

**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique**



Université du 20 Août 1955 Skikda

Faculté des sciences

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Thèse

En Vue de l'Obtention du Diplôme de Doctorat (LMD)

Domaine : SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

Filière : SCIENCES BIOLOGIQUES

Spécialité : BIOCHIMIE APPLIQUEE

Intitulé

**Evaluation des effets protecteurs des
extraits de l'*Erodium guttatum* contre les
désordres physiopathologiques induits par
le propiconazole chez le rat Wistar**

Présentée par : OUNISSI Ismahan

Soutenue le 04/ 05/ 2025

Devant le Jury :

Président : Pr. Chekroud Zohra

Université de Skikda

Examineur : Pr. Cherif Abdennour

Université Annaba

Examinatrice : Pr. Boumendjel Amel

Université Annaba

Examineur : MCA. Boulkenafet Fouzi

Université de Skikda

Directrice de thèse : Pr. Slimani Souheila

Université de Skikda

Co-directrice de thèse : MCA. Belambri Sahra Amel

Université de Skikda

Année universitaire : 2024-2025

REMERCIEMENT

Avant toute chose, je rends grâce à Dieu Tout-Puissant, le Clément, le Miséricordieux, pour m'avoir accordé la santé, la force, la patience et l'inspiration nécessaires à l'accomplissement de ce travail. Que Sa lumière continue d'éclairer mon chemin. Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance au Pr. Chekroud Zohra, présidente du jury, pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant d'évaluer ce travail et pour l'attention qu'elle y a portée.

Mes sincères remerciements s'adressent également aux membres du jury : Pr. Cherif Abdennour, Pr. Boumendjel Amel et Dr. Boulkenafet Fouzi, pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail, leurs remarques constructives et la richesse de leurs commentaires, qui ont grandement contribué à l'amélioration de ce manuscrit.

Je remercie tout particulièrement ma directrice de thèse, Pr. Slimani Souheila, pour son encadrement rigoureux, sa disponibilité constante, ses conseils avisés et son soutien tout au long de cette recherche. Sa confiance m'a permis de progresser avec assurance dans ce travail scientifique.

Mes remerciements vont également à ma codirectrice, Dr Belambri Sahra Amel, pour son accompagnement attentif et ses encouragements bienveillants

Ma reconnaissance va également à toute l'équipe de laboratoire O5 du CRBT à Constantine, sous la direction de Monsieur Bensouici Chawki, pour leur accompagnement, leur soutien technique et humain.

Je remercie particulièrement Monsieur Menasria Taha et Monsieur Derbal Saïd, pour leurs aides, leurs patiences et leurs conseils avisés.

Je souhaite également exprimer toute ma gratitude à ma chère amie Bounaas Jihane, pour sa fidèle amitié, son soutien constant, sa gentillesse et sa présence inestimable à mes côtés tout au long de cette aventure.

À mes chers parents, pour leur amour inconditionnel, leurs prières, leurs sacrifices et leur confiance en moi. À mes frères et sœurs, pour leur soutien moral, leur affection et leur encouragement indéfectible, sans eux, rien de tout cela n'aurait été possible.

Enfin, je remercie tous mes amis, proches ou lointains, qui, par leurs encouragements, leur compréhension et leur soutien moral, ont su illuminer les moments difficiles et partager les instants de joie.

RESUME

Notre étude a pour objectif d'évaluer les éventuels effets protecteurs des extraits de la partie aérienne d'*Erodium guttatum* (*E. guttatum*) contre les désordres physiopathologiques induits par le propiconazole (PCZ) chez les rats albinos Wistar. La première étape a consisté en une analyse phytochimique approfondie par LC/MS/MS ainsi qu'en l'évaluation des propriétés biologiques des extraits incluant l'exploration de l'activité antioxydante, anti-enzymatique, antimicrobienne, photoprotectrice, analgésique et anti-inflammatoire. Pour cela, six extraits (extrait hydrométhanolique (EHm), hydroéthanolique (EHe), hexanique (EH), chloroformique (Ech), d'acétate d'éthyle (EAe) et butanolique (EBu)) ont été identifiés et quantifiés. L'analyse phytochimique a mis en évidence une abondance de composés phénoliques et de flavonoïdes, particulièrement concentrés dans les extraits polaires. Les principaux composés phénoliques identifiés sont l'acide shikimique, l'acide gallique, l'isoquercitrine, l'hespéridine, la quercétine 3-xyloside et la lutéoline. Par ailleurs, ces six extraits possèdent une capacité antioxydante élevée avec une performance aux extraits polaires. Ainsi, l'extrait EHe a également montré une bonne activité inhibitrice contre la Butyrylcholinestérase (BChE), une inhibition modérée contre l'alpha-amylase, une forte activité photoprotectrice et des propriétés antimicrobiennes, une activité analgésique et a également un effet anti-inflammatoire. La deuxième étape visait à évaluer l'effet détoxifiant des extraits EHe et EBU contre la toxicité induite par PCZ. Pour cela, 42 rats Wistar mâles ont été répartis en six groupes : un groupe contrôle (C), un groupe recevant le PCZ (50 mg/kg/pc), deux groupes traités respectivement par EHe (75 mg/kg/pc) et EBU (100 mg/kg/pc), et deux groupes combinés (EHe + PCZ et EBU + PCZ) avec l'évaluation de l'état clinique et du poids corporel. Après 60 jours, les paramètres biologiques (hématologiques, hépatiques, rénaux et reproductifs) et le poids corporel ont été évalués. Le dosage des marqueurs biochimiques a révélé que l'exposition au PCZ a induit une augmentation hautement significative ($p < 0,001$ et $p < 0,01$) des enzymes hépatiques (ALAT, ASAT et PAL), du Glu, du cholestérol total, des triglycérides, du LDL, de la bilirubine, de la TSH, des paramètres rénaux (urée, créatinine) ainsi que du poids absolu et relatif du foie et des reins. Parallèlement, une diminution significative a été observée dans les taux de protéines totales ($p < 0,001$), d'albumine ($p < 0,05$), d'acide urique ($P < 0,001$), de testostérone ($p < 0,001$), de FT4 ($p < 0,001$), de la concentration des spermatozoïdes ($p < 0,05$) ainsi que dans le poids absolu et relatif des testicules ($p < 0,01$). Le PCZ a entraîné une leucocytose sans affecter les autres paramètres hématologiques, ainsi que des altérations histopathologiques dans les organes cibles. Les traitements préalables par les extraits EHe ou EBU d'*E. guttatum* ont

significativement atténué les effets toxiques du PCZ sur les poids d'organes, les paramètres biochimiques, enzymatiques, hormonaux et les lésions tissulaires. Par ailleurs, une analyse de docking a révélé que les composés majeurs de la plante, notamment l'isoquercitrine interagissent efficacement avec le récepteur PXR. Ces résultats confirment le rôle protecteur des extraits d'*E. guttatum* contre la toxicité induite par le PCZ, en lien avec leurs propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et leur richesse en composés phénoliques.

Mots clés : حشيشة كل بليّة, *Erodium guttatum*, Etude phytochimique, Activités biologiques *in vitro* et *in vivo*, Propiconazole, Désordres physiopathologiques, Test *in silico*.

Abstract

Our study aimed to evaluate the potential protective effects of extracts from the aerial part of *Erodium guttatum* (*E. guttatum*) against propiconazole (PCZ)-induced pathophysiological disorders in albino Wistar rats. The first step involved an in-depth phytochemical analysis using LC/MS/MS, along with the evaluation of the biological properties of the extracts, including their antioxidant, anti-enzymatic, antimicrobial, photoprotective, analgesic, and anti-inflammatory activities. To this end, six extracts (hydromethanolic (EHm), hydroethanolic (EHe), hexanic (EH), chloroform (Ech), ethyl acetate (EAe) and butanolic (EBu)) were identified and quantified. Phytochemical analysis revealed an abundance of phenolic compounds and flavonoids, particularly concentrated in polar extracts. The main phenolic compounds identified were shikimic acid, gallic acid, isoquercitrin, hesperidin, quercetin 3-xyloside and luteolin. In addition, all six extracts have a high antioxidant capacity, with polar extracts performing particularly well. Thus, the EHe extract also showed good inhibitory activity against Butyrylcholinesterase (BChE), moderate inhibition against alpha-amylase, strong photoprotective activity, antimicrobial properties, analgesic activity, and an anti-inflammatory effect. The second step was to evaluate the detoxifying effect of EHe and EBU extracts against PCZ-induced toxicity. To this end, 42 male Wistar rats were divided into six groups: a control group (C), a group receiving PCZ (50 mg/kg/bw), two groups treated respectively with EHe (75 mg/kg/pc) and EBU (100 mg/kg/bw), and two combined groups (EHe + PCZ and EBU + PCZ) with assessment of clinical status and body weight. After 60 days, biological parameters (hematological, hepatic, renal and reproductive) as well as changes in body weight were assessed. Biochemical marker assays revealed that exposure to PCZ resulted in a highly significant increase ($p < 0.001$ and $p < 0.01$) in liver enzymes (ALT, AST and ALP), Glu, total cholesterol, triglycerides, LDL, bilirubin, TSH, renal parameters (urea, creatinine) as well as absolute and relative liver and kidney weights. At the same time, a significant decrease was observed in total protein ($p < 0.001$), albumin ($p < 0.05$), uric acid ($P < 0.001$), testosterone ($p < 0.001$), FT4 ($p < 0.001$), sperm concentration ($p < 0.05$) and absolute and relative testicular weight ($p < 0.01$). PCZ induced leukocytosis without affecting other hematological parameters, as well as histopathological alterations in the target organs. Pretreatment with EHe or EBU extracts of *E. guttatum* significantly attenuated the toxic effects of PCZ on organ weights, biochemical, enzymatic and hormonal parameters, and tissue damage. Furthermore, a docking analysis revealed that the plant's major compounds, notably isoquercitrin, interact effectively with the PXR receptor. These results confirm the protective role of *E. guttatum* extracts against

PCZ-induced toxicity, linked to their antioxidant and anti-inflammatory properties and their richness in phenolic compounds.

Keywords: حشيشة كل بليّة, *Erodium guttatum*, Phytochemical study, *in vitro* and *in vivo* biological activities, Propiconazole, Pathophysiological disorders, *In silico* test.

.

المخلص

كان الهدف من دراستنا هو تقييم الآثار الوقائية المحتملة لمستخلصات الجزء الهوائي من نبات *Erodium guttatum* ضد الاضطرابات الفيزيولوجية المرضية التي يسببها البروبيكونازول (PCZ) في جردان ويستار البيضاء. تضمنت المرحلة الأولى تحليلاً كيميائياً نباتياً متعمقاً بواسطة LC/ MS/ MS وتقيماً للخصائص البيولوجية للمستخلصات، بما في ذلك استكشاف نشاطها المضاد للأوكسدة، والمضاد للإنزيمات، والمضاد للميكروبات، والواقى من الضوء، والمسكن للألام، والمضاد للالتهابات. لهذا، تم تحديد وتحليل ست مستخلصات (مستخلص هيدرو-ميثانولي (EHm)، هيدرو-إيثانولي (EHe)، هكسان (EH)، كلوروفورم (Ech)، أسيتات الإيثيل (EAe)، والبيوتانول (EBu)). أظهر التحليل الكيميائي النباتي وفرة من المركبات الفينولية والفلافونويدية، تتركز بشكل خاص في المستخلصات القطبية. المركبات الفينولية الرئيسية التي تم تحديدها هي حمض شيكيمييك، حمض الغاليك، وإيزوكيرسيتين، والهيسبيردين، وكيرسيتين 3-زيلوسيد، واللوتولين. وبالإضافة إلى ذلك، تتمتع هذه المستخلصات الستة بقدرة عالية مضادة للأوكسدة، حيث كان أداء المستخلصات القطبية جيداً بشكل خاص. وأظهر مستخلص EHe أيضاً نشاطاً مثبطاً جيداً ضد إنزيم البوتيريل كولينستيراز (BChE)، وتثبيطاً معتدلاً ضد إنزيم ألفا-أميلاز، ونشاطاً قوياً للحماية الضوئية وخصائص مضادة للميكروبات، ونشاطاً مسكناً وتأثيراً مضاداً للالتهابات. هدفت المرحلة الثانية إلى تقييم التأثير المزيل للسموم لمستخلصات EHe وEBu ضد السمية الناجمة عن PCZ. وللقيام بذلك، تم تقسيم 42 من ذكور جردان ويستار إلى ست مجموعات: مجموعة ضابطة (C)، ومجموعة تتلقى PCZ وحده (50 ملغم/كغم/ من وزن الجسم)، ومجموعتان عولجتا على التوالي ب EHe (75 ملغم/كغم/ من وزن الجسم) وEBu (100 ملغم/كغم/ من وزن الجسم)، ومجموعتان مجتمعتان (EHe + PCZ وEBu + PCZ) مع تقييم الحالة السريرية ووزن الجسم. بعد 60 يوماً، تم تقييم البارامترات البيولوجية (الدموية والكبدية والكلوية والتناسلية)، إلى جانب التغيرات في وزن الجسم. كشفت فحوصات العلامات البيوكيميائية الحيوية أن التعرض ل PCZ أدى إلى زيادة كبيرة للغاية ($p > 0.001$) في إنزيمات الكبد (ALAT، ASAT وPAL)، سكر الدم، الكوليسترول الكلي، الدهون الثلاثية، LDL، البيليروبين، TSH، وكذلك المعلمات الكلوية (اليوريا، الكرياتينين) والأوزان المطلقة والنسبية للكبد والكلى. في الوقت نفسه، لوحظ انخفاض كبير في تركيزات البروتين الكلي ($p > 0.001$)، والألبومين ($p > 0.05$)، والتستوستيرون ($p > 0.001$) و FT4 ($p > 0.001$) وتركيز الحيوانات المنوية ($P > 0.05$)، وكذلك في الوزن المطلق والنسبي للخصيتين ($p > 0.01$). وقد أدى PCZ إلى زيادة عدد الكريات البيضاء دون التأثير على البارامترات الدموية الأخرى، وكذلك إلى تغيرات نسيجية في الأعضاء المستهدفة. حيث أن المعالجة المسبقة بمستخلصات EHe أو EBu من نبات *E. guttatum*، خففت بشكل ملحوظ من التأثيرات السمية لـ PCZ على أوزان الأعضاء والمعايير الكيميائية الحيوية والإنزيمية والهرمونية و التغيرات النسيجية. وبالإضافة إلى ذلك، كشف تحليل الالتحام الجزيئي أن المركبات الرئيسية للنبات، ولا سيما الإيزوكيرسيتين، ترتبط بفعالية بمستقبل PXR. تؤكد هذه النتائج الدور الوقائي لمستخلصات نبات *E. guttatum* ضد السمية الناجمة عن PCZ، والمرتبطة بخصائصها المضادة للأوكسدة والمضادة للالتهابات وغناها بالمركبات الفينولية.

الكلمات المفتاحية: حشيشة كل بلية، *Erodium guttatum*، دراسة فيتو كيميائية، تقييم للأنشطة البيولوجية *in vitro* و *in vivo*، بروبيكونازول، الاضطرابات الفيزيولوجية المرضية، اختبار *in silico*.

LISTES DES FIGURES

Figure 1. Photographie de l'espèce <i>Erodium guttatum</i> , prise en avril 2021 à Boulhilat.....	4
Figure 2. Action des fongicides azolés sur la membrane fongique (Aghaze Taleem, 2021). 14	14
Figure 3. Structure chimique des stéréoisomères du propiconazole (Pan <i>et al.</i> , 2018).....	14
Figure 4. Représentation graphique résume les étapes de l'étude phytochimique et les activités biologiques <i>in vitro</i> des extraits d' <i>E. guttatum</i>	19
Figure 5. Carte géographique du site de collecte de la plante dans la région de Boulhilat à la wilaya de Batna	20
Figure 6. Les activités biologiques <i>in vivo</i> et les différentes étapes du protocole expérimental de l'étude du pouvoir protecteur des extraits d' <i>E. guttatum</i> contre la toxicité du propiconazole	29
Figure 7. Droite d'étalonnage des absorbances relatives en fonction des concentrations de quercétine (A) et d'acide gallique (B)	40
Figure 8. Spectre chromatographique de l'EBu d' <i>E. guttatum</i>	47
Figure 9. Spectre chromatographique de l'EHe d' <i>E. guttatum</i>	47
Figure 10. Spectre chromatographique de l'ECh d' <i>E. guttatum</i>	48
Figure 11. Chromatogramme GC/MS de l'extrait de n-hexane d' <i>E. guttatum</i>	49
Figure 12. Essai de piégeage de DPPH par les extraits polaires d' <i>E. guttatum</i>	52
Figure 13. Essai de piégeage de DPPH par les extraits non polaires d' <i>E. guttatum</i>	52
Figure 14. Essai de piégeage du radical ABTS• ⁺ par les extraits de la plante <i>E. guttatum</i>	52
Figure 15. Test du pouvoir réducteur des extraits d' <i>Erodium guttatum</i>	53
Figure 16. Test à la Phénanthroline pour les extraits d' <i>Erodium guttatum</i>	53
Figure 17. Test SNP pour les extraits d' <i>Erodium guttatum</i>	53
Figure 18. Comparaison de l'effet analgésique de l'EHe d' <i>E. guttatum</i> , de l'aspirine et du gel de Voltarène chez les rats.....	60
Figure 19. Pourcentage d'inhibition de l'œdème pour les deux doses de l'EHe d' <i>E. guttatum</i> (200 et 400 mg/kg) et du diclofénac chez les souris.	63
Figure 20. Structure histologique des pattes de souris après injection sous-plantaire de formol à 10 % et le traitement par les deux doses de l'EHe et le Diclofénac.	64
Figure 21. Photomicrographies de tissu de la rate des rats expérimentaux, colorées avec H&E, 10×.....	69
Figure 22. Effet du PCZ et des extraits d' <i>E. guttatum</i> sur le poids absolu (A) et relatif du foie (B) de rats après huit semaines de traitement.	71

Figure 23. Effet du PCZ et des extraits d' <i>E. guttatum</i> sur les paramètres hépatiques des rats après huit semaines de traitement.....	77
Figure 24. Photomicrographies de tissus hépatiques des tars de tous les groupes expérimentaux, colorés au H&E, 10×.....	79
Figure 25. Effet du PCZ et des extraits d' <i>E. guttatum</i> sur le poids absolu (A) et relatif des reins (B) de rats après huit semaines de traitement.....	81
Figure 26. Effet du PCZ et des extraits d' <i>E. guttatum</i> sur les paramètres rénaux des rats après huit semaines de traitement.....	84
Figure 27. Photomicrographies de tissus rénaux des rats de tous les groupes expérimentaux, colorés au H&E, 40×.....	85
Figure 28. Effet du PCZ et des extraits d' <i>E. guttatum</i> sur le profil lipidique chez les rats après huit semaines de traitement.....	89
Figure 29. Effet du PCZ et des extraits d' <i>E. guttatum</i> sur le poids absolu (A) et relatif (B) des testicules de rats après huit semaines de traitement.....	91
Figure 30. Effet du PCZ et des extraits d' <i>Erodium guttatum</i> sur les dosages hormonaux et la concentration des spermatozoïdes chez les rats après huit semaines de traitement.....	98
Figure 31. Photomicrographies de tissu testiculaire, colorées avec H&E, 40×	100
Figure 32. Pose de re-docking du ligand co-cristallisé	102
Figure 33. 3D et 2D de l'ancrage du fongicide propiconazole dans le récepteur PXR (PDB : 5A86).....	102
Figure 34. 3D et 2D de la position d'ancrage de l'isoquercitrine dans le récepteur PXR (PDB : 5A86).....	103
Figure 35. 3D et 2D de l'ancrage quercétine 3-xyloside dans le récepteur PXR (PDB : 5A86).....	104

LISTES DES TABLEAUX

Tableau 1. Classification de la plante <i>Erodium guttatum</i>	4
Tableau 2. Les propriétés physicochimiques du propiconazole (Roman et al., 2021).....	12
Tableau 3. Relation entre l'effet érythémogène et l'intensité du rayonnement à chaque longueur d'onde (Mansur et al., 1986).....	28
Tableau 4. Plan de répartition et de traitement des rats avec le propiconazole et les extraits d' <i>Erodium guttatum</i> sur une période expérimentale de 60 jours.	32
Tableau 5. Rendement et teneur en polyphénols et flavonoïdes totaux des différents extraits des parties aériennes d' <i>E. guttatum</i>	40
Tableau 6. Profil phytochimique déterminé par LC-MS-MS de l'Ech, EHe et EBu de la partie aérienne d' <i>E. guttatum</i>	44
Tableau 7. Profil des acides gras par GC/MS de l'extrait n-hexane.....	48
Tableau 8. Activité antioxydante des extraits d' <i>Erodium guttatum</i> par des tests : DPPH, ABTS, pouvoir réducteur (FRAP), Phénanthroline et nanoparticules d'argent (SNP).....	51
Tableau 9. Analyse de corrélation entre les composés phénoliques et l'activité antioxydante des extraits d' <i>E. guttatum</i>	54
Tableau 10. Activités anti-enzymatiques in vitro : inhibition des enzymes cholinestérase et α -amylase.....	56
Tableau 11. Valeur du SPF de l'EHe de la partie aérienne d' <i>E. guttatum</i>	57
Tableau 12. Comparaison entre l'activité photoprotectrice de l'EHe d' <i>E. guttatum</i> et des standards.....	57
Tableau 13. CMI de l'EHe de la partie aérienne d' <i>E. guttatum</i> sur la croissance de huit <i>microorganismes</i>	59
Tableau 14. L'effet de l'EHe et des médicaments sur la latence du retrait de la queue de l'eau chaude.....	60
Tableau 15. L'effet anti-inflammatoire de l'EHe d' <i>E. guttatum</i> et les standards chez les souris.	63
Tableau 16. Variation du poids corporel des rats albinos mâles dans tous les groupes expérimentaux pendant 60 jours.	66
Tableau 17. Effet du fongicide PCZ et des extraits d' <i>E. guttatum</i> sur les paramètres hématologiques.....	68
Tableau 18. Modification du poids absolu et relatif du foie des rats albinos mâles dans tous les groupes expérimentaux après 60 jours de traitement.	71

Tableau 19. Effet du fongicide PCZ et les extraits d' <i>E. guttatum</i> sur les enzymes hépatiques (ALAT, ASAT, PAL), la bilirubine, l'albumine et les protéines totales chez les rats mâles après 8 semaines de traitement.	76
Tableau 20. Modification du poids absolu et relatif des reins des rats albinos mâles dans tous les groupes expérimentaux après 60 jours de traitement.....	81
Tableau 21. Effet du fongicide PCZ et des extraits d' <i>E. guttatum</i> sur les paramètres rénaux chez les rats mâles après 8 semaines de traitement.	83
Tableau 22. Effet du fongicide PCZ et des extraits d' <i>E. guttatum</i> sur les paramètres lipidiques sériques chez les rats mâles après 8 semaines de traitement.	88
Tableau 23. Variation de la masse absolue et relative des testicules et de l'épididyme chez tous les groupes expérimentaux après 60 jours de traitement.....	91
Tableau 24. Effet du fongicide PCZ et des extraits d' <i>E. guttatum</i> sur les paramètres hormonaux et la concentration des spermatozoïdes chez les rats de tous les groupes expérimentaux après 8 semaines de traitement	97
Tableau 25. Score d'amarrage du propiconazole, des molécules identifiées dans les extraits d' <i>E. guttatum</i> et du ligand co-cristallisé après l'étude d'amarrage.	105

LISTES DES ABREVIATIONS

- AGMI** : Acides gras monoinsaturés
- L'AChE** : Acétylcholinestérase
- ALAT** : Alanine Aminotransférase
- ASAT** : Aspartate Aminotransférase
- Bax** : Protéine X associée à Bcl-2
- Bcl-2** : Lymphome des cellules B 2
- BPA** : Bisphénol A
- BChE** : Butyrylcholinestérase
- CAR** : Le récepteur constitutif des androstanes
- CCL4** : Tétrachlorure de carbone
- CGMH** : Concentration globulaire moyenne en hémoglobine
- COX-2** : Cyclo-oxygénase-2
- PNEC** : Concentration prédite sans effet
- CYP** : Cytochromes P450
- DL₅₀** : Dose Létale 50
- EFSA** : Autorité européenne de sécurité des aliments
- FAO** : Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture
- FSH** : Hormone Folliculostimulante
- IL-1 β** : L'interleukine 1 bêta
- GABA** : Acide γ -aminobutyrique
- GB** : Globules blancs
- GR** : Globules rouges
- GSH** : Glutathion
- GSH-PX** : Glutathion peroxydase
- HSD3B** : 3β -hydroxystéroïde déshydrogénase.
- HCT** : Hématocrite
- HPG** : Hypothalamo-hypophyso-gonadique
- IL-1 β** : L'interleukine 1 bêta
- iNOS** : Oxyde nitrique synthase inductible
- ISP C** : Voie de biosynthèse des isoprénoïdes
- LDH** : Le lactate déshydrogénase
- LH** : Hormone lutéinisante

LPS : Lipopolysaccharides

MAO : Monoamine Oxydase

MAPK : Protéine kinase activée par les mitogènes

MDH : La malate déshydrogénase

MMP : Métalloprotéinases

NF- κ B : Facteur nucléaire kappa B

NLRP3 : Famille de récepteurs de type NOD, contenant 3 domaines pyrine

NO : Monoxyde d'azote.

OMS : Organisation mondiale de la santé

PAL : Phosphatase alcaline

PGEs : Les prostaglandines PGEs

PLQ : Nombre total de plaquettes

PNEC : Concentration Prévisible Sans Effet

PNUE : Programme des Nations unies pour l'environnement

PPAR α : Le récepteur alpha activé par les proliférateurs de peroxysomes

PCZ : Propiconazole

PXR : Le récepteur X de la prégnane

RA: L'acide rétinoïque

RNS: Espèces d'azote réactives

ROS: Espèces réactives de l'oxygène

SOD : Superoxyde dismutase

STAR : Signifie Protéine Régulatrice Aiguë de la Stéroïdogénèse

TCDD : 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine.

TCMH : Teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine

TNF- α : Le facteur de nécrose tumorale alpha

T3 : Triiodothyronine

T4 : Thyroxine

TSH : Hormone thyroestimuline

TTR : Transthyrétine

VGM : Volume globulaire moyen

Remerciement

Résumés

Listes des Figures

Listes des Tableaux

Listes des abréviations

Sommaire

Introduction générale..... 1

CHAPITRE I. Revu bibliographique

Partie 1. *Erodium guttatum*

1. Famille Geraniaceae..... 3

2. Genre *Erodium*..... 3

3. *Erodium guttatum* 3

3.1. Description botanique 3

3.2. Classification taxonomique..... 4

3.4. Usage en médecine traditionnelle..... 5

3.5. Composition phytochimique..... 5

3.5.1 Composés phénoliques 5

A) Acides phénoliques 5

B) Flavonoïdes 5

C) Tannins 6

3.5.2. Composés organiques volatils..... 6

3.6. Activités biologiques..... 7

3.6.1. Activité antioxydante 7

3.6.2. Activité antiinflammatoire..... 7

3.6.3 Activité antimicrobienne..... 8

3.6.4. Activité antivirale 8

3.6.5. Activité antiparasitaire 8

3.6.6. Activité antidiabétique 9

3.6.7. Activité neuroprotectrice 9

3.6.8. Activité antiproliférative et cytotoxique 9

Partie 2. Propiconazole

1. Pesticides	11
2. Fongicides.....	11
3. Conazoles.....	11
4. Triazoles	11
5. Propiconazole.....	12
5.1. Propriétés physicochimiques du propiconazole.....	12
5.2. Mode d'action	13
5.4. Toxicocinétique du propiconazole.....	15
5.5. Toxicodynamique du propiconazole	16
A) Hépatotoxicité.....	16
B) Reprotoxicité.....	17
C) Neurotoxicité.....	17

CHAPITRE II. Matériel et méthodes

1. Etude phytochimique	19
1.1. Matériel végétal	20
1.2. Préparation des extraits.....	20
A) Extraction assistée par ultrasons et fractionnement	20
B) Macération	21
1.3. Quantification des polyphénols et flavonoïdes totaux	21
1.3.1. Dosage des polyphénols totaux (TPC)	21
1.3.2. Dosages des flavonoïdes totaux (TFC).....	22
1.4. Identification des composés phytochimiques par électro spray-spectrométrie de masse (LC-ESI-MS/MS).....	22
1.5. Identification des composés phytochimiques par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS)	23
2. Evaluation des activités biologiques <i>in vitro</i>	23
2.1. Activités antioxydantes	23
2.1.1. Activité anti-radicalaire du radical DPPH.....	24
2.1.2. Activité anti-radicalaire de l'ABTS•+.....	24
2.1.3. Test du pouvoir réducteur ferrique antioxydant (FRAP).....	25
2.1.4. Test de la réduction des nanoparticules d'argent (Ag+)	26
2.1.5. Test de la Phénanthroline	26
2.2. Tests d'inhibition enzymatiques.....	26
2.2.1. Activité inhibitrice de l'alpha-amylase	26
2.2.2. Activité anticholinestérasique.....	27

2.3. Evaluation de l'effet photoprotecteur	27
2.4. Activité antimicrobienne.....	28
3. Evaluation des activités biologiques <i>In Vivo</i>	29
3.1 Animaux et conditions d'élevage.....	30
3.2. Activité analgésique (méthode d'immersion de la queue).....	30
3.3. Activité anti-inflammatoire	30
3.4. Evaluation du pouvoir protecteur des extraits <i>E. guttatum</i> contre la toxicité du propiconazole.....	31
3.4.1. Protocol expérimental	31
3.4.2. Suivi de l'état clinique et du poids corporel des rats	32
3.4.3. Sacrifice des rats et prélèvement des échantillons	32
3.4.4. Dosage.....	33
A) Détermination des paramètres hématologiques	33
B). Détermination des paramètres biochimiques	33
C). Dosages des hormones	35
3.4.5. Concentration des spermatozoïdes.....	35
3.4.6. Etude anatomopathologique.....	36
4. Etude d'amarrage moléculaire.....	37
5. Analyse statistiques	38

CHAPITRE III. Résultats et discussion

1. Etude phytochimique	39
1.1. Evaluation des rendements d'extraits	39
1.2. Teneur totale en composés phénoliques et flavonoïdes	39
1.3. Identification des constituants phytochimiques des extraits par LC-MS/MS	41
1.4. Identification des composés apolaires de l'extrait hexanique par GC/MS	48
2. Evaluation des activités biologiques <i>In vitro</i>	49
2.1 Activité antioxydante	49
2.2. Corrélations entre les teneurs en composés phénoliques totaux et en flavonoïdes et les capacités antioxydantes.....	54
2.3. Tests d'inhibition enzymatiques.....	55
2.3.1. Activité inhibitrice de l'alpha-amylase	55
2.3.2. Activité anticholinestérasique.....	55
2.4. Evaluation de l'effet photoprotecteur	56
2.5. Activité antimicrobienne.....	58
3. Activités biologiques <i>In vivo</i>	59

3.1. Activité analgésique (méthode d'immersion de la queue).....	59
3.2. Activité anti-inflammatoire et étude histologique	61
3.3. Evaluation de l'effet protecteur d' <i>E. guttatum</i> contre la toxicité induite par le propiconazole	65
3.3.1. Suivi de l'état clinique des animaux.....	65
3.3.2. Variation de la masse corporelle des rats.....	66
3.3.3. Variation des paramètres hématologiques suite à la toxicité du propiconazole et l'action protectrice des extraits d' <i>E. guttatum</i>	67
3.3.3.1. Variation des paramètres hématologiques	67
3.3.3.2. Etude histopathologique de la rate	68
3.3.4. Evaluation de l'effet hépatoprotecteur des extraits d' <i>E. guttatum</i> suite à une intoxication par le propiconazole chez les rats Wistar.....	69
3.3.4.1. Variation de la masse absolue et relative du foie	70
3.3.4.2. Variation des paramètres enzymatiques et biochimiques.....	71
3.3.4.3. Etude anatomo-histopathologique du foie	78
3.3.5. Evaluation de l'effet néphroprotecteur des extraits d' <i>E. guttatum</i> suite à une intoxication par le propiconazole chez les rats Wistar.....	80
3.3.5.1. Variation de la masse absolue et relative des reins.....	80
3.3.5.2. Evaluation des paramètres biochimiques liés à la fonction rénale	82
3.3.5.3. L'histopathologie des tissus rénaux	84
3.3.6. Effets du propiconazole sur le profil lipidique et l'action protectrice des extraits d' <i>E. guttatum</i>	86
3.3.7. Effets du propiconazole sur la fonction reproductive et l'action protectrice des extraits d' <i>E. guttatum</i>	89
3.3.7.1. Variation de la masse absolue et relative des testicules et des épидидymes	90
3.3.7.2. Variation des taux des hormones	91
3.3.7.3. Etude anatomo-histopathologique du tissu testiculaire.....	99
4. Étude de docking moléculaire sur le récepteur X de la prégnane (PXR)	101
Conclusion et perspectives.....	106
Références bibliographiques	109
Production scientifique	

Introduction

générale

Introduction générale

La demande mondiale en pesticides a considérablement augmenté du fait qu'ils ont contribué à l'augmentation des rendements agricoles en minimisant les pertes dues aux fléaux, renforçant ainsi la sécurité alimentaire en garantissant la quantité et la qualité des récoltes. Toutefois, l'utilisation excessive et incontrôlée des pesticides a conduit à leur accumulation dans les chaînes alimentaires et dans l'environnement (air, sol et eaux), entraînant ainsi une contamination de l'environnement (**Ahmad et al., 2024**). La diffusion des pesticides dans l'environnement a rendu inévitable l'exposition de l'homme à ces substances au fil du temps. Selon les données de l'Organisation mondiale de la santé (**OMS**) et du Programme des Nations Unies pour l'Environnement (**PNUE**), environ trois millions de personnes dans le monde sont intoxiquées et 200 000 meurent à cause de l'exposition aux pesticides, principalement dans les pays en développement (**Yadav et al., 2015**).

L'un des mécanismes communs de la toxicité des pesticides est l'induction du stress oxydatif, qui génère des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (ROS et RNS) dans différents types de cellules et modèles animaux, induisant un déséquilibre entre les oxydants et les antioxydants, ce qui réduit les niveaux d'antioxydants et leur capacité à protéger les cellules des dommages oxydatifs (**Sule et al., 2022**). Ce déséquilibre peut également affecter les protéines, les lipides et les acides nucléiques, entraînant des modifications et altérations dans les voies de signalisation cellulaire. Les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote et le stress oxydatif exercent des effets à long terme sur la santé, allant de la toxicité aiguë aux maladies chroniques, telles que divers types de cancer, les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives, le diabète, l'infertilité, les malformations congénitales et les troubles de la reproduction (**Sule et al., 2022 ; Ahmad et al., 2024**).

Ainsi, la nécessité de trouver des moyens et des solutions efficaces pour réduire les effets nocifs des pesticides est devenue incontournable. Le recours à la nature et la recherche d'antioxydants naturels dans les plantes médicinales est l'une des méthodes sûres qui peuvent être utilisées pour prévenir ou réduire la toxicité des pesticides (**Jabłońska – Trypuć & Wiater, 2022**). Les plantes médicinales peuvent être considérées comme un réservoir majeur de nombreux composés phytochimiques tels que les polyphénols, les terpénoïdes, les stéroïdes, les saponines et les alcaloïdes qui sont des antioxydants naturels caractérisés par leurs capacités à piéger les radicaux libres et atténuer le stress oxydatif causé par les polluants environnementaux, et peuvent exercer un effet protecteur contre l'apparition de maladies

chroniques associées au stress oxydatif grâce à leurs puissantes propriétés biologiques : antioxydantes, anti-inflammatoires, anticancéreux, antidiabétiques, neuroprotecteurs et cardiovasculaires, de sorte qu'ils peuvent être considérés comme des matériaux chimiques préventifs (Jabłońska – Trypuć & Wiater, 2022; Muscolo *et al.*, 2024).

L'*Erodium guttatum* est une plante médicinale à fleurs que l'on trouve dans la région méditerranéenne, en particulier en Afrique du Nord et dans certaines parties de l'Europe (Mrabti *et al.*, 2021). Elle est connue pour ses utilisations traditionnelles dans le traitement du diabète, pour soulager les problèmes digestifs tels que la constipation et l'indigestion, les infections des voies urinaires, et pour traiter les troubles cutanés tels que l'eczéma et les plaies (Benrahou *et al.*, 2022a) Des recherches ont montré qu'*E. guttatum* contient des composés bioactifs, tels que des polyphénols, des flavonoïdes et des tanins, qui jouent un rôle clé dans ses propriétés biologiques et pharmacologiques très intéressantes tant que des agents antioxydants, antibactériens, anti-inflammatoires et antidiabétiques. La recherche a également rapporté que la plante est riche en minéraux essentiels tels que le calcium, le fer, le magnésium, le phosphore, le potassium, le zinc et le sodium, qui jouent un rôle vital dans divers processus physiologiques cellulaires (Hamza *et al.*, 2018; Mrabti *et al.*, 2021; Benrahou, *et al.*, 2022a ; Benrahou *et al.*, 2022b; Gadhoumi *et al.*, 2021, 2024).

Malgré la richesse de cette plante en composés phytochimiques, peu d'études ont été rapportées sur ses activités biologiques. C'est pourquoi l'objectif de cette étude est d'explorer le potentiel pharmacologique et protecteur des extraits des parties aériennes d'*Erodium guttatum*.

Cette étude renferme deux parties, à savoir :

La première partie de ce travail consiste en une revue de la littérature qui comprend une analyse botanique de la plante médicinale étudiée, mettant en évidence ses propriétés biologiques et pharmacologiques, ses effets thérapeutiques et ses principaux composants bioactifs.

Cette partie comprend également une revue des informations de base sur le fongicide utilisé dans cette étude, ses mécanismes de toxicité et ses effets sur la santé de différents organismes.

Une deuxième partie expérimentale renfermant les travaux suivants :

- Étude phytochimique de la partie aérienne de la plante *E. guttatum*.
 - Caractérisation phytochimique
 - Activités biologiques *in vivo* et *in vitro*
- Evaluation des effets toxiques de propiconazole et des effets protecteurs des extraits d'*E. guttatum* sur les fonctions vitales hépatiques, rénales et reproductives chez les rats albinos Wistar.

CHAPITRE I

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Famille Geraniaceae

Les Geraniaceae, une petite famille de plantes à fleurs dicotylédones, sont classées dans l'ordre des Géraniales et regroupent environ 830 espèces réparties dans 5 à 7 genres. Les plantes sont répertoriées comme des herbes ou des sous-arbrisseaux annuels ou pérennes. La principale caractéristique de la famille est son fruit en forme de bec, composé de cinq méricarpes disposés autour d'une colonne interne centrale. Pendant la maturation, cette colonne s'élargit, ressemblant au bec d'un héron ou d'une cigogne. Les principaux genres de cette famille comprennent *Géranium* (300 espèces), *Pélargonium* (250 espèces), *Erodium* (80 espèces) et *Monsonia* (25 espèces) (Graça *et al.*, 2016; Xu & Deng, 2017).

La majorité des espèces de la famille des Geraniaceae sont réparties dans le monde entier, principalement dans les zones tempérées, la région méditerranéenne et l'Afrique australe servant de principaux centres de diversité (Fiz *et al.*, 2008).

2. Genre *Erodium*

Le genre *Erodium* compte 74 espèces et est présent sur tous les continents, à l'exception de l'Antarctique (Fiz *et al.*, 2006). La région du bassin méditerranéen présente une biodiversité importante avec 62 espèces, tandis que les autres continents ne comptent qu'un nombre limité d'espèces indigènes : une en Amérique du Nord et du Sud, cinq en Australie et quatre en Asie. La vaste répartition d'*Erodium* illustre ses capacités de dispersion et de colonisation (Fiz *et al.*, 2008; Fiz-Palacios *et al.*, 2010).

3. *Erodium guttatum*

3.1. Description botanique

Erodium guttatum est une plante herbacée vivace très florifère, idéale pour les jardins secs, mesurant jusqu'à 30 cm de haut. La plante forme généralement un coussin dense de feuilles persistantes triangulaires à ovales mesurant jusqu'à 2,5 cm de long, avec une longue tige et des feuilles supérieures trilobées. Les fleurs mesurent environ 2 cm de diamètre et sont de couleur rose-violet avec une tache noire à la base de chaque pétale et des étamines noires (Figure 1). Le fruit d'*Erodium guttatum* est un schizocarpe cylindrique oblong légèrement poilu et à la surface lisse, et composé de cinq carpelles segmentés. Chaque carpelle, qui contient une seule graine, est allongé par un motif en spirale qui s'enroule à maturité, un mécanisme remarquable pour une distribution efficace des graines. Lorsque la plante se dessèche, les motifs se tordent et agissent comme un ressort pour éloigner les graines de la plante mère. Ce processus unique

enfouit également les graines dans le sol, augmentant ainsi leurs chances de germination. Les racines sont généralement pivotantes, ce qui leur permet d'exploiter les ressources en eau des sols relativement profonds, tout en fournissant une bonne stabilité à la plante dans des habitats parfois arides ou soumis à des perturbations, généralement dans les rocailles et éboulis calcaires de l'Afrique du Nord. Rare dans le sud de l'Espagne (Guittonneau, 1972-2010; Bienvenue sur le Guide des plantations, 2017).

La plante *E. guttatum* est connue dans la région de Batna Nord-Est d'Algérie par le nom vernaculaire Hchichet kol Blia (حشيشة كل بلية).



Figure 1. Photographie de l'espèce *Erodium guttatum*, prise en avril 2021 à Boulhilat.

3.2. Classification taxonomique

La classification taxonomique de la plante est présentée dans le **Tableau 1**.

Tableau 1. Classification de la plante *Erodium guttatum*

Règne	Les plantes
Embranchement	Angiospermes
Classe	Eudicots
Ordre	Geraniales
Famille	Geraniaceae
Genre	<i>Erodium</i>
Espèce	<i>Erodium guttatum (Desf.) Willd</i>

3.4. Usage en médecine traditionnelle

L'utilisation traditionnelle des plantes du genre *Erodium* varie d'un pays à l'autre, tant à des fins médicinales qu'à des fins nutritionnelles. Certaines espèces sont utilisées pour préparer des salades et des soupes ou sont consommées comme des légumes, d'autres sont utilisées à des fins thérapeutiques pour traiter ou atténuer de nombreux troubles de la santé, tels que les maladies gastro-intestinales, le diabète, les infections et les inflammations des voies urinaires, les affections cutanées telles que les plaies, l'eczéma et les brûlures, et peuvent être utilisées comme astringents pour stopper les hémorragies (Munekata *et al.*, 2019; Ucan Turkmen *et al.*, 2024; Abdelkrim *et al.*, 2006; Benrahou *et al.*, 2022a).

3.5. Composition phytochimique

E. guttatum, comme toutes les espèces du genre *Erodium*, possède des composants bioactifs, notamment des composants phénoliques tels que les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tanins, et des composés volatils.

3.5.1 Composés phénoliques

Au cours des dernières décennies, la diversité des composés phénoliques du genre *Erodium*, avec des différences spécifiques entre les espèces contribuant à leurs propriétés biologiques, a suscité l'intérêt de nombreux chercheurs pour plus d'informations, bien qu'ils soient longtemps restés dans l'ombre malgré l'abondance de leurs composés phytochimiques.

A) Acides phénoliques

De nombreuses études ont mis en évidence la richesse en acides phénoliques du genre *Erodium*, parmi lesquels figurent des composés largement répandus dans le règne végétal tels que les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque comme l'acide gallique, l'acide salicylique, l'acide vanillique, l'acide ellagique, l'acide protocatéchique, l'acide gentisique et l'acide syringique. Considérons les dérivés de l'acide hydroxycinnamique, notamment l'acide p-coumarique, l'acide m-coumarique, l'acide o-coumarique, l'acide trans-férulique, l'acide caféique, l'acide sinapique, l'acide chlorogénique et l'acide caféoylquinique (Fecka *et al.*, 2001; Bakari *et al.*, 2018; Bilić *et al.*, 2020; Cüce *et al.*, 2022).

B) Flavonoïdes

Le genre *Erodium* se distingue par la présence de divers types de flavonoïdes. Saleh *et al.* (1983) ont identifié la quercétine et ses dérivés comme les flavonoïdes les plus prévalents au sein du genre *Erodium*, en comparaison avec le kaempférol et la lutéoline. De plus, de nombreuses études ont mis en évidence la présence, dans le genre *Erodium*, de la quercétine et de ses dérivés, du kaempférol, de l'isorhamnétine, de la lutéoline et de leurs dérivés respectifs,

ainsi que de l'hyperoside, de la catéchine, de la naringine, de la naringénine, de l'acacétine, de l'hyperine, de l'hésperidine, de l'apigénine et du cirsilinéol (Fecka & Cisowski, 2002; Bakari *et al.*, 2018; Bilić *et al.*, 2020; Samet *et al.*, 2022; Cüce *et al.*, 2022).

C) Tannins

La famille des Geraniaceae est caractérisée par son composant principal ; la géranine (Okuda *et al.*, 1979), un tanin qui présente plusieurs activités biologiques, notamment des effets anti-inflammatoires et antitumoraux (Costa *et al.*, 2020). La géranine a été détectée dans l'extrait acétonique d'*E. arborescens* (Samet *et al.*, 2022) et identifiée comme un polyphénol antibactérien actif dans l'extrait éthanolique d'*E. glaucophyllum* (Gohar *et al.*, 2003).

En 2002 Fecka & Cisowski (2002) ont isolé et identifié cinq tanins; géraniine, déhydrogéraniine, corilagine, acide 3-O-galloylshikimique et 3-O-glucoside méthyl gallate à partir de l'extrait d'eau et d'acétone d'*E. cicutarium* par la combinaison de deux méthodes analytiques, la spectrométrie de masse et la résonance magnétique nucléaire et à partir de l'extrait aqueux à l'acétone de l'herbe fraîche d'*Erodium moschatum*, Lin JerHuei & Lin MeiFan (1997) ont isolés quatre gallotannins: l'acide 3-O-galloylshikimique, l'acide 3,4-di-O-galloylshikimique, l'acide 3,5-di-O-galloylshikimique, le 1-O-galloyl- β -D-glucose; six ellagitanins dont la corilagine, la furosine, la géraniine, l'acétonylgéraniine A, le méthyl gallate 3-O- β -D-glucoside et l'acide gallique 3-O- β -D-(6'-O-galloyl)-glucoside. En plus, Bilić *et al.* (2020) ont identifié plusieurs ellagitanins et gallotannins dans les extraits d'*E. cicutarium* provenant de quatre sites en Croatie en utilisant l'analyse UHPLC-LTQ Orbi Trap MS⁴. Par ailleurs, la composition chimique d'un extrait d'acétone d'*E. arborescens* a été analysée par LC-HESI-MS², révélant la présence de 70 composés, principalement des dérivés de tanins tels que des tanins hydrolysables, en particulier des esters simples de gallate, les dérivés et glycosides de l'acide ellagique et différents ellagitanins (Samet *et al.*, 2022).

3.5.2. Composés organiques volatils

De nombreuses études ont validé l'existence d'huiles essentielles dans le genre *Erodium*, en utilisant principalement des techniques d'extraction conventionnelles; Lis-Balchin & Hart (1994) ont identifié le méthyle eugénol, le géranol, le citronellol, l'isomenthone et le linalol (respectivement 10,6, 16,7, 15,4, 11,2 et 3,1% de l'huile totale) des feuilles d'*E. cicutarium*, et par le biais d'analyses GC et GC/MS. Ljolić Bilić *et al.* (2019) ont identifié les hydrocarbures comme la classe la prédominante (59,8 % - 65,7 %) dans les quatre collections croates d'*E. cicutarium* avec l'acide hexadécanoïque (41,5 % - 49,6 %) comme composé principal, suivi de l'acide octadécanoïque (3,8 % - 8,1 %), de l'octacosane (2,1 % - 4,8 %) et de

l'acide heptadécanoïque (2,3 % - 4,6 %). En outre, le genre *Erodium* est connu pour contenir des composants non polaires, en particulier des acides gras ; l'acide palmitique et l'acide linoléique étaient les principaux acides gras chez *E. hendrikii* (Cüce *et al.*, 2022), tandis que l'acide hexadécanoïque était prédominant chez *E. cicutarium* (Stojanović-Radić *et al.*, 2010). Chez *E. trifolium*, les acides palmitique et oléique sont les acides gras prédominants (Bouhedda *et al.*, 2024).

3.6. Activités biologiques

3.6.1. Activité antioxydante

Les plantes médicinales sont connues pour leurs puissantes capacités antioxydantes, en particulier les espèces d'*Erodium*, qui sont l'une des espèces connues pour ses remarquables propriétés antioxydantes, attribuées à sa riche composition phytochimique. Diverses espèces de ce genre ont été étudiées pour leurs effets bénéfiques potentiels sur la santé, en particulier pour leurs propriétés antioxydantes (Munekata *et al.*, 2019). Ces études mettent en évidence la présence de polyphénols, de flavonoïdes et d'autres composés bioactifs qui contribuent à leur capacité antioxydante. Une étude a montré que l'extrait méthanolique d'*E. guttatum* est abondant en polyphénols, tanins et flavonoïdes, qui sont associés à ses effets antioxydants observés dans des études in vitro et in vivo (Benrahou *et al.*, 2022a).

3.6.2. Activité antiinflammatoire

Le genre *Erodium* a fait l'objet d'études en raison de ses propriétés anti-inflammatoires, notamment pour les espèces *glaucophyllum* et *stephanianum*. Les résultats de l'étude menée par Barba *et al.* (2020) ont mis en évidence la capacité des extraits d'*E. glaucophyllum* à réduire le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α). De manière similaire, les travaux de recherche de Huang *et al.* (2010) ont souligné l'effet inhibiteur significatif de l'extrait d'*E. stephanianum* sur le TNF- α . Ces découvertes ont conduit à l'utilisation de cette espèce pour la conception d'un antagoniste du TNF- α . Gadhomi *et al.* (2024) ont démontré un potentiel anti-inflammatoire significatif pour les trois extraits hydroéthanoliques d'*E. glaucophyllum*, d'*E. hirtum* et d'*E. guttatum* en réduisant de manière substantielle la production de monoxyde d'azote (NO) induite par les lipopolysaccharides (LPS) dans les macrophages murins.

Les effets anti-inflammatoires sont principalement attribués à la teneur élevée en composés phénoliques des extraits d'*Erodium*, qui comprennent des composés tels que la catéchine et ses dérivés ; la gallocatéchine et l'épigallocatéchine, connus pour leurs activités antioxydantes, anti-inflammatoires et antiprolifératives (Barba *et al.*, 2020; Cohen *et al.*, 2020).

3.6.3 Activité antimicrobienne

L'action antibactérienne des espèces d'*Erodium* est attribuée à plusieurs constituants phytochimiques, principalement des polyphénols, des flavonoïdes, des tanins et certains acides. Ces produits chimiques ont été reconnus dans de nombreuses espèces et dans des extraits d'*Erodium*, améliorant leur efficacité contre de multiples souches bactériennes. L'extrait d'acétone d'*E. arborescens* est notamment abondant en polyphénols et en flavonoïdes, reconnus pour leurs activités antibactériennes (**Samet et al., 2022**). *E. glaucophyllum* présente une teneur considérable en polyphénols, ce qui semble jouer un rôle déterminant dans son activité antibactérienne, en particulier contre *Listeria monocytogenes*, pour laquelle l'extrait à 100 % d'acétate d'éthyle induit une zone d'inhibition de 15 mm (**Radhia et al., 2018**). Les tanins sont abondants dans les espèces d'*Erodium* et améliorent leurs capacités antibactériennes. Dans l'*Erodium cicutarium*, les dérivés de l'acide gallique, en particulier l'acide galloyl-shikimique, et les glycosides de flavonol y compris la rutine, contribuent aux effets antibactériens. Ces composés sont efficaces contre les souches cliniques de *Staphylococcus aureus*, y compris les variantes résistantes à la méticilline (**Ljolić Bilić et al., 2022**).

3.6.4. Activité antivirale

Le genre *Erodium* présente une activité antivirale notable, notamment grâce à ses extraits qui ont été étudiés pour leurs effets sur divers virus. Les recherches indiquent que les extraits aqueux et méthanolique d'*Erodium cicutarium* avaient une activité antivirale contre les myxovirus, le virus de l'herpès de type 1, la stomatite vésiculaire, le virus de la vaccine, et aussi contre le virus de la maladie de Newcastle et le virus de la grippe A chez les souris. Donc l'*Erodium cicutarium* peut stimuler la synthèse de l'interféron et inhiber la réplication virale (**Zielińska-Jencylik et al., 1987, 1988**), tandis que les extraits aqueux et éthanolique d'*Erodium glaucophyllum* démontraient des propriétés antivirales significatives contre l'hépatite A et le norovirus murin (**Abdelkebir et al., 2019**).

3.6.5. Activité antiparasitaire

Les phytoconstituants d'*Erodium* spp. ont une activité potentielle contre *Plasmodium* spp., un parasite du paludisme. **Esmaili et al. (2009)** ont trouvé de faibles valeurs de IC₅₀ pour l'extrait d'*E. oxyrrhynchum* contre les souches de *Plasmodium* K1 (résistantes à la chloroquine), et 3D7 (sensibles à la chloroquine) et une autre étude menée par **Kaiser et al. (2007)** a trouvé que l'extrait d'*E. gruinum* inhibait la 2C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate synthase (Isp C), une enzyme associée à l'infection paludique. **Fokialakis et al. (2007)** ont découvert que l'extrait d'*Erodium moschatum* a montré une activité anti-leishmanienne.

3.6.6. Activité antidiabétique

Le genre *Erodium* est inclus dans l'exploration plus large des plantes médicinales pour le traitement du diabète, en raison de ses caractéristiques thérapeutiques inhérentes et de ses effets indésirables négligeables. En particulier *E. guttatum*, qui présente des propriétés antidiabétiques notables, principalement par l'inhibition des enzymes digestives essentielles et la réduction des niveaux de glucose dans le sang (**Benrahou et al., 2022b**). L'étude référencée par **Özüpek et al. (2024)** indique qu'*E. somanum*, *E. leucanthum* et *E. siphthorianum* ont l'action inhibitrice de la bêta-glucosidase la plus puissante contrairement aux autres espèces étudiées. Le potentiel antidiabétique des espèces d'*Erodium* est confirmé par des recherches mettant l'accent sur leurs activités inhibitrices enzymatiques et leur composition phytochimique, comme la géranine et l'acide ellagique qui ont été trouvés dans les espèces d'*Erodium*, contribuant à leurs propriétés inhibitrices enzymatiques (**Özüpek et al., 2024**).

3.6.7. Activité neuroprotectrice

L'inhibition des enzymes cholinestérasiques constitue l'une des stratégies permettant de retarder ou de prévenir la progression de la maladie d'Alzheimer (**Basli & Bounaas, 2023**). Les espèces d'*Erodium*, connues pour leurs profils phytochimiques variés, peuvent offrir des composés bioactifs prometteurs qui inhibent plusieurs types d'enzymes. Plusieurs extraits d'*Erodium spp.* sont très actifs contre Acétylcholinestérase (l'AChE) et la Butyrylcholinestérase (la BChE), tels que *E. brandianum* et *E. pelargoniflorum*, *E. cicutarium* (**Özüpek et al., 2024**). Le genre *Erodium* est connu par de nombreuses substances végétales présentant des effets neuroprotecteurs en inhibant la BChE et l'AChE, notamment des acides phénoliques tels que l'acide gallique (**Ojo et al., 2023**) et l'acide shikimique (**Feunaing et al., 2024**) ainsi que des flavonoïdes tels que la quercétine (**Islam et al., 2021**), l'hespéridine (**Lekmine et al., 2024**) et la lutéoline (**Ntalouka & Tsirivakou, 2023**).

3.6.8. Activité antiproliférative et cytotoxique

La recherche de (**Sergazy et al., 2022**) met en évidence l'efficacité des extraits de plantes appartenant aux genres *Géranium* et *Erodium* tels que *G. glaberrimum*, *G. asphodeloides*, *E. brandianum* et *E. leucanthum* dans l'inhibition de la prolifération cellulaire des cellules cancéreuses du sein (MCF-7), des cellules musculaires du sarcome d'Ewing (A-673), du carcinome cervical épithélial (DoTc2 4510), du carcinome hépatocellulaire (HUH-7) et des cellules de mélanome malin (A-375). La plupart de ces extraits ont induit l'autophagie, tandis qu'*E. brandianum* a déclenché l'apoptose par la modulation des expressions des protéines Bcl2 et BAX, ce qui est particulièrement important, car cela suggère que ces plantes pourraient être

explorées davantage pour leurs propriétés médicinales, ce qui pourrait conduire au développement de nouveaux traitements contre le cancer.

1. Pesticides

Le terme « pesticide » englobe un large éventail de composés, notamment les herbicides, les insecticides, les acaricides, les bactéricides, les nématicides, les rodenticides, les fongicides, les molluscicides, les algicides, les répulsifs et les régulateurs de croissance des plantes. Les pesticides sont principalement des composés organiques utilisés sur les cultures pour lutter contre les mauvaises herbes, les maladies et les parasites, ce qui permet d'améliorer la productivité et la qualité des aliments (**Parlakidis *et al.*, 2023**).

2. Fongicides

Un fongicide est un type spécifique de pesticide qui contrôle les maladies fongiques en empêchant, éradiquant ou en tuant spécifiquement le champignon qui cause la maladie (**Jampílek & Kráľová, 2017**). Le terme « fongicide » est dérivé de deux mots latins : « champignon » et « caedo ». Le terme caedo signifie « tuer ». Un fongicide est tout agent ou substance capable d'éliminer les champignons (**Koli *et al.*, 2019**).

Les fongicides sont classés en fonction de leur structure chimique ou caractérisés sur le plan agricole et horticole par leur méthode d'action en fongicides foliaires, fongicides pour le sol et fongicides de traitement (**Gupta, 2018**).

3. Conazoles

Le suffixe « conazole » désigne un groupe de composés organiques synthétiques utilisés pour le traitement des infections fongiques chez les plantes et les animaux. Leurs structures chimiques comportent un cycle azolé à cinq chaînons et peuvent être classées en deux sous-groupes : ceux avec une fraction imidazole (par exemple, le kétoconazole), caractérisés par deux atomes d'azote dans le cycle, et les triazoles développés ultérieurement (par exemple, le propiconazole), qui contiennent trois atomes d'azote. Les fongicides conazole les plus puissants actuellement utilisés sont les dérivés du triazole et leurs modifications de deuxième génération (**Waring *et al.*, 2023**).

4. Triazoles

Les triazoles constituent l'une des catégories de fongicides les plus étendues, la société Bayer ayant développé le premier triazole en 1973. Les nouveaux triazoles ont une activité intrinsèque supérieure à celle de leurs prédécesseurs et leur efficacité est en corrélation avec leurs valeurs DL₅₀ d'origine. La fraction triazole comprend des fongicides systémiques

importants, englobant de nombreux composés ayant la structure 1,2,4-triazole, gérant efficacement de nombreuses infections fongiques dans diverses cultures, en particulier les céréales (Thabit *et al.*, 2021).

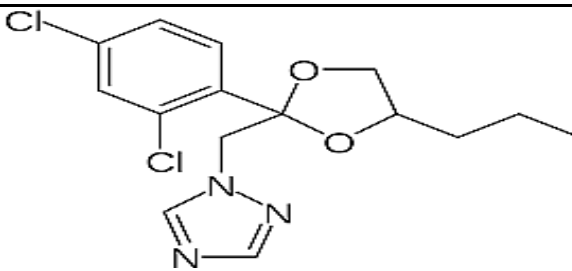
5. Propiconazole

Le propiconazole (PCZ, 1-((2-(2,4-chlorophényl) 4-propyl-1,3-dioxolan-2-yl) méthyl-1 H-1, 2,4-triazole) est l'un des meilleurs triazoles systémiques chiraux avec deux structures chimiques, fréquemment utilisé pour arrêter la croissance fongique sur les légumes, les fruits et les céréales (Hamed *et al.*, 2022). Cet agent fongicide contient des atomes de chlore dans sa structure chimique, ce qui le rend efficace contre une variété étendue de champignons (Ferrer *et al.*, 2017). Il s'est avéré hautement efficace contre l'oïdium (Hagan *et al.*, 2005), le *Colletotrichum capsicum* (Gopinath *et al.*, 2006) et l'*Alternaria alternata* et a démontré une activité significative contre les pathologies induites par les *Ascomycètes*, les *Basidiomycètes* et les *Deutéromycètes* (Sarkar *et al.*, 2009). Il est classé comme cancérigène possible pour l'homme (groupe C) avec une dose journalière acceptable de 0,04 mg/kg de poids corporel/jour, et la concentration prédite sans effet (PNEC) est de 6,8 µg/L (ECHA, 2015).

5.1. Propriétés physicochimiques du propiconazole

Les propriétés physicochimiques du propiconazole sont résumées dans le **Tableau 2**.

Tableau 2. Les propriétés physicochimiques du propiconazole (Roman *et al.*, 2021).

Fongicide	Paramètres
Nom de l'IUPAC	1-[[2-(2,4-dichlorophényl) -4-propyl-1,3-dioxolan-2-yl] méthyl] -1,2,4-triazole
Formule structurale	
Formule empirique	C ₁₅ H ₁₇ N ₃ O ₂ Cl ₂
Poids moléculaire (g/mol)	342.2
Log P	3.5
HBD	0
HBA	4
RBC	5

TPSA (Å ²)	49.2
DT ₅₀ pour les études sur le terrain (jours)	15,3–96,3 (modérément persistant)
DT ₉₀ pour études sur le terrain (jours)	108–525
Solubilité dans l'eau, mg/l (20°C)	150
Solubilité dans les solvants organiques, mg/l (20°C)	1.6×10 ³
DL 50 mg/kg/j	1517

Log P : coefficient de partage, HBD : donneurs de liaisons hydrogène, HBA : accepteurs de liaisons hydrogène, RBC : nombre de liaisons rotatives, TPSA : surface polaire topologique, DT₅₀ et DT₉₀ les périodes au-delà desquelles 50 % et 90 % respectivement du fongicide doivent être dégradés.

5.2. Mode d'action

Comme de nombreux autres fongicides à base de triazole, le PCZ implique principalement l'inhibition de la synthèse de l'ergostérol, un composant essentiel des membranes cellulaires fongiques, nécessaire à la perméabilité et à la fluidité membranaires, en bloquant l'enzyme lanostérol 14 α -déméthylase (**Trösken *et al.*, 2006**) ; une enzyme du cytochrome P450 cruciale pour la conversion du lanostérol en ergostérol, perturbant ainsi l'intégrité et la rigidité de la membrane cellulaire fongique en provoquant une accumulation de stérols méthylés. Cette perturbation entraîne une augmentation de la perméabilité membranaire et, finalement, la mort de la cellule fongique (**Ghannoum & Rice, 1999**) (**Figure 2**). De plus, les triazoles peuvent engendrer des espèces réactives de l'oxygène (ROS), provoquant ainsi un stress oxydatif dans les cellules fongiques, ce qui contribue à leur activité antifongique (**Kovacic & Z Abadjian, 2017**).

