

INFLUENCE DE LA CULTURE HYDROPONIQUE DE QUELQUES PLANTES MÉDICINALES SUR LA CROISSANCE ET LA CONCENTRATION EN COMPOSÉS SECONDAIRES DES ORGANES VÉGÉTAUX

Karine Pedneault¹, Sébastien Léonhart¹, Paul Angers³, André Gosselin¹, Al Ramputh⁴, John T. Arnason⁴ et Martine Dorais^{1,2}

¹ Horticultural Research Centre, Université Laval (Québec), Canada, G1K 7P4

² Agriculture and Agri-Food Canada, Greenhouse & Processing Crops Research Centre, Harrow (Ontario), Canada, N0R 1G0

³ Food Sciences Department, Pavillon Paul-Comtois, Université Laval (Québec), Canada, G1K 7P4

⁴ Biology Department, Ottawa University, Ottawa (Ontario), Canada, K1N 6N5

1. INTRODUCTION

Au cours des dernières années, plusieurs raisons ont mené au rétablissement de l'usage des plantes médicinales en Amérique du Nord. Elles sont d'abord d'un coût inférieur aux médicaments de synthèse, puis elles arrivent à un moment où le public est désillusionné devant la médecine moderne. Laquelle en effet n'a pu trouver remède à tous les maux, en plus de se buter à une résistance accrue des pathogènes et à une panoplie d'effets secondaires liés à l'usage des médicaments traditionnels. Enfin, la valeur médicinale des plantes est de plus en plus démontrée scientifiquement, ce qui constitue un argument de taille pour leur utilisation en médecine, particulièrement en prophylaxie. Ainsi, l'industrie des plantes médicinales est devenue, en peu de temps, le secteur de l'industrie pharmaceutique connaissant la plus forte croissance annuelle avec 15 à 20 % (1).

Néanmoins, il apparaît que la plupart des espèces médicinales utilisées à l'échelle mondiale sont cueillies directement en forêt et non cultivées (1), ce qui mène inévitablement à la dissémination de la diversité génétique des espèces indigènes et, à plus long terme, à leur disparition pure et simple. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés, dans le cadre de cette étude, à la culture des plantes médicinales en serres hydroponiques. Ce choix fut également guidé par les conditions agronomiques du Québec. En effet, la culture hydroponique présente un avantage non négligeable pour un territoire nordique tel que le notre : il s'agit d'une méthode de culture qui produit toute l'année et qui n'est donc pas soumise au rythme des saisons. De plus, les plantes produites sous ces conditions sont propres et exemptes de pesticides, ce dernier point étant particulièrement important puisqu'on souhaite s'attaquer à un marché relevant non plus de l'alimentaire, mais bien de la santé. Nos objectifs étaient donc les suivants :

1. Tracer un profil-type de l'accumulation de composés actifs ciblés au cours de la croissance de la plante sous des conditions hydroponiques, pour chacune des espèces à l'étude;
2. Caractériser la distribution des composés actifs à travers les organes végétaux;
3. À long terme, ajouter des espèces intéressantes à la liste des plantes cultivées industriellement en serre et ainsi créer une alternative à la culture de plantes légumières et ornementales pour les producteurs québécois.

Les espèces étudiées ont été choisies après une étude économique du marché des plantes médicinales en Amérique du Nord et selon leur potentiel d'adaptation aux conditions serres et hydroponiques. Nous présenterons ici quelques résultats sur *Achillea millefolium*, *Echinacea angustifolia*, *Inula helenium* et *Tanacetum parthenium*. Chez *A. millefolium*, nous avons dosé quelques flavonoïdes à l'origine des propriétés anti-inflammatoires et antispasmodiques de la plante (2-4) : la lutéoline, l'apigénine et les glycosides de l'apigénine. Ces molécules ont été regroupées dans les résultats présentés ici sous le nom de « flavonoïdes totaux »; une publication ultérieure présentera les détails de ces analyses. L'acide chlorogénique, composé qui n'intervient pas dans l'activité médicinale de *Achillea millefolium*, a également été analysé à titre d'indicateur du métabolisme secondaire de la plante.

Les composés phénoliques dérivés de l'acide caféique, soient l'échinacoside, l'acide chicorique, l'acide caftarique et l'acide chlorogénique (aussi à titre indicatif) furent analysés chez *Echinacea angustifolia*.

