



PROJET DE FIN D'ETUDES

Licence en Sciences & Techniques :
Sciences Biologiques appliquées et Santé

Validation statistique du Dosage du carboxyatractylatoside du chardon à glu par spectrophotométrie UV

Présenté par : Boutoub Oumaima

Encadré par :

Pr. KHABBAL Youssef CHU Hassan II Fès

Pr. SEFRIQUI Samira Professeur à La FST de Fès

Soutenu le : 17/06/2015

Devant le jury composé de :

Pr SEFRIQUI Samira

Pr KHABBAL Youssef

Pr SQALLI Hakima

Année Universitaire : 2014-2015



Sommaire

Présentation générale du laboratoire	3
Remerciements	5
Introduction	6
I- Le chardon à glu	8
I-1 Description botanique	8
I-2 Répartition géographique	11
I-3 Composition et Usage traditionnels de la plante	12
I-4 Mode d'action	13
I-5 Les symptômes de l'action toxique	14
I-6 Traitement	15
II- Validation analytique du dosage de CAT par spectrophotomètre UV	16
II-1 Définition et objectif de la validation	16
II-2 Les critères de validation	16
II-3 description de spectrophotomètre UV (jasco 530)	18
III- Matériel et méthodes	20
1- Matériel	20
2- Mode opératoire	20
2-1 Préparation de la solution mère.....	20
2-2 Dosage du CAT.....	21
IV- Résultats	22
V – Conclusion	29
+ Références bibliographiques.....	30



Liste des abréviations

CAPM : Centre anti-poison et pharmacovigilance du Maroc

CAT : Carboxyatractyloside

ATR : Atractyloside

ATP : Adénine triphosphate

ADP : Adénine di-phosphate

SNC : Système nerveux central

PH : Pouvoir hydrogène

UV : Ultraviolet

LD : Limite de détection

LQ : Limite de quantification

A : Arabe

F : Français

E : English

Présentation générale du laboratoire

La Faculté de Médecine et de Pharmacie de Fès instituée par le Décret n° 2-94- 130 du 13 Hija 1414 (24 Mai 1994) modifiant et complétant le Décret n°2-90- 554 du 2 Rajab 1411 (18 Janvier 1991) relatif aux établissements et aux cités universitaires. Cette faculté est un établissement dépendant de l'Université Sidi Mohammed Ben Abdellah. Elle a été inaugurée par SA MAJESTÉ LE ROI MOHAMMED VI le 20 octobre 1999. Sa création vise essentiellement à :

- Décentraliser l'enseignement médical et améliorer son niveau ;
- Créer parallèlement le centre hospitalier HASSAN II pour la formation et les soins de niveau tertiaire ;
- Initier la recherche clinique et créer des pôles d'excellence ;
- Favoriser ultérieurement l'implantation des médecins dans leur région pour une couverture médicale homogène du Royaume.



Laboratoires

- Anatomie, Anatomie Pathologique, Biochimie, Immunologie, Biophysique
- Epidémiologie, Hématologie, Histologie, Microbiologie, Parasitologie, Pharmacologie, Physiologie.



Laboratoire de pharmacologie

- **Equipements**
 - Hotte pour culture cellulaire
 - Incubateur pour cellules
 - Microscope
 - Balance électronique
 - Spectrophotomètre
 - Étuve
 - Bain marie
 - Congélateur -80
 - Réfrigérateur
 - Vortex
 - PH-mètre
 - Certains matériels de pharmacologie expérimentale

- **Locaux**
 - 2 pièces (laboratoires)
 - Une petite pièce
 - Une salle de travaux dirigés
 - 4 bureaux



Remerciements

A monsieur Rasfaa Mourad, Directeur de laboratoire de pharmacologie à la faculté de médecine Fès ;

Vous m'avez fait un grand plaisir de m'avoir accepté au sein de votre établissement, afin d'effectuer mon stage de fin d'étude.

Pr. Khabbal Youssef, Professeur en pharmacologie à la faculté de médecine Fès ;

Je le remercie de m'avoir encouragée et m'avoir accordée toute sa confiance, sa disponibilité, l'aide et les conseils concernant les missions évoquées lors des différents suivis tout au long de ces deux mois. Sachant répondre à toutes mes interrogations ; sans oublier sa participation au cheminement de ce rapport.

Pr. Sefrioui Samira, Professeur à la faculté des sciences et techniques de Fès ;

Je suis fière et heureuse d'avoir été l'une de ses étudiantes. Je la remercie d'avoir accepté d'encadrer ce projet et de me faire part de son expérience. Les résultats de ce travail doivent beaucoup aux exigences de sa rigueur scientifique, à ses orientations, et à son talent pédagogique.

C'est pour moi, l'opportunité de lui exprimer ma profonde reconnaissance et mes vifs remerciements pour son esprit ouvert et ses conseils précieux.

Pr. Sqalli Hakima, Professeur à la faculté des sciences et techniques de Fès ;

Qui a bien voulu juger ce travail. Qu'elle trouve ici l'expression de ma considération et ma reconnaissance les plus distinguées.



Introduction

Une plante toxique ou plante vénéneuse est une espèce végétale qui contient dans certaines de ses parties, parfois toutes, des substances toxiques principalement pour l'homme ou les animaux domestiques. Les substances toxiques contenues dans les plantes sont généralement des composés organiques, plus rarement minéraux. La toxicité se manifeste le plus souvent par l'ingestion de certains organes, mais aussi par contact. La toxicité d'une plante dépend de nombreux facteurs, comme de la partie de la plante incriminée, de la façon dont l'organisme est entré en contact avec cette plante, de la dose à laquelle l'organisme a été exposé, de l'état général de cet organisme.

L'utilisation des plantes comme un outil pour se faire guérir ou ce qu'on appelle une phytothérapie (désigne la médecine fondée sur les extraits de plantes et les principes actifs naturels) peut causer des intoxications si on dépasse la dose optimale (prescrite). Les intoxications par les plantes constituent un véritable problème de santé publique, en particulier dans le monde rural et chez les populations ayant recours à la médication traditionnelle. *Atractylis gummifera L.*, est une Astéracée connue sous le nom de chardon à glu. Cette plante est présente partout dans le monde et plus particulièrement dans le bassin méditerranéen. Au Maroc, la plante se rencontre fréquemment dans la nature à l'état sauvage, sauf dans les régions désertiques ou aride et l'Anti-Atlas. Elle est également disponible chez tous les herboristes. *Atractylis L gummifera* est une plante qui provoque chaque année des intoxications graves et souvent mortelles, 153 cas d'intoxication ont été enregistrés entre Janvier 1980 et Juin 1995 par le Centre Antipoison marocaine. L'ignorance par les cliniciens, l'évolution rapide et la fréquence de ces intoxications sont à l'origine de problèmes de diagnostic.

