

# République Algérienne Démocratique et Populaire

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 : ECOPHYSIOLOGIE ANIMALE

Intitulé

**Modération des effets toxiques du  
fongicide Tébuconazole par l'extrait de  
*Ruta montana* chez le rat Wistar.**

Présenté par : Aouzal Badis

Devant le jury composé de :

Qualité	Nom et Prénom	Grade	Etablissement
Président	BASLI Abdelkader	Pr	Université de Skikda
Directrice de thèse	SLIMANI Souheila	Pr	Université de Skikda
Co-directrice de thèse	GUEDDAH Doria	MCB	Université de Skikda
Examineur	BOUGHENDJIOUA Hicham	Pr	ENSET de Skikda
Examinatrice	BELAMBRI Sahra Amel	MCA	Université de Skikda

Année universitaire : 2024-2025

## بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

الحمد لله ربّ العالمين، نحمده ونستعينه ونستهديه، والصلاة  
والسلام على أشرف الأنبياء والمرسلين، سيدنا محمدٍ وعلى  
آله وصحبه أجمعين. وبعد

فإني أتوجّه بأصدق عبارات الشكر والحمد لله تعالى الذي  
وفّقني ويسّر لي السبل لإتمام هذا العمل المتواضع لنيل درجة  
الدكتوراه. فلولا توفيقه ورحمته وعظيم فضله ما كان لهذا  
الجهد أن يكتمل. أسأله سبحانه أن يجعله خالصاً لوجهه  
الكريم، وأن ينفع به البلاد والعباد، إنّه وليّ ذلك والقادر عليه.

# Remerciement

Je désire manifester toute ma reconnaissance envers mes directrices de thèse, la Professeure **SLIMANI Souheila** et la Docteure **GUEDDAH Doria**, pour la qualité de leurs conseils, leurs commentaires constructifs et leur soutien inestimable qui m'ont accompagné tout au long de mon travail de recherche. Les connaissances approfondies et l'expertise pointue qu'ils ont apportées ont joué un rôle déterminant dans la conception et la réalisation de mon travail, garantissant ainsi sa réussite.

Je tiens à exprimer ma sincère gratitude envers les membres du comité de thèse, et tout particulièrement au **Dr Basli** pour avoir présidé cette thèse de manière exemplaire. Je remercie également le **Dr Boughendjioua** et le **Dr Belambri** pour la pertinence de leurs commentaires en tant qu'examineurs, la qualité de leurs critiques constructives, ainsi que la richesse de leurs suggestions éclairées, qui ont grandement contribué à l'enrichissement et à l'amélioration de la qualité de cette recherche

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude aux ingénieurs du laboratoire de l'Université 20 Août 1955, en particulier ceux des départements des Sciences de la Nature et de la Vie (SNV), de l'Agronomie, de la Chimie, ainsi que du Hall de Technologie. Un remerciement tout particulier s'adresse à **M. Bouchalaa Kamel**, chef du Hall de Technologie, pour son engagement, sa bienveillance et son accompagnement précieux tout au long de nos recherches

Je souhaite exprimer ma profonde reconnaissance aux ingénieurs et à la direction du **laboratoire d'analyse de SONATRACH – Direction des Œuvres Sociales de Skikda**, ainsi qu'au **Laboratoire d'Anatomopathologie de l'hôpital Saad Guermech de Skikda (21000, Algérie)**. pour leur professionnalisme, leur disponibilité et leur expertise. Leur contribution technique a été essentielle à la réalisation des analyses sanguines et des lames histologiques indispensables à cette étude. J'adresse une mention particulière à **Dr Samira Elmokli** pour son aide précieuse dans l'interprétation des lames histologiques. Leur engagement et leur collaboration ont largement contribué à la fiabilité et à la qualité des résultats obtenus. Je les remercie chaleureusement pour leur soutien et leur précieuse assistance.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à **Dr Imen Laib ,Pr CHEKROUD Zohra, Dr Machia Leila, Dr. Lalouch Abdallah Dr Nabila Souilah et Dr Boulaknfet Fouzi** , ainsi qu'à l'ensemble des Docteur et professeurs de la **Faculté des Sciences**, pour leur soutien, leurs précieux conseils et leur encadrement tout au long de cette recherche. Leur expertise et leur disponibilité ont été d'une aide précieuse. Je remercie également chaleureusement les **doctorants** pour leur collaboration, leurs échanges enrichissants et leur soutien tout au long de ce parcours. Enfin, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance envers ceux qui ont apporté leur soutien, de près ou de loin, à ma quête, pour leur précieuse collaboration et leur générosité. Je leur dois une dette de gratitude immense pour les précieuses contributions qu'ils ont apportées.

# Décidás

À ma mère, **Grine Karima**, pilier de ma vie, dont la bienveillance, les sacrifices et l'affection infinie m'ont toujours inspiré et porté vers l'excellence.

À mon père, **Aouzal Rachid**, qui demeure à jamais dans mon cœur. Son amour, ses valeurs et ses enseignements continuent de me guider chaque jour.

À mes frères, **Amine** et **Abdelrraouf**, pour leur soutien constant, leurs encouragements et leur présence rassurante à chaque étape de ce parcours.

À ma sœur, **Amira**, complice de toujours, dont la tendresse et l'écoute bienveillante ont été une source précieuse de réconfort et de motivation.

À toute ma famille, **Grine** et **Aouzal**, pour leur amour, leur encouragement et leur présence inestimable dans ma vie.

Que ce travail soit un humble témoignage de ma reconnaissance et de mon affection profonde envers vous tous.

## Table des matières

### Résumés

### Liste des abréviations.

### Liste des figures.

### Liste des tableaux.

Introduction	1
--------------	---

## Chapitre I : Revue de Littérature

<b>Partie 1. Tébuconazole</b>	4
1 Généralités sur les pesticides	4
2 Triazoles	4
3 Tébuconazole	5
3.1 Structure moléculaire	5
3.2 Résidues du Tébuconazole	6
3.3 Mécanisme d'action du tébuconazole et ses effets toxiques	6
<b>Partie 2. <i>Ruta montana</i></b>	9
1 Définition et Noms communs	9
2 Description botanique	9
3 Taxonomie	10
4. Distribution Géographique	11
5 Composition chimique	12
6 Utilisation Traditionnelle	13
7 Vertus thérapeutiques de <i>Ruta montana</i>	15

## Chapitre II Matériel et méthodes

1. Etude phytochimique	18
1.1 Matériel végétal	18
1.2 Protocole d'extraction	19
1.3 Dosages colorimétriques des composés phénolique	20
1.3.1 Dosage des polyphénols totaux	20
1.3.2 Dosage des flavonoïdes	21
1.3.3 Dosage des tanins	22
1.4 Identification des composés phytochimique par LC-MS/MS	23

2	Evaluation des activité biologiques <i>In vitro</i> du <i>Ruta montana</i>	23
2.1	Evaluation de l'activité antioxydante	23
2.1.1	Méthode DPPH	23
2.1.2	Méthode ABTS	24
2.1.3	Test d'activité antioxydante totale (TAC)	26
2.1.4	Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)	26
2.2	Evaluation de l'activité enzymatique du <i>Ruta montana</i>	27
2.2.1	Evaluation de l'activité anti-uréase	27
2.2.2	Evaluation de l'activité anticholinestérase	27
2.2.3	Evaluation de l'activité antimicrobienne	28
3	Evaluation des activités biologiques <i>In vivo</i> du <i>Ruta montana</i>	30
3.1	Evaluation du pouvoir détoxifiant	30
3.1.1	Animaux et conditions d'élevage	30
3.1.2	Traitement des rats	30
3.1.3	Sacrifice des rats et prélèvement des échantillons	31
3.1.4	Dosage	31
3.1.5	Analyse des caractéristiques des spermatozoïdes	33
3.1.6	Examen histopathologique	33
3.2	Évaluation de l'effet anti-inflammatoires de l'extrait de <i>Ruta montana</i>	35
3.2.1	Œdème de l'oreille induit par le xylène	35
3.2.2	Évaluation de l'activité analgésique	36
4	Modélisation des Propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques	36
4.1	SwissADME	36
4.2	L'analyse toxicologique prédictive	37
5	Traitement statistique des résultats	38

### **Chapitre III : Résultats et discussion**

1	Etude phytochimique	39
1.1	Rendement	39
1.2	Dosage des composé polyphénoliques de la Plante <i>Ruta montana</i>	39
1.2.1	Teneurs en polyphénols totaux	39
1.2.2	Teneur en flavonoïdes	39
1.2.3	Teneur in tanins	40
1.3	Identifications qualitative et quantitative des composés phénoliques de l'extrait éthanolique du <i>Ruta montana</i> par LC-MS/MS	42
2	Evaluation des activités biologiques <i>in vitro</i> de <i>Ruta montana</i>	46
2.1	Evaluation de l'activité antioxydante	46
2.2	Evaluation de l'activité antimicrobienne	49
2.3	Evaluation de l'activité enzymatique de la Plante <i>Ruta montana in vitro</i>	51
3	Modélisation <i>in silico</i> des propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques	53
3.1	Caractéristiques physicochimiques et pharmacocinétiques de <i>Ruta montana</i>	53
3.2	Test de Bioavailability Radar des composés de <i>Ruta montana</i>	56

3.3	Test de BOILED-Egg de <i>Ruta montana</i>	58
3.4	Prévision des propriétés Toxicocinétiques des composés de <i>Ruta montana</i>	60
4	Evaluation des activités biologiques <i>In vivo</i> du <i>Ruta montana</i>	61
4.1	Evaluation du pouvoir détoxifiant	61
4.1.1	Effet du traitement sur les poids corporels	62
4.1.2	Effet du traitement sur les paramètres hématologiques	63
4.1.3	Effet du traitement sur l'activité hépatique	65
	<i>Effet du traitement sur le poids absolu et poids relative du foie</i>	65
	<i>Effet du traitement sur l'activité des enzymes hépatiques</i>	66
	<i>Effet du traitement sur les paramètres biochimiques</i>	67
	<i>Etude anatomopathologique du foie</i>	71
4.1.4	Effet du traitement sur la fonction rénale	73
	<i>Effet du traitement sur le poids absolu et poids relative des reins</i>	73
	<i>Effet du traitement sur le dosage des paramètres biochimiques rénales</i>	73
	<i>Etude histologique des reins</i>	76
4.1.5	Effet du traitement sur l'activité Reproductrice	78
	<i>Effet du traitement sur le poids des testicules</i>	78
	<i>Effet du traitement sur le spermogramme</i>	79
	<i>Variation des taux des hormone</i>	81
	<i>Histologie des Testicules</i>	83
4.2	Modélisation <i>in silico</i> des propriétés physicochimiques et du Tébuconazole	85
4.2.1	Propriétés physicochimiques et lipophilie du Tébuconazole	85
4.2.2	Médicamentabilité, biodisponibilité et pharmacocinétique du Tébuconazole	85
4.2.3	Test de Bioavailability Radar et BOILED-Egg du Tébuconazole	87
4.2.4	Prévision des propriétés Toxicocinétiques du tébuconazole	88
4.3	Effet anti-inflammatoire de l'extrait de <i>Ruta montana</i>	90
4.3.1	Effet de <i>Ruta montana</i> sur l'œdème de l'oreille induit par le xylène	91
4.3.2	Evaluation de l'activité analgésique de de l'extrait <i>Ruta montana</i>	92
	<b>Conclusion et Perspectives</b>	96
	<b>Références bibliographiques</b>	98
	<b>Annexes</b>	
	<b>Production scientifique</b>	

## Résumé

Cette étude se propose d'évaluer le potentiel phytochimique ainsi que les propriétés biologiques de l'extrait éthanolique de *Ruta montana*. L'approche méthodologique intègre une caractérisation approfondie des métabolites secondaires, une évaluation multiparamétrique de ses activités biologiques incluant des tests *in vitro* (capacités antioxydantes, inhibition enzymatique et action antimicrobienne), et une analyse *in vivo* de ses effets protecteurs contre la toxicité hépatique et rénale induite par le tébuconazole (TBC) chez un modèle murin (rats Wistar mâles). En complément, une investigation par modélisation moléculaire *in silico* a été conduite pour prédire les propriétés ADME (absorption, distribution, métabolisme, excrétion) et le profil toxicologique des principaux composés phytochimiques identifiés. L'extraction hydroéthanolique a révélé que le rendement était 11,994 %. La mesure des polyphénols (méthode de Folin-Ciocalteu), les flavonoïdes (par réaction à l'AlCl<sub>3</sub>) et les tanins (méthode à la vanilline) a mis en évidence des niveaux importants de polyphénols (3,31 ± 0,04 mg EAG/g ES), de flavonoïdes (3,35 ± 0,10 mg EQ/g ES) et de tanins (1,61 ± 0,004 mg EAT/g ES). L'analyse par LC-MS/MS a permis d'identifier neuf composés bioactifs, parmi lesquels l'hespéridine a été quantifiée à 22,86 mg/g. L'extrait a démontré une activité antioxydante significative avec des valeurs d'IC<sub>50</sub> de 0,126 ± 0,05 mg/ml pour le DPPH et de 0,104 ± 0,04 mg/ml pour l'ABTS, ainsi qu'un TAC de 0,291 ± 0,03 pour le CUPRAC A<sub>0.5</sub> = 0,271 ± 0,08. De plus, une activité antimicrobienne a été entamé par la méthode de diffusion sur gélose. L'extrait a démontré une forte activité antibactérienne contre *Escherichia coli* (18.5 mm) et *Klebsiella pneumoniae* (19 mm), avec des zones d'inhibition atteignant 20 mm pour *Pseudomonas aeruginosa*. Les effets anti-inflammatoires (évalués via le modèle d'œdème auriculaire induit par le xylène) et analgésiques (mesurés par le test d'immersion de la queue) ont été testés *in vivo* sur des rats Wistar. L'administration de l'extrait de RM à 100 mg/kg a réduit l'épaisseur de l'oreille de 38,23 % (p < 0.05) après 90 minutes, un effet comparable à celui de l'aspirine. Par ailleurs, le test d'immersion de la queue a mis en évidence un effet analgésique dose-dépendant, se traduisant par un prolongement du temps de latence de réaction jusqu'à 4.0 secondes (p < 0.05). L'étude de l'évaluation de l'effet modérateur de notre extrait a été réalisée sur un total de 42 rats mâles ayant un poids moyen de 178±67.2 g, qui ont été répartis en six groupes composés de sept animaux chacun. Un groupe témoin, un groupe TBC traité par 100 mg/kg de tébuconazole. Le troisième (RM 1) et le quatrième groupe (RM 2) ont été traités par 50 mg/kg et 100 mg/kg de l'extrait de *Ruta montana* respectivement. Le groupe cinq (TBC+RMI) et le groupe six (TBC+RMII) ont été traités par la combinaison de tébuconazole et l'extrait de *Ruta montana*. Après 50 jours du traitement oral des rats, un dosage hématologique, biochimique et hormonal a été réalisé en plus, d'un spermogramme et une étude histologique. Nos résultats ont montré clairement que le TBC provoque une hépatotoxicité (augmentation des AST, ALT, ALP), une néphrotoxicité (hausse de la créatinine et de l'urée), une perturbation hormonale (diminution de la testostérone) et des lésions histologiques (foie, reins, testicules). L'administration de la combinaison (TBC + RM) a montré une récupération de ces paramètres. Les analyses *in silico* réalisées via SwissADME et pkCSM ont confirmé la biodisponibilité et la sécurité des composés de RM. Cette étude démontre clairement que l'extrait de *Ruta montana* possède un potentiel antioxydant, anti-inflammatoire, et antibactérien avec un pouvoir modérateur efficace contre la toxicité induite par le Tébuconazole, soulignant son potentiel thérapeutique en tant qu'agent protecteur naturel.

**Mots-clés :** *Ruta montana*, LCMS, Activités biologiques *in vitro*, Rats, Tébuconazole, Toxicité hépatorenale, Test *in silico*.

## Abstract

This study evaluates the phytochemical potential and biological properties of *Ruta montana* ethanolic extract. The methodological approach integrates an in-depth characterization of secondary metabolites, a multiparametric evaluation of its biological activities including *in vitro* tests (antioxidant capacities, enzymatic inhibition and antimicrobial action), and an *in vivo* analysis of its protective effects against tebuconazole (TBC)-induced liver and kidney toxicity in a mouse model (male Wistar rats). In addition, *in silico* molecular modeling was used to predict the ADME properties (absorption, distribution, metabolism, excretion) and toxicological profile of the main phytochemical compounds identified. Hydroethanol extraction revealed a yield of 11.994%. Measurement of polyphenols (Folin-Ciocalteu method), flavonoids (by AlCl<sub>3</sub> reaction) and tannins (vanillin method) revealed significant levels of polyphenols ( $3.31 \pm 0.04$  mg EAG/g ES), flavonoids ( $3.35 \pm 0.10$  mg EQ/g ES) and tannins ( $1.61 \pm 0.004$  mg EAT/g ES). LC-MS/MS analysis identified nine bioactive compounds, among which hesperidin was quantified at 22.86 mg/g. The extract demonstrated significant antioxidant activity with IC<sub>50</sub> values of  $0.126 \pm 0.05$  mg/ml for DPPH and  $0.104 \pm 0.04$  mg/ml for ABTS, as well as a TAC of  $0.291 \pm 0.03$  for CUPRAC A0.5=  $0.271 \pm 0.08$ . In addition, antimicrobial activity was observed using the agar diffusion method: the extract demonstrated strong antimicrobial activity against *Escherichia coli* (18.5 mm) and *Klebsiella pneumoniae* (19 mm), with zones of inhibition reaching 20 mm for *Pseudomonas aeruginosa*. Anti-inflammatory (assessed via the xylene-induced auricular edema model) and analgesic (measured by the tail immersion test) effects were tested *in vivo* on Wistar rats. Administration of MR extract at 100 mg/kg reduced ear thickness by 38.23% ( $p < 0.05$ ) after 90 minutes, an effect comparable to that of aspirin. In addition, the tail immersion test demonstrated a dose-dependent analgesic effect, with reaction latency prolonged by up to 4.0 seconds ( $p < 0.05$ ). The evaluation of the moderating effect of our extract was carried out on a total of 42 male rats with an average weight of  $178 \pm 67.2$  g, which were divided into six groups of seven animals each. A control group, a TBC group treated with 100 mg/kg tebuconazole. The third (RMI) and fourth (RMII) groups were treated with 50 mg/kg and 100 mg/kg of *Ruta montana* extract respectively. Group five (TBC+RMI) and group six (TBC+RMII) were treated with the combination of tebuconazole and *Ruta montana* extract. After 50 days of oral treatment of the rats, a hematological, biochemical and hormonal assay was carried out, in addition to a spermogram and histological study. Our results clearly showed that TBC caused hepatotoxicity (increased AST, ALT, ALP), nephrotoxicity (increased creatinine and urea), hormonal disruption (decreased testosterone) and histological lesions (liver, kidneys, testes). *In silico* analyses performed via SwissADME and pkCSM confirmed the bioavailability and safety of RM compounds. This study clearly demonstrates that *Ruta montana* extract possesses antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial potential with effective moderating power against Tebuconazole-induced toxicity, underlining its therapeutic potential as a natural protective agent.

**Keywords:** *Ruta montana*, LCMS, *in vitro* biological activities, Rats, Tebuconazole, Hepatorenal toxicity, *In silico* test.

## المخلص

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم الإمكانيات الفيتوكيميائية والخصائص البيولوجية لمستخلص الإيثانولي لنبته *Ruta montana*. تتضمن المنهجية المعتمدة توصيفاً دقيقاً للمواد الثانوية الأيضية، وتقييماً متعدد المعايير للأنشطة البيولوجية بما في ذلك اختبارات *in vitro* (القدرة المضادة للأوكسدة، تثبيط الإنزيمات، والنشاط المضاد للميكروبات)، بالإضافة إلى تحليل *in vivo* للتأثيرات الوقائية ضد السمية الكبدية والكلى الناتجة عن التبوكونازول (TBC) في نموذج تجريبي على ذكور الجرذان من نوع ويستار. علاوة على ذلك، تم إجراء دراسة عبر النمذجة الجزيئية *in silico* للنتائج بخصوص ADME (الامتصاص، التوزيع، الأيض، الإطراح) والملف السمي لأهم المركبات الفيتوكيميائية المحددة. أظهرت عملية الاستخلاص بالإيثانول المائي أن العائد بلغ 11.994%. وقد كشفت قياسات البوليفينولات (باستخدام طريقة Folin-Ciocalteu)، الفلافونويدات (بتفاعل مع AIC<sub>3</sub>)، والتانينات (بطريقة الفانيليلين)، عن مستويات مرتفعة من البوليفينولات ( $0.04 \pm 3.31$ ) ملغ مكافئ حمض الغاليك/غ من المستخلص الجاف، الفلافونويدات ( $0.10 \pm 3.35$ ) ملغ مكافئ كيرسيتين/غ، والتانينات ( $0.004 \pm 1.61$ ) ملغ مكافئ حمض التانيك/غ. مكّنت التحليل بواسطة LC-MS/MS من تحديد تسعة مركبات نشطة حيويًا، وكان من بينها الهيسبيردين الذي تم تحديد كميته بـ 22.86 ملغ/غ. أظهر المستخلص نشاطاً مضاداً للأوكسدة بشكل ملحوظ، بقيم IC<sub>50</sub> بلغت  $0.05 \pm 0.126$  ملغ/مل لاختبار DPPH، و  $0.04 \pm 0.104$  ملغ/مل لاختبار ABTS، بالإضافة إلى قدرة مضادة للأوكسدة كلية TAC بلغت  $0.03 \pm 0.291$  لاختبار CUPRAC وقيمة  $A_{0.5} = 0.271 \pm 0.08$ . كما سجل نشاط مضاد للميكروبات بطريقة النشر على الأجار، حيث أظهر المستخلص نشاطاً قوياً ضد *Escherichia coli* (18.5 ملغ)، و *Klebsiella pneumoniae* (19 ملغ)، مع مناطق تثبيط وصلت إلى 20 ملم ضد *Pseudomonas aeruginosa*. تم تقييم التأثيرات المضادة للالتهاب (باستخدام نموذج وذمة الأذن الناتجة عن الزيلين) والمسكنة للألم (عن طريق اختبار غمر الذيل) *in vivo* على جرذان ويستار. أدى إعطاء مستخلص *Ruta montana* بجرعة 100 ملغ/كغ إلى تقليل سماكة الأذن بنسبة 38.23% ( $p < 0.05$ ) بعد 90 دقيقة، وهو تأثير مشابه لتأثير الأسبرين. كما أظهر اختبار غمر الذيل تأثيراً مسكناً للجرعة بشكل معتمد على الجرعة، حيث زاد زمن الكمون في الاستجابة حتى 4.0 ثوانٍ ( $p < 0.05$ ). شملت دراسة التقييم التأثير المعدل للمستخلص على 42 جرد ذكر بوزن متوسط  $178 \pm 67.2$  غرام، تم تقسيمهم إلى ست مجموعات مكونة من سبعة حيوانات لكل منها. مجموعة شاهدة، مجموعة TBC عولجت بـ 100 ملغ/كغ من التبوكونازول. المجموعة الثالثة (RMI) والرابعة (RMII) عولجت على التوالي بـ 50 و 100 ملغ/كغ من مستخلص *Ruta montana*. المجموعة الخامسة (TBC+RMI) والسادسة (TBC+RMII) تم علاجها بمزيج من التبوكونازول ومستخلص *Ruta montana*. بعد 50 يوماً من المعالجة الفموية للجرذان، تم إجراء تحاليل دموية، بيوكيميائية، وهرمونية، بالإضافة إلى تحليل الحيوانات المنوية ودراسة نسيجية. أظهرت النتائج بوضوح أن التبوكونازول يسبب سمية كبدية (زيادة AST، ALT، ALP)، وسمية كلوية (ارتفاع الكرياتينين واليوريا)، واضطرابات هرمونية (انخفاض التستوستيرون)، وتغيرات نسيجية في الكبد والكلى والخصيتين. وقد أظهر إعطاء مزيج TBC + RM تحسناً واضحاً في هذه المعايير. أكدت التحاليل *in silico* باستخدام SwissADME و pkCSM على التوافر الحيوي وسلامة مركبات *Ruta montana*. توضح هذه الدراسة بجلاء أن مستخلص *Ruta montana* يمتلك قدرة مضادة للأوكسدة، مضادة للالتهاب، ومضادة للميكروبات، مع فعالية ملحوظة كمعدل ضد السمية الناتجة عن التبوكونازول، مما يبرز إمكانياته العلاجية كعامل وقائي طبيعي.

**الكلمات المفتاحية:** *Ruta montana*، LCMS، أنشطة بيولوجية *in vitro*، الجرذان، التبوكونازول، السمية الكبدية والكلى، اختبار *in silico*.

## Liste des abréviations

### A

- ABTS : 2,2'-Azino-Bis(3-Éthylbenzothiazoline-6-Sulfonique)
- AChE : Acétylcholinestérase
- ADMET : Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion, Toxicité
- AhR : Récepteur Aryl Hydrocarbure
- ALB : Albumine
- ALP : Phosphatase Alcaline
- ALT/TGP : Alanine Aminotransférase / Transaminase Glutamique-Pyruvique
- ANOVA : Analysis of Variance (Analyse de Variance)
- AST/TGO : Aspartate Aminotransférase / Transaminase Glutamique-Oxaloacétique

### B

- BBB : Barrière Hémato-Encéphalique (Blood-Brain Barrier)
- BCFs : Facteurs de Bioconcentration
- BHT : Butylhydroxytoluène (antioxydant synthétique)
- BPA : Bisphénol A (mentionné dans les références toxicologiques)

### C

- CYP450 : Cytochrome P450 (famille d'enzymes hépatiques)
- CUPRAC : Cupric Reducing Antioxidant Capacity
- CV : Congestion Vasculaire

### D

- DL50 : Dose Létale Médiane (50 % de mortalité)
- DPPH : 2,2-Diphényl-1-Picrylhydrazyle
- DTNB : 5,5'-Dithiobis(2-Nitrobenzoïque) (réactif pour l'AChE)

### E

- EC50 : Concentration Efficace Médiane
- EDTA : Éthylène Diamine Tétracétique
- ELFA : Enzyme-Linked Fluorescent Assay (dosage hormonal)
- ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène
- ESM : Erreur Standard de la Moyenne (SEM)

## **F**

- FSH : Hormone Folliculo-Stimulante

## **G**

- GAE : Équivalent en Acide Gallique (Gallic Acid Equivalent)
- GI : Gastro-Intestinal
- GLU : Glucose

## **H**

- HDL : Lipoprotéines de Haute Densité
- HE : Huile Essentielle
- H&E : Coloration Hématoxyline-Éosine
- hERG : Human Ether-à-go-go-Related Gene (canal potassique cardiaque)

## **I**

- IC50 : Concentration Inhibitrice Médiane (50 % d'inhibition)
- II : Infiltrat Inflammatoire
- INPN : Inventaire National du Patrimoine Naturel

## **L**

- LC-MS/MS : Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse en Tandem
- LDH : Lactate Déshydrogénase
- LDL : Lipoprotéines de Basse Densité
- LH : Hormone Lutéinisante
- LOAEL : Lowest-Observed-Adverse-Effect Level
- LMD : Licence-Master-Doctorat (système éducatif)

## **M**

- MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
- MDR : Résistance Multi-Médicamenteuse (Multi-Drug Resistance)

## **N**

- NO : Oxyde Nitrique
- NOAEC : No-Observed-Adverse-Effect Concentration
- NT : Non Testé

## O

- OCDE : Organisation de Coopération et de Développement Économiques
- OMS : Organisation Mondiale de la Santé

## P

- PGP : P-Glycoprotéine (transporteur d'efflux)
- PKCSM : Outil de prédiction pharmacocinétique/toxicologique
- PLT : Plaquettes
- POLA : Polarité (paramètre SwissADME)

## R

- RBC : Globules Rouges (Red Blood Cells)
- RM : Ruta montana
- ROS : Espèces Réactives de l'Oxygène (Reactive Oxygen Species)
- RS : Score de Risque (Risk Score)

## S

- SEM : Erreur Standard de la Moyenne (Standard Error of the Mean)
- SNV : Sciences de la Nature et de la Vie
- SwissADME : Base de données pour l'évaluation des molécules

## T

- TAC : Capacité Antioxydante Totale
- TB : Bilirubine Totale
- TBC : Tébuconazole
- TC : Cholestérol Total
- TG : Triglycérides
- TNF- $\alpha$  : Facteur de Nécrose Tumorale alpha (mentionné en contexte inflammatoire)
- TP : Protéines Totales
- TPSA : Surface Polaire Topologique (Topological Polar Surface Area)

## U

- UFC : Unité Formant Colonie
- UPLC : Chromatographie Liquide Ultra Performante (Ultra Performance LC)

## **V**

- VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor (mentionné en contexte toxicologique)

## **W**

- WBC : Globules Blancs (White Blood Cells)

## **Z**

- ZI : Zone d'Inhibition (tests antimicrobiens)

## Liste des Figures :

<b>Figure 1</b>	Structure chimique du triazole : (a) 3 Dimension (3D), (b) Structure en 2 Dimension (2D)	4
<b>Figure 2</b>	Schéma récapitulatif des principaux effets toxiques du tébuconazole et de ses voies de dégradation, montrant l'impact sur divers organes	8
<b>Figure 3</b>	Morphologie de <i>Ruta montana</i>	10
<b>Figure 4</b>	Classification taxonomique de la plante <i>Ruta montana</i>	11
<b>Figure 5</b>	Distribution géographique de la plante <i>Ruta montana</i>	12
<b>Figure 6</b>	Composés chimiques isolés à partir d'extraits de <i>Ruta montana</i>	14
<b>Figure 7</b>	Localisation du site d'échantillonnage de <i>Ruta montana</i>	19
<b>Figure 8</b>	Représentation graphique élaborant les différentes étapes de l'étude phytochimique	20
<b>Figure 9</b>	Dosage des polyphénols totaux	21
<b>Figure 10</b>	Dosage des flavonoïdes	22
<b>Figure 11</b>	Dosage des tanins	22
<b>Figure 12</b>	Méthode DPPH	24
<b>Figure 13</b>	Méthode ABTS	25
<b>Figure 14</b>	Test d'activité antioxydante totale	26
<b>Figure 15</b>	Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre	27
<b>Figure 16</b>	Evaluation de l'activité anti-uréase	28
<b>Figure 17</b>	Evaluation de l'activité anticholinestérase	28
<b>Figure 18</b>	Résumé du protocole expérimental de l'étude biologique <i>in vivo</i>	32
<b>Figure 19</b>	Site web de la base de données SwissADME	37
<b>Figure 20</b>	Site web de la base de données PKCSM	37
<b>Figure 21</b>	Structure des composés de <i>Ruta montana</i> par LC-MS	42
<b>Figure 22</b>	Composition des composés phénoliques identifiés par analyse LC-MS	44
<b>Figure 23</b>	Zone d'inhibition des souches bactériennes et fongiques par l'extrait de <i>R. montana</i>	50
<b>Figure 24</b>	Réponse des souches microbiennes à l'extrait de <i>R. montana</i>	50
<b>Figure 25</b>	Hexagones de biodisponibilité des principales molécules identifiées dans <i>Ruta montana</i> , déterminés par analyse LC-MS	57

<b>Figure 26</b>	Modèle de BOILED-Egg des molécules identifiées de <i>Ruta montana</i> évaluées par analyse LC-MS	58
<b>Figure 27</b>	Moyenne des poids corporels chez les rats	63
<b>Figure 28</b>	Moyenne des marqueurs biochimiques enzymatiques	67
<b>Figure 29</b>	Moyenne des activités biochimiques du cholestérol	68
<b>Figure 30</b>	Moyenne des activités biochimiques	69
<b>Figure 31</b>	Microphotographie du tissu hépatique des rats témoins et traités (grossissement X400)	72
<b>Figure 32</b>	Effets du TBC et RM sur les biomarqueurs de la fonction rénale	74
<b>Figure 33</b>	Effets du TBC et RM sur les paramètres biochimiques minéraux	75
<b>Figure 34</b>	Microphotographie du tissu rénal des rats témoins et traités	77
<b>Figure 35</b>	Variation de la vitalité et mortalité des spermatozoïdes en réponse au traitement par TBC et RM	80
<b>Figure 36</b>	Effets du TBC et RM sur les niveaux hormonaux	81
<b>Figure 37</b>	Microphotographie du tissu testiculaire des rats témoins et traités (grossissement X400)	84
<b>Figure 38</b>	Prédiction des propriétés physicochimiques, pharmacocinétiques et d'absorption du TBC (ADMET)	87
<b>Figure 39</b>	Évolution de l'épaisseur de l'oreille suite à l'œdème induit par le xylène après administration orale de la solution de <i>Ruta montana</i> en fonction du temps.	91
<b>Figure 40</b>	Effet analgésique de <i>Ruta montana</i> par administration orale suite au test de l'immersion de queue.	92

## Liste des Tableaux :

<b>Tableau 1</b>	Matière active du tébuconazole	5
<b>Tableau 2</b>	Caractéristiques botaniques de <i>Ruta montana</i>	10
<b>Tableau 3</b>	Teneur en polyphénols, flavonoïdes et tanins dans l'extrait éthanolique de <i>Ruta montana</i>	40
<b>Tableau 4</b>	Composition des composés phénoliques identifiés à l'aide de l'analyse LC-MS	43
<b>Tableau 5</b>	Activité antioxydante de l'extrait éthanolique de <i>Ruta montana</i>	47
<b>Tableau 6</b>	Évaluation de l'activité anti-uréase de l'extrait de <i>Ruta montana</i> et de la Thiourea standard, ainsi que de l'activité anticholinestérase de <i>Ruta montana</i> et de la Galantamine standard à différentes concentrations	52
<b>Tableau 7</b>	Propriétés physicochimiques et lipophilie des principaux composés identifiés dans <i>Ruta montana</i>	54
<b>Tableau 8</b>	Médicamentabilité, biodisponibilité et pharmacocinétique des principaux composés identifiés dans <i>Ruta montana</i>	55
<b>Tableau 9</b>	Toxicité AMES, dose maximale tolérée (homme), toxicité aiguë par voie orale pour le rat, toxicité chronique par voie orale pour le rat (LOAEL), hépatotoxicité et sensibilisation de la peau à l'aide de l'outil web pkCSM	60
<b>Tableau 10</b>	Moyenne des poids corporels ainsi que des poids relatifs du foie, des reins et des testicules entre les rats témoins et ceux traités avec <i>Ruta montana</i> (RM), tébuconazole (TBC) et leurs combinaisons après 50 jours d'expérimentation	62
<b>Tableau 11</b>	Moyenne marqueurs hématologiques plasmatiques du contrôle et des rats traités avec <i>Ruta montana</i> (RM), Tébuconazole (TBC) et traitement combiné de Tébuconazole et <i>Ruta montana</i> après 50 jours d'essai expérimental	64
<b>Tableau 12</b>	Moyenne des poids relatifs du foie entre les rats témoins et ceux traités avec <i>Ruta montana</i> (RM), tébuconazole (TBC) et leurs combinaisons après 50 jours d'expérimentation.	65

<b>Tableau 13</b>	Dosages des enzymes hépatiques	66
<b>Tableau 14</b>	Variation des paramètres biochimiques suite au traitement	70
<b>Tableau 15</b>	Moyenne des poids relatifs des reins et des testicules entre les rats témoins et ceux traités avec <i>Ruta montana</i> (RM), Tébuconazole (TBC) et leurs combinaisons après 50 jours d'expérimentation.	73
<b>Tableau 16</b>	Moyenne des marqueurs biochimiques plasmatiques des reins du contrôle et des rats traités avec <i>Ruta montana</i> (RM), Tébuconazole (TBC) et traitement combiné de Tébuconazole et <i>Ruta montana</i> après 50 jours d'essai expérimental	76
<b>Tableau 17</b>	Moyenne des poids relatifs des testicules entre les rats témoins et ceux traités avec <i>Ruta montana</i> (RM), Tébuconazole (TBC) et leurs combinaisons après 50 jours d'expérimentation.	78
<b>Tableau 18</b>	Variation de la vitalité et la mortalité des spermatozoïdes chez les rats ( <i>Rattus norvegicus</i> )	79
<b>Tableau 19</b>	Effets du Tébuconazole (TBC) et de <i>Ruta montana</i> (RM) sur les niveaux hormonaux (FSH, LH et Testostérone) chez les rats après 50 jours d'exposition	82
<b>Tableau 20</b>	Propriétés physicochimiques et lipophilie	86
<b>Tableau 21</b>	Médicamentabilité, biodisponibilité et pharmacocinétique	86
<b>Tableau 22</b>	Caractéristiques Toxicologiques et Prédiction de Valeurs du Modèle Chimique tébuconazole	89



# *Introduction*

Les pesticides sont des substances utilisées pour contrôler ou bien éliminer les organismes nuisibles tels que les insectes, les mauvaises herbes, les champignons ou autres organismes pouvant nuire aux cultures, aux animaux ou aux êtres humains. Ces composés quelque soit naturels ou chimiquement synthétisés, sont largement utilisés dans l'agriculture, la sylviculture, l'aquaculture, et d'autres secteurs pour améliorer la productivité et protéger les approvisionnements alimentaires (**Tudi et al., 2021**).

Le tébuconazole (TBC) est un fongicide appartenant à la famille des triazoles (**Bošković et al., 2021**), joue un rôle crucial dans l'agriculture moderne, étant utilisé pour gérer une large gamme d'infections fongiques, notamment sur les céréales, les cultures, les fruits et les légumes (**Li et al., 2012 ; Ben Othmène et al., 2020**). Néanmoins, son application généralisée a entraîné une exposition potentielle chez les mammifères (**De Rossi et al., 2003**). Plusieurs études ont rassemblé des preuves substantielles suggérant que l'exposition au tébuconazole, par diverses voies, pourrait avoir des implications sur la santé et induire des pathologies dans plusieurs organes (**Goetz et al., 2007; Ben Othmène et al., 2020**). L'exposition au tébuconazole peut entraîner des déficiences immunologiques, neurocomportementales et neuropathologiques (**Ben Saad et al., 2017**). Certaines études toxicologiques ont mis en évidence que le tébuconazole peut également entraîner une augmentation des anomalies chromosomiques et des échanges entre chromatides sœurs dans les lymphocytes du sang périphérique des vaches (**Yang et al., 2019**). L'administration de tébuconazole s'est traduite par une augmentation des niveaux d'ARNm de Cyp1a2, de Cyp2b10, de Cyp3a11 et de la réductase NADPH-cytochrome P450 dans les hépatocytes de souris (**Tamura et al., 2013**). Ainsi, le TBC se présente comme un xénobiotique redoutable qui pourrait potentiellement induire une toxicité hépatique, rénale et même reproductrice et un stress oxydatif (**Joshi et al., 2016**), des altérations métaboliques (**Ku et al., 2021**) et même la mortalité chez divers organismes (**Perez-Rodriguez et al., 2019**).

Ainsi, la nécessité de trouver des moyens et des solutions efficaces pour réduire les effets nocifs des pesticides est devenue incontournable. Bien que la médecine moderne ait fait des progrès significatifs, la majorité des individus ont une préférence pour les traitements traditionnels. Selon des données récentes, 80 % de la population mondiale a recours à des traitements traditionnels, généralement basés sur l'utilisation d'extraits de plantes ou de composés bioactifs (**Rajčević et al., 2020**).

En raison de leur faible incidence d'effets secondaires et de leurs propriétés bénéfiques pour la santé, les produits pharmaceutiques issus des plantes suscitent un vif intérêt pour les

chercheurs depuis de nombreuses années (Aye et al., 2019). La *Ruta montana* est une plante appréciée dans le domaine de la médecine traditionnelle pour ses propriétés thérapeutiques. Cette plante contient des composés bioactifs comme des coumarines, des phénols, des alcaloïdes, des flavones et des tanins, qui contribuent à ses propriétés médicinales (Mahdeb et al., 2023). Certains composés pourraient avoir des propriétés anti-inflammatoires (Zeichen et al., 2000 ; Raghav et al., 2006). De plus, la plante contient des composés anticancéreux et antioxydants. Elle est aussi traditionnellement utilisée pour traiter différentes maladies de la peau (Mohammedi et al., 2020). Une étude récente montre que *Ruta montana* procède des propriétés antibactériennes, antifongiques, antidiabétiques et insecticides (Benkhaira et al. 2022). D'autres auteurs comme El Ouady et Eddouks (2021) soulignent l'effet bénéfique de *Ruta montana* dans le traitement de l'hypertension, recommandant son utilisation comme thérapie antihypertensive. Selon Benkhaira et al. (2022), *Ruta montana* présente une efficacité contre les effets des piqûres d'animaux venimeux et qu'elle exerce un effet bénéfique sur la paralysie faciale.

Actuellement face à un manque de confirmation scientifique rigoureuse concernant son efficacité médicinale et sa capacité de détoxification ou de modération. Cette étude vise à évaluer le potentiel protecteur et modulateur de l'extrait hydro-éthanolique *Ruta montana* contre les effets toxiques induits par le tébuconazole chez des rats Wistar mâles sur la fonction hépatorenale et reproductive et de caractériser la composition phytochimique de cette plante à l'aide de dosages par spectrophotométrie et d'analyses LC-MS afin d'examiner si les propriétés moléculaires de *Ruta montana* confèrent une action bénéfique face à cette exposition. Une modélisation toxicocinétique et pharmacocinétique du tébuconazole et des composés de la plante identifiés a été effectuée pour mieux appréhender les mécanismes d'action.

De plus, nous avons examiné les propriétés antimicrobiennes, anti-enzymatiques *in vitro* et anti-inflammatoires *in vivo* de l'extrait de *Ruta montana* afin d'évaluer son potentiel thérapeutique, en analysant son efficacité contre divers agents pathogènes, son influence sur l'inhibition d'enzymes essentielles liée à certaines pathologies, ainsi que sa capacité à moduler la réponse inflammatoire dans un modèle biologique.

Notre étude est organisée de manière rigoureuse en trois chapitres distincts, chacun abordant une partie spécifique du sujet étudié. Le premier chapitre constitue une synthèse bibliographique qui présente, de manière récapitulative, les données disponibles sur le

## Introduction

tébuconazole dans une première partie, suivies des informations relatives à la plante *Ruta montana* dans une seconde partie.

Le deuxième chapitre présente le matériel et les méthodes utilisés pour la mise en place des expérimentations.

Le troisième chapitre est consacré à la description des principaux résultats obtenus et à leur discussion.

Enfin, une conclusion est donnée à la fin du présent travail en tirant les principaux résultats obtenus et les perspectives qui pourraient initier d'autres travaux de recherche.



# *Chapitre I*

## *Revue bibliographique*

## Partie 1. Tébuconazole

### 1. Généralités sur les pesticides :

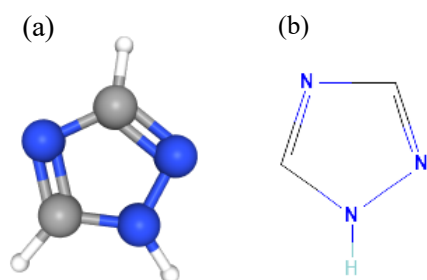
Le terme "pesticide" est dérivé du latin "cidae", signifiant "tueur " et du mot anglais "Pest ", qui désigne toute substance utilisée pour contrôler, prévenir, détruire, repousser ou atténuer les nuisibles (**Perry et al., 1998**).

Les pesticides sont classés en fonction de leurs organismes cibles, tels que les insecticides pour les insectes, les herbicides pour les mauvaises herbes et les fongicides pour les champignons. Ils peuvent également être différenciés selon leur structure chimique, leur mode d'action et leur niveau de toxicité (**Hassaan et Nemr, 2020**).

Les pesticides les plus couramment utilisés en Algérie incluent les insecticides, les fongicides et les herbicides. Les insecticides représentent environ 47 % et les fongicides 41 % des pesticides utilisés dans les cultures de tomates en Algérie occidentale (**Gaouar et al., 2021**). L'utilisation massive des néonicotinoïdes, des triazoles et des organophosphates, combinée à des pratiques d'application qui ne respectent pas toujours les bonnes pratiques agricoles, engendre des conséquences néfastes pour la santé humaine et l'environnement (**Oultaf et al., 2022**).

### 2. Triazoles :

Les triazoles sont une classe de composés hétérocycliques contenant de l'azote caractérisés par une structure en anneau à cinq membres composée de deux atomes de carbone et de trois atomes d'azote, avec la formule moléculaire  $C_2H_3N_3$  (**Deng et al., 2023**) (**Figure 1**). Il existe deux principaux types de triazoles : le 1,2,3-triazole et le 1,2,4-triazole, qui se distinguent l'un de l'autre par l'agencement des atomes d'azote dans le cycle (**Matin et al., 2022**).



**Figure 1** : Structure chimique du triazole : (a) 3 Dimension (3D), (b) Structure en 2 Dimension (2D).

Les fongicides triazoles sont efficaces contre des maladies comme la fusariose du blé, augmentant ainsi les rendements agricoles. Cependant, ils peuvent perturber des symbioses essentielles, comme celle entre les légumineuses et *Rhizobium*, nécessaire à la fixation de l'azote qui peut réduire la formation des nodules et affecter la croissance des plantes (Gorshkov et al., 2023).

### 3. Tébuconazole :

Le tébuconazole (nom ISO) appartenant à la famille des triazoles, est utilisé comme substance active de produits phytopharmaceutiques en tant que fongicide et régulateur de croissance de plantes. le nom commun ISO pour le (RS)-1-p-chlorophényl-4,4-diméthyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ylméthyl) pentan-3-ol (IUPAC) (EFSA, 2014).

#### 3.1. Structure moléculaire :

Sa structure moléculaire contient un anneau aromatique, ce qui lui confère des propriétés spécifiques et des effets potentiellement perturbateurs sur le système endocrinien, c'est-à-dire sur les hormones et les glandes endocrines du corps (Morena et al., 2025). La présence du tébuconazole a été de plus en plus détectée dans de nombreuses régions du monde (Gómez-Martínez et al., 2024). Le Tableau 1 présente en détail la matière active du tébuconazole, en mettant en avant ses propriétés.

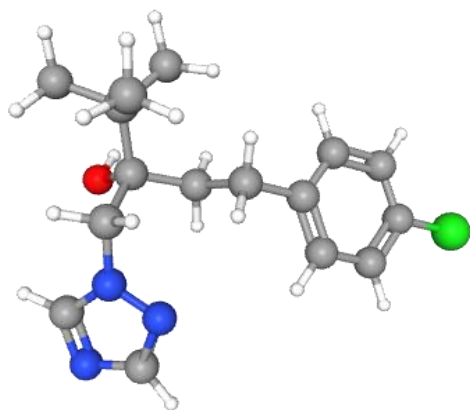
Tableau 1 : Matière active du tébuconazole (Santé Canada, 2016).

Description de la matière active	
Matière active	Tébuconazole
Fonction	Fongicide
<b>Nom chimique :</b>	
<b>1. Union internationale de chimie pure et appliquée :</b>	
rac-(3R)-1-(4-chlorophényl)-4,4-diméthyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ylméthyl)pentan-3-ol	
<b>2. Chemical Abstracts Service :</b>	
$\alpha$ -[2-(4-chlorophényl) éthyl] - $\alpha$ -(1,1-diméthyléthyl) -1H-1,2,4- triazole-1-éthanol	
<b>Numéro du Chemical Abstracts Service :</b>	107534-96-3
<b>Formule moléculaire</b>	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> ClN <sub>3</sub> O
<b>Masse moléculaire</b>	307,8
<b>Pureté de la matière active</b>	97 %

---

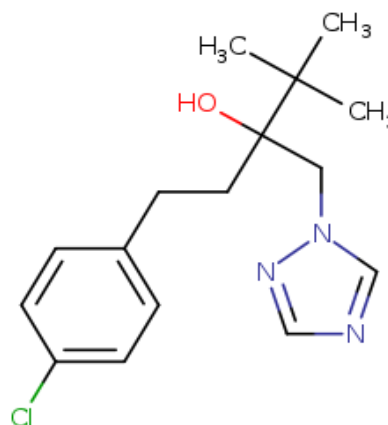
**Structure du Tébuconazole :**

(a)



**(a) Structure en 3 Dimension (3D),**

(b)



**(b) Structure en 2 Dimension (2D).**

---

**3.2. Résidues du Tébuconazole :**

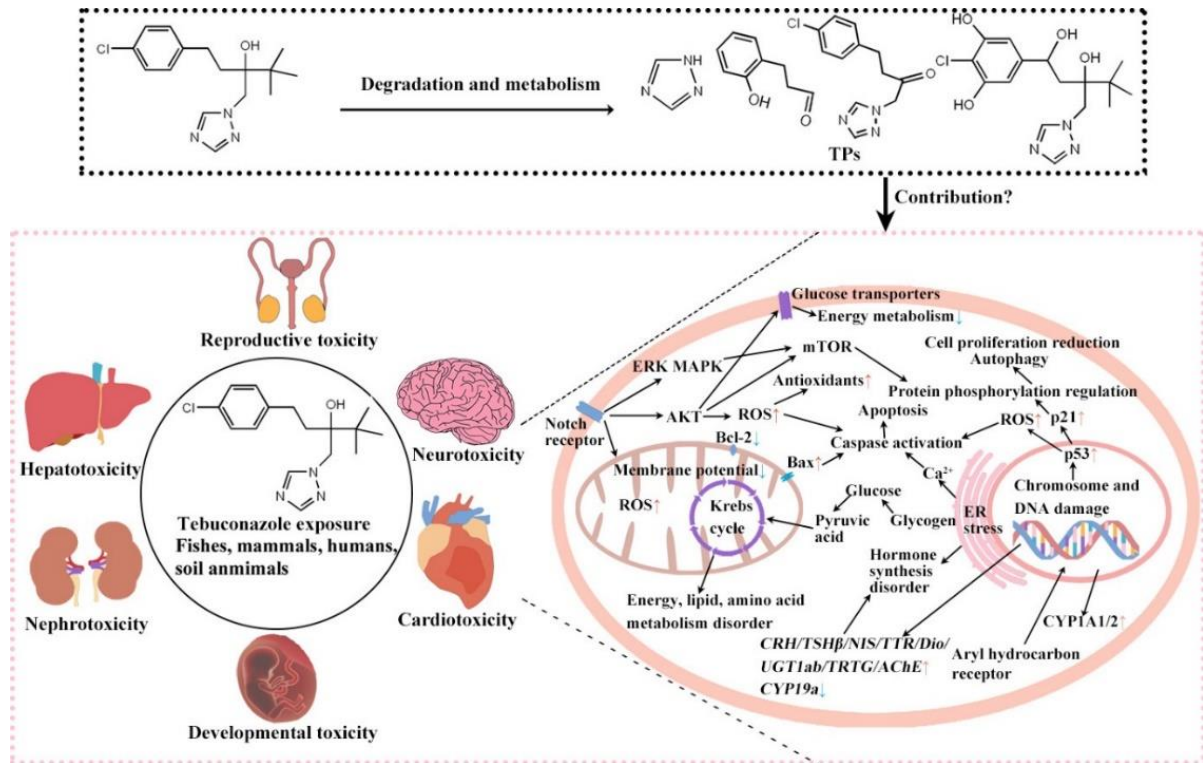
Les résidus de tébuconazole ont été fréquemment détectés à des concentrations de 143.1 ng/g dans les cheveux des travailleurs agricoles (Polledri et al., 2018), de 1,14 à 234,7 µg/kg dans le sol (Polat and Tiryaki, 2023), pouvant atteindre 1,60 mg/kg dans les fruits et légumes (Gondo et al., 2021; Wang et al., 2023), 0.012 à 0.098 mg/kg dans les céréales (Thabit et al., 2021), entre 8,0 et 1400 ng/L dans les zones humides (Kang et al., 2020), et jusqu'à quelques dizaines de ng/L dans l'eau (Carena et al., 2022 ;Awwad et al., 2023). En outre, le tébuconazole présente une toxicité potentielle sur le développement, la reproduction, ainsi qu'un risque de mutagénicité, de cancérogénicité et de neurotoxicité (Zhang et al., 2020 ; Jia et al., 2022 ; Li et al., 2022).