Cette plante est bien connue pour ses propriétés immunostimulantes et anti-inflammatoires (2, 5-7). L'implication des dérivés de l'acide caféique dans l'activité médicinale de l'échinacée est encore controversé. Toutefois, il s'agit des composés actuellement quantifiés dans la standardisation des extraits commerciaux de cette plante. Des analyses à venir se concentreront sur les alkamides, des composés aussi impliqués dans les diverses propriétés médicinales de *Echinacea angustifolia*.

Du côté des plantes à composés de type terpénoïdes, nous avons analysé l'alantolactone et son isomère, l'isoalantolactone, chez *Inula helenium* (*Elecampane*, en anglais). Ces composés sont les constituants majeurs de l'huile essentielle d'*I. helenium* et ont des propriétés antibactériennes notamment contre *Mycobacterium tuberculosis* (8), anti-protozoaires contre *Entamoeba histolytica*, qui cause des amibiases (9) et antifongiques (10, 11) contre des pathogènes opportunistes comme certains dermatophytes.

Enfin, *Tanacetum parthenium* (*Chrysanthemum parthenium* ; pyrèthre ; grande camomille) a été analysé pour sa teneur en parthénolide, une lactone sesquiterpénique connue pour ses propriétés antimigraineuses, cytotoxiques et anti-inflammatoires (12-15). Il existe actuellement une controverse autour de l'implication du parthénolide dans l'activité médicinale de cette plante. Toutefois, comme dans le cas de l'échinacée, ce composé est celui utilisé dans la standardisation des produits à base de pyrèthre ; c'est pourquoi nous avons choisi de poursuivre dans cette voie.

2. MÉTHODOLOGIE

Les plantes ont été cultivées sous des conditions hydroponiques chez Hydroserres Mirabel Inc. (Saint-Janvier-de-Mirabel, Québec, Canada) au cours de l'été-automne 1999, en bassin d'eau profondes, avec un système de radeaux flottants. Toutes les données de croissances, de température et d'ensoleillement ont été relevées et compilées. De même, un contrôle cultivé en champ (Charlesbourg, Québec, Canada) a permis une comparaison avec la culture hydroponique. Cette comparaison s'est faite entre des plantes ayant atteintes un même stade phénologique. Neuf répétitions ont été faites pour chacun des stades phénologiques.

Le matériel végétal a été récolté à différents intervalles de croissance, lavé, lyophilisé et homogénéisé pour les analyses. Ces dernières ont été effectuées par CLHP (HPLC) pour les composés phénoliques et par CPG (GC) pour les composés terpéniques. Les extractions et analyses ont été répétées 3 fois. Pour la quantification et l'identification des composés, des standards ont été utilisés lorsqu'ils étaient disponibles. Autrement, on a confirmé les pics par CPG-SM (GC-MS).

3. RÉSULTATS

3.1. Croissance

Il importe d'abord de souligner l'importance du cycle vital de la plante. En effet, seules *Achillea millefolium* et *Tanacetum parthenium* ont pu compléter leur cycle de croissance à l'intérieur de la période expérimentale. Au contraire, *Echinacea angustifolia* et *Inula helenium* n'ont pas outrepassé la croissance végétative ; en champs, ces espèces arrivent à maturité après deux ans. Cet état de fait semble avoir marqué la concentration en composés actifs trouvés chez ces plantes, puisque chez plusieurs espèces le maximum de composés actifs dans la plante est atteint à la floraison.

Par ailleurs, il existe actuellement une controverse (qui tend à être démentie) dans le milieu scientifique à savoir que la vitesse de croissance relative (RGR – *relative growth rate*) influence la concentration en métabolites secondaires. En fait, il apparaît qu'une plante dont la croissance est rapide alloue principalement le carbone absorbé à la formation de composés structuraux tels que la cellulose, au détriment des métabolites secondaires. Cette idée a été démolie par quelques auteurs dont Almeida-Cortez *et al.* (16). Dans notre cas, la vitesse relative de croissance était environ deux fois plus rapide en serre hydroponique qu'en champs. Toutefois, aucune conclusion ne peut-être tirée des comparaisons faites entre ces pratiques de culture puisque chez certaines espèces la culture hydroponique fut plus intéressante que la culture en champs alors que nous avons obtenu le contraire chez d'autres espèces.

