

## Article original / Original article

# Déterminations des teneurs en atractyloside dans les racines d'*Atractylis gummifera* L. provenant de six régions d'Algérie

## *Determinations of levels of atractyloside in the roots of Atractylis gummifera L. collected from six different areas of Algeria*

Islam Amine Larabi<sup>1,\*</sup>, Mohamed Azzouz<sup>2</sup>, Rania Abtroun<sup>1</sup>, Mohamed Reggabi<sup>2</sup>, Bachra Alamir<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Toxicologie du Centre Hospitalo Universitaire Bab El Oued Alger, 53 boulevard Said Touati, Alger, Algérie

<sup>2</sup> Laboratoire de Biologie - Toxicologie, Établissement Hospitalier Spécialisé Ait Idir, Boulevard Abderrezak Hadad, Alger, Algérie

<sup>3</sup> Centre National de Toxicologie, route petit staoueli NIPA Dely Brahim, Alger, Algérie

**Résumé – Objectif :** *Atractylis gummifera* L., ou chardon à glu, est une plante d'Afrique du Nord appartenant à la famille des Astéracées. Elle se caractérise par la production d'un métabolite hautement toxique, appelé atractyloside (ATR). L'objectif de cette étude est d'apprécier la toxicité de cette espèce par la détermination des teneurs en atractyloside des échantillons de racine récoltés dans différentes régions d'Algérie. **Méthode :** Des échantillons de racine sont récoltés dans six régions différentes du pays (Alger, Tizi-Ouzou, Médéa, Béjaïa, Guelma et Tlemcen, et les extraits méthanoliques de ces derniers sont analysés par chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur à barrette de diode (HPLC-DAD). **Résultats :** La concentration en atractyloside varie de 0,1 % à 0,27 % d'atractyloside en fonction de la région avec une moyenne de 0,17 %. **Discussion :** Les teneurs les plus faibles sont retrouvées dans les échantillons provenant des villes côtières, et les teneurs les plus élevées proviennent de régions plus éloignées de la côte. Les quantités d'atractyloside retrouvées sont rapportées aux doses létales 50 (DL50). Le calcul montre que 260 g de racine sèche correspondent à la DL50 chez le rat par voie orale, et que pour les voies intra-péritonéale, intramusculaire, et sous-cutanée, seulement 10 à 35 g permettent d'atteindre la DL50. Chez l'Homme, il n'existe pas de données concernant les doses létales de l'atractyloside et la transposition des données animales à l'Homme ne peut être appliquée en raison de l'absence de données relatives à son volume de distribution dans l'organisme. **Conclusion :** L'évaluation des teneurs en atractyloside a fait l'objet de quelques études sporadiques. La plupart de ces études sont anciennes et reposent sur l'emploi de techniques d'analyse qui manquent de sensibilité et de spécificité. Ainsi, nous avons jugé utile d'initier un travail permettant d'enrichir et d'actualiser les données sur les teneurs en atractyloside du chardon à glu. Il ressort de notre étude que les teneurs en atractyloside dans la racine varient selon la région, et par conséquent, en fonction des conditions climatiques du milieu. Les chiffres obtenus présentent un appui solide pour le clinicien dans l'appréciation du degré d'imprégnation toxique lors des intoxications aiguës. Enfin, à travers ce travail, il convient d'attirer l'attention sur la nécessité d'entreprendre des travaux de recherche visant à évaluer les doses létales de l'atractyloside chez l'Homme, qui restent toujours méconnues dans la littérature scientifique.

**Mots clés :** Chardon à glu, atractyloside, Algérie

**Abstract – Objective:** *Atractylis gummifera* or glue thistle is a plant of North Africa belonging to the Asteraceae's family. It is characterized by the production of a highly toxic metabolite, called atractyloside (ATR). The purpose of this study is to assess the toxicity of this species by the determination of levels of atractyloside in root samples collected from different regions of Algeria. **Method:** Root samples were collected from six different regions of the country and methanol extracts were analyzed by high-performance liquid chromatography coupled with a diode array detector (HPLC-DAD). **Results:** The concentration of atractyloside ranges from 0.1 percent to 0.27 percent depending on the region, with an average of 0.17 percent. **Discussion:** The lowest levels were found in samples from coastal cities, and the highest levels from areas farther from the coast. The amounts of atractyloside found were compared with the lethal dose 50 (LD50). The results show that 260 g of dry root corresponds to the LD50 in rats orally, and for intraperitoneal, intramuscular and subcutaneous routes, only 10 to 35 g can reach the LD50. In humans, there are no data on lethal doses of atractyloside, and the transposing of animal data in humans cannot be applied because of the lack of data on the distribution volume of atractyloside. **Conclusion:** The assessment of levels of atractyloside has been the subject of some