L'Atractylis gummifera L., serait la première cause d'intoxications végétales déclarées au Centre Anti Poison et de Pharmacovigilance du Maroc (CAPM). Les confusions responsables des intoxications accidentelles sont dues, soit à la partie aérienne qui ressemble à l'artichaut sauvage, soit au rhizome qui a l'aspect d'un gros navet comestible à saveur douceâtre, assez agréable, dit-on.



L'objectif de mon projet de fin d'étude est de :

- Décrire l'empoisonnement, les caractéristiques de l'intoxication par *Atractylis gummifera* L.
- Dosage de l'atractyloside (ATR), carboxyatractyloside (CAT), particules toxiques qu'on trouve dans *Atractylis gummifera* L.
- Valider une technique de recherche et l'identification du principe toxique du chardon à glu dans le plasma d'un volontaire sain et l'analyse en spectrophotométrie UV.

I- Le chardon à Glu

I-1 Description botanique

Nom scientifique: *Atractylis gummifera* L

Synonymes: *Carlino gummifera* (L) Less ; *Acoma gummifera* Brot.

Famille: Asteraceae

Noms vernaculaires:

- (A) Addad, Chouk el eulk, Laddad
- (E) Bird-lime, Glue thistle
- (F) Chardon à glu



Figure 1 : Le chardon a glu

Le chardon à glu (*Atractylis gummifera*), de la famille des Astéracées (figure 1), est une herbacée, vivace, épineuse, à grosse racine, d'origine nord-africaine. Les fleurs apparaissent en été, entre les mois de juin et juillet. Cette espèce est vivace par les parties souterraines très développées, d'où part une rosette de feuilles lancéolées, très découpées en lobes piquants. Les gros capitules de fleurs rose-violace duveteuses sont entourés de bractées hérissées d'épines. Un latex blanc jaunâtre qui s'agglomère sous forme de glu que mâchonnent les enfants et qui est utilisé pour la capture des oiseaux, d'où l'appellation populaire en arabe « *EI eulk* » ou glu. Les larmes de latex s'agglutinent en une masse sphérique, d'un gris noirâtre, de la taille d'une pomme.

L'organe souterrain de l'*Atractylis gummifera* L a une grosse racine pouvant atteindre 30 à 40 cm de longueur et 7 à 8 cm de diamètre (1).

Les feuilles sont longues et épineuses font de 50 à 60cm de long sur 10cm de large et sont groupées en bouquet. Les petits bouquets s'étalent sur le sol, donnant ainsi à la plante la forme d'un écusson aplati.

Atractylis gummifera L est composé de deux parties :

- Une partie aérienne, formée par les feuilles et les fruits (figure 1).
- Une partie souterraine, formée par un rhizome volumineux (racine) → C'est la partie la plus toxique de la plante (Figure 2).



Figure 2 : Partie aérienne de l'*Atractylis gummifera* L



Figure 3 : *Atractylis gummifera* L partie souterraine, rhizome volumineux

I-1-a-La partie aérienne

- ✓ Les feuilles : Elles sont très grandes pétiolées dans leur pourtour pennatifides, épineuses et dentées. Elles présentent une très grosse nervure médiane sillonnée de stries parallèles en relief notamment sur le court pétiole. Le limbe est profondément incisé par de larges échancrures qui atteignent presque la nervure médiane, et délimitent ainsi des lobes qui sont eux-mêmes entaillés de sept à huit échancrures. Les dents ainsi formées se terminent par une épine (2).
- ✓ Les fleurs : Apparaissent en été entre les mois de juin et juillet. Elles sont appelées « fleurons », et sont toutes à corolle gamopétale, s'épanouissant très près du sommet en 5 lobes égaux et entourées à leur base par des poiles soyeux portés par l'ovaire. Ce dernier est uniloculaire et ne renferme qu'un seul ovule (2).
- ✓ Le fruit : C'est un akène ellipsoïdal de 10 à 30 mm de longueur et quelques mm d'épaisseur. Quand ce dernier est mur, un latex blanc sort de la base de la bractée. L'akène est surmonté d'une aigrette de couleur blanche assurant sa dispersion. Elle est capable de germer en un temps très court après sa maturation (2).

I-1-b-La partie souterraine

La racine pivotante est un rhizome dont le diamètre peut atteindre une vingtaine de centimètres sur plus d'un mètre de longueur. Le rhizome frais ainsi coupé laisse couler un latex légèrement visqueux avec une odeur balsamique un peu nauséabonde ; la saveur d'abord douceâtre et sucrée, puis chaude, laisse un arrière goût de sensation acre très persistante (3).

I-1-c- la gomme ou « laàlk »

Les larmes qui coulent des capitules constituent une sorte de glu d'où le nom de chardon à glu. En effet, cette substance inodore présente des propriétés physiques et chimiques proches de celles du caoutchouc ; insolubilité dans l'eau et dans l'alcool et solubilité dans le benzène, malaxée entre les doigts, elle donne l'odeur de caoutchouc et comme lui, elle s'étire en fils (4).

I-2 Répartition géographique

Dans la famille des Astéracées, le genre *Atractylis* comporte une trentaine d'espèces localisées sur le bord et les îles de la Méditerranée, du Maroc jusqu'au Moyen-Orient. En Europe, il est fréquent en Espagne, en Sicile et en Sardaigne. Au moins seize espèces sont présentes en Algérie ou *Atractylis gummifera*, largement répandu, constitue souvent des peuplements denses (5).

Au Maroc, son aire de croissance couvre la totalité du pays, à l'exception des régions sahariennes et présahariennes (régions désertiques et Anti-Atlas), et plus précisément, elle se rencontre en : Monts du Maroc Oriental, Rif, Littoral de la Méditerranée, Maroc atlantique nord, Moyen Atlas, Haut Atlas, Maroc occidental méridional, Secteur micronésien Marocain. Elle pousse dans les forêts claires, les terrains herbeux plus ou moins arides de la zone du littoral, les pâturages, et les sols sablonneux, ou argilo-sablonneux à pH voisin de 6 (4).

I-3 Composition et Usage traditionnels de la plante :

I-3-a-Composition

Toutes les parties de la plante renferment les principes toxiques, principalement la racine, et en décroissance, la tige, les bractées, la fleur, la graine et la feuille. Les parties Aériennes sont les moins toxiques. La partie la plus toxique est la racine, à l'état frais. Le latex, qui compose la glu, est un véritable chewing-gum, « El eulk », mâché par les enfants. Les composants responsables de la toxicité sont les deux glycosides: l'atractyloside et le carboxyatractyloside. C'est à ce dernier que l'on attribue la forte toxicité de la plante fraîche.