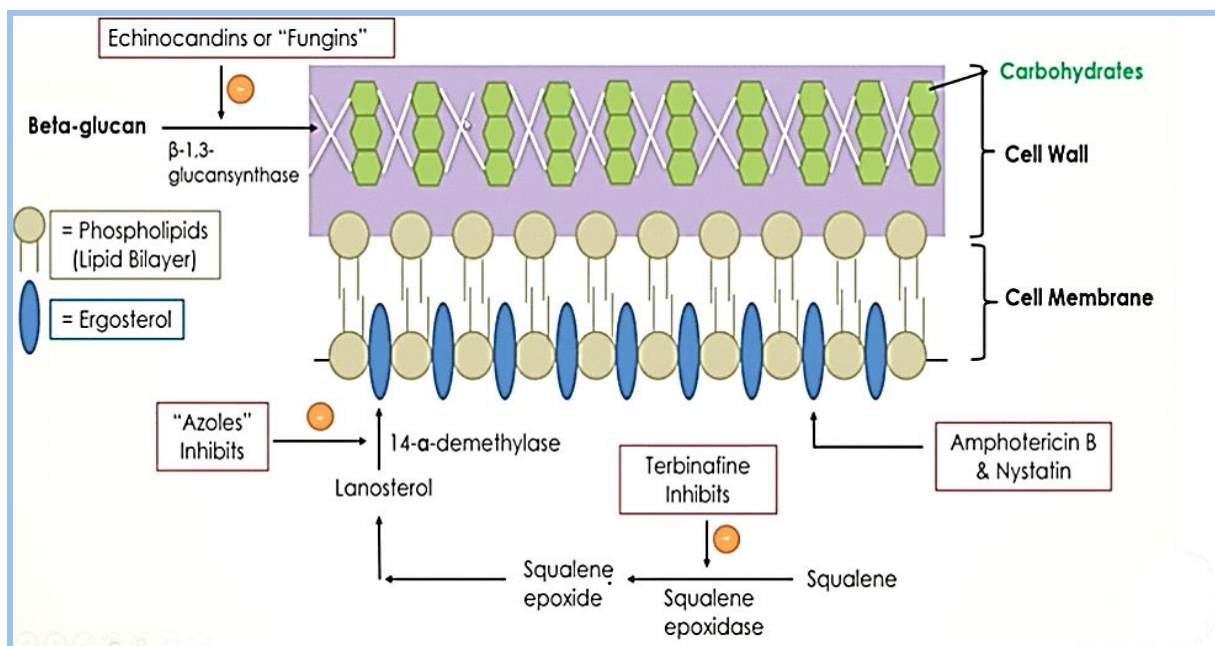


Figure 2. Action des fongicides azolés sur la membrane fongique (Aghaze Taleem, 2021).

Le PCZ possède deux atomes de carbone modifiés de manière asymétrique, ce qui donne deux paires d'énantiomères et deux paires de diastéréomères, aboutissant à un total de quatre stéréoisomères. Les quatre stéréoisomères sont classés comme cis A [(2R,4S) et (2S,4R)] et trans B [(2S,2S) et (2R,2R)] (Figure 3). Des recherches pionnières ont démontré que les isomères cis sont des inhibiteurs plus efficaces de la production d'ergostérol que les isomères trans (Pan *et al.*, 2018).

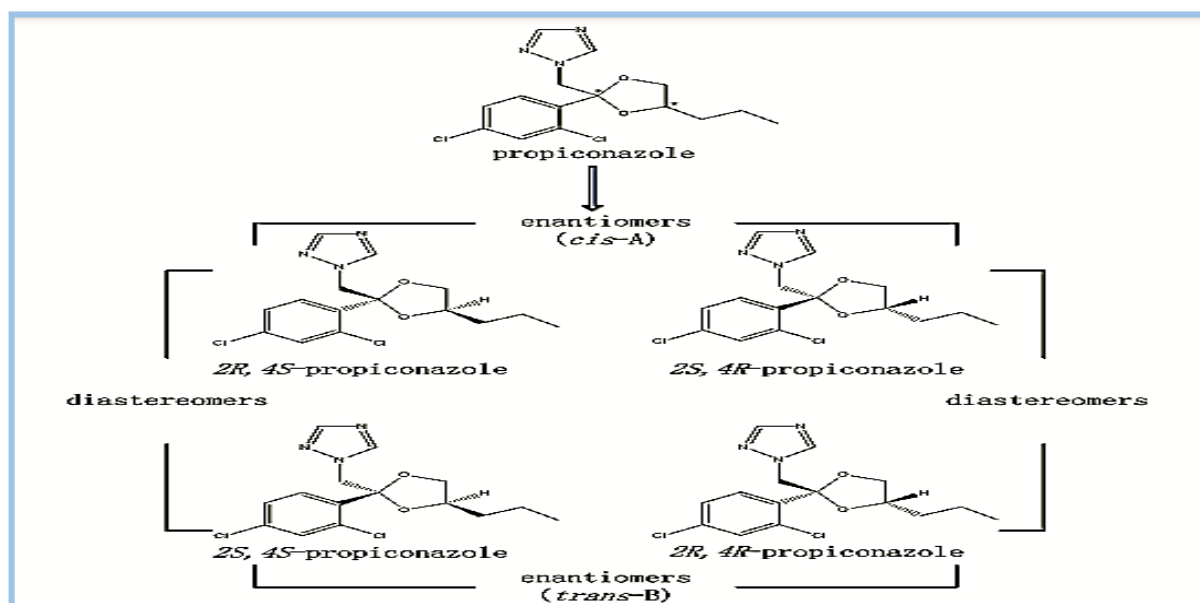


Figure 3. Structure chimique des stéréoisomères du propiconazole (Pan *et al.*, 2018)

5.4. Toxicocinétique du propiconazole

Dans les études de toxicité aiguë, le PCZ présente une faible toxicité aiguë par administration cutanée ou par inhalation, et une toxicité aiguë élevée lorsqu'il est administré par voie orale à des rats. Il n'est pas irritant pour la peau ou les yeux, mais plutôt un sensibilisant cutané. Dans les tests de toxicité orale à court terme, le foie a été identifié comme l'organe cible de la toxicité chez les rats et les souris, mais l'hypophyse a été considérée comme l'organe cible de la toxicité chez les chiens (EFSA *et al.*, 2017).

Selon l'une des littératures consultées (Gad & Pham, 2014), l'organisme absorbe 86 % d'une dose de PCZ en 48 heures, avec une élimination de 95 % dans le même laps de temps. Le PCZ se décompose en divers dérivés du triazole. Bien que certaines substances ne soient pas considérées comme cancérogènes, elles doivent néanmoins être manipulées avec la même prudence. Des expériences de métabolisme oral chez le rat utilisant du PCZ radiomarqué ont indiqué qu'environ 78 % de la radioactivité était éliminée dans l'urine et les fèces en 24 heures. La récupération de la radioactivité était presque complète en six jours, avec 38 à 46 % excrétés dans les fèces et 53 à 67 % dans l'urine. Selon (JMPR, 2004), le PCZ a subi un métabolisme substantiel chez le rat. Une étude a révélé cinq métabolites urinaires, chacun contribuant à plus de 5 % de la radioactivité. Environ 12 % et 9 % des métabolites urinaires étaient respectivement conjugués à l'acide glucuronique et au sulfate. Environ 5 % de la radioactivité fécale était constituée du composant parent non altéré. Dans une étude distincte, pas moins de 24 métabolites urinaires et 47 métabolites fécaux ont été identifiés. Le métabolisme du PCZ impliquait principalement la rupture du cycle dioxolane par oxydation de la chaîne latérale propyle, conduisant à la production de dérivés d'acide hydroxyle ou carbonyle. Les cycles chlorophénol et triazole ont subi une hydroxylation, suivie par la suite d'une déchloration et d'une conjugaison avec du sulfate ou du glucuronide. Les analyses de distribution ont indiqué que les plus grandes concentrations de résidus radioactifs ont été détectées dans le foie, le sang, les reins et les poumons. Ainsi, le PCZ ne devrait pas se bioaccumuler dans l'organisme. Des recherches sur le métabolisme oral réalisées sur des souris étaient également accessibles. Le principal métabolite urinaire chez les souris mâles (U2, une conjugaison d'acide glucuronique dépourvue du cycle dioxolane) constituait environ 60 % des résidus radioactifs urinaires chez les souris mâles, 30 % chez les souris femelles et 10 à 30 % chez les rats mâles (Dewhurst & Dellarco, 2006).

5.5. Toxicodynamique du propiconazole

En comparaison avec d'autres triazoles, le PCZ présente une affinité plus élevée pour le sol, une solubilité réduite, une immobilité, une résistance à la dégradation, une stabilité face à l'hydrolyse et à la photolyse, ainsi qu'une propension accrue à s'accumuler dans les systèmes eau/sédiments et les pratiques agricoles, ce qui entraîne fréquemment une contamination potentielle et des répercussions sur l'environnement (**Teng *et al.*, 2022; González Vázquez *et al.*, 2022; Yu *et al.*, 2022**) et des effets toxiques néfastes sur divers organismes (**Chen *et al.*, 2008**).

A) Hépatotoxicité

L'effet hépatotoxique du PCZ met en jeu des mécanismes moléculaires complexes qui varient selon les individus et sont modulés par divers facteurs tels que les voies métaboliques, la réaction au stress oxydatif et les facteurs génétiques. Le PCZ présente des effets hépatotoxiques et hépatotumorigène (**Allen *et al.*, 2006**). Des études sur les souris et les rats exposés au PCZ ont révélé un stress oxydatif important et une carbonylation des protéines dans le tissu hépatique, entraînant des dommages et des dysfonctionnements cellulaires (**Bruno *et al.*, 2009; Khalaf *et al.*, 2021**). Il a été prouvé aussi que le PCZ peut entraîner des altérations du métabolisme hépatique chez les souris, ce qui provoque des effets hépatotoxiques tels que l'hépatomégalie et l'hypertrophie des hépatocytes chez les souris et les rats. Ces conclusions ont été soutenues par plusieurs études (**Allen *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2008; Nesnow, Padgett, *et al.*, 2011; Knebel *et al.*, 2022**). Selon **Kwon *et al.* (2021)**, il a été observé que le PCZ induit l'activation des enzymes du cytochrome P450, ce qui entraîne une augmentation du stress oxydatif et de l'inflammation. Ces résultats suggèrent des niveaux accrus d'interleukine-1 β et de facteur de nécrose tumorale- α dans les cellules traitées, ce qui contribue à la fibrose hépatique. De plus, le PCZ perturbe l'expression des gènes associés à la fibrose chez les porcs, comme l'ont souligné **Jeong *et al.* (2021)** De plus, le PCZ interagit avec divers récepteurs nucléaires tels que le récepteur du prégénane X (PXR), le récepteur des hydrocarbures aryliques (AHR) et le récepteur constitutif des androstanes (CAR), ce qui entraîne des effets hépatotoxiques tels que la dysrégulation des lipides, l'hypertrophie et la stéatose au niveau des cellules hépatiques (**Albrecht, 2019; Knebel *et al.*, 2018, 2019**). Des recherches ont démontré que l'exposition des souris au PCZ peut conduire à la formation d'adénomes et de carcinomes hépatocellulaires (**INCHEM, 1987**).

B) Reprotoxicité

Le PCZ est un produit chimique qui peut avoir des effets perturbateurs sur le système endocrinien. Des recherches ont montré qu'il réduit l'activité du CYP 19 (aromatase), responsable de la conversion des androgènes en œstrogènes, et qu'il agit également comme un antagoniste des récepteurs des androgènes et des œstrogènes (**Kjærstad et al., 2010**). Le PCZ affecte la reproduction chez de nombreux organismes. Chez les mammifères, l'étude de **Costa et al. (2015)** sur les rats a montré que l'exposition au PCZ entraînait des modifications de certains paramètres de la reproduction, qui se manifestaient par des troubles andrologiques et des changements dans le comportement sexuel. De plus, une autre étude menée par **Aiche et al. (2015)** chez les rats mâles a révélé une diminution du nombre et de la mobilité des spermatozoïdes, ainsi que des changements histopathologiques dans les testicules et l'épididyme. Chez les organismes aquatiques, l'exposition au PCZ chez les têtes-de-boule a entraîné une diminution des taux plasmatiques d'œstradiol et de vitellogénine, ce qui a entraîné une diminution de la production d'œufs à des doses élevées. La recherche a également mis l'accent sur les réactions compensatoires chez les femelles, notamment l'augmentation du poids des gonades et l'activation de gènes stéroïdogènes, ce qui signifie une interaction complexe avec les hormones reproductrices (**Skolness et al., 2013**). Chez les amphibiens L'exposition au PCZ chez les jeunes grenouilles *Xenopus tropicalis* a entraîné une expression accrue des gènes associés aux voies de l'acide rétinoïque et des stéroïdes sexuels, suggérant d'éventuelles perturbations de la spermatogenèse. Aucune altération histologique n'a été détectée dans les ovaires ; toutefois, une augmentation de l'expression des récepteurs aux œstrogènes a été détectée, suggérant une perturbation endocrinienne potentielle (**Svanholm et al., 2024**). Et à partir des analyses *in vivo* et *in silico*, le PCZ interférait avec le processus de développement en perturbant la voie de signalisation RA chez la grenouille *Xenopus tropicalis* (**Wang et al., 2024**), ce qui entraînait des perturbations endocriniennes et des effets hépatiques et reproductifs ultérieurs évidents à la puberté, indiquant une perturbation persistante du métabolisme et de la fonction reproductrice mâle (**Svanholm et al., 2021**). Chez les crustacés, des recherches menées sur *Daphnia magna* ont révélé une diminution significative de la vitellogénine, une protéine clé pour la maturation des ovocytes, après une exposition au PCZ, ce qui a nui au succès de la reproduction (**Soetaert et al., 2006**).

C) Neurotoxicité

Beaucoup de recherches ont examiné la neurotoxicité du PCZ, révélant ses effets délétères sur les neurones et le comportement dans divers organismes. Les données suggèrent que le PCZ

peut perturber la fonction mitochondriale, modifier les profils lipidiques et induire un stress oxydatif, ce qui entraîne des changements neurocomportementaux et une neurodégénérescence dans des modèles animaux et des lignées cellulaires humaines.

Une étude de **Noshy *et al.* (2018)** a démontré que l'exposition au PCZ chez les rats a entraîné des déficits cognitifs, un stress oxydatif, une inhibition de l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase et des lésions histopathologiques dans les tissus cérébraux. De plus, dans la recherche menée par **Sanchez *et al.* (2020)**, il a été démontré que le PCZ diminuait la viabilité cellulaire, le potentiel de la membrane mitochondriale dans les cellules de neuroblastome différenciées SH-SY5Y et la respiration oxydative, ce qui indique un effet direct sur la santé neuronale. Le fongicide a modifié les profils lipidiques, avec des altérations des niveaux de céramides et une augmentation des lipides neuroprotecteurs, liés au dysfonctionnement mitochondrial, facilitant peut-être les processus neurodégénératifs. L'exposition des poissons zèbres au PCZ a entraîné une réduction de l'activité locomotrice et une dysrégulation des neurones GABA énergiques, suggérant d'éventuels dommages neurodéveloppementaux (**Valadas *et al.*, 2019**). Le PCZ peut également causer des dommages toxiques au cerveau du poisson d'eau douce en induisant un stress oxydatif par une augmentation de la peroxydation lipidique et de la teneur en protéines carbonylées, et une inhibition significative des enzymes métaboliques dépendantes du glutathion et des activités des enzymes de méthylation, et en réduisant de manière significative l'activité des enzymes AChE, MAO et Na-K⁺ ATPase, ainsi que les taux d'adrénaline de manière dose-dépendante (**Tabassum *et al.*, 2016**).

Chapitre II

Matériel et méthodes

La recherche expérimentale sur ce sujet a été menée dans plusieurs laboratoires spécialisés afin de garantir une approche approfondie et multidisciplinaire. L'analyse phytochimique de la plante médicinale a été réalisée au centre de pratique et de recherche du laboratoire de recherche de l'université d'Igdir, en Turquie. Les évaluations des activités biologiques *in vitro* ont été réalisées au laboratoire de biochimie du Centre de recherche en biotechnologie (CRBT) à Constantine, en Algérie. Les expériences *in vivo* ont été menées sur deux sites distincts : le Centre de recherche en sciences pharmaceutiques (CRSP) à Constantine, en Algérie, et le Laboratoire de recherche sur des interactions, la biodiversité, les écosystèmes et la biotechnologie de l'Université du 20 août 1955 à Skikda, en Algérie.

1. Etude phytochimique

Le schéma ci-dessous illustre les différentes étapes du protocole expérimental *in vitro* que nous avons suivi.

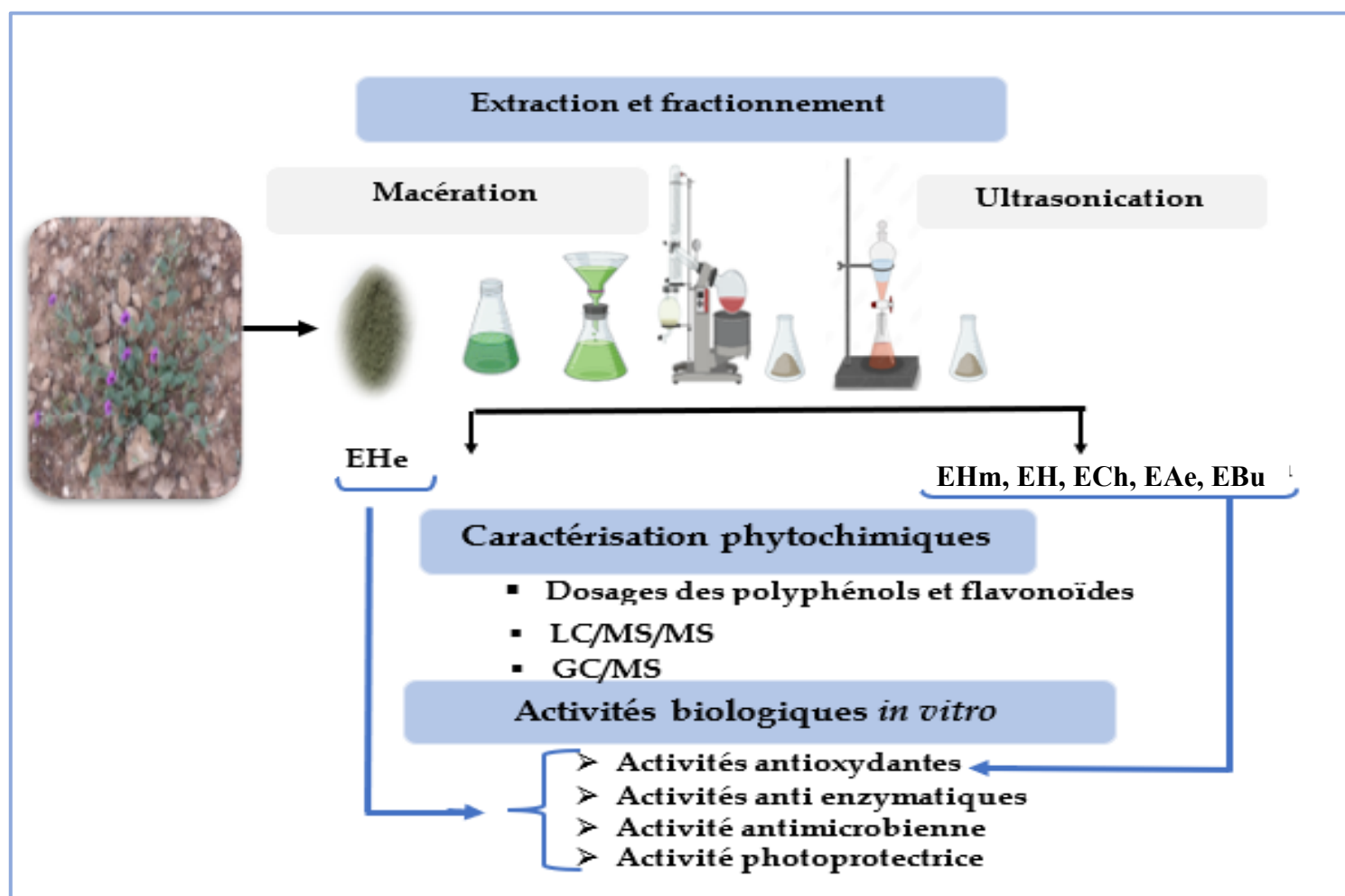


Figure 4. Représentation graphique résume les étapes de l'étude phytochimique et les activités biologiques *in vitro* des extraits d'*E. guttatum*.

1.1. Matériel végétal

Les parties aériennes fraîches (feuilles, tiges et fleurs) d'*Erodium guttatum* poussant dans la nature à l'état sauvage sur les flancs des montagnes ont été collectées en avril 2021 à Boulhilat, une petite commune de la wilaya de Batna, une région située dans le nord-est de l'Algérie ($35^{\circ}44'27.2''\text{N } 6^{\circ}38'15.4''\text{ E}$) (**Figure 5**). La plante a été identifiée par le Pr Sakhraoui Nora, botaniste au département des sciences de la nature et de la vie de l'université de Skikda. Ces échantillons (parties aériennes d'*E. guttatum*) ont été délicatement nettoyés et rincés à l'eau du robinet, coupés en petites portions et séchés à l'air libre et à l'abri de la lumière pendant une durée de 20 jours. Par la suite, ces échantillons séchés ont été broyés en poudre fine.



Figure 5. Carte géographique du site de collecte de la plante dans la région de Boulhilat à la wilaya de Batna

1.2. Préparation des extraits

L'extraction des principes actifs est effectuée par deux techniques :

A) Extraction assistée par ultrasons et fractionnement

Selon l'étude de **Suhaimi et al. (2019)** avec quelques modifications, deux cents (200) g de la poudre ont été utilisés pour une extraction assistée par ultrasons avec une solution hydrométhanolique. Le processus d'extraction a été réalisé à l'aide d'une sonde à ultrasons

(sonicateur Vibracell 75186), en déterminant la concentration du solvant à (70 %), la durée de sonication à (30 min) et l'amplitude à (70 %). Après avoir réalisé une filtration par papier filtre Wattman pour séparer les fractions liquides et solides, le solvant a été ensuite évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif (37 °C) pour donner un extrait brut, qui a été dissous dans 200 mL d'eau distillée et soumis à une extraction liquide-liquide dans une ampoule à décante par l'utilisation de quatre solvants organiques : n-hexane, chloroforme (CHCl₃), acétate d'éthyle (EtOAc) et n-butanol (n-BuOH). Les solvants organiques ont finalement été évaporés et les extraits ont été conservés jusqu'à leur utilisation pour des tests biologiques et phytochimiques.

B) Macération

Une quantité de 200 mg de la poudre végétale des parties aériennes d'*E. guttatum* a été macérée dans une solution hydro-alcoolique (éthanol) à 80 % pendant 24 heures à température ambiante avec agitation occasionnelle et répétée trois fois. Le macérat a ensuite été filtré sur du papier filtre Wattman, puis concentré à l'aide d'un évaporateur rotatif à 37°C pour obtenir l'extrait brut hydroéthanolique (Zainal *et al.*, 2022).

En résultat, nous avons obtenus six extraits :

- Un extrait hydroéthanolique brut obtenu par macération (EHe)
- Un extrait hydrométhanolique brut obtenu par ultrason (EHm)
- Quatre fractions obtenues par fractionnement de l'extrait hydrométhanolique
 - Une fraction n-hexane (EH).
 - Une fraction chloroforme (ECh).
 - Une fraction d'acétate d'éthyle (EAe).
 - Une fraction n-butanol (EBu).

Le rendement d'extraction en pourcentage (R %) est défini comme le rapport entre le poids de l'extrait sec en grammes et le poids de la poudre végétale sèche. Le calcul est effectué à l'aide

de l'équation suivante :
$$R\% = \frac{m}{M} \times 100$$

R% : rendement (%)

m : masse de l'extrait sec (g)

M : masse de la poudre végétale (g)

1.3. Quantification des polyphénols et flavonoïdes totaux

1.3.1. Dosage des polyphénols totaux (TPC)

La concentration des polyphénols totaux des six extraits obtenus a été déterminée selon la méthode spectrophotométrique utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu décrite par Müller *et*

al. (2010). L'acide gallique a été utilisé comme standard de référence pour construire la courbe d'étalonnage. Brièvement, un volume de 20 μL d'extrait (1 mg/ml) a été combiné à 100 μL de réactif de Folin-Ciocalteu (1 :10), neutralisé avec 75 μL de solution de carbonate de sodium (7,5 %, p/v) et ajouté à une microplaque à 96 puits. Un blanc a été préparé de la même manière, en remplaçant l'extrait par le solvant utilisé (méthanol). Le mélange réactionnel a été maintenu dans l'obscurité à température ambiante pendant 2 h, suivi d'une lecture à 765 nm. Les TPC ont été déterminés à l'aide d'une équation de régression linéaire dérivée de la courbe de l'acide gallique. La teneur phénolique totale a été calculée en $M \pm SD$ ($n = 3$) et exprimée en μg d'équivalent d'acide gallique par mg d'extrait.

1.3.2. Dosages des flavonoïdes totaux (TFC)

Le TFC des différents échantillons a été déterminé en utilisant le test en microplaque rapporté par **Topçu et al. (2007)** avec une légère modification. La création d'un composé entre les flavonoïdes et le trichlorure d'aluminium (AlCl_3) est essentielle au processus. Une valeur de 50 μL de solution d'extrait (1 mg/mL), 130 μL de méthanol, 10 μL de nitrate d'aluminium (10 %) et enfin 10 μL d'acétate de potassium (1 M) ont été ajoutés à chaque puits. De même, un blanc a été produit en remplaçant l'extrait par le solvant utilisé. Puis la plaque a été maintenue en incubation pendant 40 minutes, suivie d'une lecture à 765 nm. Les TFC ont été déterminés à l'aide d'une équation de régression linéaire dérivée de la courbe standard de la quercétine. La teneur totale en flavonoïdes a été calculée en $M \pm SD$ ($n = 3$) et exprimée en μg d'équivalent quercétine par mg d'extrait.

1.4. Identification des composés phytochimiques par électro spray-spectrométrie de masse (LC-ESI-MS/MS)

L'extrait brut hydroéthanoliques et les deux fractions (chloroforme et n- butanol) de la partie aérienne d'*E. guttatum* ont été soumis à une analyse LC-ESI-MS/MS.

Un spectromètre de masse Agilent Technologies 1260 Infinity II, 6460 Triple Quad avec mode d'ionisation par électro-nébulisation (ESI) positif et négatif a été utilisé. La séparation chromatographique a été réalisée à l'aide de la colonne Poroshell 120 SB-C18 ($3,0 \times 100$ mm, D.I., 2,7 μm), avec un système de solvant binaire eau (A) et méthanol (B), tous deux composés de 0,1 % d'acide formique et de 5 mM de formiate d'ammonium pour la phase mobile. Le programme de gradient a été ajusté comme suit : (75 % A-25 % B) à 3 min, (50 % A-50 % B) à 12 min, (10 % A-90 % B) à 16 min, (10 % A-90 % B) à 21 min et (97,5 % A-2,5 % B) à 24 min. Le volume d'injection était de 5,12 μl et le débit était calibré à 0,40 mL/min. Les conditions adoptées sont les suivantes : La température de la colonne était de 40 °C, le débit de séchage

et de nébulisation de l'azote gazeux était de 08 L/min, et la pression était de 15 PSI, en plus de la tension et de la température capillaires, qui étaient fixées à 4000 V et 350 °C, respectivement. Tous les étalons utilisés dans cette analyse sont présentés dans le **Tableau 6**.

l'analyse de tous les échantillons est préparée selon la méthode décrite par **Erenler *et al.* (2023)**, (50 mg) de chaque extrait/ fraction a été pesé dans un Eppendorf (2 mL) et dissous dans du méthanol (1 mL). L'hexane a été ajouté à cette solution et centrifugé pendant 10 minutes à 9000 rpm. 100 µL ont été prélevés dans la phase méthanol et dilués par ajout d'eau (450 µL) et de méthanol (450 µL). Dans la dernière étape, cette solution a été filtrée (filtre de 0,22 µm) et injectée dans l'instrument.

1.5. Identification des composés phytochimiques par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS)

Des échantillons de plantes pesant 10 g ont été soumis à une extraction par Soxhlet en utilisant 200 mL de n-hexane pendant une durée de 2 heures. Les homogénats ont été filtrés et concentrés à une température de 37°C à l'aide d'un évaporateur rotatif, dans le but de générer un extrait hexanique brut en vue de l'analyse de la composition en acides gras par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS).

Le processus démarre par une étape d'estérification de l'extrait n-hexane de la plante obtenu via une extraction Soxhlet. Ensuite, les esters méthyliques d'acides gras produits sont soumis à une analyse par chromatographie en phase gazeuse sur un équipement Shimadzu AOC-20i Plus (Shimadzu, Tokyo, Japon) comprenant un injecteur split (température = 250°C), une spectrométrie de masse (TQ8040 NX, Shimadzu) et une colonne Rxi-5Sil MS (30 m×0,25 mm, 0,25 µm d'épaisseur de la membrane). L'hélium a été employé en tant que gaz vecteur, à un débit de 1 ml/min. La température du four a été maintenue à 40 °C pendant une durée de 3 minutes, puis a été augmentée à 170 °C pendant 10 minutes, maintenue à ce niveau pendant 8 minutes, pour finalement être portée à 250 °C. Les températures de la source d'ions et de l'injecteur étaient de 200 °C et 250 °C, respectivement. L'identification des pics a été réalisée en utilisant le temps de rétention et en analysant les spectres de spectrométrie de masse à l'aide d'une base de données.

2. Evaluation des activités biologiques *in vitro*

2.1. Activités antioxydantes

Dans la présente étude, la mise en évidence de l'activité antioxydante des extraits bruts et des fractions de la partie aérienne d'*E. guttatum* a été réalisée par cinq méthodes, à savoir : DPPH, ABTS, FRAP, SNP et Phénanthroline).

2.1.1. Activité anti-radicalaire du radical DPPH

Le DPPH (1, 1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl) est un radical libre stable en raison de la délocalisation d'électrons non appariés dans sa structure. Lorsque la solution de DPPH est en contact avec une substance capable de donner un atome d'hydrogène, une réaction se produit conduisant à la réduction du DPPH (Martinez *et al.*, 2006). Donc le principe consiste en la réduction du radical libre stable violet DPPH en diphénylpicrylhydrazine jaune (Shaw *et al.*, 2003).

La capacité de piégeage des extraits vis-à-vis du DPPH a été déterminée en utilisant le protocole de Blois (1958) avec quelques modifications. 40 µL d'extraits ou d'étalons (acide ascorbique, BHA, BHT et Trolox) à différentes concentrations ont été combinés à 160 µL de solution de DPPH dans du méthanol. Le mélange a ensuite été incubé dans l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes. Le méthanol a été utilisé comme contrôle à la place de l'extrait. L'absorbance a été mesurée à 517 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques à 96 puits.

Une absorbance plus faible du mélange réactionnel indique une plus grande action de piégeage des radicaux libres DPPH, et le pourcentage d'activité de piégeage de l'extrait sur le radical DPPH a été déterminé en appliquant l'équation suivante :

$$\text{Le \% d'inhibition de DPPH} = [(A_o - A_s) / A_o] \times 100$$

- A_o représente l'absorption du contrôle.
- A_s l'absorption de la solution d'extrait testée.

La concentration requise pour piéger 50 % des radicaux libres DPPH initiaux est exprimée par la valeur IC_{50} , laquelle est utilisée pour comparer le potentiel antioxydant des extraits.

2.1.2. Activité anti-radicalaire de l'ABTS•+

La mesure de l'activité anti-radicalaire de l'ABTS [2,2'-azinobis (acide 3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)] implique un processus dans lequel l'ABTS présente une teinte bleu-vert due à l'oxydation électronique par le persulfate de potassium, qui diminue ensuite lorsque l'antioxydant présent dans l'extrait réduit la capacité de don d'électrons. Cette méthode est reconnue pour sa sensibilité supérieure dans la confirmation de l'activité antioxydante par rapport à la méthode anti-radicalaire DPPH (Choi *et al.*, 2003).

Ce test a été effectué selon la procédure de Re *et al.* (1999) avec quelques ajustements : des parties égales d'une solution aqueuse d'ABTS (7 mM) et de persulfate de potassium (2,45 mM) ont été mises en réaction pour créer la solution mère d'ABTS. Le mélange a été laissé dans

l'obscurité pendant 16 heures avant d'être utilisé. Ensuite, la solution de travail ABTS a été préparée avec une absorbance de 0,70 à 734 nm.

Une valeur de 160 µL de la solution d'ABTS ont ensuite été combinés avec 40 µL d'extrait à différentes concentrations. Les combinaisons ont été incubées dans l'obscurité pendant 10 minutes à température ambiante. Le méthanol a été utilisé à la place de l'extrait comme contrôle. L'acide ascorbique, le BHA, le BHT et le Trolox ont été utilisés comme étalons.

L'absorbance a été mesurée à 734 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques à 96 puits. La capacité de piégeage de l'ABTS a été exprimée en IC₅₀ (µg/mL) et la formule suivante a été utilisée pour déterminer le pourcentage d'inhibition (I%) associé à l'activité de piégeage de chaque extrait sur l'ABTS.

$$\% \text{ d'inhibition de l'ABTS} = [(A_o - A_s) / A_o] \times 100.$$

- A_o représente l'absorption du contrôle.
- A_s l'absorption de la solution d'extrait testée.

2.1.3. Test du pouvoir réducteur ferrique antioxydant (FRAP)

Le test FRAP quantifie la capacité réductrice d'un antioxydant par sa réaction avec un complexe de tripyridyltriazine ferrique (Fe³⁺-TPTZ), ce qui entraîne la formation d'un tripyridyltriazine ferreux coloré (Fe²⁺ + -TPTZ) (Gordon, 1990). Les caractéristiques réductrices des composés fonctionnent en interrompant la chaîne des radicaux libres par le don d'un atome d'hydrogène (Duh *et al.*, 1999; Rice-Evans *et al.*, 1997).

La méthodologie de Oyaizu (1986) a été suivie pour déterminer l'activité du pouvoir réducteur des extraits de l'*E. guttatum* avec des ajustements mineurs pour s'adapter au lecteur de microplaques. En bref, 10 µl des différentes concentrations de l'extrait brut et de ses fractions ont été combinés avec 40 µl de tampon phosphate (0,2 M, pH 6,6) et 50 µl de ferricyanure de potassium (1%), et la plaque a été incubée pendant 20 minutes à 50°C. Ensuite, de l'acide trichloracétique à 10 % (50 µL), de l'eau distillée (40 µL) et du chlorure ferrique FeCl₃ à 0,1 % (10 µL) ont été ajoutés. Après lecture des absorptions à 700 nm, la concentration correspondant à l'absorption à 0,50 nm a été estimée comme A_{0,5} (µg/mL). Le pouvoir réducteur des différents extraits a été contrasté avec les étalons suivants : acide ascorbique, BHA et BHT.

2.1.4. Test de la réduction des nanoparticules d'argent (Ag⁺)

La capacité antioxydante des extraits de la plante a été évaluée en utilisant la méthode de réduction des ions d'argent (Ag⁺) pour créer des nanoparticules d'argent sphériques qui ont été observées par spectrophotométrie en mesurant l'absorbance à 423 nm **Özyürek et al. (2012)**. Selon le protocole décrit par **Özyürek et al. (2012)**, 50 mL de nitrate d'argent (AgNO₃ (1,0 mM)) ont été chauffés pendant 10 minutes. Ensuite, 5 mL de citrate trisodique (1 %) ont été ajoutés goutte à goutte jusqu'à l'obtention d'une couleur jaune pâle. Le mélange a ensuite été laissé à refroidir à température ambiante. Environ 130 mL de solution de SNP et 50 mL d'eau distillée ont été ajoutés à 20 µL de différentes doses d'extraits/fractions de plante dissoutes dans du méthanol, et après incubation à 25°C pendant 30 min, l'absorbance a été mesurée à 423 nm. La concentration correspondant à l'absorption à 0,50 nm a été estimée comme A_{0,5} (µg/mL), et les résultats ont été comparés à ceux de l'acide ascorbique et du Trolox.

2.1.5. Test de la Phénanthroline

Le test de la Phénanthroline repose sur la réduction des ions Fe³⁺ en ions Fe²⁺ par un antioxydant. L'ion Fe²⁺ s'est formé et a ensuite interagi avec l'ortho-Phénanthroline pour produire un complexe rouge-orange (**Yefrida et al., 2018**).

Selon le protocole de **Szydłowska-Czerniak et al. (2008)**, 10 µL de chaque échantillon à différentes concentrations, 50 µL de chlorure ferrique FeCl₃ (0,2 %), 30 µL de solution de Phénanthroline (0,5 %) et 110 µL de méthanol, ont été combinés. Les mélanges obtenus ont été incubés à 30 °C pendant 20 minutes. Les résultats ont été comparés aux antioxydants standards Trolox et acide ascorbique et ont été exprimés en absorbance A_{0,5} µg/mL, qui indiquait la concentration produisant 0,5 absorbance. L'absorbance a été mesurée à 510 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques à 96 puits.

2.2. Tests d'inhibition enzymatiques

2.2.1. Activité inhibitrice de l'alpha-amylase

La méthodologie de **Zengin et al. (2014)** est utilisée pour évaluer l'activité inhibitrice de l'α-amylase (d'origine fongique) de l'EHe d'*E. guttatum*. Les étapes de la procédure ont été brièvement décrites comme suit : Dans une microplaque à 96 puits, 25 µL d'extrait a été combiné à 50 µL d'α-amylase (1 unité). Après une incubation de 10 minutes à 37°C, 50 µL d'amidon à 0,1% ont été ajoutés. La plaque a ensuite été incubée à 37°C pendant 10 minutes. Ensuite, 25 µL de HCl 1M et 100 µL d'IKI ont été ajoutés. L'absorbance a été mesurée à 630 nm en utilisant l'acarbose comme référence. Le pourcentage d'inhibition de l'α-amylase a été calculé à l'aide de l'équation suivante :

$$\%INH=1-[(Ac-Ae)-(As-Ab)/ (Ac-Ae)]$$

Ac : Absorbance [Amidon+ IKI+ HCl+ solvant de l'extrait+ tampon].

Ae : Absorbance [enzyme+ amidon+ IKI+ HCL+ solvant de l'extrait].

As : Absorbance [enzyme+ extrait+ amidon+ IKI+ HCl].

Ab : Absorbance [Extrait+ IKI+ tampon].

2.2.2. Activité anticholinestérasique

La méthode de **Ellman *et al.* (1961)** a été utilisée pour tester l'EHe pour d'éventuelles activités anti-acétylcholinestérase et anti-butyrylcholinestérase. 150 µL de tampon phosphate de sodium (100 mM, pH 8,0), 10 µL de l'échantillon à tester et 20 µL d'AChE ou de BChE ont été placés dans une plaque à 96 puits. Tous les composants ont été laissés à incuber à 25°C pendant 15 minutes. Enfin, 10 µL de DTNB (5,5'-Dithiobis (acide 2-nitrobenzoïque)) et 10 µL d'iodure d'Acétylthiocholine (0,71 mM, substrat de l'AChE) ou d'iodure de Butyrylthiocholine (0,2 mM, substrat de la BChE) ont été ajoutés. L'absorbance a été mesurée à 412 nm à 0 et 15 minutes, en utilisant la galantamine comme standard.

Le taux d'inhibition (I %) a été mesuré en utilisant la formule suivante :

$$(\%) \text{ inhibition AChE (BChE)} = [(Absorbance \text{ du Contrôle} - Absorbance \text{ d'Extrait}) / Absorbance \text{ du contrôle}] \times 100$$

2.3. Evaluation de l'effet photoprotecteur

Nous avons utilisé la technique de **Mansur *et al.* (1986)** pour tester le facteur de protection solaire (FPS) de l'EHe d'*E. guttatum*. Les absorbances des échantillons ont été mesurées à une concentration de 2 mg/mL à sept longueurs d'onde, espacées de 5 nm, de 290 à 320 nm, et réalisée en trois exemplaires pour chaque évaluation.

Le SPF a été calculé à l'aide de la formule suivante :

$$FPS= CF \times \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \times I(\lambda) \times Abs(\lambda)$$

- EE : spectre de l'effet érythémateux.
- I : spectre d'intensité solaire.
- Abs : absorbance du produit de protection solaire.
- CF : facteur de correction (= 10).

Les valeurs de : EE, X et I sont des constantes déterminées par (**Sayre *et al.*, 1979**) (**Tableau 3**).

Tableau 3. Relation entre l'effet érythémogène et l'intensité du rayonnement à chaque longueur d'onde (Mansur et al., 1986).

Longueur d'onde λ (nm)	EE (λ)x I(λ) (Normes)
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0837
320	0,0180
Total	1

2.4. Activité antimicrobienne

Le choix des micro-organismes pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'extrait hydroéthanolique (EHe) de la plante s'est fondé sur leur implication dans diverses pathologies humaines. Le groupe des bactéries à Gram négatif comprenait notamment *Salmonella typhi* ATCC 14028, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25953, *Vibrio paraheamolyticus* ; tandis que le groupe des bactéries à Gram positif incluait *Listeria monocytogenes* ATCC 13932, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et une souche de *Candida albicans*. Ces souches ont été obtenues auprès du laboratoire de microbiologie du centre de recherche en sciences pharmaceutiques de Constantine (Algérie).

L'étude de l'activité antimicrobienne a été réalisée afin de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'extrait EHe d'*Erodium guttatum*. La méthode de dilution en milieu gélosé a été utilisée, conformément aux recommandations du Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2018). Des concentrations décroissantes de l'extrait (11,32 ; 5,66 ; 2,83 ; 1,41 ; 0,70 ; 0,35 ; 0,17 ; 0,08 ; 0,04 ; 0,02 et 0,01 mg/mL) ont été incorporées dans le milieu Mueller-Hinton (MH) (BIOKAR®, France) (1 ml de chaque concentration), préalablement fondu et maintenu à environ 45 °C avant solidification. Une suspension bactérienne standardisée à 0,5 sur l'échelle de McFarland (10^8 UFC/mL) a été préparée pour chaque souche testée. Cette suspension a ensuite été diluée pour obtenir une concentration finale d'environ 10^7 UFC/mL, puis 2 μ L ($\approx 10^4$ UFC) ont été déposés, par spots, sur la surface des boîtes de Pétri contenant les différentes concentrations de l'extrait. Un milieu MH sans extrait a été utilisé comme contrôle négatif, tandis que des milieux contenant des antibiotiques

(Amikacine, gentamicine) de référence ont servi de contrôles positifs. Les boîtes de Pétri ont ensuite été incubées en aérobiose à 37 °C pendant 24 heures. Après incubation, une évaluation visuelle a permis d’apprécier la croissance bactérienne sur les plaques. L'absence de croissance indique l'inhibition de la souche testée, tandis que la présence de colonies reflète sa résistance à la concentration d'extrait incorporée dans la gélose.

3. Evaluation des activités biologiques *In Vivo*

Le schéma ci-dessous illustre les différentes étapes du protocole expérimental *in vivo* que nous avons suivi.

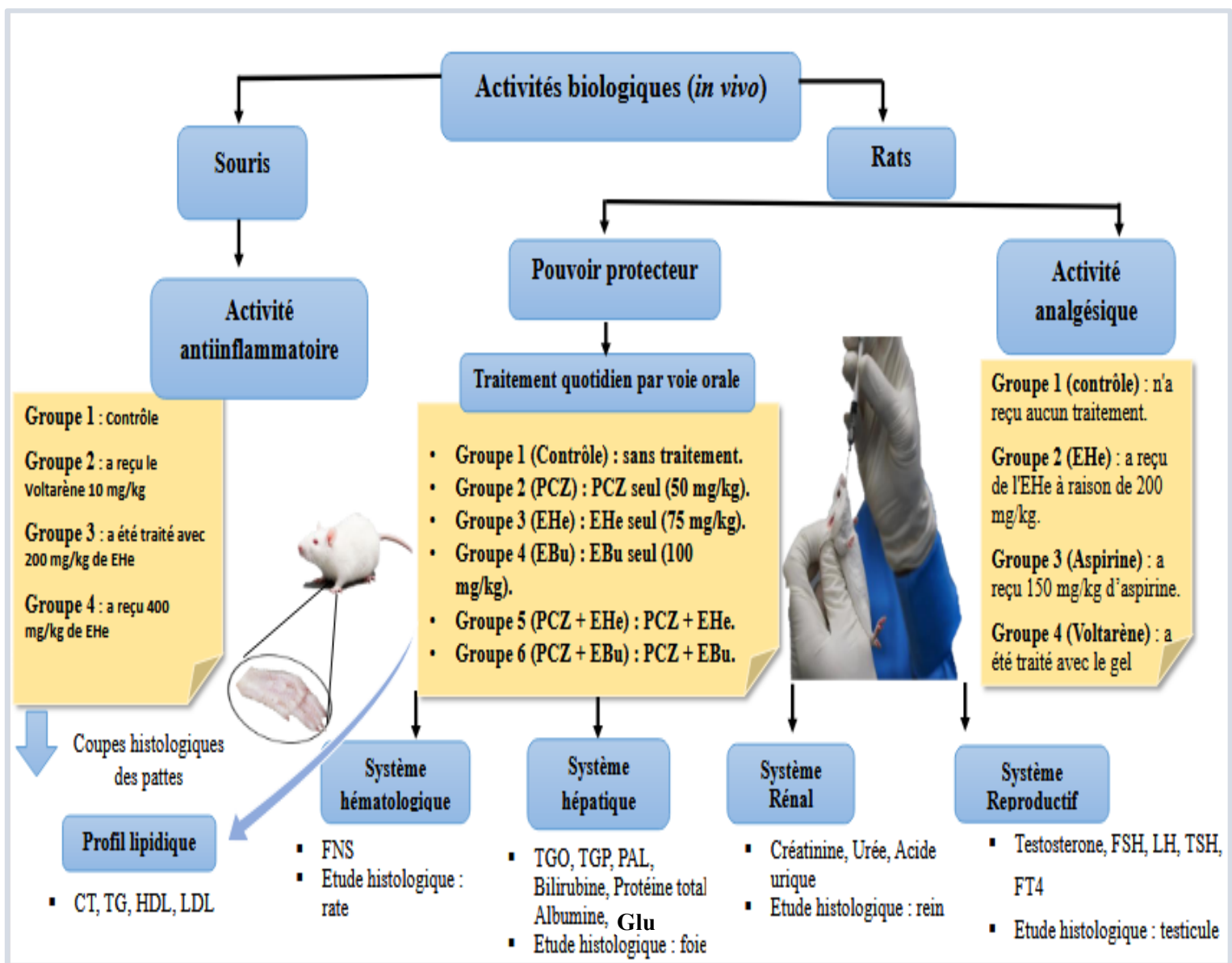


Figure 6. Les activités biologiques *in vivo* et les différentes étapes du protocole expérimental de l'étude du pouvoir protecteur des extraits d'*E. guttatum* contre la toxicité du propiconazole

3.1 Animaux et conditions d'élevage

Pour l'évaluation des activités biologiques *in vivo* nous avons utilisé soixante-deux rats (62) rats mâles de la souche albinos Wistar pesant environ 200 g et vingt-quatre (24) souris mâles pesant environ 30 g de la souche BALB/c. Les animaux ont été obtenus auprès de l'Institut Pasteur (Alger, Algérie). Ces rats ont été soumis à une période d'adaptation de deux semaines environ aux conditions de l'animalerie ; à une température de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$ et une photopériode naturelle.

3.2. Activité analgésique (méthode d'immersion de la queue)

L'activité analgésique a été évaluée à l'aide de la méthode d'immersion de la queue, conformément au protocole décrit par **Chen *et al.* (2011)** avec de légères modifications. Dans cette expérience, 4 groupes de 5 rats ont été utilisés et traités comme suit : Pour le groupe de contrôle négatif (**GC**), les rats ont reçu de l'eau physiologique par voie orale ; pour le premier groupe de contrôle positif (**GA**), les rats ont reçu de l'aspirine (médicament standard 150 mg/kg/pc par voie orale) ; pour le deuxième groupe positif (**GD**), les rats ont reçu une application externe de gel de diclofénac sur la queue ; et pour le dernier groupe (**GP**), les rats ont été traités avec 200 mg/kg/pc d'EHe de la plante par voie orale. Les animaux ont été mis à jeun pendant 16 heures. Après l'administration ou l'application des médicaments standard et de l'extrait végétal, le temps de réflexe basal, qui est le temps nécessaire en secondes pour se retirer de la source d'eau chaude, a été mesuré à différents intervalles (0, 30, 60, 120, 90, 180 min) en immergeant l'extrémité de la queue des rats dans de l'eau chaude chauffée à 55°C , et les résultats ont été comparés à ceux des groupes de contrôle négatif.

3.3. Activité anti-inflammatoire

Pour évaluer l'effet anti-inflammatoire de l'extrait de l'EHe de la plante *E. guttatum*, l'œdème de la patte de souris induit par le formol a été utilisé selon la méthode de **Tjølsen *et al.* (1992)**. Dans cette expérimentation, nous avons utilisé quatre groupes de six souris chacun. Les souris ont subi une période de jeûne de 24 heures avant le test. Une solution de formol à 1 % (100 μL /patte) a été administrée par injection dans l'aponévrose de la plante du pied droit des souris. Le diamètre standard de la patte des souris a été mesuré à l'aide d'un pied à coulisse numérique trente minutes avant le test.

Les souris ont été traitées par voie orale une heure avant l'injection du formol comme suit :

- **(1) Groupe (Gt)** : Les souris ont reçu une solution saline physiologique (témoins).
- **(2) Groupe (Diclofénac)** : Les souris ont été traitées par 10 mg/kg de diclofénac sodique.

- **(3) Groupe (P1)** : Les souris ont reçu 200 mg/kg d'extrait EHe.
- **(4) Groupe (p2)** : Les souris ont reçu 400 mg/kg d'extrait EHe.

Après l'injection de formol, nous avons mesuré l'épaisseur de la patte (mm) à 1, 2, 3, 4, 5 et 24 heures et calculé le pourcentage d'inhibition de l'œdème de la patte en utilisant la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{[(V_t - V_0) \text{ contrôle négatif} - (V_t - V_0) \text{ traité}]}{(V_t - V_0) \text{ contrôle négatif}} \times 100$$

- V_0 représente le volume de la patte à $t = 0$ (avant l'injection de formol).

- V_t est le volume de la patte à tout moment t .

3.4. Evaluation du pouvoir protecteur des extraits *E. guttatum* contre la toxicité du propiconazole

Pour déterminer les effets protecteurs de la plante *E. guttatum* contre les désordres physiopathologiques induits par un pesticide chez les rats, le propiconazole, un pesticide de la classe des fongicides, a été choisi comme produit toxique.

Le propiconazole est un fongicide triazole (C₁₅H₁₇Cl₂N₃O₂), commercialisé sous le nom de Propivap (250 g/kg de propiconazole). Il a été acheté à la division agricole de la SARL Bpi/Enh Doudah en Algérie (fabriqué en Jordanie).

Pour cette évaluation, les extraits EHe et EBU ont été sélectionnés en raison de leur rendement plus élevé comparé à celui des autres extraits.

3.4.1. Protocole expérimental

Après 15 jours d'adaptation, les rats ont été divisés en six groupes de sept rats chacun. La dose de PCZ est de 50 mg/kg/poids corporel (1/30 LD₅₀) et a été choisie en fonction de la littérature (Taxvig et al., 2008).

Les doses des extraits utilisés ont été choisies selon les indications de (Mrabti et al., 2021; Benrahou et al., 2022c).

Le traitement a été réalisé quotidiennement chaque matin pendant huit semaines consécutives selon le **Tableau 4**.

Tableau 4. Plan de répartition et de traitement des rats avec le propiconazole et les extraits d'*Erodium guttatum* sur une période expérimentale de 60 jours.

Groupes	Traitement	Doses
	Volume 1mL	
(1) Groupe (GC)	Eau distillée	/
(2) Groupe (PCZ)	Propiconazole	50 mg/kg pc/j
(3) Groupe (EHe.)	Extrait hydroéthanolique	75 mg/kg pc/j
(4) Groupe (EBu)	Extrait n-butanol	100 mg/kg pc/j
(5) Groupe (PCZ+EHe)	• Extrait hydroéthanolique	75 mg/kg pc/j
	• Propiconazole (après 40 min)	50mg/kg pc/j
(6) Groupe (PCZ+EBu)	• Extrait n-butanol	100 mg/kg pc/j
	• Propiconazole (après 40 min)	50 mg/kg pc/j

3.4.2. Suivi de l'état clinique et du poids corporel des rats

Les signes cliniques de toxicité tels que la température, appétit, motricité, comportement et états des selles, et des urines sont observés chaque jour. Le poids corporel des rats est mesuré chaque cinq jours le long de l'expérimentation.

3.4.3. Sacrifice des rats et prélèvement des échantillons

À la fin de l'expérimentation (8 semaines de traitement) et après 12 heures de jeûne, les rats ont été sacrifiés par décapitation cervicale sans anesthésie pour éviter le stress des animaux. Le prélèvement sanguin a été effectué à partir d'une ponction cardiaque. Le sang recueilli est placé dans des tubes à EDTA (pour le dosage des paramètres hématologiques), à héparine (pour la détermination des paramètres biochimiques) et des tubes secs pour l'estimation des hormones. Ensuite, après une dissection, quelques organes (foie, rein, rate et testicule) ont été soigneusement prélevés, rincés dans l'eau physiologique, puis pesés à l'aide d'une balance de précision. Enfin, les organes sont conservés dans le formol à 10 % pour réaliser l'étude histologique.

Le poids relatif est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Poids relatif } \% = \frac{\text{poids de l'organe}}{\text{poids de l'animal}} \times 100$$

3.4.4. Dosage

Le dosage des différents paramètres a été effectué auprès des laboratoires d'analyse médicale de SONATRACH de Skikda et de l'hôpital de Saad Guermech de Skikda à l'aide de kits de réactifs commerciaux (Biomaghreb, BIOLABO).

A) Détermination des paramètres hématologiques

Le sang recueilli dans les tubes EDTA a permis de déterminer l'hémogramme, qui est un examen hématologique permettant la mesure des paramètres suivant : l'hémoglobine (Hb), l'hématocrite (Ht), la numération des érythrocytes (GR), la numération des leucocytes (GB) et la numération des plaquettes (PLQ). Les principales constantes érythrocytaires : le volume globulaire moyen (VGM), la teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH) et la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH). Tous ces paramètres sont estimés sur un automate d'hématologie Mindray BC-5380.

B). Détermination des paramètres biochimiques

Le dosage des paramètres biochimiques plasmatiques a été réalisé sur l'automate auto-analyseur BF-240 Mindray.

Dosage de l'activité de l'Alanine Aminotransférase (ALAT / TGP) et l'Aspartate Aminotransférase (ASAT / TGO)

Le dosage des enzymes ALAT et ASAT est basé sur des réactions enzymatiques. Dans l'ALAT, l'enzyme catalyse la transformation de l'alanine en pyruvate, puis s'ensuit une réaction ultérieure où le pyruvate est réduit en lactate par le lactate déshydrogénase (LDH) en présence de NADH. L'ASAT catalyse la transformation de l'aspartate en oxaloacétate, puis l'oxaloacétate est réduit en malate par la malate déshydrogénase (MDH) en présence de NADH. Les deux dosages impliquent la détermination de l'activité enzymatique par spectrophotométrie, où la réduction de l'absorbance résultant de la conversion du NADH en NAD⁺ est directement liée à l'activité enzymatique, entraînant à une longueur d'onde de 340 nm (Skala *et al.*, 1981).

Dosage de la phosphatase alcaline

Le dosage de la phosphatase alcaline repose sur une méthode colorimétrique, où l'enzyme hydrolyse un substrat synthétique, généralement le p-nitrophenyl phosphate en p-nitrophénol et phosphate en milieu (Bowers Jr & McComb, 1975).

Dosage de la bilirubine totale

Le dosage de la bilirubine utilise une méthode colorimétrique dans laquelle la bilirubine réagit avec un réactif diazoïque pour former un complexe coloré. L'absorbance de ce complexe

est mesurée par spectrophotométrie, et la concentration de bilirubine est déterminée en comparant l'absorbance à celle d'un étalon connu (**Westwood, 1991**).

Dosage des protéines totales

Le dosage des protéines totales est basé sur l'utilisation de la méthode de Biuret, dans laquelle les protéines réagissent avec le réactif de Biuret en milieu alcalin afin de former un complexe coloré. L'intensité de cette couleur, mesurée par spectrophotométrie, est proportionnelle à la concentration des protéines présentes dans l'échantillon (**Sapan et al., 1999**).

Dosage de l'albumine

Le dosage de l'albumine sérique repose sur sa fixation spécifique au vert de bromocrésol en milieu acide, formant un complexe vert mesurable à 628 nm ; pour cela, 10 µL de sérum sont incubés avec 1 mL de réactif BCG (tampon succinate, pH 4,2) pendant 5 minutes à 25 °C, selon la méthode de **Doumas et al. (1971)**, cette méthode étant simple, rapide et largement utilisée en biochimie clinique.

Dosage de la glycémie

La glycémie a été dosée par la méthode enzymatique GOD-POD, basée sur l'oxydation du glucose par la glucose oxydase, suivie d'une réaction colorée catalysée par la peroxydase et mesurée à 505 nm (**Trinder, 1969**).

Dosage de la créatinine

La méthode colorimétrique de Jaffé est souvent utilisée. La créatinine réagit avec le picrate alcalin pour former un complexe coloré, dont l'intensité est proportionnelle à la concentration de créatinine dans l'échantillon. L'absorbance du complexe coloré est mesurée par spectrophotométrie (**Delanghe & Speeckaert, 2011**).

Dosage de l'urée

Le dosage de l'urée est effectué par la méthode enzymatique à l'uréase. Dans cette méthode, l'enzyme uréase catalyse la dégradation de l'urée en ammoniac et dioxyde de carbone. L'ammoniac produit est ensuite quantifié par une réaction chimique qui forme un composé coloré, mesuré par spectrophotométrie. La concentration d'urée est proportionnelle à l'intensité de la couleur (**Glick, 1969**).

Dosage de l'acide urique

Le dosage de l'acide urique est souvent réalisé par la méthode enzymatique à l'urate oxydase. L'enzyme urate oxydase catalyse l'oxydation de l'acide urique en allantoïne et en

peroxyde d'hydrogène. Le peroxyde d'hydrogène formé est ensuite mesuré par une réaction chimique qui produit un composé coloré. La concentration d'acide urique est proportionnelle à l'intensité de la couleur, mesurée par spectrophotométrie (**Pollet & Galliot, 1975**).

Dosage des paramètres du profil lipidique

Le bilan lipidique est un examen biologique permettant d'évaluer les différents paramètres lipidiques dans le sang, notamment le cholestérol total (TC), les triglycérides (TG), les lipoprotéines de basse densité (LDL, ou "mauvais cholestérol"), les lipoprotéines de haute densité (HDL, ou "bon cholestérol"). Ce bilan est essentiel pour détecter des anomalies du métabolisme lipidique.

L'évaluation du profil lipidique est effectuée à l'aide de méthodes biochimiques qui reposent sur des réactions enzymatiques spécifiques suivies de mesures spectrophotométriques. En ce qui concerne le cholestérol, l'enzyme cholestérol oxydase est employée afin d'oxyder le cholestérol, ce qui conduit à la production d'un composé pouvant être détecté (**Allain *et al.*, 1974**). En ce qui concerne les triglycérides, ces derniers subissent une hydrolyse par une lipase afin de libérer du glycérol, qui est ensuite quantifié (**Klotzsch & McNamara, 1990**). Le HDL et le LDL, on utilise des agents de précipitation ou des techniques de sélectivité enzymatique afin de séparer chaque fraction (**Miller *et al.*, 2010**).

C). Dosages des hormones

Le dosage de la testostérone, de la LH (hormone lutéinisante), de la FSH (hormone folliculostimulante), de la TSH (thyroïd stimulating hormone) et de la T4 (thyroxine) utilise des méthodes immuno-enzymatiques (ELISA), où chaque hormone se lie à des anticorps spécifiques couplés à une enzyme, et la réaction avec un substrat chromogène produit une couleur proportionnelle à la concentration de l'hormone ; cette intensité de couleur est mesurée par spectrophotométrie pour déterminer les concentrations des hormones dans l'échantillon (**Mistretta *et al.*, 2009**).

3.4.5. Concentration des spermatozoïdes

La concentration des spermatozoïdes est évaluée à l'aide d'une cellule de Malassez. Après dissection, les spermatozoïdes sont prélevés à partir des épидидymes, puis immédiatement dilués dans une solution physiologique préchauffée à 37 °C afin de préserver leur viabilité. L'échantillon obtenu est ensuite homogénéisé, puis une goutte du mélange est déposée dans la cellule de Malassez et recouverte d'une lamelle. Le comptage est effectué au microscope optique à un grossissement de $\times 40$ dans cinq champs distincts. La concentration des spermatozoïdes est ensuite déterminée à l'aide de l'équation suivante.

$$\text{Concentration (spz. } 10^6 \text{ /ml)} = (\mathbf{D} \times \mathbf{V} \times \mathbf{n}) / \mathbf{N}$$

D : coefficient de dilution (50).

V : volume de la cellule de Malassez.

n : le nombre de spermatozoïdes comptés dans 05 cellules.

N : le nombre de petites cellules

3.4.6. Etude anatomopathologique

Les coupes histologiques ont été réalisées à l'hôpital de Skikda, Service d'Anatomie Pathologique, selon la technique décrite par (Martoja and Martoja ,1967). La technique comporte les étapes suivantes :

➤ **Fixation**

Les spécimens prélevés lors de la dissection des rats et des souris ont été conservés dans du formol à 10 % afin de réaliser des coupes histologiques. Une fixation dans cette étape est indispensable pour conserver les caractères morphologiques et moléculaires tissulaires en bloquant l'autolyse, donc préserve au maximum l'intégrité chimique des tissus.

➤ **Prélèvements des sections tissulaires**

Après la fixation, chaque échantillon est déterminé individuellement par inspection oculaire. Les fragments sélectionnés doivent être placés dans des cassettes spécifiques. Toutes les cassettes sont assemblées dans le stabilisateur en attendant la prochaine étape.

➤ **Déshydratation**

Le but de cette technique est d'éliminer l'eau présente dans les organes en immergeant successivement les cassettes contenant les échantillons dans des bains d'alcool (éthanol) de plus en plus concentrés, allant de 70 % d'alcool à 100 % d'alcool absolu, suivis de bains de xylène. Cette méthode permet une déshydratation progressive et efficace des tissus. Cette phase de préparation est essentielle pour favoriser la fusion des molécules, car la paraffine, en tant que substance hydrophobe, crée un environnement favorable à leur fusion.

➤ **Inclusion et réalisation des blocs**

Son objectif est de faciliter la réalisation de coupes fines et uniformes. Le matériau d'enrobage employé est la paraffine. Le prélèvement est immergé dans de la paraffine à fondre chauffée à 56°C, la restituant du liquide et permettant ainsi son infiltration dans toute la pièce. Une fois refroidi, on obtient un bloc de paraffine dur à l'intérieur duquel la pièce prélevée est incluse.

