractylis gummifera* L.: essai de traitement du chien intoxiqué par un extrait [poisoning due to the birdlime thistle, atractylis gummifera l. attempt at treatment of the dog poisoned by an extract]. Therapie. 1964;19:1313– 1322.

Cakova V. Contribution à l'étude phytochimique d'orchidées tropicales [Thèse de doctorat en Chimie]. France: Université de Strasbourg; 2013.

Cohen Y. Jacquot C. (2008). Pharmacologie : Abrégés de pharmacie. 6ème édition, Masson, Paris, 487.

Campan R., Scapini F., (2002). Ethologie- Approche systématique du comportement. Ed. De Boeck Université. P.165.

Capron F., (1998). Forme anatomo-clinique de l‟‟inflammation, in trouble de la mortalité et de la sensibilité digestive. Revue du praticien 20, 2273-2276.

Colot M. (1972). Notions techniques de pharmacologie générale. Masson.

Cousins M.J. and Power I. (1999). Acute and postoperative pain. In (P.D. Wall & R. Melzack Ed.). Textbook of Pain, 4th ed. Edinburgh, Churchill Livingstone, p. 447-491.

Charnot A. La Toxicologie au Maroc [Mémoires de la Société des sciences naturelles du Maroc.]. Rabat: ; 1945. n° 47 (vol. 826).

Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P., Vidal N. Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. Food Chemistry. 2006;97(4):654–660. doi:10.1016/j.foodchem.2005.04.028.

Daniele C., Dahamna S., Firuzi O., Sekfali N., Saso L., Mazzanti G. *Atractylis gummifera* L. poisoning: An ethnopharmacological review. Journal of Ethnopharmacology. 2005;97(2):175– 181. doi:10.1016/j.jep.2004.11.025.

Dupont C. (1987). Le cout des études toxicologiques d‟‟un nouveau médicament. Lett. Pharma.; 1: 1.

Derraji A. chardon a glu: remède ou poison [infosanté,la revue des professionnels de santé et du médicament]. 2014.

Dieng C. (1993). Contribution à l‟‟étude de Khaya senegalensis (DESR.) A.JUSS (Meliaceae). Thèse pharmacie, Dakar, 10, 109 P.

Dacosta Y. Les phytonutriments bioactifs. Paris: Éditions Y. Dacosta; 2003. 317 p. ISBN: 978-2-951822-00-9.

Dupont F, Guignard JL. Botanique: Systématique moléculaire. 13th ed. Masson; 2005.

Danieli B., Bombardelli E., Bonati A., Gabetta B. Structure of the diterpenoid carboxyatractyloside. Phytochemistry. 1972;11(12):3501–3504. doi:10.1016/S0031-9422(00)89846-5.

Diterpenoid Glycoside Atractyloside. Food and Chemical Toxicology. 1998;36(4):335–346. doi:10.1016/S0278-6915(98)00002-7.Dupont F, Guignard JL. Botanique: Les familles de plantes. 15e édition. Issy-les-Moulineaux:

Dupont F., Guignard JL. Botanique: Les familles de plantes. 16e édition. ELSEVIER MASSON; 2015. 1 vol. (XV-388 (Abrégés de pharmacie). ISBN: 9782294741173.

Eddleston M., Persson H. Acute Plant Poisoning and Antitoxin Antibodies. Journal of Toxicology: Clinical Toxicology. 2003;41(3):309–315. doi:10.1081/CLT-120021116.

Eichholzer JV, Lewis IA, MacLeod JK, Oelrichs PB. The toxic extractives from wedelia asperrima—I: The structure and synthesis of the unusual glycosidic portion of wedeloside. Tetrahedron. 1981 Elsevier;Volume 37, Issue 10.

El Fennouni M. Les plantes réputées abortives dans les pratiques traditionnelles d'avortement au Maroc [Thèse Pour l'Obtention du Doctorat en Pharmacie]. 2012.

ELSEVIER MASSON; 2012 (Abrégés de pharmacie). ISBN: 978-2-294-71426-9.

Émile Laoust. Mots et choses berbères [Paris 1920 réédition Rabat, 1983].

Frohne D., Pfander HJ, Anton R. Plantes à risques: Un ouvrage destiné aux pharmaciens, aux médecins, toxicologues et biologistes. Paris, Cachan: Lavoisier; 2009. ISBN: 2743009071.