**3.3. Mécanisme d'action du tébuconazole et ses effets toxiques :**

Sur le plan écologique, le tébuconazole s'accumule dans les organismes et compromet la santé des écosystèmes ainsi que la biodiversité. Il est reconnu comme un perturbateur endocrinien (Ying et al., 2021), il peut ainsi entraîner des modifications de la différenciation sexuelle et de la fécondité, ainsi qu'un déséquilibre des taux d'hormones stéroïdiennes (Li et al., 2019 ; Ma et al., 2020). Les modèles gestationnels chez le rat montrent un transfert placentaire du tébuconazole, conduisant à une accumulation fœtale dans le foie et le cerveau, associée à un faible poids à la naissance et une féminisation des fœtus mâles (Ying et al., 2021). L'accumulations du tébuconazole dans certains organes comme le foie, entraînant des dommages

histopathologiques, une hypertrophie hépatique et une stéatose. Ces effets sont associés à la dysrégulation des enzymes métabolisantes et au stress oxydatif, médiés par les espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Ku et al., 2021). Chez le rat Wistar, une exposition chronique (10–50 mg/kg/jour pendant 28 jours) induit une perturbation des enzymes hépatiques CYP450, un stress oxydatif systémique et des anomalies spermatiques, avec une accumulation préférentielle dans le foie, les reins et les tissus adipeux (Yang et al., 2018 ; Ben Othmène et al., 2020). Les études *in vitro* sur cellules HepG2 révèlent une génotoxicité marquée ( $EC_{50} = 129 \mu\text{mol/L}$  à 24 h), liée à l'activation des CYP1A1/1A2 via le récepteur AhR, générant des métabolites réactifs localisés dans les mitochondries et le réticulum endoplasmique (Knebel et al., 2019 ; Barrón Cuenca et al., 2022).

Le tébuconazole présente une toxicité multifactorielle chez les mammifères et les cellules humaines, associée à une pharmacocinétique complexe, (Annexe 1). Dans les cellules HCT116, le tébuconazole provoque une apoptose via un stress du réticulum endoplasmique ( $EC_{50} = 15,4 \mu\text{mol/L}$ ), avec une perméabilité membranaire élevée due à sa lipophilicité et une transformation en métabolites hydroxylés (Ben Othmène et al., 2022). Chez l'humain, l'exposition professionnelle entraîne une absorption cutanée et par inhalation, avec détection de résidus (143.1 ng/kg) dans les cheveux et excrétion urinaire de métabolites glucuronidés sous 48–72 heures (Mercadante et al., 2014 ; Polledri et al., 2018). Selon Dong (2024), le fongicide tébuconazole déclenche un stress oxydatif (augmentation des ROS), entraînant l'oxydation de l'ADN, des protéines et des lipides, tout en réduisant les défenses antioxydantes (Figure 2). Il perturbe également le métabolisme énergétique (cycle de Krebs, transport du glucose), les voies de signalisation (mTOR, Akt) et inhibe des enzymes essentielles (CYP19a pour la reproduction, AChE pour la neurotoxicité), tout en affectant le calcium (cardiotoxicité) et en causant des dommages rénaux (néphrotoxicité). Ces déséquilibres conduisent à une mort cellulaire programmée (diminution de Bcl-2, hausse de Bax) et peuvent engendrer des dysfonctionnements hormonaux. Enfin, les lymphocytes bovins exposés *in vitro* ( $0.33\text{--}1.67 \times \text{NOAEC}$ ) présentent des aberrations chromosomiques et une réduction de la prolifération, soulignant un risque génotoxique à des concentrations sublétales (Siviková et al., 2013).



**Figure 2 :** Schéma récapitulatif des principaux effets toxiques du tébuconazole et de ses voies de dégradation, montrant l'impact sur divers organes (foie, reins, cœur, cerveau, système reproducteur) et la perturbation de processus cellulaires (stress oxydatif, mort cellulaire, dérégulation métabolique et hormonale) (Dong, 2024).

## Partie 2. *Ruta montana*

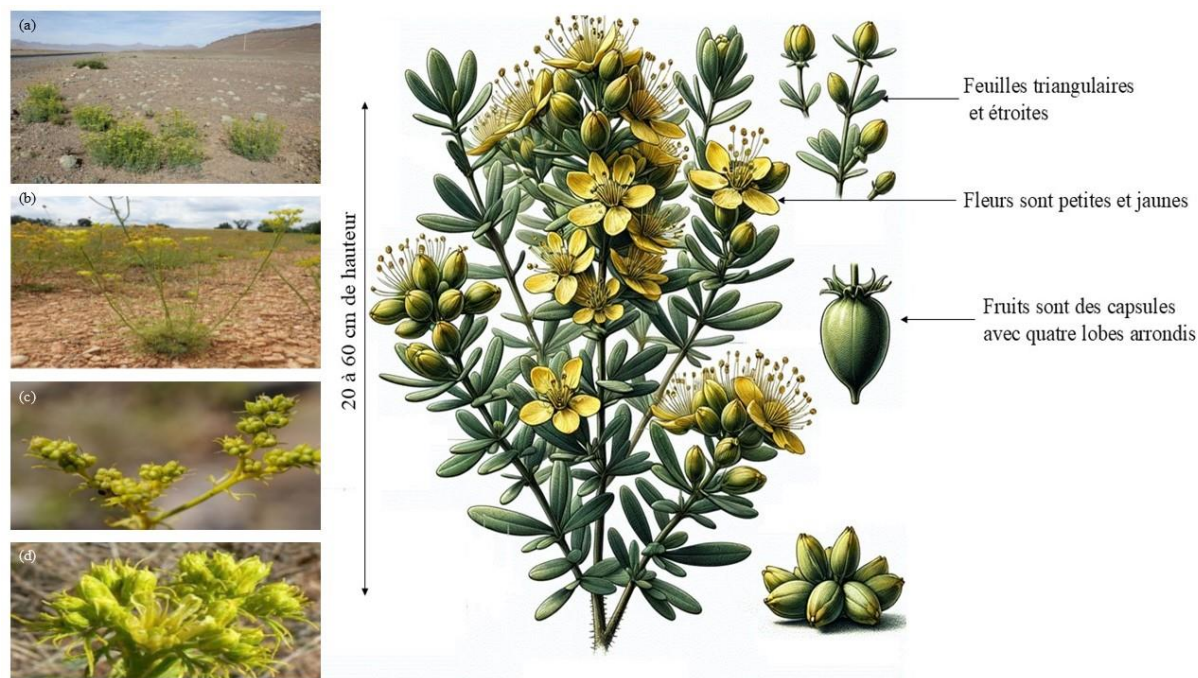
### 1. Définition et Noms communs :

*Ruta montana* appartenant à la famille des Rutaceae, est une plante médicinale et aromatique typique de la région méditerranéenne. Elle est souvent confondue avec d'autres espèces du même genre, telles que *Ruta chalepensis* et *Ruta graveolens*, en raison de leur faible différenciation morphologique (Pollio et al., 2008; Nahar et al., 2021). Les plantes du genre *Ruta* sont des arbustes vivaces, connus pour leur richesse en huiles essentielles, principalement composées de cétones aliphatiques comme le 2-undécane et le 2-nonane (Nahar et al., 2021 ; Coimbra et al., 2020). L'espèce *Ruta montana* (RM) comprend différents noms communs. Elle est connue sous le nom de « Fijel » en arabe et « Awermi » en berbère. Elle est appelée « Rue des montagnes » en français et « Mountain Rue » en anglais. Il a été conclu que le nom vernaculaire de cette plante varie en fonction de chaque pays ou région. En effet, la RM peut prendre diverses appellations vernaculaires ou bien autochtone, notamment Fijel, El Fijel, Aourmi ou Awermi (Maroc, Tunisie et Algérie), Sedef (Turquie), Arruda (Portugal) et Ruda de jardín (Espagne).

### 2. Description botanique :

*Ruta montana* est un arbuste à feuilles persistantes mesurant entre 20 et 60 cm de haut, caractérisé par des tiges grêles et des feuilles triangulaires, maigres, de couleur vert glauque à blanchâtre, profondément découpées en segments linéaires, le segment terminal étant légèrement plus large ses fleurs petites et jaunes sont caractérisées par leur bisexualité, avec deux verticilles d'étamines et des pétales spatulés aux bords légèrement dentés, regroupées en grappes serrées (Benkhaira et al., 2022) (Figure 3).

Le fruit est une capsule globuleuse portée par un pédoncule court, ne dépasse pas 4 mm et présente quatre à cinq lobes arrondis bien visibles ; elle dégage une odeur forte et nauséabonde en raison d'une huile essentielle contenue dans de grandes glandes sécrétrices (Mohammedi et al., 2020). Les caractéristiques botaniques de la RM sont présentées dans le Tableau 2.



**Figure 3** : Morphologie de *Ruta montana*, (a) Habitat ; (b) plante entière ; (c) fleurs ; et (d). fruits.

**Tableau 2** : Caractéristiques botaniques de *Ruta montana* (Benkhaira et al., 2022).

Type de plante	Hauteur	Caractéristiques générales de la plante	Période de floraison
Arbuste vivace	20-60 cm	Tiges grêles. Feuilles vert clair - Segments obovales Les fleurs sont petites, jaunes, portées en cymes dichasiques. Les fruits sont arrondis, petits et lobulés	Mai-août

### 3. Taxonomie :

La *Ruta montana* 1756, est une espèce végétale appartenant au domaine Biota (organismes vivants), au règne Plantae (plantes) selon Haeckel (1866), et plus précisément au sous-règne Viridaeplantae (plantes vertes) (**Figure 4**). Elle s'inscrit dans l'infrarègne Streptophyta (John, Williamson et Guiry, 2011), regroupant les plantes terrestres et les algues charophytes. Classée dans la classe Equisetopsida (C.Agardh, 1825), elle fait partie du clade

Tracheophyta (Sinnott ex Cavalier-Smith, 1998), qui désigne les plantes vasculaires, et du clade Spermatophyta (plantes à graines). Au sein de la sous-classe Magnoliidae (Novák ex Takht., 1967), elle relève du super-ordre Rosanae (Takht., 1967), un groupe caractérisé par des affinités évolutives avec les Rosidées. Elle appartient à l'ordre Sapindales (Juss. ex Bercht. et J.Presl, 1820), connu pour des familles comme les Rutacées. Au sein de cette dernière famille (Rutaceae, Juss., 1789), elle se rattache à la sous-famille Rutoideae (Arn., 1832) et au genre *Ruta* (L., 1753), regroupant des plantes aromatiques méditerranéennes. L'espèce *Ruta montana*, décrite par Linné en 1756, incarne ainsi une biodiversité adaptée aux milieux montagneux ou secs, typique des Rutacées (INPN, 2025).

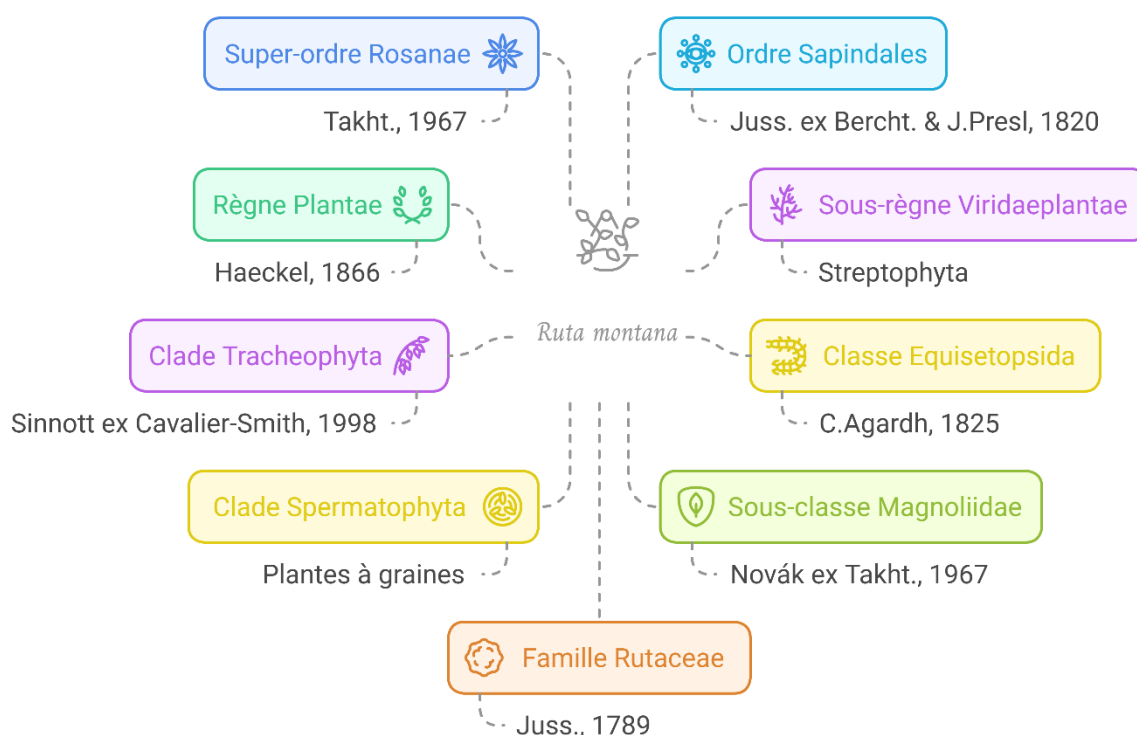


Figure 4 : Classification taxonomique de la plante *Ruta montana* (Napkin.IA, 2025).

#### 4. Distribution Géographique :

*Ruta montana* est un sous-arbrisseau à feuilles persistantes fortement odorant que l'on trouve principalement dans les régions tempérées, tropicales et arides (Figure.3 a). Il s'agit d'une plante spontanée largement répandue dans la région méditerranéenne (Driouèche et al., 2020), où elle est bien adaptée aux conditions climatiques locales (Pollio et al., 2008 ; Nahar et al., 2021). Cette espèce a une large répartition géographique, notamment au Portugal, en Grèce, en Turquie, en Algérie, en Tunisie et au Maroc (Mohammedi et al., 2020). En Afrique

du Nord, elle est particulièrement répandue dans la région centrale du Moyen Atlas au Maroc, où elle est largement utilisée en médecine traditionnelle (Najem et al., 2019). Par ailleurs, *Ruta montana* est cultivée dans diverses régions du monde pour ses propriétés médicinales et a été l'une des premières plantes introduites sur le continent américain (Hammiche et Azzouz, 2013) (Figure 5).



Figure 5 : Distribution géographique de la plante *Ruta montana* (GBIF, 2025).

## 5. Composition chimique :

Les extraits de *Ruta montana* (RM) contiennent divers composés bioactifs, principalement classés en trois grandes catégories chimiques : les cétones, les coumarines et les alcaloïdes (Benkhaira et al., 2022). Les tests qualitatifs ont révélé une richesse en tanins galliques et catéchiques, tandis que les saponines, les anthraquinones libres et les hétérosides cyanogéniques étaient absents (Daoudi et al., 2016). Un extrait hydrométhanolique des parties aériennes obtenu par Soxhlet a montré une concentration élevée en polyphénols totaux ( $33,684 \pm 1,684$  mg GAE/g) et en flavonoïdes ( $0,843 \pm 0,042$  mg QE/g) (Mohammedi et al., 2020).

Les analyses quantitatives ont mis en évidence un rendement élevé en coumarines dans un extrait de RM turque obtenu par chromatographie sur gel de silice. Ce groupe comprenait notamment la bergaptène, la rutamarine, la xanthotoxine, la chalépinsine, et le sésamine, ainsi que des alcaloïdes tels que la montanine, la 1,2-diméthyl-4-quinolinone et la dictamine (Ulubelen, 1990). En parallèle, six alcaloïdes ont été isolés dans un extrait au chloroforme de

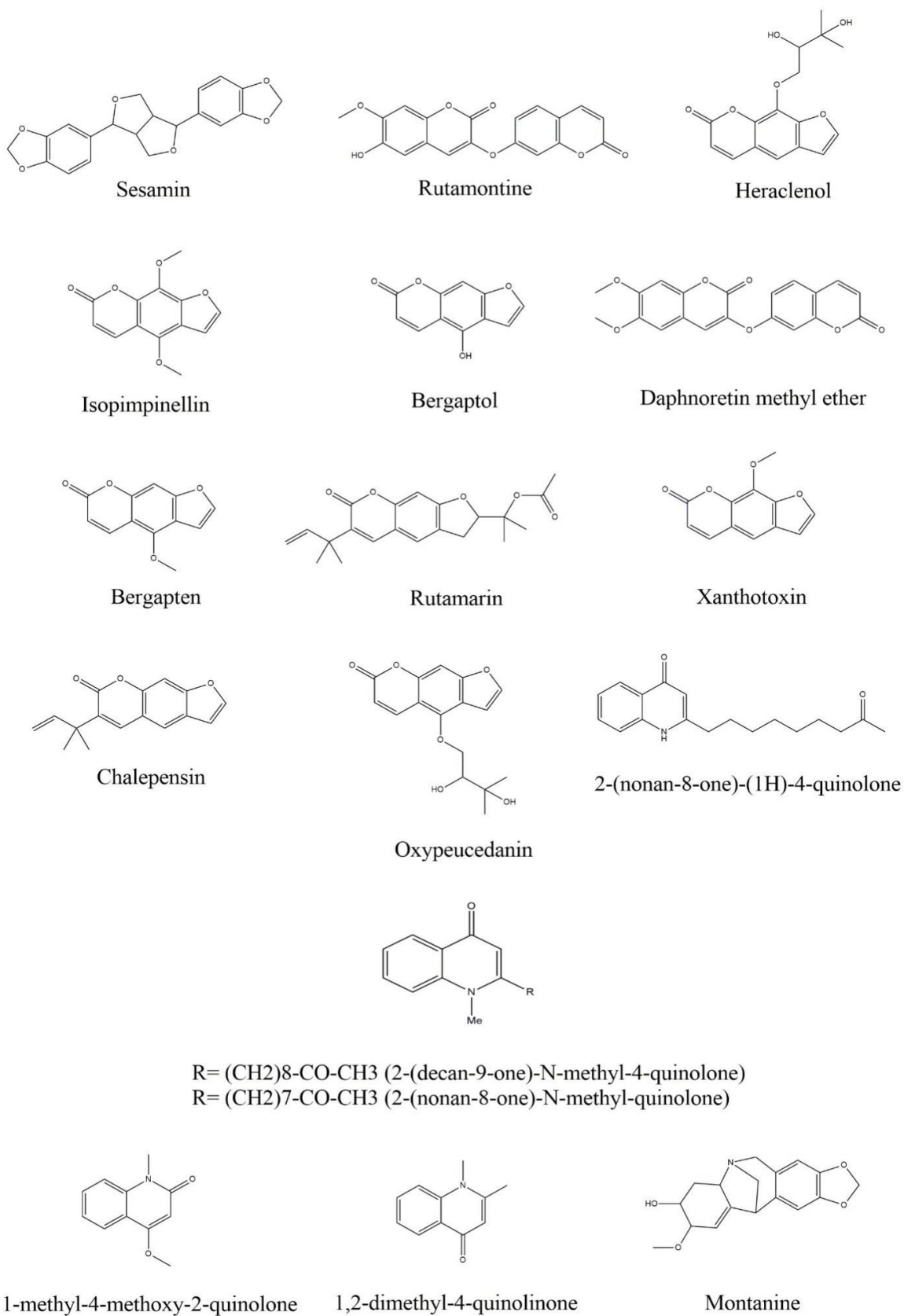
RM marocaine, dont quatre nouveaux : la 2-(nonan-8-one)-(1H)-4-quinolone, la 2-(nonan-8-one)-4-méthoxyquinoline, la 2-(nonan-8-one)-N-méthylquinolone, et la 2-(décane-9-one)-N-méthyl-4-quinolone, ainsi que deux alcaloïdes connus : la 1-méthyl-4-méthoxy-2-quinolone et l'évolitrine (Touati et al., 2000). En Algérie, les parties aériennes contiennent un éther dicoumarinyl, la rutamontine, ainsi que deux furocoumarines : l'heraclenol et l'isopimpinelline (Kabouche et al., 2003). Leurs structures chimiques sont présentées dans la Figure 6.

La phytochimie de *Ruta montana* reste encore peu explorée, en particulier son profil phénolique, largement concentré dans les parties aériennes, avec les coumarines et les alcaloïdes comme principaux constituants (Mahmud et al., 2018 ; El Hachlafi et al., 2021). D'autres parties de la plante, comme les racines, les écorces et les fruits, nécessitent d'avantage d'études.

### 6. Utilisation Traditionnelle :

Historiquement, *Ruta montana* a été utilisée dans la médecine hippocratique pour ses propriétés abortives et emménagogues, ainsi que pour le traitement des maladies pulmonaires (Pollio et al., 2008). De nos jours, elle est employée pour traiter une variété de conditions, y compris les maladies digestives, infectieuses, respiratoires, neurologiques et diabétiques (Zhang et al., 2017 ; Benkhaira et al., 2022). Des études récentes comme celle de Mahdeb et al. (2023) démontrent que l'extrait possède des propriétés antibactériennes, antifongiques, antidiabétiques et insecticides substantiels. D'autres élucident l'impact bénéfique de *Ruta montana* dans la gestion de l'hypertension, préconisant par conséquent son utilisation comme thérapie antihypertensive (El-Ouady et Eddouks, 2021).

Bien que certains aient suggéré des applications thérapeutiques, *Ruta montana* a été reconnu pour son efficacité à atténuer les effets délétères de l'envenimation par les serpents et les scorpions, tandis que sa forme en poudre est louée pour sa capacité à améliorer les symptômes de la paralysie faciale (Benkhaira et al., 2022). Dans la médecine traditionnelle Persane, la poudre de feuilles de RM est utilisée pour traiter l'épilepsie (Abolhasanzadeh et al., 2017). Par ailleurs, l'huile essentielle de *Ruta montana* (OMRM) était très appréciée dans l'industrie des parfums (Miara et al., 2019). La poudre est également utilisée dans la cuisine comme épice, l'amertume des feuilles stimule l'appétit, et leur arôme donne un goût agréable aux plats de poisson. En Italie également, les feuilles de RM aromatisent vinaigre et alcool appelé « GRAPPE aromatizzate » (Hamliche et Azzouz, 2013).



**Figure 6 :** Composés chimiques isolés à partir d'extraits de *Ruta montana* (Benkhaira et al., 2022).

## 7. Vertus thérapeutiques de *Ruta montana* :

### *Activité Antihypertensive :*

L'hypertension artérielle est un facteur de risque majeur pour les maladies cardiovasculaires, justifiant la recherche de nouvelles approches thérapeutiques naturelles. Les extraits aqueux de *Ruta montana* ont démontré une activité antihypertensive significative. Dans des études sur des rats hypertendus induits par L-NAME, l'extrait a réduit de manière significative la pression artérielle systolique, moyenne et diastolique, ainsi que la fréquence cardiaque. Cette activité vasorelaxante semble être médiée par la voie des prostaglandines, ce qui soutient l'utilisation traditionnelle de la plante pour traiter l'hypertension (**El-Ouady et Eddouks, 2021**).

### *Activité antioxydante de *Ruta montana* :*

Les extraits de *Ruta montana* ont démontré une capacité antioxydante significative à travers des tests standards comme le test DPPH et le pouvoir réducteur ferrique. Les extraits méthanoliques et ceux à l'acétate d'éthyle se sont révélés particulièrement efficaces dans le piégeage des radicaux libres (**Ali et al., 2016 ; Merghem et Dahamna, 2020 ; Drioiche et al., 2020**). En parallèle, les huiles essentielles de cette plante présentent également une activité antioxydante notoire, bien que celle-ci dépende de la concentration (**Kambouche et al., 2008**).

La composition chimique et l'efficacité antioxydante des extraits de *Ruta montana* peuvent être influencées par plusieurs facteurs, notamment les conditions géographiques, climatiques, ainsi que les méthodes d'extraction employées (**Mohammedi et al., 2020**). Il a été observé que les extraits obtenus à l'aide de solvants polaires, comme le méthanol, contiennent généralement des niveaux plus élevés de composés phénoliques et flavonoïdes, augmentant ainsi leur capacité antioxydante (**Drioiche et al., 2020 ; Ali et al., 2016**).

### *Activité antimicrobienne de *Ruta montana* :*

Les études scientifiques sur *Ruta montana* (RM) ont mis en évidence son potentiel antimicrobien, notamment contre des bactéries et champignons pathogènes, validant ainsi son utilisation traditionnelle dans le traitement des infections (**Benkhaira et al., 2022**).

Les infections bactériennes représentent un enjeu majeur en santé publique, nécessitant des alternatives naturelles aux antibiotiques conventionnels en raison de l'émergence de résistances. Dans ce contexte, Les huiles essentielles (HE) de RM montrent une efficacité

notable contre les bactéries Gram (+) et Gram (-). **Daoudi et al. (2016)** rapportent une inhibition marquée de *Staphylococcus aureus* par l'HE marocaine, surpassant la gentamicine. **Benali et al. (2020)** confirment son action sur *Bacillus subtilis*. Les HE algériennes, riches en 2-undécane inhibent *Pseudomonas aeruginosa* (**Mohammed et al., 2020**). Une synergie avec l'amoxicilline augmente la capacité d'inhibition contre *Escherichia coli* (**Zeraib et al., 2021**).

Les infections à champignons représentent un défi significatif en termes de santé publique et de santé des cultures, ce qui souligne la nécessité de trouver des alternatives aux agents antifongiques traditionnels en raison de l'émergence de phénomènes de résistance.

Dans cette optique, l'huile essentielle de *Ruta montana* démontre une activité antifongique significative. À une concentration de 1000 µg/mL, elle présente une efficacité notable contre *Botrytis cinerea* sur les plants de tomate (**Hammami et al., 2015**) et montre une inhibition significative de *Candida albicans*, dépassant même l'amphotéricine B (**Benali et al., 2020**). En outre, le principal composé, le 2-undécane, a démontré une activité antifongique significative contre *Aspergillus niger* (**Gibka et al., 2009**).

### **Activité anti-acétylcholinestérase (AChE) de *Ruta montana* :**

L'inhibition de l'acétylcholinestérase (AChE) est une stratégie thérapeutique utilisée dans le traitement de plusieurs troubles neurologiques, tels que la maladie d'Alzheimer, la démence sénile, l'ataxie et la myasthénie grave (**Mukherjee et al., 2007**). Traditionnellement, la plante *Ruta montana* (RM) a été employée pour apaiser les affections neurologiques (**Orhan et al., 2006**). Une étude a révélé que l'extrait éthanolique des tiges présentait la plus forte activité inhibitrice de l'AChE, avec une concentration inhibitrice moyenne (IC<sub>50</sub>) de 52 ± 0.4 µg/mL, suivi par une décoction des feuilles, avec une IC<sub>50</sub> de 57 ± 1.6 µg/mL (**Khadhri et al., 2017**).

### **Activité anti-inflammatoire :**

Des études scientifiques ont démontré que ses extraits inhibent la production de médiateurs inflammatoires clés, tels que l'oxyde nitrique (NO) et la cyclooxygénase-2 (COX-2), dans les cellules macrophages murines, une activité supérieure à celle de certains de ses composants isolés comme la rutine (**Raghav et al., 2006**). Ces effets sont attribués à la présence de composés bioactifs, incluant des coumarines (comme l'isopimpinelline) et des alcaloïdes (tels que l'heraclenol), identifiés pour leur rôle central dans la modulation des voies

inflammatoires (**Benkiki et al., 2002**). Ces résultats valident son usage traditionnel et soulignent son potentiel comme source d'agents anti-inflammatoires naturels.

### ***Activité Immunomodulatrice :***

Bien que l'étude spécifique sur l'activité immunomodulatrice de *Ruta montana* ne soit pas directement abordée dans les documents fournis, le genre *Ruta* est reconnu pour ses diverses bioactivités, ce qui suggère un potentiel pour des effets immunomodulateurs similaires à ceux observés dans d'autres plantes de la même famille (**Nahar et al., 2021**).

### ***Propriétés Antidiabétiques de Ruta montana :***

Les études scientifiques ont exploré le potentiel de *Ruta montana* (RM) dans la gestion du diabète, corroborant son utilisation traditionnelle. L'extrait aqueux des parties aériennes de RM a démontré des effets hypoglycémians et antihyperglycémians significatifs. **Farid et al. (2017)** ont évalué son administration orale (5 mg/kg pendant 15 jours) sur des rats diabétiques induits par la streptozotocine. Les résultats ont révélé une amélioration de la tolérance au glucose, avec une prévention de l'augmentation postprandiale de la glycémie à 30 et 90 minutes après l'ingestion de glucose (3 g/kg). De plus, une réduction des taux de glucose sanguin a été observée chez les rats diabétiques, suggérant un mécanisme d'action impliquant potentiellement la stimulation de la sécrétion d'insuline ou l'amélioration de la sensibilité périphérique à l'insuline (**Farid et al., 2017**).

### ***Activité anticancéreuse :***

L'extrait méthanolique de *Ruta montana* a démontré une capacité à inverser la résistance multi-médicamenteuse (MDR) dans la lignée cellulaire de cancer de l'ovaire humain résistant (A2780 DX3). En présence de doxorubicine, les concentrations de 10 et 40 mg/ml de l'extrait méthanolique de *Ruta montana* (EMRM) ont montré des valeurs de réversion (RF) de 2,01 et 4,56 respectivement, indiquant une amélioration significative de l'efficacité de la doxorubicine (**Ali et al., 2016**). Ainsi, *Ruta montana* pourrait présenter d'importantes propriétés anticancéreuses.



*Chapitre* **II**

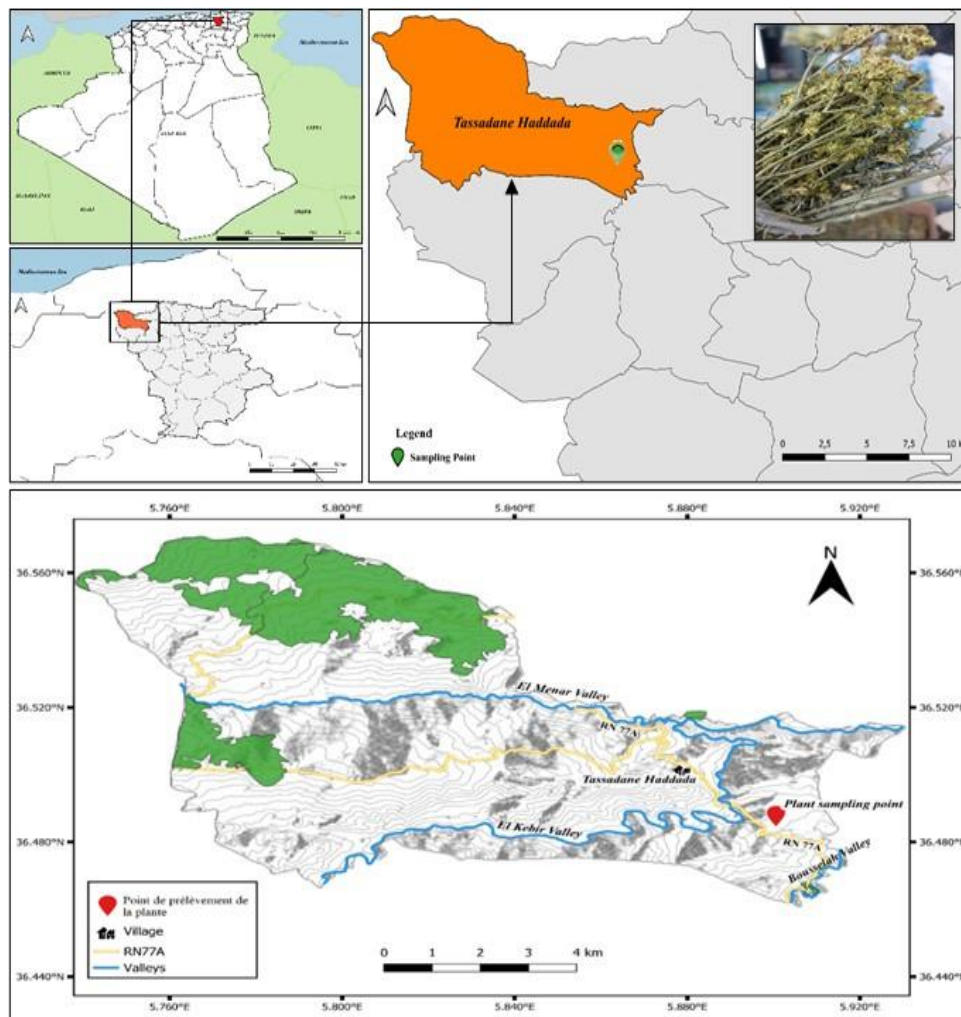
*Matériel et méthodes*

Cette recherche a été effectuée au sein des locaux du laboratoire de la Faculté des Sciences de l'Université du 20 Août 1955 de Skikda. L'objectif consiste à établir les caractéristiques biologiques et chimiques de l'extrait éthanolique de l'espèce végétale *Ruta montana*. Les travaux de recherche s'attachent à l'évaluation de l'activité antioxydante, à l'identification et à la quantification des composés phénoliques et moléculaires par le biais de la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS), ainsi qu'à l'analyse des propriétés antibactériennes, enzymatiques et des effets anti-inflammatoires *in vivo* de cette substance. Par ailleurs, cette étude analyse de quelle manière les extraits de *Ruta montana* peuvent atténuer les effets toxiques induits par le fongicide tébuconazole dans le modèle animal *Rattus norvegicus* (Rat Wistar). L'objectif principal de cette étude est de fournir des éclaircissements sur les mécanismes d'action de l'extrait éthanolique de cette plante ainsi que sur son potentiel thérapeutique en matière de prévention des effets néfastes engendrés par l'exposition aux pesticides.

### 1. Etude phytochimique :

#### 1.1. Matériel végétal :

La présente étude a été réalisée sur une plante aromatique de la famille des Rutaceae, très abondante dans la région méditerranéenne. Les parties aériennes de *Ruta montana* ont été récoltées dans un jardin situé à Tassadane Haddada (en arabe : تسدان حدادة ; en tiffinagh : ⵜⴰⵙⴰⵔⴰⵏⴰ ⴰⵏ ⴰⵏⴰⵙⴰⵏⴰ), une région située dans la province de Mila (Nord-Ouest de l'Algérie : longitude 5.897696° E, latitude 36.484362° N, avec une altitude de 442 (Figure 7). Après Une identification taxonomique par Dr Sakhraoui Nora ; une botaniste à l'université de Skikda. Les spécimens ont été nettoyés et séchés à l'obscurité, pendant 20 jours, puis réduits en une poudre fine homogène à l'aide d'un broyeur électrique en acier inoxydable. La poudre a été conditionnée dans des contenants opaques et hermétiques (en verre ambré), stockés à température ambiante jusqu'à l'extraction.



**Figure 7 :** Localisation du site d'échantillonnage de la plante *Ruta montana* à Tassadane Haddada, Wilaya de Mila (Algérie) (QGIS 3.32.2., 2025).

## 1. 2. Protocole d'extraction :

L'extraction des métabolites secondaires a été réalisée par macération dynamique. Une masse déterminée de poudre végétale a été soumise à un solvant hydroéthanolique (éthanol à 96° v/v) dans un rapport solide/liquide de 1:10 (p/v), sous agitation intermittente (3 × 20 min/jour), pendant 72 heures à température ambiante. Le mélange a été filtré à l'aide de papier filtre Whatman® No. 1, puis concentré par évaporation du solvant sous pression réduite à 40°C à l'aide d'un évaporateur rotatif (Modèle DLAB RE-100-Pro, Chine) (Figure 8).

Le rendement de l'extraction a été calculés selon l'équation suivante :

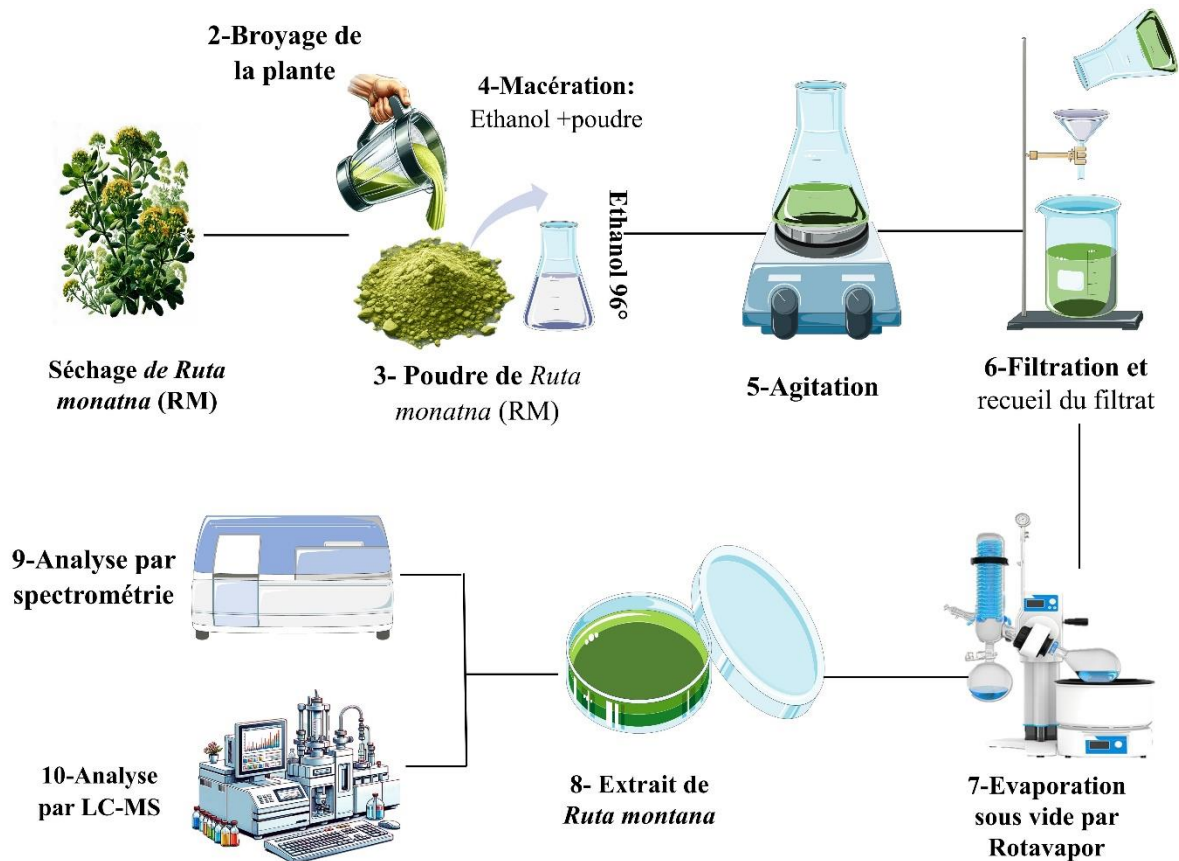
$$\text{Rdt (\%)} = \frac{(P1 - P2)}{P3} \times 100$$

>**Rdt** : Le rendement

>**P1** : poids du ballon après évaporation.

>P2 : poids du ballon vide avant évaporation.

>P3 : poids de la matière végétale de départ en poudre.



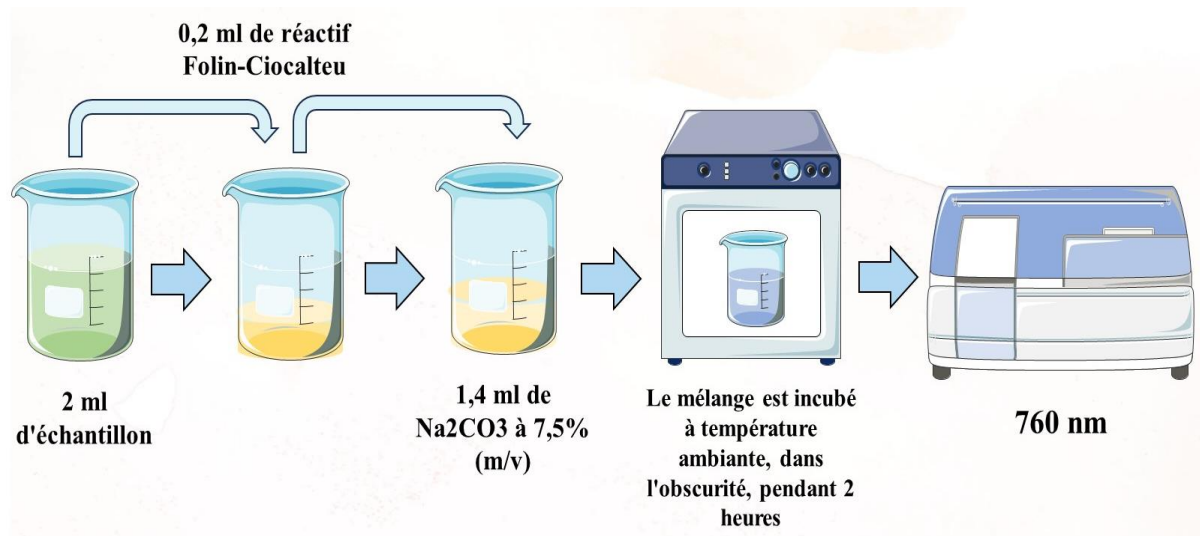
**Figure 8** : Représentation graphique élaborant les différentes étapes de l'étude Phytochimique.

### 1. 3. Dosages colorimétriques des composés phénoliques :

#### 1.3.1. Dosage des polyphénols totaux :

La technique employée pour évaluer les polyphénols totaux implique l'utilisation du réactif Folin-Ciocalteu, lequel est constitué d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. Lors de l'oxydation des phénols, le réactif subit une réduction pour former un mélange d'oxydes de tungstène et de molybdène de couleur bleue, ce qui entraîne une coloration avec une absorption maximale située entre 760 nm. La teinte observée est directement liée à la concentration de polyphénols présente dans les extraits de plantes. Afin de quantifier les polyphénols présents dans l'extraits, on mélange 2 ml de l'extrait avec 0,2 ml du réactif Folin-Ciocalteu et 1,4 ml de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  à une concentration de 7,5% (m/v). Le mélange est mis en incubation à l'abri de la lumière à température ambiante pendant une durée de 2 heures, après quoi les absorbances sont mesurées à une longueur d'onde de 760 nm à l'aide d'un

spectrophotomètre UV-1800 (Shimadzu) (**Figure 9**). Les résultats sont quantifiés en milligrammes équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait sec en utilisant une courbe d'étalonnage de l'acide gallique établie à partir de six valeurs de concentrations allant de 0 à 1 mg/ml (**Waterhouse, 2011**).



**Figure 9** : Dosage des polyphénols totaux.

### 1.3.2. Dosage des flavonoïdes :

La technique employée pour la quantification des flavonoïdes est fondée sur le protocole décrit par **Chang et ses collaborateurs (2002)**, avec quelques ajustements mineurs. Cela entraîne la formation d'un complexe hautement stable entre le chlorure d'aluminium et les atomes d'oxygène présents sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes. Ce composé de couleur jaune présente une absorption dans la plage visible à une longueur d'onde de 415 nm. Afin de quantifier les flavonoïdes présents dans l'extrait éthanolique de *Ruta montana*, on mélange 0,2 ml de l'extrait avec 1,72 ml d'éthanol à 96%, 0,4 ml de chlorure d'aluminium à 10%, et 1 ml d'acétate de sodium 1M. Par la suite, le mélange est agité et mis en incubation à température ambiante dans l'obscurité pendant une durée de 30 minutes, puis l'absorbance est mesurée à 415 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-1800 (Shimadzu) (**Figure 10**). Les résultats sont exprimés en milligrammes équivalents de quercétine par gramme d'extrait sec, en utilisant une courbe d'étalonnage spécifique pour la quercétine.

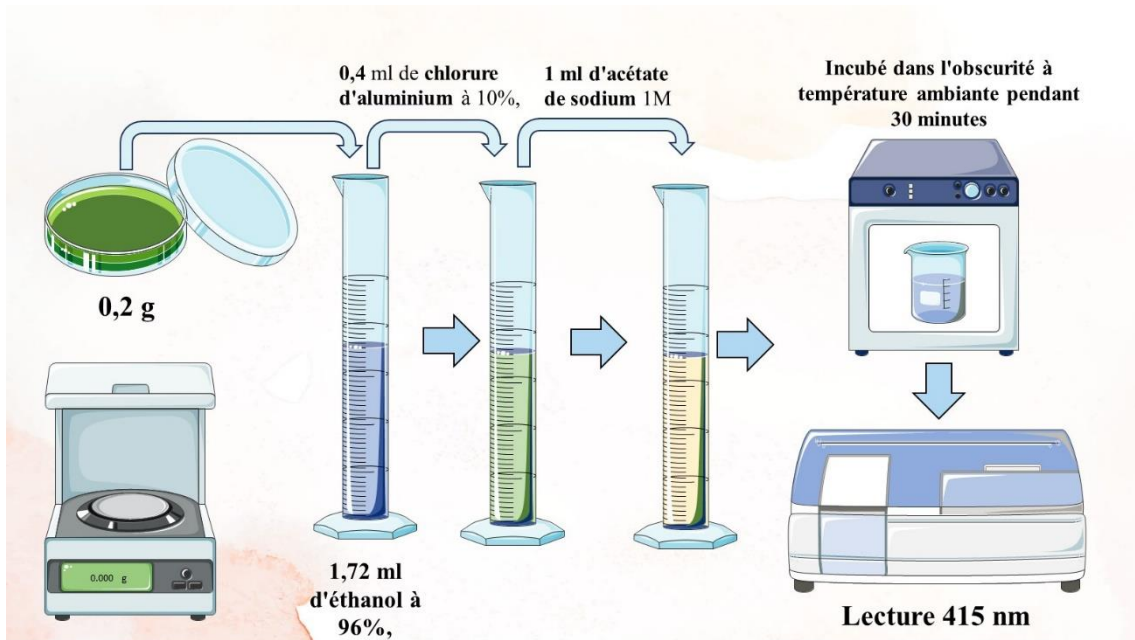


Figure 10 : Dosage des flavonoïdes.

### 1.3.3. Dosage des tanins :

Le dosage des tanins a été réalisé en utilisant la technique de la réaction à la vanilline. Le système expérimental de 6 mL était composé de 1 mL d'échantillon ou d'étalon, 2,5 mL de réactif A (solution de vanilline à 1% p/v dans le méthanol) et 2,5 mL de réactif B (solution d'HCl ou d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 9N dans le méthanol), conformément à la description donnée par **Price et al. (1978)**. La réaction s'est déroulée à une température de 30°C pendant une durée de 15 minutes, à la suite de laquelle l'absorbance a été évaluée à une longueur d'onde de 500 nm (A<sub>500</sub>). Les résultats sont quantifiés en milligrammes équivalents d'acide tannique par gramme d'extrait sec à l'aide d'une courbe d'étalonnage spécifique à l'acide tannique (**Figure 11**).

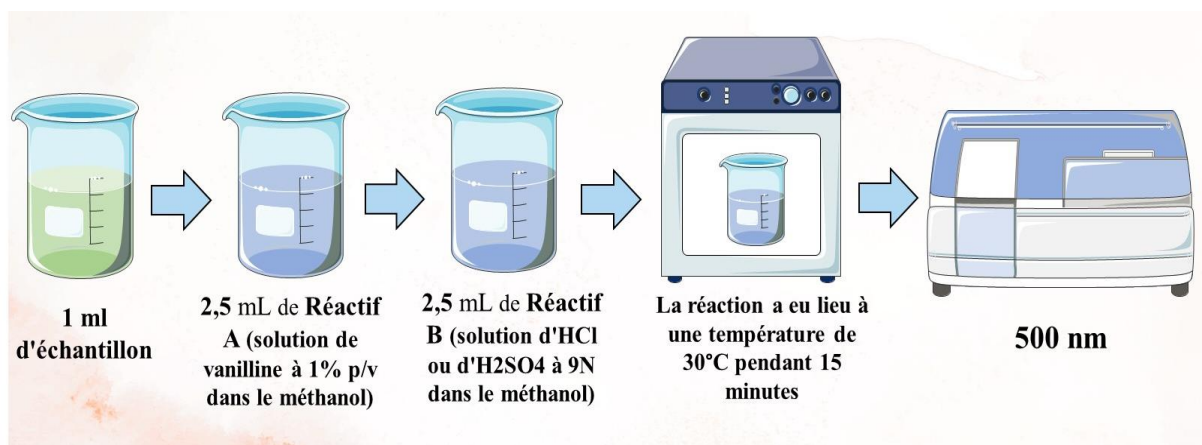


Figure 11 : Dosage des tanins.

### 1.4. Identification des composés phytochimique par LC-MS/MS :

L'analyse par LC-MS/MS est une technique essentielle pour l'identification et la quantification précise des composés chimiques dans divers échantillons. Cette technique a été réalisées au laboratoire du Département de Chimie de la Faculté des Sciences de l'Université Ondokuz Mayıs (Samsun, Turquie).

Cette technique a été employée pour étudier les constituants phénoliques des extraits éthanoliques des parties aériennes de *R. montana*. Cette analyse a été réalisée par LC-MS/MS (spectromètre de masse triple quadripôle Agilent Technologies 1260 Infinity II, 6460). La méthodologie analytique a impliqué l'utilisation d'une colonne chromatographique Poroshell 120 SB-C18 de dimensions 3,0 × 100 millimètres de diamètre interne et possédant une taille de particule de 2,7 micromètres (Erenler et al., 2023).

Un échantillon de RM (50 mg) a été pesé dans un tube Eppendorf (2,0 mL), auquel a été ajouté un composant supplémentaire (1 mL d'éthanol) pour faciliter la dissolution dans la solution. L'échantillon extrait ainsi obtenu a été soumis à une extraction à l'aide de 1 mL d'hexane. Par la suite, l'échantillon a été centrifugé à une vitesse de 9000 tours par minute pendant 10 minutes.