Ainsi, dans le cas d'*Inula helenium*, la comparaison au même stade de croissance de plantes cultivées en serre hydroponique et en champ a montré que les plantes issues du champ étaient plus intéressantes en terme de concentration en alantolactone et isoolantolactone (Tableau 1), avec une différence significative à $P < 0,01$. Au contraire, chez *Achillea millefolium*, une plus grande concentration en flavonoïdes totaux (apigénine, lutéoline et glycosides de l'apigénine) a été retrouvée dans les racines cultivées sous des conditions hydroponiques comparativement à celles cultivées en champ (respectivement 1,92 % et 0,51 % w/w dw – Tableau 2). Cependant, les feuilles de cette plante ont montré un arrangement différent puisque les feuilles cultivées en champs étaient plus concentrées en flavonoïdes totaux que celles issues de cultures hydroponiques (respectivement 0,26 % et 0,082 % w/w dw). La grande majorité des flavonoïdes trouvés étaient sous la forme glycosylée dans les racines comme dans les feuilles. Ainsi donc, il apparaît que la distribution des flavonoïdes varie dans les organes selon les conditions culturales puisque chez les plantes cultivées sous des conditions hydroponiques la presque totalité des flavonoïdes se trouvait dans les racines alors que chez les plantes cultivées en champs une bonne proportion de flavonoïdes était conservée dans les feuilles.

3.2. Stades de croissance

3.2.1. *Echinacea angustifolia*

Chez l'échinacée, la majorité des composés actifs était localisée dans les racines principales et secondaires, ce qui concorde bien avec l'utilisation de cet organe en phytothérapie. Les données présentées dans la figure 1 correspondent à une croissance de 30 jours, ce qui est très peu pour une plante qui atteint sa maturité après deux ans de culture en champs. Enfin, on observe une augmentation générale de la teneur en échinacoside et en acide chicorique dans les racines, l'acide caftarique n'ayant été retrouvée que dans les feuilles (donnée non présentée). Ces résultats laissent croire que la concentration en composés phénoliques augmentera avec la croissance de la plante. Par ailleurs, les concentrations obtenues en composés actifs sont très faibles en comparaison de ce qu'ont observé Amimoto et Fukui (17) dans divers cultivars de laitue et d'endives, soient des concentrations d'acide chicorique variant entre 2 et 6 mg/g dw, chez des plantes qui ne sont pas vraiment des sources de dérivés de l'acide caféique.

3.2.2. *Achillea millefolium*

Deux pics de forte concentration en flavonoïdes totaux ont été observés chez *Achillea millefolium* au cours de la croissance (Fig. 2). Le premier, de 0,63 % (w/w) dw a été constaté tout au début de la croissance végétative, après 43 jours de culture hydroponique. S'en est suivie une descente à 0,26 % (w/w) dw après 64 jours de culture, la concentration la plus faible relevée pendant la croissance. Une telle chute a aussi été observée pendant la croissance végétative de *Urtica dioica* (18). À la floraison, après 87 jours de culture, la concentration maximale de flavonoïdes totaux a été notée (0,75 % (w/w) dw). La plus grande partie des flavonoïdes présents à ce stade étaient localisés dans les racines (2,7 % (w/w) dw) et dans les fleurs (1,4 % (w/w) dw) (données non présentées). Un maximum de flavonoïdes a aussi été relevé chez *Convallaria majalis* (19) et *Aronia melanocarpa* (20).

L'acide chlorogénique a été retrouvée à une très forte concentration chez les jeunes plantes (7,22 % (w/w) dw à 35 jours de culture) pour ensuite demeurer stable à 4,7 % (w/w) dw pendant toute la croissance (Fig. 2). Un tel schéma a été observé chez *Coffea arabica* (21) et *Helianthus annuus* (22). De fait, ce composé est connu pour être une phytoalexine très importante dans la protection des jeunes plantes.

3.2.3. *Inula helenium*

Tout comme l'échinacée, *Inula helenium* est demeurée en croissance végétative tout au long de la période expérimentale (89 jours). On observe encore ici une tendance à l'augmentation de la concentration en composés actifs qui atteignent 0,7mg/g après 89 jours de culture (Fig. 3). De même, il apparaît que chacun des isomères est également représenté dans la plante au stade de 89 jours puisque tout deux sont à une concentration de 0,35mg/g. Avant le stade 74 jours, l'alandolactone semble dominante par rapport à son isomère. Dans tous les cas, les lactones étaient majoritairement localisées dans la racine principale et ne se retrouvaient qu'à l'état de traces dans les autres organes (racines secondaires et feuilles). Enfin, l'ensemble de ces données semble montrer que la concentration en composés actifs augmentera possiblement avec le développement de la plante.