➤ **Confection des coupes**

Le processus consiste à faire passer le bloc de paraffine à travers un microtome, un instrument utilisé en histologie, qui permet de découper des tranches de section d'une épaisseur variant entre 2 et 5 μm . Ces tranches sont ensuite disposées en série de manière régulière sous forme de rubans, facilitant ainsi l'analyse microscopique des échantillons. Les coupes, qui sont de fines tranches d'échantillons biologiques ou de matériaux, sont délicatement déposées sur des lames de verre transparentes et propres.

➤ **Déparaffinage et réhydratation**

Dans cette étape, les lames sont soumises à une température de 100°C pendant une durée de 20 minutes à l'intérieur d'une étuve, puis immergées successivement dans deux bains de xylène, un solvant couramment utilisé pour dissoudre la paraffine sur les lames. Ensuite, afin de réhydrater les tissus de manière progressive, les lames sont successivement immergées dans des bains contenant de l'éthanol à des concentrations décroissantes (100 %, 90 %, 80 % et 70 %), et enfin immergées dans de l'eau distillée afin de permettre la pénétration des colorants hydrophiles dans les tissus.

➤ **Coloration**

Les coupes réhydratées ont été placées dans un bain d'hématoxyline pendant quinze minutes pour colorer les noyaux. L'excès de colorant est éliminé dans un bain d'eau du robinet (3 minutes), suivi d'un bain d'alcool acide (10 minutes) et d'un rinçage à l'eau du robinet. Par la suite, les échantillons sont immergés dans une solution d'éosine pendant une minute afin de colorer le cytoplasme, puis tout excès de colorant est éliminé en les rinçant à l'eau. En conclusion, les spécimens sont desséchés, éclaircis, puis montés entre une lame et une lamelle à l'aide d'une résine synthétique ayant un indice de réfraction similaire à celui du verre. L'analyse a été effectuée en utilisant un microscope Euromex® muni d'une caméra et du logiciel Image Focus Plus V2.

4. Etude d'amarrage moléculaire

La structure cristalline de départ du récepteur de la prégnane X (PXR) (PDB : 5A86, résolution : 2,25 Å) (Xue *et al.*, 2015) a été extraite de la Protéine Data Bank, suivie de l'élimination des molécules d'eau, du prétraitement et de la minimisation de l'énergie à l'aide du protocole Protéine Préparation Wizards de la Schrödinger Suite (Madhavi Sastry *et al.*, 2013). Les structures des ligands ont été construites à l'aide de l'interface Schrödinger Maestro, puis préparées à l'aide de LigPrep (Schrödinger, 2015) afin d'attribuer les états de protonation appropriés à pH 7,4 \pm 1,0 et les types d'atomes. Les ordres de liaison ont été attribués et les atomes d'hydrogène ont été ajoutés aux structures des ligands. Une grille de 25 \times 25 \times 25 Å a

été générée autour du ligand co-cristallisé à l'aide de Glide 7.1 (Friesner *et al.*, 2004). Des simulations d'amarrage flexibles ont été réalisées en utilisant le mode d'amarrage à précision unique (SP), et la pose présentant le meilleur score d'amarrage a été sélectionnée comme pose d'amarrage prédite (Friesner *et al.*, 2006).

5. Analyse statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel IBM SPSS (version 25). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type (SD) pour les activités *in vitro* ainsi que pour les activités analgésique et anti-inflammatoire (*in vivo*), et en moyenne \pm erreur standard de la moyenne (SEM) pour l'activité protectrice des extraits végétaux contre la toxicité induite par le fongicide (*in vivo*). L'ensemble des données a été soumis à une analyse de variance unidirectionnelle (ANOVA), suivie du test post hoc de Tukey pour la comparaison des moyennes. Les différences ont été considérées comme statistiquement significatives pour une valeur de $p < 0,05$. Le coefficient de corrélation de Pearson (r) a été utilisé pour évaluer les relations entre les différentes variables.

Résultats et discussion

1. Etude phytochimique

1.1. Evaluation des rendements d'extraits

L'extraction représente une étape cruciale dans la recherche visant à isoler et identifier les composés bioactifs présents dans les plantes (**Jha & Sit, 2022**). Parmi les techniques les plus couramment utilisées pour l'extraction de composés phénoliques, la macération et l'extraction assistée par ultrasons occupent une place importante. Les rendements obtenus lors de ces extractions montrent une variation significative, s'étendant de 1,02 % à 36,40 %. Les extraits hydrométhanolique (EHm) et hydroéthanolique (EHe) se démarquent par les rendements les plus élevés, atteignant respectivement 34,84 % et 36,40 %. Ils sont suivis, dans l'ordre décroissant, par l'extrait butanolique (EBu) (15,85 %), l'extrait d'acétate d'éthyle (EAe) (11,42 %), l'extrait chloroformique (Ech) (1,37 %), et enfin l'extrait hexanique (EH), qui présente le rendement le plus faible avec 1.02 % (**Tableau 5**).

Les résultats obtenus peuvent être expliqués par une corrélation évidente entre la polarité du solvant et le taux d'extraction, en raison de la plus grande solubilité des composés chimiques, notamment des composés phénoliques, dans les solvants polaires par rapport aux solvants non polaires (**Do et al., 2014; Alara et al., 2021**).

1.2. Teneur totale en composés phénoliques et flavonoïdes

La quantification des polyphénols et des flavonoïdes dans les différents extraits de la partie aérienne d'*E. guttatum* a été réalisée en utilisant respectivement la méthode au réactif de Folin-Ciocalteu et celle au trichlorure d'aluminium, qui sont des méthodes simples et peu coûteuses et offrent une bonne sensibilité. Les teneurs ont été déterminées à l'aide de courbes d'étalonnage établies en fonction de concentrations croissantes d'acide gallique pour les polyphénols et de quercétine pour les flavonoïdes (**Figure 7**), et les teneurs phénoliques totales (TPT) et les teneurs en flavonoïdes totaux (TFT) de l'ensemble des extraits sont présentées dans le **Tableau 5**.

Nos résultats révèlent une variation importante et significative des teneurs en polyphénols totaux entre les différents extraits, avec des valeurs comprises entre 21,76 et 332,76 µg EAG/mg. L'EAe se distingue par la teneur en polyphénols totaux la plus élevée ($332,76 \pm 1,10$ µg EAG/mg E), suivie par l'EBu ($324,52 \pm 0,34$ µg EAG/mg), l'EHm ($310,97 \pm 3,94$ µg EAG/mg), l'EHe ($208,09 \pm 0,25$ µg EAG/mg) et l'ECh ($121,74 \pm 0,13$ µg EAG/mg). En revanche, l'EH présente la teneur en polyphénols totaux la plus faible, $21,38 \pm 0,38$ µg GAE/mg.

En ce qui concerne les flavonoïdes totaux, l'E Ae affiche également la teneur la plus élevée, atteignant $192,07 \pm 1,26 \mu\text{g EQ/mg}$, les autres extraits présentent des teneurs en flavonoïdes totaux comprises entre 1.22 et $97,07 \pm 1,4 \mu\text{g EQ/mg}$, la quantité la plus faible étant enregistrée pour l'EH.

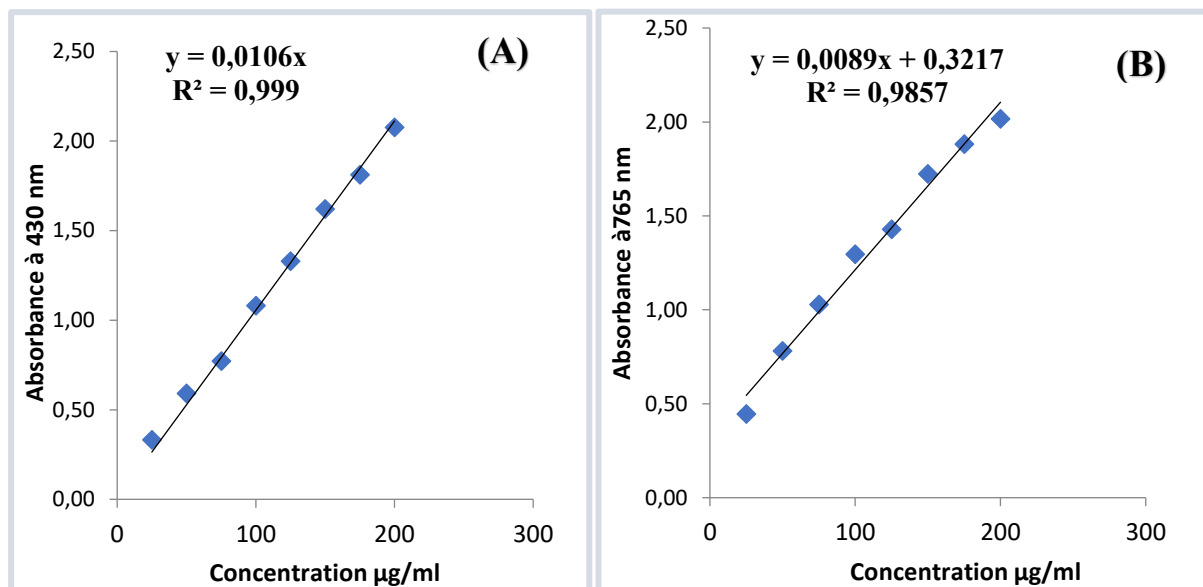


Figure 7. Droite d'étalonnage des absorbances relatives en fonction des concentrations de quercétine (A) et d'acide gallique (B)

Tableau 5. Rendement et teneur en polyphénols et flavonoïdes totaux des différents extraits des parties aériennes d'*E. guttatum*.

Extraits	Rendement (%)	Teneur totale en polyphénols ($\mu\text{g EAG/mg}$)	Teneur totale en flavonoïdes ($\mu\text{g EQ/mg}$)
EHm	34.84	$310.97 \pm 3,94^d$	71.32 ± 1.67^b
EHe	36,40	208.09 ± 0.25^c	97.07 ± 1.4^c
EBu	15.85	324.52 ± 0.34^c	93.67 ± 1.4^c
E Ae	11.42	332.76 ± 1.10^f	192.07 ± 1.26^d
Ech	1.37	121.74 ± 0.13^b	3.01 ± 0.13^a
EH	1.02	21.38 ± 0.38^a	1.22 ± 0.8^a

Les données sont exprimées en moyenne \pm S.D. (n= 3) ; ($\mu\text{g EAG/mg}$) : μg d'équivalent acide gallique par mg d'extrait végétal ; ($\mu\text{g EQ/mg}$) : μg d'équivalent quercétine par mg d'extrait végétal. Les valeurs avec des exposants différents (a, b, c, d, e et f) dans les mêmes colonnes sont significativement différentes ($p < 0.05$).

Nos résultats sont proches de ceux de **Mrabti et al. (2021)**, où les valeurs du TPT et du TFT de l'extrait méthanolique d'*E. guttatum* d'origine marocaine étaient respectivement de $279,71 \pm 0,31$ mg GAE/g et de $118,58 \pm 0,14$ mg QE/g. De même, nos résultats sont meilleurs que ceux rapportés par **Hamza et al. (2018)** où les valeurs du TPT et du TFT de l'extrait hydrométhanolique d'*E. guttatum* d'origine tunisienne sont respectivement de 124 ± 6 mg GAE/g et $52 \pm 2,3$ mg QE/g. En comparaison avec d'autres plantes du même genre, nos résultats sont supérieurs à ceux rapportés par **Cüce et al. (2022)**, qui ont obtenu une teneur en polyphénols totaux de 87.95 ± 6.47 mg GAE/g pour l'extrait hydrométhanolique de *E. hendrikii*. En revanche, l'étude de **Samet et al. (2022)** a mis en évidence des valeurs de TPT pour *E. arborescens* qui sont plus élevées que les nôtres, en particulier dans l'extrait d'hexane (205.92 ± 4.20 mg GAE/g d'extrait) et l'extrait méthanolique (382.42 ± 8.57 mg GAE/g d'extrait), et qui étaient inférieures dans l'extrait d'acétate d'éthyle (266.20 ± 4.17 mg GAE/g d'extrait). Cependant, dans la même étude, la teneur en TFT des extraits de méthanol était de 29.85 ± 0.40 mg QE/g et celle de l'acétate d'éthyle de 26.38 ± 0.51 mg QE/g, moins que celles obtenues dans notre travail.

La variation de la teneur en composés phénoliques et en flavonoïdes entre les mêmes espèces et les espèces du même genre peut être attribuée à un certain nombre de raisons, notamment aux différences de conditions environnementales telles que le climat, la salinité, la situation géographique, La récolte de la plante au stade de floraison, les procédures d'extraction et le choix des solvants qui affectent de manière significative la composition et la quantité de composés phénoliques dans les extraits, comme l'ont démontré de nombreuses études (**Medini et al., 2014; Ghaffar & Perveen, 2024; Harboub et al., 2024; Šola et al., 2025**).

1.3. Identification des constituants phytochimiques des extraits par LC-MS/MS

L'analyse phytochimique des extraits par LC-MS/MS a révélé la présence de plusieurs composés phénoliques (**Tableau 6, Figures 8, 9 et 10**) Parmi les 39 standards utilisés, l'analyse a permis d'identifier 16 composés phénoliques dans l'EHe, 17 dans l'Ech, 14 dans EBU: les composants sont des dérivés de l'acide hydroxybenzoïque (acide shikimique, acide gallique, acide protocatéchique et acide salicylique), dérivés de l'acide cinnamique (acide o-coumarique, acide trans-férulique, acide caféique et acide chlorogénique), flavonols (quercétine), glycosides de flavonol (quercétine 3-xyloside, Kaempferol-3-glucoside et isoquercitrine), des flavanones (hespéridine), des flavones (lutéoline), des aldéhydes phénoliques (vanilline et hydroxybenzaldéhyde), des acides phénoliques liés à des esters (ester éthylique de Protocatéchique), des stilbènes (resvératrol) et enfin des alcaloïde (caféine et la capsaïcine).

Tous les extraits contiennent une quantité significative d'acide shikimique (le composant majeur), ce qui concorde avec (**Ljolić Bilić et al., 2022**). Des recherches récentes ont examiné en détail les activités biologiques dans des contextes *in vitro* et *in vivo* et ont prouvé les effets anti-inflammatoires, antiviraux, antibactériens, hypolipidémiques et neuroprotecteurs, ainsi que les effets antidiabétiques et antioxydants de l'acide shikimique (**Gandhi et al., 2023**). Nos résultats ont montré que l'acide gallique est apparu comme l'un des constituants les plus répandus dans l'espèce de *guttatum*, évident dans les extraits polaires. **Bilić et al. (2020)** ont observé des résultats similaires. Ils ont identifié l'acide gallique comme un composant prédominant dans *E. cicutarium*, avec des concentrations allant de 0,679 à 2,310 mg/g dans les extraits aqueux et méthanolique provenant de quatre sites en Croatie. Ils ont également constaté que, sur les 85 substances chimiques identifiées, la majorité (24 d'entre elles) étaient des dérivés de l'acide gallique. En outre, **Cüce et al. (2022)** ont signalé que l'acide gallique était l'un des principaux acides phénoliques présents dans *E. hendrikii* sous forme de glycoside (2 450,51 nmol/g) ou de liaison ester (527,05 nmol/g). De plus, il a été démontré que l'acide gallique a une variété d'effets positifs, y compris des propriétés anti-inflammatoires, anticancéreuses, antioxydantes, antibactériennes, cardioprotectrices, neuroprotectrices et gastro-protectrices (**Fernandes et al., 2022**).

D'autres acides phénoliques, présents à des concentrations considérables dans nos extraits, ont été identifiés, notamment l'acide protocatéchuique, l'acide o-coumarique, l'acide salicylique et l'acide trans-férulique. Ces résultats sont confirmés par **Bakari et al. (2018)** et **Cüce et al. (2022)**. Bien que certains acides phénoliques soient absents ou trouvés sous forme de trace dans nos extraits, comme l'acide caféique qui était présent dans les extraits hydroalcooliques de fleurs et de feuilles de la plante *E. glaucophyllum* (**Bakari et al., 2018**), et dans les extraits aqueux et méthanolique d'*E. cicutarium* collectés sur quatre sites en Croatie (**Bilić et al., 2020**), alors que **Cüce et al. (2022)** ont trouvé que l'acide phénolique le plus abondant dans l'extrait brut d'*E. hendrikii* était l'acide caféique.

La quercétine-3-d-xyloside, également connue sous le nom de reynoutrine, est apparue comme le flavonoïde prédominant dans la partie aérienne de notre plante. Ce flavonoïde naturel a été couramment trouvé dans les fruits et les feuilles de diverses plantes, mais sa présence dans le genre *Erodium* n'a pas encore été identifiée. Malgré que **Bilić et al. (2020)**, bien qu'ils aient élargi les connaissances en identifiant huit dérivés glycosidiques de la quercétine dans *E. cicutarium*, la recherche indique que la reynoutrine présente des propriétés antioxydantes et possède des effets antiviraux (**Rehman et al., 2018; Butkevičiūtė et al., 2020**). De nombreuses

études ont également rapporté que la reynoutrine améliorait significativement la fonction cardiaque, supprimait la mort des cardiomyocytes, réduisait la libération d'agents inflammatoires, diminuait le stress oxydatif et atténuait la fibrose myocardique (Yang *et al.*, 2021), et empêchait l'induction d'un cancer du sein de progresser (Yüksel *et al.*, 2022). Nos extraits contiennent de l'hespéridine qui était le flavonoïde le plus répandu dans l'EBu polaire (4164,703 µg/l). Ces résultats sont cohérents avec ceux de Cüce *et al.* (2022), qui ont également noté que le principal flavonoïde dans l'extrait brut hydrométhanolique est l'hespéridine dans *E. hendrikii*, et selon la recherche, l'hespéridine a un large éventail de propriétés biologiques, y compris le potentiel de prévention du diabète, du cancer, de l'hyperlipidémie, des ulcères, de l'athérosclérose et de la protection du foie. Elle peut également posséder des effets anti-inflammatoires, antimicrobiens, antifongiques, antioxydants, antihypertenseurs et antiallergiques (Li *et al.*, 2018).

Par ailleurs, d'autres flavonoïdes présents dans la partie aérienne d'*E. guttatum* sont connus pour leurs effets biologiques tels que l'isoquercitrine, la quercétine, et la lutéoline, et ils ont été confirmés par Çelikler Özer *et al.* (2020) et Berber *et al.* (2022). La rutine est reconnue comme l'un des meilleurs antioxydants naturels de sa catégorie et est réputée pour ses diverses activités pharmacologiques, notamment ses propriétés anti-inflammatoires, antibactériennes, antivirales, antiprotozoaires, antitumorales, cytoprotectives, antiplaquettaires, vasoactives, antihypertensives, antispasmodiques, hypolipidémiques et antiallergéniques (Patel & Patel, 2019). S'il n'est pas présent dans la partie aérienne de la plante *E. guttatum*, il est présent dans diverses espèces appartenant au genre *Erodium* comme *E. glaucophyllum*, *E. cicutarium*, *E. arborescens*, *E. chium*, *E. crassifolium*, *E. laciniatum*, *E. malacoides*, *E. moschatum*, *E. neuradifolium*, *E. oxvrrhynchum*, *E. pulverulentum*, *E. touchyanum* (Saleh *et al.*, 1983; Çelikler Özer *et al.*, 2020). En général, les variations de la présence, de l'absence ou de la concentration de différents composés phénoliques observées dans diverses études peuvent être dues à plusieurs raisons possibles, notamment l'espèce végétale, les conditions de croissance, la technique d'extraction, le type de chromatographie, la mesure et les susceptibilités à la dégradation (Pajak *et al.*, 2014).

Tableau 6. Profil phytochimique déterminé par LC-MS-MS de l'Ech, EHe et EBU de la partie aérienne d'*E. guttatum*.

N°	Analyte	TR	Concentration µg/l			Source d'ions.	Transitions ioniques	Mode d'ionisation	R2	LQ (ug/L)	LD (ug/L)	Linéarité Range (ug/L)
			Ech	EHe	EBu							
1	Acide Shikimique	1.336	34269,673	9974,19	63342,109	ESI	173.0 -> 93.1	Négative	0.9992	78.7970	20.3983	75-4800
2	Acide Gallique	3.166	246,105	2201,38	582,236	ESI	169.0 -> 125.1	Négative	0.9986	18.5862	7.1674	31.25-500
3	Acide Protocatéchique	5.467	60,7508	384,839	ND	ESI	153.0 -> 109.0	Négative	0.9969	13.1729	3.1564	15.625-250
4	Epigallocatechine	6.870	ND	ND	ND	ESI	307.0 -> 139.0	Positive	0.9995	3.8750	2.0903	12.5-200
5	Catéchine	6.935	ND	ND	ND	ESI	288.9 -> 245.1	Négative	0.9946	7.5013	1.7055	343.750-5500
6	Acide Chlorogénique	7.467	33,628	25,898	ND	ESI	353.0 -> 191.0	Négative	0.9981	25.9023	11.5890	31.25-500
7	Hydroxy benzaldéhyde	7.783	106,775	10,049	12,173	ESI	121.0 -> 92.0	Négative	0.9993	12.8651	4.9742	15.625-250
8	Acide Vanillique	7.852	ND	ND	ND	ESI	167.0 -> 151.8	Négative	0.9958	1424.2132	219.0421	1250-20000
9	Vanilline	8.662	35,359	ND	Trace	ESI	153.0 -> 125.0	Positive	0.9949	40.5411	14.5885	62.5-1000
10	Acide Syringique	8.437	ND	ND	ND	ESI	197.1 -> 181.8	Négative	0.9990	857.3388	358.5000	1250-20000
11	Acide caféique	7.847	Trace	Trace	Trace	ESI	178.9 -> 135.1	Négative	0.9994	24.1620	6.9205	31.25-500
12	Caféine	8.419	ND	Trace	Trace	ESI	195.0 -> 137.9	Positive	0.9986	15.4959	6.8099	18.75-300
13	Acide o-coumarique	9.315	36,4158	37,622	ND	ESI	163.0 -> 119.1	Négative	0.9996	7.9973	4.0164	15.625-500
14	Acide Salicylique	9.769	195,795	104,139	76,679	ESI	137.0 -> 93.1	Négative	0.9981	82.9646	47.6695	112.5-1800

15	Taxifolia	9.733	ND	ND	ND	ESI	304.8 -> 258.9	Positive	0.9938	23.5110	11.0294	37.5-600
16	Resvératrol	9.772	ND	ND	Trace	ESI	229.0 -> 107.0	Positive	0.9910	13.5575	4.5806	18.75-300
17	Polydatine	9.615	ND	ND	ND	ESI	390.9 -> 228.9	Positive	0.9987	1.8411	1.1471	7.8125-125
18	Acide trans-férulique	9.986	446,660	89,357	ND	ESI	193.1 -> 133.9	Négative	0.9950	11.5276	6.1184	31.25-1000
19	Acide Sinapique	10.335	ND	ND	ND	ESI	223.1 -> 208.0	Négative	0.9972	4.9652	1.9437	125-2000
20	Scutellarine	11.054	ND	ND	ND	ESI	462.8 -> 286.8	Positive	0.9978	4.0013	3.1346	9.375-300
21	Acide p-coumarique	11.536	ND	ND	ND	ESI	163.0 -> 119.0	Négative	0.9987	1.5416	3.5348	31.25-500
22	Protocatéchuique éthyle ester	11.410	18,965	ND	ND	ESI	181.0 -> 107.9	Négative	0.9996	24.9201	14.5610	15.625-1000
23	Hespéridine	11.320	889,939	439,708	4164,703	ESI	611.0 -> 302.9	Positive	0.9957	17.6753	4.1396	31.25-500
24	Isoquercitrin	11.398	703,776	1760,535	1408,043	ESI	464.9 -> 302.8	Positive	0.9982	11.2680	9.9382	18.75-300
25	Rutine	12.336	ND	ND	ND	ESI	611.0 -> 302.8	Positive	0.9980	240.6720	59.5597	125-2000
26	Quercétine-3-xyloside	12.105	389,014	5205,947	749,868	ESI	432.7 -> 299.5	Négative	0.9900	69.4059	18.7126	125-2000
27	Kaempférol-3-glucoside	12.845	ND	66,527	28,631	ESI	448.8 -> 286.9	Positive	0.9997	4.5238	1.1609	7.8125-125
28	Quercétine	14.417	50,422	372,578	55,049	ESI	300.8 -> 151.0	Négative	0.9964	16.9127	4.6558	27.5-440
29	Fisétine	13.150	ND	ND	ND	ESI	287.0 -> 137.0	Positive	0.9954	44.3662	10.8961	15.625-250
30	Baïcaline	17.143	ND	ND	ND	ESI	446.8 -> 270.9	Positive	0.9991	3.0988	0.5276	15.625-250
31	Chrysin	14.524	ND	ND	ND	ESI	254.9 -> 153.0	Positive	0.9989	0.1338	0.0737	1.5625-25

32	Acide Trans-cinnamique	14.331	ND	ND	ND	ESI	149.0 -> 131.1	Positive	0.9999	22.0279	11.1853	31.25-500
33	Morin	15.828	ND	ND	ND	ESI	302.8 -> 153.0	Positive	0.9981	0.5284	0.1253	1.5625-50
34	Baicalein	17.025	ND	ND	ND	ESI	271.0 -> 123.0	Positive	0.9988	0.9631	0.5955	1.5625-25
35	Lutéoline	17.421	123,650	166,898	155,555	ESI	285.0 -> 133.1	Positive	0.9962	21.4535	20.0000	31.25-500
36	Biochanine A	17.918	ND	ND	ND	ESI	284.9 -> 151.9	Positive	0.9963	0.7333	0.1475	1.5625-25
37	Daidzéine	14.187	ND	ND	ND	ESI	254.9 -> 128.0	Positive	0.995	420	140	530-26500
38	Capsaïcine	18.043	0,209	ND	ND	ESI	306.1-> 137.0	Positive	0.998	172	86	9700-97000
39	Diosgénine	23.54	ND	ND	ND	ESI	415.0-> 271.0	Positive	0.996	1000	330	10000-60000

LQ : Limite de Quantification, LD : Limite de Détection, TR : temps de rétention, ND : Non détecté.

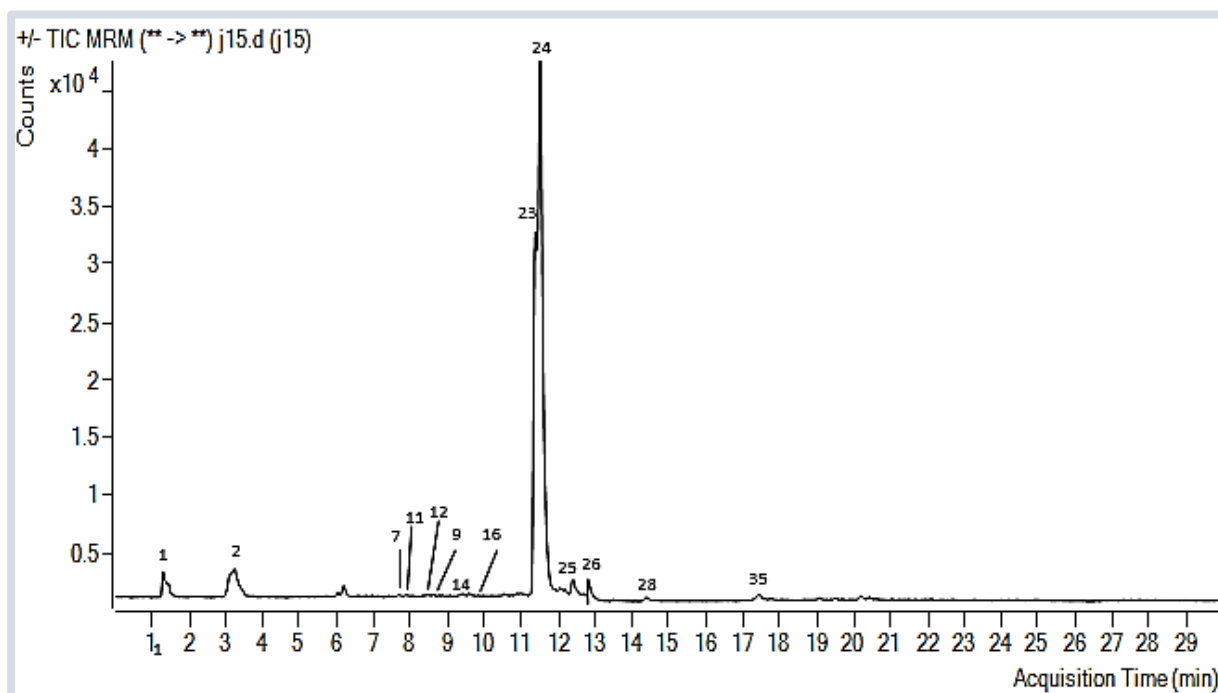


Figure 8. Spectre chromatographique de l'EBu d'*E. guttatum*

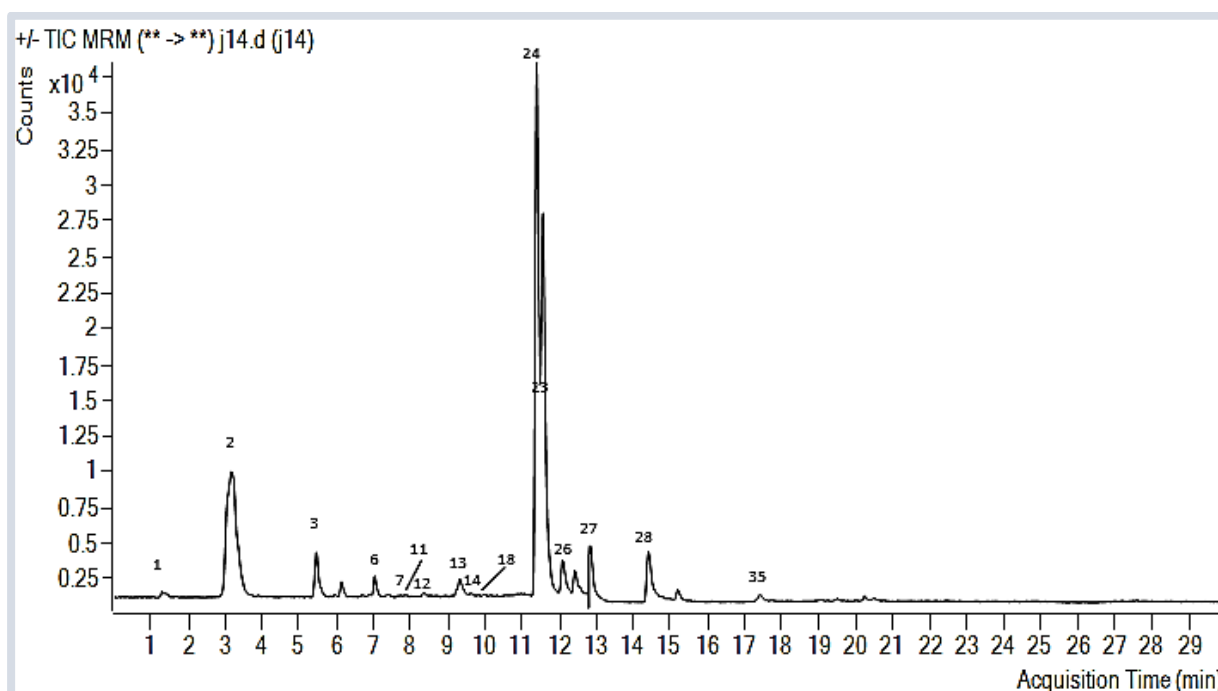


Figure 9. Spectre chromatographique de l'EHe d'*E. guttatum*

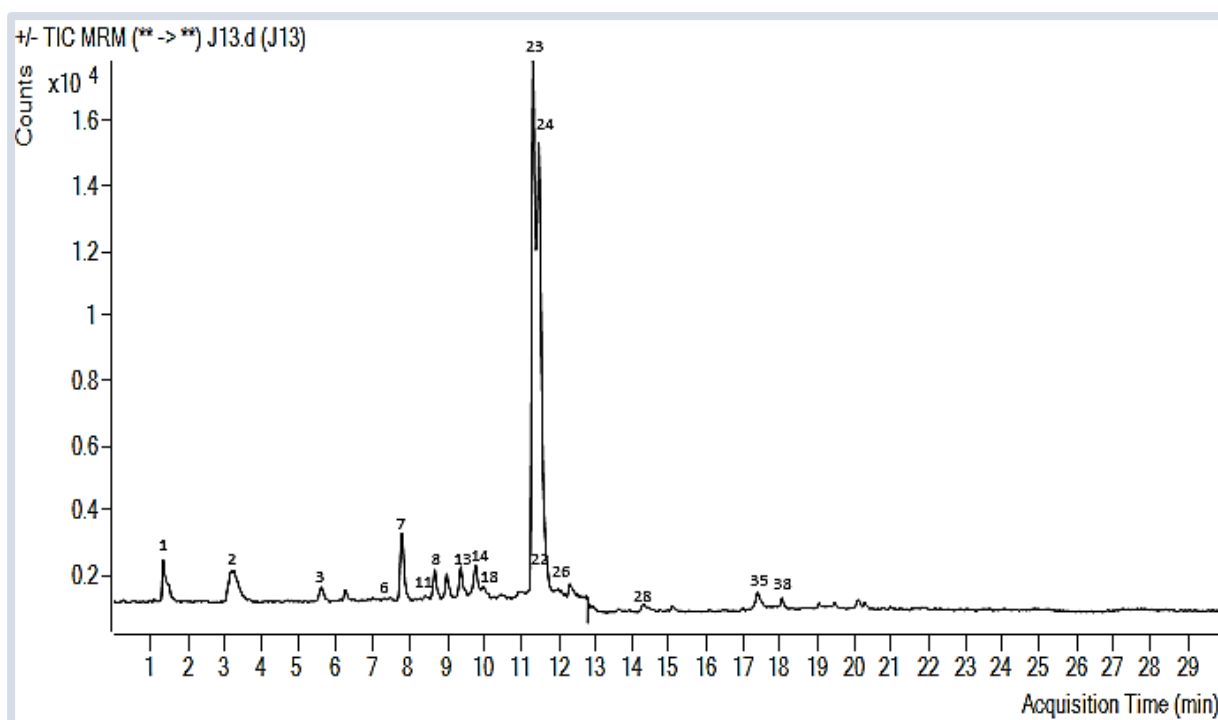


Figure 10. Spectre chromatographique de l'Éch d'*E. guttatum*

1.4. Identification des composés apolaires de l'extrait hexanique par GC/MS

La technique GC/MS (Tableau 7, Figure 11) a révélé la présence de trois acides gras dans notre extrait: l'ester méthylique de l'acide hexadécanoïque qui possède de nombreuses propriétés biologiques: anticancer, hépatoprotecteur, antihistaminique, antiarthritique, anti-coronarien, hypocholestérolémie, anti-eczéma, anti-acné, inhibiteur de l'alpha-réductase, anti-androgène, nématocide, insecticide, et effets anti-inflammatoires (Krishnamoorthy & Subramaniam, 2014), l'ester méthylique de l'acide 9-octadécénoïque (E), et enfin le stéarate de méthyle, qui présente certaines activités biologiques telles que l'activité antidiarrhéique, cytotoxique et antiproliférative (Akeem *et al.*, 2020).

Tableau 7. Profil des acides gras par GC/MS de l'extrait n-hexane.

N°	Analyte	TR	Aire	Aire%	Hauteur	Hauteur %	Similarité %	Formule
01	L'ester méthylique de l'acide hexadécanoïque	16.755	389817	46.90	74632	63.98	97	C17H34O2
02	L'ester méthylique de l'acide 9-octadécénoïque (E)	24.699	302141	36.35	2996	19.71	96	C19H36O2
03	Le stéarate de méthyle	26.749	139186	16.75	9016	16.30	94	C19H38O2

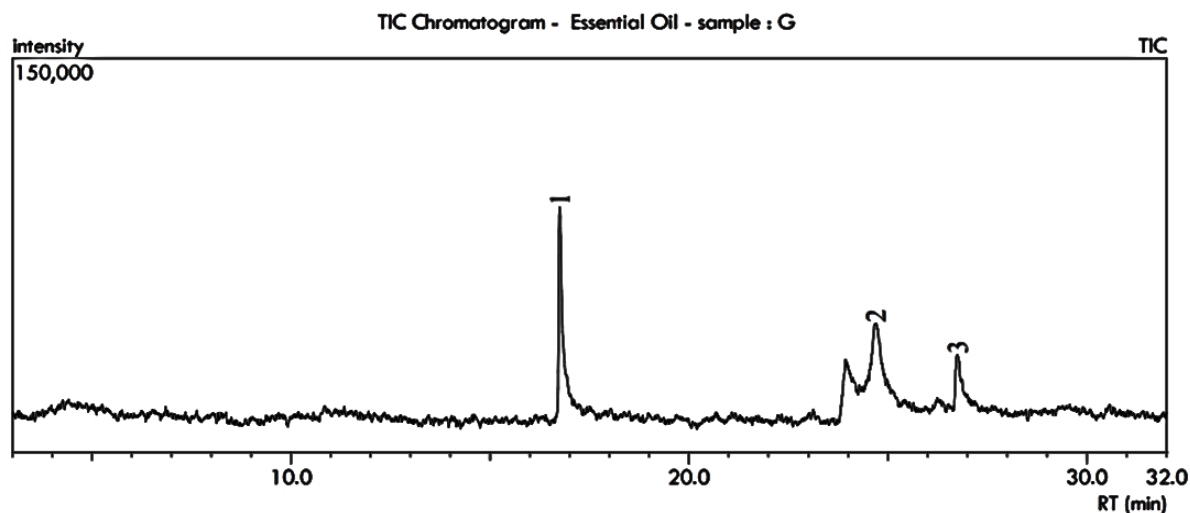


Figure 11. Chromatogramme GC/MS de l'extrait de n-hexane d'*E. guttatum*.

2. Evaluation des activités biologiques *In vitro*

2.1 Activité antioxydante

Pour évaluer l'activité antioxydante, il est fortement conseillé de combiner au moins deux méthodes, car les processus de réactions, les paramètres expérimentaux, la composition des extraits et le comportement des métabolites antioxydants peuvent différer d'une méthode à l'autre. Cela permettra d'obtenir des informations complètes sur l'efficacité antioxydante (Zhong *et al.*, 2022). Dans la présente étude, l'activité antioxydante des extraits de la partie aérienne d'*E. guttatum* a été étudiée à l'aide de cinq tests (DPPH, ABTS, FRAP, SNP et Phénanthroline) et les résultats sont présentés dans le **Tableau 8** et les **Figures (12, 13, 14, 15, 16 et 17)**.

Le test DPPH est fréquemment utilisé pour évaluer le potentiel antioxydant des extraits de plantes et la capacité des différents composés à piéger les radicaux libres. Pour évaluer l'activité de piégeage des radicaux libres DPPH, les valeurs IC_{50} ont été déterminées pour les extraits. Une activité antioxydante accrue a été observée avec des valeurs IC_{50} plus faibles. Nos résultats indiquent que les extraits polaires démontrent une excellente activité de piégeage du radical DPPH ($p < 0.05$) par rapport aux antioxydants standards (BHA, BHT, Trolox, acide ascorbique), avec des valeurs d'environ $2,37 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$ pour l'EAE, suivie de l'EHm à $3,74 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$, puis de l'EHe à $3,88 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$, et ensuite de l'EBu à $4,84 \pm 0,06 \mu\text{g/mL}$. Inversement, les extraits non polaires présentent une activité modérée, par rapport aux standards, avec l'Ech à $32,29 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$ et l'EH à $37,99 \pm 0,24 \mu\text{g/mL}$. Compte tenu de leur forte capacité à piéger le DPPH, les extraits polaires de la partie aérienne d'*E. guttatum*

indiquent qu'ils contiennent une quantité significative de réductones. De manière similaire à nos résultats, les extraits polaires : acétone, méthanol et acétate d'éthyle d'*E. arborescens* ont montré une activité de piégeage des radicaux DPPH sensiblement accrue par rapport à l'extrait hexanique non polaire (Samet *et al.*, 2022). Nos résultats indiquent que l'EHm de la partie aérienne d'*E. guttatum* peut efficacement piéger les radicaux libres DPPH, avec une IC₅₀ de $3,74 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$ inférieure à l' IC₅₀ rapportée par Mrabti *et al.* (2021) $39,10 \pm 3,28 \mu\text{g/mL}$ pour l'extrait méthanolique et Hamza *et al.* (2018) $56,9 \pm 3,3 \mu\text{g/mL}$ pour l'extrait hydrométhanolique de la même espèce.

L'activité de piégeage des radicaux libres a également été déterminée en utilisant le radical ABTS. D'après les résultats, nous pouvons dire que le radical ABTS a été inhibé par toutes les standards et tous les échantillons testés, l'activité de piégeage du radical ABTS la plus élevée ayant été observée dans l'EAE avec une valeur IC₅₀ de $1,49 \mu\text{g/mL}$. En revanche, l'EH a exercé la faible capacité de piégeage de l'ABTS avec une valeur IC₅₀ de $9,81 \mu\text{g/mL}$. Néanmoins, par rapport aux standards ; BHA, BHT, l'acide ascorbique et Trolox, les extraits polaires testés ont montré une activité de piégeage du radical ABTS significativement plus élevée ($P < 0,05$). Par ailleurs, ces résultats sont cohérents avec les travaux de Bouhedda *et al.* (2024) qui ont démontré que l'extrait méthanolique d'*E. trifolium* d'Algérie inhibe les radicaux ABTS avec des IC₅₀ de $2,06 \pm 0,08 \mu\text{g/mL}$.

Selon le test FRAP, les antioxydants donneurs d'électrons réduisent le complexe ferrique 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (Fe³⁺-tripyridyltriazine) en une forme ferreuse de couleur bleue (Fe²⁺-tripyridyltriazine), et l'augmentation de l'absorbance du milieu réactionnel indique une augmentation du pouvoir des extraits testés. L'activité antioxydante FRAP a été détectée dans tous les échantillons examinés, y compris les standards, indiquant que les deux extraits polaires EAE et EBU présentent un pouvoir réducteur ferrique significatif ($p < 0,05$) remarquablement supérieur à celui des standards, avec des valeurs A_{0,5} pour EAE et EBU qui sont respectivement de $2,98 \pm 0,07$ et $5,04 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$, dépassant significativement celles déterminées pour l'EHm $9,53 \pm 0,07 \mu\text{g/mL}$ et EHe $10,11 \pm 0,53 \mu\text{g/mL}$ et les extraits non polaires de l'EH et du ECh ($15,93 \pm 0,62$ et $11,58 \pm 0,22 \mu\text{g/mL}$, respectivement). De plus, nos résultats pour l'extrait hydrométhanolique se révèlent nettement supérieurs à ceux rapportés par Hamza *et al.* (2018), qui ont démontré que l'extrait hydrométhanolique de la même plante, issu de Tunisie, présentait une valeur d'A_{0,5} de $28,1 \pm 1,8 \mu\text{g/mL}$ dans le cadre du test FRAP.

Tous les extraits ont donné de bons résultats dans le test de la Phénanthroline par rapport aux standards, tout comme le test des nanoparticules d'argent ; dans ce cas également, les

extraits polaires, en particulier l'E Ae ($1,23 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$, $3,62 \pm 0,15 \mu\text{g/mL}$ respectivement), a donné de meilleurs résultats de manière significative ($p < 0,05$) que les extraits non polaires.

Cette excellente capacité antioxydante peut être due à la teneur élevée en composés phénoliques, en particulier dans les extraits polaires, qui semblent être des donneurs d'hydrogène et d'électrons efficaces, et à leur chimie structurale idéale, ainsi qu'à la présence de composants majeurs connus pour leur pouvoir antioxydant tels que les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque (acide gallique, acide protocatéchique, acide salicylique), les dérivés de l'acide cinnamique (acide o-coumarique, acide trans-férulique, acide chlorogénique) (Razzaghi-Asl *et al.*, 2013), les flavonoïdes et ses dérivés (kaempférol, quercétine) (Burda & Oleszek, 2001). De plus, comme une activité biologique nécessite la prise en compte d'une synergie chimique, il ne faut pas ignorer la présence d'autres petits composés phénoliques (Khiya *et al.*, 2021).

Tableau 8. Activité antioxydante des extraits d'*Erodium guttatum* par des tests : DPPH, ABTS, pouvoir réducteur (FRAP), Phénanthroline et nanoparticules d'argent (SNP).

Extraits / Standards	DPPH IC ₅₀ (μg/ml)	ABTS IC ₅₀ (μg/ml)	FRAP A _{0.5} (μg/ml)	SNP A _{0.5} (μg/ml)	Phénanthroline A _{0.5} (μg/ml)
EHm	3.74 ± 0.03 ^b	1.60 ± 0.02 ^a	9.53 ± 0.07 ^c	11.26 ± 0.24 ^c	2.21 ± 0.04 ^b
EHe	3.88 ± 0.03 ^b	6.33 ± 0.13 ^c	10.11 ± 0.53 ^c	15.93 ± 1.06 ^c	2.67 ± 0.10 ^b
EBu	4.84 ± 0.06 ^c	1.65 ± 0.01 ^a	5.04 ± 0.01 ^b	6.30 ± 0.19 ^b	1.41 ± 0.11 ^a
E Ae	2.37 ± 0.02 ^a	1.49 ± 0.02 ^a	2.98 ± 0.07 ^a	3.62 ± 0.15 ^a	1.23 ± 0.01 ^a
Ech	32.29 ± 0.03 ^f	6.89 ± 0.02 ^c	11.58 ± 0.22 ^d	37.96 ± 0.14 ^e	3.86 ± 0.01 ^d
EH	37.99 ± 0.24 ^g	9.81 ± 0.02 ^c	15.93 ± 0.62 ^e	20.32 ± 0.09 ^d	7.78 ± 0.03 ^f
BHA	15.74 ± 0.47 ^c	7.54 ± 0.67 ^d	8.41 ± 0.67 ^c	NT	NT
BHT	6.55 ± 0.59 ^d	1.55 ± 0.26 ^a	>50 ^f	NT	NT
Acide ascorbique	4.39 ± 0.01 ^c	3.04 ± 0.05 ^b	9.01 ± 1.46 ^c	7.14 ± 0.05 ^b	3.08 ± 0.02 ^c
Trolox	5.12 ± 0.21 ^c	3.21 ± 0.06 ^b	NT	34.17 ± 1.23 ^e	5.21 ± 0.27 ^c

La concentration à 50 % d'inhibition et la concentration à 0,5 d'absorbance, respectivement, sont appelées valeurs IC₅₀ et A_{0.5}. En utilisant une analyse de régression linéaire, les valeurs IC₅₀ et A_{0.5} ont été déterminées et exprimées en moyenne ± SD (n = 3). Les valeurs dans les mêmes colonnes qui ont des exposants différents (a, b, c, d, e, f ou g) sont significativement différentes ($p < 0.05$). BHA : butylhydroxyanisole, BHT : butylhydroxytoluène, NT : non testé.

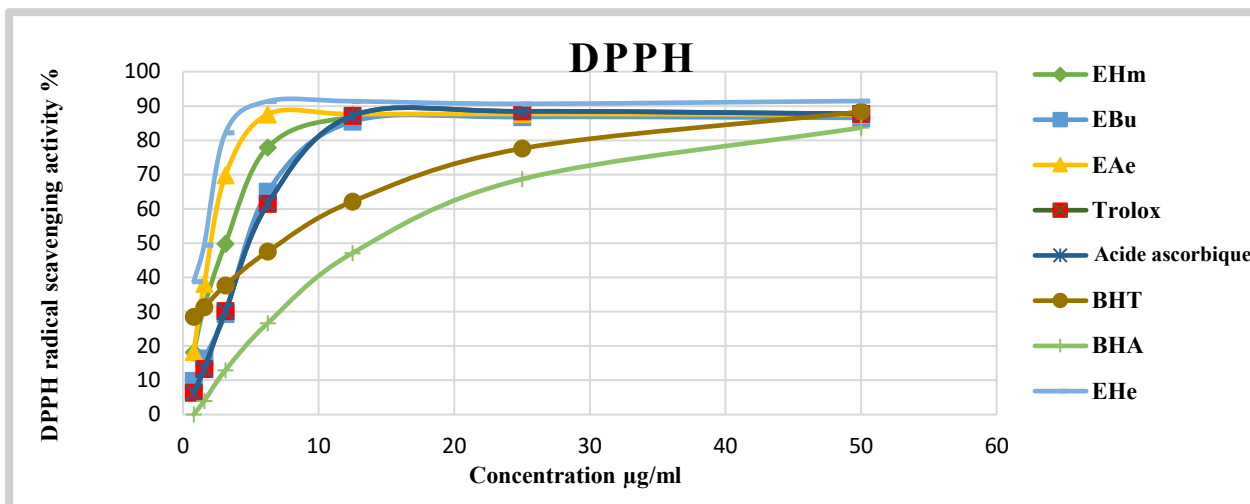


Figure 12. Essai de piégeage de DPPH par les extraits polaires d'*E. guttatum*

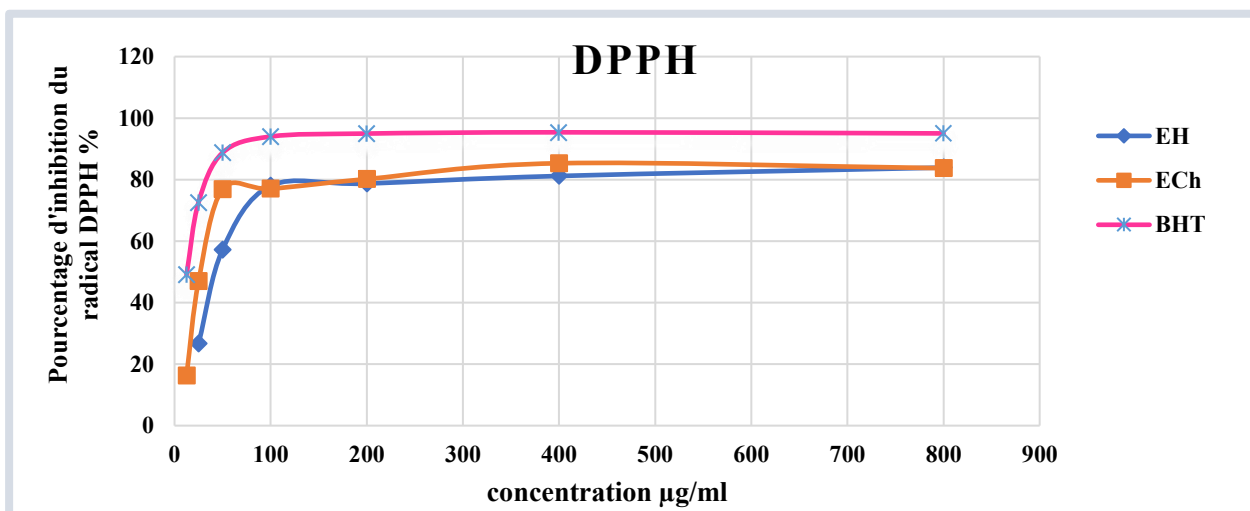


Figure 13. Essai de piégeage de DPPH par les extraits non polaires d'*E. guttatum*

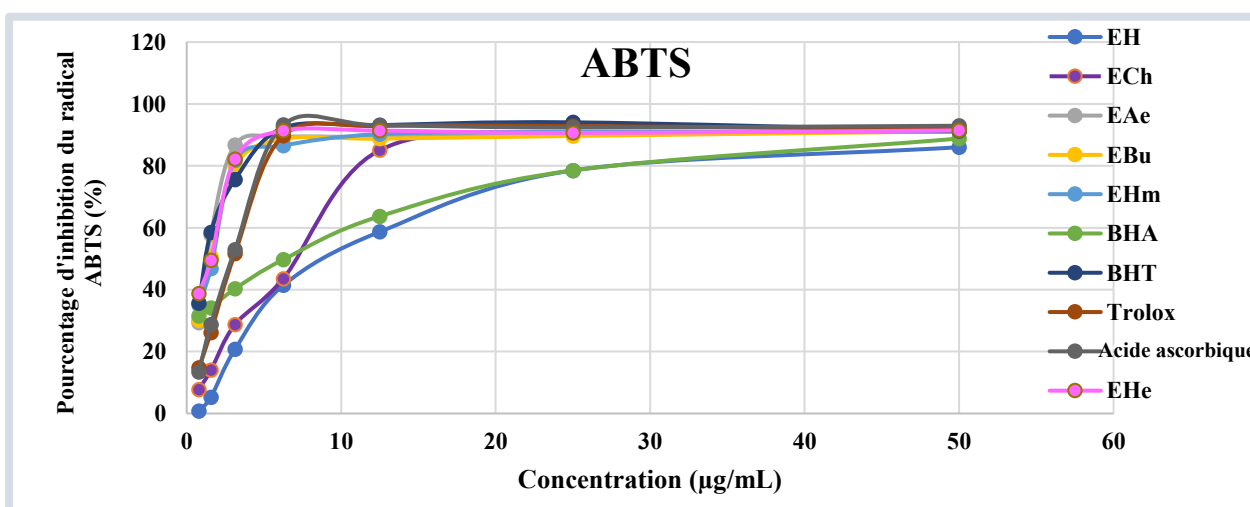


Figure 14. Essai de piégeage du radical ABTS^{•+} par les extraits de la plante *E. guttatum*

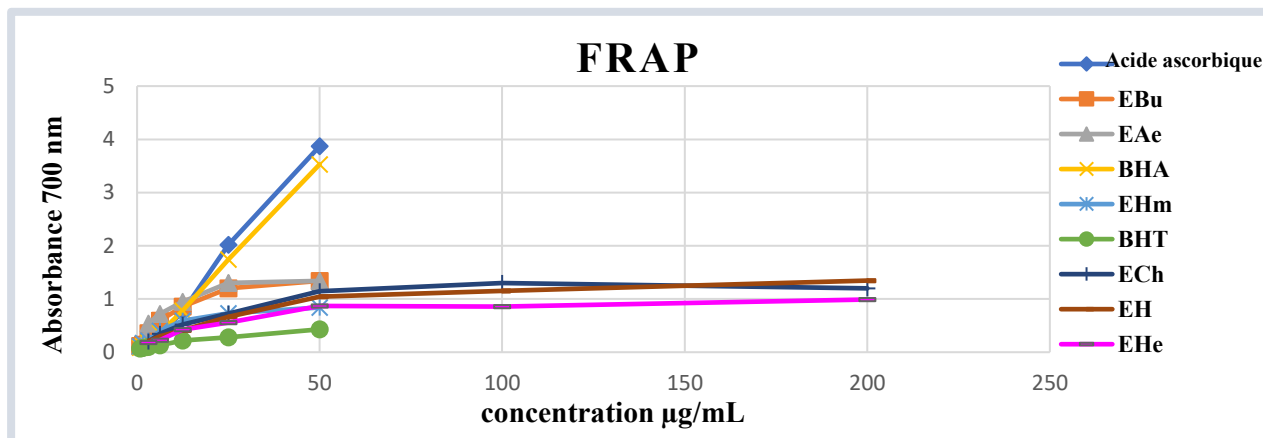


Figure 15. Test du pouvoir réducteur des extraits d'*Erodium guttatum*

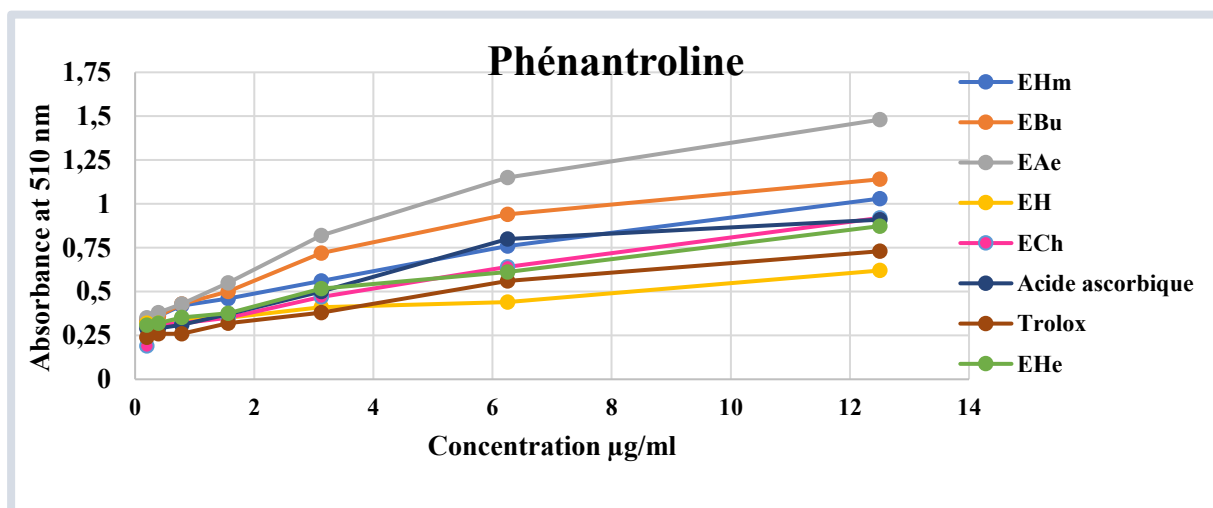


Figure 16. Test à la Phénanthroline pour les extraits d'*Erodium guttatum*

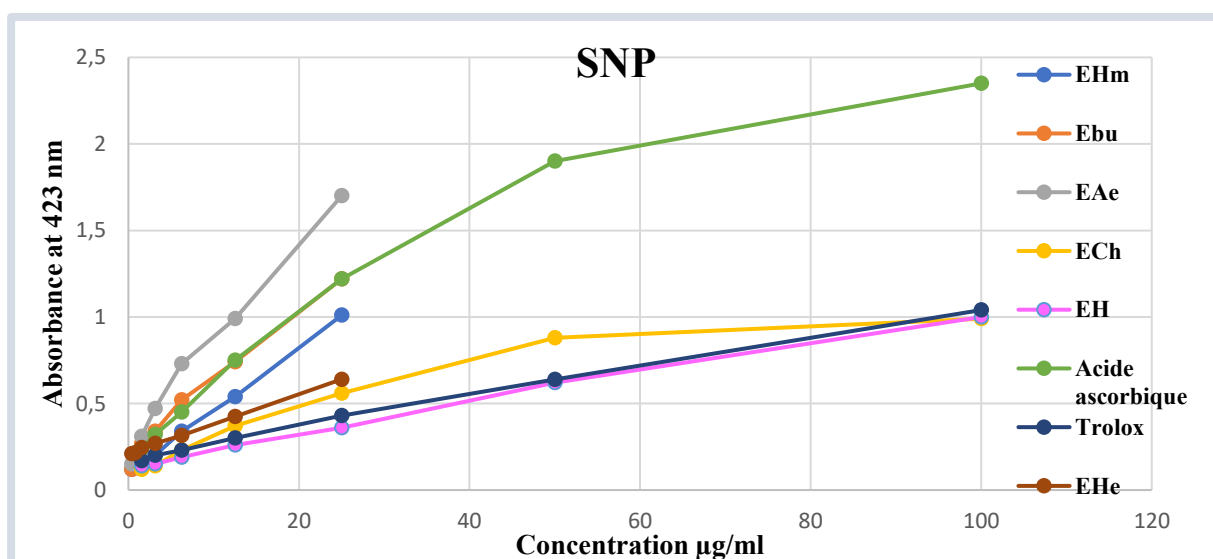


Figure 17. Test SNP pour les extraits d'*Erodium guttatum*

2.2. Corrélations entre les teneurs en composés phénoliques totaux et en flavonoïdes et les capacités antioxydantes

L'analyse des corrélations de Pearson a été utilisée pour examiner les relations entre les teneurs en composés phénoliques (TPC et TFC) et les capacités antioxydantes (DPPH, ABTS, FRAP, SNP et Phénanthroline). Les résultats sont présentés dans le **Tableau 9**. Cependant, la relation entre la teneur en composés phénoliques et les propriétés antioxydantes de cette plante n'a été examinée dans aucune étude jusqu'à présent. La présente étude a montré des corrélations remarquablement fortes et positives entre les activités antioxydantes, les plus élevées étant celles entre DPPH et ABTS ($r = 0,987$, $P < 0,01$), et ABTS et Phénanthroline ($r = 0,955$, $P < 0,01$). Il y avait également des corrélations modérées entre le SNP et les autres activités antioxydantes : ABTS, FRAP et la Phénanthroline ($r = 0,720$, $P < 0,01$), ($r = 0,686$, $P < 0,01$) et ($r = 0,536$, $P < 0,05$) respectivement. En outre, une forte corrélation positive a été observée entre le TPC et le TFC ($r = 0,818$, $P < 0,01$), mais des corrélations négatives fortes et significatives ont été observées entre les composés phénoliques et flavonoïdes et les activités antioxydantes, la corrélation la plus forte étant observée entre le TPC et l'ABTS ($r = -0,999$, $P < 0,01$) et entre le TFC et la FRAP ($r = -0,909$, $P < 0,01$). Une corrélation modérée a été trouvée entre TPC et SNP ($r = -0,741$, $P < 0,01$). Les composés phénoliques contribuent de manière significative aux activités antioxydantes de cette espèce et peuvent donc jouer un rôle essentiel dans ses effets bénéfiques.

Tableau 9. Analyse de corrélation entre les composés phénoliques et l'activité antioxydante des extraits d'*E. guttatum*.

	DPPH	ABTS	FRAP	SNP	Phénanthroline	TPC	TFC
DPPH	1						
ABTS	.987**	1					
FRAP	.872**	.889**	1				
SNP	.816**	.720**	.686**	1			
Phénanthroline	.903**	.955**	.923**	.536*	1		
TPC	-.989**	-.999**	-.908**	-.741**	-.955**	1	
TFC	-.833**	-.795**	-.909**	-.806**	-.756**	.818**	1

** . La corrélation est significative à 0,01, * . La corrélation est significative à 0,05.

2.3. Tests d'inhibition enzymatiques

2.3.1. Activité inhibitrice de l'alpha-amylase

Le diabète est une maladie métabolique répandue et un problème de santé important en raison de sa fréquence et des conséquences qui y sont associées. L'hyperglycémie survient lorsque les enzymes digestives (α -amylase et α -glucosidase) décomposent les hydrates de carbone et absorbent le glucose de la paroi intestinale. L'inhibition de l'activité de ces enzymes est une stratégie productive pour gérer l'hyperglycémie (**Hasaninezhad et al., 2020**). L'EHe a montré un effet inhibiteur modéré sur l'alpha-amylase, avec une valeur IC_{50} de $584,88 \pm 1,38 \mu\text{g/mL}$ par rapport au contrôle $284,33 \pm 0,06 \mu\text{g/mL}$ (**Tableau 10**). Cependant, nos résultats ont été presque identiques à ceux obtenus par **Bouhedda et al. (2024)**, qui ont démontré que l'extrait méthanolique d'*E. trifolium* d'Algérie inhibe l'enzyme α -amylase avec une $IC_{50} > 400 \mu\text{g/mL}$. Cet effet est potentiellement attribuable à la présence de composés phénoliques antioxydants qui peuvent neutraliser les radicaux libres, étant donné que de nombreux processus moléculaires liés au diabète sont liés à l'augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Ainsi, les extraits antioxydants peuvent être bénéfiques pour la gestion du diabète (**Lei et al., 2023**).