\* Correspondance : Islam Amine Larabi, [larabiislamine@gmail.com](mailto:larabiislamine@gmail.com)

sporadic studies. Most of these studies are old, and based on the use of less sensitive and specific analytical techniques. Thus, we thought it useful to initiate an investigation to enrich and update the data on the levels of atractyloside in glue thistle. It appears from our study that the levels of atractyloside in the root vary by region, and therefore according to the climatic conditions of the environment. The results present strong support for the clinician in assessing the degree of toxic impregnation during acute intoxications. Finally, through this work, it is necessary to draw attention to the need to undertake research to assess the lethal dose of atractyloside in humans, which remains unknown in the scientific literature.

**Key words:** Glue thistle, atractyloside, Algeria

Reçu le 25 mars 2012, accepté après modifications le 24 mai 2012

Publication en ligne le 22 juin 2012

## 1 Introduction

L'*Atractylis gummifera* L., ou chardon à glu, est une plante d'Afrique du Nord qui appartient à la famille des Astéracées.

Cette plante est incriminée dans plusieurs cas d'intoxications sévères, souvent accidentelles (confusion avec l'artichaut sauvage) mais pouvant être volontaires lors de tentatives d'autolyse. Selon le bilan du Centre Anti-Poisons d'Alger (période 1991 à 2009), cette plante occupe la 1<sup>re</sup> position des plantes responsables d'intoxications, soit 10 % des intoxications par les plantes ( $n_{\text{plantes}} = 1554$  cas). Les décès dus à l'intoxication par cette plante, sur la même période, représentent 15 % du total des décès, toutes causes confondues ( $n = 332$  décès) [1].

La principale substance responsable de ses effets toxiques est l'atractyloside ou atractyline (ATR) (figure 1). Il s'agit d'un hétéroglucoside diterpénique à structure kaurène dont le mécanisme d'action est une inhibition de la phosphorylation oxydative, au niveau du complexe ATP/ADP translocase, qui empêche la formation d'ATP [2].

Son homologue chimique, le carboxyatractyloside ou gummiférine (CATR), fut identifié plus tard, mais sa mise en évidence par les méthodes usuelles (HPLC) reste difficile à cause de sa transformation rapide en atractyloside par décarboxylation (lors du séchage de la plante) (figure 2).

L'intoxication par le chardon à glu se traduit par deux formes cliniques. L'une est bénigne, de courte durée, et se résume à des troubles digestifs, sans atteinte neurologique. La deuxième est grave et souvent mortelle. Elle est dominée par une hépatite fulminante, un coma hypertonique et une hypoglycémie marquée. Des atteintes rénale, hématologique et cardiovasculaire, ainsi que des perturbations biologiques peuvent être observées. En l'absence d'antidote spécifique, le traitement est essentiellement évacuateur et symptomatique [3].

L'identification de l'atractyloside à partir des échantillons peut se faire par des réactions colorimétriques utilisant des réactifs usuels. On cite la réaction avec le réactif de Froedhe (sulfomolybdique) qui donne une coloration jaune-orangé en présence d'atractyloside. L'addition d'eau fait virer cette solution du jaune-orangé au violet stable. Il est à souligner que la positivité de ces réactions est conditionnée par la pureté du produit à mettre en évidence, ce qui suggère l'utilisation d'une étape préalable d'extraction et de purification telle que la chromatographie sur couche mince ou l'électrophorèse [4].

De nombreuses méthodes de dosage de l'atractyloside et du carboxyatractyloside sont publiées, basées souvent sur l'utilisation de la chromatographie liquide ou gazeuse.

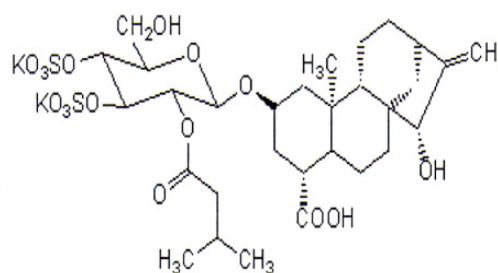


Fig. 1. Structure de l'atractyloside.