Par la suite, un volume de 100 microlitres a été prélevé de la phase éthanolique afin de créer une dilution composée de 450 microlitres d'eau et 450 microlitres d'éthanol, pour un volume total de 900 microlitres. Après l'application d'un filtre de 0,25 micron pour la purification, l'analyse LC-MS/MS a été réalisée en tant que phase finale. L'acquisition et le traitement des données ont été effectués à l'aide du logiciel Mass Hunter (version B.07.01).

### 2. Evaluation des activités biologiques *in vitro* de *Ruta montana* :

#### 2. 1. Evaluation de l'activité antioxydante :

##### 2.1.1. Méthode DPPH :

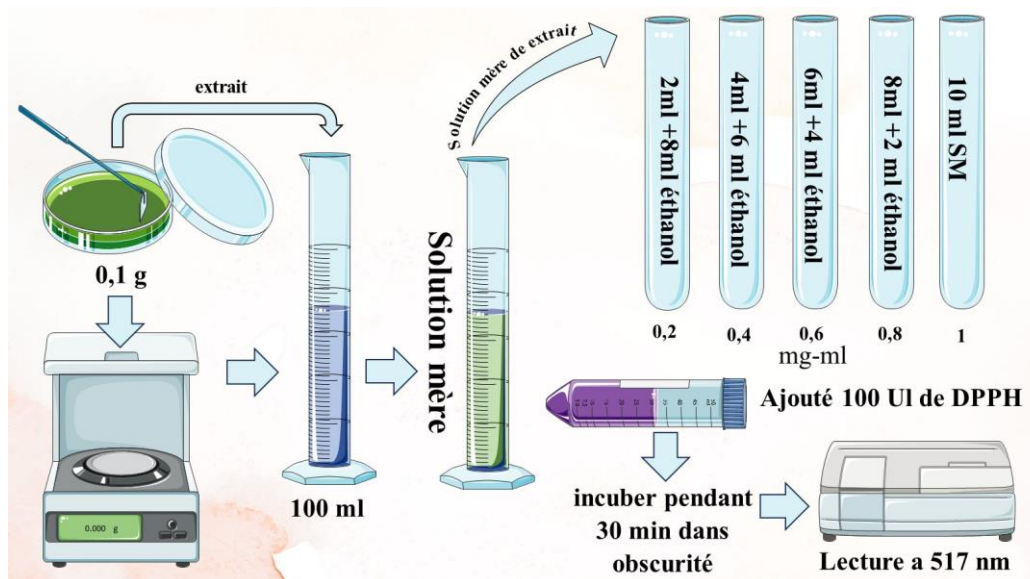
Le test de DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) est un outil utile pour évaluer l'activité antioxydante en milieu organique, selon une étude menée par Blois (1958). Ce test consiste en la réduction d'une solution alcoolique du radical DPPH<sup>•</sup> en présence d'un antioxydant donneur d'hydrogène (AH), ce qui conduit à la formation d'une forme non radicalaire, DPPH-H. La présence de radicaux DPPH<sup>•</sup> colore la solution en pourpre foncé et

crée une forte absorption à 517 nm. Toutefois, l'ajout d'un agent antioxydant entraîne une décoloration de la solution au cours de la réaction, ce qui modifie la colorimétrie de la solution. Pour évaluer l'activité antioxydante par DPPH, il faut d'abord préparer une solution de DPPH en dissolvant 3.94 mg de DPPH en 100 mL d'éthanol pour obtenir une concentration de 0,01mM. Ensuite, les échantillons à tester doivent être préparés en les dissolvant dans l'éthanol. Les échantillons sont ensuite ajoutés à la solution de DPPH dans une série de tubes à essai contenant des concentrations croissantes d'échantillon à tester (0-1mg/ml), suivis d'une incubation à l'abri de la lumière pendant 30 minutes à température ambiante. Après l'incubation, l'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible (**Figure 12**).

le pourcentage d'inhibition de DPPH a été déterminé à l'aide de la formule suivante :

$$\% \text{ inhibition} = \frac{[(\text{absorbance du contrôle} - \text{absorbance de l'échantillon})]}{\text{absorbance du contrôle}} \times 100$$

Ensuite, la courbe dose-réponse de pourcentage d'inhibition de DPPH en fonction de la concentration de l'échantillon a été tracé et cela pour calculer  $IC_{50}$  qui correspond à la concentration d'échantillon nécessaire pour réduire de moitié la quantité de DPPH initialement présente en interpolant les données de la courbe dose-réponse.



**Figure 12 :** Méthode DPPH.

### 2.1.2. Méthode ABTS :

Cette méthode est basée sur la capacité des composés à piéger le radical-cation  $ABTS^{\bullet+}$ , (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis(3-éthylbenzothiazoline)-6-sulfonique) de coloration

bleu verdâtre. Ce radical cationique est formé suite à l'oxydation de l'ABTS initialement incolore. la réaction se déroule en deux étapes : au cours de la première étape le radical  $ABTS^{\bullet+}$  est formé par arrachement d'un électron à un atome d'azote de l'ABTS en présence du persulfate de potassium  $K_2S_2O_8$  dans le milieu réactionnel. La deuxième se déroule en présence d'un antioxydant donneur de  $H^+$ , le radical d'azote concerné piège un  $H^+$ , conduisant à l' $ABTSH^+$ , ce qui entraîne la décoloration de la solution (Re et al., 1999) (Figure 13).

Une solution mère d'ABTS est préparée en mélangeant 5 ml d'eau et 19,2mg ABTS et 3,3 mg de  $K_2S_2O_8$ . Le mélange réactionnel est mis en incubation, à l'obscurité, pendant 16 h à température ambiante. La solution fille de travail d' $ABTS^+$  est obtenue en diluant la solution mère d'ABTS avec de l'eau jusqu'à obtention d'une absorbance d'environ (0,7 à 1) à 734 nm (Re et al., 1999). Dans chaque tube des prises de 1ml des différentes concentrations (0-1mg/ml) des extraits de la plante digérée et non digérée et 160  $\mu$ l de la solution d'ABTS. Ils ont été incubés à l'obscurité pendant 30 minutes. La lecture des absorbances est effectuée à 734nm. L'activité antioxydante a été calculée en utilisant la formule suivante :

$$\% \text{ inhibition} = \frac{[(\text{absorbance du contrôle} - \text{absorbance de l'échantillon})]}{\text{absorbance du contrôle}} \times 100$$

Les pourcentages d'inhibition du radical ABTS ont été tracés en fonction des concentrations d'extrait pour déterminer l'index  $IC_{50}$ .

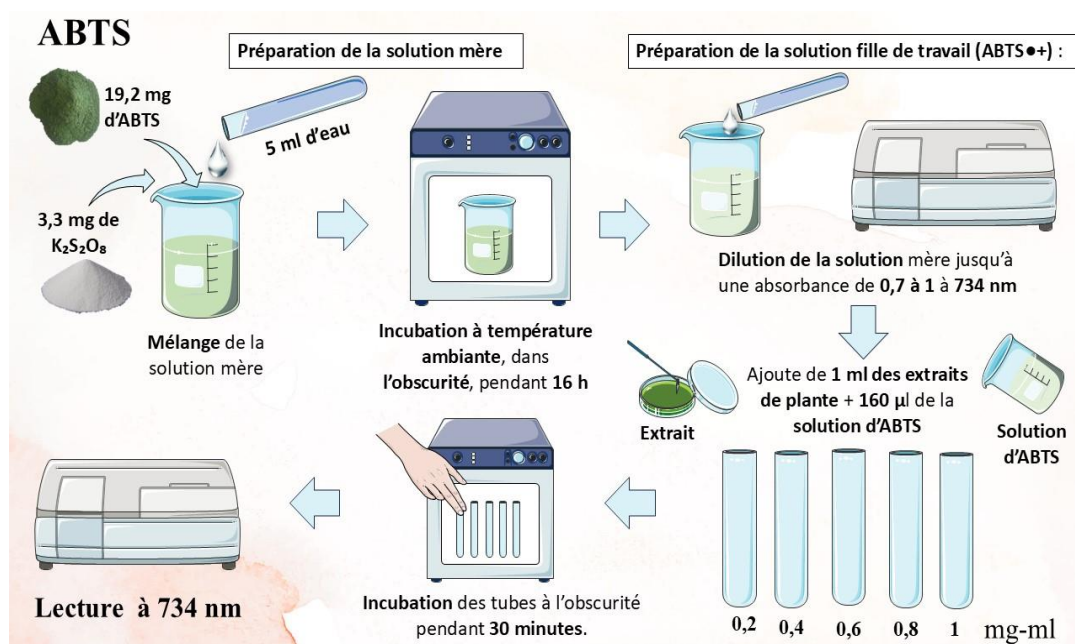
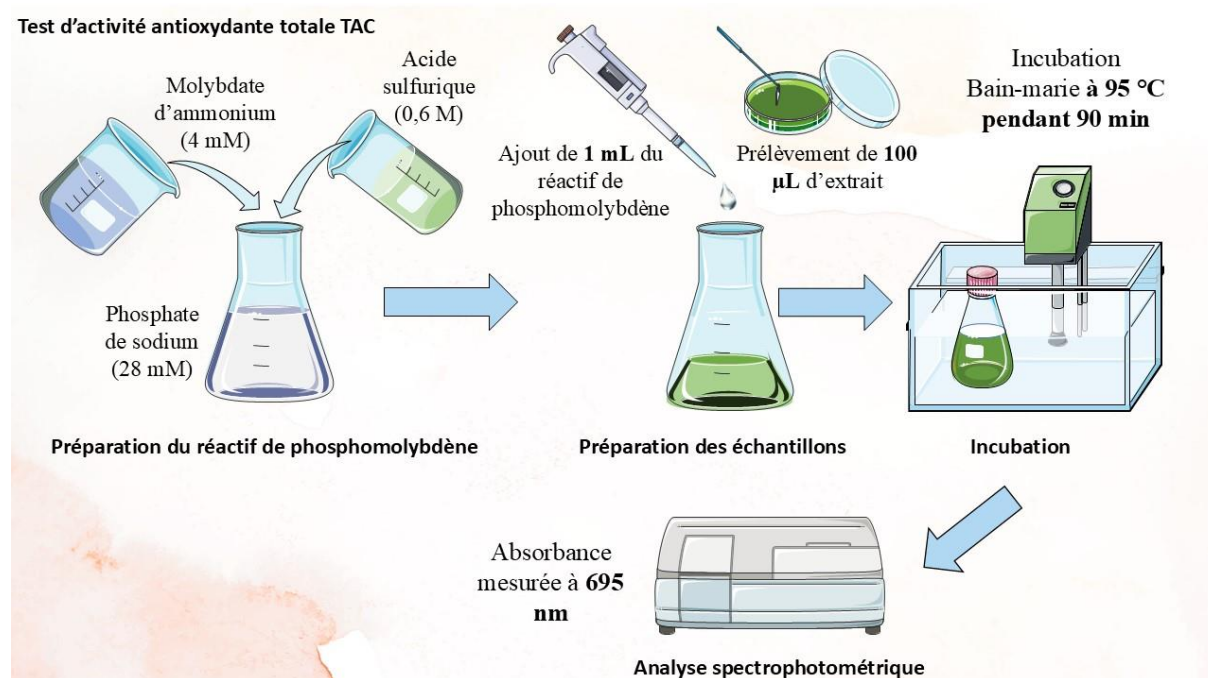


Figure 13 : Méthode ABTS.

### 2.1.3. Test d'activité antioxydante totale (TAC) :

La capacité antioxydante totale de l'extrait a été évaluée par la méthode de phosphomolybdène de **Ramalakshmi et al. (2008)**. Il consiste à ajouter 1 mL du réactif de phosphomolybdène (0,6 M d'Acide Sulfurique, 28 mM de Phosphate de Sodium et 4 mM de Molybdate d'Ammonium) à 100  $\mu$ L de chaque extrait. Après 90 minutes d'incubation dans le bain-marie à 95 °C, l'absorbance est mesurée à 695 nm. La capacité antioxydante totale est exprimée en mg équivalent d'acide ascorbique / g de matière sèche (mg EAA/g MS) (La courbe d'étalonnage de l'acide gallique) (**Figure 14**).



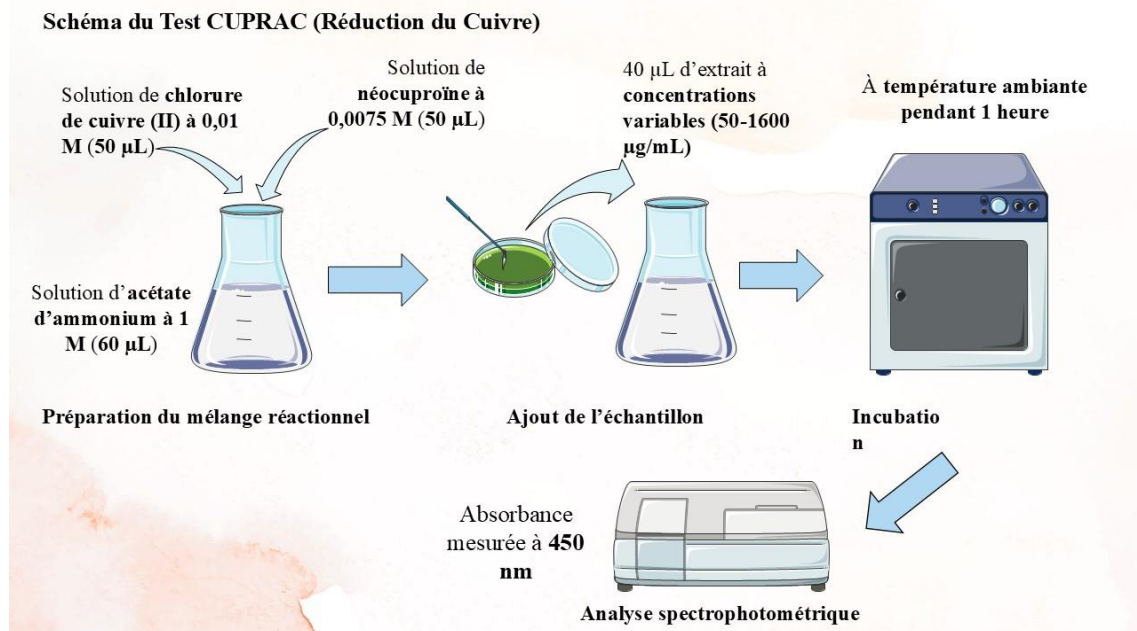
**Figure 14** : Test d'activité antioxydante totale.

### 2.1.4. Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC) :

Le test basé sur la réduction du complexe néocuproïne-cuivre ( $\text{Nc}_2\text{-Cu}^{2+}$ ) permet d'évaluer l'activité antioxydante d'un extrait en mesurant la diminution de l'absorbance à 450 nm, comme décrit par **Bensouici (2015)** et **Apak et al. (2004)**. Lorsqu'un antioxydant est présent, il réduit le complexe  $\text{Cu}^{2+}\text{-Nc}$ , conduisant à la formation d'un complexe chromogène dont l'absorbance est mesurée par spectrophotométrie.

Pour réaliser cette analyse, on mélange 50  $\mu$ L de chlorure de cuivre (II) à 0,01 M, 60 mL d'acétate d'ammonium à 1 M et 50 mL de néocuproïne à 0,0075 M avec 40 mL d'extrait hydroalcoolique à différentes concentrations (50 à 1600 mg/mL). Après une incubation d'une heure à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 450 nm à l'aide d'un

spectrophotomètre UV-1800 (Shimadzu). Les résultats sont exprimés en A(absorbance) 0.5 (mg/mL), ce qui reflète la concentration associée à une absorbance de 0.50 (**Figure 15**).



**Figure 15** : Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre.

## 2.2. Evaluation de l'activité enzymatique du *Ruta montana* :

### 2.2.1. Evaluation de l'activité anti-uréase :

L'évaluation de l'activité anti-uréase s'est avérée possible en mesurant l'ammoniac généré lors de la réaction réalisée par **Taha *et al.* (2018)**. En résumé, une microplaque à 96 puits a été remplie de 10 µL d'extrait à différentes concentrations, 20 µL de solution d'uréase (5 U/millilitre d'uréase de haricot gris *Canavalia ensiformis*, type IX), 20 µL de substrat d'urée, 45 µL de réactif phénolique et 70 µL de réactif alcalin. Après deux heures d'incubation à 30°C, l'absorbance du mélange à 630 nm a été déterminée (**Figure 16**).

### 2.2.2. Evaluation de l'activité anticholinestérase :

Cette activité est déterminée d'une combinaison de 150 µL de tampon phosphate de sodium 100 mM (pH 8.0), 10 µL d'extraits à différentes concentrations, et 20 µL de solution de Butyryl choline esterase ( $6.85 \times 10^{-3}$  U) ont été incubés à 25°C pendant 15 minutes. Une addition de 10 µL de DTNB (0.5 mM), 10 µL de chlorure d'acétylthiocholine (0.2 mM) a été suivie. Enfin, une lecture à 412 nm, pendant 0 mn et 15 min a été évaluée pour obtenir les résultats (**Ellman *et al.*, 1961**) (**Figure 17**).

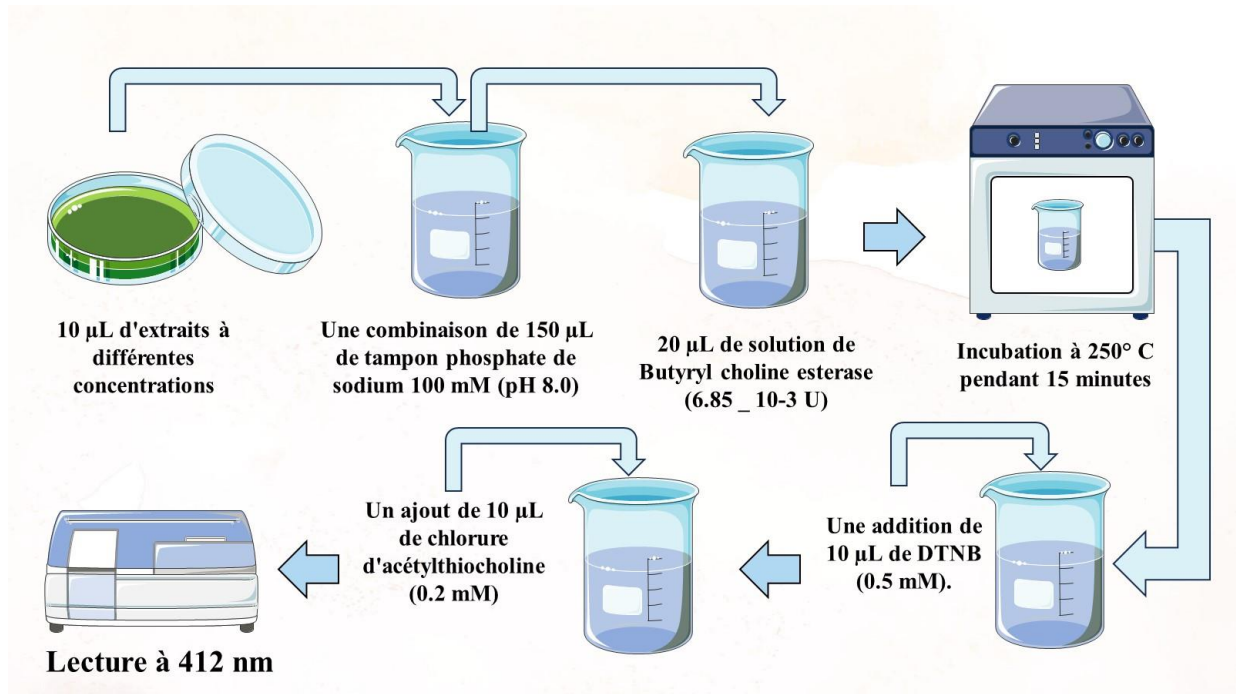


Figure 16 : Evaluation de l'activité anti-uréase.

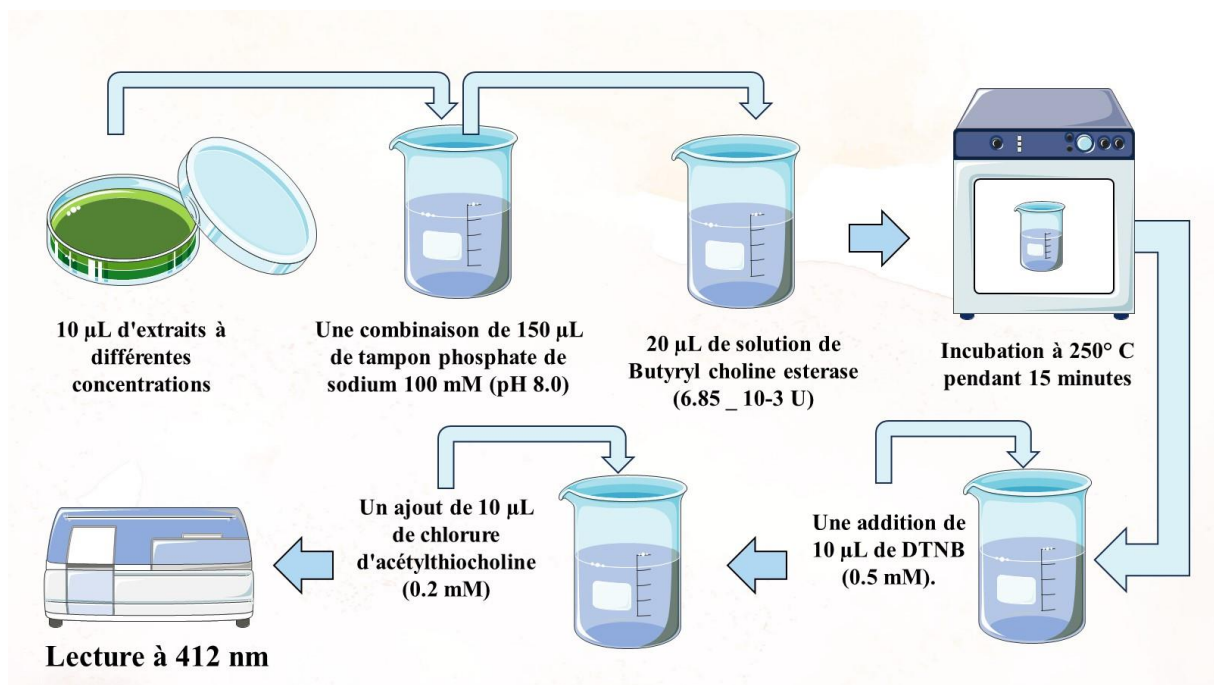


Figure 17 : Evaluation de l'activité anticholinestérase.

### 2.2.3. Evaluation de l'activité antimicrobienne :

L'activité antimicrobienne de l'extrait éthanolique de *Ruta montana* est évaluée par la méthode des disques, en mesurant la zone d'inhibition de croissance autour des disques. La méthode de l'aromatogramme, c'est une technique de laboratoire identique à celle de

l'antibiogramme qui sert à tester la sensibilité d'une souche bactérienne et fongique vis-à-vis d'un ou de plusieurs antibiotiques où les antibiotiques sont remplacés par l'extrait de la plante.

### **Principe de l'antibiogramme :**

C'est une méthode de mesure *in vitro* de l'effet antimicrobien de ou des substances actives extraites (principes actifs) qui consiste à déterminer le spectre d'activité de ces composés sur des espèces bactériennes pour essayer de vérifier la sensibilité ou la résistance des germe pathogènes vis-à-vis de ces principes naturels.

### **Préparation des disques :**

Les disques, découpés dans du papier Wattman avec un diamètre de 6 mm à l'aide d'un perforateur, sont ensuite placés dans un tube à essai. Ils sont stérilisés dans un autoclave durant 20 minutes à une température de 120° C. Après stérilisation, ces disques sont conservés à température ambiante dans un tube à essai hermétiquement fermé.

### **Préparation d'inoculum :**

Les souches ont été ensemencées par stries sur milieu gélosé Mueller Hinton ; après incubation 37°C, 5 colonies bien isolées furent prélevées et émulsionnées dans 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9%. Ensuite des dilutions ont été faites afin de standardiser la suspension microbienne.

### **Préparation des boîtes de Pétri :**

La gélose de Muller-Hinton stérile prête à l'usage a été coulée dans des boîtes de pétri stériles. L'épaisseur de la gélose est de 4-5 mm répartie uniformément dans les boîtes et placées à côté du bec bunsen jusqu'à la solidification de la gélose.

### **Souches microbiennes testées :**

L'étude s'est concentrée sur cinq espèces bactériennes : *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) et *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). De plus, l'efficacité antifongique contre *Candida albicans* (ATCC 21300) a été évaluée. Dans cette optique, des disques de papier Whatman stériles, de 6 mm de diamètre chacun, ont été imprégnés avec une concentration de 20 mg/ml des extraits respectifs. Ensuite, ces disques préparés ont été placés sur des plaques d'agar Mueller-Hinton, qui avaient été préalablement inoculées avec des

suspensions bactériennes. Chaque suspension a maintenu une concentration d'environ  $10^5$  UFC/ml, correspondant à la norme 0,5 de McFarland (CLSI, 2022). Suite à cette configuration, les boîtes de Petri ont été incubées à une température de  $37^\circ\text{C}$  pendant 24 heures.

### **Ensemencement :**

Les boîtes de Pétri ont étéensemencées par étalement sur l'ensemble de la surface gélosée à l'aide d'un écouvillon stérile, après préparation des boîtes témoins. Par la suite, six disques imprégnés de différentes concentrations de la solution testée ont été disposés dans chaque boîteensemencée. Un disque a été imprégné de la solution mère, tandis que les cinq autres ont été imprégnés de dilutions décroissantes, à savoir :  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ . Après incubation des boîtes de Pétri à  $37^\circ\text{C}$  pendant 24 heures pour les bactéries et  $30^\circ\text{C}$  pendant 72h pour les champignons.

### **3. Evaluation des activités biologiques *in vivo* de *Ruta montana* :**

#### **3.1. Evaluation du pouvoir détoxifiant :**

##### **3.1.1. Animaux et conditions d'élevage :**

Quarante-deux rats mâles albinos de souche Wistar (*Rattus norvegicus*), d'un poids moyen de  $178 \pm 67,2$  g, ont été obtenus auprès de l'Institut Pasteur d'Alger. Les animaux ont été hébergés dans l'animalerie du Département des Sciences Naturelles et de la Vie de l'Université du 20 Août 1955 de Skikda. Une période d'acclimatation de 20 jours a été respectée, durant laquelle les rongeurs ont été maintenus dans des conditions contrôlées (température:  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) sous une photopériode naturelle. L'accès à l'eau distillée et à la nourriture standardisée (granulés pour rongeurs) ont été assurés *ad libitum*. Les rats ont été répartis dans des cages en polypropylène aux dimensions standardisées (90 cm  $\times$  90 cm  $\times$  90 cm), conformément aux directives éthiques internationales sur l'hébergement des modèles animaux.

##### **3.1.2. Traitement des rats :**

Cette étude repose sur l'administration aux rats un produit toxique le tébuconazole (TBC) ; un fongicide systémique de la classe des triazolés, a été employé sous sa forme commerciale Medalion® (Rotam Agrochemical (HK) Co., Ltd.), contenant 430 g/L de principe actif. Une dose de 100 mg/kg a été choisi selon la littérature (Berrouague *et al.* 2019). Et

l'administration de l'extrait hydroethanolique de la plante à raison de deux doses (50 et 100 mg/kg), sélectionnées sur la base de la DL<sub>50</sub> déterminée par **Ghedjati et al. (2022)**.

Les rats ont été répartis en six cohortes, chacune composée de sept individus, comme suit : le groupe témoin (T), un groupe témoin négatif (TBC) recevant 100 mg/kg/jour du fongicide. Les troisième et quatrième groupe ont reçu des doses de 50 mg/kg de poids corporel (RM1) et 100 mg/kg de poids corporel (RM2) d'extrait éthanolique de *Ruta montana*, respectivement. Ensuite, le cinquième et le sixième groupe ont reçu une combinaison de TBC+RM1 et TBC+RM2, respectivement. Le gavage a été réalisée par voie orale à l'aide d'une sonde en acier inoxydable, pendant une période de 50 jours (**Figure 18**).

### 3.1.3. Sacrifice des rats et prélèvement des échantillons :

À la fin de l'expérience (50 jours), après 12h de jeûne les rats ont été sacrifiés par décapitation. Des échantillons de sang ont été prélevés, fractionnés sur trois types de tubes. Des tubes contenant de l'EDTA pour le dosage des paramètres hématologiques, tubes héparinés pour des analyses biochimiques et des tubes secs pour l'estimation des hormones.

Les organes (foie, testicules, reins) ont été soigneusement prélevés, nettoyés minutieusement avec une solution de NaCl à 0,9 %, pesé, puis conservé dans une solution de formol à 10 % pour des analyses ultérieures (**Figure 18**).

*Le poids relatif des différents organes a été mesuré selon la formule suivante :*

$$\text{Poids relatif de l'organe} = \frac{\text{Poids absolu de l'organe (g)}}{\text{Poids corporel du rat le jour du sacrifice (g)}} \times 100$$

### 3.1.4. Dosage :

Les paramètres hématologiques, biochimiques et hormonaux ont été analysés dans le cadre de cette étude au laboratoire d'analyses médicales de SONATRACH à Skikda.

#### *Dosage des paramètres hématologiques :*

Les analyses hématologiques effectuées dans notre étude comprenaient la numération des globules blancs (WBC), la quantification de l'hémoglobine (Hb), la mesure de l'hématocrite (HT), le dénombrement des plaquettes (PLT) et le comptage des globules rouges (RBC). Pour réaliser ces mesures de manière précise et fiable, nous avons utilisé un compteur électronique avancé, le MINDRAY® modèle BC 5380.

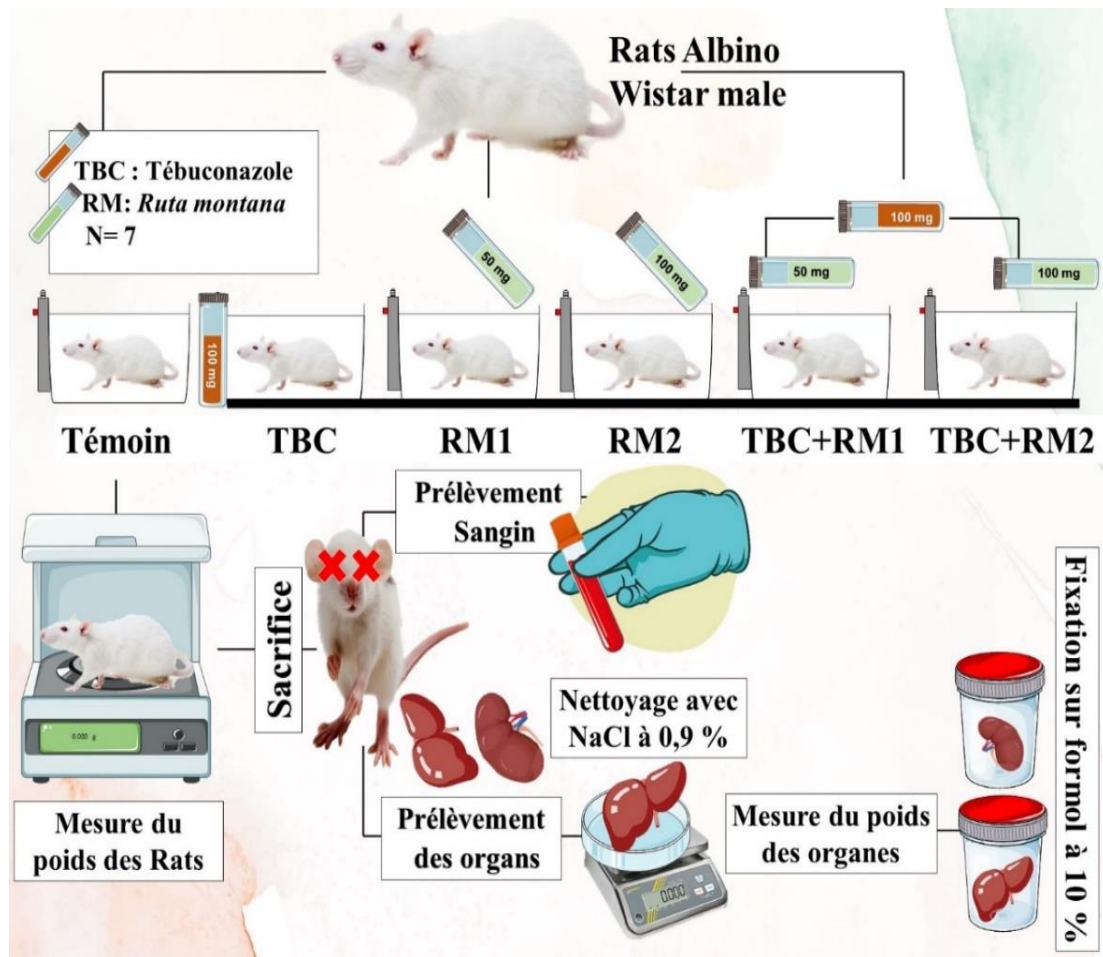


Figure 18 : Résumé du protocole expérimental de l'étude biologique *in vivo*.

### Dosage des paramètres biochimiques :

L'évaluation des paramètres biochimiques des échantillons a été réalisée en utilisant des méthodes enzymatiques et colorimétriques. Les analyses ont été effectuées en utilisant l'analyseur automatisé Beckman-Coulter Synchron LX20 PRO, un équipement doté d'un microprocesseur avancé qui permet le traitement simultané d'une variété étendue de composés chimiques. Les mesures quantitatives de haute précision ont été garanties par le système optique novateur, en accord avec les constatations faites par **Mikolaenko et al. (2000)**.

Les paramètres dosés sont les suivants :

la créatinine (Cr) mesurée en mg/l, l'urée (U) en g/l, l'acide urique (UA) en g/l, le fer sérique (Fe) en mg/l, le calcium ( $\text{Ca}^{++}$ ) en mg/l, le phosphore (Phos) en mg/l, ainsi que le magnésium (Mg) en mg/l. Les enzymes hépatiques évaluées incluent l'AST (aspartate aminotransférase), l'ALT (alanine aminotransférase), l'ALP (phosphatase alcaline) et la LDH (lactate

déshydrogénase), toutes exprimées en unités par litre (u/l). D'autres indicateurs biologiques tels que les protéines totales (TP) et l'albumine (ALB) en g/l, la bilirubine totale (TB) en mg/l, le Glycémie (GLI) en g/l, ainsi que les lipides sanguins — cholestérol total (TC), lipoprotéines de haute densité (HDL), et triglycérides (TG), tous en g/l .

### **Dosage des paramètres hormonaux :**

Les niveaux de FSH, LH et testostérone ont été mesurés en utilisant la méthode ELFA sur un automate VIDAS-BIOMÉRIEUX. Les résultats ont été exprimés en nanomoles par litre (nmol/L) avec une fourchette allant de 6 à 320 nmol/L. Avant chaque analyse, les échantillons ont été laissés à température ambiante et équilibrés avec 200  $\mu$ L, comme décrit par **Anderson et al. (2017)**.

### **3.1.5. Analyse des caractéristiques des spermatozoïdes :**

L'épididyme de chaque rat a été placé dans 1 ml de tampon de Ringer. Les spermatozoïdes ont été obtenus en faisant de petites coupes dans l'épididyme caudal et dilués en ajoutant 9 ml de tampon de Ringer (1/10), puis incubés à 37°C pendant 10 minutes (**Merghem et al., 2017**). Le nombre des spermatozoïdes a été déterminé à l'aide d'une lame malassez.

La vitalité des spermatozoïdes a été réalisée à l'aide d'une coloration à l'éosine/nigrosine. La coloration a été évaluée sur une lame de microscope, avec une goutte de sperme frais pour deux gouttes de solution de coloration. Un frottis a été réalisé et laissé sécher sur une autre lame. Les spermatozoïdes non colorés et les spermatozoïdes dont la membrane est endommagée ont été comptés au microscope, le pourcentage de cellules intactes correspondant à la viabilité des spermatozoïdes (**Eliasson, 1977**).

### **3.1.6. Examen histopathologique :**

L'étude anatomopathologique des organes a été réalisée auprès du service de l'anapath au niveau l'hôpital de saad guermach Skikda selon les indications de **Hould (1984)**.

Il s'agit du protocole le plus largement utilisé en histopathologie, qui consiste à fixer les tissus avec du formol, puis à les inclure dans de la paraffine. Cette méthode a été affinée au fil du temps pour améliorer la précision et faciliter l'examen microscopique (**Al-Sabaawy et al., 2021**). Une fixation, une déshydratation, un enrobage et une coloration appropriés sont essentiels pour minimiser la distorsion des tissus et améliorer la précision du diagnostic (**Henriques, 1981**) comme suivant :

### **Fixation :**

Les échantillons destinés à l'analyse histologique ont été préservés initialement dans du formol. Par la suite, les tissus prélevés de chaque Rat ont été extraits du formol et minutieusement découpés avec un scalpel pour obtenir des prélèvements d'une superficie approximative de 1 à 2 cm<sup>2</sup> et d'une épaisseur avoisinant 1,5 mm. Ces fragments ont été ensuite placés dans des cassettes spécialisées, conçues avec des parois ajourées formant des canaux, facilitant ainsi la circulation des liquides.

### **Déshydratation :**

L'étape de déshydratation a impliqué le traitement des échantillons par immersion séquentielle dans des solutions d'éthanol de concentrations graduelles (70, 80, 90 et 100 %), adaptées à l'épaisseur des tissus, suivie d'une immersion dans des bains de xylène. Un rinçage intermédiaire avec de l'eau distillée a été réalisé entre le troisième et le quatrième bain d'éthanol.

### **Inclusion et réalisation des blocs :**

Suite à la déshydratation, les sections anatomiques subissent une série d'immersions dans différents bains de paraffine liquide, assurant leur imprégnation complète. Chaque échantillon est récupéré à la fin du processus d'imprégnation et placé immédiatement entre des barres de Leuckart dans un fond de paraffine, une étape connue sous le nom d'enrobage. Les étapes suivantes de refroidissement et de solidification conduisent à la formation d'un bloc de paraffine dur, au sein duquel le tissu est correctement positionné.

### **Confection des coupes :**

La préparation des coupes histologiques s'effectue grâce à un microtome (Leica® Manual RM2125 RTS, Leica Biosystems, Nussloch, Allemagne), un outil spécialisé permettant de réaliser des sections fines de 2 à 5 µm, assemblées en rubans. Ces rubans sont déployés, étalés et fixés sur des lames à l'aide d'eau gélatineuse chauffée.

### **Déparaffinage et Réhydratation :**

Pour extraire les échantillons des lames enrobées, une procédure inversée est mise en œuvre. Les lames sont d'abord chauffées à 100°C durant 20 minutes dans une étuve, puis immergées dans deux bains de xylène, un solvant pour la paraffine. Les tissus sont ensuite réhydratés par des immersions successives dans des bains d'éthanol à des concentrations décroissantes (100, 90, 80 et 70 %), puis dans de l'eau distillée.

### **Coloration et montage :**

La coloration est réalisée selon la méthode Hématoxyline-Eosine, qui implique l'utilisation d'alcool acide, d'eau ammoniacale et d'une solution d'Eosine. Puis une déshydratation des échantillons, clarification, et un montage entre lame et lamelle pour observation au microscope photonique, équipé d'une caméra pour la prise d'images.

En fin ces lames ont été examinées pour détecter des altérations histologiques et observées au microscope (Euromex® Iscope IS.1152-EPL, bio).

### **3.2. Évaluation de l'effet anti-inflammatoire de l'extrait de *Ruta montana* :**

Cette étude est menée sur 42 rats Albinos Wistar mâles, pesant entre 200 et 250g. Avant l'expérimentation, les animaux subissent une période d'adaptation de 2 semaines. L'étude de l'activité anti-inflammatoire de *Ruta montana* a été réalisée en utilisant l'œdème de l'oreille induit par le xylène. L'effet anti-inflammatoire de *Ruta montana* a été évalué à l'aide du test de l'œdème de l'oreille induit par le xylène (Atta, 1998 ; Bousselsela et al., 2022).

#### **3.2.1. Œdème de l'oreille induit par le xylène :**

L'extrait éthanolique de *Ruta montana* a été administré aux rats par voie orale à la dose de 100 mg/kg, une heure avant l'induction de l'inflammation. Cette dernière est provoquée par l'application de 60 µL de xylène pur sur la face interne et externe de l'oreille gauche de chaque rat, l'oreille droite servant de contrôle pour cela trois groupes de 7 rats ont été formés

- **Groupe contrôle (n= 7) :** Les rats ont reçu 60 µL de xylène sur l'oreille gauche sans aucun traitement.
- **Groupe test (n= 7) :** Les rats ont reçu 60 µL de l'extrait éthanolique (100 mg/kg) de *Ruta montana* par voie orale, une heure avant l'application du xylène.
- **Groupe référence :** Rats ont reçu de 100 mg/kg d'aspirine (anti-inflammatoire de référence) par voie orale, une heure avant l'application du xylène.

L'épaisseur des oreilles (droite et gauche) est mesurée à l'aide d'un pied à coulisse digital avant l'application du xylène (t0) puis toutes les 60 minutes pendant 3 heures (t1, t2 et t3). L'augmentation de l'épaisseur est considérée comme un indicateur de l'inflammation de l'oreille.

### 3.2.2 Évaluation de l'activité analgésique :

L'effet analgésique de *Ruta montana* a également été étudié à l'aide du test d'immersion de la queue, selon le protocole **d'Koua et al. (2024)**. Ce test consiste à immerger l'extrémité de la queue des rats (environ 2 cm) dans de l'eau chaude maintenue à 55 °C, puis à mesurer le temps de latence (temps nécessaire pour que le rat retire sa queue de l'eau)

trois groupes de 7 rats ont été formés :

- **Groupe témoin** : Les rats ne reçoivent aucun traitement avant l'immersion.
- **Groupe test** : Administration orale de 100 mg/kg d'extrait méthanolique de *Ruta montana*, une heure avant la première immersion.
- **Groupe référence (n= 7)** : Administration orale de l'aspirine 60 µL (100mg/kg) une heure avant l'immersion.

### 4. Modélisation des Propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques :

La modélisation des propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques est une approche qui utilise des méthodes mathématiques et informatiques pour prédire les caractéristiques d'une molécule, notamment en lien avec son comportement dans un organisme. Elle est essentielle dans la découverte de la dangerosité des molécules ainsi qu'au développement de nouveaux médicaments à base de plante.

#### 4.1. SwissADME :

La base de données SwissADME (**Figure 19**) (<http://www.swissadme.ch/index.php>) est une ressource web de pointe qui offre un accès gratuit à l'évaluation et à la prévision des propriétés moléculaires essentielles, y compris les attributs physicochimiques (par exemple, taille moléculaire/SIZE, lipophilie/LIPO, polarité/POLA, insolubilité/INSO), la pharmacocinétique, la similarité avec les médicaments et la compatibilité avec la chimie médicinale pour les petites molécules. En outre, il intègre des instruments sophistiqués tels que le modèle BOILED-Egg (prévision de l'absorption gastro-intestinale et de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique) et le Bioavailability Radar, que les utilisateurs peuvent utiliser pour améliorer les stratégies d'optimisation des composés (**Daina et al.,2017**).

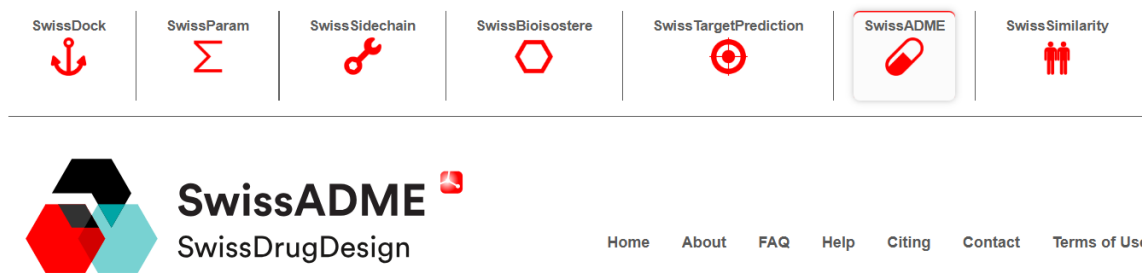


Figure 19 : Site web de base de données SwissADME.

#### 4.2. L'analyse toxicologique prédictive :

Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic (PKCSM), disponible à l'adresse <http://structure.bioc.cam.ac.uk/pkcsm> (Figure 20) est un outil de calcul crucial pour la recherche pharmacologique. Il intègre les propriétés moléculaires - telles que les caractéristiques physicochimiques, les pharmacophores et les toxicophores - avec des signatures graphiques basées sur la distance. Cette approche permet aux chimistes médicaux d'évaluer systématiquement les relations entre la pharmacocinétique, l'efficacité thérapeutique et la toxicité, contribuant ainsi à la conception de médicaments candidats plus sûrs et plus efficaces (Pires et al., 2015).

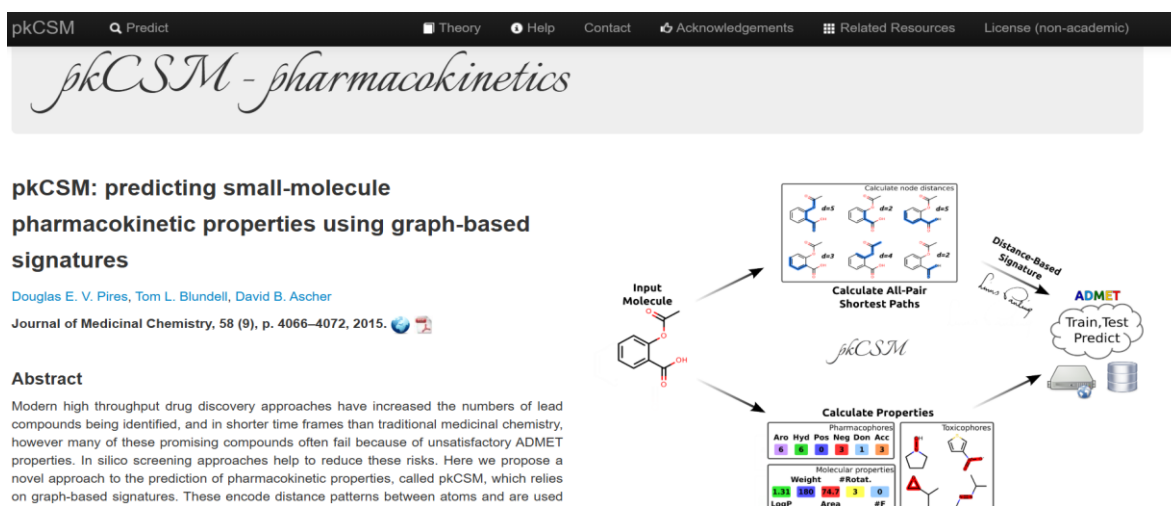


Figure 20 : Site web de base de données PKCSM.

L'analyse toxicologique prédictive repose sur une évaluation catégorielle (AMES toxicity / Test d'Ames ; hERG I/II inhibitor / Inhibiteur hERG I/II) et quantitative (Max. Tolerated Dose (human) / Dose maximale tolérée (humain) ; Oral Rat Acute Toxicity (LD<sub>50</sub>) / Toxicité orale aiguë chez le rat (LD<sub>50</sub>)) des risques associés à une molécule. Les réponses binaires (Yes/No) reflètent la présence ou l'absence d'un effet toxique spécifique

(mutagénèse (AMES toxicity), inhibition de canaux ioniques (hERG inhibition), hépatotoxicité (Hepatotoxicity), sensibilisation cutanée (Skin Sensitisation), etc.), où un résultat *Yes* indique un risque potentiel nécessitant une investigation approfondie, tandis qu'un *No* suggère une absence de dangerosité détectée par les modèles prédictifs. Pour les paramètres numériques (ex : *dose maximale tolérée* (Max. Tolerated Dose), *toxicité aiguë* (Acute Toxicity), *toxicité chronique* (Chronic Toxicity (LOAEL)), *toxicité environnementale* (*T.Pyriiformis toxicity* / *Toxicité pour Tetrahymena pyriformis* ; *Minnow toxicity* / *Toxicité pour Pimephales promelas*)), les valeurs sont interprétées en référence à des seuils toxicologiques établis : une valeur conforme aux normes réglementaires (ex : *log mg/kg/day* ou *mol/kg*) implique un profil de sécurité acceptable, tandis qu'un dépassement signale un risque toxique ou une marge thérapeutique réduite, exigeant une réévaluation de la structure chimique ou du dosage. Cette approche permet une identification précoce des aléas biologiques et environnementaux, alignée sur les exigences des bonnes pratiques de découverte pharmaceutique (*Good Drug Discovery Practices*).

### 5. Traitement statistique des résultats :

Pour l'analyse statistique des résultats, on a utilisé la version 9.2.0 de GraphPad Prism (GraphPad Software, LLC, CA, USA). Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  SEM. Les données des différents groupes ont été comparées à l'aide d'une analyse unidirectionnelle de la variance (one-way ANOVA), suivie d'un test post-hoc de Tukey ainsi qu'un test de student (pour l'étude biologique *in vivo*). Tous les résultats ont été considérés comme significatifs si la valeur de  $P < 0.05$ .



# *Chapitre* **III**

## *Résultats et*

## *discussion*



### 1. Etude phytochimique :

#### 1.1. Rendement :

Dans le cadre de notre étude sur *Ruta montana*, nous avons méthodiquement appliqué la macération éthanolique à sa poudre sèche, aboutissant à une gélose visqueuse de couleur verte avec un rendement notable de 11,994 %.

Ce résultat est similaire aux résultats obtenus par **Ghedjati et al. (2022)**, qui ont atteint un rendement de 12,42% en surpassant ainsi le rendement rapporté par **Mahdeb et al. (2023)** de l'ordre de 8,43%. Divers éléments exercent une influence sur cette variation, tels que la période de macération, la composition chimique de la plante, sujette à des variations selon le lieu géographique et la période de récolte, le stade de croissance des parties récoltées, les propriétés du sol, les conditions météorologiques (**Brown et al., 2012**), ainsi que le type de solvant utilisé pour l'extraction (**Kalt et al., 2001**).

#### 1. 2. Résultats des composé polyphénoliques de la Plante *Ruta montana* :

Les concentrations de polyphénols totaux, de flavonoïdes et de tanins ont été mesurées en se basant sur des courbes d'étalonnage de l'acide gallique, de la quercétine et de l'acide tannique, respectivement. Les résultats sont rapportés en milligrammes d'acide gallique équivalents par gramme d'extrait sec (mg EAG/g ES) pour les polyphénols totaux, en milligrammes de quercétine équivalents par gramme d'extrait sec (mg EQ/g ES) pour les flavonoïdes, et en milligrammes d'acide tannique équivalents par gramme d'extrait sec (mg EAT/g ES) pour les tanins.