Fiorucci S. Activités biologiques de composésde la famille des flavonoïdes: Approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire [Thèse de doctorat]. Nice; 2006.

Fourment, Roques. Répertoire des plantes médicinales et aromatiques d'Algérie [Documents et renseignements agricoles]; 1942.

Fassina G., Contessa AR. sur la pharmacognosie de l'*Atractylis gummifera* L. Planta Médica (Georg Thieme Verlag Stuttgart) 1961.

Gaillard Y., Cheze M., Pépin G. Intoxications humaines par les végétaux supérieurs: revue de la littérature. Annales de Biologie Clinique ; 59(6) :764-5. 2001.

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. J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 1999;733(1-2):181–229.

Georgiou M., Sianidou L., Hatzis T., Papadatos J., Koutselinis A. Hepatotoxicity due to *Atractylis gummifera*-L. J Toxicol Clin Toxicol. 1988;26(7):487–493.

Hammiche V. et al. Plantes toxiques à usage médicinal du pourtour méditerranéen. © Springer-Verlag. France, Paris ; 2013.

Gattefossé J. Les plantes dans la thérapeutique indigène du Maroc. 10: 73-123. Paris: Larose; 1921.

Ghedira K (2005). Flavonoids: structure, biological activities, prophylactic function and therapeutic uses. Phytothérapie, 3(4), 162-169.

González-Gallego J, García-Mediavilla MV, Sánchez-Campos S, Tuñón MJ. (2010). Fruit polyphenols, immunity and inflammation Br J Nutr3:S15-27.

Garnier Delamare (1992). Dictionnaire des termes de médecine. Editions Maloine, Paris

Guirmand F. et Le Bars D. (1996). Physiologie de la nociception. Annales Françaises d'Anesthèsie et de Rèanimation, 15, 1048-79.

Hafidi K. Intoxications par les plantes et les produits de la pharmacopée traditionnelle chez l'anfant [pour l'obtention du doctorat en medecine]. FES; 2014.

Hamouda C, Hédhili A, Ben Salah N, Zhioua M, Amamou M. A review of acute poisoning from *Atractylis gummifera* L. Vet Hum Toxicol ; 46(3): 144-6. 2004.

Herodez S. S., Hadolinb M., Skergeta M. and Zeljko Knez, (2003). Solvent extraction study of antioxidants from Balm (*Melissa officinalis L.*) leaves, Food Chemistry, 80, 275Ŕ282.

Hale AL. (2003). Screening Potato Genotypes for antioxidant Activity, Identification of the Responsible Compounds and Differentiating Russet Norkotah Strains Using Aflp and Microsatellite Marker Analysis, Office of Graduate Studies of Texas A&M University, Genetics 260p.

Hedili A, Warnet JM, Thevenin M, Martin C., Yacoub M, Claude JR. Biochemical Investigation of *Atractylis Gummifera* L. Hepatotoxicyty in the Rat. Archives of Toxicology n°13. pp 312-315 [chapitre de livre Biological Monitoring of Exposure and the Response at the Subcellular Level to Toxic Substances]. 1989.

http://www.jardinsdugrandportage.com/images/Catalogue2013internet.pdf [Catalogue internet.pdf]. 2013.

Huang, M.H., Huang, S.S., Wang, B.S., Sheu, M.J., Hou, W.C. (2011). Antioxidant and antiinflammatory properties of Cardiospermum halicacabum and its reference compounds ex vivo and in vivo. J. Ethnopharmacol., 133: 743 - 750.

Hmamouchi M. Plantes alimentaires, aromatiques, condimentaires, médicinales et toxiques au Maroc. 1997.

Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacol Ther. 2002;96(2-3):67–202. eng.

Hamouda C., Amamou M., Thabet H., Yacoub M., Hedhili A., Bescharnia F., Ben Salah N., Zhioua M., Abdelmoumen S., El Mekki Ben Brahim N. Plant poisonings from herbal medication admitted to a Tunisian toxicologic intensive care unit, 1983-1998. Veterinary and human toxicology (3). 2000;42:137.

http://www.luontoportti.com.

http://www.mr-plantes.com.2011.