➔ *La toxicité de cette plante est liée à la présence de deux substances, l'atractyloside (ATR) et le carboxyatractyloside (CAT) qui ont la structure chimique suivante :*

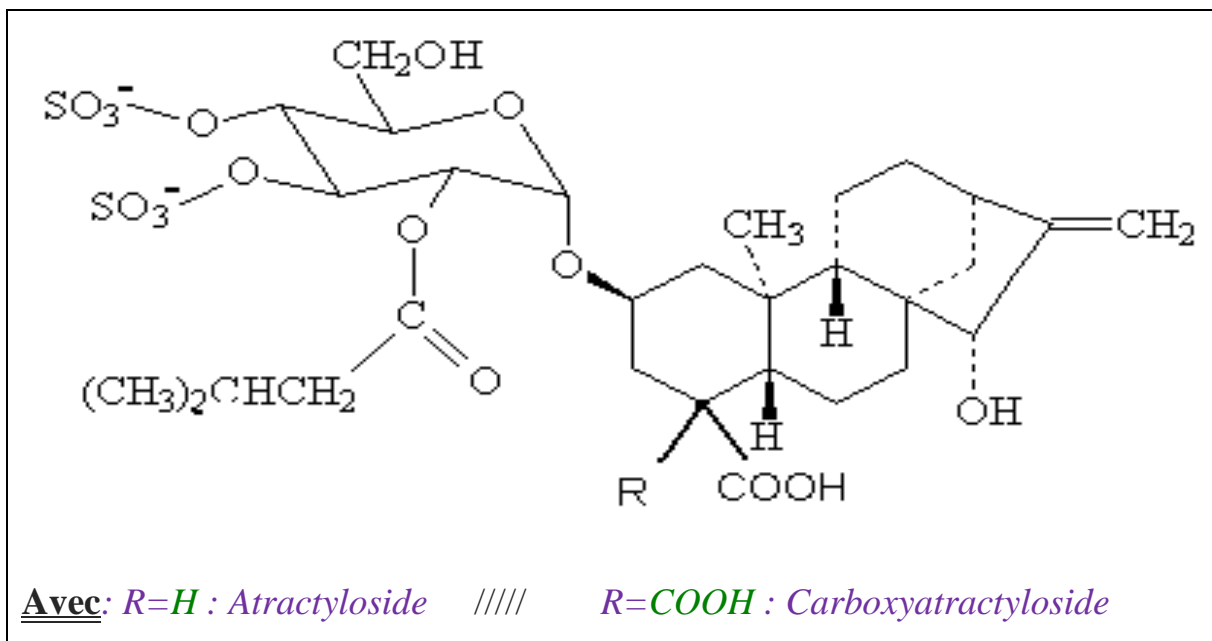


Figure 4 : Structure chimique du CAT et ATR

L'atractyloside (ATR), encore appelé atractylate de potassium ou atractyline, est un hétéroside complexe (figure 4), qui libère par hydrolyse acide une molécule de D-glucose, une molécule d'acide iso valérianique. Ce composé a été isolé pour la première fois des racines d'*Atractylis gummifera L.* par Lefranc en 1868.

Quand à la carboxyatractyloside (gummiferine), elle a été isolée pour la première fois en 1964 (Stanislas et vignais, 1964) et identifiée ensuite en 4-carboxyatractyloside. Il diffère d'ATR par la présence d'un second groupement carboxylique en position C-4 (figure 4).

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

I-3-b-Usage de la plante

Les enquêtes ethnobotaniques ne révèlent pas d'usage avéré de l' « addad » et les Racines séchées se trouvent parfois sur les étals des herboristes qui proposent le Latex desséché, cependant, on peut s'en procurer en insistant. Alors qu'il reste très utilisé en Algérie et au Maroc.

- En usage interne : la racine desséchée est utilisée, après cuisson prolongée dans l'eau, pour arrêter les hémorragies, faciliter les accouchements, provoquer les vomissements (6).
- En usage externe : la plante semble intervenir, en friction ou en cataplasmes, dans le traitement de la gale, des taches de rousseur sur le visage, des boutons d'acné, des chancres syphilitiques, des abcès et des furoncles. La décoction était autrefois utilisée en bain de bouche pour blanchir les dents et reste toujours utilisée pour les soins de la chevelure (6).
- En fumigation: on l'emploie dans le traitement des rhumes, des vertiges, des céphalées et des paralysies. Les femmes enceintes qui respirent de la fumée du chardon à glu brûlé, voient leur accouchement facilité. Ces fumigations, le plus souvent de la racine, sont également utilisées pour détruire les mouches (6).

I-4-mode d'action ou physiopathologie de l'intoxication

Les deux glycosides inhibent le transport des nucléotides phosphorylés ADP et ATP à travers la membrane mitochondriale interne, ce qui empêche la phosphorylation oxydative. L'action de l'atractyloside se situe au niveau de l'adénine nucléotide translocase ou ADP/ATP translocase. Cette enzyme est chargée du transfert de l'ADP dans la matrice mitochondriale. L'atractyloside, en raison de son analogie structurale avec l'ADP, entre en compétition avec ce dernier et se fixe sur la translocase, l'empêchant de pénétrer dans la matrice mitochondriale et, par suite, d'être transformé en ATP (7).

Lorsque l'atractyloside se fixe à la translocase, ni l'ADP ni l'ATP ne peuvent s'y lier, empêchant ce dernier de sortir de la matrice mitochondriale. L'affinité du carboxy atractyloside pour le transporteur, qu'il inhibe de façon non compétitive, est supérieure à celle

de l'atractyloside; ceci s'explique par les interactions qu'établissent le groupe carboxylique supplémentaire avec les acides aminés proches du site de fixation. Ces toxiques sont des inhibiteurs de la chaîne respiratoire mitochondriale (figure 5); en effet, l'inhibition de la seule translocase par l'un de ces toxiques entraîne l'inhibition de toute la chaîne respiratoire. L'atractyloside et le carboxyatractyloside sont, d'ailleurs, utilisés comme inhibiteurs spécifiques de l'adénine nucléotide translocase dans les études du transport mitochondrial de l'ADP et l'ATP. L'atractyloside facilite la perméabilisation cellulaire. Les effets cytotoxiques de l'atractyloside, in vivo et in vitro, sont dus à sa capacité d'induire l'ouverture du pore de transition de perméabilité et par conséquent la perméabilisations de la membrane mitochondriale. Les cellules les plus vulnérables sont celles du foie, du rein, du pancréas et du myocarde. L'action des deux glycosides entraîne l'augmentation de la consommation du glucose, l'épuisement du stock hépatique et musculaire en glycogène et l'inhibition de la glycogénogenèse (8 ; 9 ; 10).