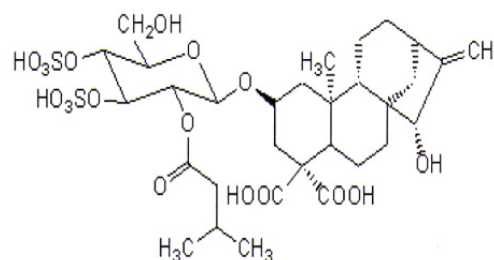


Fig. 2. Structure du carboxyatractyloside.

La première des techniques chromatographiques qui fut développée est celle réalisée par Calmes *et al.*, en 1994. Après une extraction liquide par un mélange eau-méthanol à partir de racines fraîches d'*Atractylis gummifera* L., le dosage de l'ATR et CATR en phase inverse par un mélange eau-acétonitrile est réalisé en utilisant un détecteur à lumière dispersée. La limite de détection de la technique est estimée à 9 µg d'ATR [5].

Les autres techniques chromatographiques décrites correspondent toutes à un couplage avec la spectrométrie de masse : une méthode générale de dosage des principaux toxiques végétaux au niveau sanguin par LC-MS-MS a été mise au point par Gaillard et Pepin en 1999. La séparation est réalisée sur une colonne C18 en utilisant un tampon de formiate d'ammonium à pH 3 et un gradient d'élution avec de l'acétonitrile. La détection des ions est généralement réalisée en mode négatif [6].

Une autre méthode, proposée par Steenkamp *et al.*, utilise une phase mobile constituée d'un mélange de tampon formiate d'ammonium à 10 mM, du méthanol et de l'acétonitrile, avec un domaine de linéarité allant de 1 ng/mL à 160 µg/mL [7].



Fig. 3. (Couleur dans la version en ligne) Fragments séchés de racines d'*Atractylis gummifera* L.



Fig. 4. (Couleur dans la version en ligne) Poudre d'*Atractylis gummifera* L.

Une méthode par GC-MS a été développée pour la détection de l'atractyloside au niveau des liquides de lavage gastrique et des extraits de racine de *Callilepis laureola*, avec une limite de détection de 0,0451 mmol/L [8].

Une technique immunoenzymatique de type ELISA par compétition a été développée dans un but diagnostic. Les résultats obtenus ont été confirmés par différentes techniques chromatographiques [9].

Pour notre enquête, nous proposons une technique simple, rapide et pratique pour le dosage de l'atractyloside par HPLC-DAD dans la racine sèche de chardon à glu.

Ce travail est motivé par deux considérations :

- (1) Le risque élevé que la plante engendre; en effet, selon le bilan du CAP d'Alger (1991–2009), le chardon à glu est responsable de 81 % des décès dus aux plantes ( $n = 65$  décès), et de 15 % des décès, toutes causes confondues ( $n = 332$  décès).
- (2) La rareté des données relatives aux teneurs en atractyloside dans la plante, notamment en Algérie.

## 2 Matériel et méthode

### 2.1 Matériel végétal

Les échantillons sont récoltés dans six régions d'Algérie : Alger, Tizi-Ouzou, Médéa, Bejaïa, Guelma et Tlemcen. Le travail a été mené durant la période allant d'avril à août 2010. Le matériel végétal prélevé est constitué par la racine d'*Atractylis gummifera* L. (figure 3).

Le séchage des plantes a été réalisé en maintenant ces dernières dans du papier journal, à température ambiante et loin du soleil pendant une semaine. Une fois le séchage achevé, la

racine est fragmentée puis broyée en poudre fine. Cette dernière est soumise directement à l'extraction (figure 4).

### 2.2 Réactifs

L'étalon d'atractylate de potassium pure (1 g) a été obtenu auprès de Sigma (Saint-Louis, États-Unis, réf. 94F0383). L'acétonitrile (réf. 0000198128) et le méthanol de qualité HPLC proviennent du laboratoire Panréac. L'acide orthophosphorique a été fourni par le laboratoire Gifrer & Barbezat (réf. 015-011-00-6). Le sel de phosphate monopotassique  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  provient du laboratoire Gerhard Buchmann (réf. 8334/77).