2.3.2. Activité anticholinestérasique

Dans notre étude, l'EHe a montré un effet inhibiteur intéressant contre la BChE avec une IC_{50} de $21,42 \pm 0,41 \mu\text{g/mL}$, plus efficace que la galantamine (IC_{50} de $34,75 \pm 1,99 \mu\text{g/mL}$) et n'a pas eu d'impact contre l'AChE (**Tableau 10**). Nos résultats concernant l'inhibition de l'AChE rejoignent ceux de **Bouhedda et al. (2024)**, qui ont rapporté que les extraits méthanolique et d'éther de pétrole d'*E. trifolium* ont montré une faible inhibition, avec une $IC_{50} > 200 \mu\text{g/ml}$, contrairement à la galantamine standard $5,01 \mu\text{g/mL}$. De plus, notre extrait a montré une efficacité supérieure dans l'inhibition de la BChE par rapport aux deux extraits d'*E. trifolium* (**Bouhedda et al., 2024**). De nombreuses substances végétales présentent des effets neuroprotecteurs en inhibant la BChE et l'AChE, y compris les acides phénoliques tels que l'acide gallique (**Ojo et al., 2023**) et l'acide shikimique (**Feunaing et al., 2024**), ainsi que des flavonoïdes tels que la quercétine (**Islam et al., 2021**), l'hespéridine (**Lekmine et al., 2024**) et la lutéoline (**Ntalouka & Tsirivakou, 2023**) et des composants stilbéniques tels que le resvératrol (**Mlakić et al., 2024**).

Tableau 10. Activités anti-enzymatiques in vitro : inhibition des enzymes cholinestérase et α -amylase.

Extraits et standards	Activité anticholinestérasique		Activité antidiabétique
	IC ₅₀ (μ g/mL)		IC ₅₀ (μ g/mL)
	Test d'AChE	Test d'BChE	Activité inhibitrice de l'alpha-amylase
EHe	>800 (NA)	21.42 \pm 0.41 ^a	584.88 \pm 1.38 ^b
Galantamine	6.27 \pm 1.15	34.75 \pm 1.99 ^b	Nd
Acarbose	Nd	Nd	284.33 \pm 0.06 ^a

Les données sont exprimées en moyenne \pm SD (n= 3) \pm SD de trois mesures parallèles. AChE : acétylcholinestérase ; BChE : butyrylcholinestérase. Les valeurs avec des exposants différents (a-b) dans les mêmes colonnes sont significativement différentes ($p < 0,001$) comme déterminé par ANOVA suivi par Tukey ; Nd : non déterminé ; NA : comparaison statistique non applicable avec l'étalon.

2.4. Evaluation de l'effet photoprotecteur

La lumière du soleil est vitale pour tous les êtres vivants et une exposition modérée a des effets physiologiques bénéfiques, notamment sur la régulation des rythmes circadiens et la synthèse de la vitamine D (**Juzeniene et al., 2011**). Cependant, une surexposition peut entraîner une pigmentation anormale, des rougeurs de la peau, des œdèmes, des cancers et un affaiblissement du système immunitaire. Les chercheurs se concentrent actuellement sur la création de crèmes solaires plus sûres à base d'extraits de plantes, notamment en raison de l'augmentation des niveaux d'UV résultant de l'appauvrissement de l'ozone stratosphérique et du changement climatique (**Ghazi, 2022**). Même les écrans solaires modernes sont dangereux pour la peau, car ils contiennent des produits chimiques qui peuvent provoquer des cancers, des irritations, des allergies, des réactions phototoxiques, l'inhibition de la synthèse de la vitamine D, la photo-oxydation et des mutations.

L'éventuelle activité photoprotectrice d'*E. guttatum* a également été évaluée sur la base du facteur de protection solaire (SPF), comme indiqué dans le **Tableau 11**. L'EHe d'*E. guttatum* avait une activité photoprotectrice élevée. Selon **Lefahal et al. (2018)**, les valeurs du SPF peuvent être considérées comme minimales lorsqu'elles sont comprises entre 2 et 12, modérées entre 12 et 30, et élevées pour un SPF ≥ 30 . Donc le SPF de notre extrait est proche du SPF des marques plus connues comme Nivea 50,11 \pm 0,53 et Vichy 44,22 \pm 0,35 (**Tableau12**). De nombreux composés phytochimiques sont bénéfiques pour la santé de la peau et possèdent des propriétés de protection solaire. Selon la recherche, ces composés peuvent absorber les rayons

UV en raison de la présence de chromophores dans leur structure chimique, comme les flavonoïdes et les acides hydroxycinnamiques, qui empêchent les rayons du soleil de pénétrer dans la peau (**Pizano-Andrade et al., 2022**). Des études récentes ont examiné les effets photochimio-préventifs de composés naturels tels que l'acide gallique, l'épicatéchine, l'hespéridine et la quercétine dans la prévention des dommages cutanés pour protéger l'ADN, la peau et le système immunitaire de la photo-immunosuppression. Ces composés peuvent absorber le rayonnement UV et fonctionner comme des filtres (**Cavinato et al., 2017; Pizano-Andrade et al., 2022**). Plusieurs auteurs ont montré une corrélation entre la teneur en polyphénols des extraits de plantes et leur action photoprotectrice. La peau produit déjà des radicaux libres nocifs en raison de son absorption des rayons UVB. Par conséquent, ils ont suggéré que, pour créer de meilleurs écrans solaires, il est nécessaire d'évaluer les extraits qui sont plus actifs en tant qu'antioxydants (**Macedo et al., 2015; Napagoda et al., 2016; Ratnasooriya et al., 2014**). Sur la base des caractéristiques protectrices spécifiées de quelques marques d'antisolaire (**Tableau 12**), nous proposons qu'*E. guttatum* puisse être une option viable pour l'inclusion dans les formulations d'écrans solaires naturels.

Tableau 11. Valeur du SPF de l'EHe de la partie aérienne d'*E. guttatum*.

λ (nm)	EE (λ)x I(λ) (Normalized)	HEE	
		Absorbances	SPF
290	0,015	3,97±0.006	0,59±0.000
295	0,0817	4,15±0.003	3,39±0.002
300	0,2874	4,29±0.004	12,32±0.011
305	0,3278	4,35±0.004	14,26±0.014
310	0,1864	4,38±0.004	8,17±0.007
315	0,0837	4,41±0.004	3,69±0.004
320	0,018	4,42±0.004	0,79±0.000
Total	1	-	43.23±0.05

Tableau 12. Comparaison entre l'activité photoprotectrice de l'EHe d'*E. guttatum* et des standards.

	Nivea	Vichy 1	HEE
SPF	50,11±0,53 ^c	44,22±0,35 ^b	43.23±0,05 ^a
Facteur de protection	Haute protection	Haute protection	Haute protection

Les données sont exprimées en moyenne \pm SD (n= 3) \pm SD de trois mesures parallèles. Les valeurs avec des exposants différents (a, b, c) dans la même ligne sont significativement différentes ($p < 0,05$) comme déterminé par ANOVA suivi par le test de Tukey.

2.5. Activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne de l'EHe d'*E. guttatum* a été évaluée en testant sa capacité à inhiber diverses souches microbiennes Gram-positives et Gram-négatives en déterminant la concentration minimale inhibitrice (CMI) en mg/mL (**Tableau 13**). Les résultats suggèrent que l'EHe de la partie aérienne d'*E. guttatum* possède des propriétés antimicrobiennes. Elle a démontré une efficacité similaire contre les sept souches de micro-organismes (*Salmonella typhi* ATCC 14028, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25953, *Vibrio parahaemolyticus*, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Candida albicans*) avec une CMI de 2,83 mg/mL. En même temps, il a montré une forte activité antibactérienne contre *Listeria monocytogenes* ATCC 13932 avec une CMI de 0,35 mg/mL.

Nos résultats indiquent que l'EHe de la partie aérienne de notre plante présente une forte activité antimicrobienne contre les souches microbiennes Gram-positives et Gram-négatives. Une étude précédente menée au Maroc et rapportée par **Mrabti et al. (2021)** a démontré l'efficacité de l'extrait méthanolique dérivé de la partie aérienne de la plante *E. guttatum* contre les bactéries Gram-positives et Gram-négatives. La CMI de cet extrait était de 100 mg/mL contre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, de 3,12 mg/mL contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et de *Listeria monocytogenes* ATCC 13932. Une autre étude menée par **Hamza et al. (2018)** en Tunisie a révélé que l'extrait hydrométhanolique de la même plante avait des effets inhibiteurs sur la croissance de *Staphylococcus aureus* 25923 ATCC et d'*Enterococcus faecalis* 29212 ATCC. Cependant, il n'était pas efficace contre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853. Une autre étude menée par **Ucan Turkmen et al. (2024)** a également montré que l'extrait éthanolique d'*E. cicutarium* n'avait aucun effet inhibiteur sur *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. Par conséquent, nos résultats s'alignent sur les recherches de **Bakari et al. (2018)**, qui ont démontré que les extraits hydroalcooliques de fleurs et de feuilles d'*E. glaucophyllum* présentaient des effets antibactériens notables contre *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis* et *Staphylococcus aureus*. En outre, nos résultats sont cohérents avec les études précédentes qui ont identifié des propriétés antibactériennes dans l'extrait éthanolique d'*E. gruinum* et l'extrait méthanolique d'*E. trifolium* contre *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* (**Al-Hadid et al., 2019; Bouhedda et al., 2024**).

Ces résultats peuvent s'expliquer par la présence de composés phytochimiques dans la plante, tels que les phénols et les flavonoïdes, qui présentent une activité antibactérienne en s'attaquant à divers sites bactériens. Ils affectent principalement les membranes cellulaires et

les acides nucléiques des bactéries (Lobiuc *et al.*, 2023). Sans oublier la présence d'esters méthyliques d'acides gras connus pour leurs effets antibactériens (Rahman *et al.*, 2023).

Tableau 13. CMI de l'EHe de la partie aérienne d'*E. guttatum* sur la croissance de huit *microorganismes*.

Microorganismes testés	EHe	AMK	GEN
	CMI (mg/mL)	CMI (µg/mL)	
<i>Salmonella typhi</i> ATCC 14028	2.83	/	/
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 25953	2.83	250	R
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	2.83	/	/
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	2.83	/	/
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 13932	0.35	/	/
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	2.83	/	/
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	2.83	R	R
<i>Candida albicans</i>	2.83	/	/

R : résistant, AMK : amikacine, GEN : gentamicine.

3. Activités biologiques *In vivo*

3.1. Activité analgésique (méthode d'immersion de la queue)

La douleur est une sensation émotionnelle pénible qui résulte généralement de la stimulation des nocicepteurs et de la transmission de signaux neuronaux au cerveau, afin de sensibiliser l'individu aux stimuli nocifs (Ghorbannia-Dellavar *et al.*, 2023). Le test d'immersion de la queue est une technique pratique pour évaluer la transmission de la douleur somatosensorielle aiguë en stimulant les récepteurs thermiques dans un modèle animal expérimental (Ali *et al.*, 2012). Les analgésiques sont généralement ceux qui agissent de manière centrale ou à travers la moelle épinière.

Dans les résultats du test d'immersion de la queue (Tableau 14, Figure 18), une augmentation du temps de latence a été observée avec les différents traitements : l'EHe, le diclofénac et l'aspirine. Le diclofénac a montré une analgésie hautement significative ($P < 0,001$) de 30 min à 90 min, car le seuil de douleur a augmenté de manière significative à 90 min ($8,44 \pm 1,73$) par rapport au groupe témoin ($3,14 \pm 0,19$). De 30 à 60 minutes, l'EHe (200 mg/kg)

et l'aspirine (10 mg/kg) ont montré une diminution significative de la réponse à la douleur ($P < 0,001$) avec une augmentation du seuil de la douleur à 60 minutes ($6,27 \pm 1,06$) et ($6,19 \pm 0,25$), respectivement, par rapport au groupe témoin ($3,05 \pm 0,63$).

Dans notre étude, pour la première fois, l'EHe à une dose de 200 mg/kg a montré un effet analgésique. Les résultats indiquent également que les activités antinociceptives maximales de l'EHe et de l'aspirine ont été observées à 60 minutes et pour le diclofénac à 90 minutes après l'injection. Les résultats suggèrent que les composants efficaces du EHe peuvent exercer leur effet antinociceptif en modulant la transmission de la douleur dans le système nerveux central. Sur la base de preuves pharmacologiques, plusieurs études ont montré que les acides phénoliques tels que l'acide shikimique ont un effet analgésique (Bao *et al.*, 2023), et que les flavonoïdes ont des propriétés anti-douleur. Parmi les flavonoïdes qui émergent en tant que nouveaux agents anti-douleur naturels, on trouve la quercétine et le kaempférol (Ghorbannia-Dellavar *et al.*, 2023).

Tableau 14. L'effet de l'EHe et des médicaments sur la latence du retrait de la queue de l'eau chaude

Extrait/standard	Temps de réaction (s)					
	0	30 min	60 min	90 min	120 min	180 min
Contrôle	2,48±0.5	2,6±0.54	3,05±0.63	3,14±0.19	3,63±0.25	2,42±0.85
EHe 200 mg/kg	3,13±0.59 ^{ns}	4,87±0.97 ^{***}	6,27±1.06 ^{***}	4,65±0.96 ^{ns}	4,20±1.17 ^{ns}	3,94±1.22 ^{ns}
Aspirine 150 mg/kg	3,00±1.00 ^{ns}	4,70±0.50 ^{***}	6,19±0.25 ^{***}	5,74±0.41 ^{**}	5,45±1.47 [*]	4,79±0.75 ^{**}
Voltarène gel	2,80±0.83 ^{ns}	5,30±0.40 ^{***}	7,55±1.24 ^{***}	8,44±1.73 ^{***}	6,13±0.37 ^{**}	4,10±0.74 [*]

Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SD, n = 5. ANOVA suivi du test de Tukey, niveau de signification * $P < 0,05$ et ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ par rapport au groupe contrôle, ns : non significatif.

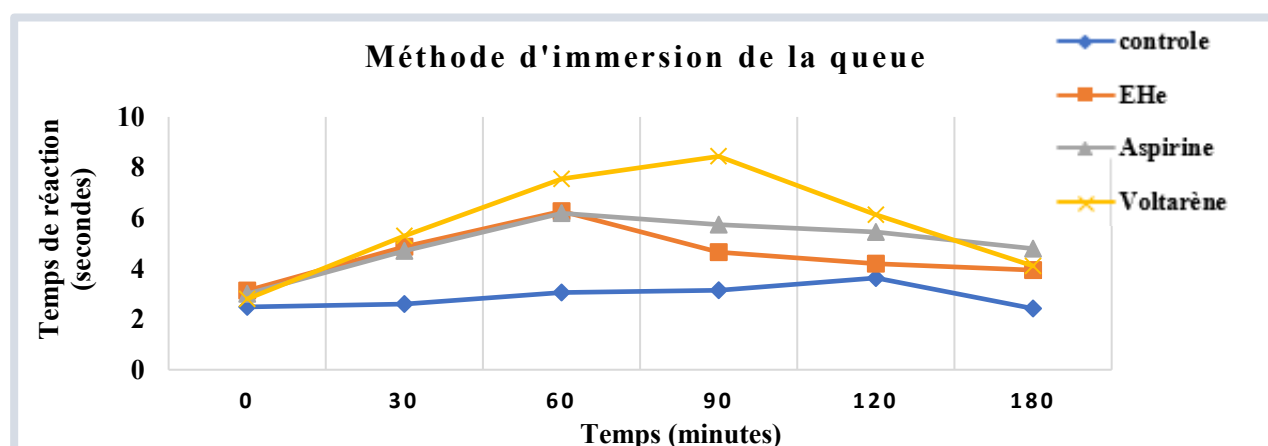


Figure 18. Comparaison de l'effet analgésique de l'EHe d'*E. guttatum*, de l'aspirine et du gel de Voltarène chez les rats

3.2. Activité anti-inflammatoire et étude histologique

L'inflammation est une réponse biologique complexe à l'homéostasie immunitaire et à la santé, déclenchée par de multiples stimuli tels que des agents pathogènes ou des irritants (**Chen *et al.*, 2017**). Traditionnellement considérée comme un mécanisme de défense, elle est désormais reconnue comme un acteur clé dans le développement de nombreuses maladies potentiellement mortelles, telles que la maladie d'Alzheimer, la polyarthrite rhumatoïde et les crises cardiaques (**Dhingra & Chopra, 2020**).

Pour explorer le potentiel anti-inflammatoire de l'EHe *in vivo*, un test d'œdème de la patte induit par le formol a été réalisé, l'une des meilleures façons de mesurer le potentiel anti-inflammatoire de l'EHe induit par le formol (**Samid *et al.*, 2023**).

Selon le **Tableau 15** et la **Figure 19**, la réduction de l'œdème de la patte chez les souris 1 heure après l'injection de formol était significative ($p < 0,05$) pour le groupe traité au diclofénac et non significative pour les deux groupes traités à l'extrait végétal par rapport au groupe témoin. De la deuxième heure à 24 heures, la réduction de l'œdème était très significative ($p < 0,001$) pour tous les groupes traités par rapport au groupe témoin. Après 24 heures suivant l'injection de formol, les pourcentages d'inhibition de l'œdème pour les deux doses d'extrait végétal 200 mg/kg et 400 mg/kg étaient légèrement différents, avec des valeurs de 67,57 % et 68,01 % respectivement à 24 h. Ces valeurs sont élevées par rapport à celle du diclofénac, qui est de 53,58 %.

L'étude histopathologique a montré que le groupe de souris normales présentait une morphologie épidermique et dermique normale (**Figure 20 A**). Les souris du groupe témoin négatif présentaient un décollement de l'épiderme, une destruction du derme, un œdème marqué et une infiltration de neutrophiles (**Figure 20 B**). Les souris du groupe diclofénac présentaient un œdème léger et une légère infiltration de neutrophiles (**Figure 20 C**). Les souris prétraitées avec 200 mg/kg d'extrait végétal ont présenté une légère destruction dermique, un léger œdème et une infiltration marquée de neutrophiles (**Figure 20 D**). En revanche, les souris traitées avec 400 mg/kg d'extrait végétal présentaient un léger œdème et une très légère infiltration de neutrophiles (**Figure 20 E**).

Il a été démontré que le mécanisme moléculaire de l'inflammation induite par le formol provoque un gonflement douloureux (œdème) et la libération de plusieurs médiateurs inflammatoires, tels que les neuropeptides, y compris la substance P et la bradykinine dans la phase neuronale, les prostaglandines, l'histamine, la sérotonine et la bradykinine dans la phase inflammatoire (**Shibata *et al.*, 1989**). Les leucocytes, y compris les neutrophiles et les

macrophages, sont principalement responsables de la réponse inflammatoire aiguë (**Sharma et al., 2020**). L'activation des neutrophiles provoque également une augmentation de la perméabilité vasculaire, ce qui entraîne un œdème (**Fantone & Ward, 1982**). En outre, lorsque les cellules immunitaires sont envoyées dans la zone d'inflammation, des radicaux libres dérivés de l'oxygène et de l'oxyde nitrique (NO) sont libérés. Ceux-ci aggravent la réponse inflammatoire et augmentent l'œdème (**Renny et al., 2024**).

L'analyse LC-MS/MS a montré que l'EHe contient des composés phénoliques et flavonoïdes qui peuvent stopper certaines réactions inflammatoires en empêchant les cellules immunitaires de mûrir, de s'activer, de fonctionner ou de libérer certains médiateurs inflammatoires tels que l'histamine, la prostaglandine, ou en inhibant la production de cytokines ou de chimiokines pro-inflammatoires dans les mastocytes, les neutrophiles et d'autres cellules immunitaires (**Majdan & Bobrowska-Korczak, 2022**). L'acide gallique, par exemple, a des effets anti-inflammatoires significatifs. L'une des principales preuves est sa capacité à réduire la voie NF- κ B dans les macrophages RAW264.7 qui ont été activés par les LPS et des facteurs inflammatoires tels que l'oxyde nitrique (NO), l'interleukine 6 (IL-6) et le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α) (**K. Li et al., 2023**). De même, la quercétine est un flavonoïde qui réduit l'inflammation en modifiant les voies de signalisation inflammatoires, en bloquant les voies NF- κ B et MAPK, et l'acide shikimique arrête la production de facteurs inflammatoires (**X. Li et al., 2023**). D'autre part, l'hespéridine peut moduler la réponse inflammatoire en réduisant les marqueurs inflammatoires (**de Souza et al., 2024**), la lutéoline contrôle la libération de médiateurs inflammatoires tels que l'enzyme COX-2 et les prostaglandines PGEs, les cytokines IL-1 β , IL-6, TNF- α . En outre, la lutéoline peut réduire les niveaux élevés de métalloprotéinases (MMP) et d'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) qui se produisent dans l'inflammation chronique (**Ntalouka & Tsirivakou, 2023**).

Les polyphénols sont des agents anti-inflammatoires qui chélatent les radicaux libres, inhibent les médiateurs pro-inflammatoires, régulent les activités cellulaires liées à l'inflammation et inhibent les enzymes inflammatoires. Ces substances phytochimiques peuvent avoir des effets thérapeutiques indépendants ou synergiques, ce qui les rend bénéfiques pour prévenir et contrôler l'inflammation et les maladies liées au stress oxydatif (**Renny et al., 2024**).

Tableau 15. L'effet anti-inflammatoire de l'EHe d'*E. guttatum* et les standards chez les souris.

Traitements	Dose (mg/kg)	Œdème de la patte en mm à différents intervalles de temps					
		1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	24 h
Contrôle	/	2,68±0.37	3,2±0.56	2,79±0.43	2,74±0.40	2.44±0.35	2,39±0.31
Diclofénac	10 mg/kg	1.83±0.27* (31.92%)	2.16±0.06*** (32.5%)	1.72±0.45*** (38.20%)	1.56±0.04*** (42.79%)	1.20±0.12*** (50.80%)	1.11±0.09*** (53.58%)
EHe	Dose 1 200 mg/kg	2.27±0.69 ^{ns} (15.49%)	2.16±0.07*** (32.34%)	1.82±0.12*** (34.74%)	1.72±0.37*** (37.08%)	1.01±0.17*** (58.70%)	0.77±0.09*** (67.57%)
	Dose 2 400 mg/kg	2.35±0.19 ^{ns} (12.39%)	1.96±0.11*** (38.75%)	1.25±0.08*** (54.92%)	1.20±0.12*** (55.92%)	1.03±0.14*** (57.68%)	0.76±0.19*** (68.01%)

Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne ± SD, n = 6. ANOVA suivi du test de Tukey, niveau de signification *P<0,05 et **P<0,01, ***P<0,001 par rapport au groupe contrôle, ns : non significatif.

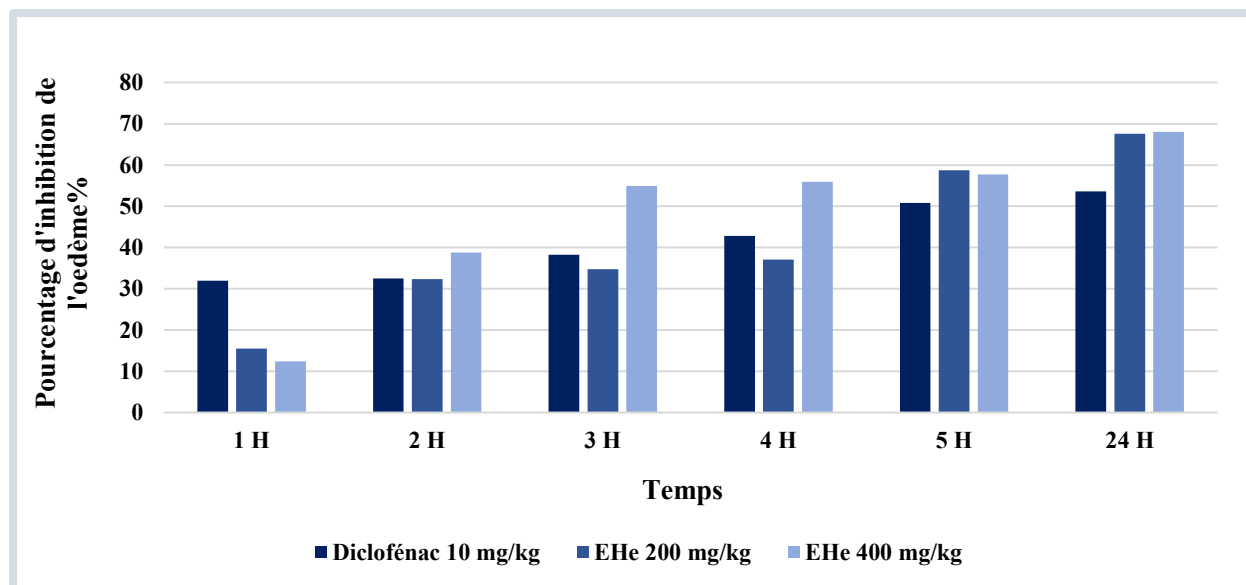


Figure 19. Pourcentage d'inhibition de l'œdème pour les deux doses de l'EHe d'*E. guttatum* (200 et 400 mg/kg) et du diclofénac chez les souris.

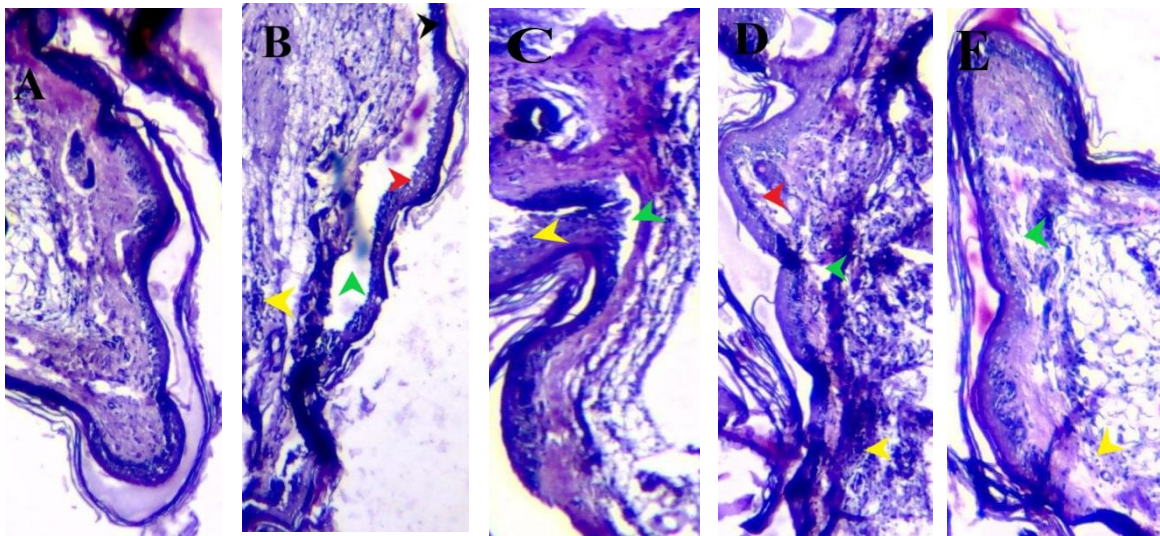


Figure 20. Structure histologique des pattes de souris après injection sous-plantaire de formol à 10 % et le traitement par les deux doses de l'EHe et le Diclofénac.

A ; groupe témoin normal montrant la structure histologique normale de l'épiderme et du derme ; B ; groupe témoin négatif montrant un décollement de l'épiderme (pointe de flèche noire), une destruction du derme (pointe de flèche rouge), un œdème marqué (pointe de flèche verte) et une infiltration de neutrophiles (pointe de flèche jaune), C ; groupe diclofénac présentant un œdème léger (tête de flèche verte) et une infiltration légère de neutrophiles (tête de flèche jaune), D ; groupe extrait à 200 mg/kg présentant une destruction dermique légère (tête de flèche rouge), un œdème léger (tête de flèche verte) et une infiltration marquée de neutrophiles (tête de flèche jaune), et E ; groupe extrait à 400 mg/kg présentant un œdème léger (tête de flèche verte) et une infiltration très légère de neutrophiles (tête de flèche jaune). (Coloration H&E, 40×).

3.3. Evaluation de l'effet protecteur d'*E. guttatum* contre la toxicité induite par le propiconazole

La toxicité des pesticides s'est avérée être une menace et un danger pour la santé des humains, des animaux et d'autres organismes vivants (Pathak *et al.*, 2022). Les effets toxiques de ces pesticides, même s'ils n'ont pas d'effet à court terme, sont toujours présents sous une forme ou une autre, nuisant au corps humain et détériorant son fonctionnement normal. Cela se produit souvent par la production d'un stress oxydatif induit soit par une production accrue de ROS/RNS au cours du métabolisme et de la biotransformation de ces pesticides (Mahajan *et al.*, 2018), soit par l'épuisement des défenses antioxydantes en raison de l'altération de l'activité de diverses enzymes antioxydantes (Sharma *et al.*, 2015). Afin d'atténuer les effets toxiques des résidus de pesticides, les chercheurs et les professionnels de santé se sont tournés vers la phytothérapie, en recherchant des substances bioactives (nutraceutiques) dans les plantes médicinales. Ces substances, qui comprennent des minéraux, des vitamines, des antioxydants et des polyphénols, aident à détoxifier l'organisme et à réparer les dommages causés par les pesticides (Sajad *et al.*, 2024).

Dans le cadre de cette recherche, des rats ont été utilisés en tant que modèle biologique, étant largement utilisés dans les études toxicologiques (Hamm *et al.*, 2006). Le propiconazole (PCZ) a été choisi comme agent toxique modèle, reconnu pour sa toxicité envers une variété d'organismes aquatiques et terrestres (Ma *et al.*, 2022), qu'ils soient ciblés ou non (Garrison *et al.*, 2011). Nous avons choisi une plante médicinale (*E. guttatum*) originaire du bassin méditerranéen afin d'explorer ses possibles effets protecteurs contre la toxicité de ce fongicide.

3.3.1. Suivi de l'état clinique des animaux

Il est essentiel de surveiller divers signes cliniques tels que le comportement, la température corporelle, l'apport alimentaire et les caractéristiques des selles tout au long de l'expérimentation afin d'évaluer l'état de santé des animaux. D'après les observations quotidiennes, aucun signe de toxicité n'a été constaté dans l'ensemble des groupes traités, à l'exception du groupe PCZ, où des manifestations variables de toxicité ont été observées, telles que la diarrhée et l'agitation.

Nos résultats concordent avec ceux de l'étude menée par Mrabti *et al.* (2021), qui ont rapporté l'absence d'effets indésirables ou de modifications de comportement chez les souris traitées avec des doses de 2000 et 5000 mg/kg /jour d'extrait aqueux d'*E. guttatum* tout au long de la période expérimentale de 28 jours.

3.3.2. Variation de la masse corporelle des rats

Le poids corporel représente l'un des paramètres essentiels lors de l'évaluation de la toxicité (Abdel-Razik *et al.*, 2022). D'après les données exposées dans le **Tableau 16**, et suite au traitement des rats pendant une période de 60 jours, une diminution non significative du poids corporel a été observée chez le groupe traité avec le PCZ par rapport au groupe contrôle, ce qui est en accord avec les résultats de l'étude menée par Elalfy *et al.* (2021), qui n'ont pas observé de changement significatif dans le poids corporel des rats suite à un traitement de 28 jours avec deux doses de PCZ ; une moyenne (75 mg/kg/pc) et l'autre élevée (150 mg/kg/pc). De plus, les résultats de Allen *et al.* (2006) ont également montré que les souris traitées au PCZ (100, 500, 2500 ppm) n'ont pas manifesté de différences notables en termes de gain de poids durant les 7 premières semaines ; cependant, à 9 et 12 semaines, le groupe exposé à la dose élevée (2500 ppm) présentait un poids significativement inférieur ($p < 0,05$) par rapport au groupe témoin.

Pour les autres groupes, à savoir ceux traités exclusivement avec des extraits de plantes (75 mg/kg/pc de l'EHe et 100 mg/kg/pc de l'EBu) ou avec des extraits en plus du PCZ, aucune variation significative de poids corporel n'a été observée par rapport au groupe témoin. Cela pourrait ainsi confirmer l'innocuité et l'effet protecteur de ces extraits. Ces résultats concordent avec ceux de Mrabti *et al.* (2021) qui n'ont pas constaté de variation de poids corporel chez les souris traitées avec 2000 et 5000 mg/kg/pc/jour de l'extrait aqueux d'*E. guttatum* pendant une période de 28 jours.

Tableau 16. Variation du poids corporel des rats albinos mâles dans tous les groupes expérimentaux pendant 60 jours.

Poids	Groupes expérimentaux					
	Contrôle	PCZ	EHe	EBu	EHe +PCZ	EBu + PCZ
Poids corporel initial (g)	163.14±5.08	167.71±3.75	165.71±3.35	168.00±2.03	168.85±1.79	168.42±4.17
Poids corporel final (g)	241.94±11.82	244.59±12.59	252.58±7.13	262.85±5.77	255.20±10.15	256,65±20.88
Gain de poids (g)	78.79±7.59	76.87±12.22	86.86±8.80	94.85±7.34	86.34±9.26	88.22±22.74

Les valeurs représentent la moyenne ± SE de sept animaux/groupe, en utilisant l'analyse de variance à sens unique (ANOVA) suivi par le test de Tukey à $p \leq 0,05$.

3.3.3. Variation des paramètres hématologiques suite à la toxicité du propiconazole et l'action protectrice des extraits d'*E. guttatum*.

Le système hématopoïétique comprend tous les tissus hématopoïétiques et les cellules sanguines circulantes. Il s'agit de l'un des plus grands organes du corps, dont la fonction principale est l'hématopoïèse, c'est-à-dire la production de cellules sanguines matures responsables de la respiration, de l'immunité et de l'hémostase. Ce système est particulièrement sensible aux attaques toxiques et figure parmi les cibles les plus importantes de la toxicité. Le système hématopoïétique est hautement régulé, complexe et dynamique et peut être perturbé par les xénobiotiques (**Ramaiah et al., 2013**).

La rate fonctionne comme un réservoir immunitaire en abritant de nombreux lymphocytes, en stockant le sang, et en jouant un rôle essentiel dans la réponse immunitaire. Ainsi, en cas de stimulation entraînant une apoptose extensive du tissu splénique, la fonction immunitaire de l'organisme est inévitablement perturbée (**Liu et al., 2022**).

3.3.3.1. Variation des paramètres hématologiques

Les résultats présentés dans le **Tableau 17** indiquent que le fongicide PCZ n'a pas engendré de variations significatives sur divers paramètres hématologiques chez les rats après huit semaines de traitement, tels que le taux de globules rouges (GR), la concentration en hémoglobine (HB), l'hématocrite (HCT), le volume globulaire moyen (VGM), la concentration globulaire moyenne en hémoglobine (CGMH), la teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH), en comparaison avec le groupe témoin. En revanche, l'exposition au PCZ provoque une augmentation très hautement significative ($p < 0,001$) du nombre de globules blancs et une augmentation significative ($p < 0,05$) du nombre total de plaquettes par rapport au groupe témoin. Alors que l'exposition de 30 jours au 100 mg/kg/j de penconazole provoquait des changements significatifs ($P < 0,05$), sauf dans le VGM, le CGMH et le nombre de globules blancs (**Yahia & Ali, 2019**).

L'exposition aux pesticides provoque un stress oxydatif et une inflammation, ce qui entraîne l'activation des réponses immunitaires. Il en résulte une augmentation du nombre de globules blancs alors que l'organisme tente de combattre l'environnement inflammatoire et les dommages cellulaires potentiels causés par les toxines (**Ruiz-Arias et al., 2022**).

Les deux extraits d'*E. guttatum* ont pu diminuer d'une façon hautement significative ($p < 0,01$) cette augmentation du nombre de globules blancs lorsqu'ils étaient administrés avant le PCZ.

Les plantes médicinales réduisent efficacement le nombre de globules blancs dû à la toxicité des pesticides grâce à des mécanismes immunomodulateurs. Elles contiennent des composés bioactifs qui stimulent ou suppriment les réponses immunitaires, améliorant la phagocytose, favorisant l'élimination des cellules endommagées et inhibant les cytokines pro-inflammatoires, équilibrant ainsi les réponses immunitaires (Noor *et al.*, 2023; Zebeaman *et al.*, 2023).

Tableau 17. Effet du fongicide PCZ et des extraits d'*E. guttatum* sur les paramètres hématologiques

Paramètres	Groupes expérimentaux					
	Contrôle	PCZ	EHe	EBu	EHe + PCZ	EBu+ PCZ
GB	7.10±0.61	14.45±0.0.63 ^{###}	7.35±0.87 ^{***}	6.98±0.56 ^{***}	9.86±1.12 ^{**}	10.18±0.86 ^{**}
GR	8,01±0.14	7,93±0.22 ^{ns}	8,09±0.14 ^{ns}	08.47±0.26 ^{ns}	8.16±0.07 ^{ns}	8.03±0.18 ^{ns}
Hb	14.93±0.21	13.64±0.63 ^{ns}	14.81±0.17 ^{ns}	16.27±0.36 ^{***}	15.02±0.11 ^{ns}	14.83±0.93 ^{ab}
Ht	45.81±1.05	41.40±0.69 ^{ns}	46.62±0.72 ^{ns}	49.57±1.56 ^{ns}	46.50±1.30 ^{ns}	46.68±1.30 ^{ns}
VGM	55.85±0.75	54.01±0.75 ^{ns}	56.80±0.68 ^{ns}	58.48±1.72 ^{ns}	56.22±1.02 ^{ns}	58.14±0.95 ^{ns}
TCMH	18.22±0.33	18.52±0.21 ^{ns}	18.15±0.11 ^{ns}	18.88±0.16 ^{ns}	18.81±0.21 ^{ns}	18.50±0.13 ^{ns}
CCMH	32.65±0.71	31.04±0.35 ^{ns}	33.04±0.40 ^{ns}	32.30±0.24 ^{ns}	31.97±0.44 ^{ns}	31.81±0.36 ^{ns}
PLQ	756.7±46.74	943.42±55.22 [#]	737±38.47 [*]	887.42±44.00 ^{ns}	890±42.15 ^{ns}	849±31.30 ^{ns}

Les valeurs représentent la moyenne ± SE de sept animaux/groupe. En utilisant l'analyse de variance à sens unique (ANOVA) suivi par Tukey.

ns : Différence non significative $p > 0.05$

* Différence significative ($p < 0.05$), ** Différence hautement significative ($p < 0.01$) ; *** Différence très hautement significative ($p < 0.001$) les groupes traités (EHe, EBU, EHe+PCZ, EBU+PCZ) par rapport au groupe PCZ.

Différence significative ($p < 0.05$), ### Différence très hautement significative ($p < 0.001$) les groupes traités (PCZ, EHe, EBU, EHe+PCZ, EBU+PCZ) par rapport au groupe contrôle.

3.3.3.2. Etude histopathologique de la rate

La structure histologique de la pulpe rouge et de la pulpe blanche était saine dans le parenchyme splénique dans les groupes de contrôle normal et le groupe de l'EHe (**Figure 21 A et C**). Le groupe expérimental intoxiqué au PCZ présentait une architecture splénique désorganisée, une séparation des splénocytes et une raréfaction dans le parenchyme splénique, une déplétion du tissu lymphoïde de la pulpe blanche et une hémorragie splénique (**Figure 21 B**). Une étude menée par **Yahia & Ali (2019)** a montré que La rate de rats exposés au penconazole pendant 30 jours a montré une hématopoïèse extra-médullaire très caractéristique, avec des mégacaryocytes sur fond d'éléments granulocytaires en cours de maturation.

Une structure histologique apparemment saine avec un tissu rouge abondant et un tissu lymphoïde abondant dans la pulpe blanche dans le parenchyme splénique suggérant une amélioration dans les tissus spléniques ayant reçu à la fois du EHe et du PCZ (**Figure 21 D**).

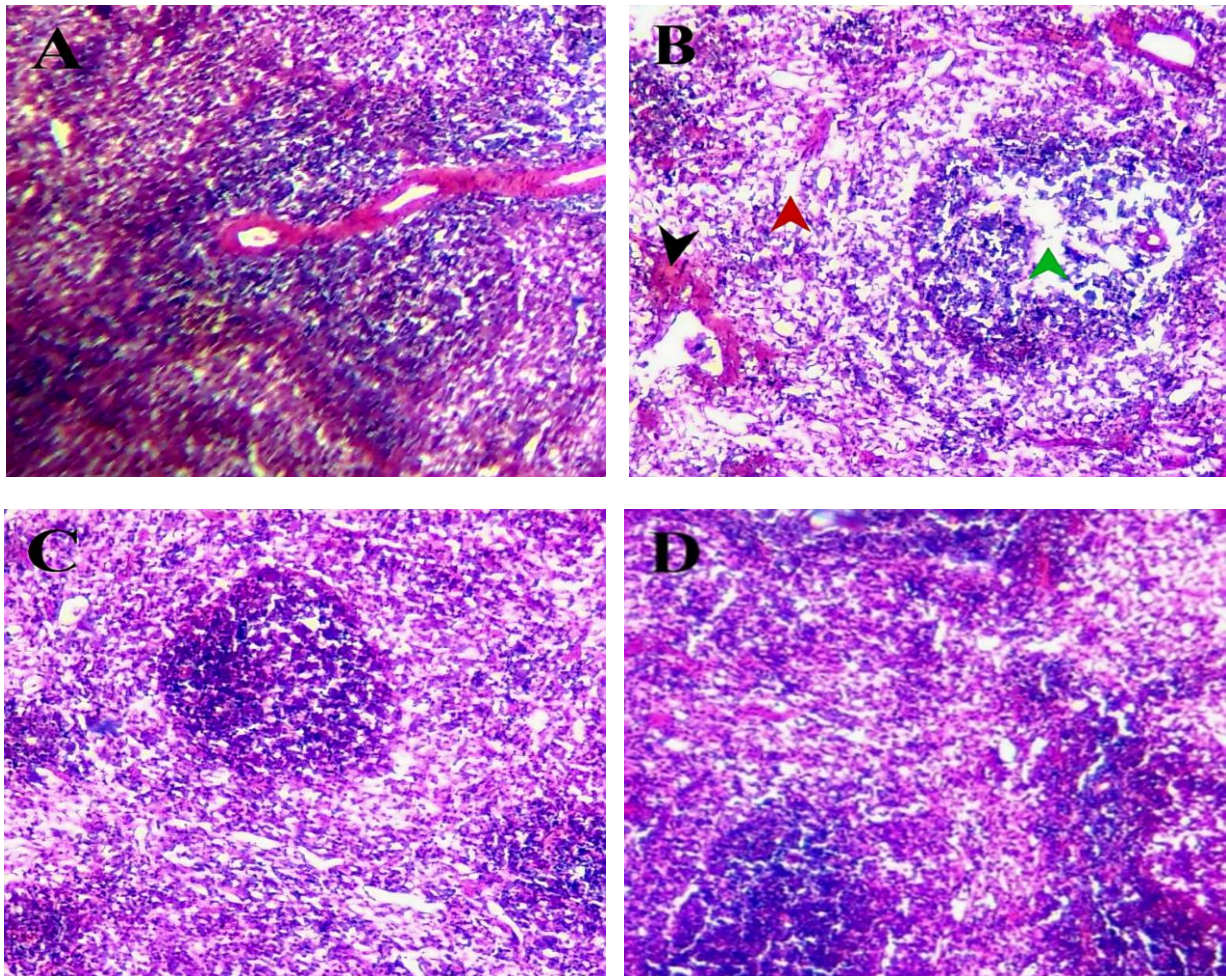


Figure 21. Photomicrographies de tissu de la rate des rats expérimentaux, colorées avec H&E, 10×.

A, groupe control normale montrant un tissu normal de la rate, B, groupe expérimental intoxiqué au PCZ montrant une hémorragie splénique (tête de flèche noire), une déplétion du tissu lymphoïde de la pulpe blanche (tête de flèche verte) et séparation et une raréfaction des splénocytes dans la pulpe rouge (tête de flèche rouge), C, groupe EHe montrant une structure histologique normale de la rate, et D, groupe expérimental EHe + PCZ montrant une structure histologique splénique apparemment saine. (Coloration H&E, 10×).

3.3.4. Evaluation de l'effet hépatoprotecteur des extraits d'*E. guttatum* suite à une intoxication par le propiconazole chez les rats Wistar

Le foie est un organe vital qui joue un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie de l'organisme en détoxifiant les substances dangereuses et xénobiotiques (**Hata *et al.*, 2007**).

3.3.4.1. Variation de la masse absolue et relative du foie

D'après les résultats présentés dans le **Tableau 18** et la **Figure 22**, il y a eu une augmentation très hautement significative ($p < 0.001$) du poids absolu et relatif du foie chez les sujets du groupe traité par le PCZ par rapport au groupe témoin. Nos résultats concordent avec les recherches précédentes qui ont examiné les effets toxiques de divers composés triazoles tels que le propiconazole, le myclobutanil, le triadiméfon, le difénoconazole, le bromuconazole et l'epoxiconazole, lesquels ont également été associés à une augmentation notable du poids hépatique chez les rongeurs (**Allen et al., 2006; Martin et al., 2007; Hamdi et al., 2019a; Mohamed et al., 2021; Rjiba et al., 2021; Attema et al., 2024**).

La prise de poids du foie des rats exposés aux fongicides triazoles est due à l'activation des récepteurs nucléaires comme le PXR et la CAR dans les hépatocytes, induisant des modifications dans l'expression génique liée au métabolisme des lipides et à la détoxification (**Albrecht, 2019; Knebel et al., 2019; Marx-Stoelting et al., 2020**), augmentant ainsi la transcription des gènes codant pour les enzymes métaboliques tels que les cytochromes P450 (CYP), tout en augmentant également la charge métabolique du foie, comme le myclobutanil et le triadiméfon ont fortement augmenté l'activité des enzymes CYP, induisant les isoformes CYP2B1 et CYP3A jusqu'à 54,6 fois, cruciales pour le métabolisme des xénobiotiques (**Sun et al., 2007; Kwon et al., 2021**). Cette induction entraîne une hypertrophie hépatique en raison de la sollicitation du foie pour métaboliser ces composés (**Flodström et al., 1990**). L'induction de ces enzymes favorise aussi la formation de foyers hépatiques anormaux, révélant des précurseurs de tumeurs hépatiques (**Flodström et al., 1990**).

L'administration préalable d'extraits d'*E. guttatum* avant le traitement au PCZ a provoqué une diminution non significative du poids absolu du foie, mais a entraîné une réduction très hautement significative du poids relatif du foie ($p < 0,001$) pour EBU et hautement significative ($p < 0.01$) pour EHe par rapport au groupe traité exclusivement par le PCZ, ce qui suggère un rôle potentiel de ces extraits dans la protection hépatique *in vivo*. Les résultats obtenus confirment les conclusions de **Benrahou et al. (2022c)**, qui n'ont observé aucune modification significative du poids du foie dans les trois groupes traités respectivement avec 200 mg/kg/pc/jour pendant 28 jours de l'extraits aqueux, éthanolique et méthanolique d'*E. guttatum* par rapport au groupe témoin.

Tableau 18. Modification du poids absolu et relatif du foie des rats albinos mâles dans tous les groupes expérimentaux après 60 jours de traitement.

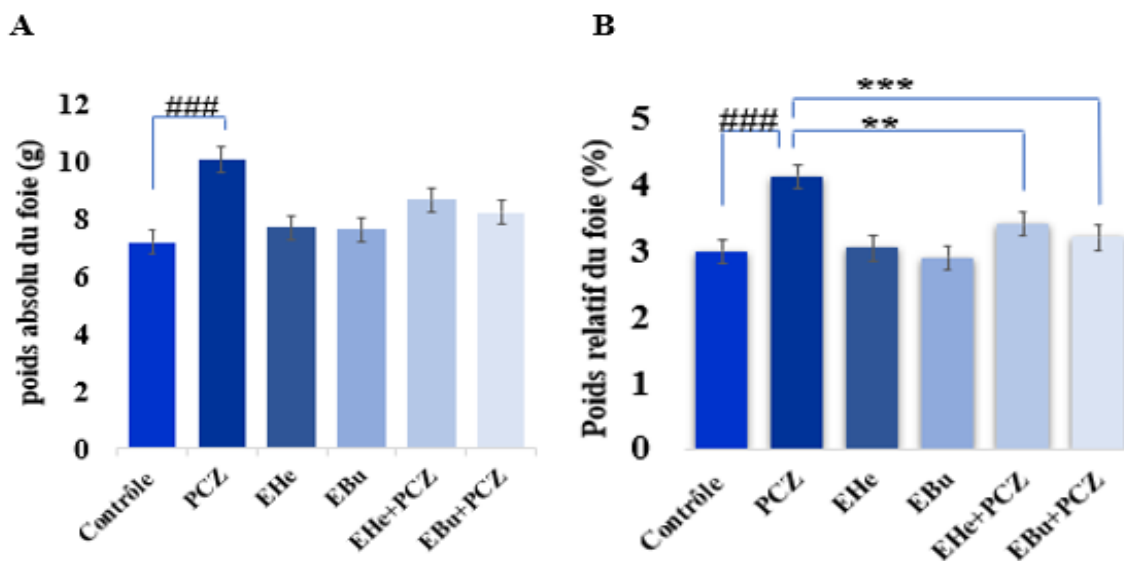
Poids	Groupes expérimentaux					
	Contrôle	PCZ	EHe	EBu	EHe + PCZ	EBu + PCZ
Poids absolu du foie (g)	7.15±0.31	10.02±0.40 ^{###}	7.67±0.61 ^{**}	7.6±0.42 ^{**}	8.64±0.49 ^{ns}	8.2±0.69 ^{ns}
Poids relatif du foie (%)	2.99±0.16	4.12±0.12 ^{###}	3,04±0.08 ^{***}	2.89±0.15 ^{***}	3,40±0.17 ^{**}	3.19±0.10 ^{***}

Les valeurs représentent la moyenne ± SE de sept animaux/groupe. En utilisant l'analyse de variance à sens unique (ANOVA) suivi par Tukey. Poids relatif de l'organe = (Poids de l'organe / Poids final du corps) x 100.

ns : Différence non significative $p > 0.05$

** Différence hautement significative ($p < 0.01$) ; *** Différence très hautement significative ($p < 0.001$) les groupes traités (EHe, EBu, EHe+PCZ, EBu+PCZ) par rapport au groupe PCZ.

Différence très hautement significative ($p < 0.001$) les groupes traités (PCZ, EHe, EBu, EHe+PCZ, EBu+PCZ) par rapport au groupe contrôle.

**Figure 22.** Effet du PCZ et des extraits d'*E. guttatum* sur le poids absolu (A) et relatif du foie (B) de rats après huit semaines de traitement.

3.3.4.2. Variation des paramètres enzymatiques et biochimiques

Divers marqueurs hépatiques peuvent être utilisés afin de détecter ou de diagnostiquer les pathologies hépatiques, tels que l'alanine aminotransférase (ALAT), l'aspartate aminotransférase (ASAT), la phosphatase alcaline (PAL), la bilirubine, les protéines totales et l'albumine. Les résultats de notre étude (Tableau 19, Figure 23) indiquent que les rats traités

par le PCZ ont manifesté une augmentation extrêmement significative ($p < 0,001$) des taux d'ALAT, d'ASAT, de PAL, ainsi qu'une augmentation hautement significative ($p < 0,01$) du taux de bilirubine. De plus, une diminution très significative ($p < 0,001$) des niveaux de protéines totales et une diminution significative ($p < 0,05$) du taux d'albumine ont été observées par rapport au groupe témoin. Ces résultats sont en concordance avec ceux obtenus par **Khalaf et al. (2021)**, qui ont montré que l'administration de 75 mg/kg/pc de PCZ provoquait une élévation des niveaux de ces marqueurs (ALAT, ASAT, bilirubine) chez les rats après 60 jours de traitement. Ces résultats sont également en accord avec ceux obtenus par **Shahat (2013)**, qui ont montré une augmentation hautement significative des taux sériques d'ALAT, d'ASAT, de PAL et de bilirubine et une diminution hautement significative des protéines totales et de l'albumine dans les groupes traités par le difénoconazole à des doses (20, 40 et 80 mg/100 g pc) après 4 et 8 semaines de traitement par rapport au groupe témoin. Une autre recherche menée par **Abdelhadya et al. (2017)** a révélé qu'après 90 jours de traitement au bromuconazole, les enzymes hépatiques (ALAT, ASAT, ALP) ainsi que le taux de bilirubine ont augmenté chez les rats, traités par deux doses de 13,8 et 32,8 mg/kg/j. En revanche, les niveaux de protéines totales et d'albumine n'ont pas présenté de changement, à l'exception du groupe traité avec 32,8 mg/kg/j, qui a montré une diminution significative ($p < 0,05$).

Une exposition subchronique aux fongicides triazoles induit un stress oxydatif favorisant la production des ROS, ce qui entraîne la peroxydation des lipides, l'oxydation des protéines et l'activation des voies pro-inflammatoires, favorisant ainsi la production de cytokines pro-inflammatoires. Ces mécanismes participent à la dégradation des hépatocytes en provoquant des dommages au niveau des cellules hépatiques, entraînant la perte d'intégrité de la membrane hépatocytaire et perturbant la synthèse protéique normale (**Bruno et al., 2009; Ortiz et al., 2010; Khalaf et al., 2021; Hamdi et al., 2019a; Xie et al., 2022; Ruiz-Yance et al., 2023; Marino et al., 2023**). Le PCZ active de multiples récepteurs nucléaires, dont le récepteur PXR, modulant ainsi l'expression de gènes impliqués dans la biotransformation des xénobiotiques et le métabolisme lipidique. Cette modulation entraîne des altérations de l'expression de protéines hépatiques, notamment les enzymes CYP450, pouvant perturber l'homéostasie cellulaire et aggraver les dommages hépatiques (**Albrecht, 2019; Ortiz et al., 2010; Marx-Stoelting et al., 2020**). L'induction des CYP, lesquelles sont essentielles pour le métabolisme des médicaments et la détoxification hépatique. Cette induction entraîne une surcharge métabolique des hépatocytes, exposant ces cellules à des niveaux accumulés de métabolites potentiellement toxiques, et entraîne une altération de la fonction hépatique et une

hépatotoxicité caractérisée par des modifications cellulaires et la libération des enzymes aminotransférases dans la circulation sanguine (Sun *et al.*, 2007; Albrecht, 2019; Kwon *et al.*, 2021; Zerdoug *et al.*, 2024). L'exposition au PCZ peut induire des changements significatifs dans les profils d'expression des protéines hépatiques chez les souris par analyse protéomique hépatique, suggérant une modulation des voies métaboliques qui ont un impact supplémentaire sur la synthèse des protéines (Ortiz *et al.*, 2010).

Il est intéressant de noter que les rats traités préalablement avec les extraits de l'EHe et de l'EBu de la plante *E. guttatum*, avant l'administration de PCZ, ont montré une réduction très hautement significative ($p < 0.001$) de l'augmentation des taux d'enzymes hépatiques tels que l'ASAT et la PAL, et hautement significative ($p < 0.01$) pour les ALAT par rapport au groupe traité par le PCZ. Les résultats aussi indiquent que le taux de bilirubine a été significativement réduit ($p < 0.05$) suite à l'administration de l'extrait EHe, tandis qu'aucune réduction significative n'a été observée avec l'extrait EBU. De plus, les niveaux de protéines totales ont significativement augmenté ($p < 0.05$) avec l'extrait EBU, mais pas de manière significative avec l'extrait EHe. En outre, il n'y a pas eu d'augmentation significative du taux d'albumine avec les deux extraits.

L'efficacité d'un médicament hépatoprotecteur repose essentiellement sur sa capacité à réduire les effets indésirables ou à maintenir les mécanismes physiologiques normaux du foie qui ont été altérés par des substances toxiques pour le foie (Raghavendran *et al.*, 2004). Plusieurs plantes de la famille des Geraniaceae, telles que *Geranium macrorrhizum*, *Pelargonium graveolens* et *Geranium schiedeanum*, ont démontré leur potentiel hépatoprotecteur contre la toxicité du CCL4 chez les rats et les souris en améliorant la fonction des hépatocytes endommagés, en réduisant de manière significative les taux sériques des enzymes hépatiques et de la bilirubine, et en augmentant considérablement l'activité des enzymes antioxydantes (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, glutathion réductase et glutathion-S-transférase), ainsi qu'en favorisant la régénération accélérée des cellules parenchymateuses hépatiques (Radulović *et al.*, 2012; Gayosso-De-Lucio *et al.*, 2014; Al-Sayed *et al.*, 2015).

Par conséquent, les deux extraits de la plante *E. guttatum* offrent une protection contre l'hépatotoxicité induite par le PCZ et pourraient potentiellement atténuer les effets indésirables associés aux dommages hépatiques. Cela peut être dû à la présence de divers composants phytochimiques qui ont un effet hépatoprotecteur contre la toxicité de ce fongicide par le biais de divers mécanismes, impliquant principalement la modulation du stress oxydatif, de

l'inflammation et de l'apoptose. Ces composés renforcent les défenses antioxydantes et atténuent les altérations biochimiques induites par les agents toxiques, préservant ainsi la fonction hépatique (Simón *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2022; Khan & Ibrahim, 2022 ; Didunyemi & Olasehinde, 2024 ; Hu *et al.*, 2024).

Diverses études ont mis en évidence la capacité de l'acide gallique à réduire la toxicité hépatique en stimulant l'activité des enzymes antioxydantes telles que la superoxyde dismutase et la catalase. Cela se traduit par une diminution des niveaux de malondialdéhyde ; un marqueur du stress oxydatif, ainsi que par une réduction de l'expression des cytokines pro-inflammatoires TNF- α et IL-1 β II. Ces effets bénéfiques ont été observés face à différents composés toxiques tels que le chlorure de mercure (Goudarzi *et al.*, 2017), le paraquat (Nouri *et al.*, 2021), le tétrachlorure de carbone (Ojeaburu & Oriakhi, 2021), la doxorubicine (Omobowale *et al.*, 2018), la fluoxétine (Karimi-Khouzani *et al.*, 2017) et l'acrylamide (Alejolowo *et al.*, 2024). L'hespéridine a également démontré son efficacité dans la prévention des dommages oxydatifs hépatiques induits par des substances toxiques, en augmentant les niveaux d'enzymes antioxydantes telles que le glutathion (GSH), la catalase (CAT) et la superoxyde dismutase (SOD). L'hespéridine a prouvé son potentiel hépatoprotecteur dans plusieurs études contre différents agents toxiques, notamment les métaux lourds tels que le plomb, l'aluminium, le mercure et le cadmium (Pari *et al.*, 2015; Sarhan *et al.*, 2021), ainsi que d'autres substances comme le tétrachlorure de carbone (EKPO *et al.*, 2024).

La quercétine, un flavonoïde naturel aux nombreux effets bénéfiques sur la toxicité hépatique, est capable de réduire de façon significative le stress oxydatif en neutralisant les espèces réactives de l'oxygène (ROS) générées lors de l'exposition à des pesticides tels que l'éthion et l'acétamipride (Ghazanfari *et al.*, 2021; Ranjith *et al.*, 2024). Il augmente l'activité des enzymes antioxydantes telles que la superoxyde dismutase (SOD) et la glutathion peroxydase (GSH-PX), ce qui aide à protéger les cellules hépatiques contre les dommages oxydatifs (Ghazanfari *et al.*, 2021; Xin *et al.*, 2024). La quercétine a également un effet régulateur à la baisse sur les cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α et les interleukines, dont les niveaux sont augmentés en cas de lésions hépatiques provoquées par les pesticides. De surcroît, il inhibe l'activation de la voie de l'inflammasome NLRP3, ce qui conduit à une réduction de l'inflammation et des lésions hépatiques associées (Xin *et al.*, 2024). La quercétine régule les voies apoptotiques en agissant sur des protéines telles que Bcl-2 et Bax, ce qui permet d'inhiber l'apoptose des hépatocytes provoquée par les pesticides (Ghosh *et al.*, 2022; Xin *et al.*, 2024). Les recherches en amarrage moléculaire révèlent que la quercétine

interagit avec les enzymes du cytochrome P450, ce qui conduit à une amélioration des processus de détoxification (**Ranjith et al., 2024 ; Ghosh et al., 2022**).

En ce qui concerne le taux de glycémie, les données présentées dans le **Tableau 19** révèlent une augmentation hautement significative ($p < 0.01$) de la glycémie après 60 jours de traitement par le PCZ par rapport au groupe contrôle. Ces résultats sont en accord avec ceux de **Mohamed et al. (2021)**, qui ont observé qu'une administration de deux doses de difénoconazole (58,94 et 117,88 mg/kg de poids corporel) a entraîné une augmentation significative des taux de glucose de 8,59 % et 12,83 % respectivement après 28 jours d'exposition, par rapport au groupe témoin. Une augmentation du taux de glucose plasmatique a été observée chez les organismes aquatiques après une exposition au PCZ, chez le *Labeo rohita* (**Hemalatha et al., 2016**) et la truite arc-en-ciel d'eau douce (*Oncorhynchus mykiss*) (**Li et al., 2011**).

L'exposition à certains types de pesticides provoque une augmentation de la glycémie chez le rat en raison de l'augmentation de la production de glucose dans le foie, de l'activité accrue de la phosphoénolpyruvate carboxykinase et de la glucose 6-phosphatase, du stress oxydatif et de la signalisation inflammatoire, notamment par le biais du facteur de nécrose tumorale α et des espèces réactives de l'oxygène (**Mostafalou et al., 2012**). Cependant, le prétraitement avec les extraits d'*E. guttatum* dans les groupes soumis simultanément aux extraits de la plante et au PCZ a conduit à une réduction non significative du glucose, malgré l'effet antidiabétique modéré de la plante mentionnée précédemment.

Tableau 19. Effet du fongicide PCZ et les extraits d'*E. guttatum* sur les enzymes hépatiques (ALAT, ASAT, PAL), la bilirubine, l'albumine et les protéines totales chez les rats mâles après 8 semaines de traitement.

<i>Paramètres Hépatiques</i>							
Groupes	ASAT (U/l)	ALAT (U/l)	PAL (U/l)	Bilirubine (mg/L)	Albumine (g/L)	Protéines Totales (g/L)	Glu (g/l)
Contrôle	128.35±5.69	96.40±6.93	129.42±3.51	5.21±0.58	38.8±0.86	67.71±0.89	1.11 ± 0.13
PCZ	302.5±17.22 ^{###}	160.33±10.37 ^{###}	287.28±14.25 ^{###}	12.31±2.13 ^{##}	35.34±0.69 [#]	61.42±0.48 ^{###}	1.90 ± 0.12 ^{##}
EHe	131.57±5.66 ^{***}	109.42±7.5 ^{***}	141.28±3.41 ^{***}	4.82±0.25 ^{**}	38.64±0.59 ^{ns}	65.85±0.26 [*]	1.09 ± 0.01 ^{**}
EBu	136.57±7.44 ^{***}	101.24±1.92 ^{***}	138.85±6.26 ^{***}	7.07±0.93 ^{ns}	39.16±1.14 [*]	70.71±1.70 ^{***}	1.22 ± 0.09 [*]
EHe +PCZ	191.85±7.56 ^{***##}	126.14±1.29 ^{**#}	202.85±3.41 ^{###***}	6.55±1.33 [*]	37.40±0.75 ^{ns}	63.14±1.29 [#]	1.76 ± 0.18 [#]
EBu +PCZ	188.67±13.75 ^{***##}	123.95±6.13 ^{**}	216.57±15.08 ^{#####}	9.97±1.75 ^{ns}	37.46±0.20 ^{ns}	66.00±0.37 [*]	1.63 ± 0.24 ^{ns}

Les valeurs représentent la moyenne ± SE de sept animaux/groupe. En utilisant l'analyse de variance à sens unique (ANOVA) suivi par Tukey. ns : Différence non significative p > 0.05

* Différence significative (p<0.05), ** Différence hautement significative (p<0.01); *** Différence très hautement significative (p<0.001) les groupes traités (EHe, EBu, EHe+PCZ, EBu+PCZ) par rapport au groupe PCZ

Différence significative (p<0.05), ## Différence hautement significative (p<0.01), ### Différence très hautement significative (p<0.001) les groupes traités (PCZ, EHe, EBu, EHe+PCZ, EBu+PCZ) par rapport au groupe contrôle.