3.2.4. *Tanacetum parthenium*

Au contraire d'*Inula helenium*, *Tanacetum parthenium* a rapidement complété son cycle vital à l'intérieur de la période expérimentale (105 jours). Dans ce cas, un maximum de composé actif (parthénolide) fut trouvé dans les boutons floraux et dans les fleurs après 105 jours de culture (respectivement 1,5 % et 1,25 % (w/w) dw) (Fig. 4). Ces données concordent avec ce qui a été observé chez *Origanum vulgare* (23) et *Thymus vulgaris* (24), c'est à dire une concentration maximale de composés terpéniques à la floraison. Un fait intéressant est cependant ressorti de l'étude de cette plante : la concentration en parthénolide n'a cessé d'augmenter tout au long de la période de floraison dans les boutons floraux comme dans les fleurs. Il est donc possible que les fleurs les plus tardives soient davantage concentrées en composés actifs.

Par ailleurs, malgré leur utilisation en phytothérapie, les feuilles sont, selon notre étude, moins intéressantes que les fleurs puisqu'elles n'ont atteint que 0,4 % (w/w) dw de parthénolide pendant la croissance végétative et pendant la floraison, après 105 jours de culture (Fig. 4). Enfin, seules des traces de parthénolide ont été retrouvées dans les racines.

3.2.5. Récolte

Selon nos résultats, l'*Achillea millefolium* et *Tanacetum parthenium* devraient être récoltées lors de la floraison, et même tard dans la floraison pour ce qui est de *T. parthenium* (Fig. 5). Chez *A. millefolium*, on devrait récolter les fleurs et les racines tandis que toutes les sommités fleuries sont les parties les plus intéressantes chez *T. parthenium*. Par contre, pour *E. angustifolia* et *I. helenium*, on devrait allonger la période de culture jusqu'à ce que la plante atteigne sa maturité afin de mieux connaître le profil de variation des composés actifs, les racines étant selon notre étude les organes les plus avantageux chez ces espèces.

Ces résultats concordent avec les recommandations de Li (25) puisque cet auteur conseille de récolter l'échinacée et *I. helenium* après 2 ou 3 ans de culture. Contrairement à nos observations en milieu hydroponique, il recommande les feuilles de l'achillée. Ceci correspond par contre aux résultats que nous avons obtenus pour les feuilles cultivées en champs, lesquelles étaient beaucoup plus riches en flavonoïdes totaux que les feuilles issues de la culture hydroponique.

Enfin, à titre de conclusion sommaire, deux faits ressortent de nos résultats :

- 1) La floraison induit une augmentation de la concentration en composés actifs chez *Achillea millefolium* et *Tanacetum parthenium*. Chez ces espèces, les composés médicinaux se retrouvent dans les sommités fleuries mais aussi dans les racines chez *A. millefolium*.
- 2) Chez *Echinacea angustifolia* et *Inula helenium*, il apparaît que la maturation de la plante favorisera l'augmentation de la concentration en composés actifs. Chez ces espèces, les racines sont les organes les plus prometteurs.

3.2.6. Stress physiologiques

L'utilisation de stress physiologiques est l'une des avenues les plus intéressantes à explorer pour arriver à augmenter la concentration en composés actifs chez les plantes cultivées sous des conditions hydroponiques. Ainsi, il est connu qu'un accroissement du rayonnement UV ou de la concentration en CO₂ atmosphérique augmente la concentration en composés phénoliques chez quelques espèces (26). Ce dernier procédé est d'ailleurs particulièrement facile à mettre en place dans une serre.

De même, une carence en azote ou encore la présence d'éliciteurs comme des polysaccharides fongiques peuvent induire une réaction de défense chez les plantes, laquelle se manifestant le plus souvent par une augmentation de la concentration en métabolites secondaires, ceux-ci sont alors désignés sous le nom de « phytoalexines ». Nous avons effectué une expérience de stress osmotique, en introduisant divers niveaux d'électroconductivité dans la solution nutritive en culture hydroponique. Cependant, les analyses étant toujours en cours, il est impossible d'en dire quoi que ce soit pour le moment.