### 2.3 Extraction

Il s'agit d'une extraction liquide-liquide de la poudre d'*A. gummifera* L. dans une colonne à reflux à 95 °C pendant 30 minutes à l'aide du méthanol. L'extrait obtenu est ensuite dilué au 1/5<sup>e</sup> dans de l'eau distillée et 100  $\mu\text{L}$  de cette dilution seront analysés.

### 2.4 Développement

Nous avons procédé à la comparaison de deux approches de quantification : la première utilise l'étalonnage direct (gamme préparée dans l'eau) et la deuxième utilise la méthode des ajouts dosés. La lecture à partir de la courbe d'étalonnage se fait directement selon l'équation de la droite de régression ( $y = 64\,195x + 39\,942$ ). La deuxième approche consiste à ajouter la même quantité d'échantillon à analyser dans chaque point de la gamme d'étalonnage, constituée de 3 niveaux de concentrations (20, 30, 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). La mesure obtenue pour chacun des points, se compose alors du signal de la solution fille (concentration connue), augmenté du signal correspondant à l'échantillon (concentration inconnue).

La droite d'étalonnage tracée permet de déterminer la concentration d'analyte dans l'échantillon selon la formule de la droite  $y = ax + b$ ,  $x$  étant la concentration totale en atractyloside en  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

La valeur absolue de  $x$  lorsque  $y$  est égal à zéro correspond à la concentration recherchée.

### 2.5 Analyse en HPLC-DAD

L'appareillage utilisé est une CLHP « Waters, alliance<sup>®</sup> » doté d'un module de séparation (2695), d'un injecteur automatique : Model SM7 (capacité 100  $\mu\text{L}$ ) ; d'un détecteur à barrette de diode (2696) et piloté par le logiciel « Waters, Empower<sup>®</sup> ». La colonne utilisée est une C18 « X-terra » 150 mm. La longueur d'onde d'absorption est de 195 nm.

Le temps de rétention de l'atractyloside est de 3,23 minutes, avec un écart type relatif (RSD) de 1,23. Le temps d'analyse est de 5 minutes (figure 5).

L'atractyloside possède un maximum d'absorption à 200 nm avec deux bosses à  $270 \pm 5$  nm et  $340 \pm 5$ , et un épaulement à 220 nm (figure 6).

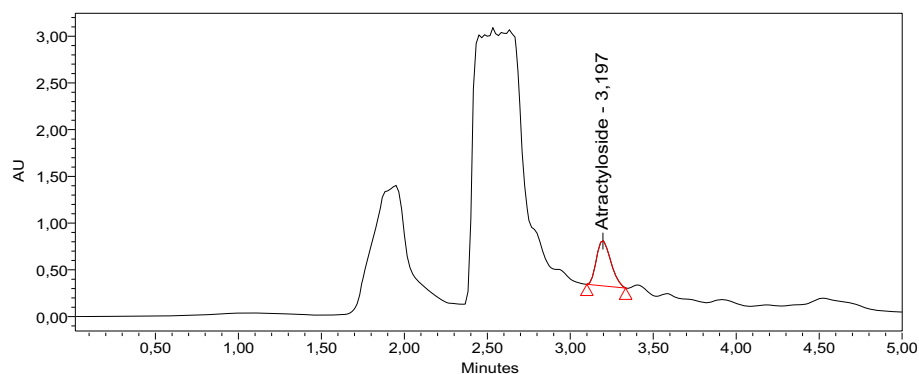


Fig. 5. (Couleur dans la version en ligne) Chromatogramme d'un extrait méthanolique d'*Atractylis gummifera* L.

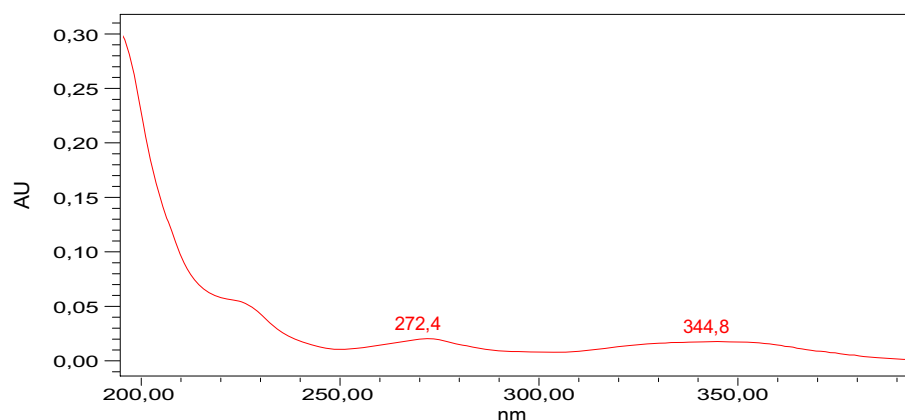


Fig. 6. (Couleur dans la version en ligne) Spectre UV de l'attractyloside.