##### 1.2.1. Teneurs en polyphénols totaux :

Nous avons pu évaluer avec précision les quantités de polyphénols présentes dans chaque échantillon en utilisant la courbe d'étalonnage comme référence. Cette courbe, représentée dans l'**Annexe 3**, a permis d'établir une relation mathématique entre les valeurs mesurées (Y) et les concentrations de polyphénols réelles (X), grâce à l'équation  $Y=0,6297X+0,0311$ .

##### 1.2.2. Teneur en flavonoïdes :

Les quantités de flavonoïdes présentes dans chaque échantillon ont été calculées en utilisant la courbe d'étalonnage. Cette courbe, représentée dans l'**Annexe 4**, a été établie à l'aide de

l'équation  $Y = 0,5901x + 0,0704$ , où Y représente la quantité de flavonoïdes et x correspond à une certaine valeur mesurée.

### 1.2.3. Teneur en tanins :

La courbe d'étalonnage des tanins, qui a été établie en mesurant les variations d'absorbance de l'acide tannique à différentes concentrations, occupe une place cruciale dans cette étude. Cette courbe permet de relier de manière précise la concentration en tanins aux valeurs d'absorbance obtenues, offrant ainsi une base solide pour l'analyse des échantillons étudiés. L'équation obtenue est de la forme  $Y = 0,7049x + 0,1169$  (**Annexe 5**).

Les résultats de l'analyse démontrent clairement que l'échantillon de *R. montana* (RM) renferme des teneurs notables en phytochimiques, suggérant une richesse potentielle en composés bioactifs. Plus précisément, l'échantillon présente un taux total de  $3,31 \pm 0,04$  mg en polyphénols, une teneur en flavonoïdes de  $3,35 \pm 0,10$  mg et une concentration en tanins condensés de  $1,61 \pm 0,004$  mg (**Tableau 3**).

**Tableau 3** : Teneur en polyphénols, flavonoïdes et tanins dans l'extrait éthanolique de *Ruta montana* (mg EAG, EQ, et EAT/g ES).

Composés phénoliques	Extrait de <i>R. montana</i>
Teneur en polyphénols (mg EAG/g ES)	$3,31 \pm 0,04$
Teneur en flavonoïdes (mg EAQ /g ES)	$3,35 \pm 0,10$
Teneurs en tanins (mg EAT/g ES)	$1,61 \pm 0,004$

EAG signifie "Équivalent en Acide Gallique" et est couramment employé pour mesurer le contenu phénolique total. EAQ, ou "Équivalent en Acide Quercétine", est utilisé pour quantifier les flavonoïdes totaux, tandis que EAT, qui signifie "Équivalent en Acide tannique", est utilisé pour évaluer le niveau de tanins condensés.

L'analyse quantitative menée dans notre étude démontre que l'extrait brut de *R. montana*, présentant une concentration de  $3,31 \pm 0,04$  mg EAG/g ES, possède un niveau remarquablement comparable de contenu phénolique total à celui rapporté par **Khadri et al. (2017)**, qui ont également identifié une concentration élevée de composés phénoliques dans l'extrait d'éthanol dérivé des feuilles de *montana*. De plus, notre recherche corrobore les résultats de **Khadri et al. (2014)**, indiquant que les feuilles et les tiges de *Ruta montana* sont notablement plus riches en composés polyphénoliques par rapport à diverses autres flores médicinales. Néanmoins, malgré les nombreux avantages associés aux polyphénols, leur

utilisation pratique peut être considérablement limitée par leur instabilité intrinsèque et leur biodisponibilité restreinte (Laib et al., 2023).

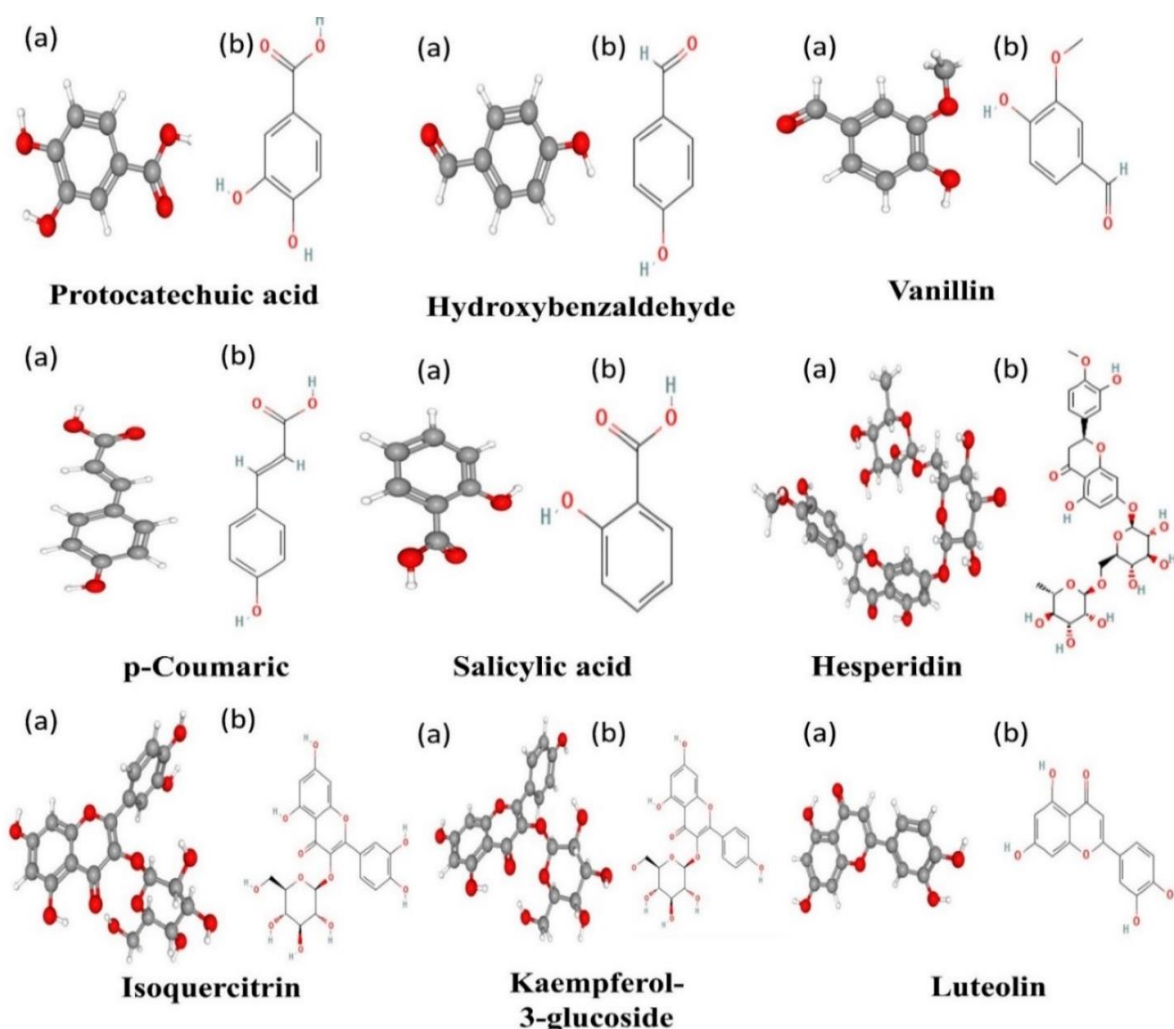
L'examen de la teneur en flavonoïdes des extraits éthanoliques de *Ruta montana* a révélé une concentration nettement élevée, mesurée à  $3,35 \pm 0,10$  mg d'équivalents de quercétine par gramme d'extrait (mg EAQ /g ES). Ce résultat dépasse nettement les niveaux de flavonoïdes trouvés dans les extraits méthanoliques à 70 % de la même espèce, traités par extraction Soxhlet ( $0,843 \pm 0,042$  mg EAQ /g) et ( $0,545 \pm 0,027$  mg EAQ /g de plante sèche) pour les techniques de macération, comme indiqué dans la recherche de **Drioiche et al. (2020)**, les disparités observées dans les concentrations de flavonoïdes dans les extraits examinés sont probablement attribuables aux variations de la solubilité des composés phénoliques, qui est influencée par la température d'extraction, ainsi qu'aux caractéristiques chimiques inhérentes de ces composés phénoliques. Le choix de la technique d'extraction est crucial, car il influence considérablement l'efficacité de l'extraction et la quantification ultérieure des flavonoïdes (**Do Quy Diem et al., 2019**). Les rendements de la teneur en flavonoïdes obtenus dans notre étude montrent des différences significatives par rapport aux résultats de **Djeridane et al. (2006)** et **Khadhri et al. (2017)**, indiquant une concentration totale notable de polyphénols et de flavonoïdes démontrant une divergence significative attribuable au cultivar particulier et aux techniques d'extraction.

Dans une analyse comparative des concentrations de tanins entre les différents extraits de solvants, nos résultats indiquent que l'extrait éthanolique, lorsqu'il est ajusté à des unités de mesure uniformes, démontre une teneur en tanins significativement plus élevée, avec une concentration de 1,61 mg d'équivalents d'acide tannique (EAT) par milligramme d'extrait. Cela contraste fortement avec les concentrations observées dans d'autres extraits tels que l'extrait d'acétate d'éthyle ( $251 \pm 1,41$  µg EAT /mg), l'extrait de chloroforme ( $83 \pm 0,98$  µg EAT /mg), l'extrait brut ( $80,33 \pm 0,70$  µg EAT /mg) et l'extrait aqueux ( $33,6 \pm 0,84$  µg EAT /mg), comme le rapportent **Merghem et Dahamna. (2020)**. En outre, **Drioiche et al. (2020)** ont constaté que la présence de tanins galliques et catéchiques était spécifiquement notée dans les parties aériennes de la plante, soulignant son potentiel en tant que source d'antioxydants naturels.

Le profil phytochimique de *Ruta montana* est sujet à des variations influencées par une multitude de déterminants tels que la phase de développement de la plante, la saison de la récolte, le choix du solvant d'extraction, la partie spécifique de la plante utilisée, l'origine géographique de la plante, les conditions dans lesquelles le matériel végétal est stocké et les techniques analytiques appliquées à l'examen, comme l'ont expliqué **Benkhaira et al. (2022)**.

### 1.3. Identifications qualitative et quantitative des composés phénoliques de l'extrait éthanolique du *Ruta montana* par LC-MS/MS :

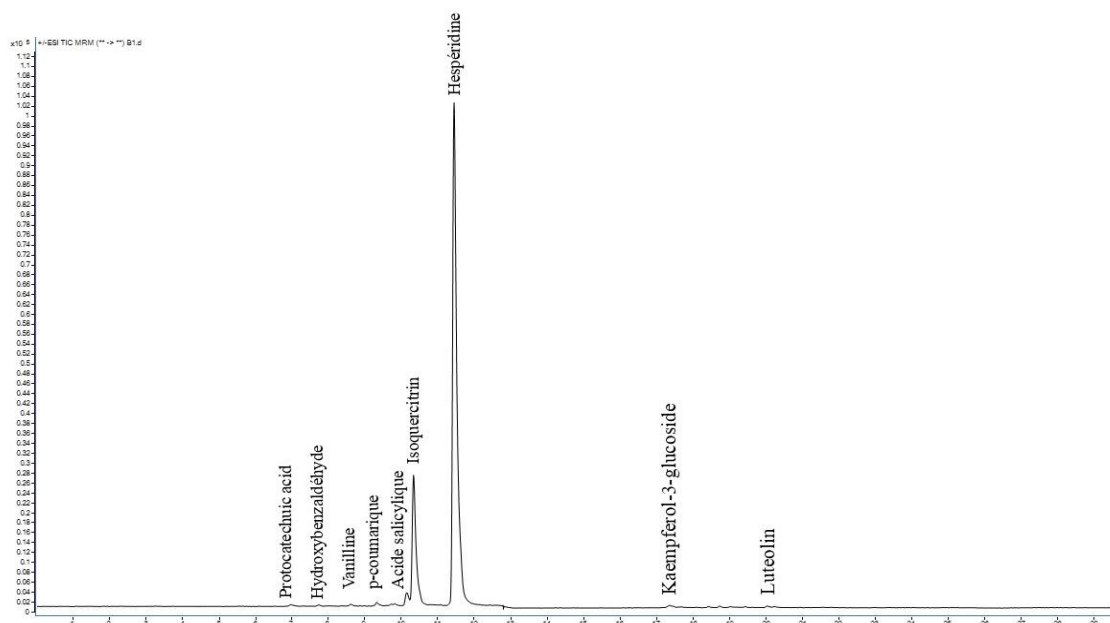
L'extrait testé a été analysé à l'aide d'un instrument LC-ESI-MS. Les chromatogrammes obtenus ont été traités par le logiciel d'analyse qualitative B.07.01 de la station de travail Agilent Mass Hunter. Notre étude des différents composés bioactifs dans la *Ruta montana* a conduit à l'identification de 9 composés (**Tableau 4**) : l'acide protocatéchuique, l'hydroxybenzaldéhyde, l'acide salicylique, Vanillin, Isoquercitrin, p-coumaric acid, l'hespéridine, le kaempférol-3-glucoside et la lutéoline. Les composés identifiés sont représentés dans la **Figure 21-22**.



**Figure 21** : Structure des composés de *Ruta montana* par LC-MS : (a) Structure 2D et (b) Structure 3D par Pubchem (**PubChem., 2025**).

**Tableau 4 :** Composition des composés phénoliques identifiés à l'aide de l'analyse LC-MS.

N°	Nom	<i>Ruta montana</i> (mg/g)	Source d'ions	RT	Transitions d'ions	Mod d'ions	R2	LOQ (ug/L)	LOD (ug/L)	Linéarité Gamme (ug/L)
1	<b>Protocatechuic acid</b>	0,0251568	ESI	5,449	153.0 -> 109.0	Positive	0,9969	13,1729	3,1564	15.625- 250
2	<b>Hydroxybenzaldehyde</b>	0,0324748	ESI	7,679	121.0 -> 92.0	Positive	0,9993	12,8651	4,9742	15.625- 250
3	<b>Vanillin</b>	0,0444	ESI	8,649	153.0 -> 125.0	Positive	0,9949	40,5411	14,5885	62,5-1000
4	<b>p-coumaric acid</b>	0,0519758	ESI	9,441	163.0 -> 119.1	Positive	0,9996	7,9973	4,0164	15.625- 500
5	<b>Salicylic acid</b>	0,2049716	ESI	9,539	137.0 -> 93.1	Positive	0,9981	82,9646	47,6695	112.5- 1800
6	<b>Hesperidin</b>	22,8657336	ESI	11,842	611.0 -> 302.9	Positive	0,9957	17,6753	4,1396	31.25-500
7	<b>Isoquercitrin</b>	0,5499434	ESI	11,867	464.9 -> 302.8	Positive	0,9982	11,2680	9,9382	18.75-300
8	<b>Kaempferol-3- glucoside</b>	0,0109754	ESI	13,287	448.8 -> 286.9	Positive	0,9997	4,5238	1,1609	7.8125- 125
9	<b>Luteolin</b>	0,3431152	ESI	17,909	285.0 -> 133.1	Positive	0,9962	21,4535	20,0000	31.25-500



**Figure 22** : Composés phénoliques identifiés à l'aide de l'analyse LC-MS.

L'analyse phytochimique de *Ruta montana* par LC-MS/MS a conduit à l'identification de neuf composés clés : l'acide protocatéchique, l'hydroxybenzaldéhyde, la vanilline, l'acide *p*-coumarique, l'acide salicylique, l'hespéridine, l'isoquercitrine, le kaempférol-3-glucoside et la lutéoline. Ces composés sont bioactifs et contribuent aux propriétés médicinales de la plante. Afin de contextualiser ces résultats, des comparaisons avec d'autres espèces de la famille des Rutacées offrent un éclairage sur la diversité et la cohérence des profils phytochimiques au sein de cette famille. Plusieurs de ces composés sont fréquemment rapportés chez les Rutacées. Par exemple, l'hespéridine, le composé le plus abondant dans *Ruta montana* (22,87 mg/g), se retrouve également de manière prédominante chez des espèces de *Citrus*, notamment *Citrus sinensis* et *Citrus aurantium*, où elle exerce d'importantes activités antioxydante et anti-inflammatoire. **Kawaii et al. (1999)** ont par ailleurs mis en évidence les effets protecteurs de l'hespéridine tant chez les espèces de *Citrus* que chez *Ruta*, soulignant son rôle de modération.

Le kaempférol-3-glucoside (0,011 mg/g), un autre composé détecté dans *Ruta montana*, est également présent dans *Ruta graveolens*, comme l'ont rapporté **Lin et Harnly (2007)**. Les dérivés du kaempférol sont reconnus pour leurs propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires, et leur présence dans plusieurs espèces de Rutacées témoigne de leur rôle dans l'atténuation du stress oxydatif. La faible concentration de kaempférol-3-glucoside dans *Ruta montana* rejoint les observations faites chez d'autres espèces, soulignant son importance fonctionnelle malgré sa présence modeste.

La lutéoline (0,343 mg/g), un flavonoïde réputé pour ses puissantes activités antioxydante, anti-inflammatoire et anticancéreuse, a également été mise en évidence dans *Ruta montana*. Elle a d'ailleurs été identifiée chez *Ruta chalepensis* et *Ruta graveolens*, comme l'ont montré **Raghav et al. (2006)**, illustrant sa large répartition au sein de la famille des Rutacées. De même, l'acide protocatéchique, détecté à 0,025 mg/g, se retrouve dans d'autres Rutacées, notamment *Ruta graveolens* et certaines espèces de *Citrus*. **El-Sonbaty et al. (2019)** ont souligné le potentiel hépatoprotecteur de l'acide protocatéchique, mettant en évidence son rôle d'antioxydant puissant. L'intégration de ce composé dans *Ruta montana* appuie donc son usage traditionnel pour la protection et la limitation des dommages oxydatifs.

Bien que l'acide salicylique (0,205 mg/g) et la vanilline (0,044 mg/g) soient moins souvent rapportés dans d'autres Rutacées, leur présence dans *Ruta montana* révèle un caractère distinctif de cette espèce. **Zaidi et al. (2023)** ont insisté sur les propriétés anti-inflammatoires et hépatoprotectrices de l'acide salicylique, renforçant la valeur thérapeutique de *Ruta montana* et complétant les effets des autres composés phénoliques.

À notre connaissance, cette étude constitue la première utilisation de la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) pour analyser l'extrait éthanolique de *Ruta montana*. Les résultats de LC-MS concordent étroitement avec ceux de **Szopa et al. (2012)**, qui ont montré la capacité de la famille des Rutacées à synthétiser l'acide protocatéchique et l'acide *p*-coumarique. Nos données corroborent également celles de **Asgharian et al. (2020)**, qui ont mis en évidence la lutéoline chez *Ruta graveolens*, ainsi que celles de **Al-Jaberi et al. (2023)**, confirmant la présence d'hespéridine dans *Ruta chalepensis*.

Fait notable, notre analyse n'a pas permis de détecter certains composés phénoliques rapportés dans des études antérieures sur *Ruta montana*. **Bouhenna et al. (2023)** ont en effet identifié, dans les extraits bruts, *n*-butanol, chloroforme et acétate d'éthyle des parties aériennes de *Ruta montana*, des molécules telles que la rutamontine, l'umbelliférone, la daphnorétine, le méthyléther de daphnorétine, la scopolétine, la chalépine, la rutarétine, la 6,7,8-triméthoxycoumarine, l'acide 4-*O*-féroyl quinique, l'acide 4-*O*-*p*-coumaroylquinique, la cnidioside A, la subérénone, la diméthylallyl-herniarine, la 6,8-*C*-dihexosyl-apigénine, l'isorhamnétine-3-*O*-rutinoside ou encore la sinapoylferuloylxlosapoyhex.

Cette divergence entre nos observations et les études antérieures peut s'expliquer par plusieurs facteurs. **Bouzana et al. (2023)** suggèrent que les variations de la composition phytochimique peuvent découler de différences liées aux espèces étudiées, à la quantité et au

type de standards disponibles ou encore à l'origine géographique de la récolte. Par ailleurs, les méthodes d'extraction jouent un rôle crucial dans l'obtention du profil phénolique. **Bouhenna et al. (2023)** ont ainsi indiqué que le *n*-butanol et l'acétate d'éthyle peuvent extraire un éventail plus large de composés que l'éthanol. D'autres éléments, comme le stade de développement de la plante, la saison de récolte, la partie de plante utilisée, les conditions de stockage, ainsi que la méthodologie analytique mise en œuvre, peuvent également contribuer aux écarts de composition chimique (**Benkhaira et al., 2022 ; Jaisamut et al., 2021**). Donc nous supposons que les composés bioactifs identifiés dans *Ruta montana*, notamment l'hésperidine, la lutéoline et le kaempférol-3-glucoside, jouent vraisemblablement un rôle majeur dans les effets protecteurs observés.

### 2. Evaluation des activités biologiques *in vitro* de *Ruta montana* :

#### 2.1. Evaluation de l'activité antioxydante :

L'inhibition des radicaux libres a été mesurée par les méthodes DPPH et ABTS, couramment utilisées pour quantifier l'efficacité des antioxydants. L'IC<sub>50</sub> obtenu pour le test DPPH est de **0,126 ± 0,05 mg/ml**, tandis que celui du test ABTS est légèrement plus faible, à **0,104 ± 0,04 mg/mL**. L'analyse de la capacité antioxydante totale (TAC) de l'extrait a révélé une valeur de **0,291 ± 0,033 mg AAE/g dry (Tableau 5)**.

L'analyse de l'activité antioxydante de *Ruta montana* a été réalisée aussi à l'aide du test CUPRAC (Cupric Reducing Antioxidant Capacity), qui évalue la capacité de l'extrait à réduire les ions Cu<sup>2+</sup> en Cu<sup>+</sup>. La courbe d'étalonnage obtenue présente une équation de régression  $y = 1,2158x + 0,1694$  (**Annexe 6**) avec un coefficient de détermination  $R^2 = 0,9973$ , indiquant une forte linéarité et une bonne fiabilité du modèle de calibration.

Le test au 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) est l'une des méthodes les plus couramment utilisées pour évaluer l'aptitude d'un extrait à piéger les radicaux libres. Dans nos travaux, l'extrait cru de *R. montana* a montré une capacité anti-radicalaire particulièrement élevée, avec une valeur IC<sub>50</sub> de  $0,126 \pm 0,05$  mg/ml, surpassant ainsi d'autres fractions (extraits obtenus par différents solvants). Ces résultats confirment les observations antérieures d'**Allouni (2018)**, qui avait déjà souligné l'efficacité notable des extraits de *R. montana* contre le radical DPPH. Nos recherches sont en accord avec celles de **Ali et al. (2016)**, ayant obtenu une IC<sub>50</sub> de 0,12 mg/ml pour l'extrait éthanolique des parties aériennes de *R. montana*. Par ailleurs, **Khadhri et al. (2017)** ont mis en évidence une IC<sub>50</sub> de  $1,47 \pm 0,1$  µg/ml pour l'extrait

éthanolique des feuilles de la même espèce, illustrant son potentiel dans la réduction du stress oxydatif.

**Tableau 5 :** Activité antioxydante de l'extrait éthanolique de *R. montana* évaluée par les tests IC<sub>50</sub> DPPH, IC<sub>50</sub>, ABTS, CUPRAC et TAC.

Activité antioxydante				
	DPPH	ABTS	CUPRAC	TAC
	IC <sub>50</sub> (mg/mL)		A0.5 (mg/mL)	(mg AAE/g dry)
<i>R. montana</i>	0,126±0,05	0,104±0,04	0,271±0,08	0,291 ± 0,03
<b>Standard BHA</b>	0,1725±0,58	0,1889±0,08	0,0925±0,2	NT
<b>Standard BHT</b>	0,1568±0,08	0,1825±0,08	0,1528±0,258	NT

NT: Non Testé.

**Slougui et al. (2023)** ont, quant à eux, évalué différents extraits et l'huile essentielle de *R. montana*. Leurs résultats montraient des IC<sub>50</sub> dépassant 800 µg/ml pour l'huile essentielle, et variant de 169,18 ± 3,21 µg/ml pour l'extrait chloroforme à 84,01 ± 6,40 µg/ml (extrait Soxhlet hexane), 526,07 ± 6,52 µg/ml (extrait n-butanol) et 91,07 ± 0,67 µg/ml (extrait acétate d'éthyle). Par comparaison, notre extrait (IC<sub>50</sub> = 126 µg/ml) présente une activité plus puissante que celle de l'huile essentielle et de l'extrait n-butanol, mais légèrement inférieure à celle des extraits hexanique et acétate d'éthyle.

Le test ABTS (2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) complète le DPPH pour l'évaluation de l'activité antioxydante. Dans notre étude, l'extrait éthanolique des feuilles de *R. montana* a révélé une activité antioxydante intermédiaire, avec une IC<sub>50</sub> de 0,104 ± 0,04 mg/ml. Ces données se distinguent nettement des résultats de **Slougui et al. (2023)**, qui rapportent une IC<sub>50</sub> supérieure à 800 µg/ml pour l'huile essentielle et certains extraits délipidés de *R. montana*. Cependant, ce même travail souligne un gradient d'activité antioxydante chez diverses fractions de *Ruta*, avec des IC<sub>50</sub> décroissantes atteignant 36,22 µg/ml, 46,54 µg/ml, 59,48 µg/ml et 173,54 µg/ml, suggérant que les extraits de *Ruta* sont particulièrement riches en antioxydants (**Coimbra et al., 2020**).

Ces observations concordent avec celles menées sur d'autres espèces de *Ruta*, notamment *Ruta chalepensis*, qui a également montré une capacité notable de piégeage des

radicaux libres (Szewczyk et al., 2022). Laib et al. (2021) précisent, toutefois, que ces variations ne peuvent pas être uniquement attribuées à la teneur en composés phénoliques : d'autres constituants présents dans l'extrait, ou même des interactions spécifiques avec des levures et d'autres matrices biologiques, pourraient intervenir dans l'activité antioxydante observée.

Le test TAC, souvent réalisé par la méthode du phosphomolybdène, permet d'évaluer la capacité globale d'un extrait à réduire des métaux et à générer un complexe vert de phosphomolybdène. Les valeurs rapportées pour les extraits bruts (*crude extracts*) de *Ruta* varient généralement de 37,67 à 396,80 mg AAE/g CE (Barbouchi et al., 2024). Dans nos analyses, l'extrait brut de *R. montana* présente une TAC de  $0,291 \pm 0,0335$  mg AAE/g de matière sèche, signant un potentiel antioxydant non négligeable.

Parmi les divers extraits testés, la fraction éthanolique de *R. montana* se démarque souvent par son activité antioxydante la plus élevée, surpassant les fractions acétate d'éthyle, butanol ou chloroforme (Bouhenna et al., 2023). Barbouchi et al. (2024) indiquent en effet que les feuilles d'extraits éthanoliques de *R. montana* contiennent une TAC de  $159,02 \pm 1,40$  mg AAE/g CE.

Plusieurs études comparatives soulignent des activités antioxydantes variables au sein du genre *Ruta*. L'huile essentielle de *Ruta graveolens* provenant de Roumanie a montré une activité antioxydante notable, associée à la présence de composés bioactifs variés (Jianu et al., 2021). De même, l'huile essentielle de *R. montana* d'Algérie a démontré, dans le test DPPH, une activité antiradicalaire dépendante de la concentration (Kambouche et al., 2008). Au regard de ces données, *R. montana* affiche des propriétés antioxydantes comparables, voire supérieures, à certaines autres espèces de *Ruta*, soulignant l'importance de sa composition phénolique et de sa richesse en flavonoïdes (Jianu et al., 2021).

L'évaluation de l'activité antioxydante de *Ruta montana* à travers la méthode CUPRAC (Cupric Reducing Antioxidant Capacity) indiquent une valeur  $A_{0.5}$  de  $0,271 \pm 0,08$  mg/ml (soit 271  $\mu$ g/ml), ce qui reflète une activité modérée par rapport aux standards synthétiques tels que le BHA ( $0,0925 \pm 0,2$  mg/ml) et le BHT ( $0,1528 \pm 0,258$  mg/ml). En revanche, les fractions d'extrait éthanolique de *Ruta chalepensis* rapportées par Gali et Bedjou (2019) montrent des valeurs CUPRAC  $A_{0.5}$  beaucoup plus faibles, notamment pour les fractions butanolique ( $22,48 \pm 1,65$   $\mu$ g/ml) et acétate d'éthyle ( $40,71 \pm 0,86$   $\mu$ g/ml), indiquant une activité antioxydante nettement supérieure. Ces comparaisons confirment que l'activité antioxydante de *Ruta*

*montana* est compétitive mais légèrement supérieur à certaines plantes médicinales bien étudiées. Cependant, il est important de noter que cette évaluation représente une première dans la littérature scientifique concernant *Ruta montana*, car aucune étude antérieure n'a rapporté l'utilisation de la méthode CUPRAC pour analyser cette plante spécifique.

Certains composés, tels que l'héspéridine, la lutéoline et l'acide salicylique, sont bien connus pour leur activité antioxydante via différents mécanismes. L'héspéridine agit principalement en neutralisant les radicaux libres et en réduisant le stress oxydatif au niveau cellulaire (Li et Schluesener, 2017 ; Parhiz et al., 2015). La lutéoline est également reconnue pour ses propriétés antioxydantes puissantes ainsi que sa capacité à inhiber certaines enzymes pro-oxydantes (Chen et al., 2019). Ce qui confère à *Ruta montana* une forte activité antioxydante.

### 2.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne :

En s'inspirant des seuils de résistance aux antimicrobiens définis par Chifundera et al. (1990), qui définissent un spectre de résistance à partir d'un diamètre d'inhibition de 6 millimètres. Les souches présentant un diamètre de zone d'inhibition de 9 millimètres ou moins ont été jugées résistantes, celles dont le diamètre était compris entre 10 et 15 millimètres ont été marquées comme insensibles, celles présentant un diamètre compris entre 16 et 22 millimètres ont été reconnues comme sensibles, et celles dont le diamètre dépassait 22 millimètres ont été classées comme très sensibles. Les résultats de l'activité antimicrobienne sont présentés dans la **Figure 23**.

L'extrait éthanolique de *Ruta montana* présente un spectre d'efficacité variable sur l'ensemble du panel bactérien (**Figure 24**). Notamment, *Escherichia coli* 18,5 mm et *Klebsiella pneumoniae* 19 mm manifestent des zones d'inhibition équivalentes, contrairement à *Staphylococcus aureus* 14 mm et *Salmonella typhimurium* 13±1,73 mm. En revanche, la zone d'inhibition de 20 mm de *Pseudomonas aeruginosa* diminue nettement par rapport aux deux premières bactéries. La zone d'inhibition la plus nominale appartient à *Candida albicans*, qui diverge significativement des zones d'inhibition de toutes les autres espèces évaluées (**Figure 23**).

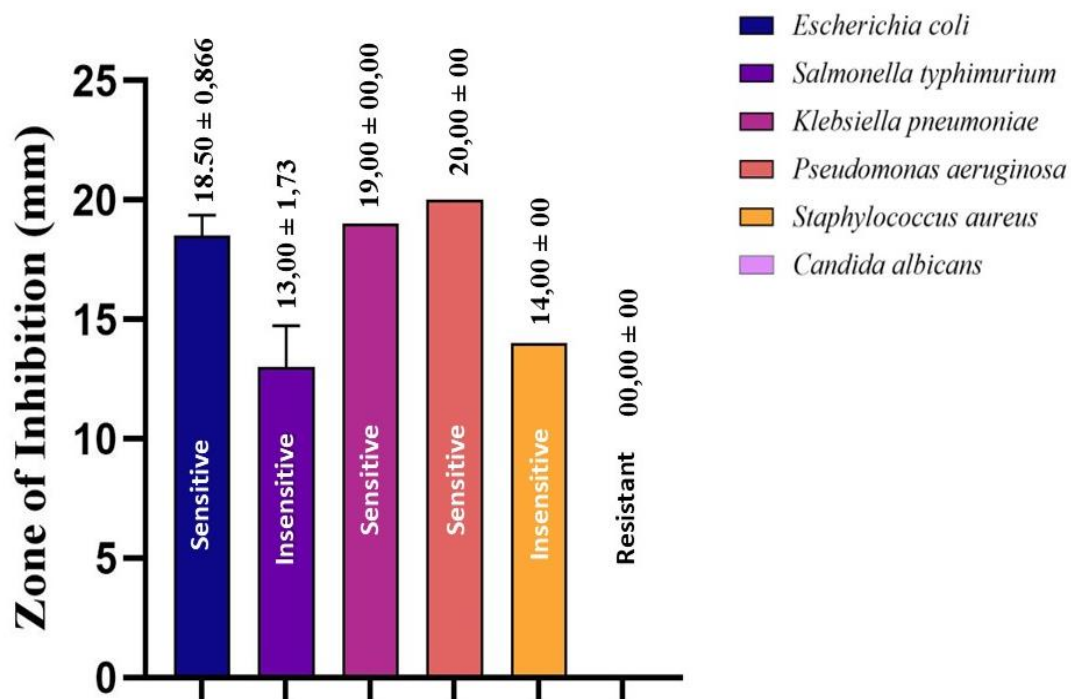


Figure 23 : Zone d'inhibition des souches bactériennes et fongique par l'extrait de *R. montana*.

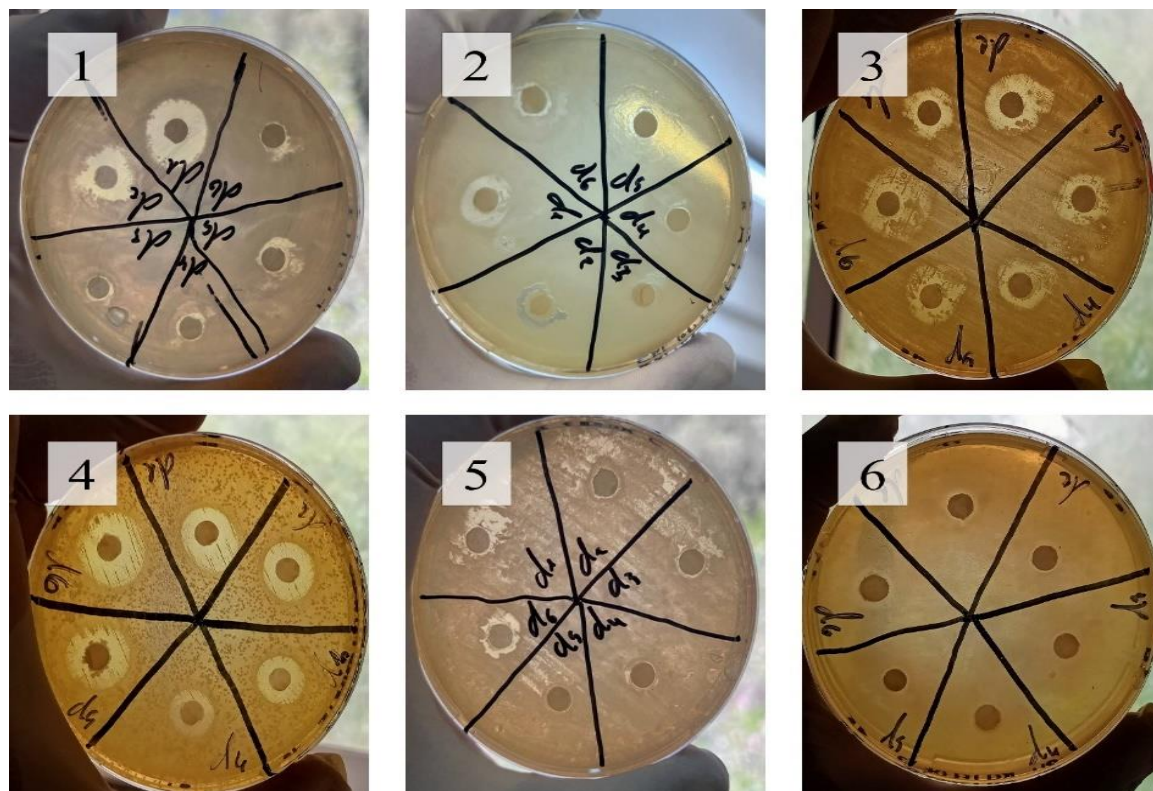


Figure 24 : Réponse des souches microbiennes à l'extrait de *R. montana* : 1. *Escherichia coli*, 2. *Salmonella typhimurium*, 3. *Klebsiella pneumoniae*, 4. *Pseudomonas aeruginosa*, 5. *Staphylococcus aureus*, 6. *Candida albicans*. d1 : 20 mg/mL ; d2 : 0,2 mg/mL ; d3:0,02 mg/mL ; d4 : 0,002 mg/mL ; d5 : 0,0002 mg/mL ; d6 : 0,00002 mg/mL

Les résultats obtenus dans la présente étude corroborent ceux rapportés par **Bouhenna et al. (2023)**, qui ont évalué l'efficacité antimicrobienne de divers extraits de *Ruta montana* contre des souches bactériennes et fongiques de type ATCC. Dans leurs travaux, l'extrait chloroformique a montré une activité antimicrobienne notable, avec des zones d'inhibition (ZI) comprises entre 18,33 et 18,66 mm vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*, tandis que *Staphylococcus aureus* se révélait moins sensible aux extraits chloroformique et brut (11–14,33 mm). Par ailleurs, l'huile essentielle de *R. montana* testée contre *Salmonella sp.* présentait également une faible zone d'inhibition (11 mm) (**Nahar et al., 2021**).

Nos observations sont en accord avec celles de **Djarri et al. (2013)**, qui ont mis en évidence une forte activité inhibitrice des huiles essentielles de *R. montana* (collectée dans l'est de l'Algérie) contre *P. aeruginosa* (20 mm), *Klebsiella pneumoniae* (19 mm) et *E. coli* (19 mm). En revanche, les huiles essentielles de *R. montana* provenant de Tunisie ont montré un effet plus faible contre ces mêmes souches, avec des ZI oscillant entre 6 et 7 mm (**Bejaoui et al., 2019**). Par ailleurs, l'évaluation de l'activité antibactérienne effectuée par **Allouni (2018)** a démontré que les extraits éthanoliques (feuilles et graines) de *R. montana* exerçaient un fort pouvoir inhibiteur à l'encontre de souches telles que *E. coli* et *S. aureus*.

De manière générale, ces résultats indiquent que les plantes synthétisent une grande diversité de molécules bioactives dans le cadre de mécanismes de défense face aux agressions pathogènes (**Bouhenna et al., 2023**). Historiquement, ces composés ont été reconnus comme de potentielles sources de nouveaux agents dotés de propriétés biologiques, notamment antimicrobiennes (**Christova-Bagdassarian et al., 2013**). Des études menées par **Hamidi et al. (2014)** et **Ajoy et al. (2013)** confirment cette hypothèse en identifiant deux coumarines l'ombelliférone (7-hydroxycoumarine) et la scopolétine dont les propriétés antibactériennes sont avérées, suggérant ainsi un lien étroit entre l'efficacité antibactérienne des extraits de *Ruta montana* et leur composition chimique (**Bouhenna et al., 2023**).

#### 2.3. Evaluation de l'activité enzymatique de la Plante *Ruta montana in vitro* :

L'activité de l'extrait a été déterminée comme étant beaucoup plus faible pour l'uréase que pour la thiourée conventionnelle. Le pourcentage maximum d'inhibition était de 18,8 ±0,74%, et la valeur IC<sub>50</sub> dépassait 200 µg/mL. En revanche, la thiourée a présenté le pourcentage d'inhibition le plus élevé de 98,90±0,5 % et la valeur IC<sub>50</sub> la plus faible de 11,57±0,68 µg/mL (**Tableau 6**).

L'activité inhibitrice de l'anticholinestérase présentée dans le tableau indique que l'extrait de *Ruta montana* a montré une faible activité ( $198,5 \pm 6,42 \mu\text{g/mL}$ ) par rapport à la galantamine standard ( $6,27 \pm 1,15 \mu\text{g/mL}$ ). L'action a été dépendante de la concentration, l'inhibition augmentant avec les niveaux de concentration. Le pourcentage d'inhibition maximal a été observé à la concentration la plus élevée (200  $\mu\text{g}$ ), mesurant  $42,68 \pm 0,2 \%$  (Tableau 6).

**Tableau 6** : Évaluation de l'activité anti-uréase de l'extrait de *Ruta montana* et de la Thiourea standard, ainsi que de l'activité anticholinestérase de *Ruta montana* et de la Galantamine standard à différentes concentrations.

% Inhibition								
	3.125 $\mu\text{g}$	6.25 $\mu\text{g}$	12.5 $\mu\text{g}$	25 $\mu\text{g}$	50 $\mu\text{g}$	100 $\mu\text{g}$	200 $\mu\text{g}$	IC <sub>50</sub> $\mu\text{g/mL}$
Anti-uréase activité	4.70 $\pm$ 0.7	6.59 $\pm$ 0.07	6.59 $\pm$ 0.01	7.82 $\pm$ 0.02	8.82 $\pm$ 0.44	13.24 $\pm$ 1.5	20.4 $\pm$ 0.74	>200
Thiourea Standard	4,49 $\pm$ 0.78	19,85 $\pm$ 2.74	55.64 $\pm$ 4.24	94.17 $\pm$ 0.15	98.42 $\pm$ 0.19	98.49 $\pm$ 0.41	98.90 $\pm$ 0.05	<b>11,57<math>\pm</math>0,68</b>
Anti- cholinestérase activité	10,93 $\pm$ 0.09	11.33 $\pm$ 0.07	11.85 $\pm$ 0.1	12.79 $\pm$ 0.07	20.5 $\pm$ 1.3	30.9 $\pm$ 6. 2	42.68 $\pm$ 0.2	<b>198,5<math>\pm</math>6,42</b>
Galantamine Standard	35,93 $\pm$ 2,28	43.77 $\pm$ 0.0	68.50 $\pm$ 0,31	80.69 $\pm$ 0,41	85.78 $\pm$ 1,63	91.80 $\pm$ 0,20	94.77 $\pm$ 0,34	<b>6,27<math>\pm</math>1,15</b>

La maladie d'Alzheimer (MA) se caractérise par un déficit en acétylcholine au niveau de la fente synaptique, ce qui perturbe le système cholinergique, essentiel au maintien de la mémoire, de l'apprentissage et des fonctions cognitives. Cette carence peut résulter d'une production insuffisante d'acétylcholine dans les terminaisons présynaptiques, d'une dégradation accrue par les cholinestérases au sein des synapses ou encore d'une sensibilité réduite des récepteurs neuronaux à ce neurotransmetteur. Ainsi, l'un des traitements couramment utilisés pour atténuer les effets de la maladie d'Alzheimer consiste à administrer des inhibiteurs de la cholinestérase (ICHÉ), tels que le donépézil ou la galantamine, afin de pallier la diminution d'acétylcholine (Ngai et al., 2022).

Dans le cadre de nos investigations, nos résultats concordent avec ceux de **Slougui et al. (2023)**, qui ont observé, pour *Ruta montana* (parties aériennes collectées en Algérie), une inhibition plus faible de l'acétylcholinestérase pour les extraits à l'acétate d'éthyle et au chloroforme, en comparaison à un standard de référence, tandis que les autres extraits ne montraient pas d'activité notable. À l'inverse, **Khadhri et al. (2017)** ont rapporté que les extraits éthanoliques de tige de *Ruta montana* (provenant de Tunisie) possédaient la meilleure activité inhibitrice vis-à-vis de l'acétylcholinestérase, avec une valeur d'IC<sub>50</sub> de  $52 \pm 0,4$  µg/mL. De plus, les extraits en décoction et les extraits éthanoliques de feuilles ont révélé une activité significative, avec des IC<sub>50</sub> respectives de  $57 \pm 1,6$  et  $76 \pm 1,6$  µg/mL (**Khadhri et al., 2017**).

Par ailleurs, *Ruta chalepensis* a montré une efficacité supérieure contre l'acétylcholinestérase, comme l'indiquent les études de **Gali et Bedjou (2019)** et **Khadhri et al. (2017)**, présentant des valeurs d'IC<sub>50</sub> plus faibles. Les extraits de *Ruta montana* exigent, en comparaison, des concentrations plus élevées pour atteindre des effets similaires, soulignant l'importance de la variabilité interspécifique au sein du genre *Ruta* pour l'exploration de nouvelles pistes thérapeutiques contre la maladie d'Alzheimer.

### 3. Modélisation *in silico* des propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques :

#### 3.1. Caractéristiques physicochimiques et pharmacocinétiques de *Ruta montana* :

Les propriétés physicochimiques et le profil de lipophilicité des principaux composés identifiés dans *Ruta montana* grâce à l'analyse LC-MS (**Tableau 4**), fournissent des indications essentielles sur leur potentiel de biodisponibilité et leur compatibilité avec les critères de drug-likeness. Les composés présentent des poids moléculaires allant de 122,12 à 618,58 g/mol. L'acide protocatéchique, l'hydroxybenzaldéhyde, la vanilline, l'acide *p*-coumarique et l'acide salicylique possèdent une faible masse moléculaire et une lipophilicité favorable (Log Po/w entre 0,65 et 1,26), tandis que l'hespéridine, l'isoquercitrine et le kaempférol-3-glucoside affichent des masses élevées ( $> 440$  g/mol) et une forte polarité (TPSA  $> 170$  Å<sup>2</sup>) (**Tableau 7**).

L'hespéridine présente la plus forte fraction Csp<sup>3</sup> (0,70), sept liaisons rotatives et 16 accepteurs de liaisons hydrogène. L'hydroxybenzaldéhyde et la vanilline possèdent une faible TPSA ( $< 50$  Å<sup>2</sup>), favorisant leur biodisponibilité orale, contrairement à l'isoquercitrine et au kaempférol-3-glucoside (TPSA  $> 170$  Å<sup>2</sup>).

Tableau 7 : Propriétés physicochimiques et lipophilie des principaux composés identifiés dans *Ruta montana*.

Molécule	Protocatechuic acid	Hydroxybenzaldehyde	Vanillin	p-coumaric acid	Salicylic acid	Hesperidin	Isoquercitrin	Kaempferol-3-glucoside	Luteolin
<b>Propriétés physicochimiques et lipophilie</b>									
<b>Masse moléculaire (g/mol)</b>	154.12	122.12	152.15	164.16	138.12	618.58	444.39	444.39	282.25
<b>Nombre d'atomes lourds</b>	11	9	11	12	10	43	32	32	21
<b>Atomes lourds aromatiques</b>	6	6	6	6	6	0	12	12	12
<b>Fraction Csp<sup>3</sup></b>	0.00	0.00	0.12	0.00	0.00	0.70	0.27	0.27	0.00
<b>Liaisons rotatives</b>	1	1	2	2	1	7	4	4	1
<b>Accepteurs de liaisons H</b>	4	2	3	3	3	16	10	10	5
<b>Donneurs de liaisons H</b>	3	1	1	2	2	9	6	6	3
<b>Réfractivité molaire</b>	37.45	33.85	40.34	45.13	35.42	138.31	107.71	107.71	75.59
<b>TPSA (Å<sup>2</sup>)</b>	77.76	37.30	46.53	57.53	57.53	246.68	173.98	173.98	94.83
<b>Consensus Log Po/w</b>	0.65	1.17	1.12	1.26	1.03	-2.64	0.04	0.04	1.71

**Tableau 8** : Médicamentabilité, biodisponibilité et pharmacocinétique des principaux composés identifiés dans *Ruta montana*.

<b>Médicamentabilité, biodisponibilité et pharmacocinétique</b>									
<b>Règle de Lipinski</b>	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Non	Non	Non	Oui
<b>Score de biodisponibilité</b>	0.56	0.55	0.55	0.85	0.85	0.85	0.55	0.55	0.55
<b>Absorption gastro-intestinale</b>	Élevée	Élevée	Élevée	Élevée	Élevée	Faible	Faible	Faible	Élevée
<b>Perméabilité BHE (BBB)</b>	Non	Oui	Oui	Oui	Oui	Non	Non	Non	Non
<b>Substrat P-gp</b>	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Oui	Oui	Non
<b>Inhibiteur CYP1A2</b>	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non
<b>Inhibiteur CYP2C19</b>	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non
<b>Inhibiteur CYP2C9</b>	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non
<b>Inhibiteur CYP2D6</b>	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non
<b>Inhibiteur CYP3A4</b>	Oui	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Oui
<b>Log Kp (cm/s)</b>	-6.42	-6.09	-6.54	-6.26	-6.08	-12.62	-8.85	-8.85	-6.59
<b>Accessibilité synthétique</b>	1.07	1.00	1.05	1.61	1.00	7.56	5.08	5.08	2.96

Les propriétés physicochimiques, telles que le poids moléculaire, la lipophilie (Log Po/w), la surface polaire (TPSA) et la flexibilité (fraction Csp<sup>3</sup>, liaisons rotatives), influencent la solubilité, la perméabilité membranaire et la biodisponibilité des molécules. L'application des règles de *drug-likeness* (Lipinski, biodisponibilité), ainsi que l'évaluation de l'absorption gastro-intestinale, de la perméabilité à la barrière hémato-encéphalique (BBB/BHE), des interactions avec la P-gp et les enzymes CYP, permettent d'anticiper leur potentiel thérapeutique et leur faisabilité synthétique (**Tableau 8**).

Selon la règle de Lipinski, tous les composés respectent les critères de *drug-likeness*, sauf l'hespéridine, l'isoquercitrine et le kaempférol-3-glucoside. Les scores de biodisponibilité varient de 0,55 à 0,85, avec l'acide *p*-coumarique et l'acide salicylique affichant les valeurs les plus élevées. L'absorption gastro-intestinale est élevée pour l'acide protocatéchique, l'hydroxybenzaldéhyde, la vanilline, l'acide *p*-coumarique, l'acide salicylique et la lutéoline, mais faible pour l'hespéridine, l'isoquercitrine et le kaempférol-3-glucoside.

L'hydroxybenzaldéhyde, la vanilline, l'acide *p*-coumarique et l'acide salicylique peuvent traverser la barrière hémato-encéphalique (BBB/BHE), tandis que les autres composés sont limités à une activité périphérique. L'isoquercitrine et le kaempférol-3-glucoside sont des substrats de la P-gp, ce qui réduit leur biodisponibilité. L'acide protocatéchique et la lutéoline inhibent le CYP3A4, avec un risque potentiel d'interactions médicamenteuses. Tous les composés présentent une faible perméabilité cutanée (Log K<sub>p</sub> faible), limitant leur administration transdermique. Les scores d'accessibilité synthétique varient de 1,00 à 7,56, avec des valeurs élevées pour l'hespéridine, l'isoquercitrine et le kaempférol-3-glucoside, suggérant une complexité de synthèse accrue.

### 3.2. Test de Bioavailability Radar des composés de *Ruta montana* :

Le Bioavailability Radar ou bien Bio disponibilité Radar présente des diagrammes structuraux générés via JChem et des notations SMILES standard de PubChem, affichés individuellement. Il évalue six propriétés physicochimiques clés : taille, polarité, solubilité, flexibilité et insaturation. La zone rose représente un intervalle optimal, où les molécules entièrement incluses sont considérées comme drug-like.