4. CONCLUSION

Nos résultats démontrent que la culture de plantes médicinales de qualité, à forte teneur en composés actifs, est possible en serre sous des conditions hydroponiques. Néanmoins, seules devraient être sélectionnées des espèces à croissance rapide, comme *Achillea millefolium* ou *Tanacetum parthenium*, afin que les plantes atteignent le stade génératif à l'intérieur d'une période de culture maximale de 4 mois. De plus, l'utilisation de stress physiologiques est à envisager afin d'augmenter la concentration en composés actifs des plantes cultivées sous ces conditions.

5. REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient Hydroserrres Mirabel Inc. et Agriculture et Agroalimentaire Canada, pour la participation financière à ce projet, ainsi que Mme Stéphanie Gaudreault, étudiante maintenant graduée du département de Science des Aliments et de Nutrition, pour une aide exemplaire et un travail impeccable pendant les extractions et analyses.

6. RÉFÉRENCES

1. E. Small et P. M. Catling, *Les cultures médicinales canadiennes*, Version française de *Canadian medicinal crops*, Les Presses scientifiques du CNRC, Ottawa, 281 p. (2000). Disponible en partie sur le web :
2. J. Bruneton, in *Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales*, 3ème édition revue et augmentée, Paris, Lavoisier : Technique et Documentation, 1120 p. (1999).
3. A. S. Golberg, E. C. Muller, E. Eigen et S. J. De salva, *J. Pharm. Sc.*, **58**(8), 938-941 (1969).
4. R. F. Chandler, S. N. Hooper et M. J. Harvey, *Economic Botany*, **36**(2), 230-223 (1982).
5. T. Skwarek et Z. Tynecka, *Herba Polonica*, **42**(2), 110-117 (1996).
6. E. Tragni *et al.*, *Fd Chem Toxic*, **23**, 317-319 (1985).
7. A. Tubaro, E. Tragni, P. Del Negro, C. L. Galli, et R. Della Loggia, *J. Pharm. and Pharmacol.*, **39**(7), 567-569 (1987).
8. C. L. Cantrell, L. Abate, F. R. Fronczek, S. G. Franzblau, L. Quijano et N. H. Fischer, *Planta Medica*, **65**(4), 351-355 (1999).
9. X. Shandera-Wayne *et al.*, *Southern Med. J.*, **91**(9), 829-837 (1998).
10. S. Wahabr, N. Tandon, Z. Jacob, P. Sagar et O. P. Srivastava, *J. Indian Bot. Soc.*, **60**(3-4) 278-281 (1981).
11. Orth *et al.*, 1996
12. M. J. Hewlett, M. J. Begley, W. A. Groenewegen, S. Heptinstall, D. W. Knight, J. May, U. Salan et D. Toplis, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, **16**, 1979-1986 (1996).
13. R. J. Marles, J. Kaminski, J. T. Arnason, L. Pazos-Sanou, S. Heptinstall, N. H. Fischer, C. W. Crompton, D. G. Kindack et D. V. C. Awang, *J. Nat. Prod.*, **55**, 1044-1056 (1992).
14. J. J. Ross *et al.*, *Planta Medica*, **65**, 126-129 (1999).
15. M. Robles, M. Aregullin, J. West, et E. Rodriguez, *Planta Medica*, **61**, 199-203 (1995).
16. J. S. Almeida-Cortez, B. Shipley et J. T. Arnason, *Functional Ecology*, **13**, 819-827 (1999).
17. K. Amimoto et H. Fukui, 1996. *Acta Hort.*, 440 : 338-343 (1999).
18. Z. Weglarz et W. Karaczun, *Herba Polonica*, **42**(2), 88-95 (1996).
19. J. Malinowski, J. Lubaska, J. Chorazewicz Przychodni et H. Strzelecka, *Herba Polonica*, **25**(2), 113-120 (1979).
20. E. G. Martinov, et N. I. Suprunov, *Sezon Razvitie Prirody*, 116-120 (1977).
21. R. J. Aerts, et T. W. Baumann, *J. Exp. Bot.*, **45**, : 497-503 (1994).
22. H. Ruckebrod, *Planta*, **46**, 19-45 (1955).
23. E. Putievski, U. Ravid et S. Z. Husain, *Difference in the yield of plant material, essential oils and their main components during the life cycle of Origanum vulgare L.*, Essential oils and aromatic plants : proceedings of the 15th International Symposium on Essential Oils, held in Noordwijkerhout, The Netherlands, July 19-21, 1984, Edited by A. Baerheim Svendsen and J. J. C. Scheffer, p. 185-231 (1985).
24. M. S. Karawya and M. S. Hifnawy, *J. Assoc. Official Anal. Chem.*, **57**(4), 997-1001 (1974).