### 3 Résultats

#### 3.1 Validation de la technique

Cette méthode est validée selon le guide de validation SFSTP<sup>1</sup> 1992 [10]. Les nouvelles recommandations de ce guide (2003 et 2006) sont bien prises en compte. La technique développée est bien adaptée au dosage de l'attractyloside dans les différents échantillons récoltés.

Le rendement d'extraction est en moyenne de 90 %. La courbe d'étalonnage moyenne établie sur trois jours présente une bonne linéarité, avec un coefficient de corrélation  $R = 0,9998$ . À cette courbe, nous avons comparé chacune des courbes des ajouts dosés. L'intervalle de dosage est compris entre 10 et 50 mg/L.

Les limites de détection et de quantification sont calculées en utilisant l'approche de l'écart type de répétabilité. Elle consiste à soumettre à l'analyse six (06) fois, une solution à 1 mg/L d'attractyloside. Les calculs donnent des valeurs de 50 µg/L et 120 µg/L respectivement.

La justesse, évaluée grâce au biais, est de 0,72 %. La technique présente une bonne précision avec un coefficient de répétabilité de 4,53 % (norme < 5 %), et un coefficient de fidélité intermédiaire de 3,48 % (norme < 5 %). L'erreur totale sur la mesure, exprimée en terme d'exactitude, est égale à 4,20 % (norme < 5 %), conformément aux exigences de la pharmacopée et aux normes de validation analytique (ICH, SFSTP).

<sup>1</sup> Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques.

La spécificité de la méthode est appréciée en vérifiant l'homogénéité du pic chromatographique. Deux paramètres sont calculés à l'aide du logiciel « Empower ». Il s'agit de l'angle de pureté et du seuil de pureté. Pour que la méthode soit spécifique, la valeur chiffrée de l'angle de pureté doit être inférieure à celle du seuil de pureté. Une concentration d'attractyloside de 50 mg/L a été sélectionnée. Les calculs donnent des valeurs de 0,216 et 0,398 respectivement, ce qui a permis de vérifier la spécificité de la méthode.

#### 3.2 Teneurs en attractyloside des racines récoltées

La teneur en attractyloside dans 100 g de racine est donnée par la formule :

$$X \text{ (g \%)} = (5 \times C) / 1000$$

$X$  : Quantité d'attractyloside en g pour 100 g de racine sèche de chardon à glu.

$C$  : Concentration d'attractyloside en mg/L lue directement sur la courbe de calibration.

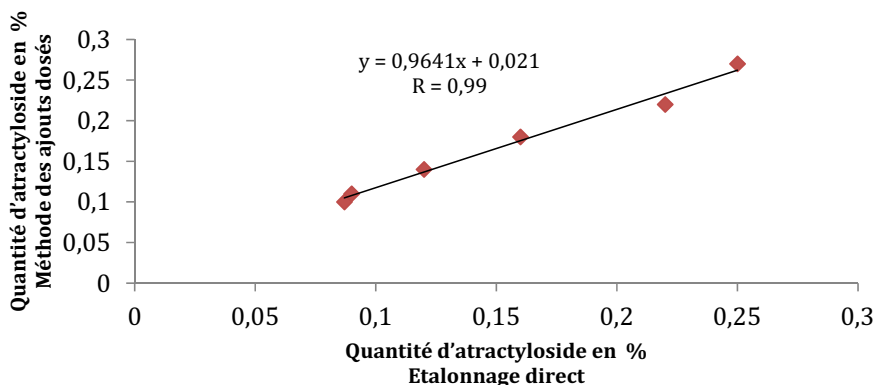
5 : Facteur de conversion.

Les teneurs en attractyloside des échantillons sont données dans le tableau I.