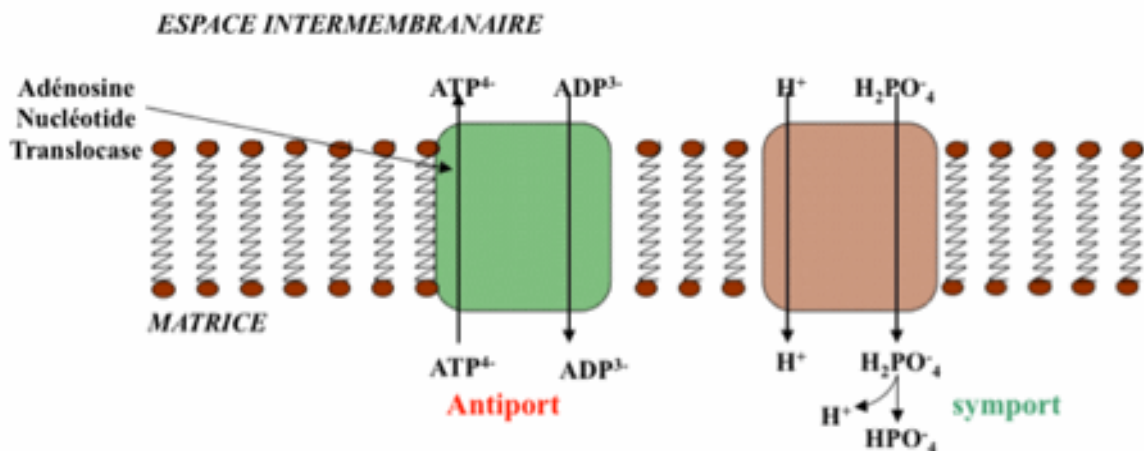


Figure 5 :L'action du CAT et ATR sur la membrane interne

I-5 Les symptômes de l'action toxique

L'intoxication se fait par ingestion. La plupart des intoxications sont accidentelles et touchent surtout les enfants qui confondent la racine avec d'autres plantes comestibles, comme les artichauts sauvages. Les intoxications sont fréquentes chez les enfants en Afrique du nord : 240 intoxications au Maroc entre 1981 et 2004, intoxications collectives en milieu

rural avec issue fatale dans plus de 50 % des cas. C'est un problème de santé publique en Afrique du nord.

Troubles digestifs bénins: diarrhées, vomissements, céphalées, une hyperglycémie légère (1,50g/L), pas de signes neurologiques.

Symptômes graves: comas hypertonique, hypoglycémie, mort

Suite à l'ingestion du Chardon à glu, la phase de latence est de 8 à 12h / 24-36h

Les personnes intoxiquées seront mises en observation pendant 2 jours.

- Dans la phase initiale: on aura des signes digestifs (24h), des douleurs épigastriques atroces, vomissements abondants, diarrhées avec selles noirâtres et fétides, des céphalées, des vertiges et une soif intense.
- Dans la phase d'Etat: on aura un coma profond et rapide, s'accompagnant d'une hypothermie initiale et d'une accélération du pouls...

On rencontrera également des troubles respiratoires tels que l'hyperpnée et des troubles hépatiques (ictères, bilirubine sérique,...)

- L'atteinte rénale est manifeste: lésions rénales avec élévation de créatinine, hématurie, oligurie (ou anurie).

L'évolution est courte, rapide et fatale, ne dépassant rarement 24h après l'apparition des signes neurologiques.

I-6 Traitement

Le traitement, en absence d'antidote spécifique, ne peut être que :

- Perfusion de sérum glucosé.
- Corriger l'acidose.
- Traitements symptomatique du coma.
- ventilation assistée.
- Lutter contre la déshydratation.
- Lavage gastrique.
- Le traitement du collapsus cardio-vasculaire par remplissage vasculaire.
- rééquilibration hydroélectrique.

Aucun traitement spécifique n'est disponible à l'heure actuelle; des voies de recherche se tournent vers l'immunothérapie, dans le but de produire des fragments d'anticorps antitoxines qui puissent agir sur les composés toxiques, comme dans le cas d'intoxications par la dioxine et autres glucosides cardiaques ou la colchicine.

II- Validation analytique du dosage de CAT par spectrophotomètre UV

II-1 Définition et objectif de validation

La Validation d'une méthode est la procédure par laquelle on démontre, preuves expérimentales à l'appui, que les performances de la méthode permettent de répondre aux exigences de l'usage auquel elle est destinée. Il faut donc démontrer que la méthode mise en œuvre par le laboratoire est apte à l'emploi prévu (11).

La validation est donc fondée sur une analyse statistique basée sur un certain nombre de critères aboutissant à des méthodes analytiques permettant de donner des résultats fiables.

II-2-Critères de validation

La validation d'une méthode analytique consiste à vérifier certains critères à savoir (12) :

- ✓ Spécificité
- ✓ Linéarité
- ✓ Fidélité
- ✓ Justesse
- ✓ Limite de détection
- ✓ Limite de quantification

1-spécificité

Capacité d'une méthode d'analyse à déterminer le Principe actif contenu dans un médicament.

2- Linéarité

Capacité d'une méthode d'analyse, à l'intérieur d'un certain intervalle, à fournir une valeur d'information ou des résultats proportionnels à la quantité en analyte à doser dans l'échantillon pour le laboratoire. Elle permet de donner des informations sur la sensibilité.

- ✓ La sensibilité : est définie comme étant la pente moyenne d'un minimum deux courbes.

3- Fidélité

La fidélité à un niveau donné correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats obtenus en appliquant le procédé expérimental à plusieurs reprises dans des conditions déterminées. Selon les conditions d'exécution de l'essai, cette caractéristique s'exprime sous forme de répétabilité et de reproductibilité.

a- Répétabilité

Conditions où les résultats d'essais indépendants sont obtenus par la même méthode sur des individus d'essai identiques dans le même laboratoire, par le même opérateur, utilisant le même équipement et pendant un court intervalle de temps. L'objectif est d'obtenir des mesures dans des conditions plus similaires possibles.

b- Reproductibilité

La reproductibilité à un niveau donné correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats individuels obtenus dans des conditions de reproductibilité. L'objectif est d'obtenir des mesures dans des conditions où une ou plusieurs sources de variabilité sont venues interférer.

4-Justesse

Etroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une série de résultats d'essais et une valeur de référence acceptée. Elle indique sur quel point la concentration observée approche la valeur réelle elle est exprimée en valeur absolue.