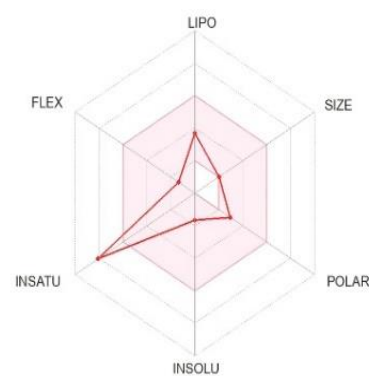
Les hexagones de biodisponibilité des composés identifiés dans *Ruta montana* (**Figure 25**) révèlent des profils favorables pour l'acide protocatéchique, l'hydroxybenzaldéhyde, la vanilline, l'acide *p*-coumarique et l'acide salicylique, caractérisés par une lipophilie modérée, une taille moléculaire optimale et une polarité équilibrée. En revanche, l'hespéridine, l'isoquercitrine et le kaempférol-3-glucoside présentent une forte polarité et une grande taille moléculaire, suggérant une faible absorption gastro-intestinale, tandis que la lutéoline souffre de problèmes de solubilité pouvant limiter son absorption systémique.



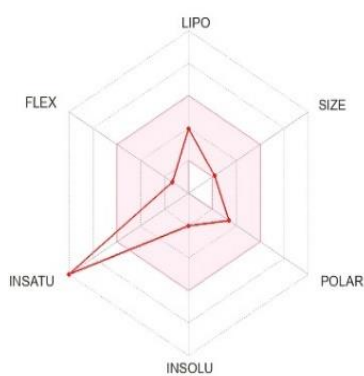
**Protocatechuic acid**



**Hydroxybenzaldehyde**



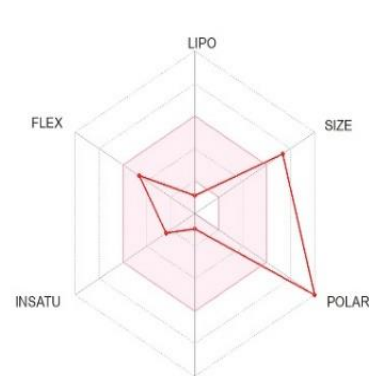
**Vanillin**



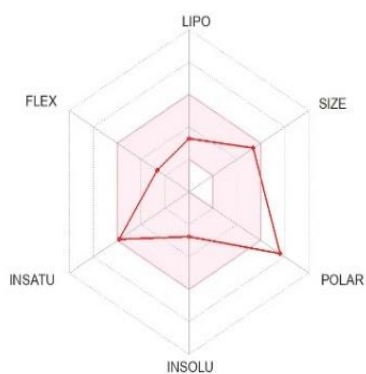
**p-Coumaric acid**



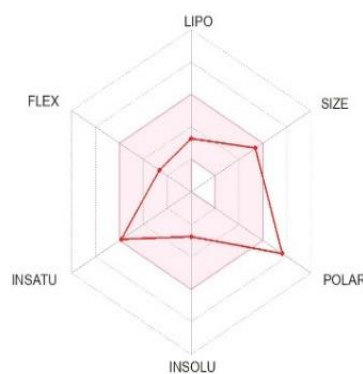
**Salicylic acid**



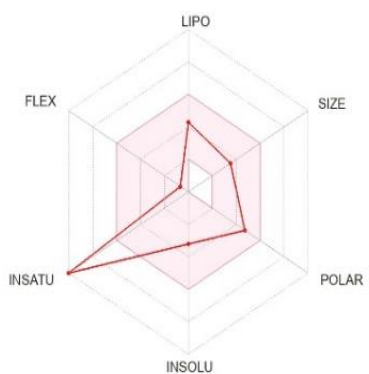
**Hesperidin**



**Isoquercitrin**



**Kaempferol-3-glucoside**

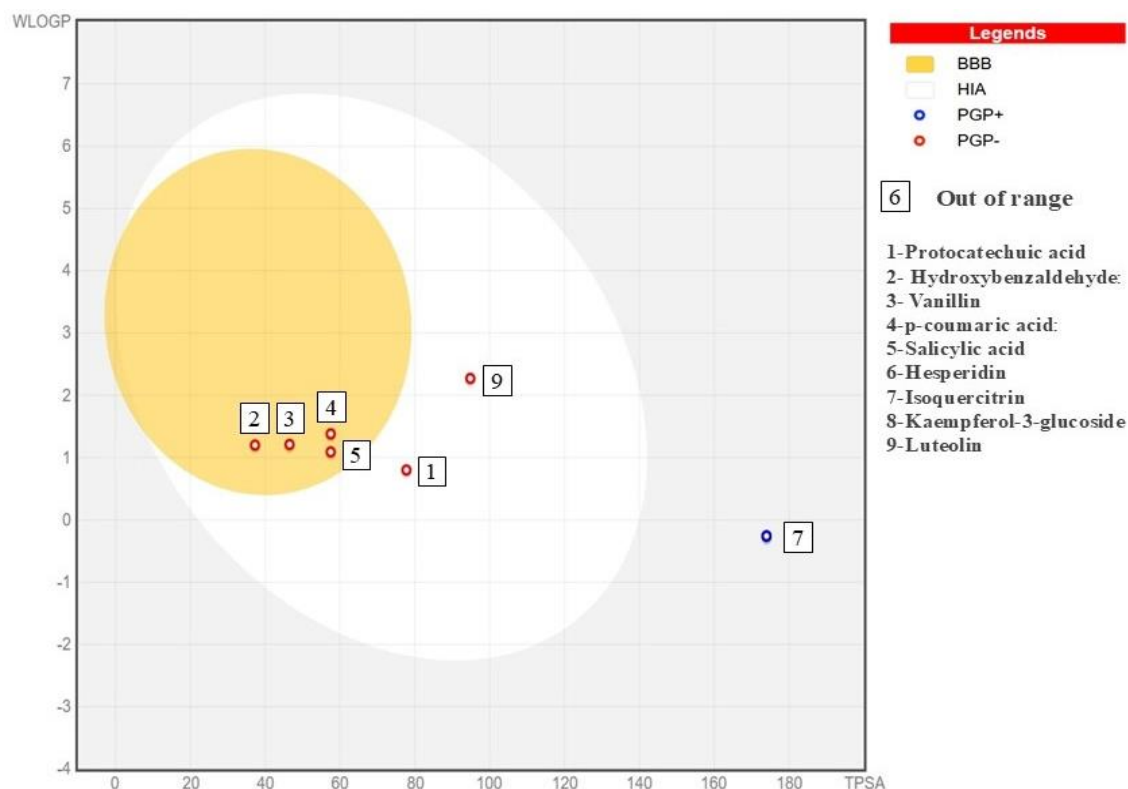


**Luteolin**

**Figure 25 :** Hexagones de biodisponibilité des principales molécules identifiées dans *Ruta montana*, déterminés par analyse LC MS.

### 3.3. Test de BOILED-Egg de *Ruta montana* :

Le modèle BOILED-Egg de SwissADME évalue l'absorption gastro-intestinale (HIA) et la perméabilité à la barrière hémato-encéphalique (BHE) en classant les molécules dans la zone blanche (forte absorption gastro-intestinale) ou la zone jaune (pénétration potentielle dans le cerveau). Cette représentation graphique facilite l'analyse des propriétés pharmacocinétiques pour l'optimisation des médicaments (**Figure 26**).



**Figure 26** : Modèle de BOILED-Egg des molécules identifiées de *Ruta montana* telles qu'évaluées par l'analyse LC MS.

La capacité d'un composé à traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE) est un critère essentiel dans le développement de médicaments ciblant le système nerveux central (SNC). La BHE est une barrière sélective essentielle pour maintenir l'homéostasie cérébrale, composée de cellules endothéliales spécialisées qui régulent le transport paracellulaire et transcellulaire (Uprety et al., 2021 ; Versele et al., 2022). La perméabilité de la BHE dépend de plusieurs facteurs physico-chimiques, notamment la lipophilie, la taille moléculaire et la capacité à former des liaisons hydrogène, ainsi que des paramètres mesurables comme le logBB et le logPS (Thai et al., 2020 ; Meng et al., 2021). Les composés lipophiles traversent plus facilement la BHE en raison de la nature lipidique de la membrane endothéliale, tandis que les

petites molécules et celles ayant une faible capacité à former des liaisons hydrogène sont également favorisées (Thai et al., 2020).

les résultats L'analyse BOILED-Egg des composés de *Ruta montana* (Figure 26), montrent que Protocatechuic acid et Luteolin, classés comme PGP-, se trouvent dans la zone blanche correspondant à l'absorption intestinale humaine (HIA). Cela suggère que ces composés sont absorbés au niveau intestinal, ce qui laisse supposer qu'ils peuvent être administrés par voie orale (Daina et Zoete, 2016). Mais qu'ils ne traversent pas efficacement la BHE, probablement en raison de leur structure chimique qui n'optimise pas leur capacité à franchir la barrière lipidique cérébrale (Meng et al., 2021). D'autre part, des composés tels que Vanillin, p-coumaric acid, et Salicylic acid se situent dans la zone jaune, une zone de perméabilité intermédiaire (zone de logBB et logPS intermédiaires), ce qui indique qu'ils possèdent un potentiel modéré pour franchir la BHE (Thai et al., 2020 ; Meng et al., 2021). Ces composés, bien que classés comme PGP-, ne sont pas soumis à l'influence des transporteurs P-glycoprotéines (PGP), ce qui favorise leur absorption et leur distribution systémique.

À l'inverse, Hesperidin et Kaempferol-3-glucoside sont classés en dehors de la zone BBB et HIA, indiquant qu'ils n'ont ni une capacité significative à traverser la BHE ni à être absorbés efficacement par l'intestin. Cette position suggère que leur taille moléculaire ou leur polarité pourrait restreindre leur perméabilité (Meng et al., 2021), ce qui lui donne une faible biodisponibilité (Veber et al., 2002 ; Wadhwa et al., 2021). Enfin, Isoquercitrin, classé PGP+, est situé en dehors des zones jaune et blanche, ce qui pourrait indiquer une interaction avec les transporteurs PGP. Cette interaction pourrait limiter l'absorption et la distribution dans le cerveau, une caractéristique fréquemment observée pour les composés soumis à l'efflux actif via P-glycoprotéines (Deli et al., 2005 ; Xie et al., 2019).

Le modèle BOILED-Egg prédit que l'acide **Protocatechuic acid** et **Luteolin** se trouvent dans la zone d'absorption gastro-intestinale (région blanche), ce qui laisse supposer qu'ils peuvent être administrés par voie orale (Daina et Zoete, 2016). Cependant, leur l'exclusion de la zone perméable de la barrière hémato-encéphalique (BHE) implique une capacité neuroactive limitée, ce qui est cohérent avec leurs profils physico-chimiques.

Les résultats de cette étude fournissent des informations clés pour évaluer la biodisponibilité des composés et leur potentiel thérapeutique dans le cadre du traitement des pathologies. Ces données s'inscrivent dans un cadre plus large où des approches expérimentales et computationnelles, telles que les modèles *in silico*, permettent de prédire la perméabilité des

composés à la BHE et gastro-intestinale ainsi de guider le développement de médicaments efficaces (Mazumdar et al., 2023).

### 3.4. Prédiction des propriétés Toxicocinétiques des composés de *Ruta montana* :

L'évaluation toxicologique des composés de *Ruta montana* montre une absence de mutagénicité selon l'aide de l'outil web pkCSM, évaluant la mutagénicité (toxicité AMES). La dose maximale tolérée varie, avec des valeurs plus élevées pour l'hydroxybenzaldéhyde (0,925), l'acide *p*-coumarique (1,111) et la vanilline (0,804). Les valeurs DL<sub>50</sub> les plus élevées sont observées pour l'héspéridine (2,464) et l'isoquercitrine (2,551), suggérant une faible toxicité aiguë. En toxicité chronique (LOAEL), le kaempférol-3-glucoside (4,889) et l'isoquercitrine (5,244) présentent les valeurs les plus élevées, nécessitant une surveillance accrue (Tableau 9).

**Tableau 9** : Toxicité AMES, dose maximale tolérée (homme), toxicité aiguë par voie orale pour le rat, toxicité chronique par voie orale pour le rat (LOAEL), hépatotoxicité et sensibilisation de la peau à l'aide de l'outil web pkCSM.

N	Compound	Toxicité AMES	Dose maximale tolérée (humain (log mg/kg, pc/jour)	Toxicité aiguë orale rat (DL <sub>50</sub> ) (mol/kg)	Toxicité chronique orale (LOAEL) (log mg/kg, pc/jour)	Hépatotoxicité	Sensibilisation cutanée
1	Protocatechuic acid	Non	-0.017	2.178	2.012	Non	Non
2	Hydroxybenzaldehyde	Non	0.925	1.833	2.624	Non	Oui
3	Vanillin	Non	0.804	1.937	2.265	Non	Non
4	<i>p</i> -coumaric acid	Non	1.111	2.155	2.534	Non	Non
5	Salicylic acid	Non	0.61	2.282	2.483	Non	Non
6	Hesperidin	Non	0.392	2.464	6.013	Non	Non
7	Isoquercitrin	Non	0.514	2.551	5.244	Non	Non
8	Kaempferol-3-glucoside	Non	0.547	2.555	4.889	Non	Non
9	Luteolin	Non	0.499	2.455	2.409	Non	Non

Les évaluations toxicologiques ne révèlent en outre aucun risque mutagène (test AMES : négatif) ni aucune hépatotoxicité pour la plupart des composés, ce qui correspond aux profils de sécurité des acides phénoliques dans les modèles précliniques. Cela concorde avec **Dantas**

**et al. (2020)** qui a révélé que de nombreuses espèces de plantes médicinales soient non mutagènes. Cette inhibition concorde aussi avec L'acide protocatéchique, de l'extrait de danshen, a été identifié comme un inhibiteur faible de CYP3A4. Bien que son effet inhibiteur soit modeste, il est important de considérer son potentiel d'interaction avec d'autres médicaments métabolisés par CYP3A4, surtout dans le cadre de l'utilisation de préparations à base de plantes comme le danshen (*Salvia miltiorrhiza*) (**Qiu et al., 2008 ; Kaur et al., 2016**). Les analyses de prédiction de cibles associent ces composés à des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) et canaux ioniques, avec des implications thérapeutiques. Par exemple, l'acide p-coumarique module l'excitabilité neuronale via les canaux voltage-dépendants (**Kim, 2017**), tandis que la lutéoline inhibe les voies NF- $\kappa$ B et MAPK, réduisant les cytokines pro-inflammatoires (**Che et al., 2020 ; Conti et al., 2021**). Ces mécanismes sont renforcés par l'activité antioxydante des phénols, neutralisant le stress oxydatif induit par le tébuconazole et protégeant hépatocytes et neurones (**Zeb, 2020 ; Abu-Serie & Habashy, 2020**). La modulation enzymatique (induction des GST et inhibition compétitive des CYP450) optimise la détoxification, limitant les métabolites hépatotoxiques (**Elsayed et al., 2021 ; Quintieri et al., 2008**). Les hétérosides, substrats de la P-gp, favorisent l'efflux de la toxine, réduisant son accumulation systémique, tandis que les complexes hydrophiles diminuent sa lipophilie (Log P), minimisant son stockage lipidique. La stabilisation de la BHE par des composés à faible TPSA (hydroxybenzaldéhyde) atténue la neurotoxicité via l'inhibition de l'inflammation (**Uprety et al., 2021**). Enfin, l'inhibition sélective des CYP1A2 et CYP2D6, couplée à l'épargne des CYP3A4 et CYP2C9, rééquilibre le métabolisme hépatique, évitant la surcharge enzymatique.

#### **4. Evaluation des activités biologiques *In vivo* du *Ruta montana* :**

##### **4.1. Evaluation du pouvoir détoxifiant :**

Les rats traités par le tébuconazole (TBC), à la *Ruta montana* (RM) et aux thérapies combinées ont présenté des manifestations telles que la faiblesse, un mouvement diminué, une perte d'équilibre et des épisodes de diarrhée. Pendant la période expérimentale de 50 jours, aucun des rats au sein des cohortes expérimentales n'a présenté d'indications de morbidité, de mortalité ou de symptômes cliniques évidents. Cependant, de manière perceptible, les rats traités au TBC ont montré une diminution notable de la prise alimentaire.

#### 4.1.1. Effet du traitement sur les poids corporels :

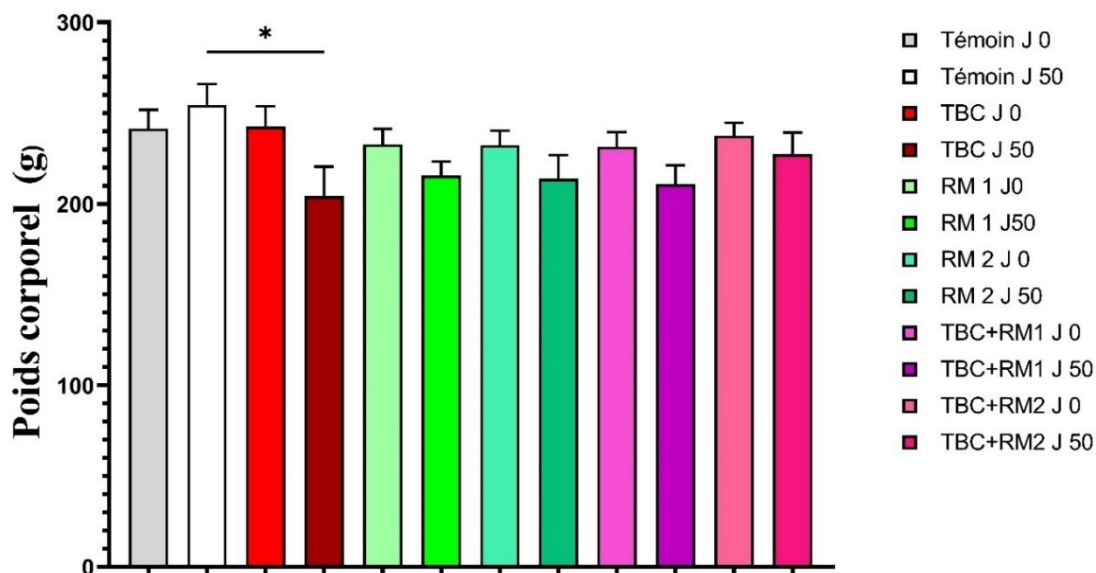
Les données présentées dans le **tableau 10** montrent les effets du tébuconazole (TBC), de la *Ruta montana* (RM1 et RM2) ainsi que de leurs combinaisons sur le poids corporels chez les rats après 50 jours d'essai expérimental (**Figure 27**).

**Tableau 10** : Moyenne des poids corporels ainsi que des poids relatifs du foie, entre les rats témoins et ceux traités avec *Ruta montana* (RM), tébuconazole (TBC) et leurs combinaisons après 50 jours d'expérimentation.

	Control	TBC	RM1	RM2	TBC+RM1	TBC+RM2
	<b>MOYENNE ± L'erreur standard de la moyenne (ESM) ou SEM</b>					
<b>Poids corporel initial (g)</b>	241,4±10,39	242,6±11,19	232,7±8,585	232,3±7,921	231,4±8,08	237,6±7,077
<b>Poids corporel final (g)</b>	254,4±11,42	204,3±16,24*	215,6±7,671	213,9±12,98	210,9±10,36	227,4±11,86

Le poids corporel initial ne montre pas de différences significatives entre les groupes expérimentaux ( $p > 0,05$ ). Cependant, après 50 jours, une diminution significative du poids corporel final est observée dans le groupe TBC ( $204,3 \pm 16,24$  g,  $p < 0,05$ ) par rapport au groupe contrôle ( $254,4 \pm 11,42$  g). Les groupes traités avec *Ruta montana* (RM1 et RM2) présentent des poids corporels finaux intermédiaires ( $215,6 \pm 7,671$  g et  $213,9 \pm 12,98$  g, respectivement), suggérant un effet protecteur partiel contre la toxicité du TBC. L'association TBC + RM 1 montre une tendance similaire ( $210,9 \pm 10,36$  g), tandis que le groupe TBC + RM2 affiche un poids corporel final plus élevé ( $227,4 \pm 11,86$  g), ce qui pourrait indiquer une atténuation plus marquée des effets délétères du TBC en présence de doses plus élevées de *Ruta montana*.

L'exposition au TBC a induit des modifications notables de la masse corporelle et des tissus organiques. Ainsi, une diminution de l'accumulation de tissus adipeux a été observée, ce qui pourrait refléter une baisse de la prise alimentaire, une faiblesse musculaire ou encore une toxicité directe du fongicide (**Berrouague et al., 2019 ; Lafi et al., 2017 ; Ben Othmène et al., 2020**). Parallèlement, une consommation accrue d'eau suggère l'activation de mécanismes compensatoires visant à atténuer cette toxicité (**Chaâbane et al., 2017**).



**Figure 27 :** Moyenne des poids corporels entre les rats témoins et ceux traités avec *Ruta montana* (RM), tébuconazole (TBC) et leurs combinaisons avant et après 50 jour (J) d'expérimentation.

Dans le cadre d'études sub-chroniques, une fluctuation marginale de la masse corporelle a été notée chez les rats traités avec l'extrait de *Ruta montana* (RM 1 et RM 2) et chez ceux soumis à une administration combinée TBC+RM, confirmant ainsi que le suivi de ces variations constitue un indicateur prédictif fiable des réactions indésirables (Dahamna et al., 2011 ; Hilaly et al., 2004 ; Merghem et al., 2013).

#### 4.1.2. Effet du traitement sur les paramètres hématologiques :

Le **tableau. 11** présente les changements dans les paramètres hématologiques chez les rats traités au tébuconazole (TBC), à la *Ruta montana* (RM) et à leurs combinaisons. Le groupe « TBC+RM 2 » présente une augmentation marquée des globules blancs ( $20 \pm 3,09 \times 10^3$  cellules/ $\mu\text{L}$ ,  $p < 0,001$ ) par rapport au contrôle ( $6,38 \pm 0,75 \times 10^3$  cellules/ $\mu\text{L}$ ). Le groupe « TBC » a présenté une réduction significative des globules rouges ( $6,27 \pm 0,07 \times 10^6$  cellules/ $\mu\text{L}$ ,  $p < 0,01$ ) par rapport au témoin ( $7,16 \pm 0,04 \times 10^6$  cellules/ $\mu\text{L}$ ), tandis que le groupe « TBC+RM 1 » a augmenté le nombre de plaquettes ( $1152 \pm 26 \times 10^3$  plaquettes/ $\mu\text{L}$ ,  $p < 0,001$ ). Le taux d'hémoglobine a diminué chez les « TBC+RM 2 » ( $11,6 \pm 0,17$  g/dL,  $p < 0,001$ ) par rapport aux témoins ( $13,4 \pm 0,303$  g/dL), et le taux d'hématocrite était plus faible chez les « RM 2 » ( $37,8 \pm 1,19$  %,  $p < 0,01$ ) par rapport aux témoins ( $41,4 \pm 0,94$  %). En outre, le « TBC » a significativement augmenté le volume corpusculaire moyen (MCV :  $57,2 \pm 0,81$  fL,  $p < 0,001$ ),

tandis que le « TBC+RM 2 » a réduit l'hémoglobine corpusculaire moyenne (MCH :  $16,1 \pm 0,22$  pg,  $p < 0,01$ ) par rapport au groupe de contrôle.

**Tableau 11** : Moyenne marqueurs hématologiques plasmatiques du contrôle et des rats traités avec *Ruta montana* (RM), Tébuconazole (TBC) et traitement combiné de Tébuconazole et *Ruta montana* après 50 jours d'essai expérimental.

Mean $\pm$ SEM	Control	TBC	RM1	RM2	TBC+RM1	TBC+RM2
Dose (mg/kg)						
WBC (L)	6,38 $\pm$ 0,75	9,28 $\pm$ 0,756	7,57 $\pm$ 0,973	6,92 $\pm$ 1,2	8,14 $\pm$ 0,806	20 $\pm$ 3,09***
RBC $10^{12}$ /L	7,16 $\pm$ 0,0471	6,27 $\pm$ 0,0716**	7,34 $\pm$ 0,0893	6,9 $\pm$ 0,217	7,83 $\pm$ 0,13	7,27 $\pm$ 0,264
Hémoglobine g/dl	13,4 $\pm$ 0,303	12,1 $\pm$ 0,281*	13,1 $\pm$ 0,176	11,9 $\pm$ 0,399**	13,3 $\pm$ 0,223	11,6 $\pm$ 0,179***
Plaquettes $\times 10^9$ /L	713 $\pm$ 51,4	969 $\pm$ 39,7*	690 $\pm$ 117	861 $\pm$ 22,4	1152 $\pm$ 26***	932 $\pm$ 20,2
Hématocrite (%)	41,4 $\pm$ 0,948	39,9 $\pm$ 0,756	41,5 $\pm$ 0,65	37,8 $\pm$ 1,19*	42,2 $\pm$ 0,796	37,6 $\pm$ 0,493*
MCV $\mu\text{m}^3$ (fL)	55,5 $\pm$ 0,053	57,2 $\pm$ 0,818	55 $\pm$ 0,396	56,4 $\pm$ 1,01	54,5 $\pm$ 0,322	50,8 $\pm$ 1,51**
MCH (Pg)	17,8 $\pm$ 0,089	17,7 $\pm$ 0,191	17,3 $\pm$ 0,113	17,7 $\pm$ 0,289	17,1 $\pm$ 0,152	16,1 $\pm$ 0,224***
MCHC (Dl)	32 $\pm$ 0,146	31,2 $\pm$ 0,283	31,5 $\pm$ 0,132	31,5 $\pm$ 0,215	31,4 $\pm$ 0,299	31,5 $\pm$ 0,249
MPV (fL)	7,03 $\pm$ 0,108	7,41 $\pm$ 0,239	6,6 $\pm$ 0,0577	7,01 $\pm$ 0,179	6,45 $\pm$ 0,0838	7,04 $\pm$ 0,193
VPD	15,1 $\pm$ 0,061	15,2 $\pm$ 0,0522	15 $\pm$ 0,0507	15,1 $\pm$ 0,0705	15 $\pm$ 0,0595	15 $\pm$ 0,0595
PCT mL/l	6,24 $\pm$ 0,31	7,03 $\pm$ 0,285	6,01 $\pm$ 0,273	6,58 $\pm$ 0,517	7,43 $\pm$ 0,151	6,35 $\pm$ 0,244

Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$ SEM ; n=7 pour chaque groupe de traitement. Les différences sont indiquées par des lettres distinctes et des niveaux de signification (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ) par rapport au groupe témoin. WBC : Globules blancs (L), GR : Globules rouges (L), MCV : Volume corpusculaire moyen (fL), MCH : Hémoglobine corpusculaire moyenne (Pg), MCHC : Concentration corpusculaire moyenne d'hémoglobine (Dl), MPV : Volume plaquettaire moyen (fL), VPD : Valeur de la distribution plaquettaire, PCT : Procalcitonine (mL/l).

Les altérations hématologiques constituent un autre volet majeur de la toxicité induite par le TBC. La réduction significative du nombre de globules rouges et du taux d'hémoglobine observée dans notre étude, reflétant une hémolyse et une possible suppression de la production érythrocytaire, rejoint les conclusions de **Berrouague et al. (2019)** et est accentuée par une pathologie rénale chronique, facteur reconnu dans la diminution de l'hémoglobine (**Al-Shemery et al., 2022 ; Shittu et al., 2013 ; Almahdi et al., 2016**). Par ailleurs, la diminution du volume globulaire moyen et la perturbation de la production plaquettaire, pouvant induire une thrombopénie, soulignent l'impact toxique du TBC sur la moelle osseuse (**Lubran, 1989 ; Bhandari et al., 2023**).

L'administration de *Ruta montana* seule, à la dose sub-chronique étudiée par **Ghedjati et al. (2022)**, n'a entraîné que des modifications hématologiques mineures. Cependant, le

traitement combiné TBC+RM, surtout à la dose plus élevée (RM2, 100 mg/kg), a permis une récupération partielle à marquer des paramètres hématologiques (RBC, HGB, HCT et PLT), indiquant ainsi une capacité protectrice dose-dépendante de l'extrait de *Ruta montana*. Cette action semble étroitement liée aux propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires de la plante, notamment en raison de sa teneur en composés phénoliques (Ounissi et al., 2024).

#### 4.1.3. Effet du traitement sur l'activité hépatique :

##### *Effet du traitement sur le poids absolu et poids relatif du foie :*

L'analyse des impacts du tébuconazole (TBC) et de la *Ruta montana* (RM) sur les caractéristiques de poids des organes internes est un élément essentiel pour évaluer les perturbations physiopathologiques provoquées par ces traitements. Le **Tableau 12** expose les moyennes des poids absolus et relatifs du foie chez les rats témoins ainsi que chez ceux qui ont été exposés au TBC, séparément ou en conjonction avec *Ruta montana*, à l'issue de 50 jours d'expérimentation.

Le poids absolu du foie diminue significativement dans le groupe TBC ( $8,057 \pm 0,20$  g) par rapport au groupe contrôle ( $9,457 \pm 0,6$  g). Cette diminution est également observée dans le groupe TBC + RM1 ( $7,1 \pm 0,38$  g,  $p < 0,01$ ), ce qui indique une altération hépatique notable sous l'effet du tébuconazole. En revanche, les groupes RM1 et RM2 affichent des valeurs proches du contrôle ( $8,571 \pm 0,26$  g et  $8,314 \pm 0,28$  g, respectivement), suggérant un effet protecteur partiel de *Ruta montana*. Cette tendance se reflète également dans le poids relatif du foie, où le groupe TBC présente une réduction marquée ( $3,248 \pm 0,48$  g), tandis que les autres groupes montrent des valeurs comparables à celles du contrôle.

**Tableaux 12 :** Moyenne des poids relatifs du foie entre les rats témoins et ceux traités avec *Ruta montana* (RM), tébuconazole (TBC) et leurs combinaisons après 50 jours d'expérimentation.

	Control	TBC	RM1	RM2	TBC+RM1	TBC+RM2
	MOYENNE $\pm$ SEM					
<b>Poids absolu du foie (g)</b>	9,457 $\pm$ 0,6	8,057 $\pm$ 0,20	8,571 $\pm$ 0,26	8,314 $\pm$ 0,28	7,1 $\pm$ 0,38**	8,886 $\pm$ 0,46
<b>Poids relatif du foie (g)</b>	3,711 $\pm$ 0,17	3,248 $\pm$ 0,48	3,66 $\pm$ 0,15	3,969 $\pm$ 0,26	3,406 $\pm$ 0,21	3,986 $\pm$ 0,31

Au niveau hépatique, alors qu'aucune différence significative n'a été observée dans les poids relatifs et absolus du foie entre les groupes exposés au TBC seul et le groupe témoin, les traitements combinés ont révélé une diminution notable du poids absolu du foie. Ce phénomène pourrait être lié à une altération du flux sanguin hépatorénal (Rous, 1920 ; Rubin et al., 1965).

**Effet du traitement sur l'activité des enzymes hépatiques :**

**Tableau 13 :** Dosages des enzymes hépatiques.

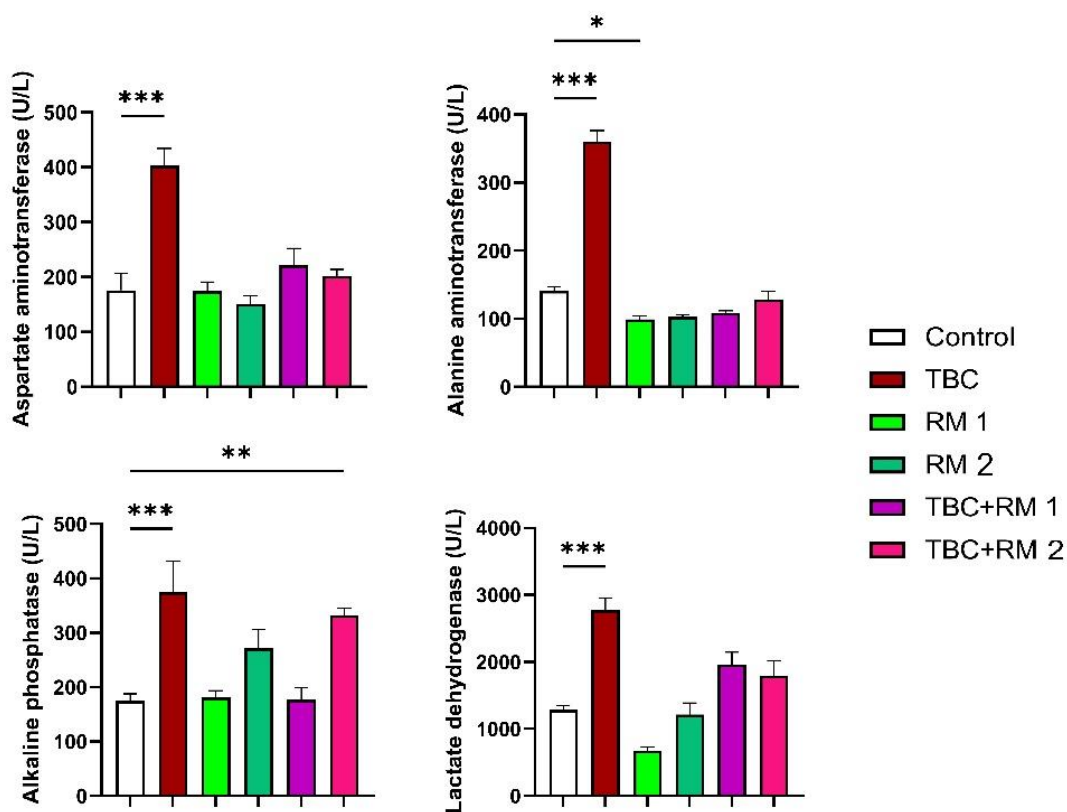
	Control	TBC	RM 1	RM 2	TBC+RM 1
Paramètres	Moyenne ± SEM				
AST/ TGO (u/l)	141,1± 6,315	360,4±16,18***	99,14± 4,852*	102,7± 3,257	108,7± 2,974
ALT/ TGP (u/l)	176,1±30,92	402,7±31,83***	174,4±16,53	150,7±15,34	221,4±30,77
LDH(u/l)	1286±66,09	2776±177,1***	678,7±57,16	1215±172,5	1961±183,3
ALP(u/l)	174,8 ±13,03	374,9±57,13**	181,1±12,46	271,3±35,20	176,9±21,9

Toutes les données sont exprimées en moyennes ±SEM ; elles ont été analysées par un test ANOVA à sens unique suivi d'un test de Tukey pour 7 animaux dans chaque groupe (n=7). Les valeurs sont significativement différentes (\*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001) par rapport au groupe témoin. **AST (u/l)** : Aspartate Aminotransférase (**TGO** - Transaminase Glutamo-Oxaloacétique), **ALT (u/l)** : Alanine Aminotransférase (**TGP** - Transaminase Glutamo-Pyruvique), **ALP (u/l)** : Phosphatase Alcaline, **LDH (u/l)** : Lactate Déshydrogénase,

Les résultats présentés dans le (**Tableau 13**) de notre étude montrent de manière explicite que le traitement par le TBC peut provoquer des dommages au niveau du foie, se traduisant par une toxicité hépatique. Les résultats de l'étude ont mis en évidence une augmentation statistiquement significative, avec un seuil de signification égal ou inférieur à 0,001, des activités enzymatiques hépatiques, notamment l'alanine aminotransférase (ALT), l'aspartate aminotransférase (AST), la lactate déshydrogénase (LDH) et la phosphatase alcaline (ALP).

Les résultats obtenus (**Figure 28**) montrent une augmentation significative des niveaux des enzymes hépatiques (AST, ALT, ALP) ainsi que de la lactate déshydrogénase (LDH) dans le groupe exposé au tébuconazole (TBC) par rapport au groupe témoin (p < 0,001), indiquant une atteinte hépatique et cellulaire importante. En revanche, les groupes traités avec *Ruta montana* (RM1 et RM2) présentent des niveaux enzymatiques comparables à ceux du témoin, suggérant l'absence d'effet hépatotoxique de cette plante. De plus, les groupes combinés

(TBC+RM1 et TBC+RM2) montrent une réduction significative des taux d'enzymes hépatiques et de la LDH par rapport au groupe TBC seul, indiquant un effet protecteur partiel de *Ruta montana* contre les dommages hépatiques et cellulaires induits par le tébuconazole

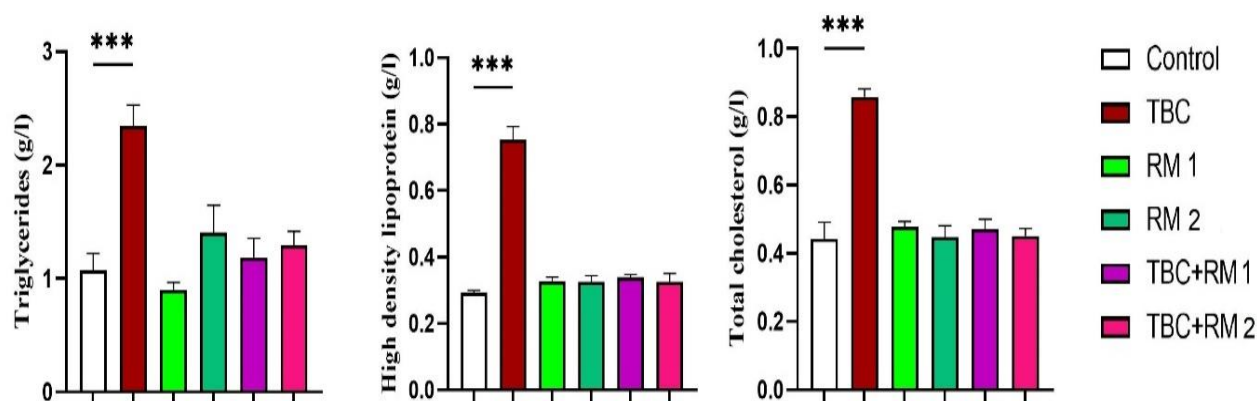


**Figure 28** : Moyenne des marqueurs biochimiques enzymatiques (AST : Aspartate aminotransférase (u/l) ; ALT : Alanine aminotransférase (u/l) ; ALP : Phosphatase alcaline (u/l) ; LDH : Lactate déshydrogénase (u/l)) du contrôle et des rats traités avec *Ruta montana* (RM).

**Effet du traitement sur les paramètres biochimiques :**

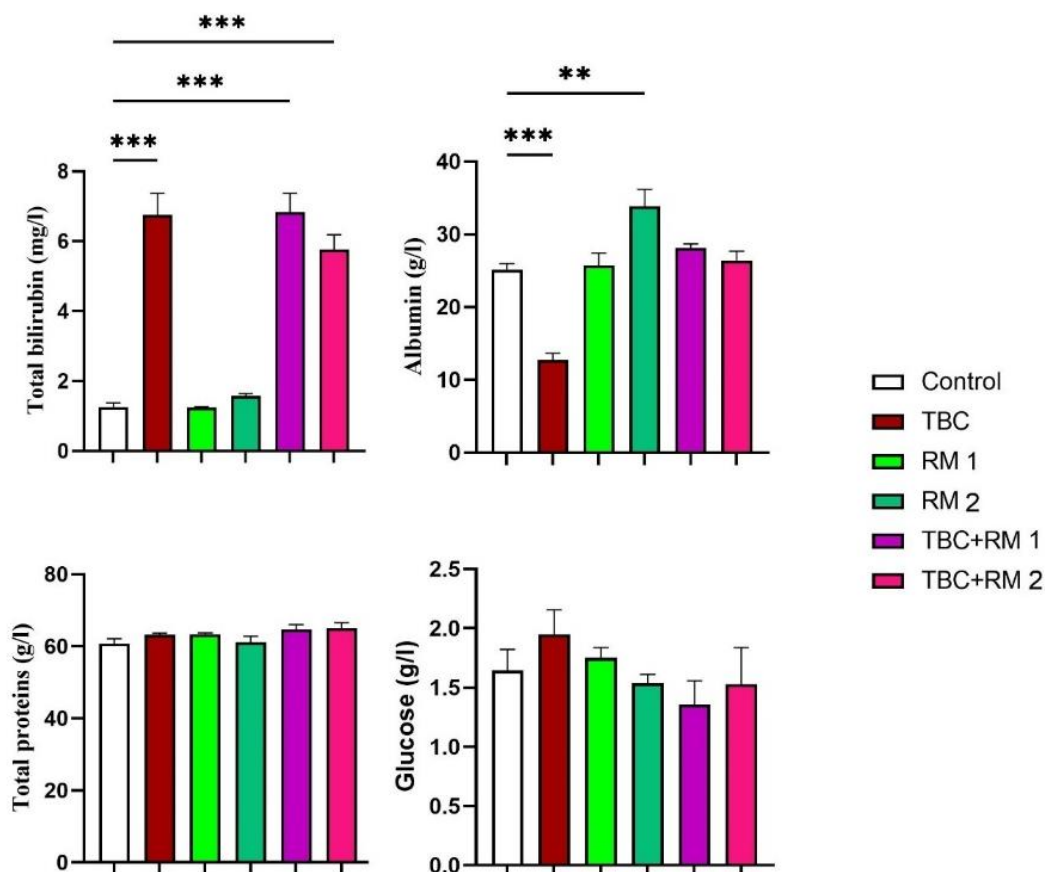
Les résultats biochimiques montrent une augmentation significative des niveaux de triglycérides, de cholestérol total et une diminution marquée des lipoprotéines de haute densité (HDL) dans le groupe exposé au tébuconazole (TBC) par rapport au groupe témoin ( $p < 0,001$ ) (**Figure 29**). Ces variations indiquent une perturbation du métabolisme lipidique, suggérant un effet hyperlipidémique et athérogène du tébuconazole. En revanche, les groupes traités avec *Ruta montana* (RM1 et RM2) affichent des niveaux de triglycérides, de cholestérol total et de HDL similaires à ceux du témoin, suggérant que cette plante n'a pas d'effet délétère sur le métabolisme lipidique. De plus, les groupes combinés (TBC+RM1 et TBC+RM2) montrent une réduction notable des triglycérides et du cholestérol total, ainsi qu'une augmentation du

HDL par rapport au groupe TBC seul, indiquant un effet protecteur partiel de *Ruta montana* contre les dyslipidémies induites par le Tébuconazole.



**Figure 29** : Moyenne  $\pm$  SEM des activités biochimiques du cholestérol, (TC : Cholestérol total (g/l) ; HDL : Lipoprotéines de haute densité (g/l) ; TG : Triglycérides (g/l)) du contrôle et des rats traités avec *Ruta montana* (RM), Tébuconazole (TBC) et traitements combinés de Tébuconazole avec *Ruta montana* après 50 jours d'essai expérimental.

Les résultats mentionnés dans la **Figure 30** montrent une augmentation très significative des niveaux de bilirubine totale dans le groupe exposé au Tébuconazole (TBC) par rapport au groupe témoin ( $p < 0,001$ ), suggérant une altération de la fonction hépatique pouvant résulter d'une hémolyse accrue ou d'une obstruction biliaire. En revanche, les groupes traités avec *Ruta montana* (RM1 et RM2) présentent des niveaux normaux de bilirubine, indiquant l'absence d'effet hépatotoxique de la plante. Cependant, les groupes combinés (TBC+RM1 et TBC+RM2) conservent des niveaux élevés de bilirubine, bien que légèrement inférieurs à ceux du groupe TBC seul, suggérant que *Ruta montana* ne parvient pas à neutraliser totalement l'effet toxique du Tébuconazole sur ce paramètre.



**Figure 30** : Moyenne  $\pm$  SEM des activités biochimiques (TP : protéines totales (g/l) ; ALB : albumine (g/l) ; TB : bilirubine totale (mg/l) ; GLU : Glucose (g/l).) du contrôle et des rats traités avec *Ruta montana* (RM), Tébuconazole (TBC) et traitements combinés de tébuconazole avec *Ruta montana* après 50 jours d'essai expérimental.

Concernant l'albumine, présente une réduction significative ( $p < 0,001$ ) est observée dans le groupe TBC, indiquant un dysfonctionnement hépatique affectant la synthèse protéique. À l'inverse, les groupes RM1 et RM2 montrent une augmentation significative ( $p < 0,01$ ) des niveaux d'albumine par rapport au groupe témoin, suggérant un potentiel effet bénéfique de *Ruta montana* sur le métabolisme hépatique. Les groupes combinés (TBC+RM1 et TBC+RM2) présentent également des niveaux d'albumine supérieurs au groupe TBC seul, ce qui pourrait refléter un effet protecteur partiel de *Ruta montana* contre la diminution de la synthèse protéique induite par le Tébuconazole. Les protéines totales et le glucose ne montrent pas de différences significatives entre les groupes expérimentaux, indiquant que ni le Tébuconazole, ni *Ruta montana*, ni leurs combinaisons n'ont un effet notable sur ces paramètres biochimiques (Tableau 14).

**Tableau 14** : Variation des paramètres biochimiques suite au traitement.

Paramètres	Traitement groups					
	Control	TBC	RM 1	RM 2	TBC+RM 1	TBC+RM 2
	Moyenne±SEM (ESM)					
<b>TC(g/l)</b>	0,4417±0,04862	0,8583±0,02303***	0,4783±0,01487	0,4471±0,03307	0,47±0,02944	0,45±0,02289
<b>HDL(g/l)</b>	0,2929±0,006442	0,7529±0,03974***	0,3271±0,01248	0,3243±0,01925	0,3386±0,008	0,3257±0,02458
<b>TG(g/l)</b>	1,074±0,1459	2,347±0,1804***	0,9014±0,06493	1,407±0,2381	1,187±0,1668	1,294±0,1227
<b>TP(g/l)</b>	60,71±1,358	63,14±0,5084	63,29±0,4206	61,14±1,639	64,71±1,322	65±1,543
<b>ALB(g/l)</b>	25,14±0,8289	12,71±0,944***	25,71±1,686	33,86±2,324**	28,14±0,5533	26,43±1,251
<b>TB (mg/l)</b>	1,257±0,1232	6,757±0,6102***	1,249±0,01895	1,583±0,07043	6,829±0,5441***	5,771±0,4219***
<b>GLU(g/l)</b>	1,644±0,1783	1,95±0,2044	1,751±0,08735	1,539±0,07343	1,356±0,2024	1,529±0,3098

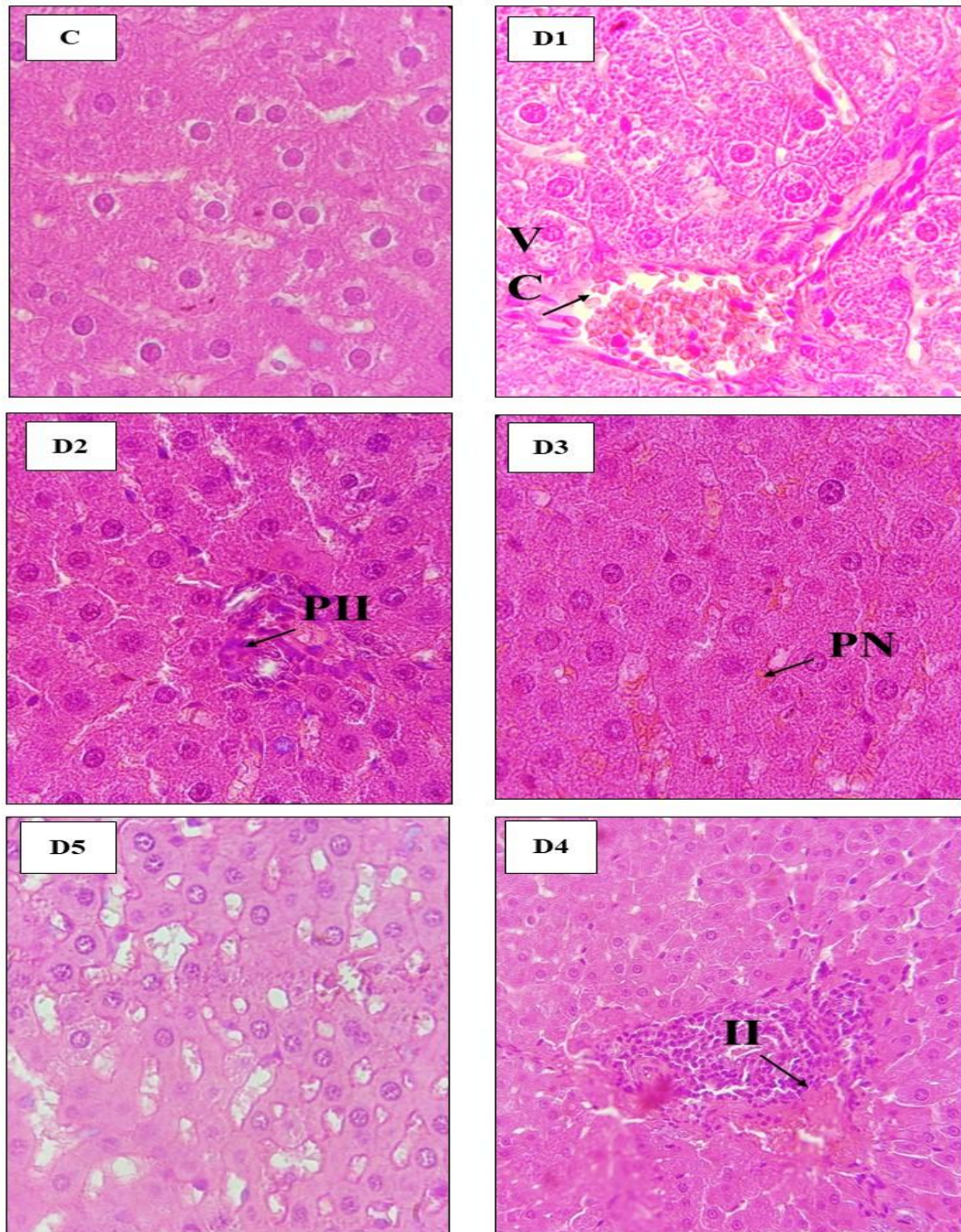
TC (g/l) :Cholestérol Total, HDL (g/l) : Lipoprotéines de Haute Densité (Bon Cholestérol), TG (g/l) : Triglycérides, TP (g/l) : Protéines Totales, ALB (g/l) : Albumine, TB (mg/l) : Bilirubine Totale, GLU (g/l) : Glucose.

Les analyses biochimiques constituent des indicateurs essentiels de dommages organo-spécifiques. Dans le foie, l'augmentation significative des enzymes plasmatiques telles que l'ALT, l'AST, la LDH et l'ALP chez les rats traités au TBC traduit une atteinte du parenchyme hépatique (Awe et al., 2013 ; Rahman et al., 2001 ; Mdhluli, 2003). Ces résultats, en accord avec Berrouague et al. (2019) et corroborés par les observations de Ku et al. (2021), suggèrent que le TBC altère l'intégrité des membranes cellulaires, induisant une nécrose et une dégradation des hépatocytes (Arfat et al., 2014 ; Slimani et al., 2014). L'élévation concomitante du cholestérol et la diminution de l'albumine viennent compléter ce tableau, indiquant une dysfonction hépatique potentiellement liée à une altération de la perméabilité membranaire et à une perturbation du métabolisme lipidique (Berrouague et al., 2019 ; Chaâbane et al., 2017 ; Ben Othmène et al., 2020).