Hami H., Soulaymani A., Skalli S., Mokhtari A., Sefiani H., Soulaymani R. Intoxication par Atractylis gummifera L. Données du centre antipoison et de pharmacovigilance du Maroc [Poisoning by Atractylis gummifera L. Morocco poison control center data]. Bull Soc Pathol Exot. 2011;104(1):53–57. doi:10.1007/s13149-010-0102-8.

Hmamouchi M. Les plantes médicinales et aromatiques marocaines. Maroc: Edition Fédala-

http://www.tela-botanica.org.

Isorez G. Contribution à la chimie des flavonoïdes :Accès à des analogues de pigments du vins rouges [Présentée en vue de l'obtention du grade de de chimie organique I]. université LOUIS

Jürgen R., Paul .S., Ulrike S., and Reinhard S., (2009). Essential Oils of Aromatic Plants with Antibacterial, Antifungal, Antiviral, and Cytotoxic PropertiesŔ an Overview: Forsch Komplementmed.16: 79Ŕ90.

Juven B.J., Schved F., Weisslowiez H., (1994). Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. J. Appl. Bacteriol. 76: 626-631.

Jouanna J., Boudon-Millot V., Guardasole A., Magdelaine C. La science médicale antique: Nouveaux regards: études réunies en l'honneur de Jacques Jouanna. Paris: Beauchesne; 2007 (Bibliothèque historique et littéraire). ISBN: 2701015146.

Khadhri A. Composées phénoliques et activités antioxydantes de deux extraits de Chardon à glu: *Atractylis gummifera* L. Revue Soc. Sci. Nat de Tunisie. 2013.

Kidd B.L. & Urban L.A. (2001). Mechanisms of inflammatory pain. British Journal of Anaesthesia, 87, (1), 3-11.

Kim H.Y., Moon B.H., Lee H.J., Choi D.H. (2004). Flavonol glycosides from the leaves of Eucommia ulmoides O. with glycation inhibitory activity. Journal of Ethnopharmacology 93, 227Ŕ230.

Kubeczka, K.H., Bartsch, A. et Ullmann, I. (1982). "Recent studies on essential oils of Apiaceae." Aetherische Oele, Ergeb. Int. Arbeitstag.: 158-187.

Khiati M. (1998). Guide des maladies infectieuses et parasitaires. OPU, Alger.

Kechkar M. extraction de la silymarine et étude de son activité antimicrobienne [Mémoire en vue d'obtention du magister en microbiologie appliquée]. Université Mentouri Constantine; 2008.

Koechel D.A., Krejci M. E. Extrarenal and direct renal actions of atractyloside contribute to its acute nephrotoxicity in pentobarbital-anesthetized dogs. Toxicology (1). 1993;79:45.

Kebbab R. Etude du pouvoir antioxydant des polyphénols issus des margines d'olives de la variété Chamlal: Evaluation de l'activité avant et aprés déglycosylation [Mémoir en vue d'obtention du diplôme de magister de sciences biologiques]. Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou; 2014.

Leonard E., Yan Y., Koffas M. A. Functional expression of a P450 flavonoid hydroxylase for the biosynthesis of plant-specific hydroxylated flavonols in Escherichia coli. Metab Eng. 2006;8(2):172–181. eng. doi:10.1016/j.ymben.2005.11.001.

Larrey D. plantes médicinales :intéret thérapeutique et risque d'hépatotoxicité. encycl méd chir(édition scientifique et médicales Elsevier.Paris). 2001.

Lahsissène H., Kahouadji A., Tijane M., Hseini S. Catalogue des plantes médicinales utilisées dans la région de Zaër (Maroc Occidental). Lejeunia, revue de botanique. 2009;N° 186.

Lugasi A., Hovari J., SagiK., Biro L. The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. Acta.biologica. 2003;Volume 47(1-4):119-125.

Le Bihan J.Y., Lemasson J.P. la chromatographie liquide à haute performance.2013Lewis I.A., Macleod J. K., Oelrichs P. B. The toxic extractives from wedelia asperrima—II. Larabi A ,Azzouz M, Abtroun R, Reggabi M, Alamir B. Déterminations des teneurs en atractyloside dans les racines d'*Atractylis gummifera* L.: provenant de six régions d'Algérie.2012. doi:10.1051/ata/2012009.