5- Limite de détection

La limite de détection d'une méthode est la plus basse concentration pour un composé analysé dans une matrice réelle qui, lorsqu'il subit toutes les étapes d'une méthode complète, incluant les extractions chimiques et le prétraitement, produit un signal détectable avec une fiabilité définie statistiquement différent de celui produit par un « blanc » dans les mêmes conditions. Pour l'estimer on peut calculer la concentration équivalente à 3 fois l'écart type d'un étalon à bas niveau dans un solvant approprié.

$$LD = 3S$$

6- Limite de quantification

La limite de quantification d'une méthode est la concentration minimale qui peut être quantifiée à l'aide d'une méthode d'analyse avec une fiabilité définie. C'est la concentration équivalente à 10 fois l'écart type obtenu lors de l'établissement de la LD.

$$LQ = 10*S$$

II-3-Description du spectromètre UV type ‘‘JASCO 530’’

La spectrophotométrie utilise le photomètre permettant de mesurer l'intensité d'un faisceau de lumière en fonction de sa couleur (longueur d'onde) connu sous le nom des spectrophotomètres.

Un certain nombre de méthodes quantitatives décrites font appel à la spectrophotométrie dans l'Ultra Violet (UV : 200-400 nm) ou le Visible (400-800 nm). Le spectrophotomètre peut être à simple faisceau ou à double faisceau. Dans un instrument à simple faisceau, le rayonnement provenant de la source lumineuse passe dans un monochromateur puis traverse la cuve contenant l'échantillon avant d'atteindre le détecteur.

Dans un instrument à double faisceau, le rayonnement lumineux sortant du monochromateur passe par un dispositif qui le divise en deux faisceaux, dont l'un traverse la cuve contenant l'échantillon et l'autre traverse la deuxième cuve contenant la substance de référence, avant d'atteindre le détecteur.

- La loi de Béer-Lambert

Le procédé le plus souvent utilisé de manière quantitative pour déterminer les concentrations d'une espèce d'absorption en solution, en utilisant cette loi :

$$A = \log_{10}(I_0/I) = \epsilon cL$$

avec :

- **A** : la mesure d'absorbance,
- **I₀** : l'intensité de la lumière incidente à une longueur d'onde donnée,
- **I** : l'intensité transmise,
- **ε** : constante connue sous le nom absorptivité molaire ou coefficient d'extinction,
- **c** : la concentration des espèces absorbantes,
- **L** : la longueur du chemin à travers l'échantillon.

- Principe de l'absorption UV

En spectrophotométrie, nous mesurons, grâce aux propriétés physico-chimiques, l'absorbance des échantillons (solutions, gaz...). Lorsqu'un rayon de lumière polychromatique comme la lumière blanche d'une ampoule traverse l'échantillon, celui-ci va absorber une partie des radiations et de ce fait résulte la couleur telle que nous l'observons à l'œil nu. Au sein du spectrophotomètre, où l'enceinte est isolée de toute source lumineuse indésirable, un

faisceau de radiation traverse l'échantillon homogène (figure 6). L'intensité du rayon émergent décroît exponentiellement lorsque l'épaisseur du milieu absorbant augmente.

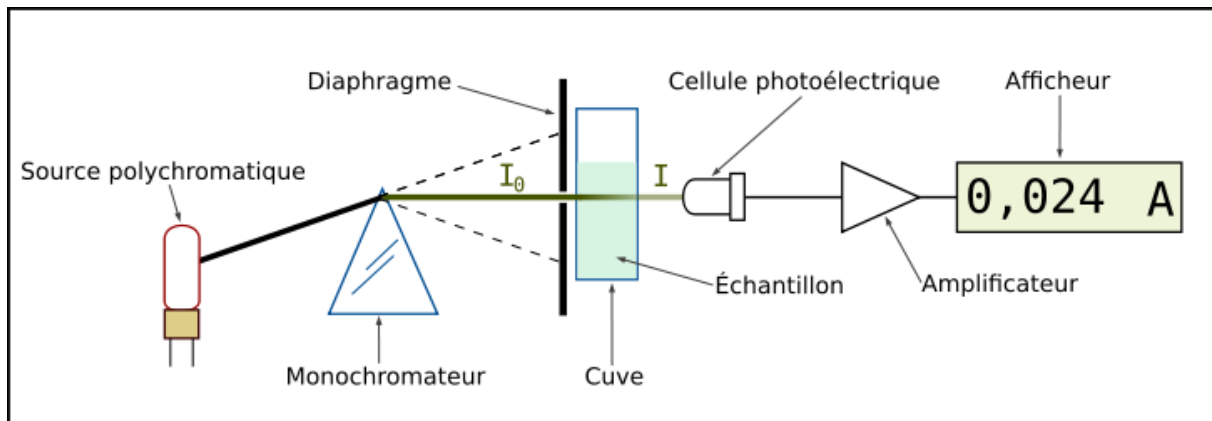


Figure 6 : schéma présentatif du spectrophotomètre UV

Le faisceau issu de la source est envoyé vers un monochromateur puis vers un rupteur qui envoie alternativement le faisceau vers la cuve de référence puis vers la cuve contenant l'échantillon.

Un système de miroir permet d'envoyer ces deux faisceaux vers le même capteur qui reçoit donc alternativement le faisceau de puissance de référence et le faisceau de puissance transmis par l'échantillon. Le signal du capteur est alors traité par un microprocesseur qui permet d'afficher la transmittance ou l'absorbance.



Figure 7 : spectrophotomètre UV (jasco 530)



Matériel et méthodes

1-Matériel :

a-réactif :

Dans notre expérience, les réactifs utilisés sont :

- L'acide sulfurique 10%
- Plasma humain
- TCA à 10 %

b- Appareillage :

Le matériel utilisé dans nos expériences pour le dosage du CAT est le suivant:

- Micropipette et tube
- Congélateur
- spectrophotomètre UV (jasco 530)
- La centrifugeuse : permet de séparer des éléments cellulaires solides, d'éléments liquides

2-Mode opératoire :

2-1-préparation de la solution mère :

Une solution mère de concentration de 100mg /100ml , a été obtenue par infusion de la poudre de la racine du chardon à glu ,séchée sous forme étalée à l'abri des rayons solaires et à température ambiante . L'infusion a duré une heure dans 100ml d'eau distillée bouillante , filtrée puis maintenue à froid.

2-2-Dosage CAT

A 1 ml de plasma , provenant d'un volontaire sain , prélevé dans des tubes en verre de 6 ml, sont ajoutés et mélangés successivement à 1 ml des solutions filles ,et 2 ml de TCA 10%. Les tubes sont agités pendant 15 secondes , puis centrifugés 10 minutes à 4000 tr/s . Le surnageant est récupéré , puis mélangé avec l'acide sulfurique 10%. Analyse en spectromètre UV , l'instrumentation spectrométrique utilisée est de type JASCO 530.



Le tableau 1 : Solutions utilisées pour le dosage du CAT .