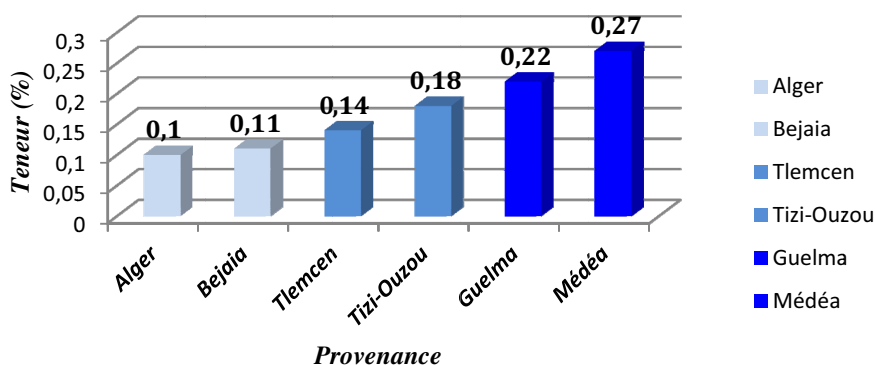
**Tableau I.** Quantité d’atractyloside exprimée en g pour cent grammes de racine d’*A-gummifera L.*

Échantillons	Quantité d’atractyloside (courbe d’étalonnage direct) (%)	Quantité d’atractyloside (courbe des ajouts dosés) (%)
A	0,087	0,10
M	0,25	0,27
T	0,16	0,18
Bj	0,09	0,11
G	0,22	0,22
TI	0,12	0,14

(A) : Alger, (M) : Médéa, (T) : Tizi-Ouzou, (Bj) : Bejaïa, (G) : Guelma, (TI) : Tlemcen.



**Fig. 7.** (Couleur dans la version en ligne) Corrélation Gamme étalon/Gamme des ajouts.



**Fig. 8.** (Couleur dans la version en ligne) Teneur en atractyloside des différents échantillons.

Les deux modes de calibration rendent des valeurs très proches, ce que confirme la bonne corrélation entre les résultats rendus par les deux méthodes (figure 7).

Nous pouvons, pour les futurs dosages de l’atractyloside, recourir directement à l’étalonnage direct sans passer par la calibration sur matrice, bien que cette dernière reste la méthode de choix.

#### 4 Discussion

Les teneurs en atractyloside varient de 0,1 % (1000 mg/kg) à 0,27 % (2700 mg/kg) en fonction de la région avec une moyenne de 0,17 % (1700 mg/kg) (figure 8).

Les teneurs obtenues se rapprochent de celles rapportées en Sardaigne (0,12 % en juin, 0,19 % en octobre, 0,33 % en

décembre). En Sicile, les teneurs rapportées sont de 1,21 % en mai et de 1,57 % en décembre [11].

Plusieurs auteurs, Viala, et Cano en 1965 [4], puis Contessa et Fassina en 1978 [12], ont montré que la teneur en atractyloside des parties hypogées du végétal est plus importante en hiver qu’au 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 [13]. Au Maroc, Romeuf *et al.* (2006) rapportent des teneurs de 0,2 % [14].

Afin d’estimer la toxicité relative de la racine, nous avons rapporté les quantités d’atractyloside retrouvées dans chaque échantillon aux doses létales 50. Le calcul montre que 260 g de racine sèche correspondent à la DL50 chez le rat par voie orale (VO), et que pour les voies intra-péritonéale (IP),

**Tableau II.** Corrélation entre la DL50 de l'atractyloside et la quantité mortelle de la racine [15–17].

Animal	Voie administration	DL50 mg/kg	Quantité mortelle D'ATR (g)
Souris	IP	434	10
Rat	IM	431	10
	SC	155	35
	VO	1100	260
	IP	210	50

intramusculaire (IM), et sous-cutanée (SC), seulement 10 à 35 g permettent d'atteindre cette dose (tableau II).

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

## 5 Conclusion

Le chardon à glu, plante très toxique, continue à être la cause d'intoxications graves, voire parfois mortelles. L'évaluation des teneurs en principes toxiques de cette plante, en l'occurrence, l'atractyloside, a déjà fait l'objet de quelques études sporadiques. La plupart de ces études sont anciennes et reposent sur l'emploi de techniques d'analyse qui manquent de sensibilité et de spécificité.