25. T. S. C. Li, *Medicinal plants : culture, utilization, and phytopharmacology*, Lancaster, Technomic Pub. Co., 517 p. 2000.
26. A. Lavola, R. Julkunen-Tiitto, T. M. De la Rosa, T. Lehto et P. J. Aphalo, Pedro, *Physiologia plantarum*, **109**(3), 260-267 (2000).

Tableau 1. Comparaison de la concentration en alantolactone et isoalantolactone (mg/g dw) chez les plantes cultivées sous des conditions hydroponique et en champ chez *Inula helenium*

Conditions de culture**	[alantolactone] (mg/g dw)	[isoalantolactone] (mg/g dw)
Hydroponique	0,18 ± 0,1*	0,045 ± 0,04*
Champs	0,48 ± 0,07*	0,80 ± 0,3*

* Différence significative à P < 0,01

** Hydroponique = 59 jours de culture ; Champs = 92 jours de culture

Tableau 2. Distribution des concentrations en flavonoïdes (% (w/w) dw) dans les organes végétaux de *Achillea millefolium* cultivée sous des conditions hydroponiques et en champ

Organe végétal	Conditions de culture	Flavonoïdes totaux (% (w/w) dw)
Feuilles	Hydroponique	0,082 ± 0,007*
	Champs	0,26 ± 0,02*
Racines	Hydroponique	1,92 ± 0,1*
	Champs	0,51 ± 0,05*

* Différence significative à $P < 0,01$

** Hydroponique = 58 jours de culture ;
Champ = 123 jours de culture

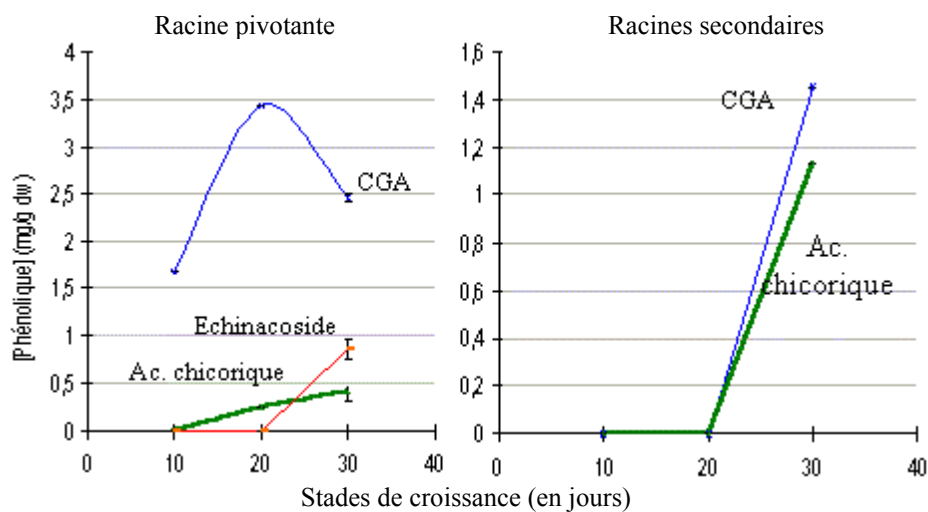


Figure 2. Variation de la concentration (mg/g dw) en acide chlorogénique (CGA), acide chicorique et échinacoside dans les racines, au cours de la croissance de *E. angustifolia*. L'acide caftarique n'était présente que dans les feuilles.