	Blanc	Solution 1	Solution 2	Solution 3	Solution 4	Solution 5	Solution 6
Chardon à glu mln (1mg/ml)	-	0.25	0.5	0.75	1	1.25	1.5
TCA 10% (ml)	2	2	2	2	2	2	2
Plasma (ml)	1	1	1	1	1	1	1
Acide sulfurique 10% (ml)	3	3.25	3.5	3.75	4	4.25	4.5
Cf (mg/ml)	-	0.05	0.1	0.13	0.16	0.19	0.21

IV-Résultats

Pour valider notre méthode « dosage du CAT », généralement on doit valider les 6 critères en se basant sur les différents tests statistiques. En ce qui concerne mon étude, il a suffi la vérification des 3 critères suivants :

- Linéarité
- Fidélité
- Justesse

3-1- Vérification de la linéarité

Pour vérifier la linéarité, il suffit de prendre différentes concentrations de notre solution et de calculer leur absorbance à partir du spectrophotomètre UV, (Tableau 2).

Tableau 2 : Les concentrations et leur absorbance

Concentration (mg/ml)	Absorbance
0	0
0.1	0.1815
0.13	0.2068
0.16	0.2447
0.19	0.2824
0.21	0.3283

Les valeurs obtenues permettent d'établir la Gamme d'étalonnage. (Figure 8)

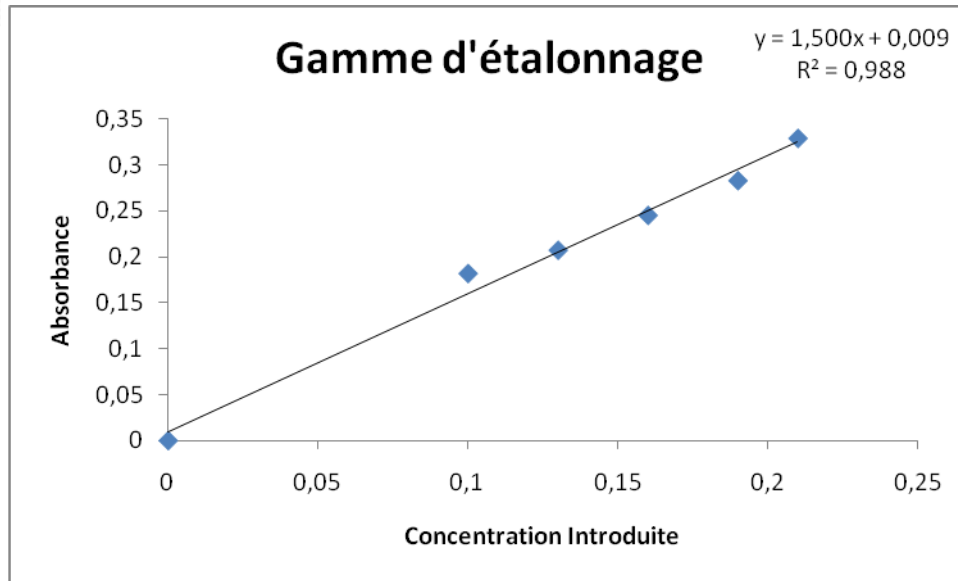


Figure 8 : La Gamme d'étalonnage

⇒ A partir de cette courbe, on peut conclure que notre linéarité a été bien vérifiée.

2-Vérification de la fidélité

La vérification de la fidélité est basée sur l'application des différents tests statistiques. Pour notre étude on a choisi d'effectuer des mesures en série de 6 échantillons pendant 4 jours. Le tableau 3 représente les résultats obtenus :

Tableau 3 : Résultats de mesure de l'absorbance du CAT pendant 4 jours suivit

Absorbance	Abs1	Abs2	Abs3	Abs4	Abs5	Abs 6	Moyenne	Moyenne Totale	Variance	Écart type	Écart type totale
Série 1	0,9542	0,9423	0,8951	0,9021	0,9356	0,9421	0,928566	0,9140	0,00057976	0,02407818	0,036425
Série 2	0,8974	0,889	0,9254	0,9156	0,8997	0,8951	0,9037		0,000192	0,013843	
Série 3	0,8976	0,9462	0,9351	0,9832	0,9998	0,9651	0,9545		0,001334	0,036526	
Série 4	0,8654	0,8754	0,8698	0,8521	0,8732	0,8783	0,8690		0,000089	0,009426	

✓ Test de vérification de la normalité :

Différences	Statistique calculée
$d_1 = X_n - X_1$ $d_2 = X_{n-1} - X_2$ $d_3 = X_{n-2} - X_3$ $d_i = X_{n-1+i} - X_i$	$W_{obs} = \frac{\sum_{j=1}^{j=p} a_j d_j^2}{\sum_{i=1}^{i=n} (X_i - \bar{X})^2}$
\bar{X} : Moyenne des mesures a_j : coefficient lus sur la table des coefficients pour n données. On choisit un risque ($\alpha=5\%$) et on lu dans la table de Shapiro et Wilk la valeur de $W(\alpha, n)$.	

Règle de décision

Si $W_{obs} > W(\alpha, n)$: on accepte l'hypothèse H_0 .
 Si $W_{obs} < W(\alpha, n)$: on rejette l'hypothèse de H_0 .

Tableau 4 : Test sur la normalité des Résultats

Différences d_j	Coefficient a_j	Statistique calculée
$d_1=0.0855$	$a_1=0.6872$	$W_{obs}=0.9940$
$d_2=0.0249$	$a_2=0.1677$	

Pour un risque $\alpha=5\%$ et $n=4$; $W_{crit}=0.748$

$W_{obs} > W_{crit}$: Donc on accepte l'hypothèse H_0

✓ Vérification des valeurs aberrantes :

On a vérifié l'existence des valeurs aberrantes avec le test de Grubbs :

- Test de Grubbs

Test utilisé pour vérifier si la petite valeur ou la grande valeur est aberrante, on calcule les deux rapports suivants :

$$G_a = \frac{X_n - \bar{X}}{s}$$

$$G_b = \frac{\bar{X} - X_1}{s}$$

Règle de décision

Si l'un des rapports est supérieur à la valeur lue dans la table au risque α , la valeur correspondante est considérée comme aberrante.

On détermine les valeurs maximales et minimales des moyennes et de la totalité des mesures après, on calcule les 2 statistiques Ga et Gb (tableau 5) et on compare ces derniers avec les valeurs triées de la table de Grubbs.

Tableau 5 : Test des valeurs aberrantes

Test des moyennes		G _{obs}		G _{crit} (5%, 4)
Max	0.9545	Ga	Gb	1.46
Min	0.8690	1.1132	1.2331	
Test des valeurs suspectes		G _{obs}		G _{crit} (5%, 24)
Max	0.9998	Ga	Gb	2.64
Min	0.8521	2.3568	1.6979	

⇒ On constate que les 2 rapports calculés sont inférieurs à G_{crit} lue dans le tableau de Grubbs avec un risque α de 5% donc la moyenne MAX et MIN et la valeur suspectes maximale et minimale ne sont pas aberrantes.