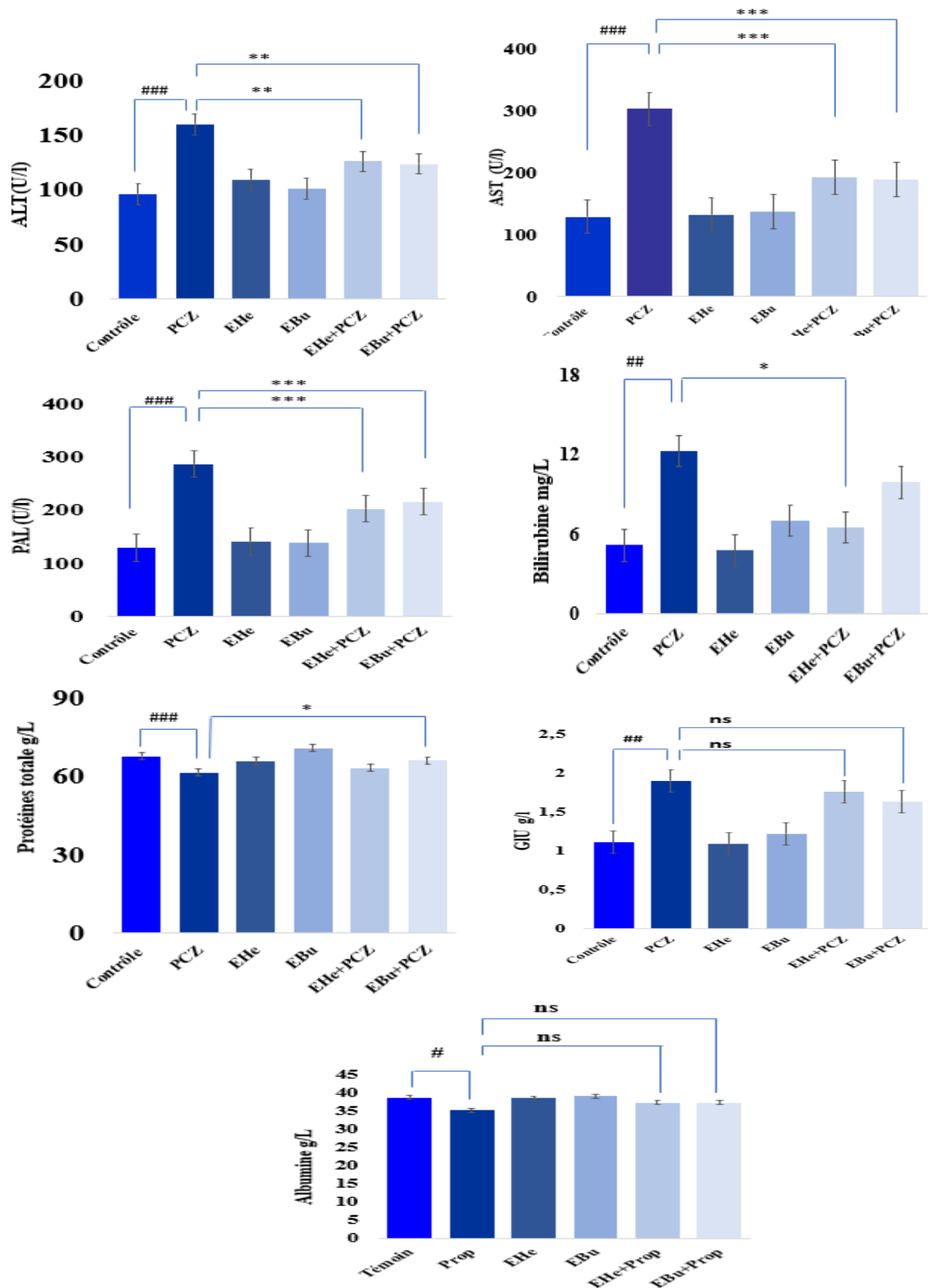


Figure 23. Effet du PCZ et des extraits d'*E. guttatum* sur les paramètres hépatiques des rats après huit semaines de traitement.

3.3.4.3. Etude anatomo-histopathologique du foie

Après huit semaines de traitement, l'histopathologie des foies des rats de tous les groupes expérimentaux a été examinée pour approfondir les recherches sur l'effet protecteur des extraits d'*E. guttatum* sur les foies des rats intoxiqués par le PCZ. La **Figure 24** illustre les changements histopathologiques dans le parenchyme hépatique.

L'étude histopathologique des foies montre que le tissu hépatique, des animaux du groupe témoin et celui des groupes traités aux extraits d'*E. guttatum* présentaient des structures histologiques normales avec un aspect normal de la veine centrale, des hépatocytes normaux et une triade portale normale (**Figure 24 A, C₁ et C₂** respectivement). En revanche, le tissu hépatique des rats intoxiqués par le PCZ présentait des zones variables de nécrose hépatocellulaire focale avec perte de l'architecture trabéculaire, dégradation massive des veines centrales, dégénérescence des noyaux des hépatocytes avec présence d'hépatocytes apoptotiques, dégradation des cellules membranaires, dilatation des sinusoides hépatiques et augmentation du nombre de cellules de Kupffer dans le parenchyme hépatique (**Figure 24 B**). L'exposition subchronique à certains triazoles tels que le diniconazole provoque de graves changements histopathologiques chez les souris, notamment la nécrose et la dégénérescence des hépatocytes par hypertrophie et infiltration de cellules inflammatoires, entraînant une augmentation des paramètres enzymatiques hépatiques (ALAT, ASAT, PAL et bilirubine) (**El-Kott & Kandeel, 2015**). Plusieurs rapports ont signalé des modifications histopathologiques dans les tissus hépatiques de rats adultes suite à une exposition à l'époxiconazole (**Hamdi et al., 2019b**), au penconazole (**Morgan et al., 2023a**) et au propiconazole (**Khalaf et al., 2021**).

Une nette amélioration a été démontrée dans les groupes expérimentaux de l'EBu + PCZ et de l'EHe + PCZ avec la présence d'une légère congestion, une légère dégradation des cellules membranaires et la plupart des hépatocytes semblaient normales, tandis que la nécrose était confinée à des cellules individuelles (**Figures 24 D₁ et D₂**), ce qui confirme nos résultats ci-dessus. L'amélioration observée est attribuable à la présence de composés phytochimiques tels que les polyphénols dans la plante. Diverses études ont démontré que les polyphénols ont la capacité de restaurer la structure et les fonctions normales du foie, entraînant ainsi une diminution des niveaux d'enzymes hépatiques dans le sang et une amélioration des caractéristiques histologiques chez les individus traités (**Gawish & Elhalwagy, 2009; Mossa et al., 2015**). Par exemple, l'acide gallique présente un potentiel pour atténuer les dommages histopathologiques liés à l'apoptose dans les tissus hépatiques (**Apaydin et al., 2023**), tandis que la quercétine offre une protection significative contre les lésions hépatiques induites par le

CCl_4 (Ma *et al.*, 2015). De plus, il a été constaté que l'hespéridine possède la capacité d'atténuer les altérations histologiques. Cela est accompli en inhibant la peroxydation lipidique et en restaurant les fonctions antioxydantes des hépatocytes (Pari *et al.*, 2015; Çetin *et al.*, 2016).

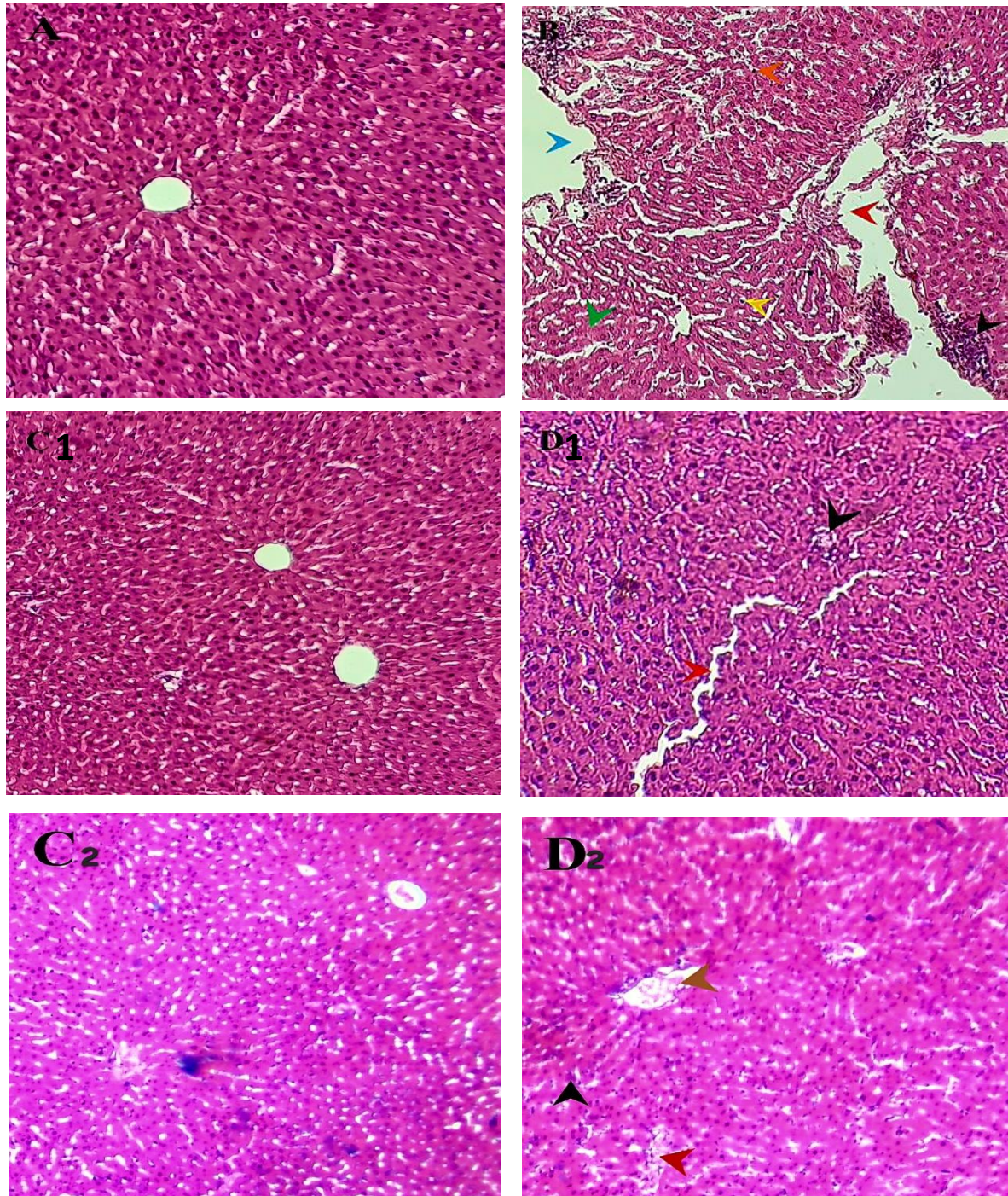


Figure 24. Photomicrographies de tissus hépatiques des tars de tous les groupes expérimentaux, colorés au H&E, 10 \times .

A, groupe témoin normal montrant une veine centrale normale et des hépatocytes normaux, B, groupe PCZ montrant une nécrose hépatocellulaire focale (tête de flèche noire), une

dégénérescence massive de la veine centrale (tête de flèche rouge), une dégénérescence du noyau des hépatocytes (tête de flèche verte), un hépatocyte apoptotique (tête de flèche jaune), dégradation des cellules membranaires (tête de flèche bleue), dilatation des sinusoides hépatiques (tête de flèche grise) et augmentation du nombre de cellules de Kupffer dans le parenchyme hépatique (tête de flèche orange), C1, groupe extrait EBU montrant des hépatocytes normaux et D1, groupe expérimental EBU +PCZ montrant une nécrose des cellules individuelles (tête de flèche noire) et une légère dégradation des cellules membranaires (tête de flèche rouge), C2, groupe EHE montrant des hépatocytes normales, et D2, groupe expérimental EHE+ PCZ montrant une nécrose cellulaire individuelle (tête de flèche noire), une légère congestion (tête de flèche marron) et une légère dégradation des cellules membranaires (tête de flèche rouge) (Coloration H&E, 10×).

3.3.5. Evaluation de l'effet néphroprotecteur des extraits d'*E. guttatum* suite à une intoxication par le propiconazole chez les rats Wistar.

En raison de leur fonction cruciale dans le maintien de l'homéostasie du corps en filtrant et en excréant les déchets toxiques de la circulation sanguine dans l'urine (Katari *et al.*, 2017), les reins sont exposés à une quantité plus concentrée et localisée de produits chimiques que d'autres organes, ce qui en fait l'un des plus vulnérables aux effets négatifs des produits pharmaceutiques et des polluants environnementaux (Radi, 2019). L'urée et la créatinine sont des marqueurs plasmatiques importants pour évaluer la fonction rénale, et leurs niveaux élevés sont souvent associés à un dysfonctionnement rénal (Gowda *et al.*, 2010).

3.3.5.1. Variation de la masse absolue et relative des reins

Selon les données exposées dans le **Tableau 20** et la **Figure 25**, on observe une augmentation hautement significative ($p < 0.01$) tant du poids absolu que du poids relatif du rein chez les individus du groupe traité avec le PCZ comparativement au groupe de contrôle. Nos résultats sont en accord avec les études antérieures qui ont étudié les effets toxiques de différents composés triazoles tels que le bromuconazole, le penconazole et l'époxiconazole, lesquels ont également été liés à une augmentation significative du poids absolu et relatif des reins chez les rongeurs (Rasoul & Marei, 2016; Hamdi *et al.*, 2019b; Rjiba *et al.*, 2021).

La prise de poids des reins après une exposition aux pesticides triazoles peut être due à une augmentation de la peroxydation des lipides, qui provoque des dommages oxydatifs aux cellules rénales, tels que l'hypertrophie, afin de contrecarrer les dommages cellulaires. En outre, l'exposition aux triazoles perturbe les activités des enzymes antioxydantes telles que la superoxyde dismutase et la catalase, entraînant une augmentation initiale de leurs niveaux qui

se transforme en dysfonctionnement à des doses plus élevées. Cette perturbation contribue au stress rénal et à la prise de poids (Hamdi *et al.*, 2019b).

Le prétraitement par des extraits d'*E. guttatum* avant l'administration de PCZ a provoqué une diminution hautement significative ($p < 0.01$) avec EHe et significative ($p < 0.05$) avec EBU du poids absolu et relatif des reins par rapport au groupe PCZ, sans différence par rapport au groupe contrôle. Ces résultats révèlent un rôle potentiel protecteur des extraits de la plante étudiée sur les reins des rats *in vivo*.

Tableau 20. Modification du poids absolu et relatif des reins des rats albinos mâles dans tous les groupes expérimentaux après 60 jours de traitement.

Poids	Groupes expérimentaux					
	Contrôle	PCZ	EHe	EBu	PCZ+EHe	PCZ+EBu
Poids absolu du rein (g)	0.83±0.03	1.22±0.11 ^{##}	0.88±0.07*	0.88±0.04*	0.83±0.03**	0.92±0.07*
Poids relatif du rein (%)	0.35±0.02	0.50±0.03 ^{##}	0.34±0.02**	0.33±0.02**	0.33±0.01**	0.36±0.03*

Les valeurs représentent la moyenne ± SE de sept animaux/groupe. En utilisant l'analyse de variance à sens unique (ANOVA) suivi par Tukey. Poids relatif de l'organe = (Poids de l'organe / Poids final du corps) x 100.

* Différence significative ($p < 0.05$), ** Différence hautement significative ($p < 0.01$) les groupes traités (EHe, EBU, EHe+PCZ, EBU+PCZ) par rapport au groupe PCZ.

Différence hautement significative ($p < 0.05$), les groupes traités (PCZ, EHe, EBU, EHe+PCZ, EBU+PCZ) par rapport au groupe contrôle.

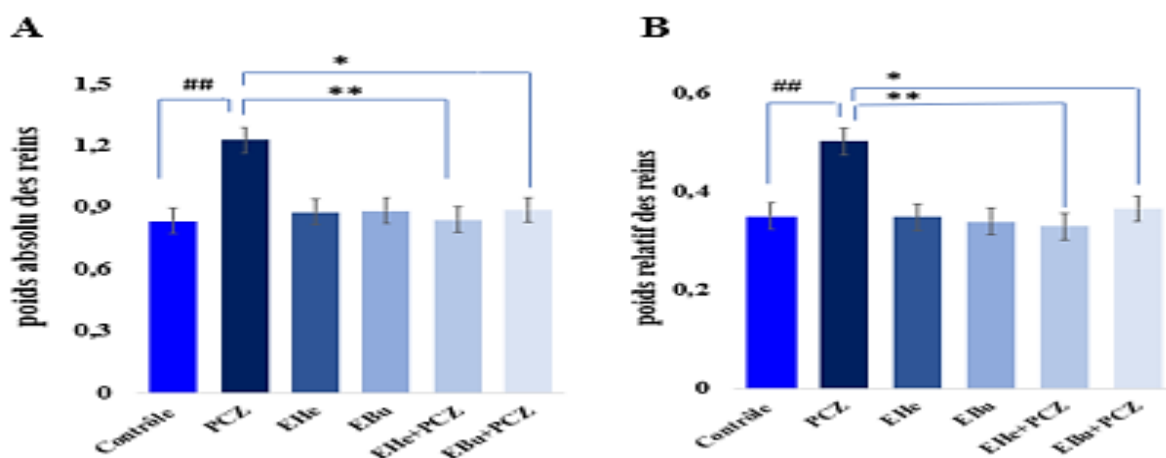


Figure 25. Effet du PCZ et des extraits d'*E. guttatum* sur le poids absolu (A) et relatif des reins (B) de rats après huit semaines de traitement.

3.3.5.2. Evaluation des paramètres biochimiques liés à la fonction rénale

Nos résultats, illustrés dans le **Tableau 21** et la **Figure 26**, montrent que le groupe de rats traités au PCZ a présenté une augmentation très hautement significative ($p < 0.001$) des taux de créatinine et d'urée plasmatiques, indiquant un dysfonctionnement rénal et une altération de la fonction glomérulaire. Cette constatation a été confirmée par d'autres études dans lesquelles des rats ont été exposés à environ 75 mg/kg de poids corporel de PCZ pendant 8 semaines (**Elalfy et al., 2021**). En outre, des rats exposés à une dose de 58,94 mg/kg/pc de difénoconazole pendant 28 jours ont également montré une augmentation significative des taux d'urée et de créatinine dans le sang (**Mohamed et al., 2021**), similaire à celle observée chez des rats ayant reçu 50 mg/kg de poids corporel de penconazole pendant 10 jours (**Morgan et al., 2023b**).

Dans cette étude, l'acide urique, connu pour ses propriétés antioxydantes, a également été utilisé comme paramètre d'évaluation de la fonction rénale. Nos résultats montrent une diminution très hautement significative ($p < 0.001$) de son taux plasmatique après l'exposition au PCZ, ce qui pourrait indiquer une production excessive d'espèces réactives de l'oxygène, puisque l'acide urique agit comme un puissant piègeur de radicaux libres. Ce résultat est conforme à une étude précédente menée par **Othmène et al. (2020)**, qui ont observé une réduction des niveaux d'acide urique chez les rats traités avec 0,9, 9, 27 et 104 mg/kg/pc une fois par jour pendant 28 jours par le tébuconazole. Cependant, il diffère des résultats rapportés par **Rjiba et al. (2021)**, où l'administration de bromuconazole à trois doses (3,28, 16,4 et 32,8 mg/kg/j) après 28 jours d'expérience a conduit à des niveaux élevés d'acide urique plasmatique chez les rats.

L'administration préalable d'extraits d'*E. guttatum* avant le traitement par le PCZ chez les rats a eu pour effet d'atténuer les dommages rénaux, comme en témoigne une amélioration très hautement significative dans la valeur de l'urée avec les deux extraits. Cependant, pour la créatinine et l'acide urique, l'amélioration est hautement significative avec l'EHe et significative avec l'EBu. Ces effets bénéfiques des extraits pourraient être attribués à la présence de flavonoïdes qui ont des effets néphroprotecteurs en éliminant les espèces réactives de l'oxygène (ROS). Cela permet de réduire les dommages oxydatifs infligés aux tissus rénaux, d'inhiber les médiateurs inflammatoires, de moduler les voies de signalisation intracellulaires et d'atténuer l'inflammation. Ainsi, les flavonoïdes contribuent à préserver l'intégrité structurelle et fonctionnelle des reins face à la toxicité des pesticides (**Vargas et al., 2018; Zeng et al., 2021; Jain et al., 2024**). Tel que la lutéoline, en améliorant l'activité des enzymes antioxydantes comme la superoxyde dismutase et la catalase, permet de neutraliser le stress

oxydatif induit par des agents toxiques (Alekhya Sita *et al.*, 2019; Albarakati *et al.*, 2020). Et d'autres flavonoïdes comme la quercétine (Abarikwu, 2014) et l'héspéridine (Elhelaly *et al.*, 2019; Pari *et al.*, 2015).

Cette amélioration est également attribuable à la présence d'acides phénoliques tels que l'acide gallique, qui exerçait un rôle protecteur contre la néphrotoxicité induite par le fénitrothion, le méthotrexate et l'acrylamide, en augmentant l'activité des enzymes antioxydantes, en réduisant les taux de malondialdéhyde et en améliorant les marqueurs de la fonction rénale (Asci *et al.*, 2017; Apaydın *et al.*, 2023; Alejowlo *et al.*, 2024), et ainsi contre la toxicité du paraquat, en soulignant ses propriétés antioxydantes qui améliorent les niveaux de vitamine C rénale, de superoxyde dismutase et de catalase tout en réduisant les marqueurs du stress oxydatif et les réponses inflammatoires, protégeant ainsi le tissu rénal (Nouri *et al.*, 2021).

Tableau 21. Effet du fongicide PCZ et des extraits d'*E. guttatum* sur les paramètres rénaux chez les rats mâles après 8 semaines de traitement.

Groupes	<i>Les paramètres rénaux</i>		
	Urée (mg/dl)	Créatinine (mg/dl)	Acid urique (mg/dl)
Contrôle	32.57±1.28	0.53±0.03	3.1±0.17
PCZ	53.14±1.93 ^{###}	0.76±0.02 ^{###}	1.67±0.14 ^{###}
EHe	36.57±1.55 ^{***}	0.52±0.02 ^{***}	2.98±0.17 ^{**}
EBu	35.71±2.3 ^{***}	0.54±0.02 ^{***}	4.05±0.26 ^{***}
EHe +PCZ	38.37±2.66 ^{***}	0.62±0.02 ^{**}	2.71±0.08 ^{**}
EBu +PCZ	39.14±1.62 ^{***}	0.63±0.02 [*]	3.04±0.35 [*]

Les valeurs représentent la moyenne ± SE de sept animaux/groupe. En utilisant l'analyse de variance à sens unique (ANOVA) suivi par le teste de Tukey.

* Différence significative (p<0.05), ** Différence hautement significative (p<0.01), *** Différence très hautement significative, les groupes traités (EHe, EBU, EHe+PCZ, EBU+PCZ) par rapport au groupe PCZ.

Différence significative (p<0.001), les groupes traités (Prop, EHe, EBU, EHe+PCZ, EBU+PCZ) par rapport au groupe contrôle.

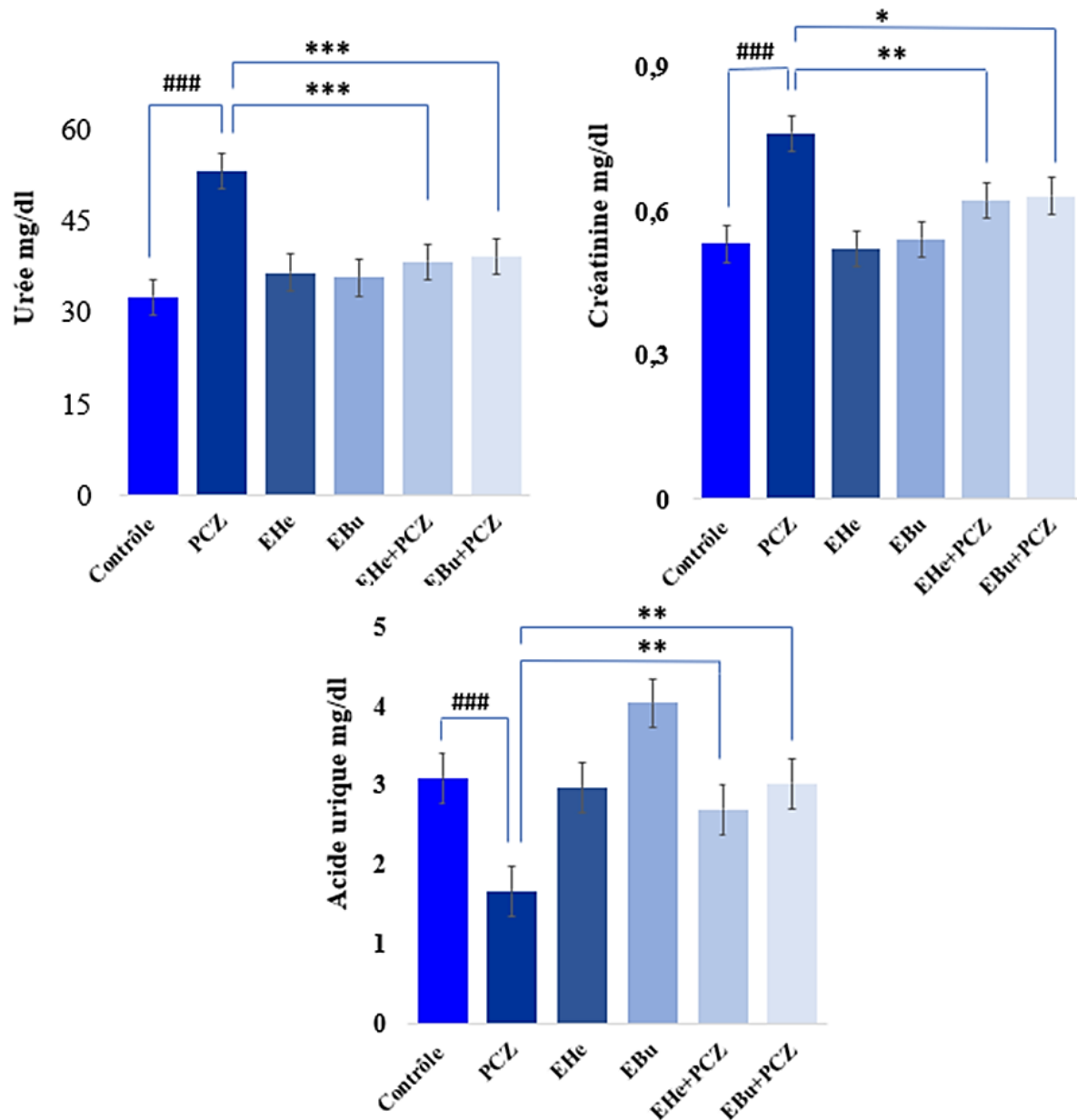


Figure 26. Effet du PCZ et des extraits d'*E. guttatum* sur les paramètres rénaux des rats après huit semaines de traitement.

3.3.5.3. L'histopathologie des tissus rénaux

Les tissus rénaux du groupe de contrôle et des groupes des extraits d'*E. guttatum* étaient normaux avec une structure histologique normale du parenchyme rénal et des cellules rénales (Figures 27 A, C1 et C2 respectivement). En revanche, les tissus rénaux des rats traités au PCZ présentaient une destruction du parenchyme rénal, une hémorragie tubulaire, une nécrose de l'épithélium tubulaire avec pycnose nucléaire, une atrophie glomérulaire avec vacuolisation et nécrose, une infiltration de cellules mononucléaires intertubulaires, une hypertrophie et une

congestion des vaisseaux sanguins rénaux (**Figure 27 B**). Des modifications histologiques du tissu rénal ont été observées dans des rapports antérieurs où les rats ont été exposés à l'époxiconazole (**Hamdi *et al.*, 2019b**), au penconazole (**Rasoul & Marei, 2016; Morgan *et al.*, 2023a**), au propiconazole (**Khalaf *et al.*, 2021**) et au tébuconazole (**Othmène *et al.*, 2020**). Une atténuation significative de la destruction du parenchyme rénal, de l'hémorragie tubulaire, de la nécrose épithéliale tubulaire avec pycnose nucléaire et infiltration de cellules mononucléaires intertubulaires a été enregistrée dans les tissus rénaux des rats ayant reçu à la fois les extraits d'*E. guttatum* et le PCZ (**Figures 26 D1 et D2**).

Cette amélioration est due aux polyphénols qui peuvent améliorer les fonctions des organes, y compris les reins, en exerçant des effets antioxydants, anti-inflammatoires et anti-apoptotiques, rétablissant ainsi potentiellement la structure et les fonctions normales après une toxicité par les pesticides (**Zeng *et al.*, 2021; Ashkar *et al.*, 2022**).

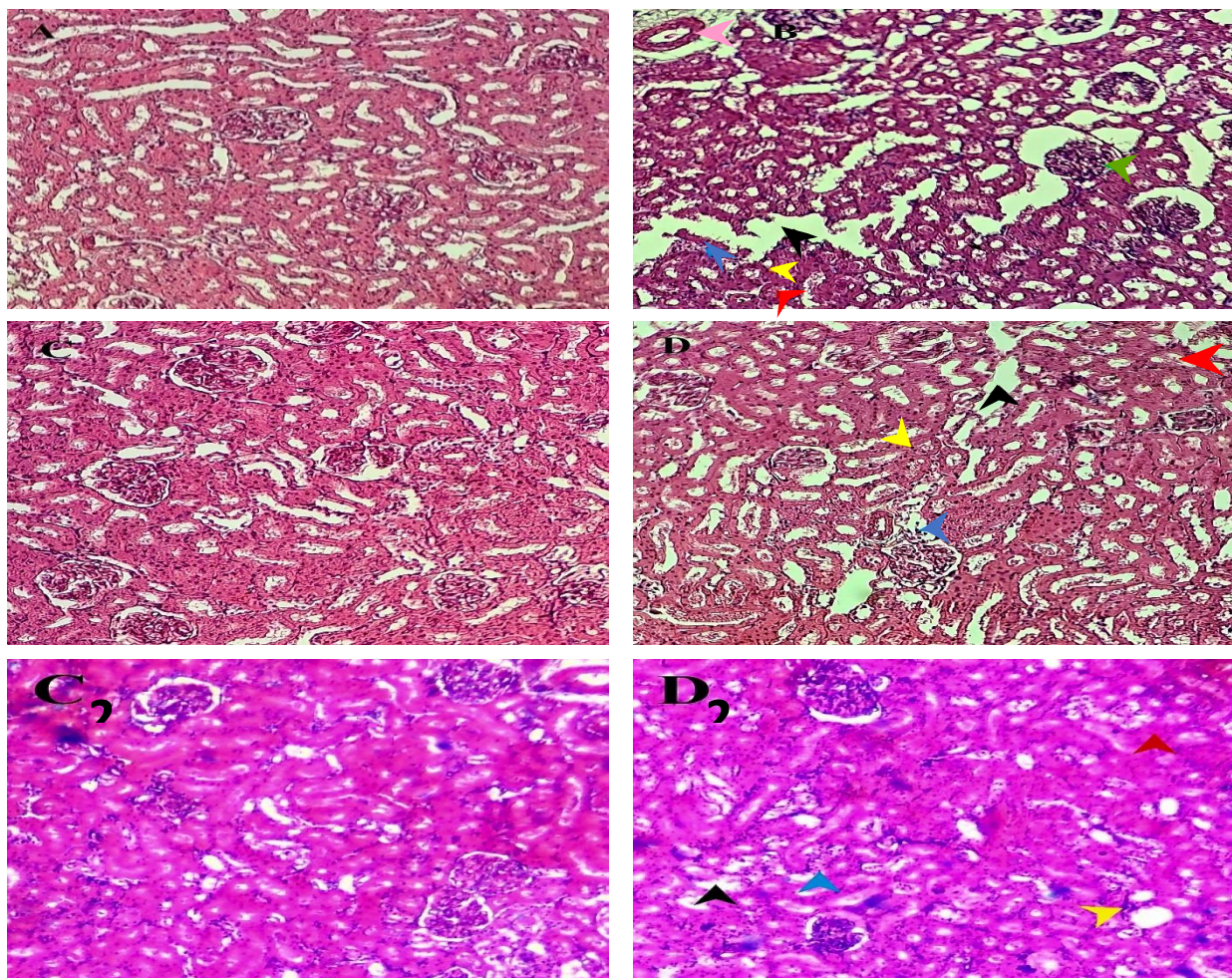


Figure 27. Photomicrographies de tissus rénaux des rats de tous les groupes expérimentaux, colorés au H&E, 40×.

A, groupe control normale montrant des glomérules et des tubules rénaux normaux, B, groupe expérimental intoxiqué au PCZ montrant la destruction du parenchyme rénal (pointe de flèche noire), hémorragie tubulaire (tête de flèche rouge), nécrose épithéliale tubulaire avec pycnose nucléaire (tête de flèche jaune), atrophie glomérulaire avec vacuolisation et nécrose (tête de flèche en verre), infiltration de cellules mononucléaires intertubulaires (tête de flèche bleue), hypertrophie et congestion des vaisseaux sanguins rénaux (tête de flèche rose), C1, groupe d'Ebu montrant une structure histologique normale, et D1, groupe expérimental de l'Ebu + PCZ montrant une légère destruction du parenchyme rénal (tête de flèche noire), une légère hémorragie tubulaire (tête de flèche rouge), une légère nécrose épithéliale tubulaire avec pycnose nucléaire (tête de flèche jaune) et une légère infiltration de cellules mononucléaires intertubulaires (tête de flèche bleue), C2, groupe expérimental d'EHe montrant une structure histologique normale, D2, groupe expérimental de l'EHe + PCZ montrant une légère destruction du parenchyme rénal (tête de flèche noire), une légère hémorragie tubulaire (tête de flèche rouge), une légère nécrose épithéliale tubulaire (tête de flèche jaune) et une légère infiltration de cellules mononucléées intertubulaires (tête de flèche bleue). (Coloration H&E, 40×).

3.3.6. Effets du propiconazole sur le profil lipidique et l'action protectrice des extraits d'*E. guttatum*

Les lipides sont des éléments clés qui régulent les fonctions cellulaires et maintiennent l'homéostasie cellulaire (**Ghadir *et al.*, 2010**). Cependant, les lésions hépatiques et la stéatose sont associées à une augmentation des taux de cholestérol et de triglycérides (**Maretti-Mira *et al.*, 2022**).

Les résultats obtenus à partir du profil lipidique plasmatique contenant les taux de cholestérol total (CT), de triglycérides (TG), de lipoprotéines de haute densité (HDL) et de lipoprotéines de basse densité (LDL). Nos résultats (**Tableau 22, Figure 28**) ont révélé des augmentations très hautement significatives ($p < 0.001$) des taux de TC, de TG et de LDL et une diminution non significative du taux de HDL chez les rats traités au PCZ par rapport au groupe contrôle, entraînant une perturbation du métabolisme lipidique. Ces résultats sont cohérents avec des études antérieures de **Hamdi *et al.* (2022)** qui ont rapporté que l'administration d'époxiconazole à 24, 40 et 56 mg/kg de poids corporel à des rats pendant 28 jours augmentait également les profils lipidiques plasmatiques, et de l'étude de **Sun *et al.* (2023)** qui a indiqué que l'administration de doses faibles et élevées d'hexaconazole pendant 12

semaines augmentait les niveaux de paramètres lipidiques tels que TC, TG, LDL et diminuait les niveaux de HDL par rapport au groupe témoin.

L'exposition à l'hexaconazole provoque une augmentation des profils lipidiques chez les rats en activant les voies de signalisation mTOR-PPAR- γ /SREBP1 induites par le stress oxydatif. Cela conduit à une augmentation de la lipogenèse et de l'accumulation de lipides, perturbant ainsi l'homéostasie lipidique (Sun *et al.*, 2023). De plus, les triazoles ont des interactions avec des récepteurs nucléaires tels que le PXR et le PPAR α , qui ont une importance capitale dans la régulation du métabolisme lipidique et de la stéatose (Knebel *et al.*, 2019). Le récepteur prégnane X (PXR) joue un rôle essentiel dans le processus d'accumulation de triglycérides et de stéatose observé dans les lignées cellulaires hépatiques humaines exposées aux propiconazole et tébuconazole (Knebel *et al.*, 2019). Une exposition aiguë aux triazoles provoque une redistribution significative des profils d'acides gras dans les lipides du foie, notamment une diminution des acides gras monoinsaturés (AGMI) (Khyzhnyak *et al.*, 2022). Cette diminution peut perturber les processus d'absorption, d'exportation et d'utilisation des lipides, ce qui peut conduire à une accumulation de lipides dans le foie (Badmus *et al.*, 2022). Et l'augmentation des taux de lipides sanguins, y compris des acides gras monoinsaturés et des triglycérides, est fréquemment associée à l'accumulation de lipides dans le foie (Geisler & Renquist, 2017; Yang *et al.*, 2017). L'altération du métabolisme lipidique causée par l'exposition aux triazoles peut conduire à des problèmes de santé graves tels que l'obésité et les maladies cardiovasculaires. Cela se manifeste par l'accumulation de lipides et la modification des profils d'acides gras dans le foie, comme en témoignent diverses études démontrant que l'exposition subchronique aux triazoles tels que le tébuconazole et l'époxiconazole entraîne des dommages cardiaques chez les rats Wistar mâles (Ben Othmène *et al.*, 2020; Hamdi *et al.*, 2022).

Néanmoins, la pré-supplémentation avec l'EHe d'*E. guttatum* a entraîné une diminution hautement significative ($p < 0.01$) des triglycérides et du LDL et une réduction significative ($p < 0.05$) du taux de cholestérol total. En revanche, l'EBu a provoqué une diminution hautement significative ($p < 0.01$) du taux de cholestérol total, une diminution significative ($p < 0.05$) du LDL, ainsi qu'une diminution non significative des triglycérides par rapport au groupe traité exclusivement par le PCZ. Aucune différence n'a été constatée par rapport au groupe témoin.

Ces effets bénéfiques d'*E. guttatum* observés dans la présente recherche peuvent être attribués à la présence de composés phénoliques tels que la quercétine, la lutéoline, l'acide gallique, l'acide shikimique, le kaempférol, qui sont capables de réguler le métabolisme et

d'améliorer le profil lipidique par le biais de divers mécanismes épigénétique, transcriptionnel et translationnel qui ont été démontrés dans des études antérieures (Toma *et al.*, 2020; Kim *et al.*, 2019; Ochiai *et al.*, 2021; Ramadhan *et al.*, 2023).

Tableau 22. Effet du fongicide PCZ et des extraits d'*E. guttatum* sur les paramètres lipidiques sériques chez les rats mâles après 8 semaines de traitement.

Groupes	<i>Paramètres lipidiques</i>			
	Chol T (g/l)	TG (g/l)	HDL (g/l)	LDL(g/l)
Contrôle	0.62±0.03	0.54±0.07	0.39±0.03	0.12±0.03
PCZ	0.90±0.05 ^{###}	1.08±0.13 ^{###}	0.33±0.02 ^{ns}	0.35±0.06 ^{##} #
EHe	0.64±0.02 ^{***}	0.57±0.02 ^{***}	0.43±0.008 ^{ns}	0.09±0.02 ^{**} *
EBu	0.65±0.05 ^{***}	0.54±0.04 ^{***}	0.39±0.02 ^{ns}	0.14±0.03 [*] *
EHe+ PCZ	0.71±0.03 [*]	0.67±0.06 [*]	0.35±0.03 ^{ns}	0.15±0.03 ^{**}
EBu+ PCZ	0.66±0.01 ^{**}	0.77±0.06 ^{ns}	0.35±0.11 ^{ns}	0.19±0.02 [*]

Les valeurs représentent la moyenne ± SE de sept animaux/groupe. En utilisant l'analyse de variance à sens unique (ANOVA) suivi par Tukey.

ns : Différence non significative $p > 0.05$

* Différence significative ($p < 0.05$), ** Différence hautement significative ($p < 0.01$) ; *** Différence très hautement significative ($p < 0.001$) les groupes traités (EHe, EBu, EHe+PCZ, EBu+PCZ) par rapport au groupe PCZ.

Différence significative ($p < 0.05$), ## Différence hautement significative ($p < 0.01$), ### Différence très hautement significative ($p < 0.001$) les groupes traités (Prop, EHe, EBu, EHe+PCZ, EBu+PCZ) par rapport au groupe contrôle.

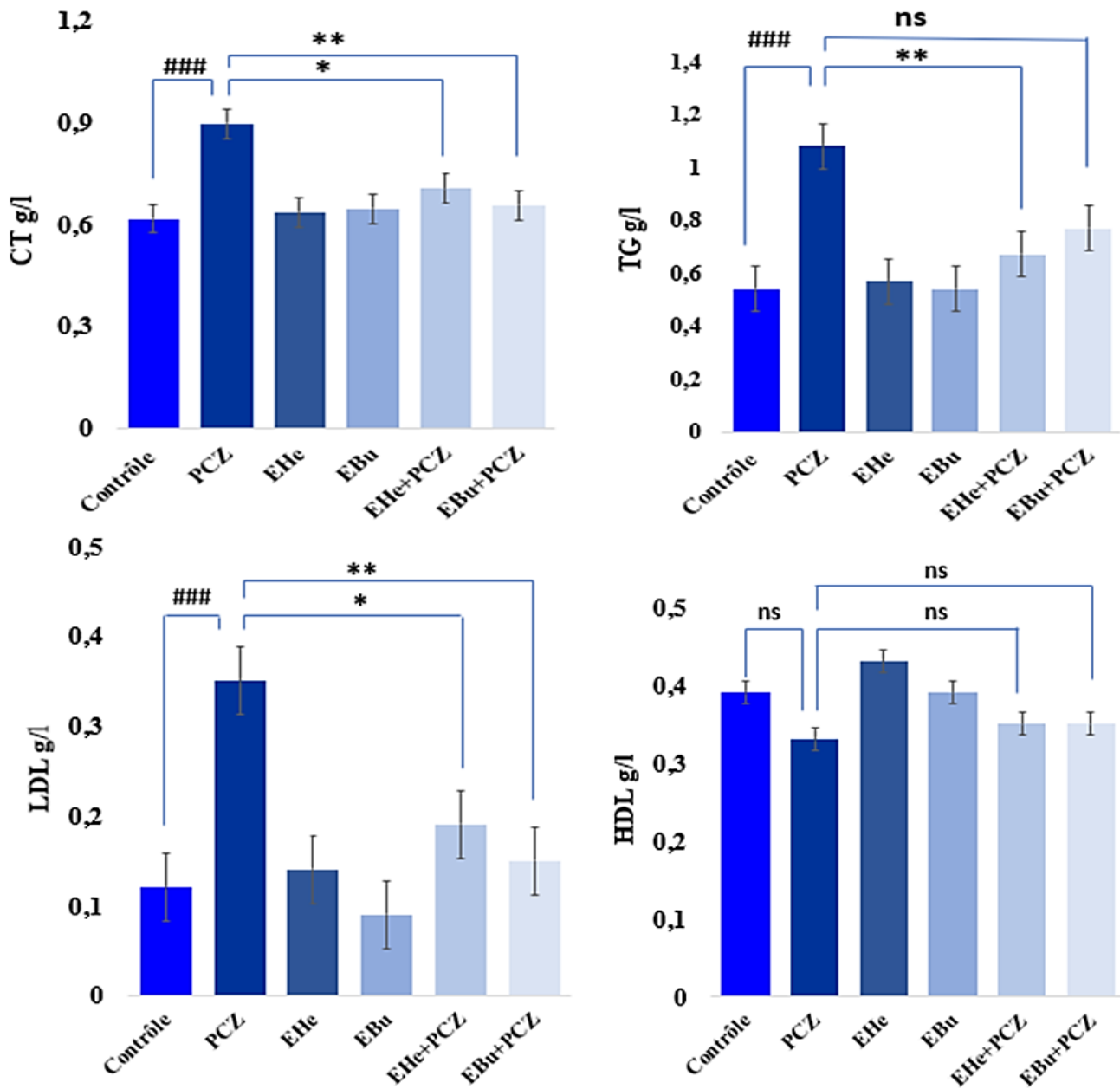


Figure 28. Effet du PCZ et des extraits d’*E. guttatum* sur le profil lipidique chez les rats après huit semaines de traitement.

3.3.7. Effets du propiconazole sur la fonction reproductrice et l’action protectrice des extraits d’*E. guttatum*.

Les testicules sont essentiels pour la synthèse des hormones stéroïdes (stéroïdogénèse) et la création de spermatozoïdes matures (spermatogénèse), deux tâches essentielles qui dépendent de la coordination de leurs nombreux types de cellules (Moreira *et al.*, 2021). Chez

les hommes, les pesticides peuvent endommager les tubules séminifères, perturber la libération des hormones, réduire la mobilité des spermatozoïdes et endommager le matériel génétique des spermatozoïdes (Wdowiak *et al.*, 2024).

L'hypophyse, un organe crucial du système endocrinien, produit des hormones principales : la folliculostimulante (FSH), l'hormone lutéinisante (LH) et la thyroïdostimuline (TSH) (Páez-Pereda & Stalla, 2005). La thyroïde, une glande endocrine, régule les hormones (triiodothyronine T3 et thyroxine T4) et exerce des fonctions essentielles telles que la reproduction (Fonseca *et al.*, 2022), et les pesticides peuvent perturber l'hypothalamo-hypophyso-gonadique, entraînant changements morphologiques et complications reproductives (Pandey & Mohanty, 2017; He *et al.*, 2024).

3.3.7.1. Variation de la masse absolue et relative des testicules et des épидидymes

L'évaluation du poids absolu et relatif des testicules chez les rats traités par le PCZ a révélé une diminution hautement significative par rapport au groupe contrôle, tandis que le poids absolu et relatif de l'épididyme a présenté une diminution non significative (Tableau 23, Figure 29). Ces résultats sont cohérents avec ceux rapportés par El-Sharkawy & El-Nisr (2013), qui ont démontré qu'une exposition prolongée (trois fois par semaine) sur une période de 9 mois au penconazole à une dose de 50 mg/kg/pc, administrée par voie orale chez les rats, a provoqué une diminution significative du poids relatif des testicules ($p < 0,05$) par rapport aux testicules du groupe témoin. Nos résultats sont en accord aussi avec l'étude de Zheng *et al.* (2023), qui ont trouvé que le poids relatif des testicules chez les souris était significativement réduit à la suite d'une toxicité subchronique de 35 jours avec une dose de 20 et 40 mg/kg/pc/j de difénoconazole.

Ces résultats pourraient être liés à une augmentation du stress oxydatif dans le tissu testiculaire, entraînant des dommages oxydatifs susceptibles de jouer un rôle dans l'induction de l'apoptose, la dégénérescence des tissus testiculaires, ainsi que la diminution de la masse corporelle (Mokhbatly *et al.*, 2019; Abd-Elhakim *et al.*, 2021). De plus, cette réduction dans le poids des testicules est un indicateur de dommages importants au niveau cellulaire et hormonal et pourrait s'expliquer par le fait que le PCZ induit une altération de la structure des testicules et interfère donc avec la spermatogenèse (Mutwedu *et al.*, 2021).

Le prétraitement avec les extraits de la plante avant l'administration du PCZ a révélé un poids relatif et absolu des testicules comparable à celui du groupe témoin cela signifie le rôle préventif de ces extraits sur les tissus testiculaires.

Tableau 23. Variation de la masse absolue et relative des testicules et de l'épididyme chez tous les groupes expérimentaux après 60 jours de traitement.

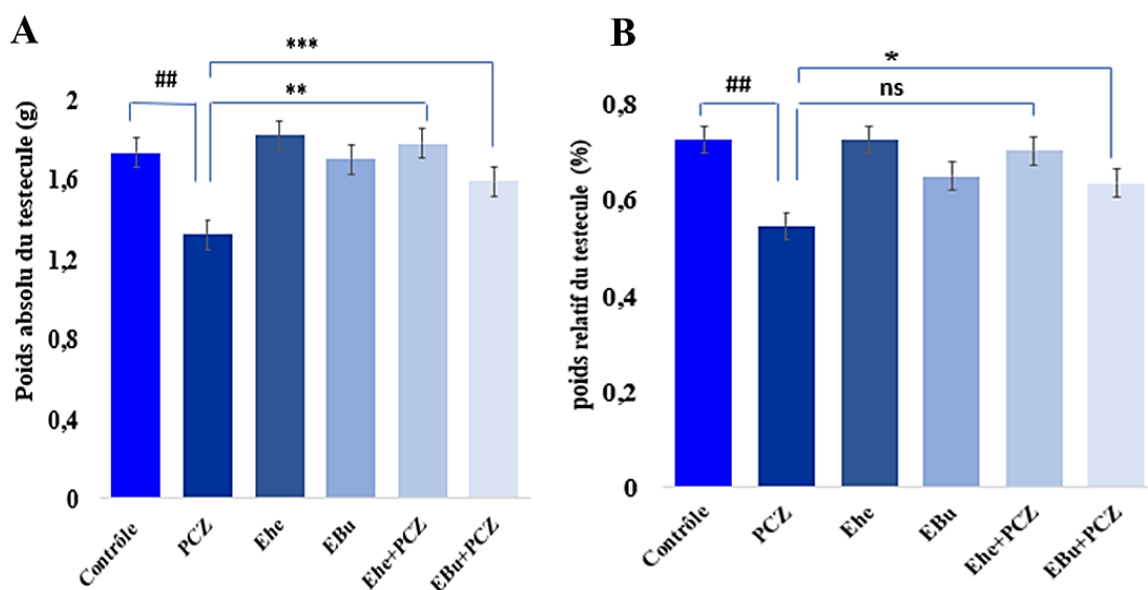
Poids	Groupes expérimentaux					
	Contrôle	PCZ	EHe	EBu	EHe +PCZ	EBu + PCZ
Poids absolu du testicule (g)	1.73±0.06	1.32±0.07 ^{##}	1.70±0.05 ^{**}	1.82±0.06 ^{***}	1.59±0.1 ^{**}	1.77±0.05 ^{***}
Poids relatif du testicule (%)	0.72±0.03	0.54±0.02 ^{##}	0.65±0.03 ^{ns}	0.72±0.03 ^{**}	0.63±0.04 ^{ns}	0.70±0.06 [*]
Poids absolu d'épididyme(g)	0.49±0.12	0.46±0.54	0.52±0.48	0.47±0.44	0.45±0.05	0.47±0.03
Poids relatif d'épididymes (%)	0.21±0.05	0.18±0.01	0.18±0.01	0.20±0.02	0.17±0.013	0.18±0.01

Les valeurs représentent la moyenne ± SE de sept animaux/groupe. En utilisant l'analyse de variance à sens unique (ANOVA) suivi par Tukey.

ns : Différence non significative $p > 0.05$

* Différence significative ($p < 0.05$), ** Différence hautement significative ($p < 0.01$) ; *** Différence très hautement significative ($p < 0.001$) les groupes traités (EHe, EBU, EHe+PCZ, EBU+PCZ) par rapport au groupe PCZ.

Différence hautement significative ($p < 0.01$) les groupes traités (Prop, EHe, EBU, EHe+PCZ, EBU+PCZ) par rapport au groupe contrôle.

**Figure 29.** Effet du PCZ et des extraits d'*E. guttatum* sur le poids absolu (A) et relatif (B) des testicules de rats après huit semaines de traitement.

3.3.7.2. Variation des taux des hormones

Les données présentées dans le **Tableau 24** et la **Figure 30** de cette recherche révèlent que l'administration de PCZ à une dose de 50 mg/kg/jour a provoqué une baisse hautement

significative du taux de testostérone, avec des taux en LH et FSH comparables à ceux enregistrés chez les rats du groupe de contrôle. Ces résultats concordent avec l'étude de **Goetz et al. (2009)**, qui ont montré qu'après 48 heures d'exposition de la lignée cellulaire H295R (adénocarcinome surrénalien humain) au myclobutanil, au propiconazole ou au triadiméfon à 1, 3, 10, 30 ou 100 mM, il y avait une diminution de la testostérone par les trois triazoles. Une autre étude a mis en évidence une diminution significative ($p < 0,05$) des taux de testostérone, de FSH et de LH dans les groupes à faible dose (15 mg/kg/pc/j) et à dose élevée (30 mg/kg/pc/j) de difénoconazole. Cette diminution s'est établie respectivement à (26,23 et 57,72 %), (21,94 et 43,33 %) et (28,63 et 44,35 %), par rapport au groupe témoin, au cours d'une étude expérimentale de 70 jours par un gavage oral (**Khwanes et al., 2022**). De plus, les résultats de la recherche réalisée par **Mokhbatly et al. (2019)** ont révélé une baisse significative ($P \leq 0,05$) des niveaux de testostérone sérique (0.60 ± 0.04 , 0.66 ± 0.03 ng /mL) chez les rats ayant reçu par voie orale des doses respectives de 13,8 et 32,8 mg/kg/pc/j de bromuconazole par rapport au groupe de contrôle (1.75 ± 0.11 ng/mL) sur une durée de traitement de 90 jours. De manière similaire, **Shams et al. (2024)** ont constaté une réduction des niveaux de toutes les hormones (LH : 4.34 ± 1 , FSH : 2.32 ± 0.04 , Testostérone : 0.83 ± 0.07) par rapport au groupe de contrôle (LH : 4.64 ± 0.69 , FSH : 2.39 ± 0.07 , Testostérone : 0.88 ± 0.09) suite à l'administration de penconazole à une dose de 50 mg/kg par injection intrapéritonéale pendant une période de traitement de 14 jours suivie de 28 jours de repos.

Inversement, alors que les triazoles sont connus pour perturber les niveaux de testostérone, certaines études indiquent que certains triazoles peuvent augmenter la testostérone sérique chez les modèles adultes, ce qui suggère une interaction complexe qui mérite d'être étudiée plus avant (**Blystone, 2006; Goetz et al., 2009**).

Concernant le TSH et l'hormone thyroïdienne T4, nous trouverions une diminution de taux de T4 chez les rats et une augmentation des taux de TSH dans le groupe traité par le PCZ par rapport au groupe témoin. Ces résultats sont cohérents avec ceux de **Liu et al. (2022)**, qui ont indiqué que le paclobutrazol et l'uniconazole pourraient perturber le système endocrinien thyroïdien des rats en modifiant les niveaux de T4. Par un changement de manière significative après une exposition de 28 jours au paclobutrazol (32.5 et 260 mg/kg) et à l'uniconazole (50.5 et 404 mg/kg). Des études ont démontré que l'exposition à des fongicides à base de triazole tels que le 3-amino-1, 2, 4-triazole (ATZ) et le cyproconazole entraîne une réduction des concentrations sériques de T4 et une augmentation des taux de TSH (**He et al., 2024; Takaoka et al., 1994**).

Une autre étude menée par **Kadic *et al.* (2024)** a rapporté qu'après une administration des fongicides cyproconazole, époxiconazole et prochloraze aux rats pendant une période de 28 jours, une diminution statistiquement significative des niveaux de T4 sérique (43.4 %) et une augmentation des niveaux de TSH (293.4 %) ont été observées chez les rats traités avec du cyproconazole à 74 mg/kg /j par rapport aux animaux non traités (contrôle). L'exposition au prochloraze à 68 mg/kg/j a également significativement diminué les niveaux de T4 (30.5 %).

En ce qui concerne la concentration en spermatozoïdes, nous avons constaté une diminution de la concentration en spermatozoïdes dans le groupe traité aux PCZ par rapport au groupe témoin. Ce résultat est cohérent avec d'autres études qui ont montré que l'exposition à des fongicides à base de triazole tels que le tébuconazole, l'époxiconazole et le penconazole entraînait une diminution de la concentration en spermatozoïdes (**Grote *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2024; El-Sharkawy & El-Nisr 2013**).

Les fongicides à base de triazole entraînent une réduction des niveaux d'hormones sexuelles telle que la testostérone, à travers divers mécanismes incluant la perturbation de la stéroïdogenèse, l'inhibition des activités enzymatiques clés et des altérations des voies de signalisation hormonale. Des études ont confirmé que les fongicides contenant des triazoles, tels que le myclobutanil et le triadiméfon, ont la capacité d'inhiber des enzymes essentielles de la voie stéroïdogène, notamment le CYP17, qui joue un rôle crucial dans la biosynthèse de la testostérone (**Blystone, 2006; Goetz *et al.*, 2009**). L'exposition aux composés triazoles comme le propiconazole a provoqué une réduction de la production de testostérone dans des poulets mâles en utilisant des explants testiculaires, ainsi qu'une altération de l'expression de gènes stéroïdogènes tels que HSD3B et STAR via une augmentation de l'expression d'AHR et de CAR et du stress oxydatif, respectivement (**Serra *et al.*, 2023**). Plusieurs fongicides conazoles montrent des effets anti-androgéniques *in vitro* (l'utilisation de cellules de Leydig murines (MA-10) et de cellules humaines T47D-ARE) découlant de deux mécanismes : l'inhibition de la sécrétion de testostérone et l'antagonisme de l'AR, suggérant des effets toxiques testiculaires potentiels et une perturbation endocrinienne (**Roelofs *et al.*, 2014; Draskau & Svingen, 2022**). Le cyproconazole a la capacité d'agir en tant qu'agoniste des récepteurs des œstrogènes, ce qui peut induire des changements dans l'expression génique au sein de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique, responsable de la régulation de la production hormonale (**He *et al.*, 2024**). L'exposition au difénoconazole a été associée à une perturbation de la signalisation de l'acide rétinoïque, essentielle à la spermatogenèse, contribuant ainsi à la diminution du taux de testostérone (**Zheng *et al.*, 2023**).

L'exposition à des fongicides triazoles pendant des périodes critiques du développement peut entraîner des problèmes de santé reproductive à long terme, comme le montrent des études dans lesquelles la production de testostérone fœtale a été inhibée (**Blystone, 2006**).

Les triazoles perturbent le système endocrinien en inhibant l'activité de la peroxydase thyroïdienne, qui est cruciale pour la synthèse des hormones thyroïdiennes (**Takaoka et al., 1994**). Certaines études suggèrent que les mécanismes de détoxification hépatique pourraient également jouer un rôle dans la perturbation de l'homéostasie des hormones thyroïdiennes. Ainsi, les examens histologiques ont révélé une hypertrophie et une hyperplasie folliculaires thyroïdiennes en réponse à une exposition au triazole, ce qui suggère des effets directs sur la glande thyroïde (**Kadic et al., 2024**). Il a été démontré que les triazoles, tels que le difénoconazole, remplacent la thyroxine (T4) du TTR, ce qui indique une interférence potentielle avec le transport et la fonction des hormones thyroïdiennes. Cette perturbation peut entraîner une modification de l'équilibre hormonal, affectant divers processus physiologiques (**Carlier et al., 2024**).

Les fongicides à base de triazoles affectent la concentration des spermatozoïdes et exercent une toxicité reproductive par divers mécanismes. Ils inhibent la biosynthèse des stéroïdes, perturbant ainsi l'équilibre hormonal et conduisant à des effets antiandrogéniques et antiœstrogéniques. Cela se traduit par une diminution de la concentration et de la motilité des spermatozoïdes, une augmentation des cellules germinales anormales et une altération de la fonction de reproduction chez les rats mâles, soulignant leur toxicité significative pour la reproduction (**Shepelskaya & Kolianchuk, 2021**). De plus, ces fongicides, surtout en cas de stress oxydatif, induisent la cytotoxicité, un arrêt du cycle cellulaire G0/G1 et l'apoptose dans les cellules de Sertoli, affectant ainsi la concentration des spermatozoïdes (**Petricca et al., 2022**). En inhibant les enzymes CYP, ils perturbent également la biosynthèse et la signalisation des hormones stéroïdes, ce qui peut entraîner une réduction de la concentration de spermatozoïdes et des déséquilibres hormonaux (**Mokhbatly et al., 2019; Draskau & Svingen, 2022; Zheng et al., 2023**). De manière similaire, ces fongicides altèrent les taux hormonaux en réduisant l'expression des ARNm de HSD3B et STAR, augmentant l'expression de l'AHR et de la CAR, ce qui induit un stress oxydatif et une morphologie anormale des spermatozoïdes, perturbant ainsi les fonctions de reproduction chez les poulets (**Serra et al., 2023**). En revanche, l'époxiconazole a montré une réduction de la concentration des spermatides sans effets toxiques sur la fertilité ou la reproduction (**Grote et al., 2008**). Enfin, le tébuconazole provoque un stress oxydatif qui endommage les cellules germinales et perturbe le développement des cellules de

Leydig, affectant ainsi la concentration des spermatozoïdes et l'équilibre hormonal, illustrant ses effets toxiques sur la santé reproductive (Lee *et al.*, 2024). Une étude spécifique menée par El-Sharkawy & El-Nisr (2013) a également démontré que le penconazole entraîne un dysfonctionnement testiculaire, réduisant les taux de testostérone et la concentration de spermatozoïdes en raison de modifications nécrotiques des tubules séminifères, d'apoptose des cellules spermatogènes, ainsi que de la déplétion des cellules de Sertoli et de Leydig.

La pré-supplémentation avec l'EBu d'*E. guttatum* a provoqué une élévation significative ($p < 0.05$) de la concentration de testostérone, une élévation hautement significative ($p < 0.01$) de FT4, une augmentation significative ($p < 0.05$) du nombre de spermatozoïdes, et une diminution significative ($p < 0.05$) de la TSH. Cependant, l'EHe a provoqué une élévation des paramètres (testostérone, FT4, nombre de spermatozoïdes) et une diminution de la TSH, bien que de manière non significative.