L'administration de l'extrait de *Ruta montana* semble contrecarrer ces altérations. Grâce à son riche profil en composés phénoliques, dont l'héspéridine, l'isoquercitrine, la lutéoline et d'autres, identifiés par LC-MS/MS, RM favorise une restauration partielle voire quasi complète des paramètres biochimiques hépatiques (Ali et al., 2023 ; Nasehi et al., 2023). Ces composés exercent des effets antioxydants en inhibant notamment l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS), en augmentant la capacité antioxydante totale (TAC) et en modulant l'activité d'enzymes antioxydantes comme la SOD et la catalase (Xiaoting et al., 2010 ; Tabeshpour et al., 2020). Cette capacité de RM à rétablir la fonction hépatique est en accord avec les études de Merghem et al. (2013) et de Mahdeb et al. (2023), qui suggèrent que ses effets antioxydants peuvent préserver l'intégrité cellulaire et limiter les dommages oxydatifs.

#### ***Etude anatomopathologique du foie :***

Les lames microscopiques des foies de rats ayant reçu le composé tébuconazole par gavage oral a révélé diverses détériorations pathologiques, notamment une congestion vasculaire, une dilatation des sinus, un infiltrat inflammatoire périportal ou une nécrose portale, ainsi qu'une hépatite. Nous avons également remarqué que certaines de ces modifications ont été observées dans les foies des rats traités avec *Ruta montana* et le premier groupe de combinaison. Cependant, seule la congestion est présente chez les rats traités avec 50 mg/kg de *Ruta montana* et le second groupe combiné, qui peuvent présenter une certaine forme de récupération des hépatocytes normaux et moins d'infiltrat inflammatoire (Figure 31).



**Figure 31** : Microphotographie du tissu Hépatique de (c) rats témoins montrant des tubules convolutés distaux avec de nombreux parenchymes proximaux normaux et sains ; (D1) rats traités avec 100 mg/Kg de tébuconazole ; (D2 et D3) rats traités avec 50 mg/Kg et 100 mg/Kg de *Ruta montana* ; (D4 et D5) rats traités avec un mélange de 100 mg/Kg de tébuconazole et 50 mg/Kg pour (D4) et 100 mg/Kg ou (D4) de *Ruta montana* (Grossissement X400). VC : congestion vasculaire, PII : infiltrat inflammatoire périportal, PN : nécrose portale, II : infiltrat inflammatoire.

**4.1.4. Effet du traitement sur la fonction rénale :**

***Effet du traitement sur le poids absolu et poids relative des reins :***

Le poids absolu des reins diminue légèrement dans le groupe TBC ( $1,914 \pm 0,17$  g) par rapport au contrôle ( $2,057 \pm 0,32$  g), bien que cette différence ne soit pas significative. Une tendance similaire est observée dans le groupe RM2 ( $1,83 \pm 0,27$  g). Le poids relatif des reins reste globalement stable dans tous les groupes, bien qu'une augmentation significative soit observée dans le groupe TBC + RM2 ( $1,06 \pm 0,09$  g,  $p < 0,05$ ), ce qui pourrait refléter un mécanisme compensatoire ou une réorganisation métabolique induite par le traitement combiné (Tableaux 15). Ces observations, cohérentes avec la littérature (Piao et al., 2013 ; Lazic et al., 2020), indiquent que les variations de la taille des organes, et notamment des reins, sont des marqueurs fiables de la toxicité et ne dépendent pas nécessairement des fluctuations de la masse corporelle globale (Takizawa, 1978 ; Craig et al., 2014).

**Tableaux 15 :** Moyenne des poids relatifs des reins entre les rats témoins et ceux traités avec *Ruta montana* (RM), Tébuconazole (TBC) et leurs combinaisons après 50 jours d'expérimentation.

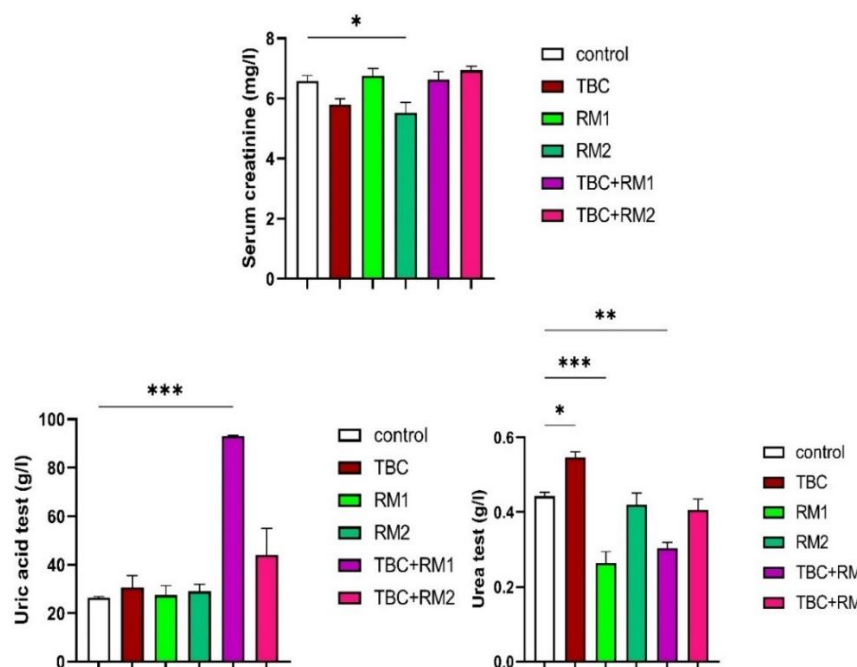
	Control	TBC	RM1	RM2	TBC+RM1	TBC+RM2
	MOYENNE $\pm$ SEM					
<b>Poids absolu des reins (g)</b>	2.057 $\pm$ 0.32	1.914 $\pm$ 0.17	2.01 $\pm$ 0.10	1.83 $\pm$ 0.27	1.914 $\pm$ 0.30	2.088 $\pm$ 0.97
<b>Poids relatif des reins (g)</b>	0.816 $\pm$ 0.05	0.89 $\pm$ 0.06	0.86 $\pm$ 0.03	0.867 $\pm$ 0.05	0.911 $\pm$ 0.05	1.06 $\pm$ 0.09*

***Effet du traitement sur le dosage des paramètres biochimiques rénales :***

Les groupes combinés (TBC+RM1 et TBC+RM2) montrent une augmentation significative des niveaux d'acide urique, en particulier TBC+RM1, qui affiche des valeurs beaucoup plus élevées que tous les autres groupes ( $p < 0,001$ ). Cette élévation pourrait indiquer une perturbation du métabolisme de l'acide urique ou une interaction entre le tébuconazole et *Ruta montana* affectant l'excrétion rénale. Par ailleurs, l'urémie diminue significativement dans le groupe RM1 ( $p < 0,05$ ) (Tableau 16).

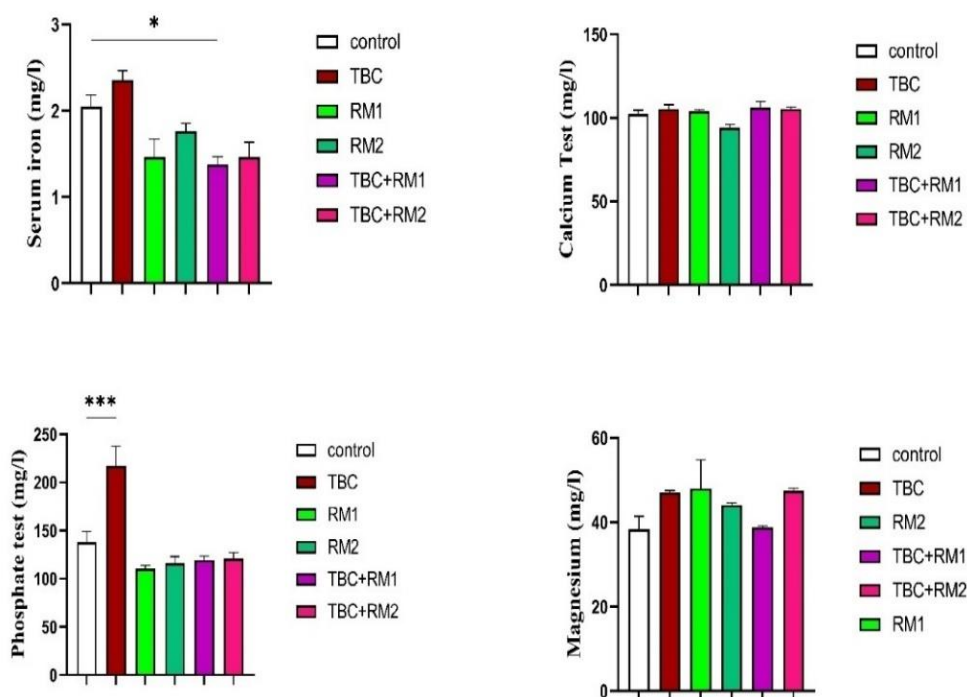
Les résultats obtenus montrent une augmentation significative des d'urée dans le groupe exposé au Tébuconazole (TBC) par rapport au groupe témoin ( $p < 0,001$ ), indiquant une altération de la fonction rénale et une possible insuffisance rénale fonctionnelle induite par ce fongicide. En revanche, les groupes traités avec *Ruta montana* (RM1 et RM2) présentent des valeurs similaires à celles du contrôle, suggérant que cette plante ne provoque pas de toxicité rénale (**Figure 32**).

Les groupes combinés (TBC+RM1 et TBC+RM2) montrent une augmentation significative des niveaux d'acide urique, en particulier TBC+RM1, qui affiche des valeurs beaucoup plus élevées que tous les autres groupes ( $p < 0,001$ ). Cette élévation pourrait indiquer une perturbation du métabolisme de l'acide urique ou une interaction entre le tébuconazole et *Ruta montana* affectant l'excrétion rénale. Par ailleurs, l'urémie diminue significativement dans le groupe RM1 ( $p < 0,05$ ) (**Tableau 16**). Les résultats obtenus montrent une augmentation significative des niveaux de fer sérique et de phosphate dans le groupe exposé au tébuconazole (TBC) par rapport au groupe témoin ( $p < 0,05$  pour le fer,  $p < 0,001$  pour le phosphate), indiquant une perturbation du métabolisme minéral et possiblement une altération de la fonction rénale (**Tableau 16**).



**Figure 32 :** Effets du Tébuconazole (TBC) et de *Ruta montana* (RM) sur les biomarqueurs de la fonction rénale (créatinine, urée et acide urique) chez les rats après 50 jours d'exposition. Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$ SEM ;  $n=7$  pour chaque groupe de traitement. Différence significative : (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ) par rapport au groupe témoin.

En revanche, les groupes traités avec *Ruta montana* (RM1 et RM2) affichent des niveaux de fer et de phosphate comparables à ceux du groupe témoin, suggérant que cette plante ne provoque pas de déséquilibre minéral. De plus, les groupes combinés (TBC+RM1 et TBC+RM2) montrent une réduction significative des niveaux de fer et de phosphate par rapport au groupe TBC seul, indiquant un effet protecteur potentiel de *Ruta montana* contre les altérations du métabolisme du fer et du phosphate induites par le tébuconazole. Aucune disparité notable n'est constatée entre les groupes en ce qui concerne les concentrations de calcium et de magnésium, ce qui indique que ni le Tébuconazole, ni la *Ruta montana*, ni leurs associations n'ont un impact significatif sur ces paramètres électrolytiques (**Figure 33**).



**Figure 33** : Effets du tébuconazole (TBC) et de *Ruta montana* (RM) sur les paramètres biochimiques minéraux (fer, phosphate, calcium et magnésium) chez les rats après 50 jours d'exposition.

Sur le plan rénal, le TBC induit une hausse progressive des taux de phosphore et de calcium, pouvant conduire à la précipitation de cristaux (Lehmann et al., 1991), ainsi qu'une élévation de l'urée, indicateur de dysfonction rénale (Cameron et Greger, 1998 ; Missoun et al., 2018). Toutefois, notre étude n'a pas relevé d'augmentation des taux sériques de créatinine et d'urée en lien avec des traumatismes rénaux majeurs, mais plutôt une diminution dans le groupe RM1 et dans les groupes recevant la combinaison TBC+RM1, suggérant une possible réduction de

la synthèse de créatinine ou une amélioration de son élimination (Tepel et al., 2000 ; Hoffmann et al., 2004 ; Doi et al., 2009).

**Tableau 16 :** Moyenne des marqueurs biochimiques plasmatiques des reins du contrôle et des rats traités avec *Ruta montana* (RM), Tébuconazole (TBC) et traitement combiné de Tébuconazole et *Ruta montana* après 50 jours d'essai expérimental.

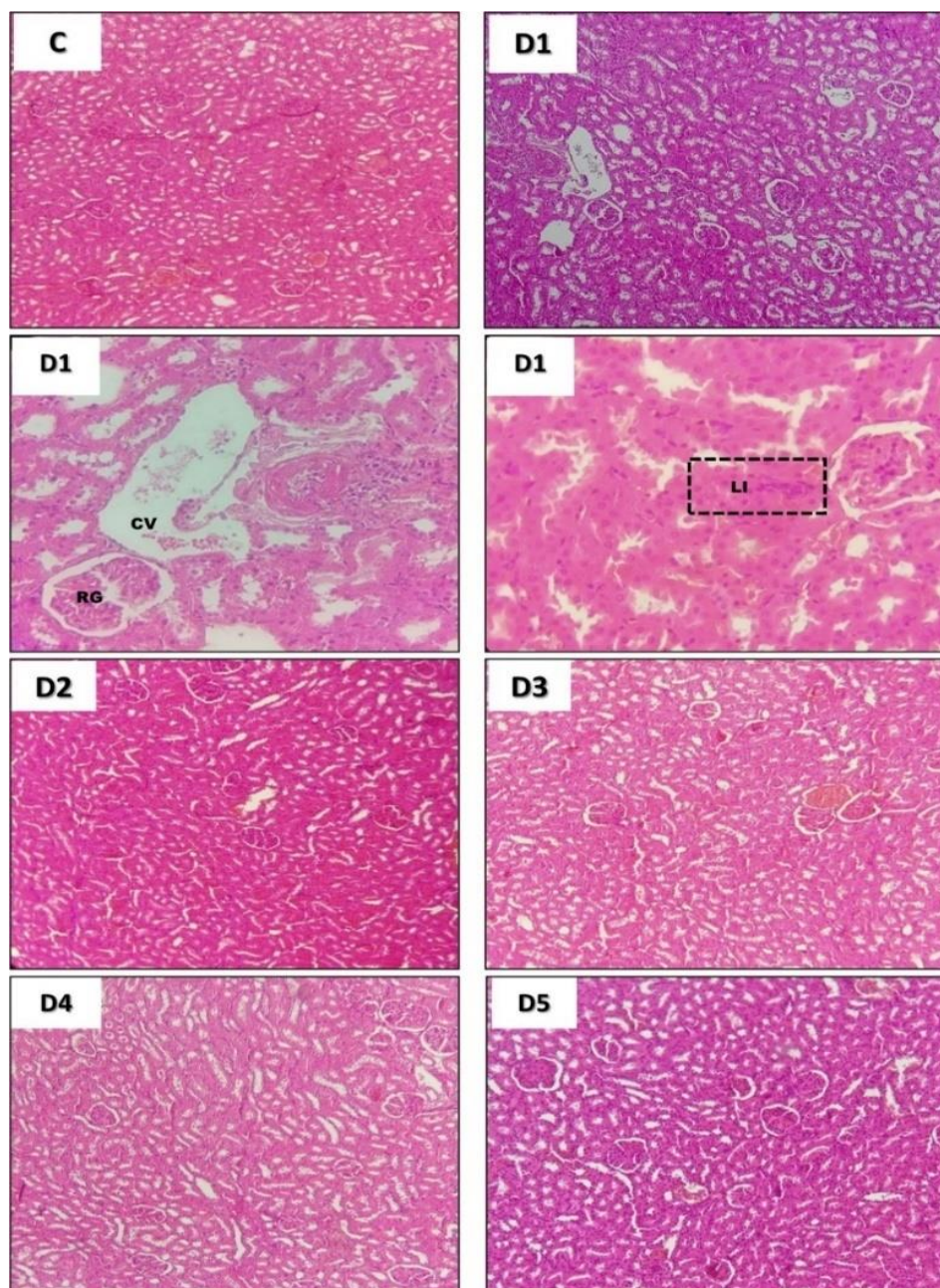
	Control	TBC	RM 1	RM 2	TBC+RM 1	TBC+RM 2
MOYENNE ± SEM						
<b>Cr(mg/l)</b>	6,579±0,1864	5,803±0,1848	6,759±0,2401	5,533±0,3344*	5,533±0,2625	6,936±0,1431
<b>U (g/l)</b>	0,4429±0,01107	0,4743±0,03287*	0,2643±0,03023***	0,42±0,032	0,3043±0,01494**	0,4057±0,02943
<b>UA (g/l)</b>	26,43±0,4809	30,71±4,804	27,43±3,981	29±2,992	93±0,3086***	44±10,96
<b>Fe(mg/l)</b>	2,047±0,136	2,354±0,1122	1,466±0,2089	1,766±0,08947	1,376±0,0925*	1,463±0,1729
<b>Ca<sup>++</sup> (mg/l)</b>	102,4 ± 2,181	105,3 ± 2,661	103,9 ± 1,01	94 ± 2,127	106,1 ± 3,542	105,4 ± 1,131
<b>Phos (mg/l)</b>	138,3 ± 10,65	217,1 ± 20,38***	110,4 ± 3,206	116,1 ± 6,78	119,4 ± 4,145	120,7 ± 6,718
<b>Mg (mg/l)</b>	38,29 ± 3,16	47,14 ± 0,4041	48 ± 6,786	44,14 ± 0,4592	38,71 ± 0,4738	47,43 ± 0,5714

En parallèle, la combinaison TBC+RM a également entraîné une baisse des taux sériques de fer et une hausse notable de l'acide urique, indiquant que l'effet protecteur de RM, particulièrement à la dose de 100 mg/kg (RM2), permet de normaliser certains paramètres rénaux altérés par le TBC (Ran et al., 2017). Ce rétablissement partiel de la fonction rénale, soutenu par des mécanismes antioxydants et anti-inflammatoires, est en accord avec les travaux antérieurs qui ont montré que divers extraits de plantes pouvaient améliorer le dysfonctionnement rénal en réduisant l'inflammation et les dommages fibrotiques (Khan et al., 2022 ; Andrés et al., 2024).

#### *Etude histologique des reins :*

Le groupe exposé au tébuconazole a montré des signes significatifs de pathologie rénale, incluant une congestion vasculaire, une dilatation et des lésions primaires observées dans les tubules rénaux et le tissu interstitiel. Ces résultats suggèrent une altération de la microcirculation et une diminution de la fonction rénale, conduisant au développement d'une néphrite interstitielle accompagnée d'un infiltrat inflammatoire. En contraste, l'association du

tébuconazole et du *Ruta montana* a entraîné une amélioration significative des tissus, alors que les groupes traités uniquement au *Ruta montana* n'ont manifesté aucun changement histopathologique au niveau des tissus rénaux (**Figure 34**).



**Figure 34 :** Microphotographie du tissu rénal de (c) rats témoins montrant des tubules convolutés distaux avec de nombreux parenchymes proximaux normaux et sains ; (D1) rats traités avec 100 mg/Kg de tébuconazole ; (D2 et D3) rats traités avec 50 mg/Kg et 100 mg/Kg de *Ruta montana* ; (D4 et D5) rats traités avec un mélange de 100 mg/Kg de tébuconazole et 50 mg/Kg pour (D4) et 100 mg/Kg ou (D4) de *Ruta montana* (Grossissement X400). **CV** : congestion des vaisseaux, **IL** : infiltration lymphocytaire, **RG** : glomérule rénal.

**4.1.5. Effet du traitement sur l'activité Reproductrice :**

**Effet du traitement sur le poids des testicules :**

Le poids absolu des testicules diminue de manière drastique dans le groupe TBC ( $4,05 \pm 0,22$  g) par rapport au groupe contrôle ( $5,93 \pm 0,14$  g), avec une différence hautement significative ( $p < 0,001$ ). Les groupes RM1 et RM2 présentent des poids absolus des testicules supérieurs au groupe TBC, bien qu'inférieurs au groupe contrôle, ce qui pourrait suggérer un effet atténuateur partiel de *Ruta montana*. Le groupe TBC + RM1 ( $5,43 \pm 0,27$  g) montre une amélioration significative par rapport au groupe TBC, tandis que le groupe TBC + RM2 ( $5,26 \pm 0,30$  g) présente une récupération légèrement moindre. Le poids relatif des testicules suit la même tendance, avec une diminution notable dans le groupe TBC ( $1,86 \pm 0,095$  g) et une amélioration dans les groupes combinés, notamment TBC + RM1 ( $2,59 \pm 0,16$  g) (**Tableaux 17**).

**Tableaux 17 :** Moyenne des poids relatifs des testicules entre les rats témoins et ceux traités avec *Ruta montana* (RM), Tébuconazole (TBC) et leurs combinaisons après 50 jours d'expérimentation.

	Control	TBC	* RM1	RM2	TBC+RM1	TBC+RM2
<b>MOYENNE <math>\pm</math> L'erreur standard de la moyenne (ESM) ou SEM</b>						
<b>Poids absolu des testicules (g)</b>	5,93 $\pm$ 0,14	4,05 $\pm$ 0,22 ***	4,93 $\pm$ 0,17	5,04 $\pm$ 0,31	5,43 $\pm$ 0,27	5,26 $\pm$ 0,30
<b>Poids relatif des testicules (g)</b>	2,35 $\pm$ 0,14	1,86 $\pm$ 0,095	2,13 $\pm$ 0,11	2,40 $\pm$ 0,18	2,59 $\pm$ 0,16	2,34 $\pm$ 0,15

Nos résultats corroborant les travaux de **Ben Saad et al. (2020)** et les observations faites dans le cadre de l'utilisation de stéroïdes anabolisants et androgènes (**Mohd Mutalip et al., 2013**). Cette réduction, considérée comme l'indicateur le plus sensible de l'atteinte des organes reproducteurs, suggère que le TBC exerce des effets préjudiciables sur le système reproducteur, même si certains travaux (**Chen et al., 2019**) n'avaient pas systématiquement mis en évidence une modification de la masse testiculaire.

**Effet du traitement sur le spermogramme :**

Les résultats relatifs à la vitalité et à la mortalité des spermatozoïdes dans les divers groupes expérimentaux sont exposés dans le tableau et les graphiques correspondants. L'analyse des données révèle une réduction significative ( $p < 0,001$ ) de la vitalité spermatique dans le groupe soumis au tébuconazole (TBC), affichant une moyenne de  $57,8 \pm 4,43$  %, en comparaison avec le groupe témoin qui présente une vitalité élevée ( $94,9 \pm 1,59$  %). En revanche, les groupes traités exclusivement avec les extraits végétaux RM1 et RM2 présentent des vitalités similaires à celles du groupe témoin, avec des valeurs de  $94,2 \pm 2,75$  % et  $97,2 \pm 2,33$  %, respectivement. En revanche, l'administration conjointe du TBC avec les extraits RM1 et RM2 (groupes TBC+RM1 et TBC+RM2) induit une amélioration partielle de la vitalité spermatique ( $85,2 \pm 6,21$  % et  $88,8 \pm 6,92$  % respectivement) par rapport au groupe traité uniquement avec le TBC (**Tableau 18**).

**Tableau 18 :** Variation de la vitalité et la mortalité des spermatozoïdes chez les rats (*Rattus norvegicus*).

Moyenne	Control	TBC	RM1	RM2	TBC+RM1	TBC+RM2
<b>Vitalité des spermatozoïdes (%)</b>	94,9±1,59	57,8±4,43***	94,2±2,75	97,2±2,33	85,2±6,21	88,8±6,92
<b>Mortalité des spermatozoïdes (%)</b>	5,07±1,6	46,7±1,11***	5,8±2,75	4,8±4,32	14,8±6,21	11,2±6,92

Concernant la mortalité spermatique, une augmentation significative ( $p < 0,001$ ) est observée dans le groupe TBC seul, atteignant  $46,7 \pm 1,11$  % contre seulement  $5,07 \pm 1,6$  % pour le groupe contrôle. Les extraits RM1 ( $5,8 \pm 2,75$  %) et RM2 ( $4,8 \pm 4,32$  %) seuls ne montrent pas de différences significatives par rapport au contrôle. Toutefois, la combinaison du TBC avec RM1 et RM2 réduit notablement la mortalité induite par le TBC ( $14,8 \pm 6,21$  % et  $11,2 \pm 6,92$  % respectivement), indiquant clairement un effet modérateur potentiel de ces extraits vis-à-vis de la toxicité du tébuconazole sur la fonction spermatique (**Figure 35**). Le tébuconazole présente à des effets néfastes sur la vitalité et la mortalité des spermatozoïdes, ainsi que sur la fonction reproductive en général. Nos résultats concordent avec **Ben saad et al.**

(2020) qui on trouvez une similaire dans la vitalité et mortalité des spermatozoïde. une autre étude sur les spermatozoïdes bovins, le tébuconazole montré une spermioxicité significative à des concentrations plus élevées (1-100  $\mu\text{M}$ ) (Kabakci et al., 2021). D'autres pesticides, tels que le malathion et le diazinon, réduisent considérablement le nombre, la viabilité des spermatozoïdes et augmentent les anomalies des spermatozoïdes (Betancourt et al., 2006).

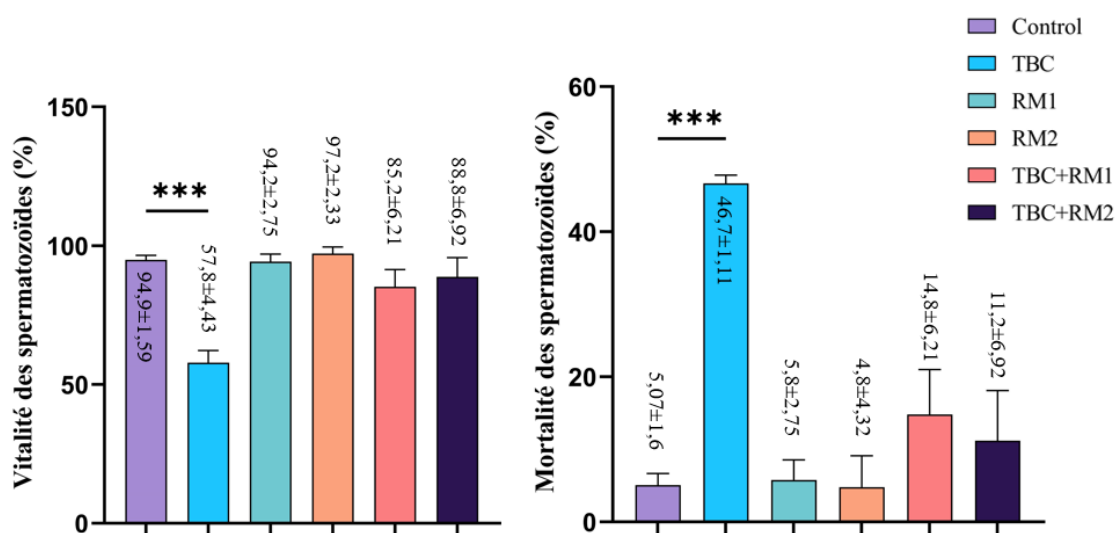


Figure 35 : Variation de la vitalité et de la mortalité des spermatozoïdes en réponse au traitement par le tébuconazole (TBC) et aux extraits végétaux (RM1 et RM2).

Cette observation peut s'expliquer par le fait que l'action du fongicide triazole perturbe la régulation normale du cycle cellulaire des cellules trophoblastiques humaines, entraînant une diminution de leur viabilité en altérant divers mécanismes cellulaires tels que les systèmes de protéases, les facteurs angiogéniques, les hormones, les cytokines et les facteurs de croissance (Zhou et al., 2016). Nous avons aussi remarqué une amélioration de la vitalité chez les rats traités par la plante *Ruta montana* suggérant un effet modérateur cela concorde avec d'autres plantes comme *Ionidium suffruticosum* qui a montré des effets positifs sur la fertilité masculine, augmentant le poids testiculaire, la spermatogenèse, le nombre de spermatozoïdes, et améliorant la vitalité des spermatozoïdes chez les rats sub-fertiles (Chenniappan et Murugan, 2017).

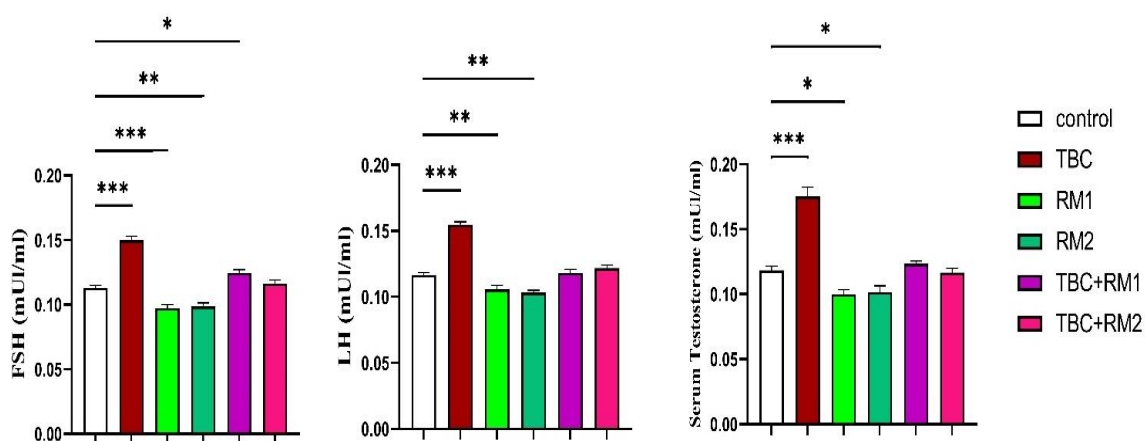
Les polyphénols présents dans certaines plantes, comme le quercétine et le resvératrol, améliorent l'efficacité de la respiration mitochondriale des spermatozoïdes. Cela se traduit par une meilleure production d'énergie, essentielle pour la motilité et la vitalité des spermatozoïdes

(Ferramosca et al., 2021). La richesse en composés antioxydants qui contribuent à atténuer le stress oxydatif, un facteur clé de l'infertilité masculine. Ces antioxydants agissent en neutralisant les espèces réactives de l'oxygène (ROS), protégeant ainsi les spermatozoïdes des lésions oxydatives, tout en améliorant leur motilité et leur vitalité (Ferramosca et al., 2021).

**Variation des taux des hormone :**

Les résultats obtenus montrent une augmentation significative des niveaux de FSH (hormone folliculo-stimulante), LH (hormone lutéinisante) et testostérone dans le groupe exposé au Tebuconazole (TBC) par rapport au groupe témoin ( $p < 0,001$ ), suggérant une altération du système endocrinien et une stimulation excessive de l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique. Cette élévation pourrait être due à une rétroaction compensatoire induite par une perturbation hormonale liée au tébuconazole (Tableau 19).

En revanche, les groupes traités avec *Ruta montana* (RM1 et RM2) présentent des niveaux significativement réduits de FSH, LH et testostérone par rapport au groupe TBC ( $p < 0,01$ ), indiquant un effet modulateur de *Ruta montana* sur l'axe hormonal. De plus, les groupes combinés (TBC+RM1 et TBC+RM2) montrent une réduction notable des niveaux hormonaux par rapport au groupe TBC seul, avec des valeurs proches de celles du groupe témoin, suggérant que *Ruta montana* pourrait atténuer les perturbations endocriniennes induites par le tébuconazole (Figure 36).



**Figure 36 :** Effets du Tébuconazole (TBC) et de *Ruta montana* (RM) sur les niveaux hormonaux (FSH, LH et testostérone) chez les rats après 50 jours d'exposition. Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$ SEM ; n=7 pour chaque groupe de traitement.

Sur le plan endocrinien, le TBC induit une hyperactivation de l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique (HPG) caractérisée par des élévations significatives de la FSH, de la LH et de la testostérone (Yang et al., 2018 ; Yang et al., 2019 ; Chen et al., 2019 ; Gandhari et al., 2023). Cela correspond à l'étude des mammifères L'exposition au tébuconazole affecte le développement des cellules de Leydig du fœtus, augmentant les niveaux de testostérone (Ma et al. 2020).

**Tableau 19** : Effets du Tébuconazole (TBC) et de *Ruta montana* (RM) sur les niveaux hormonaux (FSH, LH et Testostérone) chez les rats après 50 jours d'exposition.

	Control	TBC	RM1	RM2	TBC+RM 1	TBC+RM 2
<b>FSH (mUI/mL)</b>	0,113±0,0017	0,15±0,0030***	0,0973±0,002***	0,0988±0,002641**	0,124±0,0022*	0,116±0,0028
<b>LH (mUI/mL)</b>	0,116±0,001	0,155±0,0018***	0,105±0,003**	0,103±0,001782**	0,118±0,0025	0,121±0,002
<b>Testostérone (mUI/mL)</b>	0,118±0,003	0,175±0,0071***	0,10±0,0036*	0,101±0,004*	0,123±0,002	0,116±0,003

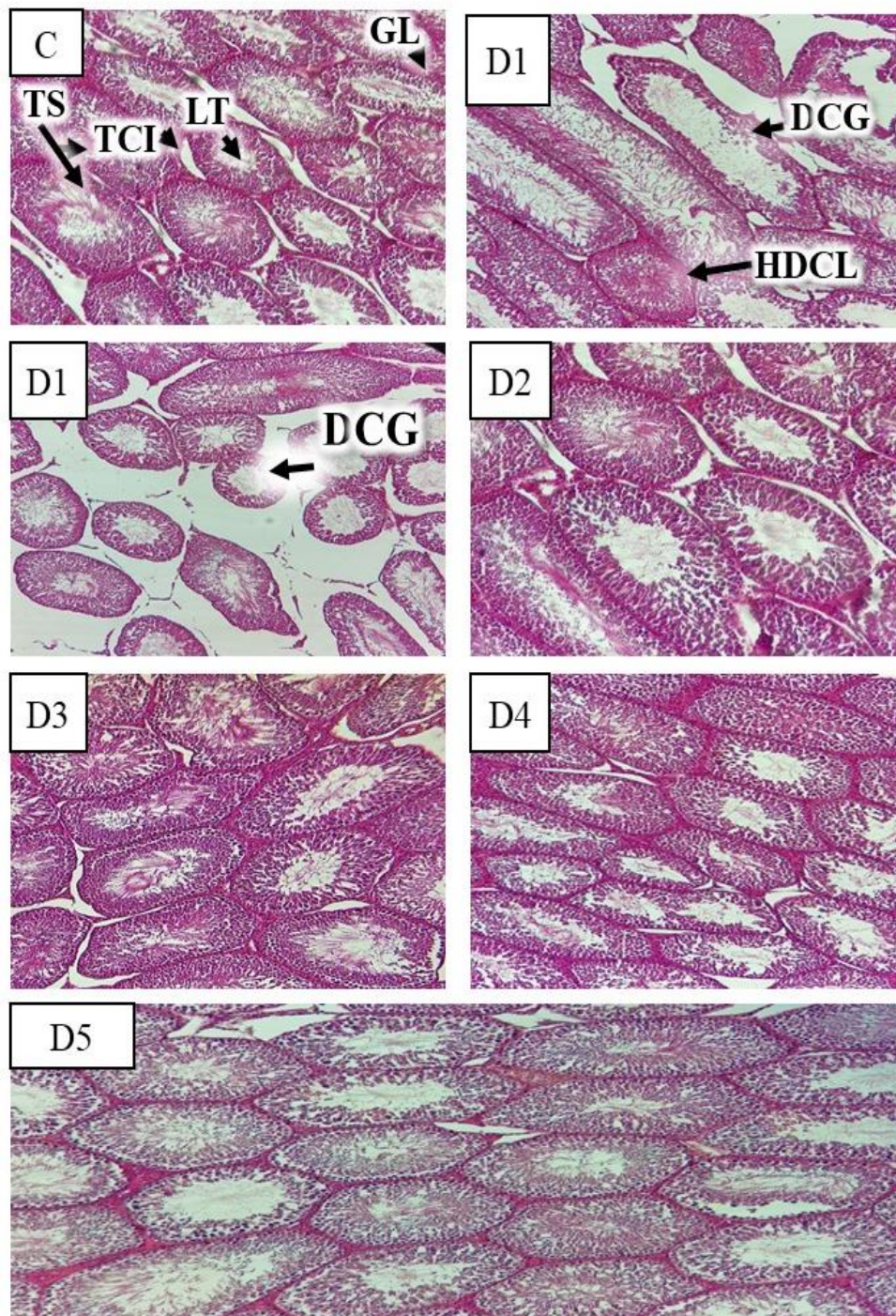
L'inhibition de l'aromatase par le TBC perturbe la rétroaction négative des estrogènes, entraînant une sécrétion accrue de GnRH et, par conséquent, des gonadotropines, ainsi qu'une accumulation de testostérone, phénomène également observé avec d'autres perturbateurs endocriniens (Desaulniers et al., 1999). À l'inverse, l'administration de RM (RM1 et RM2) réduit significativement ces hormones, indiquant une restauration partielle de l'équilibre hormonal. Cela peut s'expliquer par la présence de L'hésperidine peut agir sur l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique en modulant la libération de GnRH (gonadotropin-releasing hormone) par l'hypothalamus. Une diminution de la GnRH entraîne une réduction de la sécrétion de FSH et de LH par l'hypophyse, ce qui diminue indirectement la production de testostérone par les gonades (Parhiz et al., 2015). Les flavonoïdes et autres constituants bioactifs de *Ruta montana* pourraient favoriser aussi l'activité de l'aromatase, rétablissant ainsi la synthèse d'estrogènes et la rétroaction négative sur la sécrétion de GnRH (Haghmorad et al., 2019 ; Benkhaira et al., 2022). De plus, la co-administration TBC+RM ramène les niveaux hormonaux à des valeurs proches du contrôle, démontrant l'effet antagoniste de RM,

comparable aux effets observés avec d'autres extraits végétaux tels que ceux de *Mucuna pruriens* ou d'*Eucalyptus globulus* (Widjaja et al., 2023).

Cela peut être liée à L'hespéridine est un puissant antioxydant qui neutralise les espèces réactives de l'oxygène (ROS). Ces ROS, souvent générées par des toxines environnementales comme le tébuconazole, peuvent perturber les fonctions hormonales en endommageant les cellules des glandes endocrines. En réduisant le stress oxydatif, l'hespéridine protège les organes producteurs d'hormones comme les testicules et aide à maintenir une production hormonale normale (Li & Schluesener, 2017). L'hespéridine influence l'activité d'enzymes clés impliquées dans la synthèse et la dégradation des hormones stéroïdiennes, comme l'aromatase ou la 5 $\alpha$ -réductase. En régulant ces enzymes, elle aide à prévenir les déséquilibres hormonaux tels que l'excès ou le déficit d'androgènes (Parhiz et al., 2015).

#### ***Histologie des Testicules :***

L'examen histologique montre que le tébuconazole induit des altérations testiculaires sévères, incluant une désorganisation des tubules séminifères, une diminution des cellules germinales, une hypertrophie des cellules de Leydig et des signes d'inflammation et de nécrose, traduisant une toxicité marquée. En revanche, *Ruta montana* seule ne provoque aucune altération et maintient une spermatogenèse normale. Lorsqu'elle est administrée avec le tébuconazole, une restauration partielle à quasi complète de l'architecture testiculaire est observée, accompagnée d'une amélioration de la spermatogenèse et d'une réduction des lésions inflammatoires. Ces résultats suggèrent que *Ruta montana* exerce un effet protecteur contre la toxicité testiculaire du tébuconazole, contribuant à préserver la fonction testiculaire et l'équilibre hormonal (Figure 37).



**Figure 37 :** Microphotographie du tissu Testiculaire (c) Rats témoins ; (D1) Rats traités avec 100 mg/Kg de tébuconazole ; (D2 et D3) Rats traités avec 50 mg/Kg et 100 mg/Kg de *Ruta montana* ; (D4 et D5) rats traités avec un mélange de 100 mg/Kg de tébuconazole et 50 mg/Kg pour (D4) et 100 mg/Kg ou (D4) de *Ruta montana* (Grossissement X400). **TS :** Tube séminifères, **TCI :** tissu conjonctif inter tubulaire, **LT :** lumière d'un tube, **GL :** glande Leydig, **DCG :** Désorganisation de la couche germinale au sein des tubules séminifères, **HDCL :** Hyperplasie ou hypertrophie des cellules de Leydig.

## 4.2 Modélisation *in silico* des propriétés physicochimiques et du Tébuconazole :

### 4.2.1. Propriétés physicochimiques et lipophilie du Tébuconazole :

Sur le plan physicochimique, le tébuconazole affiche une masse moléculaire de 307,82 g/mol et un nombre élevé d'atomes lourds (21), dont 11 aromatiques, contribuant à sa rigidité structurale et à sa réactivité. La fraction Csp<sup>3</sup> de 0,50 équilibre flexibilité et stabilité conformationnelle, tandis que ses six liaisons rotatives facilitent des interactions adaptatives avec des cibles biologiques. La présence de trois accepteurs et d'un donneur de liaisons hydrogène influence sa solubilité aqueuse modérée, cohérente avec son classement « modérément soluble » dans les modèles ESOL, Ali et Silicos-IT. Sa réfractivité molaire (85,37) et sa surface polaire (TPSA = 50,94 Å<sup>2</sup>) indiquent une polarité modérée, compatible avec une perméabilité membranaire. Le Consensus Log P de 3,23 confirme une lipophilie modérée, favorisant potentiellement son accumulation dans les tissus lipidiques, un facteur aggravant sa toxicité chronique. Ces propriétés, combinées à son inhibition des CYP, sous-tendent les mécanismes plausibles de sa toxicité hépatique et systémique (**Tableau 20**).

### 4.2.2. Médicamentabilité, biodisponibilité et pharmacocinétique du Tébuconazole :

Le tébuconazole présente un profil de médicamentabilité conforme aux critères de la Règle de Lipinski (absence de violations), suggérant une biodisponibilité orale potentiellement optimisée. Son score de biodisponibilité de 0,55 reflète une absorption systémique modérée, corroborée par une absorption gastro-intestinale élevée. La perméabilité à la barrière hémato-encéphalique (BHE/BBB) est avérée, ce qui pourrait expliquer partiellement sa neurotoxicité rapportée. Bien qu'il ne soit pas un substrat de la glycoprotéine P (P-gp), sa capacité à inhiber les isoformes CYP1A2, CYP2C19 et CYP2D6 soulève un risque significatif d'interactions médicamenteuses, tandis que l'absence d'inhibition des CYP2C9 et CYP3A4 limite certains effets indésirables métaboliques. La perméabilité cutanée, évaluée par un log Kp de -5,55 cm/s, reste faible, réduisant le risque d'exposition transdermique. Enfin, son accessibilité synthétique (2,81) indique une faisabilité de production, malgré les défis toxicologiques associés à sa structure (**Tableau 21**).

**Tableau 20** : Propriétés physicochimiques et lipophilie.

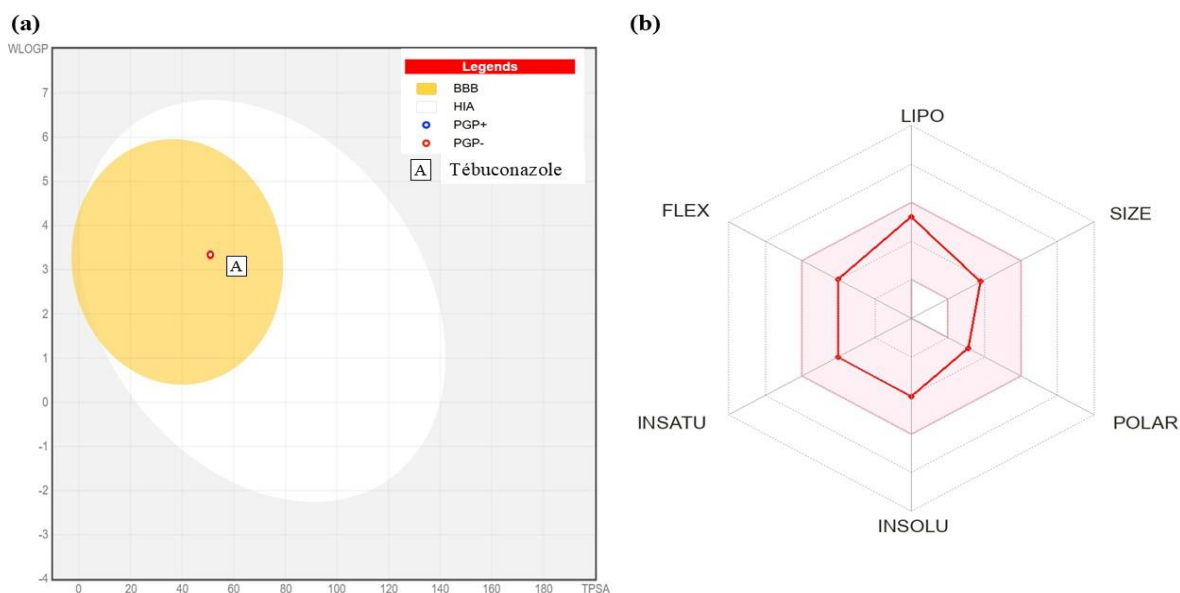
Propriété	Valeur	Unité
Masse moléculaire	307.82	g/mol
Nombre d'atomes lourds	21	-
Atomes lourds aromatiques	11	-
Fraction Csp <sup>3</sup>	0.50	-
Liaisons rotatives	6	-
Accepteurs de liaisons H	3	-
Donneurs de liaisons H	1	-
Réfractivité molaire	85.37	-
TPSA	50.94	Å <sup>2</sup>
Consensus Log Log Po/w	3.23	-

**Tableau 21** : Médicamentabilité, biodisponibilité et pharmacocinétique.

Propriété	Valeur
Règle de Lipinski	Oui
Score de biodisponibilité	0.55
Absorption gastro-intestinale	Haute
Perméabilité BHE (BBB)	Oui
Substrat P-gp	Non
Inhibiteur CYP1A2	Oui
Inhibiteur CYP2C19	Oui
Inhibiteur CYP2C9	Non
Inhibiteur CYP2D6	Oui
Inhibiteur CYP3A4	Non
Log Kp (cm/s)	-5.55
Accessibilité synthétique	2.81

### 4.2.3. Test de Bioavailability Radar et BOILED-Egg du Tébuconazole

Le fongicide tébuconazole présente un profil pharmacocinétique et physicochimique marqué par une lipophilicité modérée (WLOGP), une perméabilité à la barrière hémato-encéphalique (BHE) et une absorption intestinale humaine (HIA) efficace, sans interaction significative avec la P-glycoprotéine (PGP-) (**Figure 38a**). Son analyse structurale révèle une flexibilité moléculaire (FLEX), une taille modérée (SIZE), un degré d'insaturation limité (INSATU) et une polarité intermédiaire (POLAR), caractéristiques compatibles avec une biodisponibilité optimisée (**Figure 38b**).



**Figure 38** : Prédiction des propriétés physicochimiques, pharmacocinétiques et d'absorption du Tébuconazole : (a) Graphique de perméabilité membranaire (BBB, HIA, PGP) selon WLOGP et TPSA ; (b) Profil radar illustrant les paramètres ADMET. Prédiction des propriétés Toxicocinétiques du Tébuconazole.

Les propriétés pharmacocinétiques du tébuconazole révèlent plusieurs aspects importants qui influencent son efficacité thérapeutique et son profil toxicologique. En termes de métabolisme hépatique, le tébuconazole est principalement métabolisé par les isoformes du cytochrome P450, notamment CYP3A4 et CYP2C9. Cette métabolisation permet une élimination efficace du composé et réduit le risque d'accumulation dans l'organisme, ce qui est un facteur crucial pour limiter les effets toxiques potentiels, en particulier lors d'expositions prolongées (**Habenschus et al., 2019**). De plus, les études sur l'extraction hépatique montrent que le tébuconazole présente un effet de premier passage hépatique négligeable, avec des taux d'extraction relativement faibles (2,7–25 %), ce qui signifie que la majorité du composé atteint

la circulation systémique après administration orale, facilitant ainsi son efficacité thérapeutique tout en réduisant les risques de métabolisme initial excessif (**Habenschus et al., 2019**).

Sur le plan des propriétés physicochimiques, le tébuconazole présente une lipophilicité modérée, favorisant une absorption intestinale efficace, similaire à d'autres fongicides triazolés. Cependant, cette lipophilicité modérée limite sa capacité à traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE), ce qui réduit son potentiel de toxicité neurologique, en comparaison avec des composés plus lipophiles qui sont plus susceptibles de pénétrer dans le cerveau (**Habenschus et al., 2019 ; Leite et al., 2024**). Cette caractéristique confère au tébuconazole un avantage en termes de sécurité neurologique par rapport à d'autres fongicides dont la perméabilité à la BHE est plus élevée.

La comparaison avec d'autres fongicides triazolés révèle des profils pharmacocinétiques similaires, notamment en ce qui concerne la lipophilicité modérée, la bonne absorption intestinale, et la métabolisation par le cytochrome P450. Toutefois, des différences notables existent dans la diversité des voies métaboliques et la rapidité de dissipation des fongicides, ce qui peut influencer la biodisponibilité et le risque d'accumulation du composé dans le corps. En particulier, des fongicides ayant une métabolisation plus limitée présentent un risque plus élevé d'accumulation, contrairement au tébuconazole qui bénéficie de multiples voies métaboliques réduisant ce risque (**Cui et al., 2018**).

#### 4.2.4. Préviation des propriétés Toxicocinétiques du tébuconazole :

Le tébuconazole présente un profil toxicologique caractérisé par une absence de mutagénicité (test AMES négatif). Cependant, il montre une hépatotoxicité marquée (résultat positif), nécessitant une vigilance accrue quant à ses effets hépatiques lors d'expositions prolongées. La dose maximale tolérée chez l'humain est estimée à 0,598 log mg/kg/jour, tandis que la toxicité aiguë chez le rat ( $LD_{50} = 2,332$  mol/kg) et la toxicité chronique (LOAEL = 1,516 log mg/kg/jour) indiquent un seuil de toxicité modéré. Aucun risque de sensibilisation cutanée n'est détecté (**Tableau 22**).