-Test de Cochran :

Ce test est appelé Test d'homogénéité de variance, dans ce test, on va calculer la somme des variances, on détermine le max des variances et on calcule leur rapport.

- Test de Cochran

Test de comparaison des variances : permet de détecter la variance aberrante ou suspecte. La statistique calculée est

$$C_{obs} = \frac{S_{max}^2}{\sum_{j=1}^p S_j^2}$$

H₀ : les écarts types sont du même ordre de grandeur

H₁ : le maximum des écarts types est significativement plus grand que les autres.

On compare la valeur de C_{obs} et C_{crit} lue dans la table de Cochran pour un risque α pour un nombre de répétitions (n) et pour (p) opérateur.

Règle de décision

Si C_{obs} < C_{crit} : les variances sont de même ordre de grandeur.

Si C_{obs} > C_{crit} : la variance maximum est significativement plus grande que les autres.

Cobs=0,584033073

Pour un risque $\alpha=5\%$, $n=6$ et $p=4$, $C_{crit}=0.59$

Interprétation :

Du fait que $Cobs < C_{crit}$: On accepte l'hypothèse H_0 .

H_0 : les variances sont homogènes, les écarts types observés de même ordre de grandeur

✓ Répétabilité et reproductibilité de la méthode :

- Test d'ANOVA-1

Pour la vérification de la répétabilité et la reproductibilité de la méthode de référence on utilise le test de l'ANOVA-1: Son objectif principal est de tester l'hypothèse selon laquelle les moyennes de plusieurs (k) groupes indépendants de distributions normales sont égales. Pour chaque source de variation On détermine le degré de liberté (ddl) après on calcule la somme des carrés des écarts (SCE) et le carré moyen (CM) puis on calcule le coefficient de Fisher (F) et la P-value comme indiquer ci-dessous :

Tableau 6 : Méthode d'ANOVA

Source	Ddl	SCE	Variance (CM)	F	P-value
Inter	3	0.023883	0.007961	14.51	3.09
Intra	20	0.010972	0.000549		
Total	23	0.034855			

- Le coefficient de Fisher est égal au Carré moyen (CM) intergroupe sur le carré moyen intragroupe.

- Pour un risque $\alpha=5\%$, P-value = loi.F (F, $v_1=p-1=3$, $v_2=n-p=20$) sur Excel

Interprétation :

Puisque (P-value=3.09 > $\alpha=5\%$), l'hypothèse d'égalité des moyennes sera acceptée. On conclura que les données sont compatibles (à ce niveau de risque) avec l'hypothèse d'égalité des moyennes.

✓ Limite de répétabilité

Après avoir vérifié l'égalité des moyennes via l'ANOVA, on calcule la limite de répétabilité à partir du Carré Moyen intra-laboratoire :

Tableau 7 : Variance, Ecart type et la limite de Répétabilité

Variance (S_r^2)	Ecart type (S_r)	k ($\alpha=95\%$)	Limite de répétabilité
0,000549	0,0234	2	$r=2 \times \sqrt{2} \times S_r = 0,06627$

Interprétation :

On constate que la différence absolue entre deux valeurs successives obtenues dans les mêmes conditions est inférieure à ($r=0,066$). On conclue que la méthode est répétable.

✓ Fidélité intermédiaire

La fidélité intermédiaire est calculée à partir des carrés moyens intra et inter-laboratoire via la relation suivante:

Tableau 8 : Fidélité intermédiaire

Relation	Variance (S^2_L)	Ecart type (SL)
$S^2_L = CM_F - CM_r/n_i$	$S^2_L = (0,00796 - 0,000594)/6 = 0,001235$	0.03514

✓ Limite de reproductibilité

Après la détermination de l'écart type de répétabilité et l'écart type de la fidélité intermédiaire, on calcule la limite de reproductibilité de la façon suivante :

Variance (S^2_R)	Ecart-type (S_R)	k ($\alpha=95\%$)	Limite de Reproductibilité
$S^2_R = S_L^2 + S_r^2 = 0.001784$	$S_R = \sqrt{S^2_R} = 0.04223$	2	$R = 2 \times \sqrt{2} \times S_R = 0.11935$

Cela signifie que, si on réalise deux mesures par 2 opérateurs différents, on peut s'attendre à avoir des résultats qui diffèrent au plus de 0,11935.

On constate que la limite de reproductibilité et de répétabilité calculée est inférieure à celle indiquée par la norme, donc la répétabilité et reproductibilité de la méthode sont vérifiées.

3-Vérification de la justesse

Après avoir prouvé la fidélité de la méthode, on va s'intéresser au test de justesse. Ce test consiste à comparer les résultats de 10 mesures d'échantillons inter-laboratoire puis on calcule la moyenne et l'écart type. Les résultats obtenus sont :

	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	Moyenne	Ecart type
Abs	0.095	0.098	0.095	0.096	0.0973	0.0975	0.0982	0.0954	0.0976	0.0959	0.09686	0.31122

Après on passe à l'application du test comme suit :

Valeur vrai	T_{obs}	$T_{crit}(t(0.975,9))$	Conclusion
0.0975	$T_{obs} = 0.0975 - 0.0968 / (0.3112 / \text{racine}(10)) = 0.0071$	2.262	La méthode est juste

- Pour un risque $\alpha=5\%$ et $ddl = n-1 = 9$, $t_{crit} = 2,262$;

Interprétation :

Puisque $T_{obs} < T_{crit}$: la différence entre la moyenne des mesures et la valeur Vrai n'est pas significative donc la méthode est juste.



V-Conclusion

Cette étude nous a permis de montrer que les intoxications par le chardon à glu sont fréquentes et souvent graves.

Différentes techniques sont mises en évidence pour l'analyse de l'intoxication par le chardon à glu. D'autres sont en cours d'évolution dans le but d'aider le clinicien dans sa démarche diagnostique.

En l'absence de traitement spécifique et efficace (antidote spécifique), le remède à cette intoxication ne peut être que préventif. C'est pour cela que le but de notre étude était de valider une nouvelle méthode à travers le dosage du CAT qui va nous permettre le diagnostic exact dans les cas d'intoxications au chardon à glu.