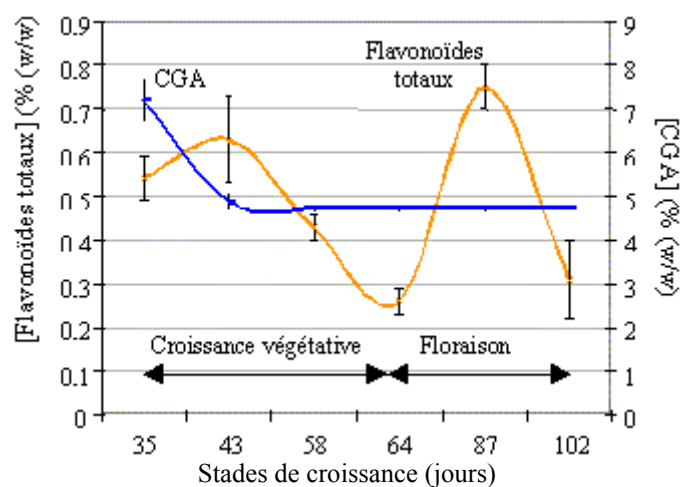


Figure 3. Variation de la concentration totale (% (w/w) dw) en flavonoïdes (apigénine, glycosides de l'apigénine, lutéoline) et en acide chlorogénique (CGA) dans la plante entière, au cours de la croissance de *A. millefolium*.

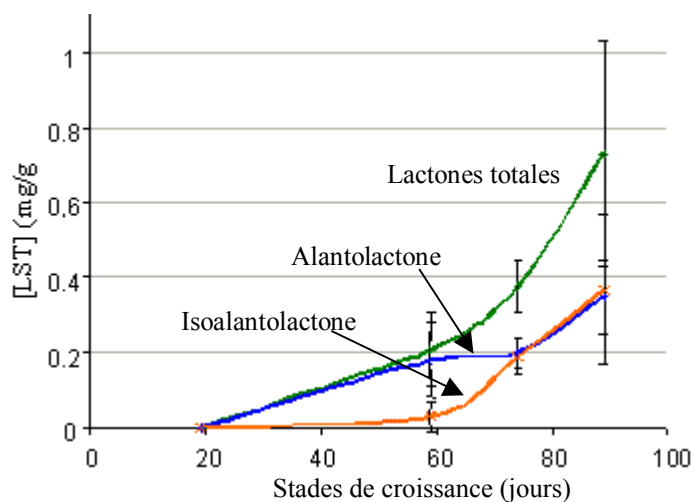


Figure 3. Variation de la concentration (mg/g dw) en lactones sesquiterpéniques (LST) totales, en alantolactone et en isoalantolactone dans la plante entière, pendant la croissance végétative de *I. helenium*

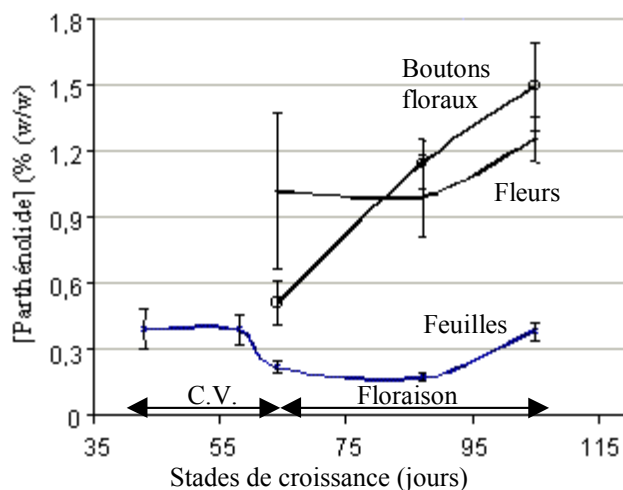


Figure 5. Variation de la concentration en parthénolide (% (w/w) dw) dans les organes végétaux, pendant la croissance *T. parthenium*. Les racines ne contenant que des traces de parthénolide. C.V. = Croissance végétative.

Tableau 3. Période de récolte et organes végétaux recommandés selon nos résultats et selon ceux de Thomas S. C. Li (2000) pour *Echinacea angustifolia*, *Achillea millefolium*, *Inula helenium* et *Tanacetum parthenium*

Espèce végétale	Période de récolte*	Organe	Période de récolte recommandée**
<i>E. angustifolia</i>	Plantes matures	Racines	Racines, après 3 ans
<i>A. millefolium</i>	Période de floraison	Fleurs et racines	Feuilles et fleurs, tard dans l'été
<i>I. helenium</i>	Plantes matures	Racines	Après 2 ou 3 ans
<i>T. parthenium</i>	Milieu et fin de la floraison	Fleurs, boutons floraux	À la floraison

* Selon nos résultats

** Selon Thomas S. C. Li, 2001