**Tableau 22** : Caractéristiques Toxicologiques et Prédications de Valeurs du Modèle Chimique tébuconazole.

Propriété	Valeur Prédite	Unité
Toxicité AMES	Non	Catégorielle (Oui/Non)
Dose maximale tolérée (humain)	0,598	Numérique (log mg/kg/jour)
Toxicité aiguë orale rat (LD <sub>50</sub> )	2,332	Numérique (mol/kg)
Toxicité chronique orale rat (LOAEL)	1,516	Numérique (log mg/kg, pc/jour)
Hépatotoxicité	Oui	Catégorielle (Oui/Non)
Sensibilisation cutanée	Non	Catégorielle (Oui/Non)

Le tébuconazole, fongicide triazole largement utilisé, présente une toxicité aiguë modérée pour les organismes aquatiques, avec des valeurs de CL<sub>50</sub> variant de 1,1 à 4,8 mg/L chez les poissons après 96 heures d'exposition, supérieures à celles de la bifenthrine (0,013–0,41 mg/L) (Wang *et al.*, 2021 ; Tofan *et al.*, 2023). Cette variabilité interspécifique souligne l'importance des facteurs biologiques dans l'évaluation des risques. *Daphnia magna* montre une sensibilité accrue (CE<sub>50</sub> = 2,37 mg/L), tandis que les crustacés benthiques présentent une toxicité notable par voie alimentaire (CL<sub>50</sub> = 200 mg/kg) (Tofan *et al.*, 2023 ; Gu *et al.*, 2023).

En contexte chronique, le tébuconazole s'accumule préférentiellement dans le foie, induisant des lésions histopathologiques (hypertrophie, stéatose), un stress oxydatif et des perturbations des enzymes métaboliques, caractéristiques des triazoles mais exacerbées par son action sur la peroxydation lipidique et l'apoptose (Ku *et al.*, 2021 ; Leite *et al.*, 2024). Ces effets hépatotoxiques s'accompagnent de dysfonctionnements immunitaires, neurologiques et endocriniens, bien que leur intensité varie selon les analogues structuraux (Li *et al.*, 2022 ; Freitas *et al.*, 2021). Des modèles toxicocinétiques révèlent une sous-estimation des concentrations hépatiques, nécessitant une réévaluation des risques lors d'expositions prolongées (Jónsdóttir *et al.*, 2016).

Au-delà du foie, le tébuconazole altère la fonction cognitive via la perturbation de l'axe intestin-cerveau et du microbiote intestinal (Ku *et al.*, 2023), et compromet le métabolisme cardiaque en réduisant la production d'ATP et l'utilisation des substrats énergétiques (Ku *et al.*, 2022). Bien que les procédés industriels (ex. malterie, cuisson) réduisent significativement sa

présence dans les denrées alimentaires (Hrynko *et al.*, 2023), une vigilance accrue est requise pour les expositions chroniques à faible dose, où les seuils de risque aigu ne s'appliquent pas.

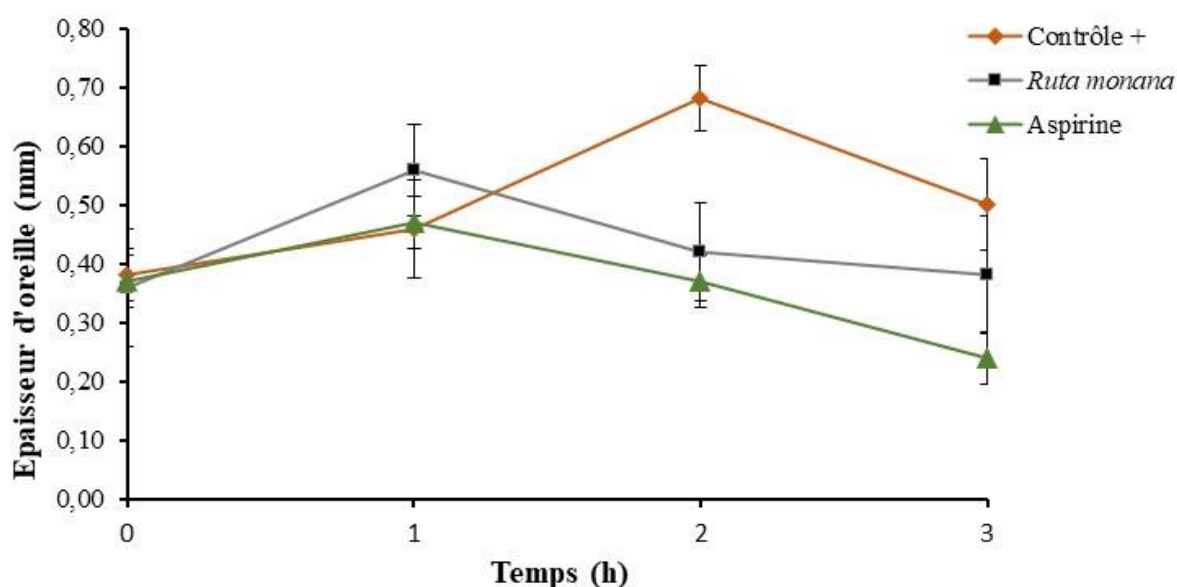
Les composés phytochimiques de *Ruta montana*, comprenant des acides phénoliques (protocatéchique, p-coumarique) et des flavonoïdes (lutéoline, hétérosides), réduisent la toxicité du tébuconazole par des mécanismes synergiques : (1) Leur activité antioxydante neutralise le stress oxydatif causé par le fongicide, protégeant ainsi les hépatocytes et les neurones des dommages lipidiques et de l'ADN ; Ils modulent les enzymes de détoxification (induction des glutathion S-transférases) tout en inhibant de manière compétitive les isoformes CYP450 (CYP1A2, CYP2D6), diminuant la formation de métabolites réactifs hépatotoxiques ; Les hétérosides (hespéridine, isoquercitrine), substrats de la P-glycoprotéine, facilitent l'efflux du tébuconazole, limitant son accumulation systémique ; Les composés à faible polarité (hydroxybenzaldéhyde, vanilline) stabilisent la barrière hémato-encéphalique en inhibant l'inflammation, réduisant ainsi sa perméabilité neurotoxique. Ces interactions, associées à la compétition pour les liaisons hydrophobes (diminution du Log P effectif), réajustent le métabolisme hépatique et favorisent l'excrétion rénale, constituant une approche phytoremédiatrice multifactorielle.

#### 4.3. Effet anti-inflammatoire de l'extrait de *Ruta montana* :

Dans le cadre de notre étude, l'objectif était également d'analyser l'effet anti-inflammatoire de l'extrait hydro-éthanolique de la plante *Ruta montana*, tout en cherchant à corroborer les propriétés thérapeutiques déjà établies de cette plante en médecine traditionnelle, en particulier en ce qui concerne son administration par voie orale. Pour évaluer cette activité, un modèle d'inflammation aiguë a été induit *in vivo* chez des rats. Ces modèles incluaient spécifiquement l'induction d'un œdème auriculaire à l'aide de xylène. Le potentiel analgésique du *Ruta montana* a été examiné en détail à l'aide d'une méthode expérimentale appelée test de l'immersion de la queue. Cette méthode implique l'immersion de la queue d'un animal de laboratoire dans une solution afin d'évaluer l'effet analgésique du *Ruta montana*. L'évaluation de l'effet anti-inflammatoire de *Ruta montana* a été réalisée en mesurant l'épaisseur de l'oreille à différents temps après l'induction d'un œdème par le xylène.

### 4.3.1. Effet de *Ruta montana* sur l'œdème de l'oreille induit par le xylène :

Les manifestations typiques de l'inflammation aiguë induite par le xylène comprennent l'érythème, la chaleur, l'œdème et la douleur (Scheen, 2022). Par conséquent, la quantification de l'œdème s'avère être un moyen efficace d'évaluer l'inflammation cutanée provoquée par le xylène. La mesure de l'épaisseur de l'oreille de chaque rat est effectuée à l'aide d'un micromètre numérique. Avant toute intervention, il convient de noter que l'épaisseur de l'oreille est d'environ 0,4 mm, ce qui est établi comme le paramètre de contrôle positif pour cette étude. L'application du xylène provoque une inflammation marquée, atteignant son maximum après 90 minutes, avec une épaisseur de  $0,68 \pm 0,0583$  mm. L'œdème commence ensuite à diminuer progressivement, atteignant  $0,50 \pm 0,0316$  mm après 2 heures.



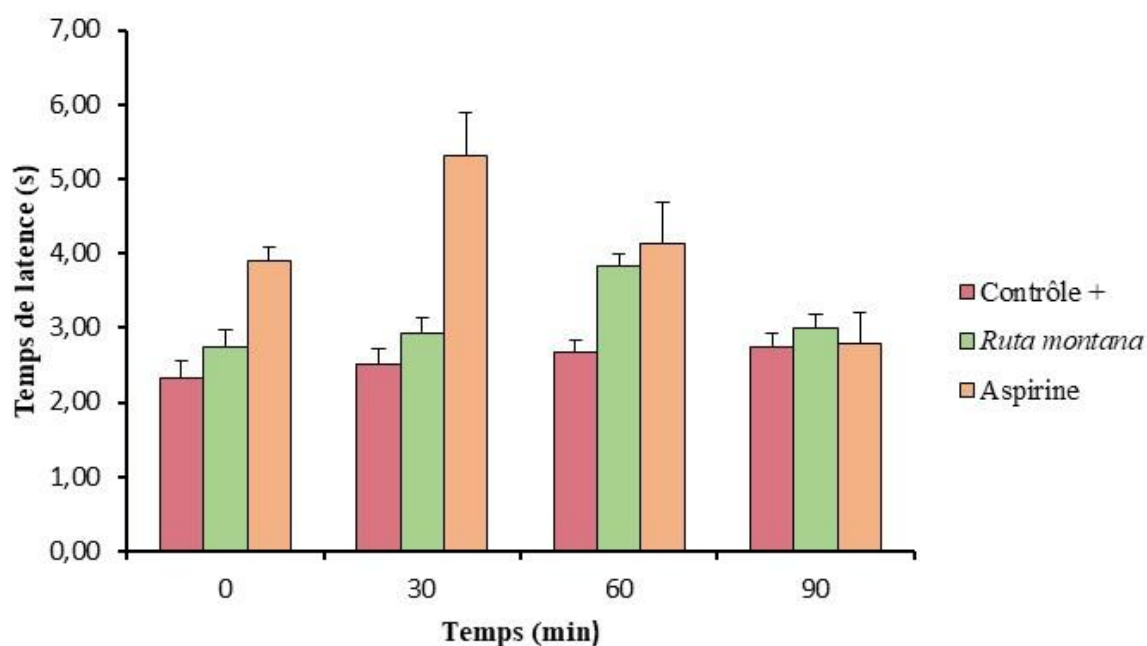
**Figure 39** : Évolution de l'épaisseur de l'oreille suite à l'œdème induit par le xylène après administration orale de la solution de *Ruta montana* en fonction du temps. Les résultats sont présentés en moyenne  $\pm$  SEM pour  $n=7$ .

Les rats ayant reçu un traitement oral avec *Ruta montana* à une dose de 100 mg/kg ont présenté une réduction significative de l'œdème de l'oreille. En effet, après 60 minutes, l'épaisseur atteint  $0,56 \pm 0,0245$  mm, mais elle diminue ensuite de manière marquée à 90 minutes (**Figure 39**), atteignant  $0,42 \pm 0,0374$  mm, soit une réduction de 38,23% ( $p < 0,05$ ). Après 2 heures, l'effet anti-inflammatoire de *Ruta montana* continue, avec une épaisseur de  $0,38 \pm 0,02$  mm, correspondant à une inhibition de 24%. Les rats traités avec l'aspirine présentent une réduction plus rapide et plus marquée de l'inflammation. Après 1 heure,

l'épaisseur atteint 0,50 mm, soit une diminution précoce par rapport au contrôle. À 2 heures, l'effet est plus net (0,42 mm), et après 3 heures, l'épaisseur descend à 0,30 mm, soit une réduction significative ( $p < 0,01$ ).

#### 4.3.2. Evaluation de l'activité analgésique de de l'extrait *Ruta montana* :

Une évaluation de l'effet analgésique de *Ruta montana* a été effectuée à l'aide d'un test d'immersion de la queue. Ce test est basé sur la réponse réflexe de retrait de la queue face à un stimulus thermique nociceptif. Plonger la queue du rat dans de l'eau chaude provoque une réaction soudaine de retrait, pour laquelle le temps de latence est enregistré individuellement pour chaque animal. Un accroissement notable du délai de réaction témoigne de l'effet analgésique de la substance en question.



**Figure 40** : Effet analgésique de *Ruta montana* par administration orale suite au test de l'immersion de queue. Les résultats sont présentés en moyenne  $\pm$  SEM pour  $n = 7$ . (\*\*) Si  $p < 0,01$ , (\*) si  $p < 0,05$  par rapport au control (+) (test de student).

Lors de l'immersion de la queue des rats témoins (Contrôle), le temps de réaction initial était relativement court, environ 2,33 secondes (**Figure 40**). Les rats traités avec l'extrait de *Ruta montana* à une dose de 100 mg/kg ont montré une augmentation progressive du temps de latence, indiquant un effet analgésique. Après 60 minutes, cet effet atteint son maximum avec un temps de réaction de 4,0 secondes, soit une augmentation significative par rapport au contrôle ( $p < 0,05$ ). Après 90 minutes, l'effet diminue légèrement, mais reste toujours supérieur

au groupe contrôle avec une latence de 3,2 secondes, indiquant une atténuation progressive de l'effet analgésique.

Les rats traités avec l'aspirine montrent un effet analgésique plus rapide et plus marqué (**Figure 31**). Dès 30 minutes, le temps de réaction atteint 5,5 secondes, soit une augmentation très significative ( $p < 0,01$ ) par rapport au contrôle et au groupe *Ruta montana*. Cet effet diminue progressivement après 60 minutes, mais reste supérieur aux autres groupes, avec un temps de latence d'environ 4,2 secondes. Après 90 minutes, l'effet de l'aspirine continue à diminuer, atteignant une latence similaire au groupe *Ruta montana* (3,3 secondes), indiquant une atténuation progressive de son action analgésique.

L'effet anti-inflammatoire de *Ruta montana* observé dans cette étude, mesuré par la réduction de l'œdème auriculaire induit par le xylène, est en accord avec des travaux antérieurs. Par exemple, **Bousselsela et al. (2022)** ont étudié les effets anti-inflammatoires de *Marrubium vulgare* L. et *Marrubium deserti*, deux espèces médicinales de la région algérienne. Ces plantes ont montré une réduction significative de l'œdème, attribuée à leurs composés bioactifs, en particulier les flavonoïdes et les phénols, qui partagent des structures similaires à celles présentes dans *Ruta montana*. De manière similaire, notre étude a observé une diminution significative de l'épaisseur de l'oreille des rats traités avec l'extrait de *Ruta montana* (100 mg/kg), soutenant l'idée que les composés phénoliques et flavonoïdes de cette plante pourraient jouer un rôle clé dans son activité anti-inflammatoire (**Bousselsela et al., 2022**).

L'effet anti-inflammatoire de *Ruta montana* a aussi été corroboré par les résultats de **Atta et Alkofahi . (1998)**, qui ont démontré les effets anti-inflammatoires d'autres plantes médicinales jordaniennes. Ces études confirment que *Ruta montana* pourrait partager des mécanismes d'action communs avec d'autres espèces végétales utilisées dans les pratiques traditionnelles pour le traitement des inflammations.

L'effet analgésique de *Ruta montana* observé dans cette étude est également soutenu par des résultats antérieurs. En effet, l'augmentation significative du temps de latence dans le test d'immersion de la queue, est comparable aux travaux de **Tidou et al. (2024)**, qui ont démontré un effet analgésique similaire avec les extraits hydroéthanoliques de *Nephrolepis bisserata* et *Clerodendrum splendens*. Dans ces études, les extraits végétaux ont modifié la réponse nociceptive chez la souris, probablement en modifiant l'interaction avec les récepteurs opioïdes ou en réduisant le stress oxydatif (**Tidou et al., 2024**). Les résultats de cette étude suggèrent que les effets anti-inflammatoires et analgésiques de *Ruta montana* pourraient être attribués à

plusieurs mécanismes biologiques. Premièrement, les flavonoïdes et alcaloïdes présents dans cette plante pourraient inhiber la production de médiateurs pro-inflammatoires tels que les prostaglandines et réduire le stress oxydatif (Scheen, 2022). Les flavonoïdes, en particulier, sont bien connus pour leurs propriétés antioxydantes et peuvent neutraliser les radicaux libres produits lors des processus inflammatoires. De plus, l'effet anti-inflammatoire de *Ruta montana* pourrait être médié par l'inhibition des enzymes telles que la cyclooxygénase-2 (COX-2), qui est responsable de la production des prostaglandines inflammatoires (Bousselsela et al., 2022).

Concernant l'effet analgésique, il est plausible que *Ruta montana* exerce son action en modulant les récepteurs opioïdes endogènes, comme l'ont suggéré les travaux de Tidou et al. (2024) pour d'autres extraits végétaux. Ce mécanisme pourrait être renforcé par l'inhibition des canaux ioniques impliqués dans la transmission nociceptive, réduisant ainsi la perception de la douleur. Les résultats obtenus pour *Ruta montana* s'inscrivent dans un cadre plus large de recherche sur les plantes médicinales aux effets anti-inflammatoires et analgésiques. Des études antérieures sur des espèces comme *Marrubium vulgare* L. et *Nephrolepis bisserata* ont démontré des effets similaires dans des tests expérimentaux sur l'inflammation et la douleur. Par exemple, *Marrubium vulgare* a montré une réduction de l'œdème auriculaire induit par le xylène (Bousselsela et al., 2022), et *Nephrolepis bisserata* a induit une prolongation du temps de latence dans des tests thermiques (Tidou et al., 2024). Ces similitudes suggèrent que les composés bioactifs présents dans ces plantes partagent des cibles moléculaires communes et des mécanismes d'action similaires comme la Rutine qui est un flavonoïde bien documenté pour son activité anti-inflammatoire. Elle agit en inhibant les enzymes pro-inflammatoires telles que la cyclooxygénase-2 (COX-2) et la lipoxigénase (LOX), réduisant ainsi la production de prostaglandines et leucotriènes (Middleton et al., 2000) et elle possède également des propriétés antioxydantes qui neutralisent les espèces réactives de l'oxygène (ROS), limitant ainsi le stress oxydatif associé à l'inflammation.

La quercétine réduit l'expression des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 en modulant les voies NF- $\kappa$ B et MAPK (Boots et al., 2008) et Elle inhibe également la migration des leucocytes vers les sites inflammatoires. Dans le cadre de l'étude sur *Ruta montana*, l'effet anti-inflammatoire observé lors du test d'œdème auriculaire induit par le xylène peut être partiellement attribué à la présence d'hespéridine. L'extrait méthanolique a réduit significativement l'œdème (38,23 % après 90 minutes), ce qui est cohérent avec les mécanismes anti-inflammatoires connus de ce flavonoïde. L'hespéridine détecté dans notre étude agit en réduisant la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  et l'IL-6

**(Ginwala et al., 2019)**. En modulant leur expression, l'hespéridine contribue à atténuer les symptômes inflammatoires. Cette molécule inhibe également les enzymes cyclooxygénase-2 (COX-2) et lipoxygénase (LOX), responsables de la production de prostaglandines et leucotriènes pro-inflammatoires **(Kim et al., 1999)**. Cette inhibition réduit les manifestations typiques de l'inflammation, telles que l'œdème, la douleur et la rougeur. Elle agit également sur les canaux ioniques impliqués dans la transmission nociceptive, tels que TRPV1, réduisant ainsi la sensibilité aux stimuli douloureux **(García-Lafuente et al., 2009)**.



# *Conclusion et Perspectives*

## Conclusion et Perspectives

L'objectif de cette étude était d'évaluer le potentiel phytochimique et biologique de *Ruta montana*, en explorant ses composés bioactifs, ses activités antioxydantes, antimicrobiennes et enzymatiques *in vitro*, ainsi que ses effets protecteurs contre la toxicité induite par le tébuconazole (TBC) *in vivo* sur rats Wistar mâle. Parallèlement, des modélisations *in silico* ont été réalisées pour prédire les propriétés pharmacocinétiques et toxicologiques des composés identifiés. Les résultats obtenus permettent de tirer les conclusions suivantes :

### ❖ Analyse phytochimique :

- L'extrait éthanolique de *R. montana* présente un rendement d'extraction de 11,994 %, comparable aux études antérieures.
- Des teneurs significatives en polyphénols totaux ( $3,31 \pm 0,04$  mg EAG/g ES), flavonoïdes ( $3,35 \pm 0,10$  mg EQ/g ES) et tanins ( $1,61 \pm 0,004$  mg EAT/g ES) ont été identifiées.
- La chromatographie LC-MS/MS a révélé la présence de 9 composés phénoliques majeurs, dont l'héspéridine (22,87 mg/g), la lutéoline et l'acide protocatéchique, connus pour leurs propriétés bioactives.

### ❖ Activités biologiques *in vitro* :

- Une activité antioxydante remarquable a été observée, avec des valeurs  $IC_{50}$  de 0,126 mg/mL (DPPH) et 0,104 mg/mL (ABTS), supérieures à certains standards synthétiques (BHA, BHT).
- L'extrait montre une activité antimicrobienne dose-dépendante, notamment contre *Escherichia coli* (ZI = 18,5 mm) et *Klebsiella pneumoniae* (ZI = 19 mm).
- Une inhibition modérée de l'acétylcholinestérase ( $IC_{50} = 198,5$  µg/mL) a été notée, suggérant un potentiel contre les troubles neurodégénératifs.

### ❖ Modélisation *in silico* :

- Les composés identifiés (héspéridine, lutéoline) respectent majoritairement les critères de *drug-likeness*, avec une *absorption gastro-intestinale élevée* pour les acides phénoliques.
- La prédiction toxicologique indique une absence de mutagénicité et une hépatotoxicité faible pour la plupart des composés de l'extrait éthanolique.
- Le tébuconazole présente un risque hépatotoxique et neurotoxique, atténué par la co-administration de *R. montana* via des mécanismes antioxydants et anti-inflammatoires.

## Conclusion et Perspectives

### ❖ Effets *in vivo* contre la toxicité du tébuconazole :

- *R. montana* atténue les perturbations hématologiques (anémie, thrombopénie) et hépatiques (réduction des AST/ALT de 360,4 à 108,7 U/L).
- Une protection rénale est observée via la normalisation de la créatinine (5,8 à 6,9 mg/L) et de l'urée (0,47 à 0,30 g/L).
- La plante restaure la fonction reproductive : augmentation du poids testiculaire (4,05 à 5,43 g), amélioration de la vitalité spermatique (57,8 % à 85,2 %) et modulation hormonale (baisse de la FSH/LH).
- Les analyses histologiques confirment une réduction des lésions hépatiques (stéatose), rénales (nécrose tubulaire) et testiculaires (désorganisation des tubules).


### ❖ Activités anti-inflammatoire et analgésique :

- *R. montana* réduit l'œdème auriculaire induit par le xylène de 38,23 % après 90 minutes.
- Un effet analgésique significatif est noté via le test d'immersion de la queue, avec un temps de latence accru de 2,33 à 4,0 secondes.

### Perspectives

Les résultats ouvrent des voies prometteuses pour des applications thérapeutiques et agroenvironnementales. Les perspectives incluent :

- ❖ Identification approfondie des mécanismes moléculaires des composés actifs (hespéridine, lutéoline) dans la modulation du stress oxydatif et de l'inflammation.
- ❖ Études cliniques préliminaires pour valider l'efficacité et la sécurité de *R. montana* dans le traitement des troubles hépatiques, rénaux et reproductifs.
- ❖ Développement de formulations phytopharmaceutiques combinant *R. montana* à des agents chélateurs (Capturant de métaux) pour réduire la bioaccumulation des pesticides.
- ❖ Évaluation de l'impact écologique de *R. montana* comme agent de phytoremédiation dans les sols contaminés par des fongicides.



*Références  
bibliographiques*

### A

- Abdollahi, M., Ranjbar, A., Shadnia, S., Nikfar, S., & Rezaie, A. (2004).** Pesticides and oxidative stress: A review. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 10(6), RA141–RA147.
- Abolhasanzadeh, Z., Ashrafi, H., Badr, P., & Azadi, A. (2017).** Traditional neurotherapeutics approach intended for direct nose to brain delivery. *Journal of Ethnopharmacology*, 209, 116–123. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.07.026>
- Abu-Serie, M., et Habashy, N. (2020).** *Vitis vinifera* polyphenols from seedless black fruit act synergistically to suppress hepatotoxicity by targeting necroptosis and pro-fibrotic mediators. *Scientific Reports*, 10, Article 59489. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59489-z>
- Asgharian, S., Hojjati, M. R., Ahrari, M., Bijad, E., Deris, F., & Lorigooini, Z. (2020).** *Ruta graveolens* and rutin, as its major compound, investigating their effect on spatial memory and passive avoidance memory in rats. *Pharmaceutical Biology*, 58(1), 447–453. <https://doi.org/10.1080/13880209.2020.1762669>
- Ajoy, G., & Padma, C. (2013).** Brine shrimp cytotoxic activity of 50% alcoholic extract of *Croton bonplandianum* Baill. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 6(2), 40–41.
- Ali, W. K., Ihoual, S., & Abidli, N. (2016).** Antioxidant and MDR reversal activity in resistant human ovarian cancer cells of methanolic extract from *Ruta montana* located in the North of Algeria. *Der Pharma Chemica*, 8(12), 215–223.
- Ali, Y. A., Soliman, H. A., Abdel-Gabbar, M., Ahmed, N. A., Attia, K. A. A., & Shalaby, F. M. (2023).** Rutin and hesperidin revoke the hepatotoxicity induced by paclitaxel in male Wistar rats via their antioxidant, anti-inflammatory, and antiapoptotic activities. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2023, Article 2738351. <https://doi.org/10.1155/2023/2738351>
- Al-Jaberi, A. M. Z., Al-Fadal, S. A. M., Abdul-Jalil, T. Z., & Al-Wafi, H. (2023).** HPLC isolation of rutin, hesperidin, and quercetin from *Ruta chalepensis* extract growing in Iraq. *Pharmacognosy Journal*, 15(4), 606–611. <https://doi.org/10.5530/pj.2023.15.127>
- Allouni, R. (2018).** Etude des aspects morphologique, phytochimique et pharmacotoxicologique de la plante *Ruta montana*. (Thèse de doctorat en sciences). Département de biochimie, Faculté des sciences de la nature et de la vie, Université Ferhat Abbas Sétif 1. p. 71.
- Allouni, R., Guergour, H., Mahdeb, N., Omrane, V., & Bouzidi, A. (2017).** Acute toxicity study of the total alkaloids of *Ruta montana* in male mice. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 9(8), 1060–1066. <https://doi.org/10.25258/phyto.v9i08.9612>
- Almahdi, M. A., Emhemmed, M. B., Mariam, M. I., & Nuzha, T. G. (2016).** Prevalence of anemia and its association with renal function in diabetic patients from south of Libya. *Libyan Journal of Medical Research*, 10(1), 47–51.

- Al-Sabaawy, H., Rahawi, A., & Al-Mahmood, S. (2021).** Standard techniques for formalin-fixed paraffin-embedded tissue: A Pathologist's perspective. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*. <https://doi.org/10.33899/ijvs.2021.131918.2023>
- Al-Shemery, M. K., AL-Masaoodi, R. A., Khudheyer, F. Y., & Hassan, S. M. (2022).** The concentration of GDF-15 is related to the incidence of heart failure. *European Chemical Bulletin*, 11(5). <https://doi.org/10.31838/ecb/2022.11.05.002>
- Anderson, R., Mueller, R., Reese, S., & Wehner, A. (2017).** Evaluation of an automated enzyme-linked fluorescent assay for thyroxine measurement in cat and dog sera. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 29(3), 278–286. <https://doi.org/10.1177/1040638717696442>
- Andrés, C. M. C., Pérez de la Lastra, J. M., Juan, C. A., Plou, F. J., Pérez-Lebeña, E., et. Fintelman, E. (2024).** Antioxidant metabolism pathways in vitamins, polyphenols, and selenium: Parallels and divergences. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(5), Article 2600. <https://doi.org/10.3390/ijms25052600>
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., & Karademir, S. E. (2004).** Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine (CUPRAC method). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7970–7981. <https://doi.org/10.1021/jf048741x>
- Arfat, Y., Mahmood, N., Tahir, M. U., Rashid, M., Anjum, S., Zhao, F., Sun, F. (2014).** Effect of imidacloprid on hepatotoxicity and nephrotoxicity in male albino mice. *Toxicology Reports*, 1, 554–561.
- Atta, A., & Alkofahi, A. (1998).** Antinociceptive and anti-inflammatory effects of some Jordanian medicinal plant extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 60(2), 117–124. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00106-6](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00106-6)
- Awe, E. O., & Banjoko, S. O. (2013).** Biochemical and haematological assessment of toxic effects of the leaf ethanol extract of *Petroselinum crispum* (Mill) Nyman ex A.W. Hill (parsley) in rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13, Article 75. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-75>
- Awwad, M. M., Taha, S. M., Khalil, M. M. H., Salem, A. M., & Chovelon, J.-M. (2023).** The simultaneous degradation of prochloraz and tebuconazole in water with monitoring their degradation products using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(35), 83810–83820. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-28240-2>
- Aye, M., Aung, H., Sein, M., & Armijos, C. (2019).** A Review on the Phytochemistry, Medicinal Properties and Pharmacological Activities of 15 Selected Myanmar Medicinal Plants. *Molecules*, 24(2), 293. <https://doi.org/10.3390/molecules24020293>.

## B

Barbouchi, M., Benzidia, B., Elamrani, K., Sabiri, M., El Idrissi, M., & Choukrad, M. (2024). Phytochemical screening, quantitative analysis and antioxidant properties of crude extracts from stems, leaves, and flowers of three *Ruta* species. *Kuwait Journal of Science*, 51, 100287. <https://doi.org/10.1016/j.kjs.2024.100287>

Barron Cuenca, J., de Oliveira Galvão, M. F., Endirlik, B. Ü., Tirado, N., & Dreij, K. (2022). In vitro cytotoxicity and genotoxicity of single and combined pesticides used by Bolivian farmers. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 63(1), 4–17. <https://doi.org/10.1002/em.22477>

Bejaoui, Y., Abderrabba, M., & Ayadi, S. (2019). Biological study from *Ruta* plants extracts growing in Tunisia. *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 38(2), 85–89. <https://doi.org/10.30492/ijcce.2019.37124>

Belarmino, T., Caldas, I. S., Paula, F. R., Rodrigues, C. C., Carvalho, D. T., & Dias, D. F. (2019). Synthesis, activity, and molecular modeling studies of 1,2,3-triazole derivatives from natural phenylpropanoids as new trypanocidal agents. *Chemical Biology & Drug Design*, 95(1), 124–129. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13628>

Ben Saad, H., Ben Abdallah, F., Bkhairia, I., Boudawara, O., Nasri, M., Hakim, A., & Ben Amara, I. (2020). Efficacy of essential trace elements supplementation on mineral composition, sperm characteristics, antioxidant status, and genotoxicity in testis of tebuconazole-treated rats. *Biomedical and Environmental Sciences*, 33(10), 760–770.

Ben Saad, H., Feki, A., Boudawara, O., Hakim, A., & Ben Amara, I. (2017). Effects of selenium on tebuconazole-induced hepatotoxicity in adult rats. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(6), 105–109.

Benali, T., Habbadi, K., Khabbach, A., Marmouzi, I., Zengin, G., Bouyahya, A., ... Hammani, K. (2020). GC–MS analysis, antioxidant and antimicrobial activities of *Achillea odorata* subsp. *pectinata* and *Ruta montana* essential oils and their potential use as food preservatives. *Foods*, 9(5), Article 668. <https://doi.org/10.3390/foods9050668>

Benítez, G., González-Tejero, M. R., & Molero-Mesa, J. (2012). Knowledge of ethnoveterinary medicine in the Province of Granada, Andalusia, Spain. *Journal of Ethnopharmacology*, 139(2), 429–439. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.11.029>

Benkhaira, N., Koraichi, I., & Fikri-Benbrahim, K. (2022). *Ruta montana* (L.) L.: An insight into its medicinal value, phytochemistry, biological properties, and toxicity. *Journal of Herbmed Pharmacology*, 11(3), 305–319. <https://doi.org/10.34172/jhp.2022.36>

Benkiki, N., Benkhaled, M., Kabouche, Z., & Bruneau, C. (2002). Heraclenol and isopimpinellin: Two rare furocoumarins from *Ruta montana*. In Şener, B. (Ed.), *Biodiversity* (pp. 303–307). Springer, Boston, MA. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9242-0\\_36](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9242-0_36)

Ben Othmène, Y., Monceaux, K., Karoui, A., Salem, I., Belhadef, A., Abid-Essefi, S., & Lemaire, C. (2020). Tebuconazole induces ROS-dependent cardiac cell toxicity by activating DNA damage and mitochondrial apoptotic pathway. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 204, Article 111040. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111040>

- Ben Othmène, Y., Salem, I., Hamdi, H., Annabi, E., & Abid-Essefi, S. (2021).** Tebuconazole induced cytotoxic and genotoxic effects in HCT116 cells through ROS generation. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 174, Article 104797. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2021.104797>
- Ben Othmène, Y., Monceaux, K., Belhadef, A., Karoui, A., Ben Salem, I., Boussabbeh, M., Abid-Essefi, S., & Lemaire, C. (2022).** Triazole fungicide tebuconazole induces apoptosis through ROS-mediated endoplasmic reticulum stress pathway. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 94, 103919. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2022.103919>
- Berrouague, S., Rouag, M., Khaldi, T., Boumendjel, A., Boumendjel, M., & Taibi, F. (2019).** Efficacy of *Allium sativum* oil to alleviate tebuconazole-induced oxidative stress in the liver of adult rats. *Cellular and Molecular Biology*, 65(8), 23–31. <https://doi.org/10.14715/cmb/2019.65.8.5>
- Betancourt, M., Reséndiz, A., & Reyna Fierro, E. C. (2006).** Effect of two insecticides and two herbicides on the porcine sperm motility patterns using computer-assisted semen analysis (CASA) in vitro. *Reproductive Toxicology*, 22, 508–512. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2006.03.001>
- 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>
- Boots, A. W., Haenen, G. R. M. M., & Bast, A. (2008).** Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *European Journal of Pharmacology*, 585(2–3), 325–337.
- Bouhenna, M., Bendif, H., Segueni, N., Khalfa, H., Djadoudi, A., Tahraoui, S., ... Rebbas, K. (2023).** Phytochemical profiling, LC-MS analyses, cytotoxicity, antioxidant, and antimicrobial activities of *Ruta montana*: An ethnomedicinally important plant in Algeria. *Current Bioactive Compounds*, 20(4), 90–99. <https://doi.org/10.2174/1573407219666230606140634>
- Bošković, N., Bílková, Z., Šudoma, M., Bielská, L., Škulcová, L., Ribitsch, D., & Hofman, J. (2021).** Conazole fungicides epoxiconazole and tebuconazole in biochar amended soils: Degradation and bioaccumulation in earthworms. *Chemosphere*, 274, 129700. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129700>
- Bouzana, A., Chekroud, Z., Becheker, I., Sakhraoui, N., Bouzenad, N., & Bensouici, C. (2023).** Phytochemical analysis by LC-MS/MS and *in vitro* antioxidant activity of the Algerian endemic plant *Dianthus sylvestris* subsp. *aristidis* (Batt.) Greuter & Burdet. *Global NEST Journal*, 25(7), 113–119. <https://doi.org/10.30955/gnj.005047>
- Brown, P. N., Murch, S. J., & Shipley, P. (2012).** Phytochemical diversity of cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Aiton) cultivars by anthocyanin determination and metabolomic profiling with chemometric analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(1), 261–271. <https://doi.org/10.1021/jf2033335>
- Bousselsela, H., Ghedadba, N., Hambaba, L., Hachemi, M., Dassamiour, S., & Mouffouk, C. (2022).** In vivo anti-inflammatory activities of *Marrubium vulgare* L. and *Marrubium deserti* de Noé species growing in Algeria. *Phytothérapie*, 20(4), 214–223. <https://doi.org/10.3166/phyto-2021-0294>

C

- Cameron, J. S., & Greger, R. (1998).** Renal function and testing of function. In A. M. Davidson, J. S. Cameron, J. P. Grunfeld, D. N. S. Kerr, E. Ritz, & G. C. Winearl (Eds.), *Oxford Textbook of Clinical Nephrology* (pp. 36–39). Oxford University Press.
- Carena, L., Scozzaro, A., Romagnoli, M., Pazzi, M., Martone, L., Minero, C., & Vione, D. (2022).** Phototransformation of the fungicide tebuconazole, and its predicted fate in sunlit surface freshwaters. *Chemosphere*, 303, Article 134895. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134895>
- Chaâbane, M., Koubaa, M., Soudani, N., Elwej, A., Grati, M., Jamoussi, K., et al. (2017).** *Nitraria retusa* fruit prevents penconazole-induced kidney injury in adult rats through modulation of oxidative stress and histopathological changes. *Pharmacology and Biology*, 55, 1061–1073.
- Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., & Chern, J. C. (2002).** Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3), 178–182.
- Che, D., Shin, J., Kang, H., Cho, B., Kim, Y., & Jang, S. (2020).** Luteolin suppresses IL-31 production in IL-33-stimulated mast cells through MAPK and NF-κB signaling pathways. *International Immunopharmacology*, 83, 106403. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106403>
- Chen, X., Zhu, Q., Li, X., Huang, T., Wang, S., Wang, Y., Li, Y. (2019).** Pubertal exposure to tebuconazole increases testosterone production via inhibiting testicular aromatase activity in rats. *Chemosphere*, 230, 519–526. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.122>
- Chenniappan, K., et Murugan, K. (2017).** Therapeutic and fertility restoration effects of *Ionidium suffruticosum* on sub-fertile male albino Wistar rats: effects on testis and caudal spermatozoa. *Pharmaceutical Biology*, 55(1), 946–957. <https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1278453>
- Chifundera, K., Bury, W. M., & Kizungub, M. (1990).** Screening phytochimique et antibactérien des extraits de *Ficus sycomorus*. *Fitoterapia*, 61(6), 535–539.
- Christova-Bagdassarian, V. L., Bagdassarian, K. S., et Atanassova, M. (2013).** Phenolic profile, antioxidant, and antimicrobial activities from the Apiaceae family (dry seeds). *Mintage Journal of Pharmaceutical and Medical Sciences*, 2, 26–31.
- CLSI. (2022).** *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing* (32e éd.). Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Coimbra, A. T., Ferreira, S., & Duarte, A. (2020).** Genus *Ruta*: A natural source of high value products with biological and pharmacological properties. *Journal of Ethnopharmacology*, 260, Article 113076. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113076>
- Conti, P., Caraffa, A., Gallenga, C. E., Ross, R., Kritas, S. K., Frydas, I., Pandolfi, F. (2021).** Powerful anti-inflammatory action of luteolin: Potential increase with IL-38. *BioFactors*, 47(2), 165–169. <https://doi.org/10.1002/biof.1718>

**Craig, E. A., Yan, Z., & Zhao, Q. J. (2014).** The relationship between chemical-induced kidney weight increases and kidney histopathology in rats. *Journal of Applied Toxicology*, 35(7), 729–736. <https://doi.org/10.1002/jat.3036>

**Cui, N., Xu, H., Yao, S., He, Y., Zhang, H., & Yu, Y. (2018).** Chiral triazole fungicide tebuconazole: enantioselective bioaccumulation, bioactivity, acute toxicity, and dissipation in soils. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 25468–25475. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2587-9>

### D

**Daoudi, A., Hrouk, H., Belaidi, R., Slimani, I., Ibijbijen, J., & Nassiri, L. (2016).** Valorization of *Ruta montana* and *Ruta chalepensis*: Ethnobotanical study, phytochemical screening, and antibacterial activity. *Journal of Materials and Environmental Science*, 7(3), 926–935.

**Daina, A., Michielin, O., et Zoete, V. (2017).** SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, 7(42717), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep42717>

**Daina, A., et Zoete, V. (2016).** A BOILED-Egg to predict gastrointestinal absorption and brain penetration of small molecules. *ChemMedChem*, 11(11), 1117–1121. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201600182>

**Dahamna, S., Belguet, A., Bouamra, D., Guendouz, A., Mergham, M., & Harzallah, D. (2011).** Evaluation of the toxicity of cypermethrin pesticide on organs weight loss and some biochemical and histological parameters. *Communication in Agricultural and Applied Biological Sciences*, 76(4), 915–921.

**Dantas, F., Castilho, P., Almeida-Apolonio, A., De Araújo, R., & Oliveira, K. (2020).** Mutagenic potential of medicinal plants evaluated by the Ames Salmonella/microsome assay: A systematic review. *Mutation Research*, 786, 108338. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2020.108338>

**De Rossi, C., Bieri, R., & Riefstahl, J. (2003).** Organic pollutants in precipitation: Monitoring of pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons in the region of Trier (Germany). *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C*, 28(8), 307–314. [https://doi.org/10.1016/S1474-7065\(03\)00052-4](https://doi.org/10.1016/S1474-7065(03)00052-4)

**Deli, M., Abraham, C., Kataoka, Y., & Niwa, M. (2005).** Permeability Studies on In Vitro Blood–Brain Barrier Models: Physiology, Pathology, and Pharmacology. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 25, 59–127. <https://doi.org/10.1007/s10571-004-1377-8>

**Deng, X., Sun, H., & Youssif, B. G. M. (2023).** Editorial: Pharmaceutical insights into the triazoles: Recent advances. *Frontiers in Chemistry*, 11. <https://doi.org/10.3389/fchem.2023.1149133>

**Desaulniers, D., Leingartner, K., Wade, M., Fintelman, E., Yagminas, A., & Foster, W. (1999).** Effects of acute exposure to PCBs 126 and 153 on anterior pituitary and thyroid

hormones and FSH isoforms in adult Sprague Dawley male rats. *Toxicological Sciences*, 47(2), 158–169. <https://doi.org/10.1093/toxsci/47.2.158>

**Dixit, D., Verma, P., & Marwaha, R. (2021).** A review on ‘triazoles’: Their chemistry, synthesis and pharmacological potentials. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 18, 2535–2565. <https://doi.org/10.1007/s13738-021-02231-x>

**Djarri, L., Ferhat, M., Merabet, G., Chelghoum, A., Laggoune, S., & Semra, Z. (2013).** Composition and antibacterial activity of the essential oil of *Ruta montana* from Constantine (Algeria). *Der Pharmacia Lettre*, 5(4), 70–73. <http://scholarsresearchlibrary.com/archive.html>

**Djo (Do) Quy Diem, A. E. A., Tran-Nguyen, P. L., & Huynh, L. H. (2019).** Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22, 296–302.

**Doi, K., Yuen, P. S. T., Eisner, C., Hu, X., Leelahavanichkul, A., Schnermann, J., & Star, R. A. (2009).** Reduced production of creatinine limits its use as a marker of kidney injury in sepsis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 20(6), 1217–1221. <https://doi.org/10.1681/ASN.2008060617>

**Dong, B. (2024).** A comprehensive review on toxicological mechanisms and transformation products of tebuconazole: Insights on pesticide management. *Science of the Total Environment*, 908, Article 168264. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.168264>

**Donovan, D., De Fusco, C., Kuhnke, L., & Reichel, A. (2023).** Trends in molecular properties, bioavailability, and permeability across the Bayer compound collection. *Journal of Medicinal Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.2c01577>

**Drioiche, A., Amine, S., Boutahiri, S., Saidi, S., Ailli, A., Rhafouri, R., Zair, T. (2020).** Antioxidant and antimicrobial activity of essential oils and phenolic extracts from the aerial parts of *Ruta montana* L. of the Middle Atlas Mountains-Morocco. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 23(5), 902–917.

## E

**Eliasson, R. (1977).** Supravital staining of human spermatozoa. *Fertility and Sterility*, 28, 1257. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)42927-4](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)42927-4)

**Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Featherston, R. M. (1961).** A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88–90.

**El Hachlafi, N., Chebat, A., & Fikri-Benbrahim, K. (2021).** Ethnopharmacology, phytochemistry, and pharmacological properties of *Thymus satureioides* Coss. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021, Article 6673838. <https://doi.org/10.1155/2021/6673838>

**El-Ouady, F., & Eddouks, M. (2021).** *Ruta montana* evokes antihypertensive activity through an increase of prostaglandins release in L-NAME-induced hypertensive rats. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets*, 21(2), 305–314.

Elsayed, M., Okda, T., Atwa, G., Omran, G., Elbaky, A., & Ramadan, A. (2021). Design and optimization of orally administered luteolin nanoethosomes to enhance its anti-tumor activity against hepatocellular carcinoma. *Pharmaceutics*, 13(5), Article 648.

<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13050648>

El-Sonbaty, Y. A., Suddek, G. M., Megahed, N., & Gameil, N. M. (2019). Protocatechuic acid exhibits hepatoprotective, vasculoprotective, antioxidant and insulin-like effects in dexamethasone-induced insulin-resistant rats. *Biochimie*, 167, 119–134.

<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.09.011>

Erenler, R., Yaman, C., Demirtaş, İ., & Alma, M. H. (2023). Phytochemical investigation of *Hypericum heterophyllum* flowers: LC-ESI-MS/MS analysis, total phenolic and flavonoid contents, antioxidant activity. *The Natural Products Journal*, 13(7), 1–9.

<https://doi.org/10.2174/2210315513666230112165545>

European Food Safety Authority. (2014). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance tebuconazole. *EFSA Journal*, 12(4), Article 3485.

<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3485>

### F

Farid, O., Hebi, M., Ajebli, M., Hidani, A. E., & Eddouks, M. (2017). Antidiabetic effect of *Ruta montana* L. in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 28(3), 275–282. <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2016-0030>

Ferramosca, A., Lorenzetti, S., Di Giacomo, M., Lunetti, P., Murrieri, F., Capobianco, L., Dolce, V., Coppola, L., & Zara, V. (2021). Modulation of Human Sperm Mitochondrial Respiration Efficiency by Plant Polyphenols. *Antioxidants*,

10. <https://doi.org/10.3390/antiox10020217>

Freitas, R., Linhares, B., Oliveira, J., Leite, J., Da Matta, S., Gonçalves, R., & Freitas, M. (2021). Tebuconazole-induced toxicity and the protective effect of *Ficus carica* extract in Neotropical fruit-eating bats. *Chemosphere*, 275, 129985.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129985>

### G

Gali, L., et Bedjou, F. (2019). Antioxidant and anticholinesterase effects of the ethanol extract, ethanol extract fractions and total alkaloids from the cultivated *Ruta chalepensis*. *South African Journal of Botany*, 120, 174–179. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.04.011>

Gaouar, Z., Chefirat, B., Saadi, R., Djelad, S., & Rezk-Kallah, H. (2021). Pesticide residues in tomato crops in Western Algeria. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 14(4), 281–286.

<https://doi.org/10.1080/19393210.2021.1953156>

Gandhari, P., Singh, S., & Yadav, M. K. (2023). Role of RFamide-related peptide-3 in the neuroendocrine regulation of gonadotropin secretion. *Journal of Neuroendocrinology*, 35(4), e13245. <https://doi.org/10.1111/jne.13245>

García-Lafuente, A., Guillamón, E., Villares, A., Rostagno, M. A., & Martínez, J. A. (2009). Flavonoids as anti-inflammatory agents: Implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflammation Research*, 58(9), 537–552.

Ghedjati, N., Mahdeb, N., & Bouzidi, A. E. O. (2022). Acute and subchronic toxicity study of methanol extract of the aerial parts of *Ruta montana* L. on adult female Wistar rats. *Tropical Journal of Natural Product Research*, 6(8), 1203–1209. <https://doi.org/10.26538/tjnpr/v6i8.7>

Gibka, J., Kunicka-Styczynska, A., & Glinski, M. (2009). Antimicrobial activity of undecan-2-one, undecan-2-ol and their derivatives. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 12(5), 605–614. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2009.10643763>

Ginwala, R., Bhavsar, R., Chigbu, D. I., Jain, P., & Khan, Z. K. (2019). Potential role of flavonoids in treating chronic inflammatory diseases with a special focus on the anti-inflammatory activity of apigenin. *Antioxidants*, 8(2), Article 35. <https://doi.org/10.3390/antiox8020035>

Giampieri, F., Cianciosi, D., & Forbes-Hernández, T. Y. (2020). Myrtle (*Myrtus communis* L.) berries, seeds, leaves, and essential oils: New undiscovered sources of natural compounds with promising health benefits. *Food Frontiers*, 1(3), 276–295.

Giori, L., Stacy, N., Ogle, M., Nelson, S., Fecteau, K., & Cushing, A. (2019). Hematology, plasma biochemistry, and hormonal analysis of captive Louisiana pine snakes (*Pituophis ruthveni*): Effects of intrinsic factors and analytical methodology. *Comparative Clinical Pathology*, 29(1), 145–154. <https://doi.org/10.1007/s00580-019-03030-w>

Global Biodiversity Information Facility. (2025). *GBIF*. Gbif.org. <https://www.gbif.org/>

Goetz, A. K., Ren, H., Schmid, J. E., & Dix, D. J. (2007). Disruption of testosterone homeostasis as a mode of action for the reproductive toxicity of triazole fungicides in the male rat. *Toxicological Sciences*, 95(1), 227–239.