Référence bibliographique

- (1) Merad R ; (1973). Contribution a la connaissance de la pharmacopée traditionnelle algérienne. Les éventaires du Grand-Alger. Thèse pour le Doctorat d'Etat en Pharmacie, Université d'Alger
- (2) LEFRAND Edmond ;(1866). Etude botanique, chimique et toxicologique de l'Atractylis gummifera. Livre, pp. 8 – 15.
- (3) DESCOTES, J. ; TESTUD, F. ; FRANTZ, P. ; (1992). Les urgences en toxicologie Livre, pp. 381-385.
- (4) ZAIM, N. ; (2009). Etude de la toxicité d'Atractylis gummifera L chez la souris Iops Ofa et le rat Wistar et le rôle de la trimitazidine dans la prévention des lésions hépatiques. Thèse de Doctorat d'Etat.
- (5) Skalli, S ; Alaoui, I ; Pineau, A ; Zaid, A ; Soulaymani, R(2002). L'intoxication par le chardon à glu (Atractylis gummifera L.) ; à propos d'un cas clinique. Revue Santé publique. 284-286.
- (6) Bellakhdar J ;(1997). La Pharmacopée marocaine traditionnelle. Ibis Press, Paris.
- (7) Bruni A, Luciani S, Bortignon C (1965) Competitive reversal by adenine nucleotides of atractyloside effect on mitochondrial energy transfer. Biochim Biophys Acta 97: 434-41.
Vignais PV, Vignais PM, Defaye G ; (1973). Adenosine diphosphate translocation in mitochondria. Nature of the receptor site for carboxyatractyloside (gummiferin).Biochemistry 12: 1508-9.
- (8) Obatomi DK, Bach PH ;(1998). Biochemistry and toxicology of the diterpenoid glycoside Atractyloside. Food and Chemical Toxicology 36: 335-46
- (9) Bowser DN, Petrou S, Panchal RG et al ; (2002). Release of mitochondrial Ca²⁺ via the permeability transition activates endoplasmic reticulum Ca²⁺ uptake. Faseb J 16: 1105-1007
- (10) Chardon G, Viala A, Vignais P, Stanislas E ; (1964). L'intoxication par le chardon a glu, Atractylis gummifera L. Thérapie 19: 1313-22
- (11) Méthodologie d'analyse de risque alimentaire ¹ INRA : Validation des méthodes d'analyse quantitative par le profil d'exactitude, Max Feinberg, 2010, page 14-15.
- (12) P^{fe} CHAHBI Asmae ; (2011/2012) .Analyse descriptive de la démarche qualité et validation d'une méthode d'analyse dans un laboratoire.

Liste des figures

	Page
Figure 1 : chardon à glu	8
Figure 2 : Partie aérienne de l' <i>Atractylis gummifera</i> L	9
Figure 3 : <i>Atractylis gummifera</i> L partie souterraine, rhizome volumineux	10
Figure 4 : Structure chimique du CAT et ATR	12
Figure 5 : L'action du CAT et ATR sur la membrane interne	14
Figure 6 : Schéma présentatif du spectrophotomètre UV	19
Figure 7 : Spectrophotomètre UV (jasco 530)	19
Figure 8 : Gamme d'étalonnage	23



Liste des tableaux

	Page
Tableau 1 : Solution utilisée pour le dosage du CAT	21
Tableau 2 : les concentrations et leur absorbances	22
Tableau 3 : les mesures de l'absorbance du CAT pendant 4 jours suivis	23
Tableau 4 : Test sur la normalité des résultats	24
Tableau 5 : les valeurs aberrantes	25
Tableau 6 : Méthode d'ANOVA	26
Tableau 7 : Variance, écart type et la limite de répétabilité	27
Tableau 8 : Fidélité intermédiaire	27

ANNEXES

$i \backslash n$	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0,7071	0,7071	0,6872	0,6646	0,6431	0,6233	0,6052	0,5888	0,5739
2			0,1677	0,2413	0,2806	0,3031	0,3164	0,3244	0,3291
3					0,0875	0,1401	0,1743	0,1976	0,2141
4							0,0561	0,0947	0,1224
5									0,0399

Table des coefficients « aj »

$n \backslash \alpha$	0,05	0,01
3	0,767	0,753
4	0,748	0,687
5	0,762	0,686
6	0,788	0,713
7	0,803	0,730
8	0,818	0,749
9	0,829	0,764
10	0,842	0,781
11	0,850	0,792
12	0,859	0,805
13	0,856	0,814

Table de normalité

N	0.1	0.075	0.05	0.025	0.01
3	1.15	1.15	1.15	1.15	1.15
4	1.42	1.44	1.46	1.48	1.49
5	1.6	1.64	1.67	1.71	1.75
6	1.73	1.77	1.82	1.89	1.94
7	1.83	1.88	1.94	2.02	2.1
8	1.91	1.96	2.03	2.13	2.22
9	1.98	2.04	2.11	2.21	2.32
10	2.03	2.1	2.18	2.29	2.41
11	2.09	2.14	2.23	2.36	2.48
12	2.13	2.2	2.29	2.41	2.55
13	2.17	2.24	2.33	2.46	2.61
14	2.21	2.28	2.37	2.51	2.66
15	2.25	2.32	2.41	2.55	2.71
16	2.28	2.35	2.44	2.59	2.75
17	2.31	2.38	2.47	2.62	2.79
18	2.34	2.41	2.5	2.65	2.82
19	2.36	2.44	2.53	2.68	2.85
20	2.38	2.46	2.56	2.71	2.88
21	0	0	2.58	2.73	2.91
22	0	0	2.6	2.76	2.94
23	0	0	2.62	2.78	2.96
24	0	0	2.64	2.8	2.99
25	0	0	2.66	2.82	3.01

Table de Grubbs

$p \backslash m$	2	3	4	5	6	7	8
2	0,999	0,975	0,939	0,906	0,877	0,863	0,833
3	0,967	0,871	0,798	0,746	0,707	0,677	0,653
4	0,907	0,768	0,684	0,629	0,59	0,56	0,537
5	0,841	0,684	0,598	0,544	0,507	0,478	0,456
6	0,781	0,616	0,532	0,48	0,445	0,418	0,398
7	0,727	0,561	0,48	0,431	0,397	0,373	0,354
8	0,680	0,516	0,438	0,391	0,36	0,336	0,319
9	0,639	0,478	0,403	0,358	0,329	0,307	0,29
10	0,602	0,445	0,373	0,331	0,303	0,282	0,267
12	0,541	0,392	0,326	0,288	0,262	0,244	0,23
15	0,471	0,335	0,276	0,242	0,22	0,203	0,191
20	0,389	0,271	0,221	0,192	0,174	0,166	0,15
24	0,343	0,235	0,191	0,166	0,149	0,137	0,129
30	0,293	0,198	0,159	0,138	0,124	0,114	0,106
40	0,237	0,158	0,126	0,108	0,097	0,089	0,083

Table de Cochran

ddl	0,01	0,02	0,05	0,1
1	63,657	31,821	12,706	6,314
2	9,925	6,965	4,303	2,920
3	5,841	4,541	3,182	2,353
4	4,604	3,747	2,776	2,132
5	4,032	3,365	2,571	2,015
6	3,707	3,143	2,447	1,943
7	3,499	2,998	2,365	1,895
8	3,355	2,896	2,306	1,860
9	3,250	2,821	2,262	1,833
10	3,169	2,764	2,228	1,812
11	3,106	2,718	2,201	1,796

Table de justesse