Ainsi, nous avons jugé utile d'initier un travail permettant d'enrichir et d'actualiser les données sur les teneurs en atractyloside du chardon à glu en développant une technique de dosage simple et performante. De cette enquête, il ressort que les teneurs en atractyloside dans la racine varient selon la région, et par conséquent en fonction des conditions climatiques du milieu (température, humidité, type de sol, etc.). Les teneurs retrouvées se révèlent similaires à celles de la littérature, pour les études menées sur la même période de l'année.

Il est aussi à souligner que les chiffres obtenus sont un appui solide et un support pour le clinicien dans l'appréciation du degré d'imprégnation toxique lors d'intoxications aiguës.

Enfin, il convient d'attirer l'attention sur la nécessité d'entreprendre des travaux de recherche visant à évaluer les doses létales de l'atractyloside chez l'Homme, qui restent toujours méconnues dans la littérature scientifique.

**Conflits d'intérêts.** Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts.

## Références

- Centre Antipoisons d'Alger. Bilan des intoxications au chardon à glu au CAP d'Alger (années 1991–2009), 2010.
- Obatomi DK. Biochemistry and toxicology of the diterpenoid glycoside. *Atractyloside*. *Food Chem Toxicol*. 1998; 36: 335–346.
- Bismuth C. *Toxicologie clinique*. Paris : Flammarion (5<sup>e</sup> édition), 2000.
- Viala A, Cano JP. Identification et dosage de l'atractyloside dans les extraits de chardon à glu, *Atractylis gummifera* L., après séparation par électrophorèse sur couche mince. *Bull Soc Pharma Marseille*. 1965; 2b.
- Calmes M, Crespin F, Maillard C, Ollivier E, Balansard G. High-performance liquid chromatographic determination of atractyloside and carboxyatractyloside from *Atractylis gummifera* L. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1994; 663: 119–122.
- Gaillard Y, Pepin G. Poisoning by plant material: review of human cases and analytical determination of main toxin by high-performance liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1999; 733: 181–229.
- Steenkamp PA. Identification of atractyloside by LC-ESI-MS in alleged herbal poisonings. *Forensic Sci Int*. 2006; 163(1-2): 81–92.
- 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.
- Bye SN, Coetzer HT, Dutton MF. An enzyme immuno-assay for atractyloside, the nephrotoxin of *Callilepis laureola* (implila). *Toxicol*. 1990; 28(8): 997–1000.
- Caporal-Gautier J, Nivet JM, Algranti P, Guilloteau M, Hist M, Lallier M, N'Guyen-Huu JJ, Russotto R. Guide de validation analytique. Rapport d'une commission SFSTP. I : Méthodologie. *S.T.P Pharma Pratiques*. 1992; 2(4): 205–226.
- Fassina G, Veronese G. Analysis of extracts of *Atractylis gummifera*. IV. Chromatographic studies of the pigments of the rhizome. *Boll Soc Ital Biol Sper*. 1961; 37: 518–520.
- Contessa AR, Fassina G. Pharmacology of *Atractylis gummifera* L. In: *Atractyloside: Chemistry, Biochemistry and Toxicology*. Italy: Piccin Medical Books, Padova. 1978: 1–11.
- Abtroun R. Élaboration d'un fichier analytique et toxicologique pour le centre d'information, de contrôle, et de traitement des intoxications graves. Thèse de doctorat en Sciences Médicales, Alger 1986.
- Romeuf L, Cherrah Y, Ahid S, Ollagnier M, Basset T, Gaillard Y. Identification et dosage de l'atractyloside et du carboxyatractyloside par CLHP-SM<sup>2</sup> et CLHP-SM<sup>3</sup> dans le chardon à glu (*Atractylis gummifera* L.). *Ann Toxicol Anal*. 2006; 18(4): 223–257.
- Santi R, Cascio G. Ricerche farmacologiche sul principio attivo dell'*Atractylis gummifera*. I. Azione generale. *Arch Ital Sci Farmacol*. 1955; 5: 354–363.
- Charnot A. La toxicologie au Maroc. *Mem Soc Sci Nat Maroc*. 1945; 47: 572.
- Arnaud J. Contribution à l'étude du fruit du chardon à glu, *Atractylis gummifera*. Thèse Doct. Pharm. Université d'Alger. 1957.