Le Vante A., Albe-Fessard D. et Tuurel C.I., (1978): «Donnés récentes sur les voies de la douleur »; Ann, Anes, Fran ; XIX ; pp : 302-308.

Leminor L., et Veron M., (1998). Bactériologie médiale. Flamm. Méd. Sci. 273-294.

Leclerc H, Gaillard J-L, Simonet M., (1995). Microbiologie générale, la bactérie et le monde bactérien. Doin Editeurs, Paris.

Lefranc E. Etude botanique, chimique et toxicologique sur l'*Atractylis gummifera L.*: (EI haddad des arabes). Paris: librairie germer- bailliere; 1866.

Larribaud J. Tindouf et le Sahara occidental. revue des archives de l'Institut Pasteur ,Alger. 1952.

Lemordant D., Boukef K., Bensalem M. Plantes utiles et toxiques de Tunisie. journal Fitoterapia. 1977.

Larrey D. Liver involvement in the course of phytotherapy. Presse Med ; 23(15): 691-3. 1994.

Lechat P.; Calvo F.; De Crémoux P.; Giroud J-P.; Lagier G.; Lechat Ph.; Rouveix B.; Weber S. (1990). Les médicaments de l‟‟inflammation, in Abrégé de pharmacologie. Masson, Paris, 288-319.

Meunier A., Braz J., Cesselin F., Hamon M., Pohl M., (2004). Inflammation et douleur : thérapie génique expérimentale. Médecine/Sciences, 20 :325-30.

Madani N., Sbaï H, Harandou M., Boujraf S., Achour S., Khatouf M., Kanjaa N. Intoxication par le chardon à glu chez une femme enceinte. La Presse Médicale. 2006;35(12):1828–1830. doi:10.1016/S0755-4982(06)74909-0.

Mokennon Debebe, Mekbeb Afework, Eyasu Makonnen, AsfawDebella, Bekesho Geleta and Negero Gemeda. Evaluations of Biochemical, Hematological and Histopathological Parameters of Subchronic Administration of Ethanol Extract of Albizia Gummifera Seed in Albino Wistar Rat. 2017. Journal of Clinical Toxicology. ISSN: 2161-0495.

Mohammedia; 1999. 389 p. ISBN: 9954800700. Indexes to plant names in Arabic, Berber, French, and Latin.

Mouaffak Y., Boutbaoucht M., Ejlaidi A., Toufiki R., Younous S. Intoxication mortelle au chardon à glu: À propos d'un cas. Archives de Pédiatrie. 2013;20(5):496–498. doi:10.1016/j.arcped.2013.01.055.

Masri W., Hedhili A., Amamou M. Intoxication par *Atractylis gummifera* L: À propos de deux cas cliniques. Revue Francophone des Laboratoires. 2009;(413):87–91. doi: 10.1016/S1773-035X(09)74252-2.

Merad R. Contribution à la connaissance de la pharmacopée traditionnelle algérienne: les éventaires du Grand-Alger [These pour Ie Doctorat d'Etat en Pharmacie]. Université d'Alger. Faculté mixte de médecine et de pharmacie; 1973.

Medic sanic M, Jasprica I, Smolcic Bubalo A, Et Mornar A. Optimization of Chromatographic Conditions in Thin Layer Chromatography of Flavonoids and Phenolic Acids. Croatica Chemica Acta, p 361-366. 2004.

Michel Chauve. http://uses.plantnet-project.org/fr. etude de l'efficacité de cynara humilis sur les brulures: modèle de la brulure thermique chez le rat. [2012 (71). 2012 [updated 2012].

Matasyoh J.C., Maiyo Z.C., Ngure R.M., Chepkorir R. (2009). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Coriandrum sativum. Food Chemistry 113, 526Ŕ529

Mitsher LA., Lev RP., Bathala MS., Wu WN., Beal J.L., (1972). Antibacterial agents from higher plants, Introducion rationale and methodology. Journal of Natural Products 35, 157-165.

Marongiu B. , Porcedda S., Piras A., Rosa A., Deiana M. and A. Dessi, (2004). Antioxidant Activity of Supercritical Extract of Melissa officinalis Subsp. Inodora, Phytoter. Res., 18; 789 Ŕ 792.