Les effets bénéfiques des extraits de la plante *E. guttatum*, en particulier EBU, pourraient être attribués à la présence de composés phytochimiques tels que la lutéoline, l'acide protocatéchuique, la quercétine, l'héspéridine et l'acide gallique. L'étude présentée par Owumi *et al.* (2020) a révélé un effet protecteur de la lutéoline contre la toxicité reproductive induite par des agents chimiothérapeutiques tels que la doxorubicine, qui partagent des mécanismes de toxicité analogues à ceux de divers pesticides (stress oxydatif, inflammation, apoptose). L'administration conjointe de lutéoline renforce la capacité antioxydante, diminue les marqueurs du stress oxydatif, de l'inflammation et de l'apoptose, et rétablit la fonction testiculaire et la qualité du sperme. L'acide protocatéchuique a été minutieusement examiné pour ses propriétés protectrices sur le système reproducteur suite à l'exposition à divers agents toxiques environnementaux, tels que les pesticides et les contaminants comme le furan, le bisphénol A (BPA) et la dioxine (TCDD). L'acide protocatéchuique atténue la réduction de la production et de la qualité des spermatozoïdes, rétablit les niveaux hormonaux (testostérone, LH, FSH), améliore l'activité des enzymes antioxydantes et diminue l'inflammation ainsi que l'apoptose dans les tissus reproducteurs. Il préserve également contre les lésions histologiques et les modifications de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique, principalement via le biais de mécanismes antioxydants, anti-inflammatoires et anti-apoptotiques (Beytur *et al.*, 2012; Adedara *et al.*, 2018; Owumi, Adedara, *et al.*, 2020; Song *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2023). L'administration de quercétine a optimisé les paramètres spermatiques, augmenté les niveaux sériques de testostérone et d'hormone lutéinisante, et régulé à la hausse l'expression des gènes stéroïdogènes et antioxydants. Il a réduit les lésions testiculaires et le stress oxydatif induits par

le fénitrothion, indiquant le potentiel de la quercétine pour protéger la santé reproductive contre la toxicité des pesticides (**Saber *et al.*, 2016**). La quercétine a significativement amélioré les dommages du système reproducteur chez les rats Wistar mâles exposés à la cyperméthrine et à la deltaméthrine, améliorant la morphologie des organes, les niveaux hormonaux et les paramètres des spermatozoïdes en régulant à la hausse les enzymes stéroïdogènes et en renforçant l'activité antioxydante, protégeant ainsi la fertilité (**Sharma *et al.*, 2018**). Une autre étude a démontré que la quercétine peut restaurer l'équilibre hormonal et atténuer les lésions reproductives induites par les phtalates, comme en témoignent la restauration du métabolisme des hormones stéroïdes et l'amélioration des paramètres testiculaires (**Xia *et al.*, 2024**). Une étude supplémentaire révèle que la quercétine favorise la biosynthèse de la testostérone et corrige les altérations des niveaux sériques d'hormones sexuelles, de la morphologie testiculaire et de la qualité du sperme induites par l'exposition aux phtalates (**Liu *et al.*, 2024**). L'acide gallique exerce des effets protecteurs en optimisant la qualité du sperme, en atténuant le stress oxydatif et en renforçant l'activité des enzymes testiculaires. Il diminue également les marqueurs d'inflammation et d'apoptose, ce qui peut être avantageux pour la santé reproductive (**Rotimi *et al.*, 2024**). L'hespéridine présente des propriétés antioxydantes qui réduisent le stress oxydatif induit par des substances toxiques, préservant ainsi la spermatogenèse et la santé testiculaire. Le traitement par hespéridine a significativement rétabli les niveaux d'hormones reproductrices, amélioré les paramètres spermatiques et atténué les marqueurs de stress oxydatif (**Yan *et al.*, 2024**). La recherche de **Güngör *et al.* (2024)** a révélé que l'hespéridine préserve contre les lésions causées par le glyphosate chez les rats mâles en augmentant la motilité des spermatozoïdes, en élevant les niveaux d'antioxydants et en atténuant les dommages histopathologiques, favorisant ainsi la fertilité et la morphologie des organes dans le système reproducteur masculin affecté par les pesticides. L'étude de (**Al-Bayati & Al-Zubaidi, 2024**) a démontré que l'hespéridine a restauré efficacement les niveaux d'hormones reproductrices (LH, FSH, testostérone) et amélioré la quantité et la morphologie des spermatozoïdes.

Tableau 24. Effet du fongicide PCZ et des extraits d'*E. guttatum* sur les paramètres hormonaux et la concentration des spermatozoïdes chez les rats de tous les groupes expérimentaux après 8 semaines de traitement

Groupes	<i>Paramètres hormonaux</i>					Concentration des spermatozoïdes ($\times 10^6$) /ml (Épididyme)
	Testostérone (ng/ml)	LH mUI/mL	FSH mUI/mL	TSH3 (μ UI/ml)	FT4 (Pg/ml)	
Contrôle	5.21 \pm 0.93	0.10 \pm 0.00	0.108 \pm 0.005	0.0010 \pm 0.000	28.30 \pm 0.87	73.3 \pm 8.1
PCZ	1.20 \pm 0.06 ^{###}	0.24 \pm 0.14	0.116 \pm 0.01	0.0050 \pm 0.000 ^{###}	15.79 \pm 0.34 ^{###}	29.9 \pm 6.5 [#]
EHe	4.32 \pm 0.41 ^{**}	0.10 \pm 0.00	0.112 \pm 0.004	0.0010 \pm 0.000 ^{***}	24.86 \pm 1.34 ^{**}	74.7 \pm 9.3 [*]
EBu	5.43 \pm 0.61 ^{***}	0.10 \pm 0.00	0.106 \pm 0.008	0.0010 \pm 0.000 ^{***}	25.24 \pm 1.51 ^{**}	79.1 \pm 11.6 [*]
EHe+PCZ	1.73 \pm 0.09 ^{###}	0.13 \pm 0.03	0.106 \pm 0.006	0.0030 \pm 0.000	20.05 \pm 2.05 ^{##}	67.1 \pm 12.1
EBu+PCZ	3.51 \pm 0.29 [*]	0.14 \pm 0.03	0.108 \pm 0.008	0.0026 \pm 0.000 [*]	25.59 \pm 1.92 ^{**}	74.25 \pm 9.7 [*]

Les valeurs représentent la moyenne \pm SE de sept animaux/groupe. En utilisant l'analyse de variance à sens unique (ANOVA) suivi par Tukey.

ns : Différence non significative $p > 0.05$

* Différence significative ($p < 0.05$), ** Différence hautement significative ($p < 0.01$) ; *** Différence très hautement significative ($p < 0.001$) les groupes traités (EHe, EBu, EHe+PCZ, EBu+PCZ) par rapport au groupe PCZ.

#Différence significative ($p < 0.05$), ## Différence hautement significative ($p < 0.01$), ### Différence très hautement significative ($p < 0.001$) les groupes traités (PCZ, EHe, EBu, EHe+PCZ, EBu+PCZ) par rapport au groupe contrôle

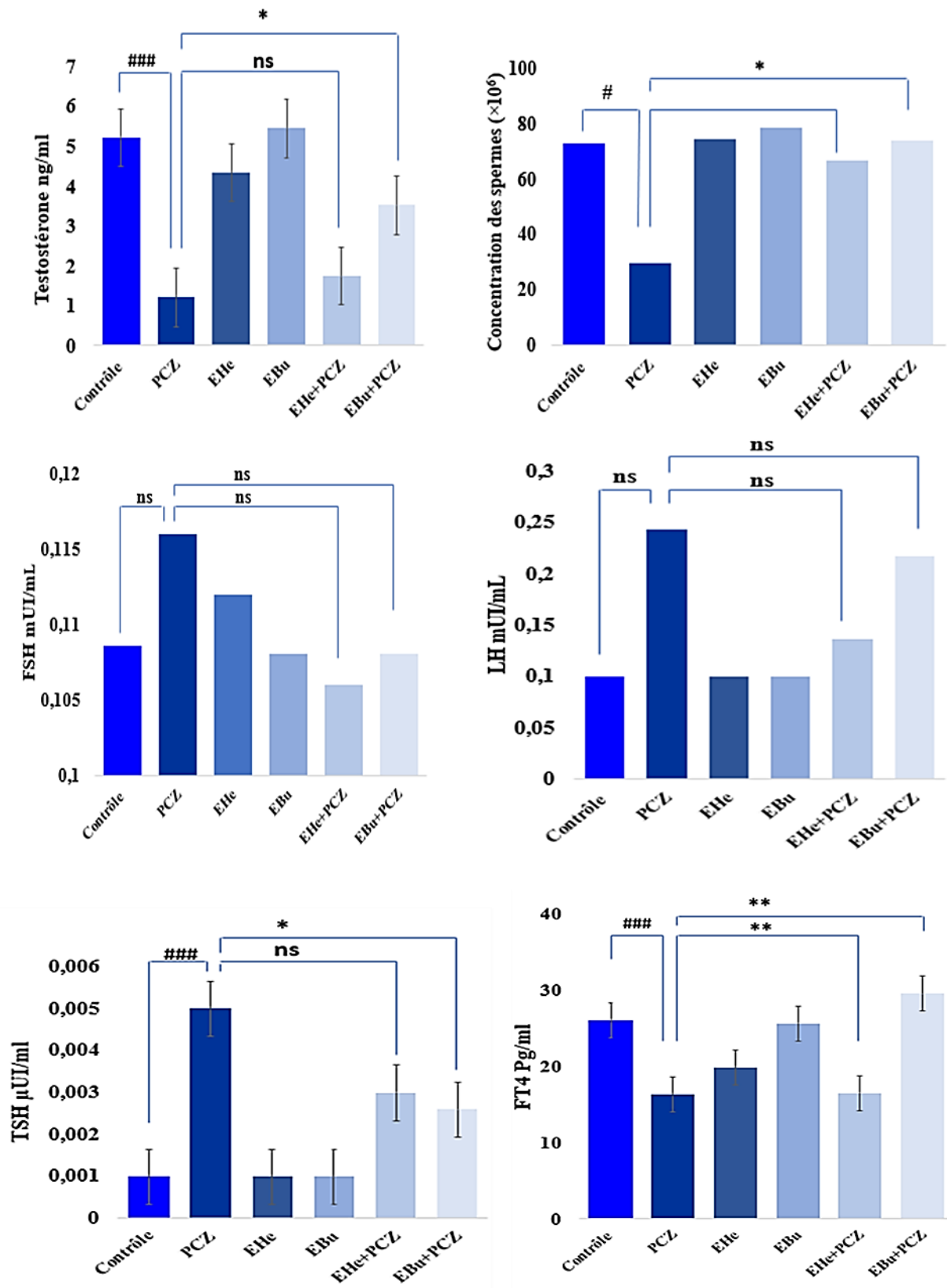


Figure 30. Effet du PCZ et des extraits d'*Erodium guttatum* sur les dosages hormonaux et la concentration des spermatozoïdes chez les rats après huit semaines de traitement.

3.3.7.3. Etude anatomo-histopathologique du tissu testiculaire

La **Figure 31** illustre les changements histopathologiques observés dans les tissus testiculaires des groupes expérimentaux. L'examen microscopique a montré que les testicules du groupe contrôle et du groupe EBU présentaient une structure histologique normale des tubes séminifères et du tissu interstitiel (**Figure 31 A et C**, respectivement). En revanche, les tissus testiculaires des rats exposés au PCZ montraient une destruction sévère du tissu interstitiel, une déformation et une atrophie fréquentes des tubes séminifères avec des spermatocytes et des spermatides nécrotiques, une réduction significative du nombre de cellules à différents stades de la spermatogenèse, ainsi qu'une desquamation fréquente des cellules germinales de la membrane basale vers la lumière des tubules, entraînant une perte sévère des cellules spermatogènes dans la lumière tubulaire et l'absence de spermatozoïdes (**Figure 31 B**). L'examen histopathologique des testicules de rats exposés à des fongicides à base de triazole a révélé des changements dégénératifs, notamment la nécrose des tubules séminifères, la raréfaction des cellules germinales et des altérations morphologiques des cellules de Sertoli et de Leydig (**El-Sharkawy & El-Nisr, 2013; Mokhbatly et al., 2019**).

Cependant, les tissus testiculaires des rats ayant reçu à la fois de l'EBU et du PCZ montraient une atténuation significative des lésions microscopiques. Ces tissus présentaient une destruction légère avec congestion et vacuoles du tissu interstitiel, une déformation et une atrophie rares des tubes séminifères avec des spermatocytes et des spermatides nécrotiques, une légère diminution du nombre de cellules à différents stades de la spermatogenèse, ainsi qu'une desquamation rare des cellules germinales de la membrane basale vers la lumière des tubules, avec une perte légère des cellules spermatogènes dans la lumière tubulaire et l'absence de spermatozoïdes (**Figure 31D**). Cette amélioration est due aux composés polyphénoliques qui ont montré des effets prometteurs dans la réduction des dommages testiculaires causés par la toxicité des pesticides. Ces composés, connus pour leurs propriétés antioxydantes, peuvent contrecarrer le stress oxydatif et restaurer la fonction testiculaire. Plusieurs études ont montré l'efficacité de différents composés phénoliques dans l'inversion des lésions testiculaires causées par des agents toxiques, soulignant leur rôle thérapeutique potentiel (**Sharma et al., 2018; Rotimi et al., 2024; Güngör et al., 2024; Saber et al., 2016**).

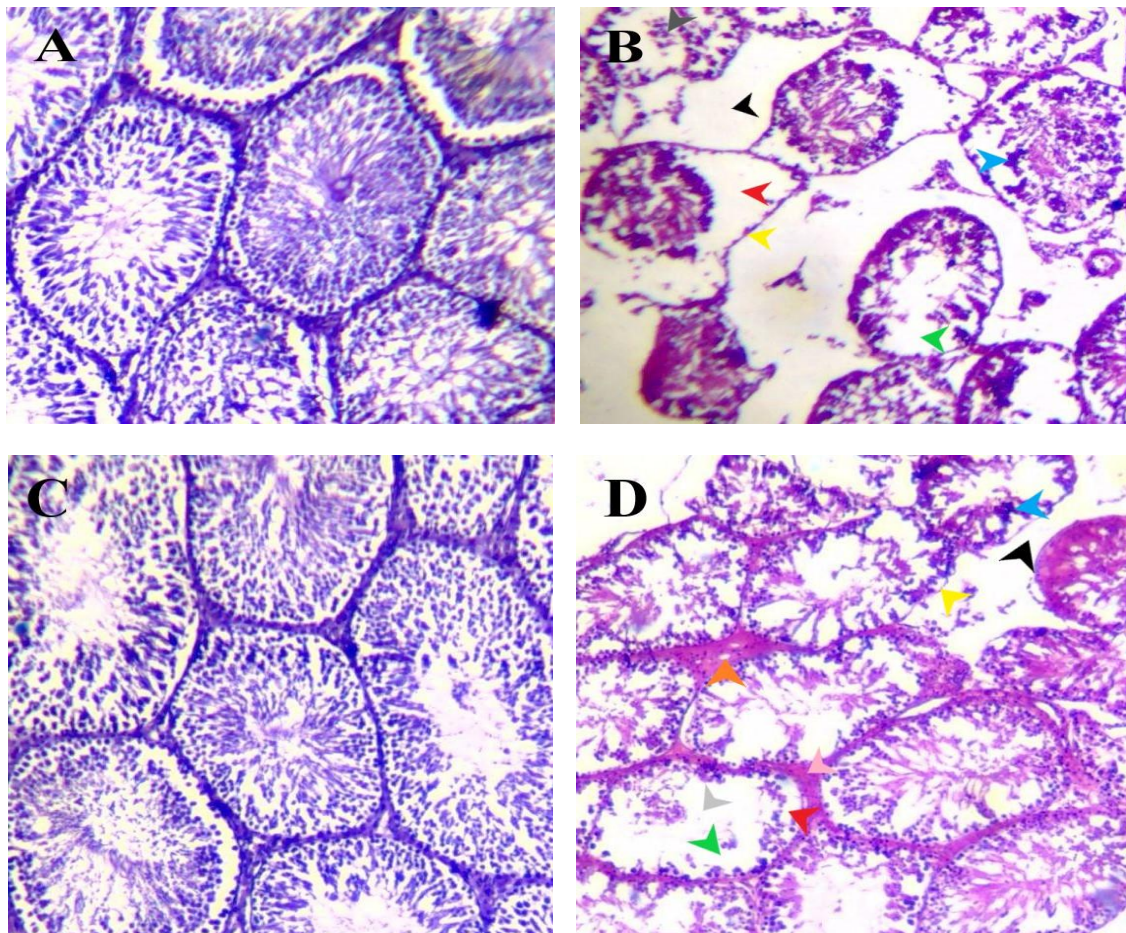


Figure 31. Photomicrographies de tissu testiculaire, colorées avec H&E, 40×

A, groupe témoin normal montrant des tubules séminifères et du tissu interstitiel, B, groupe de PCZ montrant une destruction sévère du tissu interstitiel (tête de flèche noire), des tubes séminifères déformés et atrophiés (tête de flèche jaune), des spermatocytes et spermatides nécrotiques (tête de flèche bleue), une diminution sévère des différentes cellules de la spermatogenèse (tête de flèche verte), desquamation des cellules germinales de la membrane basale (tête de flèche rouge), couches de cellules spermatogènes sans spermatozoïdes (tête de flèche grise), C, groupe EBU montrant une structure histologique normale, et D, groupe expérimental EBU+ PCZ montrant une destruction légère du tissu interstitiel (tête de flèche noire) avec une congestion (tête de flèche rose) et une vacuole (tête de flèche orange), des tubes séminifères déformés et atrophiés (tête de flèche jaune), des spermatocytes et des spermatides nécrotiques (tête de flèche bleue), desquamation des cellules germinales de la membrane basale (tête de flèche rouge), une perte légère de la série spermatogène (tête de flèche verte) et des couches de cellules spermatogènes sans spermatozoïdes (tête de flèche grise), (coloration H&E, 40×).

4. Étude de docking moléculaire sur le récepteur X de la prégnane (PXR)

Le récepteur X de prégnane (PXR) est un récepteur nucléaire essentiel dans la régulation des gènes de détoxification, en particulier dans le foie. Il active des enzymes comme les cytochromes P450 (CYP450) et des transporteurs membranaires pour métaboliser et éliminer les xénobiotiques (substances étrangères) (Attema *et al.*, 2024). Le propiconazole, un fongicide de la classe des triazoles, peut activer le PXR en se liant à lui, induisant ainsi l'expression de ces enzymes hépatiques. Cette activation peut modifier le métabolisme de d'autres substances, avec des implications potentielles pour la toxicité hépatique et les interactions médicamenteuses (Xie *et al.*, 2001).

C'est pourquoi nous avons mené une étude d'amarrage moléculaire pour explorer l'effet protecteur des composés identifiés dans notre plante sur le PXR. En modélisant l'interaction entre ces composés, le PCZ et le PXR, nous cherchons à comprendre comment les molécules de la plante pourraient moduler l'activation du PXR et potentiellement contrecarrer les effets néfastes du PCZ. La validation de l'ancrage moléculaire a été réalisée avec succès, comme en témoigne une valeur RMSD (Root Mean Square Deviation) inférieure à 1 Å, confirmant la précision et la fiabilité de notre modèle, comme l'illustre la **Figure 32**.

Des études d'ancrage ont été réalisées pour expliquer l'effet protecteur de la plante médicinale sur l'enzyme PXR contre le PCZ. Des simulations d'ancrage ont été réalisées en utilisant les molécules identifiées dérivées des plantes et le PCZ sur le PXR. Les résultats ont révélé que les molécules végétales présentent une grande affinité de liaison dans le site actif du PXR, deux composés (Isoquercitrine et Quercétine 3-xyloside), en particulier, enregistrant de meilleurs scores d'ancrage que le PCZ. Cela suggère une interaction compétitive entre ces molécules végétales et le propiconazole dans le site actif, réduisant effectivement la liaison du PCZ à la protéine PXR.

Nous avons ensuite analysé les modes d'interaction de ces deux composés (Isoquercitrine et Quercétine 3-xyloside) et du PCZ avec les résidus du site actif du PXR, comme le montrent les **Figures 33, 34 et 35**. Ces résultats soutiennent l'hypothèse selon laquelle les composés végétaux entrent en compétition avec le PCZ pour le site actif du PXR, atténuant ainsi potentiellement ses effets perturbateurs.

L'isoquercitrine a démontré la plus grande stabilité (-11,543 kcal/mol) par rapport aux autres molécules, ainsi que par rapport au PCZ (-7,774 kcal/mol) et au ligand co-cristallisé, comme le montre le **Tableau 25**. Ce composé a formé quatre liaisons hydrogène avec les résidus du site actif du PXR (**Figure 34**), en particulier entre ses groupes hydroxyles et les résidus HIS407, SER247, LEU239 et LEU209. De même, le Quercétine 3-xyloside a affiché

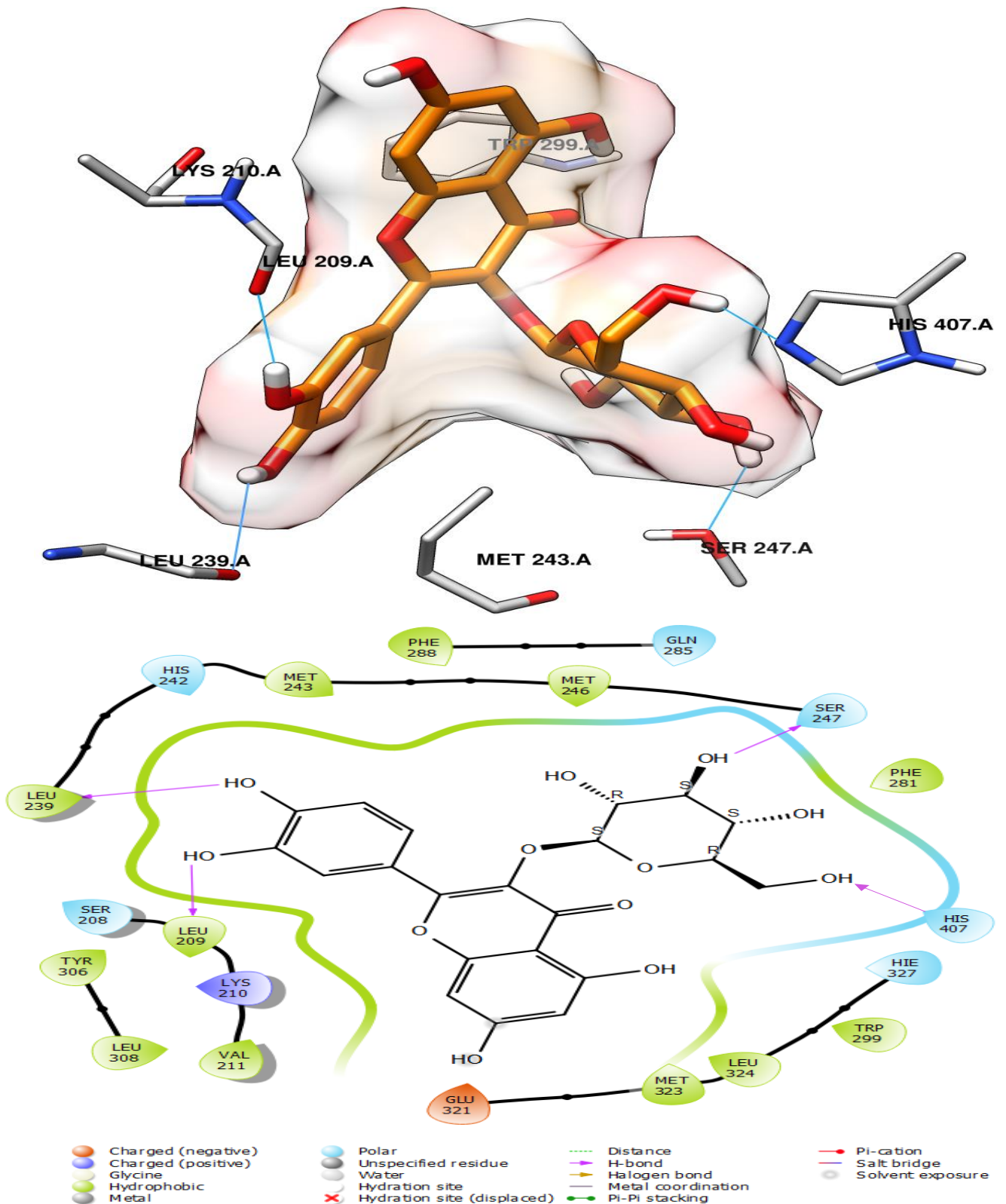


Figure 34. 3D et 2D de la position d'ancrage de l'isoquercitrine dans le récepteur PXR (PDB : 5A86)

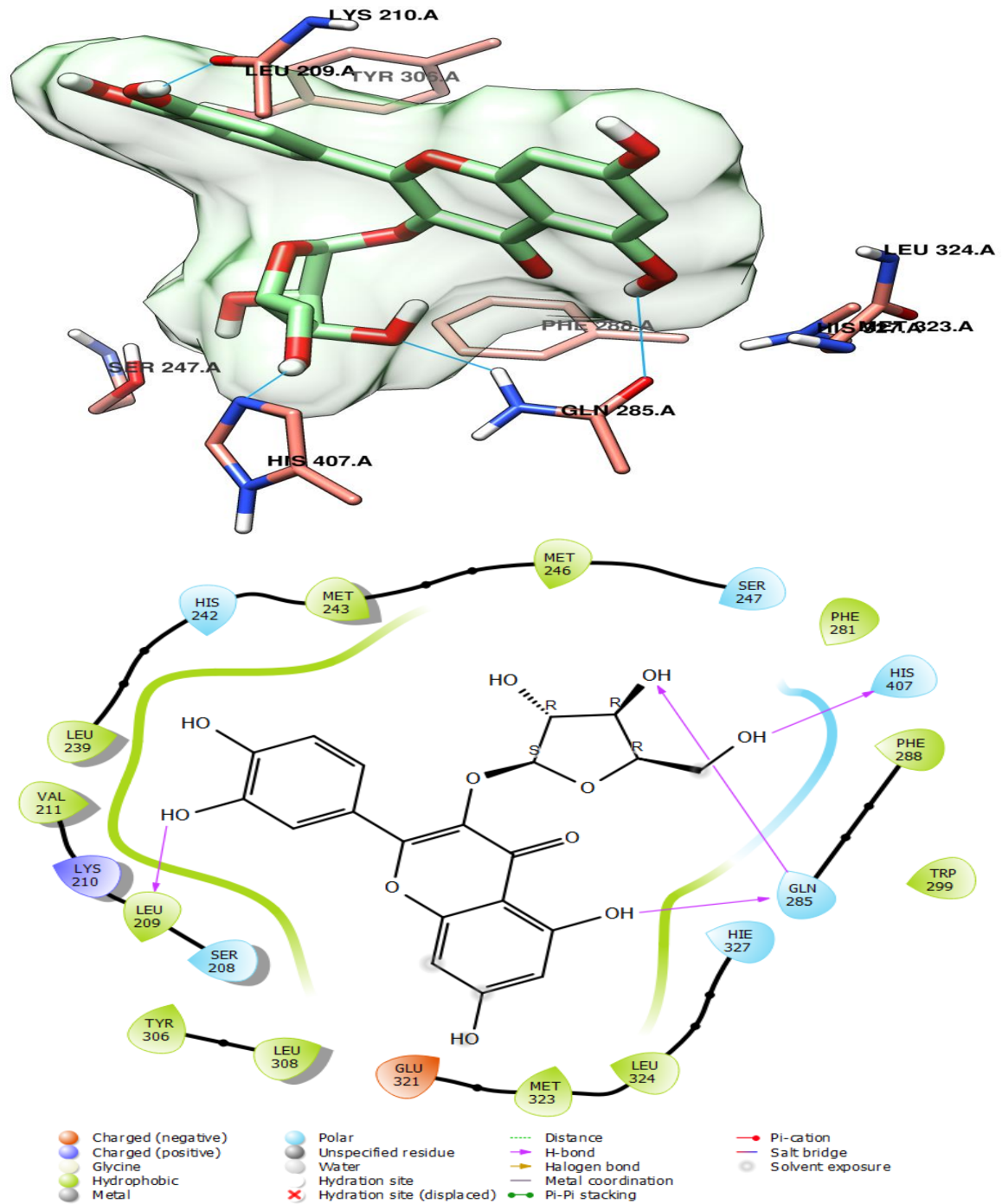


Figure 35. 3D et 2D de l'ancrage quercétine 3-xyloside dans le récepteur PXR (PDB : 5A86)

Tableau 25. Score d'amarrage du propiconazole, des molécules identifiées dans les extraits d'*E. guttatum* et du ligand co-cristallisé après l'étude d'amarrage.

Composés	Docking Score (kcal/mol)
	PXR
Isoquercitrin	-11.543
Quercétine 3-xyloside	-11.256
Hespéridine	-7.771
Lutéoline	-7.603
Acide shikimique	-7.523
Acide gallique	-6.771
Propiconazole	-7.884
Co-cristallisé	-8.100

Conclusion et perspectives

L'objectif principal de cette étude était double. D'une part, elle visait à réaliser une étude phytochimique approfondie de la plante *E. guttatum*, afin d'identifier et de quantifier ses composés bioactifs. Parallèlement, une évaluation des activités biologiques de cette plante a été réalisée afin de mieux comprendre ses propriétés thérapeutiques potentielles. D'autre part, cette étude s'est attachée à examiner l'effet protecteur de l'*E. guttatum* contre la toxicité induite par le propiconazole, en analysant son influence sur les modifications physiopathologiques engendrées par ce fongicide toxique. Ces investigations permettent ainsi de mieux cerner le potentiel de l'*E. guttatum* en tant qu'agent naturel aux propriétés préventives et thérapeutiques.

L'analyse phytochimique des extraits d'*E. guttatum* révélait

- ✓ Une quantité significative de composés phénoliques et flavonoïdes.
- ✓ La présence de plusieurs composés bioactifs, notamment l'acide shikimique, l'acide gallique, l'isoquercitrine, l'hespéridine, la quercétine 3 xyloside et la lutéoline quantifiés par LC/MS-MS. Ces composés sont connus pour leurs propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et cryoprotectrice, ce qui pourrait expliquer leur capacité à atténuer les effets néfastes du fongicide étudié.

L'évaluation des propriétés biologiques a mis en évidence une activité significative des extraits, notamment :

- ✓ Une forte capacité antioxydante mesurée par (DPPH, ABTS, FRAP, SNP et Phénanthroline), indiquant une neutralisation efficace des radicaux libres.
- ✓ Une activité modérée contre α -amylase et remarquable contre BChE.
- ✓ Une excellente activité photoprotectrice.
- ✓ Une activité antimicrobienne remarquable.
- ✓ Une inhibition de l'inflammation confirmée par une étude in vivo et une étude histologique.
- ✓ Une activité analgésique remarquable.

Les résultats de l'expérimentation in vivo concernant l'activité détoxifiante ont confirmé que l'administration des extraits d'*Erodium guttatum* atténue les altérations physiopathologiques induites par le PCZ au niveau de la fonction hépatique, rénale, hématologique et reproductive.

Plus précisément :

- ✓ Sur la fonction hématologique : une amélioration des paramètres hématologiques, notamment des globules blancs, et une atténuation des altérations histopathologiques au niveau de la rate.
- ✓ Sur le foie : les extraits ont significativement réduit l'élévation du volume et des enzymes hépatiques (ALT, AST, PAL), témoignant d'une préservation de l'intégrité hépatique. L'analyse histologique a révélé une diminution des lésions tissulaires et de l'infiltration inflammatoire.
- ✓ Sur les reins : une amélioration des paramètres biochimiques rénaux (urée, créatinine et acide urique), préservation du volume rénal et une réduction des altérations histopathologiques ont été observées, indiquant un effet protecteur contre la néphrotoxicité.
- ✓ Sur le profil lipidique : les extraits ont significativement réduit l'élévation des paramètres lipidiques (Cho T, TG, LDL).
- ✓ Sur la fonction reproductive : l'administration des extraits a induit une augmentation du volume testiculaire, accompagnée d'une amélioration des paramètres spermatiques (concentration des spermatozoïdes) et hormonaux (testostérone, FSH, LH, TSH, T4), ce qui suggère un effet protecteur contre la toxicité reproductive induite par le PCZ.

L'étude de docking moléculaire a permis de confirmer le potentiel protecteur de l'*E. guttatum* contre la toxicité induite par le PCZ. En effet, les composés phytochimiques identifiés, surtout l'isoquercitrine et la quercétine 3 xyloside dans cette plante, ont montré une affinité significative pour la cible moléculaire impliquée dans la toxicité de ce fongicide. Plus précisément, ces molécules bioactives sont capables d'interagir avec le récepteur nucléaire hépatique PXR, empêchant ainsi la liaison du PCZ à sa structure clé. Ces résultats suggèrent que l'*E. guttatum* pourrait agir en tant qu'inhibiteur compétitif, réduisant ainsi les effets délétères du PCZ sur l'organisme.

Ces conclusions renforcent l'intérêt d'explorer davantage cette plante comme agent protecteur naturel contre les perturbations physiopathologiques induites par les pesticides sur l'organisme.

En perspective

Approfondissement de l'étude phytochimique :

- ✓ L'isolement des molécules les plus prometteuses permettrait de mieux comprendre leur rôle dans les activités biologiques observées.
- ✓ Études de synergie : l'analyse des interactions entre les divers constituants bioactifs permet d'évaluer si leurs effets protecteurs sont additifs ou synergiques.

Validation et exploration des mécanismes d'action

- ✓ L'approfondissement des voies de signalisation impliquées dans la protection contre la toxicité des pesticides à travers des études transcriptomiques et protéomiques apporterait des preuves mécanistiques solides.
- ✓ Compléter l'étude de docking par des simulations de dynamique moléculaire permettrait d'affiner la compréhension des interactions entre les composés phytochimiques et les cibles biologiques.

Etudes précliniques et cliniques

- ✓ Expérimentations contre d'autres modèles animaux : afin de valider les résultats obtenus, il serait pertinent d'examiner l'effet protecteur sur divers modèles d'intoxication chronique aux pesticides et de comparer les effets en fonction des doses et des durées d'exposition.

Essais cliniques : une évaluation humaine portant sur l'innocuité et l'efficacité des extraits d'*E. guttatum* permet de confirmer son potentiel en tant qu'agent protecteur contre la légèreté des pesticides.

Extension aux impacts environnementaux et agricoles

- ✓ Atténuation de l'impact des pesticides : analyser si l'*E. guttatum* peut servir de complément alimentaire ou d'additif pour diminuer la dose des pesticides chez les travailleurs agricoles exposés.

Références bibliographiques

- Abarikwu, S. O. (2014).** Protective Effect of Quercetin on Atrazine-Induced Oxidative Stress in the Liver, Kidney, Brain, and Heart of Adult Wistar Rats. *Toxicology International*. 21(2): 148-155. <https://doi.org/10.4103/0971-6580.139794>
- Abdelhadya, D. H., El-Magd, M. A., Elbially, Z. I., & Saleh, A. A. (2017).** Bromuconazole-induced hepatotoxicity is accompanied by upregulation of *PXR / CYP3A1* and downregulation of *CAR / CYP2B1* gene expression. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 27(7): 544-550. <https://doi.org/10.1080/15376516.2017.1333555>
- Abd-Elhakim, Y. M., El Sharkawy, N. I., El Bohy, K. M., Hassan, M. A., Gharib, H. S. A., El-Metwally, A. E., Arisha, A. H., & Imam, T. S. (2021).** Iprodione and/or chlorpyrifos exposure induced testicular toxicity in adult rats by suppression of steroidogenic genes and SIRT1/TERT/PGC-1 α pathway. *Environmental Science and Pollution Research*. 28(40): 56491-56506. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14339-x>
- Abdelkrim, C., Belboukhari, N., Karima, S., & Hacini, S. (2006).** Plants of Algerian semi-arid regions used for the treatment of gastro-intestinal disorders. *Algerian Journal of Arid region*. 5(1): 07.
- Abdel-Razik, R., Mosallam, E., & Hamed, N. (2022).** Protective effect of acetylcysteine against thiamethoxam-induced hepatic and renal toxicity in rats. *Egyptian Journal of Chemistry*. 65(9): 1-6. <https://doi.org/10.21608/ejchem.2022.114622.5209>
- Adedara, I. A., Omole, O., Okpara, E. S., Fasina, O. B., Ayeni, M. F., Ajayi, O. M., Busari, E. O., & Farombi, E. O. (2018).** Impact of prepubertal exposure to dietary protocatechuic acid on the hypothalamic-pituitary-testicular axis in rats. *Chemico-Biological Interactions*: 290: 99-109. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.05.013>
- Ahmad, M. F., Ahmad, F. A., Alsayegh, A. A., Zeyaulah, Md., AlShahrani, A. M., Muzammil, K., Saati, A. A., Wahab, S., Elbendary, E. Y., Kambal, N., Abdelrahman, M. H., & Hussain, S. (2024).** Pesticides impacts on human health and the environment with their mechanisms of action and possible countermeasures. *Heliyon*. 10(7): e29128. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e29128>
- Aiche, M. A., Mallem, L., Yahia, E., & Boulakoud, M. S. (2015).** Toxicity of subchronic doses of propiconazole, propineb and their mixture on reproductive parameters in male rats. *Advances in Environmental Biology*. 9(3): 885-891. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20153270140>
- Akeem, A., Ekunseitan, D., Muhammad, S., Oguntoye, M., & Yusuf, A. (2020).** Phytochemicals Analysis and GC-MS Determination of Ethanolic Extracts of

- Azadirachta indica and Mangifera indica Stem Bark and their Biological Potentials. *The Pac J Sci Technol.* 21(1): 219-22.
- Al-Bayati, H. S. S.-Al., & Al-Zubaidi, B. A. (2024).** Protective Role of Hesperidin Nanoparticles and Hesperidin against Methotrexate-Induced Reproductive System Toxicity in Male Albino Rats. *Utta Pradesh journal of zoology.*45(12), 132-155. <https://doi.org/10.56557/upjz/2024/v45i124112>
- Alara, O. R., Abdurahman, N. H., & Ukaegbu, C. I. (2021).** Extraction of phenolic compounds: A review. *Current Research in Food Science.* 4: 200-214. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.03.011>
- Albarakati, A. J. A., Baty, R. S., Aljoudi, A. M., Habotta, O. A., Elmahallawy, E. K., Kassab, R. B., & Abdel Moneim, A. E. (2020).** Luteolin protects against lead acetate-induced nephrotoxicity through antioxidant, anti-inflammatory, anti-apoptotic, and Nrf2/HO-1 signaling pathways. *Molecular Biology Reports.* 47(4): 2591-2603. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05346-1>
- Albrecht, W. (2019).** Highlight report: Hepatotoxicity of triazole fungicides. *Archives of Toxicology.* 93(10): 3037-3038. <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02555-x>
- Alejolowo, O. O., Elias, A. O., Eseagwu, O. S., Nwonuma, C. O., & Osemwegie, O. O. (2024).** Gallic acid modulates oxido-inflammatory response in acrylamide-induced hepato-renal toxicity. *Scientific African.* 23: e02024. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2023.e02024>
- Alekhyia Sita, G. J., Gowthami, M., Srikanth, G., Krishna, M. M., Rama Sireesha, K., Sajjarao, M., Nagarjuna, K., Nagarjuna, M., Chinnaboina, G. K., Mishra, A., & SreeHarsha, N. (2019).** Protective role of luteolin against bisphenol A-induced renal toxicity through suppressing oxidative stress, inflammation, and upregulating Nrf2/ARE/ HO-1 pathway. *IUBMB Life.* 71(7): 1041-1047. <https://doi.org/10.1002/iub.2066>
- Al-Hadid, K. J., Al-Karablieh, N., Sharab, A., & Mutlak, I. (2019).** Phytochemical analyses and antibacterial activities of *Erodium*, *Euphorbia*, *Logoecia* and *Tamarix species*. *The Journal of Infection in Developing Countries.* 13(11): 1013-1020. <https://doi.org/10.3855/jidc.11776>
- Ali, T., Javan, M., Sonboli, A., & Semnianian, S. (2012).** Evaluation of the antinociceptive and anti-inflammatory effects of essential oil of *Nepeta pogonosperma* Jamzad et Assadi in rats. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences,* 20(1), 48. <https://doi.org/10.1186/2008-2231-20-48>
- Allain, C. C., Poon, L. S., Chan, C. S., Richmond, W., & Fu, P. C. (1974).** Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clinical chemistry.* 20(4): 470-475.

- Allen, J. W., Wolf, D. C., George, M. H., Hester, S. D., Sun, G., Thai, S.-F., Delker, D. A., Moore, T., Jones, C., Nelson, G., Roop, B. C., Leavitt, S., Winkfield, E., Ward, W. O., & Nesnow, S. (2006).** Toxicity Profiles in Mice Treated with Hepatotumorigenic and Non-Hepatotumorigenic Triazole Conazole Fungicides: Propiconazole, Triadimefon, and Myclobutanil. *Toxicologic Pathology*. 34(7): 853-862. <https://doi.org/10.1080/01926230601047816>
- Al-Sayed, E., Martiskainen, O., Seif el-Din, S. H., Sabra, A.-N. A., Hammam, O. A., & El-Lakkany, N. M. (2015).** Protective effect of *Pelargonium graveolens* against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice and characterization of its bioactive constituents by HPLC–PDA–ESI–MS/MS analysis. *Medicinal Chemistry Research*. 24(4): 1438-1448. <https://doi.org/10.1007/s00044-014-1218-3>
- Apaydın, F. G., Kalender, S., Baş, H., & Kalender, Y. (2023).** Protective role of gallic acid against fenitrothion-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity via oxidative stress, histopathological and biochemical alteration. Research Square. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2699186/v1>
- Asci, H., Ozmen, O., Ellidag, H. Y., Aydin, B., Bas, E., & Yilmaz, N. (2017).** The impact of gallic acid on the methotrexate-induced kidney damage in rats. *journal of food and drug analysis*. 25(4): 890-897. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2017.05.001>
- Ashkar, F., Bhullar, K. S., & Wu, J. (2022).** The effect of polyphenols on kidney disease : Targeting mitochondria. *Nutrients*. 14(15): 3115. <https://doi.org/10.3390/nu14153115>
- Attema, B., Kumm, O., Krutáková, M., Pavek, P., Hakkola, J., Hooiveld, G. J. E. J., & Kersten, S. (2024).** The fungicide propiconazole induces hepatic steatosis and activates PXR in a mouse model of diet-induced obesity. *Archives of Toxicology*. 99(3): 1203-1221. <https://doi.org/10.1007/s00204-024-03942-9>
- Badmus, O. O., Hillhouse, S. A., Anderson, C. D., Hinds Jr, T. D., & Stec, D. E. (2022).** Molecular mechanisms of metabolic associated fatty liver disease (MAFLD): Functional analysis of lipid metabolism pathways. *Clinical science*. 136(18): 1347-1366. <https://doi.org/10.1042/CS20220572>
- Bakari, S., Hajlaoui, H., Daoud, A., Mighri, H., Ross-Garcia, J. M., Gharsallah, N., & Kadri, A. (2018).** Phytochemicals, antioxidant and antimicrobial potentials and LC-MS analysis of hydroalcoholic extracts of leaves and flowers of *Erodium glaucophyllum* collected from Tunisian Sahara. *Food Science and Technology*. 38(2): 310-317. <https://doi.org/10.1590/fst.04517>
- Bao, X., Zheng, Z., Lv, J., Bao, J., Chang, S., Jiang, X., & Xin, Y. (2023).** Shikimic acid (SA) inhibits neuro-inflammation and exerts neuroprotective effects in an LPS-induced in vitro and in vivo model. *Frontiers in Pharmacology*. 14: 1265571 <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1265571>

- Barba, F. J., Alcántara, C., Abdelkebir, R., Bäuerl, C., Pérez-Martínez, G., Lorenzo, J. M., Carmen Collado, M., & García-Pérez, J. V. (2020).** Ultrasonically-assisted and conventional extraction from *Erodium glaucophyllum* roots using ethanol : Water mixtures: phenolic characterization, antioxidant, and anti-inflammatory activities. *Molecules*. 25(7): 1759. <https://doi.org/10.3390/molecules25071759>
- Basli, A., & Bounaas, J. (2023).** Pathophysiological mechanism and natural preventive and therapeutic strategies of Alzheimer's disease. *Nutrition and Health*. 29(3): 403-413. <https://doi.org/10.1177/02601060221137104>
- Ben Othmène, Y., Hamdi, H., Annabi, E., Amara, I., Ben Salem, I., Neffati, F., Najjar, M. F., & Abid-Essefi, S. (2020).** Tebuconazole induced cardiotoxicity in male adult rat. *Food and Chemical Toxicology*. 137: 111134. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111134>
- Benrahou, K., Mrabti, H. N., Assaggaf, H. M., Mortada, S., Salhi, N., Rouas, L., El Bacha, R., Dami, A., Masrar, A., & Alshahrani, M. M. (2022c).** Acute and subacute toxicity studies of *Erodium guttatum* extracts by oral administration in rodents. *Toxins*. 14(11): 735. <https://doi.org/10.3390/toxins14110735>
- Benrahou, K., Mrabti, H. N., Fettach, S., Kachmar, M. R., Kouach, M., Goossens, J.-F., Doudach, L., Mahmud, S., Alshahrani, M. M., Al Awadh, A. A., Bouyahya, A., & Faouzi, M. E. A. (2022a).** Mineral and Phenolic Composition of *Erodium guttatum* Extracts and Investigation of Their Antioxidant Properties in Diabetic Mice. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2022: 1-11. <https://doi.org/10.1155/2022/4229981>
- Benrahou, K., Naceiri Mrabti, H., Bouyahya, A., Daoudi, N. E., Bnouham, M., Mezzour, H., Mahmud, S., Alshahrani, M. M., Obaidullah, A. J., & Cherrah, Y. (2022b).** Inhibition of α -Amylase, α -Glucosidase, and Lipase, Intestinal Glucose Absorption, and Antidiabetic Properties by Extracts of *Erodium guttatum*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2022(1): 5868682. <https://doi.org/10.1155/2022/5868682>
- Berber, D., Toksöz, O., Türkmenoğlu, İ., & Sesal, C. (2022).** A review on antimicrobial activities of some culinary herbs and spices against *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Life Sciences and Related Technologies*. 3(2): 75-85. <https://doi.org/10.51753/flsrt.1083093>
- Beytur, A., Ciftci, O., Aydin, M., Cakir, O., Timurkaan, N., & Yılmaz, F. (2012).** Protocatechuic acid prevents reproductive damage caused by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in male rats : PCA prevents reproductive toxicity caused by TCDD. *Andrologia*. 44: 454-461. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2011.01204.x>
- Bilić, V. L., Gašić, U., Milojković-Opsenica, D., Nemet, I., Rončević, S., Kosalec, I., & Rodriguez, J. V. (2020).** First Extensive Polyphenolic Profile of *Erodium cicutarium* with Novel Insights to Elemental Composition and Antioxidant Activity. *Chemistry & Biodiversity*. 17(9): e2000280. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202000280>

- Blois, M. S. (1958).** Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 181(4617): 1199-1200. <https://doi.org/10.1038/1811199a0>
- Blystone, C. R. (2006).** Conazole Pesticide Disruption of Testicular Steroidogenesis during Different Stages of Male Development. Thèse de doctorat en toxicologie. Thèse de doctorat en toxicologie. North Carolina State University. 122 pages <https://repository.lib.ncsu.edu/bitstream/1840.16/4431/1/etd.pdf>
- Bouhedda, A., Laouer, H., Souilah, N., Çakır, C., Bouriah, N., Abu-Elsaoud, A. M., Selamoglu, Z., Ben Hamadi, N., Alomran, M. M., Özdemir, S., Öztürk, M., Boufahja, F., & Bendif, H. (2024).** Does *Erodium trifolium* (Cav.) Guitt exhibit medicinal properties? Response elements from phytochemical profiling, enzyme-inhibiting, and antioxidant and antimicrobial activities. *Open Chemistry*. 22(1): 20240049. <https://doi.org/10.1515/chem-2024-0049>
- Bowers Jr, G. N., & McComb, R. B. (1975).** Measurement of total alkaline phosphatase activity in human serum. *Clinical chemistry*. 21(13): 1988-1995.
- Bruno, M., Moore, T., Nesnow, S., & Ge, Y. (2009).** Protein Carbonyl Formation in Response to Propiconazole-Induced Oxidative Stress. *Journal of Proteome Research*. 8(4): 2070-2078. <https://doi.org/10.1021/pr801061r>
- Burda, S., & Oleszek, W. (2001).** Antioxidant and Antiradical Activities of Flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49(6): 2774-2779. <https://doi.org/10.1021/jf001413m>
- Butkevičiūtė, A., Liaudanskas, M., Kviklys, D., Gelvonauskienė, D., & Janulis, V. (2020).** The qualitative and quantitative compositions of phenolic compounds in fruits of *Lithuanian heirloom* apple cultivars. *Molecules*, 25(22), 5263. <https://doi.org/10.3390/molecules25225263>
- Carrier, M. P., Cenijn, P. H., Baygildiev, T., Irwan, J., Escher, S. E., van Duursen, M. B., & Hamers, T. (2024).** Profiling the endocrine-disrupting properties of triazines, triazoles, and short-chain PFAS. *Toxicological Sciences*. 202(2): 250-264. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfae131>
- Cavinato, M., Waltenberger, B., Baraldo, G., Grade, C. V. C., Stuppner, H., & Jansen-Dürr, P. (2017).** Plant extracts and natural compounds used against UVB-induced photoaging. *Biogerontology*. 18(4): 499-516. <https://doi.org/10.1007/s10522-017-9715-7>
- Çelikler Özer, Ö., Baki Kekilli, E., ERDOĞAN ORHAN, İ., & KAHRAMAN, A. (2020).** *Erodium* L'HER.(dönbaba/iğnelik). *Türk Farmakope Dergisi*. 5(1): 58-80. https://www.researchgate.net/publication/343720170_ERODIUM_L'HER_DONBABAIGNELIK

- Çetin, A., Çiftçi, O., & Otlu, A. (2016).** Protective effect of hesperidin on oxidative and histological liver damage following carbon tetrachloride administration in Wistar rats. *Archives of Medical Science: AMS*. 12(3): 486-493. <https://doi.org/10.5114/aoms.2015.49484>
- Chen, J., Reilly, R. M., Kym, P. R., & Joshi, S. (2011).** In Vitro and in Vivo Assays for the Discovery of Analgesic Drugs Targeting TRP Channels. In M. X. Zhu (Éd.), *TRP Channels*. CRC Press/Taylor & Francis. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92815/>
- Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X., & Zhao, L. (2017).** Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*. 9(6): 7204-7218. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23208>
- Chen, P.-J., Moore, T., & Nesnow, S. (2008).** Cytotoxic effects of propiconazole and its metabolites in mouse and human hepatoma cells and primary mouse hepatocytes. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*. 22(6): 1476-1483. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2008.05.001>
- Choi, Y.-M., Kim, M.-H., Shin, J.-J., Park, J.-M., & Lee, J.-S. (2003).** The antioxidant activities of the some commercial teas. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 32(5): 723-727.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). 2018.** Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. M7–A9. 9th ed Wayne, PA.
- Costa, N. O., Vieira, M. L., Sgarioni, V., Pereira, M. R. F., Montagnini, B. G., Mesquita, S. de F. P., & Gerardin, D. C. C. (2015).** Evaluation of the reproductive toxicity of fungicide propiconazole in male rats. *Toxicology*. 335: 55-61. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2015.06.011>
- Costa, T. E. M. M., Raghavendra, N. M., & Penido, C. (2020).** Natural heat shock protein 90 inhibitors in cancer and inflammation. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 189: 112063. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112063>
- Cüce, M., Colak, N., Zeljković, S. Ć., Tarkowski, P., Strnad, M., Gruz, J., İmamoğlu, K. V., & Ayaz, F. A. (2022).** An evaluation of volatiles and phenolic compounds in conjunction with the antioxidant capacity of endemic endangered species of *Erodium hendrikii* Alpinar. *South African Journal of Botany*. 149: 458-467. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.06.010>
- Delanghe, J. R., & Speeckaert, M. M. (2011).** Creatinine determination according to Jaffe—What does it stand for? *Nephrology Dialysis Transplantation Plus*, 4(2), 83-86. <https://doi.org/10.1093/ndtplus/sfq211>
- de Souza, A. B. F., de Matos, N. A., Castro, T. de F., Costa, G. de P., Talvani, A., Nagato, A. C., de Menezes, R. C. A., & Bezerra, F. S. (2024).** Preventive effects of hesperidin

- in an experimental model of acute lung inflammation. *Respiratory Physiology & Neurobiology*. 323: 104240. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2024.104240>
- Dewhurst, I., & Dellarco, V. (2006).** Propiconazole. *Pesticide residues in food–2004 evaluations*, 281-323.
- Dhingra, A. K., & Chopra, B. (2020).** Inflammation as a Therapeutic Target for Various Deadly Disorders: A Review. *Current Drug Targets*. 21(6): 582-588. <https://doi.org/10.2174/1389450120666191204154115>
- Didunyemi, O., & Olasehinde, O. (2024).** Hepatoprotective and Antioxidant Activities of Polyphenolic Extract of *Pyrus communis* Leaf in Carbon tetrachloride–Treated Albino Wistar Rats: Hepatoprotective effect of polyphenolic leaf extract of *Pyrus communis*. *Journal of Tropical Life Science*. 14(2): 369-376. <http://dx.doi.org/10.11594/jtls.14.02.16>
- Do, Q. D., Angkawijaya, A. E., Tran-Nguyen, P. L., Huynh, L. H., Soetaredjo, F. E., Ismadji, S., & Ju, Y.-H. (2014).** Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis*. 22(3): 296-302. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2013.11.001>
- Doumas, B. T., Ard Watson, W., & Biggs, H. G. (1971).** Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clinica Chimica Acta*. 31(1): 87-96. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(71\)90365-2](https://doi.org/10.1016/0009-8981(71)90365-2)
- Draskau, M. K., & Svingen, T. (2022).** Azole fungicides and their endocrine disrupting properties: Perspectives on sex hormone-dependent reproductive development. *Frontiers in Toxicology*. 4: 883254. <https://doi.org/10.3389/ftox.2022.883254>
- Duh, P.-D., Du, P.-C., & Yen, G.-C. (1999).** Action of methanolic extract of mung bean hulls as inhibitors of lipid peroxidation and non-lipid oxidative damage. *Food and chemical Toxicology*, 37(11), 1055-1061. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(99\)00096-4](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(99)00096-4)
- Ekpo, G. I., Eteng, O. E., Ekam, V. S., Onyemaizu, M. U., Ofonime, N., Blessing, O. E., Uduak, O. L., Robert, A. E., Ufot, S., & Eyong, U. (2024).** Hesperidin and quercetin modulate carbon tetrachloride (CCl₄) induced hepatotoxicity in male rats. *Asian Journal of Natural Product Biochemistry*. 22(1): <https://smujo.id/jnpb/article/view/16744>
- Elalfy, M., Elazab, S., Hamed, M., & Elhadidy, M. (2021).** Ameliorative Effect of Vanillin against Propiconazole Induced Hepatorenal and Testicular Injury in Male Albino Rats. *Journal of Animal and Veterinary Sciences*. 6(2455-2518): 12-17. <https://doi.org/10.20431/2455-2518.0602002>
- Elhelaly, A. E., AlBasher, G., Alfarraj, S., Almeer, R., Bahbah, E. I., Fouda, M. M. A., Bungău, S. G., Aleya, L., & Abdel-Daim, M. M. (2019).** Protective effects of hesperidin and diosmin against acrylamide-induced liver, kidney, and brain oxidative

- damage in rats. *Environmental Science and Pollution Research*. 26(34): 35151-35162. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06660-3>
- El-Kott, A. F., & Kandeel, A. A. (2015).** Histopathological observations and biochemical changes of rats with diniconazole's hepatotoxicity. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 6(2): 589-596. [http://rjpbcs.com/pdf/2015_6\(2\)/\[89\].pdf](http://rjpbcs.com/pdf/2015_6(2)/[89].pdf)
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Featherstone, R. M. (1961).** A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*. 7(2): 88-95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- El-Sharkawy, E. E., & El-Nisr, N. A. (2013).** Testicular dysfunction induced by penconazole fungicide on male albino rats. *Comparative Clinical Pathology*. 22(3): 475-480. <https://doi.org/10.1007/s00580-012-1435-4>
- Erenler, R., Atalar, M. N., Yildiz, İ., Geçer, E. N., Yildirim, A., DemiRtas, İ., & Alma, M. H. (2023).** Quantitative analysis of bioactive compounds by LC-MS/MS from *Inula graveolens*. *Bütünleyici ve Anadolu Tıbbi Dergisi*. 4(3): 3-10. <https://doi.org/10.53445/batd.1278048>
- European Food Safety Authority (EFSA), Arena, M., Auteri, D., Barmaz, S., Bellisai, G., Brancato, A., Brocca, D., Bura, L., Byers, H., Chiusolo, A., Court Marques, D., Crivellente, F., De Lentdecker, C., De Maglie, M., Egsmose, M., Erdos, Z., Fait, G., Ferreira, L., Goumenou, M., ... Villamar-Bouza, L. (2017).** Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance propiconazole. *EFSA Journal*. 15(7): e04887. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4887>
- Fantone, J. C., & Ward, P. A. (1982).** Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *The American Journal of Pathology*. 107(3): 395.
- Fecka, I., & Cisowski, W. (2002).** TLC determination of tannins and flavonoids in extracts from some *Erodium* species using chemically modified stationary phases. *JPC-Journal of Planar Chromatography-Modern TLC*. 15(6): 429-432. <https://doi.org/10.1556/jpc.15.2002.6.7>
- Fecka, I., Kowalczyk, A., & Cisowski, W. (2001).** Phenolic Acids and Depsides from Some Species of the *Erodium* Genera. *Zeitschrift Für Naturforschung C*. 56(11-12): 943-950. <https://doi.org/10.1515/znc-2001-11-1205>
- Fernandes, T. A., Antunes, A. M. M., Caldeira, I., Anjos, O., de Freitas, V., Fargeton, L., Boissier, B., Catarino, S., & Canas, S. (2022).** Identification of gallotannins and ellagitannins in aged wine spirits: A new perspective using alternative ageing technology and high-resolution mass spectrometry. *Food Chemistry*. 382: 132322. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132322>

- Ferrer, I., Zweigenbaum, J. A., & Thurman, E. M. (2017).** Chapter 10—Identification of Pesticide Transformation Products in Food Applying High-Resolution Mass Spectrometry. In R. Romero-González & A. G. Frenich (Éds.), *Applications in High Resolution Mass Spectrometry*: 315-335. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809464-8.00010-5>
- Feunaing, R. T., Tamfu, A. N., Gbaweng, A. J. Y., Kucukaydin, S., Tchamgoue, J., Lannang, A. M., Lenta, B. N., Kouam, S. F., Duru, M. E., Anouar, E. H., Talla, E., & Dinica, R. M. (2024).** In Vitro and Molecular Docking Evaluation of the Anticholinesterase and Antidiabetic Effects of Compounds from *Terminalia macroptera* Guill. & Perr. (Combretaceae). *Molecules*. 29(11): 2456. <https://doi.org/10.3390/molecules29112456>
- Fiz, O., Vargas, P., Alarcón, M., Aedo, C., García, J. L., & Aldasoro, J. J. (2008).** Phylogeny and Historical Biogeography of Geraniaceae in Relation to Climate Changes and Pollination Ecology. *Systematic Botany*. 33(2): 326-342. <https://doi.org/10.1600/036364408784571482>
- Fiz, O., Vargas, P., Alarcón, M. L., & Aldasoro, J. J. (2006).** Phylogenetic Relationships and Evolution in *Erodium* (Geraniaceae) based on trnL-trnF Sequences. *Systematic Botany*. 31(4): 739-763. <https://doi.org/10.1600/036364406779695906>
- Fiz-Palacios, O., Vargas, P., Vila, R., Papadopulos, A. S. T., & Aldasoro, J. J. (2010).** The uneven phylogeny and biogeography of *Erodium* (Geraniaceae): Radiations in the Mediterranean and recent recurrent intercontinental colonization. *Annals of Botany*. 106(6): 871-884. <https://doi.org/10.1093/aob/mcq184>
- Flodström, S., Hemming, H., Wärngard, L., & G. Ahlberg, U. (1990).** Promotion of altered hepatic foci development in rat liver, cytochrome P450 enzyme induction and inhibition of cell-cell communication by DDT and some structurally related organohalogen pesticides. *Carcinogenesis*. 11(8): 1413-1417. <https://doi.org/10.1093/carcin/11.8.1413>
- Fonseca, W. F., Ahluwalia, P., Bhatt, D. N., Ansari, S., Tabassum, R., Vaibhav, K., & Ahluwalia, M. (2022).** Chapter 17 - Black seed (*Nigella sativa*): Pharmacological and therapeutic applications in endocrine dysfunction. In A. Khan & M. Rehman (Éds.), *Black Seeds (Nigella Sativa)* (p. 405-422). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824462-3.00017-2>
- Friesner, R. A., Banks, J. L., Murphy, R. B., Halgren, T. A., Klicic, J. J., Mainz, D. T., Repasky, M. P., Knoll, E. H., Shelley, M., Perry, J. K., Shaw, D. E., Francis, P., & Shenkin, P. S. (2004).** Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. *Journal of Medicinal Chemistry*. 47(7): 1739-1749. <https://doi.org/10.1021/jm0306430>
- Friesner, R. A., Murphy, R. B., Repasky, M. P., Frye, L. L., Greenwood, J. R., Halgren, T. A., Sanschagrin, P. C., & Mainz, D. T. (2006).** Extra Precision Glide: Docking and

- Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein–Ligand Complexes. *Journal of Medicinal Chemistry*. 49(21): 6177-6196. <https://doi.org/10.1021/jm051256o>
- Gad, S. C., & Pham, T. (2014).** Propiconazole. Ed. Wexler. In *Encyclopedia of Toxicology*: 1101-1104. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.01203-3>
- Gadhoumi, H., Martinez-Rojas, E., Tounsi, M., & Hayouni, E. A. (2021).** Phenolics Composition and Biological Activities Assessment of Leaves, Flowers and Roots Extracts from *Erodium glaucophyllum*, *Erodium hirtum* and *Erodium guttatum*. In *Biology Bulletin*. 48(6): 667-672. <https://doi.org/10.1134/S1062359021060091>
- Gadhoumi, H., Yeddes, W., Sarra, D., Majdi, H., Bourgou, S., Tounsi, M., & Hayouni, E. A. (2024).** Phytochemical Composition, Cytotoxic Effects, and AntiInflammatory Capacity of Ethanol Extracts from *Erodium* Species: *E. Glaucophyllum*, *E. Hirtum* and *E. Guttatum*. *Clinical Case Reports International*. 8: 1688 <https://doi.org/10.25107/2638-4558.1688>
- Gandhi, G. R., Vasconcelos, A. B. S., Antony, P. J., Montalvão, M. M., de Franca, M. N. F., Hillary, V. E., Ceasar, S. A., & Liu, D. (2023).** Natural sources, biosynthesis, biological functions, and molecular mechanisms of shikimic acid and its derivatives. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 13(4): 139. <https://doi.org/10.4103/2221-1691.374230>
- Garrison, A. W., Avants, J. K., & Miller, R. D. (2011).** Loss of propiconazole and its four stereoisomers from the water phase of two soil-water slurries as measured by capillary electrophoresis. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 8(8): 3453-3467. <https://doi.org/10.3389/fnut.2024.1342881>
- Gawish, A., & Elhalwagy, M. E. (2009).** Which can attenuate hepatotoxicity induced by pesticides mixture natural or synthetic phenolic antioxidant. *Nature and Science*. 7(5): 29-44.
- Gayosso-De-Lucio, J., Bautista, M., Velazquez-González, C., De la O Arciniega, M., Morales-González, J. A., & Benedí, J. (2014).** Chemical composition and hepatotoxic effect of *Geranium schiedeanum* in a thioacetamide-induced liver injury model. *Pharmacognosy Magazine*. 10(Suppl 3): S574-S580. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.139788>
- Geisler, C. E., & Renquist, B. J. (2017).** Hepatic lipid accumulation: Cause and consequence of dysregulated glucoregulatory hormones. *J Endocrinol*. 234(1): R1-R21. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0513>
- Ghadir, M. R., Riahin, A. A., Havaspour, A., Nooranipour, M., & Habibinejad, A. A. (2010).** The relationship between lipid profile and severity of liver damage in cirrhotic patients. *Hepatitis monthly*, 10(4), 285.