Moure, A., Cruz, J.M., Franco, D., Dominguez , J.M. et Sineiro, J. (2001). "Natural antioxydants from residual sources." Food Chemistry, 72: 145-171.

Meunier A., Braz J., Cesselin F., Hamon M., Pohl M., (2004). Inflammation et douleur : thérapie génique expérimentale. Médecine/Sciences, 20 :325-30.

Madhavi, D.L., Deshpande, S.S. et Salunkhe, D.K. (1995). "Toxicological aspects of food antioxidants." Food antioxidants. Technological and Health perspectives.

Miossec P. (2003). Physiopathologie de l‟‟inflammation. La revue du praticien, 53, 1-7.

Meyer R.A., Campbell J.N. & Raja S.N. (1994). Peripheral neural mechanisms of nociception. Edinburgh, Chruchill-Livingstone.

Morel Y., et Barouki R., (1999). Repression of gene expression by oxidative stress. Biochemical Journal 342(3), 481-496.

Mouhib M., El Omari Z. Nos plantes médicinales: emploi en médecine moderne, en homéopathie, en médecine populaire [Edition Copiste,Casablanca]. 1988.

Namiki M. (1990). Antioxidants antimutagens in food. Crit. Rev. Food Sci. 29: 273-300.

Nauciel. C., and Vildé J.L. (2005). Bactériologie médicale, 2ème Ed. Masson. Paris. pp: 5-10.

Nait Said N. Etude phytochimique des extraits chloroformiques des plantes :'PITURATHOS CHLORANTHUS ' et 'MARRUBIUM VULGARE' [diplome de madister en chimie organique]. :Batna; 2007. Obatomi D.K, Bach P.H. Biochemistry and Toxicology of the

ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ (OMS) (World Health Organization). Guidelines for safe recreational water environments. Volume 2, Swimming pools and similar environments, 2006

Paris R. and Moyse H. (1965). Précis de matière médicale. Ed. Masson et Cie, Paris, 416p.

Pratt, D.E. (1980). "Natural antioxidants of soybean and other oil seeds." Ed. M.G. Simic, and M. Karel, Plenum, Autoxidation in food and biological systems: 261-282.

Potterat, O. (1997). Antioxidants and free radical scavengers of natural origin. Current organic chemestry 1, 415-417.

Price D.D. (2002). Central neural mechanisms that interrelate sensory and affective dimensions of pain. Molecular interventions, 2, 392-403.

Pinto Da Cunha M., Geubel A. Phytothérapie et hépatotoxicité. Louvain médical' - Vol. 121, no. 10, p. 407-414. 2002.

Purves D., Augustine G.J., Fitzpatrick D., Katz L.C., Lamantia A.S., McNamara J.O., Williams, S.M. (2000). Neuroscience (seconde édition). Sinaute Associates. Inc. Sunderland, Massachusettes. USA.

Paris M., Hurabielle M. Abrégé de matière médicale, pharmacognosie.: Tome I. Paris: Masson; 1981.

Quézel P., Santa S. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Paris: Éditions du Centre national de la Recherche scientifique; 1962-1963.

Rezzag Mohcen O. Extraction de certains composés du miel naturel ayant effet antimicrobien [Diplôme d'études supérieures en biologie option biochimie]. [Université Kasdi Merbah Algérie; 2010.

Riccio P., Scherer B., Klingenberg M. Isolation of a new atractyloside type compound. FEBS Letters. 1973;31(1):11–14. doi:10.1016/0014-5793(73)80062-6.

Rhalem N, Khattabi A., Ouammi L, Soulaymani A ,Soulaymani BR. Etude rétrospective des intoxications par les plantes au Maroc: Expérience du Centre Anti Poison et de Pharmacovigilance du Maroc (1980-2008). 2010.

Ribeiro M.A., Bernardo-Gil M.G. and Esquıvel M.M., (2001). *Melissa officinalis* L.: study of antioxidant activity in supercritical residues, Journal of Supercritical Fluids, 21 51 Ŕ 60.

Revillard H. (2001). «Immunologie»;. De Boeck Université 4ème Edition; p : 600

Skalli S., Alaoui I., Pineau A., Zaid A., Soulaymani R. L'intoxication par le chardon à glu

(*Atractylis gummifera* L.) ; à propos d'un cas clinique [Revue Santé publique]. 2002.

Schorderet Michel, Dayer J-M. et coll. (1998). Physiopathologie de la fièvre, de la douleur et de l"inflammation; Analgésiques, antipyrétiques, anti-inflammatoires et immunosuppresseurs (in Pharmacologie des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques). Slatkine, Paris-Génève, 569-606.

Stickel F., Seitz HK, Hahn EG, Schuppan D. Liver toxicity of drugs of plant origin. 2001.

Steenkamp V., Stewart M. J., Zuckerman M. Detection of poisoning by Impila (Callilepis laureola) in a mother and child. Hum Exp Toxicol. 1999;18(10):594–597.

Stickel F., Egerer G., Seitz H. K. Hepatotoxicity of botanicals. Public Health Nutr. 2000;3(2):113–124.

Skerget M., Kotnik P., Hadolin M., Hras A. R., Simonic M., Knez Ž. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. Food Chemistry. 2005;89(2):191–198. doi:10.1016/j.foodchem.2004.02.025.

Stewart M. J., Steenkamp V. The Biochemistry and Toxicity of Atractyloside: A Review. Therapeutic Drug Monitoring. 2000;22(6):641–649. doi:10.1097/00007691-200012000-00001.

Santangelo Carmela, Varì Rosaria, Scazzocchio Beatrice, Di Benedetto Roberta, Filesi Carmela and Masella Roberta. (2007). Polyphenols, intracellular signaling and inflammation Ann Ist Super Sanit 43: 394-405.

Traoré Fanta (1999). Evaluation de l"activité antimalarique de Glinus oppositofolius (L.). A.D.C., Nauclea latifolia (SM.), Mitragyna inermis (WILLD.) O. KUNTZE, trois plantes utilisées en médecine traditionnelle au Mali. Thèse de doctorat, Marseille II, 199 P.

Tahri N. ,El basti A., Zidane L. ,Rochdi A. ,Douira A. Etude ethnobotanique des plantes medicinales dans la province de Settat (Maroc). Journal of Forestry Faculty of Kastamonu University. 2012.

Touitou Yvan, (1993). Pharmacologie Diplôme d"Etat d"Infirmier (e), 7eme édition Paris. 407 p.

Tetrahedron. 1981;37(24):4305–4311. doi:10.1016/0040-4020(81)85026-0.

Viala A, Cano J. P. Limites de sensibilité des réactions de coloration de l'atractyloside appliquées sur couche mince de gel de silice. Bull. Soc. Pharm. Marseille, 59, 1966.

ValterJacinto. www.mauvaisesherbes.org/ [Savoureuses des plantes sauvages].

Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T., Mazur M. and Telser J., (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol, 39(1), 44-84.

Vercautere J. Plan, formule et illustration du cours de pharmacognosie. Université Montpellier I; 2012.

www.naturamediterraneo.com.

www.pharmapress.net/centre antipoison du maroc.

Walsh SE, Maillard JY, Russell AD, Catrenich CE, Charbonneau DL, Bartolo RG. (2003). Antibacterial activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram positive and negative bacteria. J. Appl. Microbiol; 94: 240-247.

www.flora-on.pt.

www.ncbi.nlm.nih.gov. PubChem Compound.

Wright S., (1973). Physiologie appliqué à la médicine»; Flammarion Médicine-Sciences, 12 éme éd. Paris; p : 606.

Willis W.D., Wislund K.N. (1997). Neuroanatomy of the pain system that modulate pain. Journal of Clinic Neurophysiology, 14, 2-31.

Yepez B., Espinosa M., López S. and Bolaños G., (2002). Producing antioxidant fractions from herbaceous matrices by supercritical fluid extraction, Fluid Phase Equilibria 194Ŕ197, 879Ŕ884Yvan T., (1997). Pharmacologie 8ème Edit. Masson. Paris-Milan-Barcelone ; 388 p.

Zaim N., Guemouri L., El Abbadi N., Fouzi E, Benjouad A, El Mzibri M. Détermination of atractyloside from *Atractylis gummifera* L. by HPLC method. physical and chemical news. 2007