- Ghannoum, M. A., & Rice, L. B. (1999).** Antifungal Agents : Mode of Action, Mechanisms of Resistance, and Correlation of These Mechanisms with Bacterial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. 12(4): 501-517. <https://doi.org/10.1128/cmr.12.4.501>
- Ghaffar, N., & Perveen, A. (2024).** Solvent polarity effects on extraction yield, phenolic content, and antioxidant properties of Malvaceae family seeds : A comparative study. *New Zealand Journal of Botany*. 1-11. <https://doi.org/10.1080/0028825X.2024.2392705>
- Ghazanfari, A., Soodi, M., & Omidi, A. (2021).** Quercetin ameliorates acetamiprid-induced hepatotoxicity and oxidative stress. *Physiology and Pharmacology*. 25(2): 154-161. <http://dx.doi.org/10.32598/ppj.25.2.70>
- Ghazi, S. (2022).** Do the polyphenolic compounds from natural products can protect the skin from ultraviolet rays? *Results in Chemistry*. 4: 100428. <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2022.100428>
- Ghorbannia-Dellavar, S., Farimani, M. M., Pahlevani, A. H., Khoramjouy, M., Mosaddegh, M., & Faizi, M. (2023).** Antinociceptive activity of Iranian *Euphorbia* species in mice : Preliminary phytochemical analysis of *Euphorbia malleata*. *South African Journal of Botany*. 159: 532-543. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2023.05.012>
- Ghosh, A., Sarmah, P., Patel, H., Mukerjee, N., Mishra, R., Alkahtani, S., Varma, R. S., & Baishya, D. (2022).** Nonlinear molecular dynamics of quercetin in *Gynocardia odorata* and *Diospyros malabarica* fruits: Its mechanistic role in hepatoprotection. *PLoS One*. 17(3): e0263917. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0263917>
- Glick, D. (Éd.). (1969).** *Methods of Biochemical Analysis* (1^{re} éd., Vol. 17). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470110355>
- Goetz, A. K., Rockett, J. C., Ren, H., Thillainadarajah, I., & Dix, D. J. (2009).** Inhibition of Rat and Human Steroidogenesis by Triazole Antifungals. *Systems Biology in Reproductive Medicine*. 55(5-6): 214-226. <https://doi.org/10.3109/19396360903234045>
- Gohar, A. A., Lahloub, M. F., & Niwa, M. (2003).** Antibacterial Polyphenol from *Erodium glaucophyllum*. *Zeitschrift Für Naturforschung C*. 58(9-10): 670-674. <https://doi.org/10.1515/znc-2003-9-1013>
- González Vázquez, A. E., Hockemeyer, K. R., McConville, M., Remucal, C. K., & Koch, P. L. (2022).** Assessment of Temperature and Time Following Application as Predictors of Propiconazole Translocation in *Agrostis stolonifera*. *ACS Agricultural Science & Technology*. 2(3): 592-602. <https://doi.org/10.1021/acsagscitech.2c00022>
- Gopinath, K., Radhakrishnan, N. V., & Jayaraman, J. (2006).** Effect of propiconazole and difenoconazole on the control of anthracnose of chilli fruits caused by *Colletotrichum*

- capsici. *Crop Protection - CROP PROT.* 25(9): 1024-1031.
<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2006.02.001>
- Gordon, M. H. (1990).** The Mechanism of Antioxidant Action in Vitro. In B. J. F. Hudson (Éd.), *Food Antioxidants* (p. 1-18). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-009-0753-9_1
- Goudarzi, M., Kalantar, M., & Kalantar, H. (2017).** The Hepatoprotective Effect of Gallic Acid on Mercuric Chloride-Induced Liver Damage in Rats. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products.* 12(4): e12345. <https://doi.org/10.5812/jjnpp.12345>
- Gowda, S., Desai, P. B., Kulkarni, S. S., Hull, V. V., Math, A. A. K., & Vernekar, S. N. (2010).** Markers of renal function tests. *North American Journal of Medical Sciences.* 2(4): 170-173.
- Graça, V. C., Ferreira, I. C., & Santos, P. F. (2016).** Phytochemical composition and biological activities of *Geranium robertianum* L.: A review. *Industrial Crops and Products.* 87: 363-378. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.04.058>
- Grote, K., Niemann, L., Selzsam, B., Haider, W., Gericke, C., Herzler, M., & Chahoud, I. (2008).** Epoxiconazole causes changes in testicular histology and sperm production in the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Environmental Toxicology and Chemistry.* 27(11): 2368-2374. <https://doi.org/10.1897/08-048.1>
- Guittoneau, G. G. (1972).** Etude biosystematique du genre *Erodium* L'Her. *Boissiera.* 20: 1-154.
- Guittoneau, G.-G. (2010).** Aperçu sur la taxonomie, l'écologie et la phylogénie du genre *Erodium* L'Hér. Dans le bassin méditerranéen. *Tela Botanica.* 1-46.
- Güngör, Ş., Kırıkkulak, M., Denk, B., Gülhan, M. F., Güleş, Ö., Budak, D., İnanç, M. E., Avdatek, F., Yeni, D., & Taşdemir, U. (2024).** Potential Protective Effect of Hesperidin (Vitamin P) against Glyphosate-Induced Spermatogenesis Damage in Male Rats: Biochemical and Histopathological Findings on Reproductive Parameters. *Life.* 14(9): 1190. <https://doi.org/10.3390/life14091190>
- Gupta, P. K. (2018).** Toxicity of Fungicides. In *Veterinary Toxicology (Third Edition)*. (Cambridge, USA: Academic Press), 569–580. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811410-0.00045-3>
- Hagan, A., Olive, J., Stephenson, J., & Rivas-Davila, M. (2005).** Comparison of Fungicides for the Control of Powdery Mildew on Dogwood. *Journal of Environmental Horticulture.* 23(4): 179-184. <https://doi.org/10.24266/0738-2898-23.4.179>
- Hamdi, H., Khelifi, A., Hallara, E., Houas, Z., Najjar, M. F., & Abid-Essefi, S. (2022).** Subchronic exposure to Epoxiconazole induced-heart damage in male Wistar rats. *Pesticide Biochemistry and Physiology.* 182: 105034. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2022.105034>

- Hamdi, H., Othmène, Y. B., Ammar, O., Klifi, A., Hallara, E., Ghali, F. B., Houas, Z., Najjar, M. F., & Abid-Essefi, S. (2019a).** Oxidative stress, genotoxicity, biochemical and histopathological modifications induced by epoxiconazole in liver and kidney of Wistar rats. *Environmental Science and Pollution Research*. 26(17): 17535-17547. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05022-3>
- Hamed, S. M., Al-Nuaemi, I. J., Korany, S. M., Alsherif, E. A., Mohamed, H. S., & AbdElgawad, H. (2022).** Hazard assessment and environmental fate of propiconazole degradation by microalgae: Differential tolerance, antioxidant and detoxification pathway. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 10(4): 108170. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.108170>
- Hamm, T. E., King-Herbert, A., & Vasbinder, M. A. (2006).** Chapter 27—Toxicology. In M. A. Suckow, S. H. Weisbroth, & C. L. Franklin (Éds.), *The Laboratory Rat (Second Edition)*: 803-816. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012074903-4/50030-3>
- Hamza, G., Emna, B.-H., Yeddes, W., Dhouafli, Z., Moufida, T. S., & El Akrem, H. (2018).** Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities data of three plants from Tunisia region: *Erodium glaucophyllum*, *Erodium hirtum* and *Erodium guttatum*. *Data in brief*. 19: 2352-2355. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2018.07.005>
- Harboub, N., Mighri, H., Bennour, N., Pereira, C., Fernandes, E., Castañeda-Loaiza, V., Custódio, L., Abdellaoui, R., & Akrouf, A. (2024).** Phenolic profile, cytotoxicity and *in vitro* antioxidant and enzyme inhibitory properties of the edible halophyte *Sarcocornia fruticosa* from southeastern Tunisia. *Food Bioscience*. 62: 105126. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.105126>
- Hasaninezhad, F., Tavaf, Z., Panahi, F., Nourisefat, M., Khalafi-Nezhad, A., & Yousefi, R. (2020).** The assessment of antidiabetic properties of novel synthetic curcumin analogues : α -amylase and α -glucosidase as the target enzymes. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders*. 19(2): 1505. <https://doi.org/10.1007/s40200-020-00685-z>
- Hata, S., Namae, M., & Nishina, H. (2007).** Liver development and regeneration: From laboratory study to clinical therapy. *Development, Growth & Differentiation*. 49(2): 163-170. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2007.00910.x>
- He, Z., Li, Y., Zhou, L., Li, R., Zhang, Y., Wang, Z., & Wang, M. (2024).** *In Silico*, *In Vitro*, and *In Vivo* Studies Indicate the Endocrine-Disrupting Effects of Cyproconazole Stereoisomers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 72(44): 24228-24236. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.4c04927>
- Hemalatha, D., Muthukumar, A., Rangasamy, B., Nataraj, B., & Ramesh, M. (2016).** Impact of sublethal concentration of a fungicide propiconazole on certain health biomarkers of Indian major carp *Labeo rohita*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 8: 321-327. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.10.009>

- Hu, Q., Zhang, W., Wei, F., Huang, M., Shu, M., Song, D., Wen, J., Wang, J., Nian, Q., Ma, X., Zeng, J., & Zhao, Y. (2024).** Human diet-derived polyphenolic compounds and hepatic diseases : From therapeutic mechanisms to clinical utilization. *Phytotherapy Research*. 38(1): 280-304. <https://doi.org/10.1002/ptr.8043>
- Huang Qinglong, Yang Xiaoyuan, Zhuang Guosheng, & Huang Min. 2010.** Preparation method of Erodium stephanianum Willd extract liquid and application as medicine for inhibiting TNF (Tumor Necrosis Factor) alpha (China Brevet CN101904881A). <https://patents.google.com/patent/CN101904881A/en>
- INCHEM, M. (1987).** 768. *Propiconazole Part II Toxicology, Pesticide residues in food*, 19.
- Islam, M. S., Quispe, C., Hossain, R., Islam, M. T., Al-Harrasi, A., Al-Rawahi, A., Martorell, M., Mamurova, A., Seilkhan, A., Altybaeva, N., Abdullayeva, B., Docea, A. O., Calina, D., & Sharifi-Rad, J. (2021).** Neuropharmacological Effects of Quercetin : A Literature-Based Review. *Frontiers in Pharmacology*, 12: 665031. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.665031>
- Jabłońska – Trypuć, A., & Wiater, J. (2022).** Protective effect of plant compounds in pesticides toxicity. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*. 20(2): 1035-1045. <https://doi.org/10.1007/s40201-022-00823-0>
- Jain, T., Singh, M. P., & Gohil, K. J. (2024).** Natural Flavonoids : Fortifying Renal Defence Mechanism. *Current Drug Safety*. 20(1): 1-18. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804299-1.00004-7>
- Jampilek, J., & Král'ová, K. (2017).** 3 - Nanopesticides : Preparation, targeting, and controlled release. In A. M. Grumezescu (Éd.). *New Pesticides and Soil Sensors*. Academic Press: 81-127. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804299-1.00004-7>
- Jeong, J. Y., Kim, B., Ji, S. Y., Baek, Y. C., Kim, M., Park, S. H., Kim, K. H., Oh, S.-I., Kim, E., & Jung, H. (2021).** Effect of pesticide residue in muscle and fat tissue of pigs treated with propiconazole. *Food Science of Animal Resources*. 41(6): 1022. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2021.e53>
- Jha, A. K., & Sit, N. (2022).** Extraction of bioactive compounds from plant materials using combination of various novel methods: A review. *Trends in Food Science & Technology*. 119: 579-591. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.11.019>
- Juzeniene, A., Brekke, P., Dahlback, A., Andersson-Engels, S., Reichrath, J., Moan, K., Holick, M. F., Grant, W. B., & Moan, J. (2011).** Solar radiation and human health. *Reports on Progress in Physics*. 74(6): 066701. <https://doi.org/10.1088/0034-4885/74/6/066701>

- Kadic, A., Oles, P., Fischer, B. C., Reetz, A. E., Sylla, B. S., Feiertag, K., Ritz, V., Heise, T., Marx-Stoelting, P., Tralau, T., Renko, K., & Solano, M. D. L. M. (2024).** In vitro and in vivo investigation of a thyroid hormone system-specific interaction with triazoles. *Scientific Reports*. 14(1): 6503. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-55019-3>
- Karimi-Khouzani, O., Heidarian, E., & Amini, S. A. (2017).** Anti-inflammatory and ameliorative effects of gallic acid on fluoxetine-induced oxidative stress and liver damage in rats. *Pharmacological Reports*. 69(4): 830-835. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2017.03.011>
- Katari, R., McNamara, K., Gentile, C., Edgar, L., Callese, T., Igel, D., Zambon, J. P., Tamburrini, R., & Orlando, G. (2017).** Tissue Engineering and Regenerative Medicine Solutions for the Abdominal Organs. In *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*: 325-347. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63660-7.00013-9>
- Khalaf, A. A. A., Elhady, M. A., Hassanen, E. I., Azouz, A. A., Ibrahim, M. A., Galal, M. K., Noshay, P. A., & Azouz, R. A. (2021).** Antioxidant Role of Carvacrol Against Hepatotoxicity and Nephrotoxicity Induced by Propiconazole in Rats. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 31(1): 67-74. <https://doi.org/10.1007/s43450-021-00127-8>
- Khan, S., & Ibrahim, M. (2022).** A systematic review on hepatoprotective potential of grape and polyphenolic compounds: Molecular mechanism and future prospective. *Nat. Resour. Hum. Health*. 3: 196-213. <https://doi.org/10.53365/nrfhh/156261>
- Khiya, Z., Oualcadi, Y., Gamar, A., Berrekhis, F., Zair, T., & Hilali, F. E. (2021).** Correlation of Total Polyphenolic Content with Antioxidant Activity of Hydromethanolic Extract and Their Fractions of the *Salvia officinalis* Leaves from Different Regions of Morocco. *Journal of Chemistry*. 2021(1): e8585313. <https://doi.org/10.1155/2021/8585313>
- Khwanes, S. A., Mohamed, R. A., Ibrahim, K. A., & Abd El-Rahman, H. A. (2022).** Ginger reserves testicular spermatogenesis and steroidogenesis in difenoconazole-intoxicated rats by conducting oxidative stress, apoptosis and proliferation. *Andrologia*. 54(1): e14241. <https://doi.org/10.1111/and.14241>
- Khyzhnyak, s. V., Midyk, S., Velinska, A., Arnauta, O., & Kalachniuk, L. (2022).** Fatty acid profile of the liver lipids under acute fungicide action and intake of a biologically active preparation in rats. *The Ukrainian Biochemical Journal*. 94: 47-53. <https://doi.org/10.15407/ubj94.04.047>
- Kim, M. J., Sim, D. Y., Lee, H. M., Lee, H.-J., & Kim, S.-H. (2019).** Hypolipogenic Effect of Shikimic Acid Via Inhibition of MID1IP1 and Phosphorylation of AMPK/ACC. *International Journal of Molecular Sciences*. 20(3): 582. <https://doi.org/10.3390/ijms20030582>

- Klotzsch, S. G., & McNamara, J. R. (1990).** Triglyceride measurements : A review of methods and interferences. *Clinical chemistry*. 36(9): 1605-1613.
- Knebel, C., Buhrke, T., Süßmuth, R., Lampen, A., Marx-Stoelting, P., & Braeuning, A. (2019).** Pregnane X receptor mediates steatotic effects of propiconazole and tebuconazole in human liver cell lines. *Archives of Toxicology*. 93(5): 1311-1322. <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02445-2>
- Knebel, C., Kebben, J., Eberini, I., Palazzolo, L., Hammer, H. S., Süßmuth, R. D., Heise, T., Hessel-Pras, S., Lampen, A., Braeuning, A., & Marx-Stoelting, P. (2018).** Propiconazole is an activator of AHR and causes concentration additive effects with an established AHR ligand. *Archives of Toxicology*. 92(12): 3471-3486. <https://doi.org/10.1007/s00204-018-2321-x>
- Knebel, C., Süßmuth, R. D., Hammer, H. S., Braeuning, A., & Marx-Stoelting, P. (2022).** New Approach Methods for Hazard Identification : A Case Study with Azole Fungicides Affecting Molecular Targets Associated with the Adverse Outcome Pathway for Cholestasis. *Cells*. 11(20): 3293. <https://doi.org/10.3390/cells11203293>
- Koli, P., Bhardwaj, N. R., & Mahawer, S. K. (2019).** Agrochemicals : Harmful and Beneficial Effects of Climate Changing Scenarios. In *Climate Change and Agricultural Ecosystems*. Woodhead Publishing: 65-94 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816483-9.00004-9>
- Kovacic, P., & Z Abadjian, M.-C. (2017).** Mechanism of Antifungal Triazoles and Related Drugs : Electron Transfer, Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress. *SOJ Microbiology & Infectious Diseases*. 5(5): 1-9. <https://doi.org/10.15226/sojmid/5/5/00182>
- Krishnamoorthy, K., & Subramaniam, P. (2014).** Phytochemical Profiling of Leaf, Stem, and Tuber Parts of *Solena amplexicaulis* (Lam.) Gandhi Using GC-MS. *International Scholarly Research Notices*. 2014(1): 567409. <https://doi.org/10.1155/2014/567409>
- Kwon, H. C., Sohn, H., Kim, D. H., Shin, D. M., Jeong, C. H., Chang, Y. H., Yune, J. H., Kim, Y. J., Kim, D.-W., Kim, S. H., & Han, S. G. (2021).** In Vitro and In Vivo Study on the Toxic Effects of Propiconazole Fungicide in the Pathogenesis of Liver Fibrosis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 69(26): 7399-7408. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c01086>
- Lee, W.-Y., Lee, R., & Park, H.-J. (2024).** Tebuconazole Induces Mouse Fetal Testes Damage via ROS Generation in an Organ Culture Method. *International Journal of Molecular Sciences*. 25(13): 7050. <https://doi.org/10.3390/ijms25137050>
- Lefahal, M., Zaabat, N., Ayad, R., Makhloufi, E. H., Djarri, L., Benahmed, M., Laouer, H., Nieto, G., & Akkal, S. (2018).** In Vitro Assessment of Total Phenolic and Flavonoid Contents, Antioxidant and Photoprotective Activities of Crude Methanolic Extract of

- Aerial Parts of *Capnophyllum peregrinum* (L.) Lange (Apiaceae) Growing in Algeria. *Medicines*. 5(2):26. <https://doi.org/10.3390/medicines5020026>
- Lei, M., Wang, L., Olatunde, O. O., Singh, S., Ovatlarnporn, C., Basit, A., & Olatunji, O. J. (2023).** UPLC–ESI–QTOF–MS profiling, antioxidant, antidiabetic, antibacterial, anti-inflammatory, antiproliferative activities and in silico molecular docking analysis of *Barleria strigosa*. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*. 10(1): 73. <https://doi.org/10.1186/s40538-023-00451-2>
- Lekmine, S., Benslama, O., Tahraoui, H., Ola, M. S., Laouani, A., Kadi, K., Martín-García, A. I., & Ali, A. (2024).** Anti-Cholinergic Effects of the Phenolic Extract from the *Astragalus crenatus* Plant : A Computational and Network Pharmacology Study. *Pharmaceuticals*. 17(3): 348. <https://doi.org/10.3390/ph17030348>
- Li, K., Gong, Q., Lu, B., Huang, K., Tong, Y., Mutsvene, T. E., Lin, M., Xu, Z., Lu, F., Li, X., & Hu, L. (2023).** Anti-inflammatory and antioxidative effects of gallic acid on experimental dry eye : In vitro and in vivo studies. *Eye and Vision*. 10(1): 17. <https://doi.org/10.1186/s40662-023-00334-5>
- LI, L., LIU, S., TANG, H., SONG, S., LU, L., ZHANG, P., & LI, X. (2020).** Effects of protocatechuic acid on ameliorating lipid profiles and cardio-protection against coronary artery disease in high fat and fructose diet fed in rats. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 82(9): 1387-1394. <https://doi.org/10.1292/jvms.20-0245>
- Li, S., Yin, S., Ding, H., Shao, Y., Zhou, S., Pu, W., Han, L., Wang, T., & Yu, H. (2022).** Polyphenols as potential metabolism mechanisms regulators in liver protection and liver cancer prevention. *Cell Proliferation*. 56(1): e13346. <https://doi.org/10.1111/cpr.13346>
- Li, W., Kandhare, A. D., Mukherjee, A. A., & Bodhankar, S. L. (2018).** Hesperidin, a plant flavonoid accelerated the cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats : Role of TGF- β /Smads and Ang-1/Tie-2 signaling pathways. *EXCLI Journal*. 17: 399-419. <https://doi.org/10.17179/excli2018-1036>
- Li, Z.-H., Zlabek, V., Velišek, J., Grabic, R., Machová, J., Kolařová, J., Li, P., & Randák, T. (2011).** Antioxidant responses and plasma biochemical characteristics in the freshwater rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, after acute exposure to the fungicide propiconazole. *Czech Journal of Animal Science*. 56(2): 61-69. <https://doi.org/10.17221/35/2010-CJAS>
- Lin JerHuei, L. J., & Lin MeiFan, L. M. (1997).** Tannins and related compounds from *Erodium moschatum* (L.) L'Her. *Journal of Food and Drug Analysis*. 5(4):14. <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2935>

- Lis-Balchin, M. T., & Hart, S. L. (1994).** A Pharmacological Appraisal of the Folk Medicinal Usage of *Pelargonium grossularioides* and *Erodium cicutarium*. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*. 2(3): 41-48. https://doi.org/10.1300/J044v02n03_06
- Liu, F., Li, X., Bello, B. K., Zhang, T., Yang, H., Wang, K., & Dong, J. (2022).** Difenoconazole causes spleen tissue damage and immune dysfunction of carp through oxidative stress and apoptosis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 237: 113563. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113563>
- Liu, H., Xu, Y., Wang, Y., Liu, C., Chen, J., Fan, S., Xie, L., Dong, Y., Chen, S., & Zhou, W. (2022).** Study on endocrine disruption effect of paclobutrazol and uniconazole on the thyroid of male and female rats based on lipidomics. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 234, 113386. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113386>
- Liu, L.-L., Yue, J.-Z., Lu, Z.-Y., Deng, R.-Y., Li, C.-C., Yu, Y.-N., Zhou, W.-J., Lin, M., Gao, H.-T., & Liu, J. (2024).** Long-term exposure to the mixture of phthalates induced male reproductive toxicity in rats and the alleviative effects of quercetin. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 483: 116816. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2024.116816>
- Liu, R., Liu, B., Tian, L., Wu, X., Li, X., Cai, D., Jiang, X., Sun, J., Jin, Y., & Bai, W. (2023).** Induction of reproductive injury by bisphenol A and the protective effects of cyanidin-3-O-glucoside and protocatechuic acid in rats. *Science of the Total Environment*. 883: 163615. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.163615>
- Ljoljić Bilić, V., Gašić, U. M., Milojković-Opsenica, D., Rimac, H., Vuković Rodriguez, J., Vlainić, J., Brlek-Gorski, D., & Kosalec, I. (2022).** Antibacterial Fractions from *Erodium cicutarium* Exposed—Clinical Strains of *Staphylococcus aureus* in Focus. *Antibiotics*. 11(4): 492. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11040492>
- Ljoljić Bilić, V., Stabentheiner, E., Kremer, D., Dunkić, V., Grubešić, R. J., & Rodríguez, J. V. (2019).** Phytochemical and Micromorphological Characterization of Croatian Populations of *Erodium cicutarium*. *Natural Product Communications*. 14(6): 1934578X19856257. <https://doi.org/10.1177/1934578X19856257>
- Lobiuc, A., Pavăl, N.-E., Mangalagiu, I. I., Gheorghită, R., Teliban, G.-C., Amăriucăi-Mantu, D., & Stoleru, V. (2023).** Future Antimicrobials : Natural and Functionalized Phenolics. *Molecules*. 28(3): 1114. <https://doi.org/10.3390/molecules28031114>
- Ma, J.-Q., Li, Z., Xie, W.-R., Liu, C.-M., & Liu, S.-S. (2015).** Quercetin protects mouse liver against CCl₄-induced inflammation by the TLR2/4 and MAPK/NF-κB pathway. *International Immunopharmacology*. 28(1): 531-539. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.06.036>
- Ma, Y., Li, S., Ye, S., Hu, D., Luo, S., Wei, L., & Xiao, F. (2022).** Effect of propiconazole on neutrophil extracellular traps formation : Assessing the role of autophagy. *Food and Chemical Toxicology*. 168: 113354. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.113354>
- Macedo, S. K. S., Almeida, T. D. S., Ferraz, C. A. A., Oliveira, A. P., Hugo Almeida, A. V., Almeida, J. R. G. D. S., Silva, N. D. S., & Nunes, X. P. (2015).** Identification of

- flavonol glycosides and in vitro photoprotective and antioxidant activities of *Triplaris gardneriana* Wedd. *Journal of Medicinal Plants Research*. 9(7): 207-215. <https://doi.org/10.5897/JMPR2014.5555>
- Madhavi Sastry, G., Adzhigirey, M., Day, T., Annabhimoju, R., & Sherman, W. (2013).** Protein and ligand preparation: Parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*. 27(3): 221-234. <https://doi.org/10.1007/s10822-013-9644-8>
- Mahajan, L., Verma, P., Raina, R., & Sood, S. (2018).** Toxic effects of imidacloprid combined with arsenic: Oxidative stress in rat liver. *Toxicology and Industrial Health*. 34(10): 726-735. <https://doi.org/10.1177/0748233718778993>
- Majdan, M., & Bobrowska-Korczyk, B. (2022).** Active Compounds in Fruits and Inflammation in the Body. *Nutrients*. 14(12): 2496. <https://doi.org/10.3390/nu14122496>
- Mansur, J. de S., Breder, M. N. R., Mansur, M. C. d'Ascensão, & Azulay, R. D. (1986).** Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. *An. bras. dermatol.* 61(3): 121-124.
- Maretti-Mira, A. C., Salomon, M. P., Hsu, A. M., Kanel, G. C., & Golden-Mason, L. (2022).** Hepatic damage caused by long-term high cholesterol intake induces a dysfunctional restorative macrophage population in experimental NASH. *Frontiers in Immunology*. 13: 968366. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.968366>
- Marino, Y., Arangia, A., D'Amico, R., Cordaro, M., Siracusa, R., Impellizzeri, D., Gugliandolo, E., Fusco, R., Cuzzocrea, S., & Di Paola, R. (2023).** Aggravation of TGFβ1-Smad pathway and autoimmune myocarditis by fungicide (Tebuconazole) exposure. *International Journal of Molecular Sciences*. 24(14): 11510. <https://doi.org/10.3390/ijms241411510>
- Martin, M. T., Brennan, R. J., Hu, W., Ayanoglu, E., Lau, C., Ren, H., Wood, C. R., Corton, J. C., Kavlock, R. J., & Dix, D. J. (2007).** Toxicogenomic Study of Triazole Fungicides and Perfluoroalkyl Acids in Rat Livers Predicts Toxicity and Categorizes Chemicals Based on Mechanisms of Toxicity. *Toxicological Sciences*. 97(2): 595-613. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm065>
- Martinez, S., Valek, L., Rešetić, J., & Ružić, D. F. (2006).** Cyclic voltammetry study of plasma antioxidant capacity—Comparison with the DPPH and TAS spectrophotometric methods. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 588(1): 68-73. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2005.12.016>
- Martoja, R. et Martoja-Pierson, M. 1967.** Initiation aux techniques de l'histologie animale. Masson & Cie éditeurs. Paris, 329 pp.

- Marx-Stoelting, P., Knebel, C., & Braeuning, A. (2020).** The connection of azole fungicides with xeno-sensing nuclear receptors, drug metabolism and hepatotoxicity. *Cells*. 9(5): 1192. <https://doi.org/10.3390/cells9051192>
- Medini, F., Fellah ,Hanen, Ksouri ,Riadh, & and Abdelly, C. (2014).** Total phenolic, flavonoid and tannin contents and antioxidant and antimicrobial activities of organic extracts of shoots of the plant *Limonium delicatulum*. *Journal of Taibah University for Science*. 8(3): 216-224. <https://doi.org/10.1016/j.jtusci.2014.01.003>
- Miller, W. G., Myers, G. L., Sakurabayashi, I., Bachmann, L. M., Caudill, S. P., Dziekonski, A., Edwards, S., Kimberly, M. M., Korzun, W. J., & Leary, E. T. (2010).** Seven direct methods for measuring HDL and LDL cholesterol compared with ultracentrifugation reference measurement procedures. *Clinical chemistry*. 56(6): 977-986. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2009.142810>
- Mistretta, V., Cavalier, E., Collette, J., Lutteri, L., & Chapelle, J.-P. (2009).** Intérêt des anticorps monoclonaux dans le laboratoire d'analyses biomédicales. *Revue Médicale de Liège*. 64(5-6): 257-263.
- Mlakić, M., Talić, S., Odak, I., Barić, D., Šagud, I., & Škorić, I. (2024).** Cholinesterase Inhibition and Antioxidative Capacity of New Heteroaromatic Resveratrol Analogs : Synthesis and Physico—Chemical Properties. *International Journal of Molecular Sciences*. 25(13): 7401. <https://doi.org/10.3390/ijms25137401>
- Mohamed, R. E., El-Said, M. M., & Arief, M. M. H. (2021).** Phytochemical Screening of *Cinnamon Cassia* and Its Protective Effects Against Hepatotoxicity Induced By Difenonazole in Male Albino Rats. *Research Square*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-173661/v1>
- Mohamed, R., El-Sayed, M., Arief, M., & Mahmoud, A. (2021).** Evaluation of the ameliorative effect of *Cinnamon cassia* against metabolic disorder and thyroid hormonal disruption following treatment with difenoconazole fungicide in the male albino rats. *Egyptian Journal of Chemistry*. 65(1): 55-67. <https://doi.org/10.21608/ejchem.2021.76914.3766>
- Mokhbatly, A. A., Aburawash, A., Ghazi, E., Goda, W., Elbially, Z. I., Abou-Asa, S. S., El-Magd, M. A., Elesh, I., & Abdelhady, D. H. (2019).** A potential molecular mechanism and biochemical alterations associated with bromuconazole-induced testicular toxicity in rats. *Arabian journal of medical sciences*. 2: 20-24.
- Moreira, S., Pereira, S. C., Seco-Rovira, V., Oliveira, P. F., Alves, M. G., & Pereira, M. de L. (2021).** Pesticides and Male Fertility : A Dangerous Crosstalk. *Metabolites*. 11(12): 799. <https://doi.org/10.3390/metabo11120799>
- Morgan, A. M., Ogaly, H. A., Kamel, S., Rashad, M. M., Hassanen, E. I., Ibrahim, M. A., Galal, M. K., Yassin, A. M., Dulmani, S. A. A., Al-Zahrani, F. A. M., & Hussien,**

- A. M. (2023b).** Protective effects of N-acetyl-l-cysteine against penconazole-triggered hepatorenal toxicity in adult rats. *Journal of Veterinary Research*. 67(3): 459-469. <https://doi.org/10.2478/jvetres-2023-0039>
- Mossa, A.-T. H., Heikal, T. M., Belaiba, M., Raelison, E. G., Ferhout, H., & Bouajila, J. (2015).** Antioxidant activity and hepatoprotective potential of *Cedrelopsis grevei* on cypermethrin induced oxidative stress and liver damage in male mice. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 15(1): 251. <https://doi.org/10.1186/s12906-015-0740-2> <https://doi.org/10.1186/s12906-015-0740-2>
- Mostafalou, S., Eghbal, M. A., Nili-Ahmadabadi, A., Baeri, M., & Abdollahi, M. (2012).** Biochemical evidence on the potential role of organophosphates in hepatic glucose metabolism toward insulin resistance through inflammatory signaling and free radical pathways. *Toxicology and Industrial Health*. 28(9): 840-851. <https://doi.org/10.1177/0748233711425073>
- Mrabti, H. N., Doudach, L., Kachmar, M. R., Khali, Z., Mrabti, N. N., Benrahou Enrahou, K. B., Harraoui, K., Zengin, G., Bouyahya, A., & Faouzi, M. E. A. (2021).** Phenolic content, antibacterial, antioxidant, and toxicological investigations of *Erodium guttatum* (Geraniaceae) collected from the Northeast of Morocco. *Turkish Journal of Botany*. 45(8): 739-749. <https://doi.org/10.3906/bot-2107-29>
- Müller, L., Gnoyke, S., Popken, A. M., & Böhm, V. (2010).** Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT-Food Science and Technology*. 43(6): 992-999. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.02.004>
- Munekata, P. E. S., Alcántara, C., Collado, M. C., Garcia-Perez, J. V., Saraiva, J. A., Lopes, R. P., Barba, F. J., do Prado Silva, L., Sant'Ana, A. S., Fierro, E. M., & Lorenzo, J. M. (2019).** Ethnopharmacology, phytochemistry and biological activity of *Erodium* species: A review. *Food Research International*. 126: 108659. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108659>
- Muscolo, A., Mariateresa, O., Giulio, T., & Mariateresa, R. (2024).** Oxidative Stress: The Role of Antioxidant Phytochemicals in the Prevention and Treatment of Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 25(6): 3264. <https://doi.org/10.3390/ijms25063264>
- Mutwedu, V. B., Nyongesa, A. W., Azine, P. C., Chiregereza, D. K., Ngoumtsop, V. H., Mugumaarhahama, Y., & Ayagirwe, R. B. B. (2021).** Growth performance and reproductive function impairment of glyphosate-based herbicide in male guinea pig (*Cavia porcellus*). *Veterinary Medicine and Science*. 7(3): 1047-1055. <https://doi.org/10.1002/vms3.443>
- Napagoda, M. T., Malkanthi, B. M. A. S., Abayawardana, S. A. K., Qader, M. M., & Jayasinghe, L. (2016).** Photoprotective potential in some medicinal plants used to treat skin diseases in Sri Lanka. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 16(1): 479. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1455-8>

- Nesnow, S., Padgett, W. T., & Moore, T. (2011).** Propiconazole Induces Alterations in the Hepatic Metabolome of Mice: Relevance to Propiconazole-Induced Hepatocarcinogenesis. *Toxicological Sciences*. 120(2): 297-309. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr012>
- Noor, G., Badruddeen, Akhtar, J., Singh, B., Ahmad, M., & Khan, M. I. (2023).** An outlook on the target-based molecular mechanism of phytoconstituents as immunomodulators. *Phytotherapy Research*. 37(11): 5058-5079. <https://doi.org/10.1002/ptr.7969>
- Noshy, P. A., Elhady, M. A., Khalaf, A. A. A., Kamel, M. M., & Hassanen, E. I. (2018).** Ameliorative effect of carvacrol against propiconazole-induced neurobehavioral toxicity in rats. *NeuroToxicology*. 67: 141-149. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2018.05.005>
- Nouri, A., Heibati, F., & Heidarian, E. (2021).** Gallic acid exerts anti-inflammatory, anti-oxidative stress, and nephroprotective effects against paraquat-induced renal injury in male rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 394(1): 1-9. <https://doi.org/10.1007/s00210-020-01931-0>
- Nouri, A., Salehi-Vanani, N., & Heidarian, E. (2021).** Antioxidant, anti-inflammatory and protective potential of gallic acid against paraquat-induced liver toxicity in male rats. *Avicenna Journal of Phytomedicine*. 11(6): 633-644. <https://doi.org/10.22038/AJP.2021.18581>
- Ntalouka, F., & Tsirivakou, A. (2023).** Luteolin : A promising natural agent in management of pain in chronic conditions. *Frontiers in Pain Research*. 4: 1114428. <https://doi.org/10.3389/fpain.2023.1114428>
- Ochiai, A., Othman, M. B., & Sakamoto, K. (2021).** Kaempferol ameliorates symptoms of metabolic syndrome by improving blood lipid profile and glucose tolerance. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 85(10): 2169-2176. <https://doi.org/10.1093/bbb/zbab132>
- Ojeaburu, S. I., & Oriakhi, K. (2021).** Hepatoprotective, antioxidant and, anti-inflammatory potentials of gallic acid in carbon tetrachloride-induced hepatic damage in Wistar rats. *Toxicology Reports*. 8: 177-185. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2021.01.001>
- Ojo, O. A., Rotimi, D. E., Ojo, A. B., Ogunlakin, A. D., & Ajiboye, B. O. (2023).** Gallic acid abates cadmium chloride toxicity via alteration of neurotransmitters and modulation of inflammatory markers in Wistar rats. *Scientific Reports*. 13(1): 1577. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-28893-6>
- Okuda, T., Mori, K., Terayama, K., Higuchi, K., & Hatano, T. (1979).** Isolation of geraniin from plants of Geranium and Euphorbiaceae (author's transl). *Yakugaku zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*. 99(5): 543-545. https://doi.org/10.1248/yakushi1947.99.5_543

- Omobowale, T. O., Oyagbemi, A. A., Ajufu, U. E., Adejumobi, O. A., Ola-Davies, O. E., Adedapo, A. A., & Yakubu, M. A. (2018).** Ameliorative Effect of Gallic Acid in Doxorubicin-Induced Hepatotoxicity in Wistar Rats Through Antioxidant Defense System. *Journal of Dietary Supplements*. 15(2): 183-196. <https://doi.org/10.1080/19390211.2017.1335822>
- Ortiz, P. A., Bruno, M. E., Moore, T., Nesnow, S., Winnik, W., & Ge, Y. (2010).** Proteomic analysis of propiconazole responses in mouse liver: Comparison of genomic and proteomic profiles. *Journal of proteome research*. 9(3): 1268-1278. <https://doi.org/10.1021/pr900755q>
- Othmène, Y. B., Hamdi, H., Salem, I. B., Annabi, E., Amara, I., Neffati, F., Najjar, M. F., & Abid-Essefi, S. (2020).** Oxidative stress, DNA damage and apoptosis induced by tebuconazole in the kidney of male Wistar rat. *Chemico-Biological Interactions*. 330: 109114. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109114>
- Owumi, S. E., Adedara, I. A., Farombi, E. O., & Oyelere, A. K. (2020).** Protocatechuic acid modulates reproductive dysfunction linked to furan exposure in rats. *Toxicology*. 442: 152556. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2020.152556>
- Owumi, S. E., Ijadele, A. O., Arunsi, U. O., & Odunola, O. A. (2020).** Luteolin abates reproductive toxicity mediated by the oxido-inflammatory response in Doxorubicin-treated rats. *Toxicology Research and Application*. 4: 2397847320972040. <https://doi.org/10.1177/2397847320972040>
- Oyaizu, M. (1986).** Studies on products of browning reaction antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese journal of nutrition and dietetics*. 44(6): 307-315.
- Özyürek, M., Güngör, N., Baki, S., Güçlü, K., & Apak, R. (2012).** Development of a Silver Nanoparticle-Based Method for the Antioxidant Capacity Measurement of Polyphenols. *Analytical Chemistry*. 84(18): 8052-8059. <https://doi.org/10.1021/ac301925b>
- Páez-Pereda, M., & Stalla, G. K. (2005).** Chapter 1.4—Hormones of the pituitary. In T. Steckler, N. H. Kalin, & J. M. H. M. Reul (Éds.), *Techniques in the Behavioral and Neural Sciences*. 15: 67-77. [https://doi.org/10.1016/S0921-0709\(05\)80007-0](https://doi.org/10.1016/S0921-0709(05)80007-0)
- Pajał, P., Socha, R., Gałkowska, D., Roźnowski, J., & Fortuna, T. (2014).** Phenolic profile and antioxidant activity in selected seeds and sprouts. *Food Chemistry*. 143: 300-306. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.064>
- Pan, X., Cheng, Y., Dong, F., Liu, N., Xu, J., Liu, X., Wu, X., & Zheng, Y. (2018).** Stereoselective bioactivity, acute toxicity and dissipation in typical paddy soils of the chiral fungicide propiconazole. *Journal of Hazardous Materials*, 359, 194-202. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.07.061>

- Pandey, S. P., & Mohanty, B. (2017).** Disruption of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis on co-exposures to dithiocarbamate and neonicotinoid pesticides : Study in a wildlife bird, *Amandava amandava*. *Neurotoxicology*. 60: 16-22. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2017.02.010>
- Pari, L., Karthikeyan, A., Karthika, P., & Rathinam, A. (2015).** Protective effects of hesperidin on oxidative stress, dyslipidaemia and histological changes in iron-induced hepatic and renal toxicity in rats. *Toxicology reports*. 2: 46-55. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2014.11.003>
- Parlakidis, P., Gounari, I., Georgiou, A., Adamidis, G., Vryzas, Z., & Gikas, G. D. (2023).** Removal of two triazole fungicides from agricultural wastewater in pilot-scale horizontal subsurface flow constructed wetlands. *Agronomy*. 13(1): 265. <https://doi.org/10.3390/agronomy13010265>
- Patel, K., & Patel, D. K. (2019).** The Beneficial Role of Rutin, A Naturally Occurring Flavonoid in Health Promotion and Disease Prevention : A Systematic Review and Update. In *Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases*: 457-479. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813820-5.00026-X>
- Pathak, V. M., Verma, V. K., Sharma, A., Dewali, S., Kumari, R., Mohapatra, A., & Cunill, J. M. (2022).** Current status of pesticide effects on environment, human health and it's eco-friendly management as bioremediation : A comprehensive review. *Frontiers in Microbiology*. 13: 962619. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.962619>
- Petricca, S., Celenza, G., Luzi, C., Cinque, B., Lizzi, A. R., Franceschini, N., Festuccia, C., & Iorio, R. (2022).** Synergistic activity of ketoconazole and miconazole with prochloraz in inducing oxidative stress, GSH depletion, mitochondrial dysfunction, and apoptosis in mouse sertoli TM4 cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 23(10): 5429. <https://doi.org/10.3390/ijms23105429>
- Pizano-Andrade, J. C., Vargas-Guerrero, B., Gurrola-Díaz, C. M., Vargas-Radillo, J. J., & Ruiz-López, M. A. (2022).** Natural products and their mechanisms in potential photoprotection of the skin. *Journal of Biosciences*. 47(4): 77. <https://doi.org/10.1007/s12038-022-00314-2>
- Pollet, J., & Galliot, M. (1975).** Automatic dosage of uric acid by urate oxydase. Comparison with Praetorius' methods. *Annales de Biologie Clinique*. 33(2): 75-80. <https://europepmc.org/article/med/241280>
- Radhia, A., Hanen, N., Abdelkarim, B. A., & Mohamed, N. (2018).** Phytochemical screening, antioxidant and antimicrobial activities of *Erodium glaucophyllum* (L.) L'Hérit. *J Biomed Sci*, 7(4), 13-19.

- Radi, Z. (2019).** Kidney Pathophysiology, Toxicology, and Drug-Induced Injury in Drug Development. *International Journal of Toxicology*. 38(3): 215-227. <https://doi.org/10.1177/1091581819831701>
- Radulović, N. S., Stojković, M. B., Mitić, S. S., Randjelović, P. J., Ilić, I. R., Stojanović, N. M., & Stojanović-Radić, Z. Z. (2012).** Exploitation of the Antioxidant Potential of *Geranium Macrorrhizum* (Geraniaceae): Hepatoprotective and Antimicrobial Activities. *Natural Product Communications*. 7(12): 1934578X1200701218. <https://doi.org/10.1177/1934578X1200701218>
- Raghavendran, H. R. B., Sathivel, A., & Devaki, T. (2004).** Hepatoprotective nature of seaweed alcoholic extract on acetaminophen induced hepatic oxidative stress. *Journal of health science*. 50(1): 42-46. <https://doi.org/10.1248/jhs.50.42>
- Rahman, Md. M., Al Noman, Md. A., Khatun, S., Alam, R., Shetu, Md. M. H., Talukder, E. K., Imon, R. R., Biswas, Md. Y., Anis-Ul-Haque, K. M., Uddin, M. J., & Akhter, S. (2023).** Evaluation of *Senna tora* (L.) Roxb. Leaves as source of bioactive molecules with antioxidant, anti-inflammatory and antibacterial potential. *Heliyon*. 9(1): e12855. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e12855>
- Rajan, S., Mahalakshmi, S., Deepa, V., Sathya, K., Shajitha, S., & Thirunalasundari, T. (2011).** Antioxidant potentials of *Punica granatum* fruit rind extracts. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 3(3): 82-88.
- Ramadhan, S. J., Khudair, K. K., & Al-Okaily, B. N. (2023).** Effect of Gallic acid on lipid profile and antioxidant status in cadmium chloride-treated rats. *Iraqi journal of agricultural sciences*. 54(3): 735-740. <https://doi.org/10.36103/ijas.v54i3.1755>
- Ramaiah, L., Bounous, D. I., & Elmore, S. A. (2013).** Chapter 50—Hematopoietic System. In W. M. Haschek, C. G. Rousseaux, & M. A. Wallig (Éds.), *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology (Third Edition): Vol. III* (p. 1863-1933). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415759-0.00050-9>
- Ranjith, D., Telang, A. G., Subhadra, S., Kamothi, D. J., Madhu, C. L., & Kumar, D. (2024).** Chitosan-TPP encapsulated quercetin nanoparticles : Amplified protection mechanisms unveiled against Ethion-induced developmental toxicity through comprehensive in-vivo and in-silico elucidation. *Toxicology Research*. 13(3): tfae074. <https://doi.org/10.1093/toxres/tfae074>
- Rasoul, M. A. A., & Marei, G. I. K. (2016).** Potential therapeutic effect of turmeric (*Curcuma longa*) against adverse effects of penconazole fungicide to white rats. *International Journal of Pharmacology and Toxicology*. 4: 178-186. <https://doi.org/10.14419/ijpt.v4i2.6347>

- Ratnasooriya, W. D., Jayakody, J. R. A. C., Rosa, S. R. D., & Ratnasooriya, C. D. T. (2014).** In vitro sun screening activity of Sri Lankan orthodox black tea (*Camellia Sinensis* linn). *World Journal of Pharmaceutical Sciences*, 144-148.
- Razzaghi-Asl, N., Garrido, J., Khazraei, H., Borges, F., & Firuzi, O. (2013).** Antioxidant Properties of Hydroxycinnamic Acids : A Review of Structure- Activity Relationships. *Current Medicinal Chemistry*. 20(36): 4436-4450. <https://doi.org/10.2174/09298673113209990141>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999).** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*. 26(9-10): 1231-1237. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3)
- Rehman, S., Ashfaq, U. A., Ijaz, B., & Riazuddin, S. (2018).** Anti-hepatitis C virus activity and synergistic effect of *Nymphaea alba* extracts and bioactive constituents in liver infected cells. *Microbial pathogenesis*. 121: 198-209. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.05.023>
- Renny, A., Sidhic, J., Tom, A., Kuttithodi, A. M., Job, J. T., Rajagopal, R., Alfarhan, A., & Narayanankutty, A. (2024).** Methanol Extract of *Thottea siliquosa* (Lam.) Ding Hou Leaves Inhibits Carrageenan- and Formalin-Induced Paw Edema in Mice. *Molecules*. 29(20): 4800. <https://doi.org/10.3390/molecules29204800>
- Rice-Evans, C., Miller, N., & Paganga, G. (1997).** Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant science*. 2(4): 152-159.
- Rjiba, K., Hamdi, H., M'nassri, A., Guedri, Y., Mokni, M., & Abid, S. (2021).** Bromuconazole caused genotoxicity, hepatic and renal failure via oxidative stress process in Wistar rats. Research Square. <http://dx.doi.org/10.21203/rs.3.rs-420777/v1>
- Roelofs, M. J. E., Temming, A. R., Piersma, A. H., van den Berg, M., & van Duursen, M. B. M. (2014).** Les fongicides à base de conazole inhibent la sécrétion de testostérone des cellules de Leydig et l'activation des récepteurs aux androgènes *in vitro*. *Toxicology Reports*. 1: 271-283. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2014.05.006>
- Roman, D., Voiculescu, D., Filip, M., Ostafe, V., & Isvoran, A. (2021).** Effects of Triazole Fungicides on Soil Microbiota and on the Activities of Enzymes Found in Soil : A Review. *Agriculture*. 11(9): 893. <https://doi.org/10.3390/agriculture11090893>
- Rotimi, D. E., Komolafe, C., Iyobhebhe, M., Akinduko, A. A., Durojaiye, T., Oluwayemi, E. T., Akinsanola, B., & Olaolu, T. D. (2024).** Therapeutic Role of Gallic Acid in Male Infertility. *2024 International Conference on Science, Engineering and Business for Driving Sustainable Development Goals (SEB4SDG)*: 1-9. <https://doi.org/10.1109/SEB4SDG60871.2024.10630413>

- Ruíz-Arias, M. A., Medina-Díaz, I. M., Bernal-Hernández, Y. Y., Agraz-Cibrián, J. M., González-Arias, C. A., Barrón-Vivanco, B. S., Herrera-Moreno, J. F., Verdín-Betancourt, F. A., Zambrano-Zaragoza, J. F., & Rojas-García, A. E. (2022).** Hematological indices as indicators of inflammation induced by exposure to pesticides. *Environmental Science and Pollution Research*. 30(7): 19466-19476. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-23509-4>
- Saber, T. M., Abd El-Aziz, R. M., & Ali, H. A. (2016).** Quercetin mitigates fenitrothion-induced testicular toxicity in rats. *Andrologia*. 48(5): 491-500. <https://doi.org/10.1111/and.12467>
- Sajad, M., Shabir, S., Singh, S. K., Bhardwaj, R., Alsanie, W. F., Alamri, A. S., Alhomrani, M., Alsharif, A., Vamanu, E., & Singh, M. P. (2024).** Role of nutraceutical against exposure to pesticide residues : Power of bioactive compounds. *Frontiers in Nutrition*. 11: 1342881. <https://doi.org/10.3389/fnut.2024.1342881>
- Saleh, N. A. M., El-karemy, Z. A. R., Mansour, R. M. A., & Fayed, A.-A. A. (1983).** A chemosystematic study of some geraniaceae. *Phytochemistry*. 22(11): 2501-2505. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(83\)80148-4](https://doi.org/10.1016/0031-9422(83)80148-4)
- Samet, S., Ayachi, A., Fourati, M., Mallouli, L., Allouche, N., Treilhou, M., Téné, N., & Mezghani-Jarraya, R. (2022).** Antioxidant and antimicrobial activities of *Erodium arborescens* aerial part extracts and characterization by LC-HESI-MS2 of its acetone extract. *Molecules*. 27(14): 4399. <https://doi.org/10.3390/molecules27144399>
- Samid, I., Khouya, T., Elbouny, H., Sellam, K., & Alem, C. (2023).** Quantification of phytochemical and antioxidant properties of aqueous apple extracts from the high atlas mountains in Morocco and their anti-inflammatory effect on Wistar rats. *Scientific African*. 22: e01897. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2023.e01897>
- Sanchez, C. L., Souders, C. L., Pena-Delgado, C. J., Nguyen, K. T., Kroyter, N., Ahmadie, N. E., Aristizabal-Henao, J. J., Bowden, J. A., & Martyniuk, C. J. (2020).** Neurotoxicity assessment of triazole fungicides on mitochondrial oxidative respiration and lipids in differentiated human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Neuro Toxicology*. 80: 76-86. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2020.06.009>
- Sapan, C. V., Lundblad, R. L., & Price, N. C. (1999).** Colorimetric protein assay techniques. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 29(2): 99-108. <https://doi.org/10.1111/j.1470-8744.1999.tb00538.x>
- Sarhan, H., Saleh, A., Hammam, O., Atta, A., & Elnahrery, E. (2021).** The protective role of Diosmin, Hesperidine combination against heavy metals toxicity in Wistar albino rats : Biochemical, Immunohistochemical and Molecular Studies. *Egyptian Journal of Chemistry*. 64(8): 4531-4543. <https://doi.org/10.21608/ejchem.2021.83002.4078>
- Sarkar, S., Seenivasan, S., & Premkumar, R. (2009).** Biodegradation of propiconazole by *Pseudomonas putida* isolated from tea rhizosphere. *Plant, Soil and Environment*. 55(5): 196-201. <https://doi.org/10.17221/2184-PSE>

- Sayre, R. M., Agin, P. P., LeVee, G. J., & Marlowe, E. (1979).** A comparison of in vivo and in vitro testing of sunscreens formulas. *Photochemistry and Photobiology*. 29(3): 559-566. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1979.tb07090.x>
- Sergazy, S., Vetrova, A., Orhan, I. E., Senol Deniz, F. S., Kahraman, A., Zhang, J.-Y., & Aljofan, M. (2022).** Antiproliferative and Cytotoxic Activity of Geraniaceae Plant Extracts Against Five Tumor Cell Lines. *Future Science OA*, 8(2), FSO775. <https://doi.org/10.2144/fsoa-2021-0109>
- Serra, L., Bourdon, G., Estienne, A., Fréville, M., Ramé, C., Chevaleyre, C., Didier, P., Chahnamian, M., Ganier, P., Pinault, F., Froment, P., & Dupont, J. (2023).** Triazole pesticides exposure impaired steroidogenesis associated to an increase in AHR and CAR expression in testis and altered sperm parameters in chicken. *Toxicology Reports*. 10: 409-427. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2023.03.005>
- Shahat, M. (2013).** Evaluation of the toxic effects of difenoconazole fungicide (SCORE) on male albino rats. *Al-Azhar Bulletin of Science- Basic Science Sector*. 24(2): 33-48. <https://doi.org/10.21608/absb.2013.6417>
- Shams, E., Abdollahi, V., Harfsheno, M., & Ghasemian, S. O. (2024).** Protective effect of selenium and vitamin C on the fertility of male rats given penconazole. *JBRA Assisted Reproduction*. 28(1): 27-32. <https://doi.org/10.5935/1518-0557.20230042>
- Sharma, D., Sangha, G. K., & Khera, K. S. (2015).** Triazophos-induced oxidative stress and histomorphological changes in ovary of female Wistar rats. *Pesticide biochemistry and physiology*. 117:9-18. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.09.004>
- Sharma, P., Khan, I. A., & Singh, R. (2018).** Curcumin and quercetin ameliorated cypermethrin and deltamethrin-induced reproductive system impairment in male wistar rats by upregulating the activity of pituitary-gonadal hormones and steroidogenic enzymes. *International journal of fertility & sterility*. 12(1): 72. <https://doi.org/10.22074/ijfs.2018.5160>
- Sharma, V. C., Kaushik, A., Dey, Y. N., Srivastava, B., Wanjari, M., & Jaiswal, B. (2020).** Analgesic, anti-inflammatory and antipyretic activities of ethanolic extract of stem bark of *Anogeissus latifolia* Roxb. *Clinical Phytoscience*. 6(1): 22. <https://doi.org/10.1186/s40816-020-00171-2>
- Shepelskaya, N. R., & Kolianchuk, Y. V. (2021).** Reproductive toxicity of triazole fungicides cyproconazole and epoxiconazole when exposed to male and female wistar rats during gametogenesis. *One Health and Nutrition Problems of Ukraine*. 54(1): 52-61. <https://doi.org/10.33273/2663-9726-2021-54-1-52-61>
- Shibata, M., Ohkubo, T., Takahashi, H., & Inoki, R. (1989).** Modified formalin test: Characteristic biphasic pain response. *pain*. 38(3): 347-352. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(89\)90222-4](https://doi.org/10.1016/0304-3959(89)90222-4)

- Simón, J., Casado-Andrés, M., Goikoetxea-Usandizaga, N., Serrano-Maciá, M., & Martínez-Chantar, M. L. (2020).** Nutraceutical Properties of Polyphenols against Liver Diseases. *Nutrients*. 12(11): 3517. <https://doi.org/10.3390/nu12113517>
- Skala, J. H., Waring, P. P., Lyons, M. F., Rusnak, M. G., & Alletto, J. S. (1981).** Methodology for Determination of Blood Aminotransferases. In J. E. Leklem & R. D. Reynolds (Éds.), *Methods in Vitamin B-6 Nutrition : Analysis and Status Assessment*: 171-202. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-9901-8_10
- Skolness, S. Y., Blanksma, C. A., Cavallin, J. E., Churchill, J. J., Durhan, E. J., Jensen, K. M., Johnson, R. D., Kahl, M. D., Makynen, E. A., & Villeneuve, D. L. (2013).** Propiconazole inhibits steroidogenesis and reproduction in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *toxicological sciences*. 132(2): 284-297. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kft010>
- Soetaert, A., Moens, L. N., Van der Ven, K., Van Leemput, K., Naudts, B., Blust, R., & Coen, W. M. (2006).** Molecular impact of propiconazole on *Daphnia magna* using a reproduction-related cDNA array. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 142(1-2): 66-76. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2005.10.009>
- Šola, I., Poljuha, D., Pavičić, I., Jurinjak Tušek, A., & Šamec, D. (2025).** Climate Change and Plant Foods: The Influence of Environmental Stressors on Plant Metabolites and Future Food Sources. *Foods*. 14(3): 416. <https://doi.org/10.3390/foods14030416>
- Song, J., He, Y., Luo, C., Feng, B., Ran, F., Xu, H., Ci, Z., Xu, R., Han, L., & Zhang, D. (2020).** New progress in the pharmacology of protocatechuic acid: A compound ingested in daily foods and herbs frequently and heavily. *Pharmacological research*. 161: 105109. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105109>
- Stojanović-Radić, Z., Čomić, L., Radulović, N., Dekić, M., Randelović, V., & Stefanović, O. (2010).** Chemical composition and antimicrobial activity of *Erodium* species: *E. ciconium* L., *E. cicutarium* L., and *E. absinthoides* Willd. (Geraniaceae). *Chemical Papers*. 64(3): 368-377. <https://doi.org/10.2478/s11696-010-0014-x>
- Suhaimi, S. H., Hasham, R., Hafiz Idris, M. K., Ismail, H. F., Mohd Ariffin, N. H., & Abdul Majid, F. A. (2019).** Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction Conditions Followed by Solid Phase Extraction Fractionation from *Orthosiphon stamineus* Benth (Lamiace) Leaves for Antiproliferative Effect on Prostate Cancer Cells. *Molecules*. 24(22),:Article 22. <https://doi.org/10.3390/molecules24224183>
- Sule, R. O., Condon, L., & Gomes, A. V. (2022).** A Common Feature of Pesticides: Oxidative Stress—The Role of Oxidative Stress in Pesticide-Induced Toxicity. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2022: 1-31. <https://doi.org/10.1155/2022/5563759>
- Sun, D., Luo, G., Zhang, Q., Wang, M., Yang, T., Wang, Y., & Pang, J. (2023).** Sub-chronic exposure to hexaconazole affects the lipid metabolism of rats through mTOR-PPAR-

- γ /SREBP1 signaling pathway mediated by oxidative stress. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 197: 105646. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2023.105646>
- Sun, G., Grindstaff, R. D., Thai, S.-F., Lambert, G. R., Tully, D. B., Dix, D. J., & Nesnow, S. (2007).** Induction of cytochrome P450 enzymes in rat liver by two conazoles, myclobutanil and triadimefon. *Xenobiotica*. 37(2): 180-193. <https://doi.org/10.1080/00498250601059942>
- Svanholm, S., Brouard, V., Roza, M., Marini, D., Karlsson, O., & Berg, C. (2024).** Impaired spermatogenesis and associated endocrine effects of azole fungicides in peripubertal *Xenopus tropicalis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 270: 115876. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.115876>
- Svanholm, S., Säfholm, M., Brande-Lavridsen, N., Larsson, E., & Berg, C. (2021).** Toxicité pour le développement et la reproduction et activité endocrinienne du propiconazole dans le modèle *Xenopus tropicalis*. *Science of The Total Environment*. 753: 141940. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141940>
- Szydłowska-Czerniak, A., Dianoczki, C., Recseg, K., Karlovits, G., & Szlyk, E. (2008).** Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. *Talanta*. 76(4): 899-905. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.04.055>
- Tabassum, H., Khan, J., Salman, Mohd., Raisuddin, S., & Parvez, S. (2016).** Propiconazole induced toxicological alterations in brain of freshwater fish *Channa punctata* Bloch. *Ecological Indicators*. 62: 242-248. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.11.001>
- Takaoka, M., Manabe, S., Yamoto, T., Teranishi, M., Matsunuma, N., Masuda, H., & Goto, N. (1994).** Comparative study of goitrogenic actions of 3-substituted 1, 2, 4-triazoles in rats. *Journal of Veterinary Medical Science*. 56(2): 341-346. <https://doi.org/10.1292/jvms.56.341>
- Taxvig, C., Vinggaard, A. M., Hass, U., Axelstad, M., Metzdorff, S., & Nellemann, C. (2008).** Endocrine-disrupting properties in vivo of widely used azole fungicides. *International Journal of Andrology*. 31(2): 170-177. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2007.00838.x>
- Teng, M., Zhao, W., Chen, X., Wang, C., Zhou, L., Wang, C., & Xu, Y. (2022).** Parental exposure to propiconazole at environmentally relevant concentrations induces thyroid and metabolism disruption in zebrafish (*Danio rerio*) offspring : An in vivo, in silico and in vitro study. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 242: 113865. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113865>
- Thabit, T. M. A., Abdelkareem, E. M., Bouqellah, N. A., & Shokr, S. A. (2021).** Triazole Fungicide Residues and Their Inhibitory Effect on Some Trichothecenes Mycotoxin Excretion in Wheat Grains. *Molecules*. 26(6): 1784. <https://doi.org/10.3390/molecules26061784>

- Tjølsen, A., Berge, O.-G., Hunskar, S., Rosland, J. H., & Hole, K. (1992).** The formalin test: An evaluation of the method. *Pain*. 51(1): 5-17. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(92\)90003-t](https://doi.org/10.1016/0304-3959(92)90003-t)
- Toma, L., Sanda, G. M., Niculescu, L. S., Deleanu, M., Sima, A. V., & Stancu, C. S. (2020).** Phenolic compounds exerting lipid-regulatory, anti-inflammatory and epigenetic effects as complementary treatments in cardiovascular diseases. *Biomolecules*. 10(4): 641. <https://doi.org/10.3390/biom10040641>
- Topçu, G., Ay, M., Bilici, A., Sarıkürkcü, C., Öztürk, M., & Ulubelen, A. (2007).** A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food chemistry*. 103(3): 816-822. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.09.028>
- Trinder, P. (1969).** Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *Journal of Clinical Pathology*. 22(2): 158-161. <https://doi.org/10.1136/jcp.22.2.158>
- Trösken, E. R., Fischer, K., Völkel, W., & Lutz, W. K. (2006).** Inhibition of human CYP19 by azoles used as antifungal agents and aromatase inhibitors, using a new LC–MS/MS method for the analysis of estradiol product formation. *Toxicology*. 219(1-3): 33-40. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2005.10.020>
- Ucan Turkmen, F., Koyuncu, G., & Sarigullu Onalan, F. E. (2024).** Phenolic profile, fatty acid and mineral composition with antioxidant, antibacterial, and enzyme inhibitor activities of different extracts from *Erodium Cicutarium* (L.) L’Hér. Consumed as a vegetable in Kilis, Turkey. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 18(8): 6394-6405. <https://doi.org/10.1007/s11694-024-02657-w>
- Valadas, J., Mocelin, R., Sachett, A., Marcon, M., Zanette, R. A., Dallegrave, E., Herrmann, A. P., & Piato, A. (2019).** Propiconazole induces abnormal behavior and oxidative stress in zebrafish. *Environmental Science and Pollution Research*. 26(27): 27808-27815. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05977-3>
- Vargas, F., Romecín, P., García-Guillén, A. I., Wangesteen, R., Vargas-Tendero, P., Paredes, M. D., Atucha, N. M., & García-Estañ, J. (2018).** Flavonoids in Kidney Health and Disease. *Frontiers in Physiology*. 9: 394. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00394>
- Wang, R., Tan, X., Liu, Y., Fan, L., Yan, Q., Chen, C., Wang, W., Zhang, W., Ren, Z., Ning, X., Wei, S., Ku, T., & Sang, N. (2024).** Triazole fungicides disrupt embryonic stem cell differentiation: Potential modulatory role of the retinoic acid signaling pathway. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 283: 116859. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2024.116859>
- Waring, R. H., Mitchell, S. C., & Brown, I. (2023).** Agrochemicals in the Food Chain. In M. E. Knowles, L. E. Anelich, A. R. Boobis, & B. Popping (Éds.), *Present Knowledge in*

- Food Safety*. Academic Press: 44-61. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819470-6.00006-8>
- Wdowiak, N., Wójtowicz, K., Wdowiak-Filip, A., Pucek, W., Wróbel, A., Wróbel, J., & Wdowiak, A. (2024)**. Environmental Factors as the Main Hormonal Disruptors of Male Fertility. *Journal of Clinical Medicine*.13(7): 1986. <https://doi.org/10.3390/jcm13071986>
- Westwood, A. (1991)**. The Analysis of Bilirubin in Serum. *Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine*. 28(2): 119-130. <https://doi.org/10.1177/000456329102800202>
- Xia, L.-Z., Liu, L.-L., Yue, J.-Z., Lu, Z.-Y., Zheng, J., Jiang, M.-Z., Lin, M., Liu, J., & Gao, H.-T. (2024)**. Alleviative effect of quercetin against reproductive toxicity induced by chronic exposure to the mixture of phthalates in male rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 270: 115920. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.115920>
- Xie, W., Radomska-Pandya, A., Shi, Y., Simon, C. M., Nelson, M. C., Ong, E. S., Waxman, D. J., & Evans, R. M. (2001)**. An essential role for nuclear receptors SXR/PXR in detoxification of cholestatic bile acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 98(6): 3375-3380. <https://doi.org/10.1073/pnas.051014398>
- Xie, Y., Chang, J., Pan, Y., Hao, W., & Li, J. (2022)**. Effets toxicologiques de l'administration aiguë de prothioconazole et de prothioconazole-desthio sur le foie chez les lézards chinois mâles (*Eremias argus*). *Chemosphere*. 291: 132825. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132825>
- Xin, Y., Li, X., Ping, K., Xiang, Y., Li, M., Li, X., Yang, H., & Dong, J. (2024)**. Pesticide avermectin-induced hepatotoxicity and growth inhibition in carp: Ameliorative capacity and potential mechanisms of quercetin as a dietary additive. *Aquatic Toxicology*. 268: 106859. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2024.106859>
- Xu, Z., & Deng, M. (2017)**. Geraniaceae. In Z. Xu & M. Deng, *Identification and Control of Common Weeds*. 2: 629-637. https://doi.org/10.1007/978-94-024-1157-7_45
- Xue, Y. (2015)**. *Structure of pregnane X receptor in complex with a Sphingosine 1- Phosphate Receptor 1 Antagonist*. <https://www.rcsb.org/structure/5a86>
- Yadav, I. C., Devi, N. L., Syed, J. H., Cheng, Z., Li, J., Zhang, G., & Jones, K. C. (2015)**. Current status of persistent organic pesticides residues in air, water, and soil, and their possible effect on neighboring countries: A comprehensive review of India. *Science of the Total Environment*. 511: 123-137. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.12.041>
- Yahia, D., & Ali, M. F. (2019)**. Cytogenetic and genotoxic effects of penconazole and chlorpyrifos pesticides in bone marrow of rats. *Journal of Advanced Veterinary Research*. 9(2): 29-38. <http://orcid.org/0000-0001-6758-8265>

- Yan, L., Wang, J., Dai, D., Zhang, Y., Li, Y., & Xiao, W. (2024).** Testicular protective effects of hesperidin against chemical and biological toxicants. *Toxicology Research*. 13(3): tfae078. <https://doi.org/10.1093/toxres/tfae078>
- Yang, R. X., Hu, C. X., Mi, Y. Q., Sun, W. L., Chen, G. Y., Pan, Q., Shen, F., Xu, G. W., & Fan, J. G. (2017).** A serum lipidomic study of patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi = Zhonghua Ganzangbing Zazhi = Chinese Journal of Hepatology*. 25(2): 122-127. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1007-3418.2017.02.009>
- Yang, W., Tu, H., Tang, K., Huang, H., Ou, S., & Wu, J. (2021).** Reynoutrin Improves Ischemic Heart Failure in Rats Via Targeting S100A1. *Frontiers in Pharmacology*. 12: 703962. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.703962>
- Yefrida, Y., Suyani, H., Alif, A., Efdi, M., & Hermansyah, A. (2018).** Modification of phenanthroline method to determine antioxidant content in tropical fruits methanolic extract. *Research Journal of Chemistry and Environment*. 22: 28-35.
- Yu, L., Li, C., Zhang, Y., Guo, X., Cao, N., Guo, S., Wu, S., Li, X., & Pang, S. (2022).** Residue Monitoring of Propiconazole in the Rice–Crab Co-Culture Field and its Toxicity and Bioaccumulation to *Eriocheir sinensis*. *Frontiers in Environmental Science*. 10: 848348. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2022.848348>
- Yüksel, T. N., Bozgeyik, E., & Yayla, M. (2022).** The effect of quercetin and quercetin-3-d-xyloside on breast cancer proliferation and migration. *Journal of Basic and Clinical Health Sciences*. 6(2): 569-578. <https://doi.org/10.30621/jbachs.1056769>
- Zainal, W. N. H. W., Azian, N. A. A. M., Albar, S. S., & Rusli, A. S. (2022).** Effects of extraction method, solvent and time on the bioactive compounds and antioxidant activity of *Tetrigona apicalis* Malaysian propolis. *Journal of Apicultural Research*. 61(2): 264-270. <https://doi.org/10.1080/00218839.2021.1930958>
- Zebeaman, M., Tadesse, M. G., Bachheti, R. K., Bachheti, A., Gebeyhu, R., & Chaubey, K. K. (2023).** Plants and Plant-Derived Molecules as Natural Immunomodulators. *BioMed Research International*. 2023(1): 7711297. <https://doi.org/10.1155/2023/7711297>
- Zeng, X., Du, Z., Ding, X., & Jiang, W. (2021).** Protective effects of dietary flavonoids against pesticide-induced toxicity: A review. *Trends in Food Science & Technology*. 109: 271-279. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.046>
- Zengin, G., Sarikurkcü, C., Aktumsek, A., Ceylan, R., & Ceylan, O. (2014).** A comprehensive study on phytochemical characterization of *Haplophyllum myrtifolium* Boiss. Endemic to Turkey and its inhibitory potential against key enzymes involved in Alzheimer, skin diseases and type II diabetes. *Industrial Crops and Products*. 53: 244-251. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.12.043>

Zerdoug, A., Le Vée, M., Le Mentec, H., Carteret, J., Jouan, E., Jamin, A., Lopez, B., Uehara, S., Higuchi, Y., & Yoneda, N. (2024). Induction of drug metabolizing enzyme and drug transporter expression by antifungal triazole pesticides in human HepaSH hepatocytes. *Chemosphere*. 366: 143474. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.143474>

Zheng, X., Wei, Y., Chen, J., Wang, X., Li, D., Yu, C., Hong, Y., Shen, L., Long, C., & Wei, G. (2023). Difenconazole exposure induces retinoic acid signaling dysregulation and testicular injury in mice testes. *Toxics*. 11(4): 328. <https://doi.org/10.3390/toxics11040328>

Zhong, J., Wang, Y., Li, C., Yu, Q., Xie, J., Dong, R., Xie, Y., Li, B., Tian, J., & Chen, Y. (2022). Natural variation on free, esterified, glycosylated and insoluble-bound phenolics of *Rubus chingii* Hu: Correlation between phenolic constituents and antioxidant activities. *Food Research International*. 162: 112043. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112043>

Références du site web :

AghazeTaleem (2021). Best antifungal drugs. Azole, triazole, polyene. <https://aghazetaleem.com/best-antifungal-drugs-azole-triazole-polyene/>

Bienvenue sur le Guide des plantations ! (2017, septembre 26). <https://guidedesplantations.fr/>

ECHA, 2015. Regulation (EU) No 528/2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products. - Recherche Google.

Report of the Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues (JMPR) 2004—Google Search. (s. d.).

Schrödinger, 2 (2015) LigPrep, Version 3.4, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015. - Google Search. (2015).

Productions scientifiques

Phytochemical profile by LC-MS/MS, total phenolic content and antioxidant properties of *Erodium guttatum* from Algeria

Ismahan Ounissi¹, Souheila Slimani ^{1*}, Jihane Bounaas ¹, Chawki Bensouici², Badis Aouzel ¹, and Anissa Bouacha¹

¹Research Laboratory of Interaction, Biodiversity, Ecosystems and Biotechnology, Faculty of Sciences, University 20 August 1955 Skikda, Algeria

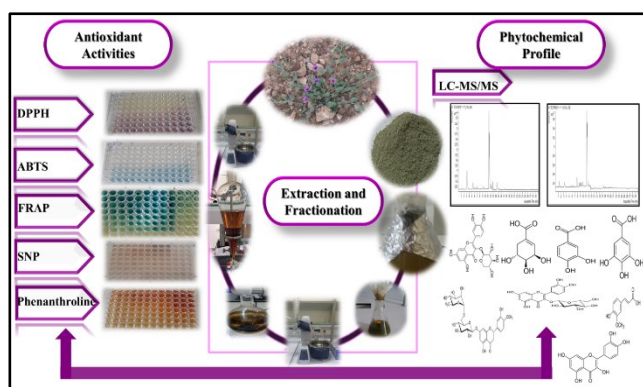
²Biotechnology Research Center (CRBT), Ali Mendjli New Town UV 03, B.P E73, Constantine 25016, Algeria.

Received: 16/07/2024, Accepted: 17/09/2024, Available online: 08/10/2024

*to whom all correspondence should be addressed: e-mail: shsouheila@yahoo.fr

<https://doi.org/10.30955/gnj.06464>

Graphical abstract



Abstract

The present study aimed to evaluate the phytochemical composition and the antioxidant potential of the crude extract and its various fractions which are n-hexane, chloroform, ethyl acetate, and n-butanol of the aerial part of *Erodium guttatum* (*E. guttatum*). Total flavonoid and phenolic content have been estimated using the trichloroaluminum colorimetric and Folin-Ciocalteu method. The phytochemical profile was investigated in various polar (ethyl acetate) and nonpolar (chloroform) fractions, using LC-MS/MS technique. The antioxidant activities were also assessed using in vitro assays such as the DPPH, ABTS, FRAP, SNP and Phenanthroline. The obtained results showed that the ethyl acetate fraction had the highest phenolic and flavonoid content ($332.76 \pm 1.10 \mu\text{g GAE/mg}$ and $192.07 \pm 1.26 \mu\text{g QE/mg}$), respectively. Moreover, LC-MS/MS analysis of the chloroform and ethyl acetate fractions revealed the presence of 16 and 14 compounds, respectively, the main compounds in the chloroform fraction being shikimic acid (13.708 mg/g), hesperidin (0.356 mg/g), isoquercitrin (0.282 mg/g), and in the ethyl acetate fraction, shikimic acid (3.989 mg/g), quercetin 3-xyloside (2.082 mg/g), and gallic acid (0.881 mg/g). The Antioxidant studies revealed that the ethyl acetate fraction exhibited significantly superior activity with IC_{50} of $2.37 \pm 0.02 \mu\text{g/ml}$ and

$1.49 \pm 0.02 \mu\text{g/ml}$ against DPPH and ABTS radicals, respectively. Additionally, the fraction showed $\text{A}_{0.5}$ values of $2.98 \pm 0.07 \mu\text{g/ml}$, $3.62 \pm 0.15 \mu\text{g/ml}$, and $1.23 \pm 0.01 \mu\text{g/ml}$ against FRAP, SNP and Phenanthroline, respectively. *E. guttatum* may serve as a promising resource for antioxidants, warranting further exploration of its potential in medicine or as a dietary supplement due to its components with potential pharmacological benefits.

Keywords: *E. guttatum*, crude, fractions; poly phenols, LC-MS-MS, antioxidant activities

1. Introduction

For a long time, people have used plants to treat various illnesses. Actually, these traditional medicines are used in the pharmaceutical industry to search a novel chemical compounds produced from plants (Salmerón-Manzano *et al.*, 2020; Eshete and Molla, 2021).

Plants, in general, are a suitable source for producing a wide range of natural antioxidants, so they provide an effective defense against oxidative stress through their secondary metabolites, particularly phenolic and flavonoid components (Amzad Hossain & Shah, 2015). Natural antioxidants are receiving increasing attention as they play a protective role in food and pharmaceutical products by preventing or delaying toxic oxidation reactions and neutralising free radicals, thereby maintaining their quality and extending their shelf life. In addition, they delay or prevent the negative effects of oxidative stress associated with several diseases such as cancer, cardiovascular disease, inflammation, and neurodegenerative diseases (Gulcin, 2020; Khiya *et al.*, 2021). Due to their unique chemical structures characterised by aromatic properties, highly compatible systems, and numerous hydroxyl groups; polyphenols act as effective electron and hydrogen atom donors (Sequeira & Poppitt, 2017). This enables them to combat free radicals and other reactive oxygen species (ROS) (Rudrapal *et al.*, 2022). More than 3,000 species of plants are inventoried in Algeria. This abundance is a result of the country's climate variability and its strategic geographical location in the Southern Mediterranean Basin (Benarba *et*

al., 2015; Miara *et al.*, 2018) making it an important center for plant biodiversity (Naili *et al.*, 2010). *Erodium*, belonging to the Geraniaceae family, with over 63 species, are particularly prevalent in Mediterranean regions (Fiz *et al.*, 2006). *Erodium* is used in traditional medicine to treat a wide range of health problems such as gastrointestinal disorders, urinary inflammations, diabetes, circulatory system disorders, blood pressure disorders, pneumonia, constipation, and hemorrhage, effective for healing wounds, burns, and coughs, as well as relieving various skin conditions such as eczema (Munekata *et al.*, 2019). The diverse uses of this plant genus are linked to the richness of its phytochemical compounds, which has led to a focus of research on analysing their biochemical composition, paving the way for the discovery of new bioactive compounds, Jin *et al.* (2020); Bilić *et al.* (2020) and Samet *et al.* (2022) have documented the presence of various phenolic constituents in numerous *Erodium* species. These include hydroxycinnamic acids, such as ferulic acid, p-coumaric acid, rosmarinic acid, and caffeic acid, as well as hydroxybenzoic acids, including gallic acid, protocatechuic acid, gentisic acid, vanillic acid, p-hydroxybenzoic acid, and salicylic acid. Additionally, these studies have identified also the flavonoids such as flavonol glycosides (isoquercitrin, rutin, hyperoside) and flavonol aglycones (quercetin, kaempferol, isorhamnetin), flavones (luteolin and its derivatives), along with tannins such as catechin, gallotannins (Methyl gallate 3-O- β -D-glucopyranoside, (-) 3-O-Galloylshikimic acid), ellagitannins (geraniin, corilagin), and brevifolin and its derivatives.

Erodium guttatum (Desf) Willd is a seasonal plant that grows in the Mediterranean region throughout North Africa, Palestine, and southern Spain (Mrabti *et al.*, 2021). Traditionally, it has long been used in Algeria to treat gastrointestinal disorders (Abdelkrim *et al.*, 2006). There is little information in the literature on the composition and pharmacological properties of this species. A study conducted by Mrabti *et al.* (2021) revealed by phytochemical screening that this species, collected in Morocco, contains phenolic compounds, notably a dominance of flavonoids, followed by tannins and anthraquinones, and Significant levels of polyphenols and flavonoids were observed, and a wide range of mineral elements was determined by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES), additionally, considerable antioxidant activity was noted. A correlation between the chemical contents and biological activities of this species and others collected in Tunisia was established by Hamza *et al.* (2018).

Our study focuses on the plant *Erodium guttatum* harvested in the northeastern region of Batna, known as "Hchichet kol Bliá". The main objective of this research is to highlight the quantitative characteristics, specifically the total quantity of phenol and flavonoids, Furthermore, investigate the antioxidant capacity of crude extract and their fractions of the aerial part from the plant through five tests (DPPH, ABTS, FRAP, SNP, and Phenanthroline), and this is the first study of this species conduct chemical

analysis using LC-MS/MS on diverse, polar and nonpolar fractions of the aerial portion of the plant to enhance scientific knowledge about this botanical species.

2. Materials and methods

2.1. Sample collection

The fresh aerial parts (leaves, stems and flowers) of *Erodium guttatum* growing in the wild were collected in April 2021 from Batna; a region located in the northeast of Algeria (35°44'27.2"N 6°38'15.4" E). The plant was identified by Pr Sakhraoui Nora, a botanist in the Department of Natural and Life sciences at Skikda University. Samples were gently cleaned, dried in the dark and powdered.

2.2. Extraction and fractionation

Two hundred (200) g of powder were used for extraction by an ultrasound-assisted extraction technique. The extraction process was carried out using an ultrasound probe (vibracell 75186 sonicator) with the determination of solvent concentration (70%), sonication time (30min) and amplitude (70%). The solvent was evaporated using a rotary evaporator (37°C) to yield a crude extract, which was dissolved in 200 mL of distilled water and partitioned successively with n-hexane, chloroform (CHCl₃), ethyl acetate (EtOAc), and n-butanol (n-BuOH). Finally, the organic solvents were evaporated, and the residues were stored until used for biological and phytochemical tests.

2.3. Determination of total phenolic content (TPC)

To determine the total phenolic content (TPC) of the crude extract and the four fractions, a spectrophotometric method using the Folin-Ciocalteu reagent was employed (Müller *et al.*, 2010). Gallic acid was used as a reference standard to construct the calibration curve. Briefly, 20 μ L volume of plant extract/ fraction was combined with 100 μ L of Folin-Ciocalteu reagent (1:10), neutralised with 75 μ L of sodium carbonate solution (7.5%, w/v) each added to a 96-well microplate. A blank was prepared in the same way, replacing the extract with the solvent used (methanol). The reaction mixture was kept in the dark at room temperature for 2 h, followed by a reading at 765 nm. TPC were determined using a linear regression equation derived from the gallic acid standard curve. Total phenolic content was calculated as the mean \pm SD (n = 3) and expressed as μ g gallic acid equivalent per mg of extract.

2.4. Determination of flavonoid content (TFC)

The TFC of the various samples was determined using the microplate test reported by Topçu *et al.* (2007) With a slight modification. The creation of a complex between flavonoids and Al³⁺ is essential to the process. 50 μ L of extract solution (1 mg/mL), 130 μ L of methanol, 10 μ L of aluminum nitrate (10%) and finally 10 μ L of potassium acetate (1M) was added to each well, similarly, a blank was produced by replacing the extract with the solvent used, then the plate was kept incubating for 40 minutes followed by a reading at 765 nm. TFC were determined using a linear regression equation derived from the quercetin standard curve. Total flavonoid content was

calculated as the mean \pm SD (n = 3) and expressed as μg of quercetin equivalent per mg of extract.

2.5. Liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry analysis LC-ESI-MS/MS analysis

The chloroform and ethyl acetate fractions of the aerial part of *E. guttatum* were subjected to LC-ESI-MS/MS analysis after preparation according to the method described by Erenler *et al.* (2023) An Agilent Technologies 1260 Infinity II, 6460 Triple Quad Mass spectrometer with positive and negative electrospray ionization (ESI) mode were used. The chromatographic separation was performed using the Poroshell 120 SB-C18 column (3.0 \times 100 mm, I.D., 2.7 μm) column oven, with a binary solvent system water (A) and methanol (B), both consisting of 0.1% formic acid and 5 mM ammonium formate for the mobile phase. The gradient program was adjusted as: (75% A-25% B) at 3 min, (50% A-50% B) at 12 min, (10% A-90% B) at 16 min, (10% A-90% B) at 21 min and (97.5% A-2.5% B) at 24 min. The injection volume was 5.12 μL , and the flow rate was calibrated at 0.40 mL/min. The conditions adopted are as follows: The column temperature was 40°C, the drying and nebulizing flow of nitrogen gas was 08 L/min, and the pressure was 15 psi, in addition to the capillary voltage and temperature, which were fixed at 4000 V and 350 °C, respectively. All standards used in this analysis are presented in Table 2.

2.6. Evaluation of antioxidant capacity

2.6.1. DPPH free radical-scavenging assay

The DPPH (1, 1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl) assay for free radical scavenging (Blois, 1958) with some modifications was performed. 40 μL of extracts or standards (Ascorbic acid, BHA, BHT and Trolox) at several concentrations were combined with 160 μL of DPPH solution in methanol. After that, the mixture was incubated in the dark at room temperature for 30 min. Methanol was used as a control. The absorbance was measured at 517 nm using a 96-well microplate reader.

Lower absorbance of the reaction mixture indicates a Greater scavenging action of free radicals DPPH and the percentage of scavenging activity of the crude extract and its fractions on DPPH radical was determined by applying the following equation:

$$\text{The \% inhibition of DPPH} = [(A_0 - A_s) / A_0] \times 100$$

A_0 represents the control's absorption and A_s the tested extract solution's absorption.

The concentration required for the sample to scavenge 50% of the initial DPPH free radicals is indicated by the IC_{50} value. And was employed to contrast the antioxidant extracts' quality.

2.6.2. ABTS scavenging assay

ABTS [2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)]: With a few adjustments, this test was carried out using the Re *et al.* (1999) procedure.

Equal parts of an aqueous ABTS (7 mM) and potassium persulfate (2.45 mM) solution were reacted to create the ABTS stock solution. The mixture was allowed to sit in the dark for 16 hours before being used.

diluted stock solution in methanol, the ABTS working solution was prepared, with an absorbance of 0.70 at 734 nm. 160 μL of the ABTS solution was then combined with 40 μL of extracts at varying concentrations. The combinations were incubated in the dark for 10 min. at room temperature. Methanol was used as a control. Ascorbic acid, BHA, BHT and Trolox were used as standards.

Absorbance was measured at 734 nm using a 96-well microplate reader. ABTS scavenging ability was expressed as IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$) and the following formula was used to determine the percentage of inhibition (I%) associated with each extract's trapping activity on ABTS.

$$\text{The \% inhibition of ABTS} = [(A_0 - A_s) / A_0] \times 100.$$

A_0 represents the control's absorption and A_s the tested extract solution's absorption.

2.6.3. Ferric reducing antioxidant power assay (FRAP)

the methodology of (Oyaizu, 1986) was followed to determine the reducing power activity, with minor adjustments to accommodate the microplate reader. In brief, 10 μL of the different concentrations of crude extract and its fractions were combined with 40 μL of phosphate buffer (0,2 M, pH 6,6) and 50 μL of potassium ferricyanide (1%), and the plate was incubated for 20 min at 50°C. Subsequently, 10% trichloroacetic acid (50 μL), distilled H₂O (40 μL), and 0.1% ferric chloride FeCl₃ (10 μL) were added. After reading the absorptions at 700 nm, the concentration corresponding to the absorption at 0.50 nm was estimated as $A_{0.5}$ ($\mu\text{g}/\text{mL}$). The reducing power of the different extracts was contrasted with the standard (Ascorbic acid, BHA and BHT).

2.6.4. Silver nanoparticle assay (SNP)

According to the protocol described by Özyürek *et al.* (2012), the antioxidant capacity of the crude extract/plant fractions was assessed using the silver ion (Ag⁺) reduction method. To create spherical silver nanoparticles, 50 ml of silver nitrate (AgNO₃ (1.0 mM)) was heated for 10 minutes. Next, 5 ml of trisodium citrate (1%) was added dropwise until a pale-yellow colour was obtained. The mixture was then allowed to cool at room temperature. Approximately 130 ml of SNP solution and 50 ml of distilled water were added to 20 μL of different doses of plant extract/fractions dissolved in methanol, and after incubation at 25°C for 30 min, the absorbance was measured at 423 nm.

The concentration that corresponded to the absorption at 0.50 nm was estimated as $A_{0.5}$ ($\mu\text{g}/\text{mL}$), and the results were compared to those of Ascorbic acid and Trolox.

2.6.5. Phenanthroline assay

The phenanthroline activity was performed using Szydłowska-Czerniak *et al.* (2008) protocol. 10 μL of each sample at varying concentrations, 50 μL of ferric chloride FeCl₃ (0.2%), 30 μL of phenanthroline (0.5%) solution, and 110 μL of methanol, were combined. The resulting mixtures were incubated at 30 °C for 20 minutes. The results were compared to the antioxidants standard Trolox and Ascorbic acid and were expressed as

absorbance $A_{0.5}$ $\mu\text{g/mL}$, which indicated the concentration producing 0.5 absorbance. The absorbance was measured at 510 nm using a 96-well microplate reader.

2.7. Statistical analysis

All experiments were performed in triplicate and results were presented as mean value \pm SD, and IBM SPSS Statistics, version 25, one-way ANOVA was used to analyze the data and find significant differences at $p < 0.05$. The Tukey test was then performed. The correlation between total phenolic content and antioxidant activities was ascertained using Pearson's correlation coefficient (r).

3. Results and discussion

3.1. Extraction

The yields obtained from various polar and nonpolar fractions derived from 69.69 g (34.84%) of the crude methanolic extract of *E. guttatum*'s aerial parts (**Table 1**) exhibited a wide range, spanning from 1.02% to 15.85%, with the n-butanol fraction yielding the highest at 15.85%, succeeded by the ethyl acetate 11.42% then the chloroform fraction 1.37%. In contrast, the n-hexane fraction yielded the lowest 1.02%. Our results can be attributed to a clear correlation between solvent polarity and extraction yield due to the increased solubility of chemical compounds, particularly phenolic compounds in polar solvents compared to nonpolar solvents. (Do *et al.*, 2014; Alara *et al.*, 2021).

3.2. Total phenolic and flavonoid content

Table 1. Yield, TPC and TFC Values of crude Extract and its fractions from *E. guttatum*

Extracts and fractions	Yield (%)	TPC ($\mu\text{g GAE/mg}$)	TFC ($\mu\text{g QE/mg}$)
Crude extract	34.84	310.97 ± 3.94^c	71.32 ± 1.67^b
n-BuOH	15.85	324.52 ± 0.34^d	93.67 ± 1.4^c
EtOAc	11.42	332.76 ± 1.10^e	192.07 ± 1.26^d
CHCl ₃	1.37	121.74 ± 0.13^b	3.01 ± 0.13^a
n-hexane	1.02	21.38 ± 0.38^a	1.22 ± 0.8^a

Data are expressed as mean \pm S.D. ($n = 3$); ($\mu\text{g GAE/mg}$): μg of gallic acid equivalent per mg of plant extract; ($\mu\text{g QE/mg}$): μg of quercetin equivalent per mg of plant extract. The values with different superscripts (a, b, c, d, e) in the same columns are significantly different ($p < 0.05$).

3.3. Phytochemical profile by LC-MS/MS

The different components present in the aerial part of the *E. guttatum* plant after using 40 standards provided quantification data comprehensively presented in Table 2.

The polar and nonpolar fractions showed a similar profile in terms of phytoconstituents. The LC-MS/MS methods identified 16 components in the chloroform fraction and 14 components in the ethyl acetate fraction: hydroxybenzoic acid derivatives (shikimic acid, gallic acid, protocatechuic acid and salicylic acid), cinnamic acid derivatives (o-coumaric acid, trans-ferulic acid and chlorogenic acid), flavonols (quercetin), flavonol glycosides (quercetin 3-xyloside, Kaempferol-3-glucoside and isoquercitrin), flavanones (hesperidin), flavones (luteolin), phenolic aldehydes (vanillin and hydroxybenzaldehyde), ester-bound phenolic acids

(Protocatechuic ethyl ester), and finally an alkaloid (capsaicin). Notably, vanillin, Protocatechuic ethyl ester, and Capsaicin, which were absent in the ethyl acetate fraction and present in the chloroform fraction, and Kaempferol-3-glucoside was present in the ethyl acetate fraction, but not in the chloroform fraction. Additionally, there were variations in the concentration of the components between the fractions.

The total phenolic content (TPC) and the total flavonoid content (TFC) in the crude extract and selected fractions (n-hexane, chloroform, ethyl acetate, n-butanol) of *E. guttatum* are shown in Table 1. The results indicated a wide and significant TPC variation ranging from 21.38 to 332.76 $\mu\text{g GAE /mg}$ extract. The ethyl acetate fraction showed the highest TPC ($332.76 \pm 1.10 \mu\text{g GAE /mg}$), followed by the n-butanol fraction ($324.52 \pm 0.34 \mu\text{g GAE /mg}$) then the crude extract ($310.97 \pm 3.94 \mu\text{g GAE /mg}$) after that the chloroform fraction ($121.74 \pm 0.13 \mu\text{g GAE /mg}$). In contrast, the n-hexane fraction had the lowest total phenol content ($21.38 \pm 0.38 \mu\text{g GAE /mg}$). The results demonstrated that the TFC varied also significantly from 1.22 to 192.07 $\mu\text{g QE/mg}$ extract. The maximum amount found in the ethyl acetate fraction ($192.07 \pm 1.26 \mu\text{g QE/mg}$ extract).

To our knowledge, no studies have been conducted on this plant using fractional extraction of the crude hydroalcoholic extract, so we only compared the crude extract. Therefore, our results are close to those of (Mrabti *et al.*, 2021) where the TPC and TFC values of the crude extract from *E. guttatum* of Moroccan origin were $279.71 \pm 0.31 \text{ mg GAE/g}$ extract and $118.58 \pm 0.14 \text{ mg QE/g}$ extract, respectively. Similarly, our results were better than those reported by (Hamza *et al.*, 2018) where TPC and TFC values for the crude extract of *E. guttatum* from Tunisian origin as $124 \pm 6 \text{ mg GAE/g}$ extract and $52 \pm 2.3 \text{ mg QE/g}$ extract, respectively.

(Protocatechuic ethyl ester), and finally an alkaloid (capsaicin). Notably, vanillin, Protocatechuic ethyl ester, and Capsaicin, which were absent in the ethyl acetate fraction and present in the chloroform fraction, and Kaempferol-3-glucoside was present in the ethyl acetate fraction, but not in the chloroform fraction. Additionally, there were variations in the concentration of the components between the fractions.

In the ethyl acetate fraction, compounds with the highest quantitative abundance were shikimic acid (3.989 mg/g), quercetin 3-xyloside (2.082 mg/g), gallic acid (0.881 mg/g), and isoquercitrin (0.704 mg/g). Conversely, hydroxybenzaldehyde (0.004 mg/g) was present in the lowest amounts. However, in the chloroform fraction, the phenolic components with the highest quantitative presence were shikimic acid (13.708 mg/g), hesperidin (0.356 mg/g), isoquercitrin (0.282 mg/g), and trans-ferulic acid (0.179 mg/g). capsaicin (0.00008 mg/g) was identified as the least abundant in this fraction.

Both fractions contain a significant amount of shikimic acid, which agrees with (Ljoljić Bilić *et al.*, 2022). Recent

investigations have extensively examined the biological activities in both in vitro and in vivo settings and proved the anti-inflammatory, antiviral, antibacterial, hypolipidemic, skin, bone, and neuroprotective effects, as well as antidiabetic and antioxidant effects of shikimic acid (Gandhi *et al.*, 2023). Our results showed that gallic acid emerged as one of the most prevalent constituents in *guttatum* species, evident in polar fractions, Bilić *et al.* (2020) observed similar results. They identified gallic acid as a predominant component in *E. cicutarium*, with concentrations ranging from 0.679 to 2.310 mg/g in aqueous and methanolic extracts from four Croatian sites. They also, found that, of the 85 chemicals identified, the majority (24 of them) were gallic acid derivatives. Additionally, Cüce *et al.* (2022) have reported that gallic acid was one of the main phenolic acids present in *E. hendrikii* in glycoside (2450.51 nmol/g) or ester-bound form (527.05 nmol/g). Moreover, gallic acid has been shown to have a variety of positive effects, including anti-inflammatory, anti-cancer, antioxidant, antibacterial, cardioprotective, neuroprotective, and gastroprotective properties (Fernandes *et al.*, 2022). Our extracts contain other phenolic acids at considerable concentrations such as Protocatechuic acid, o-coumaric acid, Salicylic Acid, and Trans-ferulic acid. These findings are confirmed by (Bakari *et al.*, 2018) and (Cüce *et al.*, 2022). Although, certain phenolic acids are absent in our extracts like caffeic acid which was present in the hydroalcoholic extracts of flowers and leaves of the plant *E. glaucophyllum* (Bakari *et al.*, 2018), and in the aqueous and methanolic extracts of *E. cicutarium* collected from four sites in Croatia (Bilić *et al.*, 2020), whereas Cüce *et al.* (2022) found that the most abundant phenolic acid in the crude extract of *E. hundrikii* was caffeic acid. On the other hand, Quercetin-3-d-xyloside, also known as reynoutrin, emerged as the predominant flavonoid in the aerial part of our plant within the polar fraction. This natural flavonoid was commonly found in the fruits and leaves of various plants, but its presence in the genus *Erodium* has yet to be identified. Despite, (Bilić *et al.*, 2020) had expanding knowledge by identifying eight glycoside derivatives of quercitrin in *E. cicutarium* and research indicates that reynoutrin exhibits antioxidant properties and may possess antiviral (Rehman *et al.*, 2018; Butkevičiūtė *et al.*, 2020). Many studies also have reported that reynoutrin significantly improved cardiac function suppressed the death of cardiomyocytes, reduced the release of inflammatory agents, lowered oxidative stress, and lessened myocardial fibrosis (Yang *et al.*, 2021) and prevented the induction of breast cancer from progressing (Yüksel *et al.*, 2022). Our extract contains Hesperidin which, was the most prevalent flavonoid in the nonpolar portion (0.356 mg/g). These findings are consistent with those of Cüce *et al.* (2022) who also noted that the primary flavonoid in the crude extract is hesperidin in *E. hundriiki*, and according to research, hesperidin has a wide range of biological properties, including the potential to prevent diabetes, cancer, hyperlipidemia, ulcers, atherosclerosis and liver protection. It may also possess anti-inflammatory, antimicrobial, antifungal, antioxidant,

antihypertensive and antiallergic effects (Li *et al.*, 2018). Furthermore, there are other flavonoids present in the aerial part of *E. guttatum*, which are known by their biological effects such as quercetin, isoquercitrin, and luteolin, and they have been confirmed by Çelikler Özer *et al.* (2020) and Berber *et al.* (2022). Rutin is recognized as one of the best natural antioxidants in its class and is renowned for its diverse pharmacological activities, including anti-inflammatory, antibacterial, antiviral, antiprotozoal, antitumoral, cytoprotective, antiplatelet, vasoactive, antihypertensive, antispasmodic, hypolipidemic and antiallergenic properties (Patel & Patel, 2019). While it is absent from the aerial part of the *E. guttatum* plant, it is present in various species belonging to the *E. genus*, such as *E. glaucophyllum*, *E. cicutarium*, *E. arborescens*, *E. chium*, *E. crassifolium*, *E. laciniatum*, *E. malacoides*, *E. moschatum*, *E. neuradifolium*, *E. oxyrrhynchum*, *E. pulverulentum*, *E. touchyanum* (Saleh *et al.*, 1983; Çelikler Özer *et al.*, 2020). Generally, The variations in the presence, absence, or concentration of different phenolic compounds observed in various studies can be due to several possible reasons including plant species, growth conditions, extraction technique, chromatography type, measurement, and susceptibilities to degradation (Pająk *et al.*, 2014).

Table 2. Phytochemical profile determined by LC-MS-MS of CHCl₃ and EtOAc fractions of *E. guttatum*

N°	Analyte	RT	Concentration mg/g		Ion Source	Ion Transitions	Ion Mode	R2	LOQ (ug/L)	LOD (ug/L)	Linearity Range (ug/L)
			CHCl ₃	EtOAc							
1	Shikimic acid	1.336	13.708	3.989	ESI	173.0 -> 93.1	Negative	0.9992	78.7970	20.3983	75-4800
2	Gallic acid	3.166	0.098	0.881	ESI	169.0 -> 125.1	Negative	0.9986	18.5862	7.1674	31.25-500
3	Protocatechuic acid	5.467	0.024	0.154	ESI	153.0 -> 109.0	Negative	0.9969	13.1729	3.1564	15.625-250
4	Epigallocatechin	6.870	ND	ND	ESI	307.0 -> 139.0	Positive	0.9995	3.8750	2.0903	12.5-200
5	Catechin	6.935	ND	ND	ESI	288.9 -> 245.1	Negative	0.9946	7.5013	1.7055	343.750-5500
6	Chlorogenic acid	7.467	0.013	0.010	ESI	353.0 -> 191.0	Negative	0.9981	25.9023	11.5890	31.25-500
7	Hydroxybenzaldehyde	7.783	0.043	0.004	ESI	121.0 -> 92.0	Negative	0.9993	12.8651	4.9742	15.625-250
8	Vanillic acid	7.852	ND	ND	ESI	167.0 -> 151.8	Negative	0.9958	1424.2132	219.0421	1250-20000
10	vanillin	8.662	0.014	ND	ESI	153.0 -> 125.0	Positive	0.9949	40.5411	14.5885	62.5-1000
11	Syringic acid	8.437	ND	ND	ESI	197.1 -> 181.8	Negative	0.9990	857.3388	358.5000	1250-20000
12	Caffeic Acid	7.847	ND	ND	ESI	178.9 -> 135.1	Negative	0.9994	24.1620	6.9205	31.25-500
13	Caffeine	8.419	ND	ND	ESI	195.0 -> 137.9	Positive	0.9986	15.4959	6.8099	18.75-300
14	o-coumaric acid	9.315	0.014	0.015	ESI	163.0 -> 119.1	Negative	0.9996	7.9973	4.0164	15.625-500
15	Salicylic acid	9.769	0.078	0.042	ESI	137.0 -> 93.1	Negative	0.9981	82.9646	47.6695	112.5-1800
16	Taxifolin	9.733	ND	ND	ESI	304.8 -> 258.9	Positive	0.9938	23.5110	11.0294	37.5-600
17	Resveratrol	9.772	ND	ND	ESI	229.0 -> 107.0	Positive	0.9910	13.5575	4.5806	18.75-300
18	Polydatine	9.615	ND	ND	ESI	390.9 -> 228.9	Positive	0.9987	1.8411	1.1471	7.8125-125
19	trans-ferulic acid	9.986	0.179	0.036	ESI	193.1 -> 133.9	Negative	0.9950	11.5276	6.1184	31.25-1000
20	Sinapic acid	10.335	ND	ND	ESI	223.1 -> 208.0	Negative	0.9972	4.9652	1.9437	125-2000
21	Scutellarin	11.054	ND	ND	ESI	462.8 -> 286.8	Positive	0.9978	4.0013	3.1346	9.375-300
22	p-coumaric acid	11.536	ND	ND	ESI	163.0 -> 119.0	Negative	0.9987	1.5416	3.5348	31.25-500
23	Protocatechuic ethyl ester	11.410	0.007	ND	ESI	181.0 -> 107.9	Negative	0.9996	24.9201	14.5610	15.625-1000
24	Hesperidin	11.320	0.356	0.176	ESI	611.0 -> 302.9	Positive	0.9957	17.6753	4.1396	31.25-500
25	Isoquercitrin	11.398	0.282	0.704	ESI	464.9 -> 302.8	Positive	0.9982	11.2680	9.9382	18.75-300
26	Rutin	12.336	ND	ND	ESI	611.0 -> 302.8	Positive	0.9980	240.6720	59.5597	125-2000
27	Quercetin-3-xyloside	12.105	0.156	2.082	ESI	432.7 -> 299.5	Negative	0.9900	69.4059	18.7126	125-2000
28	Kaempferol-3-glucoside	12.845	ND	0.027	ESI	448.8 -> 286.9	Positive	0.9997	4.5238	1.1609	7.8125-125
29	quercetin	14.417	0.020	0.149	ESI	300.8 -> 151.0	Negative	0.9964	16.9127	4.6558	27.5-440
30	Fisetin	13.150	ND	ND	ESI	287.0 -> 137.0	Positive	0.9954	44.3662	10.8961	15.625-250
31	Baicalin	17.143	ND	ND	ESI	446.8 -> 270.9	Positive	0.9991	3.0988	0.5276	15.625-250
32	Chrysin	14.524	ND	ND	ESI	254.9 -> 153.0	Positive	0.9989	0.1338	0.0737	1.5625-25
33	trans-cinnamic acid	14.331	ND	ND	ESI	149.0 -> 131.1	Positive	0.9999	22.0279	11.1853	31.25-500
34	Morin	15.828	ND	ND	ESI	302.8 -> 153.0	Positive	0.9981	0.5284	0.1253	1.5625-50
35	Baicalein	17.025	ND	ND	ESI	271.0 -> 123.0	Positive	0.9988	0.9631	0.5955	1.5625-25
36	Luteolin	17.421	0.049	0.067	ESI	285.0 -> 133.1	Positive	0.9962	21.4535	20.0000	31.25-500

37	Biochanin A	17.918	ND	ND	ESI	284.9 -> 151.9	Positive	0.9963	0.7333	0.1475	1.5625-25
38	Daidzein	14.187	ND	ND	ESI	254.9 -> 128.0	Positive	0.995	420	140	530-26500
39	Capsaicin	18.043	0.00008	ND	ESI	306.1-> 137.0	Positive	0.998	172	86	9700-97000
40	Diosgenin	23.54	ND	ND	ESI	415.0-> 271.0	Positive	0.996	1000	330	10000-60000

Rt: Retention time, LOQ: Limit of quantification, LOD: Limit of detection, ND: Not detected.

Table 3. Antioxidant activity of crude extract and its fractions of *Erodium guttatum* by DPPH, ABTS, reducing power, phenanthroline, and silver nanoparticle (SNP) assays

Extracts and fractions	DPPH IC ₅₀ (µg/ml)	ABTS IC ₅₀ (µg/ml)	RP A _{0.5} (µg/ml)	SNP A _{0.5} (µg/ml)	Phenanthroline A _{0.5} (µg/ml)
Crude extract	3.74 ±0.03 ^b	1.60±0.02 ^a	9.53±0.07 ^c	11.26±0.24 ^c	2.21±0.04 ^b
n-BuOH	4.84±0.06 ^c	1.65±0.01 ^a	5.04±0.01 ^b	6.30±0.19 ^b	1.41±0.11 ^a
EtOAc	2.37±0.02 ^a	1.49±0.02 ^a	2.98±0.07 ^a	3.62±0.15 ^a	1.23±0.01 ^a
CHCL ₃	32.29±0.03 ^f	6.89±0.02 ^c	11.58 ± 0.22 ^d	37.96±0.14 ^e	3.86± 0.01 ^d
n-hexane	37.99±0.24 ^g	9.81±0.02 ^e	15.93 ± 0.62 ^e	20.32±0.09 ^d	7.78±0.03 ^f
BHA	15.74±0.47 ^e	7.54±0.67 ^d	8.41±0.67 ^c	NT	NT
BHT	6.55±0.59 ^d	1.55±0.26 ^a	>50 ^f	NT	NT
Ascorbic acid	4.39±0.01 ^c	3.04±0.05 ^b	9.01±1.46 ^c	7.14±0.05 ^b	3.08±0.02 ^c
Trolox	5.12±0.21 ^c	3.21±0.06 ^b	NT	34.17±1.23 ^e	5.21±0.27 ^e

The concentration at 50% inhibition and the concentration at 0.5 absorbance, respectively, are referred to IC₅₀ and A_{0.5} values. By using a linear regression analysis, the IC₅₀ and A_{0.5} values were determined and expressed as mean ± SD (n =3). The values in the same columns that have different superscripts (a, b, c, d, e, f, or g) differ significantly (p < 0.05). BHA: butylated hydroxyanisole, BHT: butylated hydroxytoluene, NT: not tested.

Table 4. Correlation analysis between phenolic compounds and antioxidant activity of crude extract and its fraction from *E. guttatum*

	DPPH	ABTS	FRAP	SNP	Phenanthroline	TPC	TFC
DPPH	1						
ABTS	.987**	1					
FRAP	.872**	.889**	1				
SNP	.816**	.720**	.686**	1			
Phenanthroline	.903**	.955**	.923**	.536*	1		
TPC	-.989**	-.999**	-.908**	-.741**	-.955**	1	
TFC	-.833**	-.795**	-.909**	-.806**	-.756**	.818**	1

** . Correlation is significant at the 0.01 level, * . Correlation is significant at the 0.05 level.

3.4. Antioxidant Activity

In the present study, the antioxidant activity of the crude extract and its fractions from the aerial part of *E. guttatum* was investigated using five assays (DPPH, ABTS, FRAP, SNP and Phenanthroline) and the results are presented in Table 3.

The DPPH test is frequently used to assess plant extracts' antioxidant potential and assess different compounds' ability to scavenge free radicals. In this test, antioxidant molecules reduce the stable violet free radical DPPH to form light yellow hydrazine (Rajan *et al.*, 2011).

To evaluate DPPH free radical scavenging activity, IC₅₀ values were determined for the crude extract and its fractions, increased antioxidant activity was observed with lower IC₅₀ values. Our results indicate that the crude extract and polar fractions demonstrate an excellent scavenging activity of DPPH radical compared to the standard's antioxidants (BHA, BHT, Trolox, Acid ascorbic), with values of approximately 2.37 ± 0.02 µg/mL for the ethyl acetate, followed by crude extract at 3.74 ± 0.03 µg/mL, and then the n-butanol fraction at 4.84 ± 0.06 µg/mL. Conversely, the nonpolar fractions exhibit moderate activity, aligning with the standards, with the chloroform fraction at 32.29 ± 0.03 µg/mL and the n-hexane fraction at 37.99 ± 0.24 µg/mL. Given their strong ability to scavenge DPPH, the crude extract and its polar fractions, in particular, indicate that they contain a significant quantity of reductones, similar to our results, the polar extracts: acetone, methanolic, and ethyl acetate of *E. arborescens* showed noticeably increased DPPH radical scavenging activity in comparison to nonpolar hexane extract (Samet *et al.*, 2022). Our findings indicate that the crude extract of *E. guttatum*'s aerial part may effectively scavenge DPPH free radicals, with an IC₅₀ (3.74 ± 0.03 µg/mL) lower than standards like ascorbic acid (4.39 ± 0.01 µg/mL) and lower than the IC₅₀ reported by Mrabti *et al.* (2021) (39.10 ± 3.28 µg/mL) and Hamza *et al.* (2018) (56.9 ± 3.3 µg/mL) for the crude extract of the same species.

Free radical scavenging activity was also determined using the ABTS radical. According to the results, we can say that the ABTS radical was inhibited by all of the standards and tested samples with the highest ABTS scavenging activity was found in the ethyl acetate fraction with an IC₅₀ value of 1.49 µg/mL. In contrast, the n-hexane fraction exerted the lowest ABTS scavenging capacity with an IC₅₀ of 9.81 µg/mL. Nevertheless, compared with standards, BHA, BHT, ascorbic acid, and Trolox, the crude extract and all its polar fractions tested showed significantly higher ABTS radical scavenging activity (P < 0.05).

According to the FRAP assay, electron-donating antioxidants reduce the ferric complex 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (Fe³⁺-tripyridyltriazine) to a blue-colored ferrous form (Fe²⁺-tripyridyltriazine) and the reaction medium's increased absorbance indicates an increase in the tested extracts' power. FRAP antioxidant activity was detected in all samples examined, including the standards, indicating that both polar fractions, EtOAc and BUOH, exhibit a

significant ferric reducing power remarkably superior to that of the standards with A_{0.5} values for EtOAc and BUOH are 2.98 ± 0.07 and 5.04 ± 0.01 µg/mL, respectively, significantly exceeding those determined for the crude extract 9.53 ± 0.07 µg/mL and nonpolar fractions of hexane and chloroform (15.93 ± 0.62 and 11.58 ± 0.22 µg/mL, respectively).

The crude extract and all fractions gave good results in the phenanthroline test compared to the standards, as did the silver nanoparticle test; in this case, too, the polar extracts, especially the ethyl acetate fraction (1.23 ± 0.01 µg/mL, 3.62 ± 0.15 µg/mL respectively), gave better results significantly (p < 0.05) than the nonpolar fraction.

This excellent antioxidant capacity may be due to the high content of phenolic components, particularly in polar extracts/fractions, which appear to be efficient hydrogen and electron donors, and due to their ideal structural chemistry. Additionally, as a biological activity requires the consideration of chemical synergy, we should not ignore the presence of other small phenolic compounds (Khiya *et al.*, 2021), as well as to the presence of major components known for their anti-oxidant power such hydroxybenzoic acid derivatives (gallic acid, protocatechuic acid, salicylic acid), cinnamic acid derivatives (o-coumaric acid, trans-ferulic acid, chlorogenic acid) (Razzaghi-Asl *et al.*, 2013), flavonoids and its derivatives (kaempferol, quercetin) (Burda & Oleszek, 2001).

3.5. Correlations between total phenolic and flavonoid contents and antioxidant capacities

Pearson correlation analysis was used to examine the relationships between the levels of phenolic compounds (TPC and TFC) and antioxidant capacities (DPPH, ABTS, FRAP, SNP, and phenanthroline). The results are presented in **Table 4**. However, the relationship between the content of phenolic compounds and the antioxidant properties of this plant has not been examined in any study so far. The present study showed remarkably strong and positive correlations between antioxidant activities, the highest being between DPPH and ABTS (r = 0.987, P < 0.01), and ABTS and phenanthroline (r = 0.955, P < 0.01), there was also a moderate correlation between SNP and ABTS and FRAP (r = 0.720, P < 0.01), (r = 0.686, P < 0.01) respectively, and a small correlation was found between SNP and phenanthroline (r = 0.536, P < 0.05). In addition, a strong positive correlation was reported between TPC and TFC (r = 0.818, P < 0.01), however, strong and significant negative correlations were found between phenolic and flavonoid compounds and antioxidant activities, while the strongest correlation was between TPC and ABTS (r = - 0.999, P < 0.01) and between TFC and FRAP (r = - 0.909, P < 0.01). A moderate correlation was found between TPC and SNP (r = - 0.741, P < 0.01). Phenolic compounds contribute significantly to the antioxidant activities of this species and thus may play an essential role in its beneficial effects.

4. Conclusion

The findings from this research indicate that both the crude extract and different fractions of *E. guttatum* exhibit significant antioxidant properties in vitro. The quantitative composition of phenolic and flavonoid compounds is particularly intriguing, especially in the crude extract and polar fractions. LC-MS/MS analysis unveiled the presence of various phenolic acids, and flavonoids recognized in the literature for their pharmacological effects. However, additional investigations are warranted to isolate and characterize the bioactive compounds responsible for the antioxidant potential. Subsequent in vivo studies are essential to assess their efficacy in disease prevention.

References

- Abdelkrim C., Belboukhari N., Karima S. and Hacini S. (2006). Plants of Algerian semi-arid regions used for the treatment of gastro-intestinal disorders. *Algerian Journal of Arid region*, **5**, 07.
- Alara O.R., Abdurahman N.H. and Ukaegbu C.I. (2021). Extraction of phenolic compounds: A review. *Current Research in Food Science*, **4**, 200–214.
- Amzad Hossain M. and Shah M.D. (2015). A study on the total phenols content and antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of endemic plant *Merremia borneensis*. *Arabian Journal of Chemistry*, **8**(1), 66–71.
- Bakari S., Hajlaoui H., Daoud A., Mighri H., Ross-Garcia J.M., Gharsallah N. and Kadri A. (2018). Phytochemicals, antioxidant and antimicrobial potentials and LC-MS analysis of hydroalcoholic extracts of leaves and flowers of *Erodium glaucophyllum* collected from Tunisian Sahara. *Food Science and Technology*, **38**, 310–317.
- Benarba B., Belabid L., Righi K., Bekkar A.A., Elouissi M., Khaldi A. and Hamimed A. (2015). Ethnobotanical study of medicinal plants used by traditional healers in Mascara (North West of Algeria). *Journal of Ethnopharmacology*, **175**, 626–637.
- Berber D., Toksöz O., Türkmenoğlu İ. and Sesal C. (2022). A review on antimicrobial activities of some culinary herbs and spices against *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Life Sciences and Related Technologies*, **3**(2), 75–85.
- Bilić V.L., Gašić U., Milojković-Opsenica D., Nemet I., Rončević S., Kosalec I. and Rodriguez J.V. (2020). First Extensive Polyphenolic Profile of *Erodium cicutarium* with Novel Insights to Elemental Composition and Antioxidant Activity. *Chemistry & Biodiversity*, **17**(9), e2000280.
- Blois M.S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, **181**(4617), 1199–1200.
- Burda S. and Oleszek W. (2001). Antioxidant and Antiradical Activities of Flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**(6), 2774–2779.
- Butkeviciūtė A., Liaudanskas M., Kviklys D., Gelvonauskienė D. and Janulis V. (2020). The qualitative and quantitative compositions of phenolic compounds in fruits of Lithuanian heirloom apple cultivars. *Molecules*, **25**(22), 5263.
- Çelikler Özer Ö., Baki Kekilli E., ERDOĞAN ORHAN İ. and KAHRAMAN A. (2020). *Erodium L'HER.* (dönbaba/ığnelik). *Türk Farmakope Dergisi*, **5**(1).
- Çüce M., Colak N., Zeljković S.Ć., Tarkowski P., Strnad M., Gruz J., İmamoğlu K.V. and Ayaz F.A. (2022). An evaluation of volatiles and phenolic compounds in conjunction with the antioxidant capacity of endemic endangered species of *Erodium hendrikii* Alpinar. *South African Journal of Botany*, **149**, 458–467.
- Do Q.D., Angkawijaya A.E., Tran-Nguyen P.L., Huynh L.H., Soetaredjo F.E., Ismadji S. and Ju Y.-H. (2014). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis*, **22**(3), 296–302.
- Erenler R., Atalar M.N., Yildiz İ., Geçer E.N., Yildirim A., Demirtaş İ. and Alma M.H. (2023). Quantitative analysis of bioactive compounds by LC-MS/MS from *Inula graveolens*. *Bütünleyici ve Anadolu Tıbbi Dergisi*, **4**(3), 3–10.
- Eshete M.A. and Molla E.L. (2021). Cultural significance of medicinal plants in healing human ailments among Guji semi-pastoralist people, Suro Barguda District, Ethiopia. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, **17**(1), 61.
- Fernandes T.A., Antunes A.M.M., Caldeira I., Anjos O., de Freitas V., Fargeton L., Boissier B., Catarino S. and Canas S. (2022). Identification of gallotannins and ellagitannins in aged wine spirits: A new perspective using alternative ageing technology and high-resolution mass spectrometry. *Food Chemistry*, **382**, 132322.
- Fiz O., Vargas P., Alarcón M.L. and Aldasoro J.J. (2006). Phylogenetic Relationships and Evolution in *Erodium* (Geraniaceae) based on *trnL-trnF* Sequences. *Systematic Botany*, **31**(4), 739–763.
- Gandhi G.R., Vasconcelos A.B.S., Antony P.J., Montalvão M.M., de Franca M.N.F., Hillary V.E., Ceasar S.A. and Liu D. (2023). Natural sources, biosynthesis, biological functions, and molecular mechanisms of shikimic acid and its derivatives. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, **13**(4), 139.
- Gulcin İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. *Archives of Toxicology*, **94**(3), 651–715.
- Hamza G., Emna B.-H., Yeddes W., Dhouafli Z., Moufida T.S. and El Akrem H. (2018). Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities data of three plants from Tunisia region: *Erodium glaucophyllum*, *Erodium hirtum* and *Erodium guttatum*. *Data in brief*, **19**, 2352–2355.
- Jin L., Fayvush G., Khutsishvili M., Atha D. and Borris R.P. (2020). Phytochemical Investigation of *Erodium oxycorymbium* M. Bieb. *Natural Product Communications*, **15**(6), 1934578X2093085.
- Khiya Z., Oualcadi Y., Gamar A., Berrekhis F., Zair T. and Hilali F. E. (2021). Correlation of Total Polyphenolic Content with Antioxidant Activity of Hydromethanolic Extract and Their Fractions of the *Salvia officinalis* Leaves from Different Regions of Morocco. *Journal of Chemistry*, **2021**, e8585313.
- Li W., Kandhare A.D., Mukherjee A.A. and Bodhankar S.L. (2018). Hesperidin, a plant flavonoid accelerated the cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats: Role of TGF-β/Smads and Ang-1/Tie-2 signaling pathways. *EXCLI Journal*, **17**, 399–419.
- Ljoljić Bilić V., Gašić U.M., Milojković-Opsenica D., Rimac H., Vuković Rodriguez J., Vlainić J., Brlek-Gorski D. and Kosalec I. (2022). Antibacterial Fractions from *Erodium cicutarium* Exposed—Clinical Strains of *Staphylococcus aureus* in Focus. *Antibiotics*, **11**(4), Article 4.
- Miara M.D., Bendif H., Ait Hammou M. and Teixidor-Toneu I. (2018). Ethnobotanical survey of medicinal plants used by

- nomadic peoples in the Algerian steppe. *Journal of Ethnopharmacology*, **219**, 248–256.
- Mrabti H.N., Doudach L., Kachmar M.R., KHALI Z., MRABTI N.N., BENRAHOU K.B., HARRAQUI K., ZENGİN G., BOUYAHYA A. and FAOUZI M.E.A. (2021). Phenolic content, antibacterial, antioxidant, and toxicological investigations of *Erodium guttatum* (Geraniaceae) collected from the Northeast of Morocco. *Turkish Journal of Botany*, **45(8)**, 739–749.
- Müller L., Gnoyke S., Popken A.M. and Böhm V. (2010). Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT-Food Science and Technology*, **43(6)**, 992–999.
- Munekata P.E.S., Alcántara C., Collado M.C., Garcia-Perez J. V., Saraiva J.A., Lopes R.P., Barba F.J., do Prado Silva L., Sant'Ana A.S., Fierro E.M. and Lorenzo J.M. (2019). Ethnopharmacology, phytochemistry and biological activity of *Erodium* species: A review. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, **126**, 108659.
- Naili M.B., Alghazeer R.O., Saleh N.A. and Al-Najjar A. Y. (2010). Evaluation of antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia campestris* (Astraceae) and *Ziziphus lotus* (Rhamnaceae). *Arabian Journal of Chemistry*, **3(2)**, 79–84.
- Oyaizu M. (1986). Studies on products of browning reaction antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese journal of nutrition and dietetics*, **44(6)**, 307–315.
- Özyürek M., Güngör N., Baki S., Güçlü K. and Apak R. (2012). Development of a Silver Nanoparticle-Based Method for the Antioxidant Capacity Measurement of Polyphenols. *Analytical Chemistry*, **84(18)**, 8052–8059.
- Pająk P., Socha R., Gałkowska D., Rożnowski J. and Fortuna T. (2014). Phenolic profile and antioxidant activity in selected seeds and sprouts. *Food Chemistry*, **143**, 300–306.
- Patel K. and Patel D.K. (2019). The Beneficial Role of Rutin, A Naturally Occurring Flavonoid in Health Promotion and Disease Prevention: A Systematic Review and Update. In *Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases* (457–479). Elsevier.
- Rajan S., Mahalakshmi S., Deepa V., Sathya K., Shajitha S. and Thirunalasundari T. (2011). *ANTIOXIDANT POTENTIALS OF PUNICA GRANATUM FRUIT RIND EXTRACTS*. **3(3)**.
- Razzaghi-Asl N., Garrido J., Khazraei H., Borges F. and Firuzi O. (2013). Antioxidant Properties of Hydroxycinnamic Acids: A Review of Structure- Activity Relationships. *Current Medicinal Chemistry*, **20(36)**, 4436–4450.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M. and Rice-Evans C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, **26(9-10)**, 1231–1237.
- Rehman S., Ashfaq U.A., Ijaz B. and Riazuddin S. (2018). Anti-hepatitis C virus activity and synergistic effect of *Nymphaea alba* extracts and bioactive constituents in liver infected cells. *Microbial pathogenesis*, **121**, 198–209.
- Rudrapal M., Khairnar S.J., Khan J., Dukhyil A.B., Ansari M.A., Alomary M.N., Alshabrmi F.M., Palai S., Deb P.K. and Devi, R. (2022). Dietary Polyphenols and Their Role in Oxidative Stress-Induced Human Diseases: Insights Into Protective Effects, Antioxidant Potentials and Mechanism(s) of Action. *Frontiers in Pharmacology*, **13**, 806470.
- Saleh N.A.M., El-karemy Z.A.R., Mansour R.M.A. and Fayed A.-A. A. (1983). A chemosystematic study of some geraniaceae. *Phytochemistry*, **22(11)**, 2501–2505.
- Salmerón-Manzano E., Garrido-Cardenas J.A. and Manzano-Agugliaro F. (2020). Worldwide research trends on medicinal plants. *International journal of environmental research and public health*, **17(10)**, 3376.
- Samet S., Ayachi A., Fourati M., Mallouli L., Allouche N., Treillhou M., Téné N. and Mezghani-Jarraya R. (2022). Antioxidant and antimicrobial activities of *Erodium arborescens* aerial part extracts and characterization by LC-HESI-MS2 of its acetone extract. *Molecules*, **27(14)**, 4399.
- Sequeira I.R. and Poppitt S.D. (2017). Unfolding Novel Mechanisms of Polyphenol Flavonoids for Better Glycaemic Control: Targeting Pancreatic Islet Amyloid Polypeptide (IAPP). *Nutrients*, **9(7)**, 788.
- Szydłowska-Czeraniak A., Dianoczi C., Recseg K., Karlovits G. and Szlyk E. (2008). Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. *Talanta*, **76(4)**, 899–905.
- Topçu, G., Ay, M., Bilici, A., Sarıkürkcü, C., Öztürk, M., & Ulubelen, A. (2007). A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food chemistry*, **103(3)**, 816-822
- Yang W., Tu H., Tang K., Huang H., Ou S. and Wu J. (2021). Reynoutrin Improves Ischemic Heart Failure in Rats Via Targeting S100A1. *Frontiers in Pharmacology*, **12**.
- Yüksel T.N., Bozgeyik E. and Yayla M. (2022). The effect of quercetin and quercetin-3-d-xyloside on breast cancer proliferation and migration. *Journal of Basic and Clinical Health Sciences*, **6(2)**, 569–578.