Gondo, T. F., Kamakama, M., Oatametse, B., Samu, T., Bogopa, J., & Keikotlhaile, B. M. (2021). Pesticide residues in fruits and vegetables from the southern part of Botswana. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 14(4), 271–280. <https://doi.org/10.1080/19393210.2021.1950845>

Gómez-Martínez, D., Selvin, M. A., Nilsson, A. K., Carmona, E., Ngou, J. S., Kristiansson, E., Nilsson, R. H., & Corcoll, N. (2024). Environmental concentrations of the fungicide tebuconazole alter microbial biodiversity and trigger biofilm-released transformation products. *Chemosphere*, 369, Article 143854. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.143854>

Gorshkov, A., Kusakin, P., Borisov, Y., Tsyganova, A., & Tsyganov, V. (2023). Effect of Triazole Fungicides Titul Duo and Vintage on the Development of Pea (*Pisum sativum* L.) Symbiotic Nodules. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(10), Article 8646. <https://doi.org/10.3390/ijms24108646>

Gu, Y., Tobino, T., & Nakajima, F. (2023). Dietborne Toxicity of Tebuconazole to a Benthic Crustacean, *Heterocypris incongruens* and Its Relative Contribution to the Overall Effects under Food-Water Equilibrium Partitioning. *Environmental science & technology*. <https://doi.org/10.1021/acs.est.3c06609>

## H

Habenschus, M., Nardini, V., Dias, L., Rocha, B., Barbosa, F., & De Oliveira, A. (2019). In vitro enantioselective study of the toxicokinetic effects of chiral fungicide tebuconazole in

human liver microsomes. *Ecotoxicology and environmental safety*, 181, 96-105. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.05.071>

**Haghmorad, D., Mahmoudi, M., Haghghi, P., Alidadiani, P., Shahvazian, E., Tavasolian, P., Mahmoudi, M. (2019).** Improvement of fertility parameters with *Tribulus terrestris* and *Anacyclus Pyrethrum* treatment in male rats. *International Brazilian Journal of Urology*, 45(5), 1043–1054. <https://doi.org/10.1590/S1677-5538.IBJU.2018.0843>

**Hamidi, M., Jovanova, B., & Panovska, T. (2014).** Toxicological evaluation of plant products using the brine shrimp (*Artemia salina* L.) model. *Macedonian Pharmaceutical Bulletin*, 60(1), 9–18. <https://doi.org/10.33320/maced.pharm.bull.2014.60.01.002>

**Hammami, I., Smaoui, S., Hsouna, A. B., Hamdi, N., Triki, M. A. (2015).** *Ruta montana* L. leaf essential oil and extracts: Characterization of bioactive compounds and suppression of crown gall disease. *EXCLI Journal*, 14, 83–94. <https://doi.org/10.17179/excli2014-655>

**Hammiche, V., & Azzouz, M. (2013).** Rues: Ethnobotany, phytopharmacology and toxicity. *Phytothérapie*, 11(1), 22–30. <https://doi.org/10.1007/s10298-013-0751-9>

**Hassaan, M., & Nemr, E. (2020).** Pesticides pollution: Classifications, human health impact, extraction and treatment techniques. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 46(3), 207–220. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2020.08.007>

**Henriques, U. (1981).** Histological technique in routine histopathology: An opinion. *Pathology Research and Practice*, 171(3–4), 417–422. [https://doi.org/10.1016/S0344-0338\(81\)80114-8](https://doi.org/10.1016/S0344-0338(81)80114-8)

**Hilaly, J. E., Israili, Z. H., & Lyoussi, B. (2004).** Acute and chronic toxicological studies of *Ajuga iva* in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology*, 91(1), 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2003.11.009>

**Hoffmann, U. (2004).** The value of N-acetylcysteine in the prevention of radiocontrast agent–induced nephropathy seems questionable. *Journal of the American Society of Nephrology*, 15(2), 407–410. <https://doi.org/10.1097/01.ASN.0000106780.14856.55>

**Hould, R. (1984).** *Techniques d'histopathologie et de cytopathologie*. Éditions Maloine.

**Hrynko, I., Kaczyński, P., Wolejko, E., & Łozowicka, B. (2023).** Impact of technological processes on tebuconazole reduction in selected cereal species and the primary cereal product, and dietary exposure assessment. *Food chemistry*, 422, 136249. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136249>

### I

**Inventaire national du patrimoine naturel (INPN) (2025).** (n.d.). Inventaire National Du Patrimoine Naturel. <https://inpn.mnhn.fr/accueil/index>

### J

**Jabri, M. A., Rtibi, K., Sakly, M., Marzouki, L., & Sebai, H. (2016).** Role of gastrointestinal motility inhibition and antioxidant properties of myrtle berries (*Myrtus communis* L.) juice in diarrhea treatment. *BioMedicine & Pharmacotherapy*, 84, 1937–1944.

Jaisamut, P., Wanna, S., Thanakoon, A., Saejew, S., Saowapark, N., Suchato, W., ... Siri, S. (2021). Evaluation of microwave-assisted extraction method for preparation and assessment of Thai herbal medicine oral tablets with enriched phytochemical compounds. *AAPS PharmSciTech*, 22. <https://doi.org/10.1208/s12249-021-02052-4>

Jayakumar, T., Lin, K.-C., Chang, C.-C., Hsia, C.-W., Manubolu, M., Huang, W.-C., ... Hsia, C.-H. (2021). Targeting MAPK/NF- $\kappa$ B pathways in anti-inflammatory potential of rutaecarpine: Impact on Src/FAK-mediated macrophage migration. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1), Article 92. <https://doi.org/10.3390/ijms23010092>

Jianu, C., Goleț, I., Stoin, D., Cocan, I., Bujancă, G., Mișcă, C., ... Horhat, D. I. (2021). Chemical profile of *Ruta graveolens*, evaluation of the antioxidant and antibacterial potential of its essential oil, and molecular docking simulations. *Applied Sciences*, 11(24), Article 11753. <https://doi.org/10.3390/app112411753>

Jia, K., Chen, G., Zeng, J., Liu, F., Liao, X., Guo, C., & Lu, H. (2022). Low trifloxystrobin-tebuconazole concentrations induce cardiac and developmental toxicity in zebrafish by regulating notch mediated-oxidative stress generation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 241, 113752. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113752>

Jónsdóttir, S., Reffstrup, T., Petersen, A., & Nielsen, E. (2016). Physiologically Based Toxicokinetic Models of Tebuconazole and Application in Human Risk Assessment.. *Chemical research in toxicology*, 29 5, 715-34. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.5b00341>

Joshi, S. C., Gulati, N., Sharma, B., & Sharma, P. (2016). Effects of tebuconazole (a fungicide) on reproduction of male rats. *International Journal of Pharmaceutical Research and Health Sciences*, 4, 1489–1494.

### K

Kabakci, R., Kaya, A., Yigit, A. A., & Varisli, O. (2021). Assessment of tebuconazole exposure on bovine testicular cells and epididymal spermatozoa. *Acta Veterinaria Hungarica*, 69(2), 180–188. <https://doi.org/10.1556/004.2021.00023>

Kabouche, Z., Benkiki, N., Seguin, E., & Bruneau, C. (2003). A new dicoumarinyl ether and two rare furocoumarins from *Ruta montana*. *Fitoterapia*, 74(1–2), 194–196. [https://doi.org/10.1016/s0367-326x\(02\)00313-1](https://doi.org/10.1016/s0367-326x(02)00313-1)

Kalt, W., Ryan, D. A., Duy, J. C., Prior, R. L., Ehlenfeldt, M. K., & Vander Kloet, S. P. (2001). Interspecific variation in anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity among genotypes of highbush and lowbush blueberries (*Vaccinium* section *Cyanococcus* spp.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4761–4767. <https://doi.org/10.1021/jf010653e>

Kambouche, N., Merah, B., Bellahouel, S., Bouayed, J., Dicko, A., Derdour, A., ... Soulimani, R. (2008). Chemical composition and antioxidant potential of *Ruta montana* L. essential oil from Algeria. *Journal of Medicinal Food*, 11(3), 593–595. <https://doi.org/10.1089/jmf.2007.0515>

Kang, D., Doudrick, K., Park, N., Choi, Y., Kim, K., & Jeon, J. (2020). Identification of transformation products to characterize the ability of a natural wetland to degrade synthetic organic pollutants. *Water Research*, 187, 116425. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116425>

- Kaur, P., Chamberlin, A. C., Poulos, T. L., Falzone, C. J., & Shapiro, S. (2016).** Structure-based inhibitor design for evaluation of a CYP3A4 pharmacophore model. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(9), 4210–4220. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01146>
- Kawaii, S., Tomono, Y., Katase, E., Ogawa, K., & Yano, M. (1999).** Antiproliferative activity of flavonoids on several cancer cell lines. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 63(5), 896–899.
- Khadhri, A., Bouali, I., Belkhir, S., Mokni, R. E., Smiti, S., Almeida, C., Nogueira, J. M. F., & Araújo, M. E. M. (2014).** Chemical variability of two essential oils of Tunisian rue: *Ruta montana* and *Ruta chalepensis*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 17(3), 445–451. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2014.914001>
- Khadhri, A., Bouali, I., Belkhir, S., Mokni, R. E., Smiti, S., Almeida, C., Falé, P., & Serralheiro, M. L. (2017).** In vitro digestion, antioxidant, and antiacetylcholinesterase activities of two species of *Ruta*: *Ruta chalepensis* and *Ruta montana*. *Pharmaceutical Biology*, 55(1), 101–107. <https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1230634>
- Khan, M. A., Kassianos, A. J., Hoy, W., Alam, K., Healy, H., & Gobe, G. (2022).** Promoting plant-based therapies for chronic kidney disease. *Journal of Evidence-Based Integrative Medicine*, 27, 2515690X2210796. <https://doi.org/10.1177/2515690X221079688>
- Khelifi, D., Sghaier, R. M., Amouri, S., Laouini, D., Hamdi, M., & Bouajila, J. (2013).** Composition and anti-oxidant, anti-cancer and anti-inflammatory activities of *Artemisia herba-alba*, *Ruta chalepensis* and *Peganum harmala*. *Food and Chemical Toxicology*, 55, 202–208. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.01.004>
- Kim, H. (2017).** *p*-Coumaric acid enhances long-term potentiation and recovers scopolamine-induced learning and memory impairments. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 492(3), 493–499. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.08.068>
- Kim, H. K., Cheon, B. S., Kim, Y. H., Kim, S. Y., & Kim, H. P. (1999).** Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW264.7 and their structure–activity relationships. *Biochemical Pharmacology*, 58(5), 759–765. doi:10.1016/s0006-2952(99)00160-4
- Knebel, C., Heise, T., Zanger, U. M., Lampen, A., Marx-Stoelting, P., & Braeuning, A. (2019).** The azole fungicide tebuconazole affects human CYP1A1 and CYP1A2 expression by an aryl hydrocarbon receptor-dependent pathway. *Food and Chemical Toxicology*, 123, 481–491. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.11.039>
- Koebach, J., O'Brien, M., Muttenthaler, M., Miazzo, M., Akcan, M., Elliott, A. G., ... Gruber, C. W. (2013).** Oxytocic plant cyclotides as templates for peptide G protein-coupled receptor ligand design. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(52), 21183–21188. <https://doi.org/10.1073/pnas.1311183110>
- Koua, B. B., Kouadio, J. H., & Kouadio, Y. J. (2024).** Étude analgésique des extraits hydroéthanoliques de *Nephrolepis bisserata* et *Clerodendrum splendens* chez la souris. *European Scientific Journal*, 20(6), 243–256.

- Ku, T., Hu, J., Zhou, M., Xie, Y., Liu, Y., Tan, X., Guo, L., Li, G., & Sang, N. (2022).** Cardiac energy metabolism disorder mediated by energy substrate imbalance and mitochondrial damage upon tebuconazole exposure.. *Journal of environmental sciences*, 136, 270-278. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2022.10.012>
- Ku, T., Liu, Y., Xie, Y., Hu, J., Hou, Y., Tan, X., Ning, X., Li, G., & Sang, N. (2023).** Tebuconazole mediates cognitive impairment via the microbe-gut-brain axis (MGBA) in mice.. *Environment international*, 173, 107821. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2023.107821>
- Ku, T., Zhou, M., Hou, Y., Xie, Y., Li, G., & Sang, N. (2021).** Tebuconazole induces liver injury coupled with ROS-mediated hepatic metabolism disorder.. *Ecotoxicology and environmental safety*, 220, 112309. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112309>
- Kramer, L., Schulze, T., Klüver, N., Altenburger, R., Hackermüller, J., Krauss, M., & Busch, W. (2024).** Curated mode-of-action data and effect concentrations for chemicals relevant for the aquatic environment. *Scientific Data*, 11(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41597-023-02904-7>
- Ku, T., Zhou, M., Hou, Y., Xie, Y., Li, G., & Sang, N. (2021).** Tebuconazole induces liver injury coupled with ROS-mediated hepatic metabolism disorder. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 220, Article 112309. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112309>

### L

- Lafi, B., Chaâbane, M., Elwej, A., Grati, M., Jamoussi, K., Mnif, H., et al. (2017).** Effects of co-exposure to imidacloprid and gibberellic acid on redox status, kidney variables, and histopathology in adult rats. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 124(2), 1–10. <https://doi.org/10.1080/13813455.2017.1371195>
- Laib, I., Kehal, F., Arris, M., Maameri, M. I., Lachlah, H., Bensouici, C., & Barkat, M. (2021).** Effet de la digestion gastro-intestinale in vitro sur les composés phénoliques et l'activité antioxydante du thé vert *Camellia sinensis* L. issu de l'agriculture biologique. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 35(3), 212–221.
- Laib, I., Laib, D E., Semouma, D., Cheriet, N., Aouzal, B., & Barkat, M. (2023).** Optimization of extraction and study of the in vitro static simulation of INFOGEST gastrointestinal digestion and in vitro colonic fermentation on the phenolic compounds of dandelion and their antioxidant activities. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 17, 1–23. <https://doi.org/10.1007/s11947-023-03316-6>
- Lazic, S. E., Semenova, E., & Williams, D. P. (2020).** Determining organ weight toxicity with Bayesian causal models: Improving on the analysis of relative organ weights. *Scientific Reports*, 10(1), Article 6625. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63465-y>
- Lehmann, J., & Worcester, E. M. (1991).** Hypercalciuria and stones. *American Journal of Kidney Diseases*, 27, 386–391.
- Leite, F., De Paula Marques Silva, C., Miranda, R., & Dorta, D. (2024).** Comparison of in vitro toxicity in HepG2 cells: Toxicological role of Tebuconazole-tert-butyl-hydroxy in exposure to the fungicide Tebuconazole.. *Pesticide biochemistry and physiology*, 202, 105954. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2024.105954>

**Li, G., Li, D., Rao, H. & Liu, X. (2022).** Potential neurotoxicity, immunotoxicity, and carcinogenicity induced by metribuzin and tebuconazole exposure in earthworms (*Eisenia fetida*) revealed by transcriptome analysis. *Science of the Total Environment*, 807, Article 150760. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150760>

**Li, S., Sun, Q., Wu, Q., Gui, W., Zhu, G., & Schlenk, D. (2019).** Endocrine disrupting effects of tebuconazole on different life stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Pollution*, 249, 1049–1059. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.03.067>

**Li, Y., & Schluesener, H. (2017).** Health-promoting effects of the citrus flavanone hesperidin. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(3), 613–631.

**Li, Y., Dong, F., Liu, X., Xu, J., Li, J., Kong, Z., et al. (2012).** Simultaneous enantioselective determination of triazole fungicides in soil and water by chiral liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1224, 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.12.044>

**Lin, L.-Z., et Harnly, J. M. (2007).** A Screening Method for the Identification of Glycosylated Flavonoids and Other Phenolic Compounds Using a Standard Analytical Approach for All Plant Materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(4), 1084–1096. doi:10.1021/jf062431s

### M

**Ma, F., Li, Y., Yu, Y., Li, Z., Lin, L., Chen, Q., Xu, Q., Pan, P., Wang, Y., & Ge, R. (2020).** Gestational exposure to tebuconazole affects the development of rat fetal Leydig cells. *Chemosphere*, 262, Article 127792. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127792>

**Maggi, F., Tang, F. H. M., la Cecilia, D., & McBratney, A. (2019).** PEST-CHEMGRIDS, global gridded maps of the top 20 crop-specific pesticide application rates from 2015 to 2025. *Scientific Data*, 6, Article 170. <https://doi.org/10.1038/s41597-019-0170-5>

**Mahdeb, N., Attafi, K., Bouhouhou, S., Rima, A., & Abdelouahab, B. (2023).** Acute and subacute toxicity of *Ruta montana* extract to female rats: Effect on liver, kidneys and ovaries. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 11(10), 1862–1870. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v11i10.1862-1870.5768>

**Mahmud, I., Shahria, N., Yeasmin, S., Iqbal, A., Mukul, E. H., Gain, S., Chowdhury, M. H., & Rashid, M. A. (2018).** Ethnomedicinal, phytochemical and pharmacological profile of a mangrove plant *Ceriops decandra* Griff. Din Hou. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, 16(1). <https://doi.org/10.1515/jcim-2017-0129>

**Matin, M., Matin, P., Rahman, M., Hadda, B., Almalki, F., Mahmud, S., Ghoneim, M., Alruwaily, M., & Alshehri, S. (2022).** Triazoles and their derivatives: Chemistry, synthesis, and therapeutic applications. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.864286>

**Mazumdar, B., Sarma, P., Mahanta, H., & Sastry, G. (2023).** Machine learning based dynamic consensus model for predicting blood-brain barrier permeability. *Computers in biology and medicine*, 160, 106984. <https://doi.org/10.1016/j.compbiomed.2023.106984>

- Mdhluli, M. (2003).** Toxicological and antifertility investigations of oleanolic acid in male vervet monkeys (*Chlorocebus aethiops*). (PhD Thesis). Discipline of Physiological Sciences, University of the Western Cape, Cape Town, South Africa.
- Merghem, M., et Dahamna, S. (2020).** *In vitro* antioxidant activity and total phenolic content of *Ruta montana* L. extracts. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 10(2), 69–75. <https://doi.org/10.22270/jddt.v10i2.3919>
- Meng, F., Xi, Y., Huang, J., & Ayers, P. (2021).** A curated diverse molecular database of blood-brain barrier permeability with chemical descriptors. *Scientific Data*, 8. <https://doi.org/10.1038/s41597-021-01069-5>
- Merghem, M., Dahamna, S., Samira, K., & Khennouf, S. (2017).** Effect of Chronic Oral Administration of *Ruta montana* L. Areal Part Extract on Fertility Potential in Albino Rats. *Annual Research & Review in Biology*, 21(4), 1–8. <https://doi.org/10.9734/arrb/2017/38608>
- Merghem, M., Dahamna, S., Rezzagui, A., Boussahel, S., Belguet, A., Dehimi, K., & Harzallah, D. (2013).** Acute and chronic toxicity of aqueous extract of *Ruta montana* L. in rodents. *Pharmacognosy Communications*, 3(2), 50–57. <https://doi.org/10.5530/pc.2013.2.11>
- Mercadante, R., Polledri, E., Scurati, S., Moretto, A., & Fustinoni, S. (2014).** Identification and quantification of metabolites of the fungicide tebuconazole in human urine. *Chemical Research in Toxicology*, 27(11), 1943–1949. <https://doi.org/10.1021/tx500305u>
- Middleton Jr., E., Kandaswami, C., & Theoharides, T. C. (2000).** The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*, 52(4), 673–751.
- Miara, M. D., Bendif, H., Rebbas, K., Rabah, B., Hammou, M. A., & Maggi, F. (2019).** Medicinal plants and their traditional uses in the highland region of Bordj Bou Arreridj (Northeast Algeria). *Journal of Herbal Medicine*, 16, Article 100262. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2019.100262>
- Missoun, F., Slimani, M., & Aoues, A. (2018).** Toxic effect of lead on kidney function in rats. *Advanced Journal of Microbiology Research*, 12(12), 1–7.
- Mikolaenko, I., Benson, E., Konrad, R. J., Chaffin, C., Robinson, C. A., & Hardy, R. W. (2000).** Evaluation of the Beckman Coulter LX20 clinical chemistry analyzer. *Laboratory Medicine*, 31(7), 387–393. <https://doi.org/10.1309/UREA-EU4H-UM16-3B2W>
- Mohammedi, H., Mecherara-Idjeri, S., & Hassani, A. (2020).** Variability in essential oil composition, antioxidant and antimicrobial activities of *Ruta montana* L. collected from different geographical regions in Algeria. *Journal of Essential Oil Research*, 32(1), 88–101. <https://doi.org/10.1080/10412905.2019.1660238>
- Mohd Mutalip, S. S., Singh, G. K. S., Mohd Shah, A., Mohamad, M., Mani, V., & Hussin, S. N. (2013).** Histological changes in testes of rats treated with testosterone, nandrolone, and stanozolol. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 11(8), 653–658.
- Morena, C., Accinelli, C., Bruno, V., Abbas, H. K., Paulk, R. T., & Shier, W. T. (2025).** Induced selection of tebuconazole-resistant *Aspergillus flavus* isolates during germination of

treated corn seeds. *Journal of Agriculture and Food Research*, 19, Article 101566. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2024.101566>

**Mukherjee, P. K., Kumar, V., Mal, M., & Houghton, P. J. (2007).** Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine*, 14(4), 289–300. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2007.02.002>

### N

**Nahar, L., El-Seedi, H. R., Khalifa, S. A. M., Mohammadhosseini, M., & Sarker, S. D. (2021).** *Ruta* essential oils: Composition and bioactivities. *Molecules*, 26(16), Article 4766. <https://doi.org/10.3390/molecules26164766>

**Najem, M., Ibijbijen, J., et Nassiri, L. (2019).** Quantitative Ethnobotanical Study of Poisonous Medicinal Plants used in the Traditional Pharmacopoeia of the Central Middle Atlas Region: Morocco. *Ethnobotany Research and Applications*, 18, 1–17. <https://doi.org/10.32859/era.18.36.1-17>

**Napkin AI. (2025).** *Napkin AI - The visual AI for business storytelling*. Napkin AI. <https://www.napkin.ai/>

**Nasehi, Z., Kheiripour, N., Akhavan Taheri, M., Ardjmand, A., & Lorigooini, Z. (2023).** Efficiency of hesperidin against liver fibrosis induced by bile duct ligation in rats. *BioMed Research International*, 2023, Article 5444301. <https://doi.org/10.1155/2023/5444301>

**Neves, J. M., Matos, C., Moutinho, C., Queiroz, G., & Gomes, L. R. (2009).** Ethnopharmacological notes about ancient uses of medicinal plants in Trás-os-Montes (northern of Portugal). *Journal of Ethnopharmacology*, 124(2), 270–283. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.04.041>

**Ngai, D. N., Kibiti, C. M., & Ngugi, M. P. (2022).** Cognitive enhancing effects and anticholinesterase activity of stem bark and leaf extracts of *Prunus africana*. *Heliyon*, 8(12), e12345. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e12289>

### O

**OCDE (2002).** *Essai n° 423: Toxicité orale aiguë - Méthode par classe de toxicité aiguë*, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 4, Éditions OCDE, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264071018-fr>.

**Ojaghi, A., Carrazana, G., Caruso, C., Abbas, A., Myers, D., Lam, W., & Robles, F. (2020).** Label-free hematology analysis using deep-ultraviolet microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(26), 14779–14789. <https://doi.org/10.1073/pnas.2001404117>

**Orhan, G., Orhan, I., & Sener, B. (2006).** Recent developments in natural and synthetic drug research for Alzheimer's disease. *Letters in Drug Design & Discovery*, 3(4), 268–274. <https://doi.org/10.2174/157018006776743215>

**Oultaf, L., Ahmed, F., & Ahmed, D. (2022).** Environmental and health risks of pesticide use practices by farmers in the region of Tizi-Ouzou (northern Algeria). *International Journal of Environmental Studies*, 80(6), 1587–1597. <https://doi.org/10.1080/00207233.2022.2044693>

### P

**Pathak, V., Verma, V., Rawat, B., Kaur, B., Babu, N., Sharma, A., ... Cunill, J. (2022).** Current status of pesticide effects on environment, human health and its eco-friendly management as bioremediation: A comprehensive review. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.962619>

**Perez-Rodriguez, V., Souders, C. L., Tischuk, C., & Martyniuk, C. J. (2019).** Tebuconazole reduces basal oxidative respiration and promotes anxiolytic responses and hypoactivity in early-staged zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 217, 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2018.11.01>

**Perry, A., Yamamoto, I., Ishaaya, I., & Perry, R. (1998).** Function and classification (pp. 4–6). In *Insecticides in Agriculture and Environment*. Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-03656-3\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-662-03656-3_2)

**Piao, Y., Liu, Y., & Xie, X. (2013).** Change trends of organ weight background data in Sprague Dawley rats at different ages. *Journal of Toxicological Pathology*, 26(1), 29–34.

**Pires, D. E. V., Blundell, T. L., & Ascher, D. B. (2015).** pkCSM: Predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58(9), 4066–4072. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00104>

**Polat, B., & Tiryaki, O. (2023).** Determination of fungicide residues in soil using QuEChERS coupled with LC-MS/MS, and environmental risk assessment. *Environmental Monitoring and Assessment*, 195(8). <https://doi.org/10.1007/s10661-023-11550-w>

**Polledri, E., Mercadante, R., & Fustinoni, S. (2018).** Determination of tebuconazole and penconazole fungicides in rat and human hair by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 32(15), 1243–1249. <https://doi.org/10.1002/rcm.8153>

**Pollio, A., De Natale, A., Appetiti, E., Aliotta, G., & Touwaide, A. (2008).** Continuity and change in the Mediterranean medical tradition: *Ruta* spp. (Rutaceae) in Hippocratic medicine and present practices. *Journal of Ethnopharmacology*, 116(3), 469–482. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.12.013>

**Price, M. L., Van Scoyoc, S., & Butler, L. G. (1978).** A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26(5), 1214–1218.

**PubChem. (2025).** *PubChem*. Nih.gov; National Library of Medicine. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

### Q

Qiu, F., Zhang, R., Sun, J., A, J., Hao, H., Peng, Y., ... Wang, G. (2008). Inhibitory effects of seven components of Danshen extract on catalytic activity of cytochrome P450 enzyme in human liver microsomes. *Drug Metabolism and Disposition*, 36(7), 1308–1314. <https://doi.org/10.1124/dmd.108.021030>

Quintieri, L., Palatini, P., Nassi, A., Ruzza, P., & Floreani, M. (2008). Flavonoids diosmetin and luteolin inhibit midazolam metabolism by human liver microsomes and recombinant CYP3A4 and CYP3A5 enzymes. *Biochemical Pharmacology*, 75(6), 1426–1437. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.11.012>

### R

Raghav, S. K., Gupta, B., Agrawal, C., Goswami, K., & Das, H. R. (2006). Anti-inflammatory effect of *Ruta graveolens* L. in murine macrophage cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 104(1–2), 234–239. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.09.008>

Rahman, M. F., Siddiqui, M. K., & Jamil, K. (2001). Effects of Vepacide (*Azadirachta indica*) on aspartate and alanine aminotransferase profiles in a subchronic study with rats. *Human et Experimental Toxicology*, 20(5), 243–249. <https://doi.org/10.1191/096032701678227730>

Rajčević, N., Bukvički, D., Dodoš, T., & Marin, P. (2022). Interactions between Natural Products—A Review. *Metabolites*, 12. <https://doi.org/10.3390/metabo12121256>

Ran, J., Xu, G., Ma, H., Xu, H., Liu, Y., Tan, R., ... Lao, G. (2017). Febuxostat attenuates renal damage besides exerting hypouricemic effect in streptozotocin-induced diabetic rats. *International Journal of Nephrology*, 2017, Article 2739539. <https://doi.org/10.1155/2017/2739539>

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)

Rous, P., & Larimore, L. D. (1920). Relation of the portal blood to liver maintenance: A demonstration of liver atrophy conditional on compensation. *Journal of Experimental Medicine*, 31(5), 609–632. <https://doi.org/10.1084/jem.31.5.609>

Rubin, E., Gevirtz, N. R., Cohan, P., Tomita, F., & Jacobson, J. H. (1965). Liver cell damage produced by portacaval shunts. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 118(1), 235–237. <https://doi.org/10.3181/00379727-118-29807>

Rumsby, G. (2018). Principles of Clinical Biochemistry. In *Wilson and Walker's Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology* (8e éd., pp. 346–380). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/9781316677056.012>

### S

Santé Canada. (2016). Projet de décision d'homologation PRD2016-33 : Tébuconazole. Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire. <https://www.canada.ca/content/dam/hc->

[sc/migration/hc-sc/cps-spc/alt\\_formats/pdf/pest/part/consultations/prd2016-33/PRD2016-33-fra.pdf](https://doi.org/10.1016/j.neuro.2020.06.002)

**Sanchez, C. L., Souders, C. L., Pena-Delgado, C. J., Nguyen, K. T., Kroyter, N., Ahmadie, N. E., ... Martyniuk, C. J. (2020).** Neurotoxicity assessment of triazole fungicides on mitochondrial oxidative respiration and lipids in differentiated human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Neurotoxicology*, *80*, 76–86. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2020.06.002>

**Scheen, A. J. (2022).** De l'inflammation aiguë aux maladies inflammatoires chroniques. *Revue Médicale de Liège*, *77*, 253–255.

**Seliger, R., Kraus, M., & Engel, T. (2023).** A-144 Three-wavelength polarization imaging method for the analysis of individual human blood cells with dye-enhanced dispersion of dilution buffer. *Clinical Chemistry*, *69*(Suppl. 1), hvad097.131. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvad097.131>

**Serrano-Marín, J., Reyes-Resina, I., Martínez-Pinilla, E., Navarro, G., & Franco, R. (2020).** Natural compounds as guides for the discovery of drugs targeting G-protein-coupled receptors. *Molecules*, *25*(21), Article 5060. <https://doi.org/10.3390/molecules25215060>

**Sivikova, K., Dianovský, J., Holecková, B., Galdíková, M., & Kolesárová, V. (2013).** Assessment of cytogenetic damage in bovine peripheral lymphocytes exposed to in vitro tebuconazole-based fungicide. *Chemosphere*, *92*(5), 555–562. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.03.050>

**Slimani, S., & Boulakoud, M. S. (2014).** Antracol administration has disturbed the reproductive cycle of domestic pigeon *Columba livia domestica*. *Advances in Environmental Biology*, *8*(24), 82–91.

**Slimani, S., Boulakoud, M. S., & Abdennour, C. (2021).** The fungicide thiram induced hepatic and renal injuries in domestic pigeons (*Columba livia domestica*). *Annals of Clinical and Analytical Medicine*, *12*(5), 547–552. <https://doi.org/10.4328/acam.20620>

**Slougui, N., Rabhi, N. L., Achouri, R., & Bensouici, C. (2023).** Evaluation of the antioxidant, antifungal, and anticholinesterase activity of the extracts of *Ruta montana* L., harvested from Souk-Ahras (North-East of Algeria) and composition of its extracts by GC-MS. *Tropical Journal of Natural Product Research*, *7*(7). <https://doi.org/10.26538/tjnpr/v7i7.25>

**Szopa, A., Ekiert, H., Szewczyk, A., & Fugas, E. (2012).** Production of bioactive phenolic acids and furanocoumarins in in vitro cultures of *Ruta graveolens* L. and *Ruta graveolens* ssp. *divaricata* (Tenore) Gams under different light conditions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *110*(3), 329–336. <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0154-5>

**Szewczyk, A., Marino, A., Taviano, M., Cambria, L., Davì, F., Trepà, M., ... Miceli, N. (2023).** Studies on the accumulation of secondary metabolites and evaluation of biological activity of in vitro cultures of *Ruta montana* L. in temporary immersion bioreactors. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(8), Article 7045. <https://doi.org/10.3390/ijms24087045>

## T

- Tabeshpour, J., Hosseinzadeh, H., Hashemzaei, M., & Karimi, G. (2020).** A review of the hepatoprotective effects of hesperidin, a flavanone glycoside in citrus fruits, against natural and chemical toxicities. *Daru*, 28(1), 305–317. <https://doi.org/10.1007/s40199-020-00344-x>
- Taha, M., Ullah, H., Al Muqarrabun, L. M. R., Khan, M. N., Rahim, F., Ahmat, N., ... Khan, K. M. (2018).** Bisindolylmethane thiosemicarbazides as potential inhibitors of urease: Synthesis and molecular modeling studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 26(1), 152–160. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.11.028>
- Takizawa, T. (1978).** An unbiased comparison of organ weights when an inequality in body weight exists. *Toxicology*, 9(4), 353–360. [https://doi.org/10.1016/0300-483X\(78\)90018-5](https://doi.org/10.1016/0300-483X(78)90018-5)
- Tamura, K., Inoue, K., Takahashi, M., Matsuo, S., Irie, K., Kodama, Y., et al. (2013).** Dose-response involvement of constitutive androstane receptor in mouse liver hypertrophy induced by triazole fungicides. *Toxicology Letters*, 221(1), 47–56. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.05.011>
- Tang, F. H. M., Lenzen, M., McBratney, A., & Maggi, F. (2021).** Risk of pesticide pollution at the global scale. *Nature Geoscience*, 14(4), 206–210. <https://doi.org/10.1038/s41561-021-00712-5>
- 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), Article 1784. <https://doi.org/10.3390/molecules26061784>
- Thai, N., Theodorakis, P., & Li, M. (2020).** Fast Estimation of the Blood–Brain Barrier Permeability by Pulling a Ligand through a Lipid Membrane. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 60, 3057 - 3067. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.9b00834>.
- Tidou, S. N., Kouakou, L. S., Kouakou, G. S., & Zirihi, G. N. (2024).** Étude analgésique des extraits hydroéthanoliques de *Clerodendrum splendens* G. Don (Lamiaceae) et *Nephrolepis bisserata* (Sw.) Schott (Nephrolepidaceae) : Deux plantes de la pharmacopée ivoirienne. *European Scientific Journal*, 20(6), 244. <https://doi.org/10.19044/esj.2024.v20n6p244>
- Tofan, L., Niță, V., Nenciu, M., Coatu, V., Lazăr, L., Damir, N., Vasile, D., Popoviciu, D., Brotea, A., Curtean-Bănăduc, A., Avramescu, S., & Aonofriesei, F. (2023).** Multiple Assays on Non-Target Organisms to Determine the Risk of Acute Environmental Toxicity in Tebuconazole-Based Fungicides Widely Used in the Black Sea Coastal Area. *Toxics*, 11. <https://doi.org/10.3390/toxics11070597>
- Touati, D., Atta-ur-Rahman, & Ulubelen, A. (2000).** Alkaloids from *Ruta montana*. *Phytochemistry*, 53(2), 277–279. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(99\)00486-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(99)00486-0)
- Tudi, M., Ruan, H., Wang, L., Lyu, J., Sadler, R., Connell, D., Chu, C., & Phung, D. (2021).** Agriculture development, pesticide application and its impact on the environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(3), Article 1112. <https://doi.org/10.3390/ijerph18031112>

## U

- Ulubelen, A. (1990).** A new alkaloid, montanine, from *Ruta montana*. *Journal of Natural Products*, 53(1), 207–208. <https://doi.org/10.1021/np50067a034>

Uprety, A., Kang, Y., & Kim, S. (2021). Blood-brain barrier dysfunction as a potential therapeutic target for neurodegenerative disorders. *Archives of Pharmacal Research*, 44(5), 487–498. <https://doi.org/10.1007/s12272-021-01332-8>

### V

Vallet, F. (2002). Mesure des pesticides dans l'atmosphère en Poitou-Charentes : Développements des techniques de biosurveillance des pesticides. *Rapport Pesticides Atmo Poitou-Charentes*. 93p.

Veber, D. F., Johnson, S. R., Cheng, H. Y., Smith, B. R., Ward, K. W., & Kopple, K. D. (2002). Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *Journal of Medicinal Chemistry*, 45(12), 2615–2623. <https://doi.org/10.1021/jm020017n>

Versele, R., Sevin, E., Gosselet, F., Fenart, L., & Candela, P. (2022). TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  modulate blood-brain barrier permeability and decrease amyloid- $\beta$  peptide efflux in a human blood-brain barrier model. *International Journal of Molecular Sciences*, 23. <https://doi.org/10.3390/ijms231810235>

### W

Wadhwa, R., Yadav, N., Katiyar, S., Yaguchi, T., Lee, C., Ahn, H., ... Sundar, D. (2021). Molecular dynamics simulations and experimental studies reveal differential permeability of withaferin-A and withanone across the model cell membrane. *Scientific Reports*, 11, Article 2395. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81729-z>

Wang, Y., Huang, T., Zhang, T., Ma, X., Zhou, G., Chi, M., & Zou, N. (2023). Residue levels and dietary intake risk assessments of 139 pesticides in agricultural produce using the m-PFC method based on SBA-15-C18 with GC-MS/MS. *Molecules*, 28(6), Article 2480. <https://doi.org/10.3390/molecules28062480>

Wang, Y., Chen, C., Yang, G., Wang, X., Wang, Q., Weng, H., Zhang, Z., & Qian, Y. (2021). Combined lethal toxicity, biochemical responses, and gene expression variations induced by tebuconazole, bifenthrin and their mixture in zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and environmental safety*, 230, 113116. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.113116>

Waterhouse, A. L. (2011). Folin-Ciocalteu micro method for total phenol in wine. *Department of Viticulture and Enology, University of California, Davis*. Retrieved from <http://waterhouse.ucdavis.edu/phenol/folinmicro.htm>

Widjaja, G., Ibrahim, N., Hadi, S., Cababat, F., Jalil, T., Al-Charak, A., ... Mustafa, F. (2023). The effect of *Eucalyptus globulus* hydroalcoholic extract on LH, FSH and testosterone concentrations and sperm morphology. *Archives of Razi Institute*, 78(1), 115–123. <https://doi.org/10.22092/ari.2022.359470.2426>

### X

Xiaoting, L., Xiangyun, Z., Shumei, L., & Minghua, D. (2010). Effect of hesperidin on expression of inducible nitric oxide synthase in cultured rabbit retinal pigment epithelial cells.

In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 664, pp. 193–201). Springer.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1399-9\\_22](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1399-9_22)

**Xie, J., Shen, Z., Anraku, Y., Kataoka, K., & Chen, X. (2019).** Nanomaterial-based blood-brain-barrier (BBB) crossing strategies. *Biomaterials*, 224, 119491. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119491>

### Y

**Yang, J., Liu, S., Liao, M., Chen, R., Liu, P., & Ueng, Y. (2018).** Effects of tebuconazole on cytochrome P450 enzymes, oxidative stress, and endocrine disruption in male rats. *Environmental Toxicology*, 33(8), 899–907. <https://doi.org/10.1002/tox.22575>

**Yang, X., Zhang, X., Yao, Q., Song, M., Han, Y., Shao, B., & Li, Y. (2019).** T-2 toxin impairs male fertility by disrupting hypothalamic-pituitary-testis axis and declining testicular function in mice. *Chemosphere*, 234, 909–916. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.145>

**Ying, Y., Pan, P., Zou, C., Wang, Y., Tang, Y., Hou, X., & Ge, R. (2021).** Tebuconazole exposure disrupts placental function and causes fetal low birth weight in rats. *Chemosphere*, 264, Article 128432. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128432>

**Yu, S., & Shang, P. (2014).** A review of bioeffects of static magnetic field on rodent models. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 114(1), 14–24. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2013.11.001>

### Z

**Zaidi, S. N. F., Usman, G. K., Usman, S. M., Sostin, O. M., & Bhardwaj, S. (2023).** Salicylic acid protects gentamicin-induced hepatotoxicity in rabbits. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 36(3), 873–878. <https://doi.org/10.36721/PJPS.2023.36.3.REG.873-878.1>

**Zeb, A. (2020).** Concept, mechanism, and applications of phenolic antioxidants in foods. *Journal of Food Biochemistry*, 44(10), e13394. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13394>

**Zeichen de Sa, R., Rey, A., Arganaraz, E., & Bindstein, E. (2000).** Perinatal toxicology of *Ruta chalepensis* (Rutaceae) in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 69(2), 93–98. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00232-3](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00232-3)

**Zeraib, A., Boudjedjou, L., Suici, N., Benmeddour, T., Rahal, K., & Fercha, A. (2021).** Synergistic effects of *Ruta montana* (Clus.) L. essential oil and antibiotics against some pathogenic bacteria. *Journal of Phytology*, 13, 101–107. <https://doi.org/10.25081/jp.2021.v13.7088>

**Zhang, M., Wang, J., Zhu, L., Li, T., Jiang, W., Zhou, J., Peng, W., & Wu, C. (2017).** *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. (Rutaceae): A systematic review of its traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology, pharmacokinetics, and toxicology. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(10), Article 2172. <https://doi.org/10.3390/ijms18102172>

**Zhang, R., Zhou, Z., & Zhu, W. (2020).** Evaluating the effects of tebuconazole on the earthworm (*Eisenia fetida*) by <sup>1</sup>H NMR-based untargeted metabolomics and mRNA assay.

## Références bibliographiques

*Ecotoxicology and Environmental Safety*, 194, Article 110370.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110370>

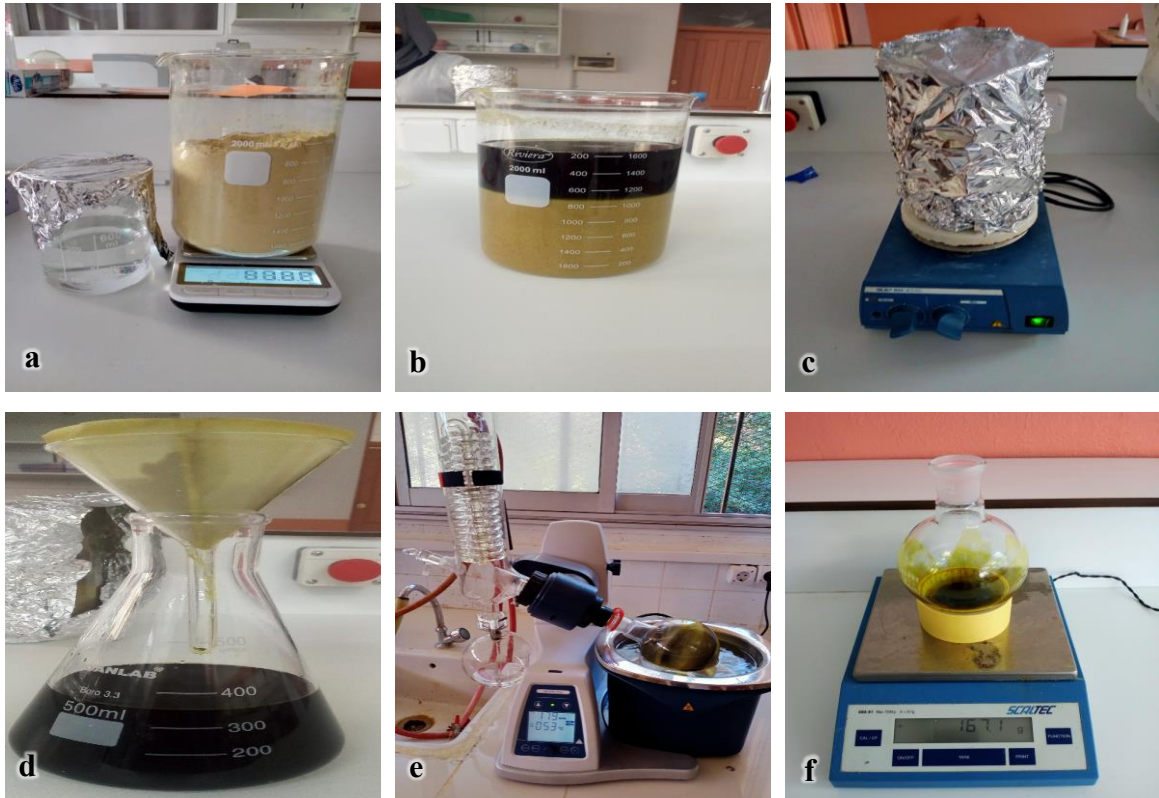
**Zhou, J., Zhang, J., Li, F., et al. (2016).** Triazole fungicide tebuconazole disrupts human placental trophoblast cell functions. *Journal of Hazardous Materials*, 308, 294–302.



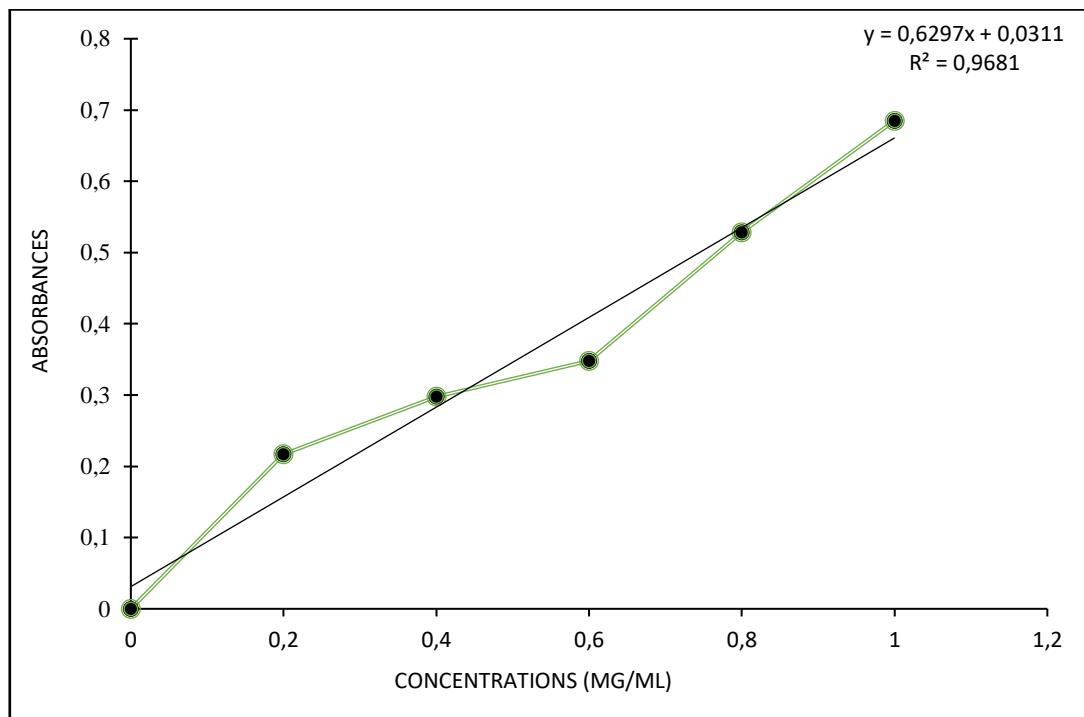
# *Annexes*

## Annexe 1 : Effets toxiques et pharmacocinétique du tébuconazole chez les mammifères (Rats) et les cellules humaines.

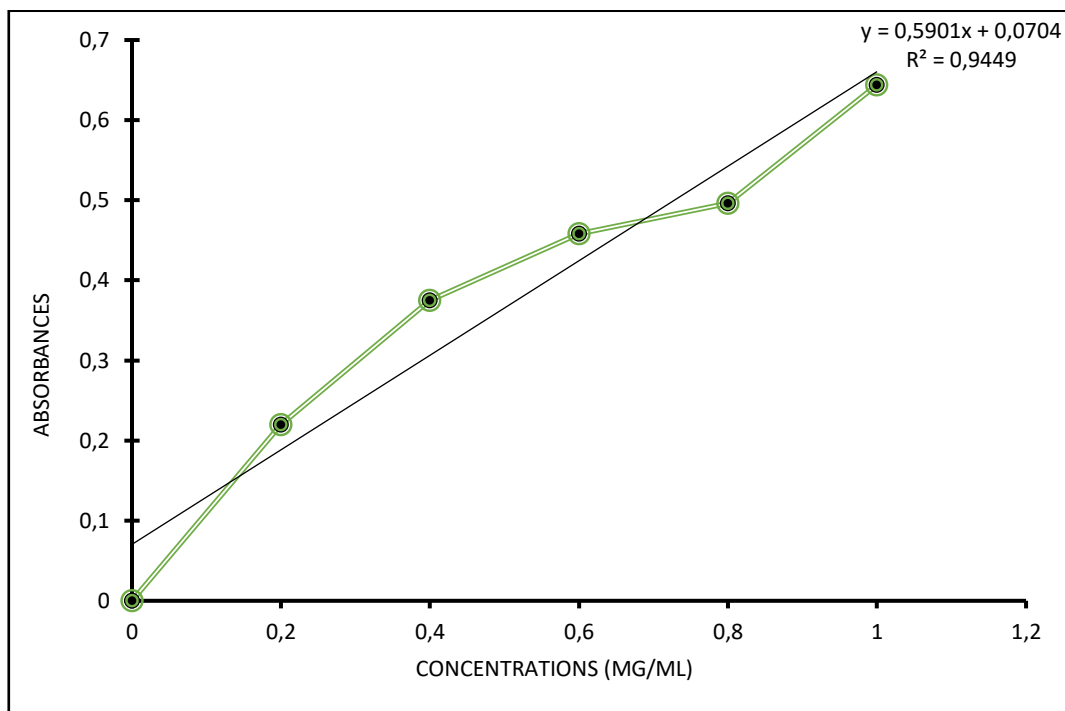
Organisme/Cellules	Effets toxiques	Valeurs/Concentrations	Absorption	Distribution	Métabolisme	Excrétion	Références
<b>Rats Wistar mâles</b>	Perturbation des CYP450, stress oxydatif hépatique/rénal, anomalies spermatiques.	10–50 mg/kg/jour pendant 28 jours.	Absorption gastro-intestinale et cutanée (orale/topique).	Accumulation dans le foie, les reins et les tissus adipeux.	Hydroxylation et oxydation médiées par les CYP450 hépatiques.	Excrétion fécale (60–70 %) et urinaire (30–40 %).	<b>Yang et al., 2018 ; Ben Othmène et al., 2020</b>
<b>Cellules HepG2 (foie humain)</b>	Dommmages à l'ADN, augmentation des protéines p53/p21.	EC <sub>50</sub> (24 h) = 129 µmol/L.	Diffusion passive à travers la membrane cellulaire.	Localisation dans les mitochondries et le réticulum endoplasmique.	Activation des CYP1A1/1A2 via le récepteur AhR.	Non applicable ( <i>in vitro</i> ).	<b>Knebel et al., 2019 ; Barrón Cuenca et al., 2022</b>
<b>Cellules HCT116 (côlon humain)</b>	Apoptose via stress du réticulum endoplasmique (voie ROS-dépendante).	EC <sub>50</sub> (24 h) = 15,4 µmol/L.	Perméabilité membranaire élevée (lipophilicité).	Accumulation dans le cytoplasme et le noyau.	Transformation en métabolites hydroxylés et conjugués (ex. glucuronides).	Non applicable ( <i>in vitro</i> ).	<b>Ben Othmène et al., 2022</b>
<b>Cellules SH-SY5Y (neurones humains)</b>	Perturbation du potentiel membranaire mitochondrial.	100–300 µmol/L (réduction du potentiel mitochondrial).	Absorption passive via la membrane plasmique.	Localisation mitochondriale et réticulum endoplasmique.	Faible métabolisme <i>in vitro</i> ; stabilité chimique élevée.	Non applicable ( <i>in vitro</i> ).	<b>Sanchez et al., 2020</b>
<b>Humains (exposition professionnelle)</b>	Risque de génotoxicité et perturbation endocrinienne.	143,1 ng/kg détectés dans les cheveux.	Absorption cutanée et inhalation dominantes (agriculteurs).	Détection dans le sang, le foie, les reins et les cheveux.	Métabolites hydroxylés (ex. TPs 289-1) et oxydés identifiés.	Excrétion urinaire des métabolites sous 48–72 heures.	<b>Mercadante et al., 2014 ; Polledri et al., 2018</b>
<b>Rats gestants</b>	Réduction du poids fœtal, féminisation des fœtus mâles.	50 mg/kg/jour (exposition gestationnelle).	Transfert placentaire vers le fœtus.	Distribution fœtale préférentielle dans le foie et le cerveau.	Métabolisme maternel réduit ; accumulation de tébuconazole non transformé.	Excrétion fœtale limitée ; rétention tissulaire.	<b>Ying et al., 2021</b>
<b>Lymphocytes bovins</b>	Augmentation des aberrations chromosomiques, réduction de la prolifération.	0,33–1,67 × NOAEC (10–50 mg/kg/jour).	Absorption systémique après exposition <i>in vitro</i> .	Distribution nucléaire et cytoplasmique.	Métabolisme limité <i>in vitro</i> .	Non applicable ( <i>in vitro</i> ).	<b>Siviková et al., 2013</b>



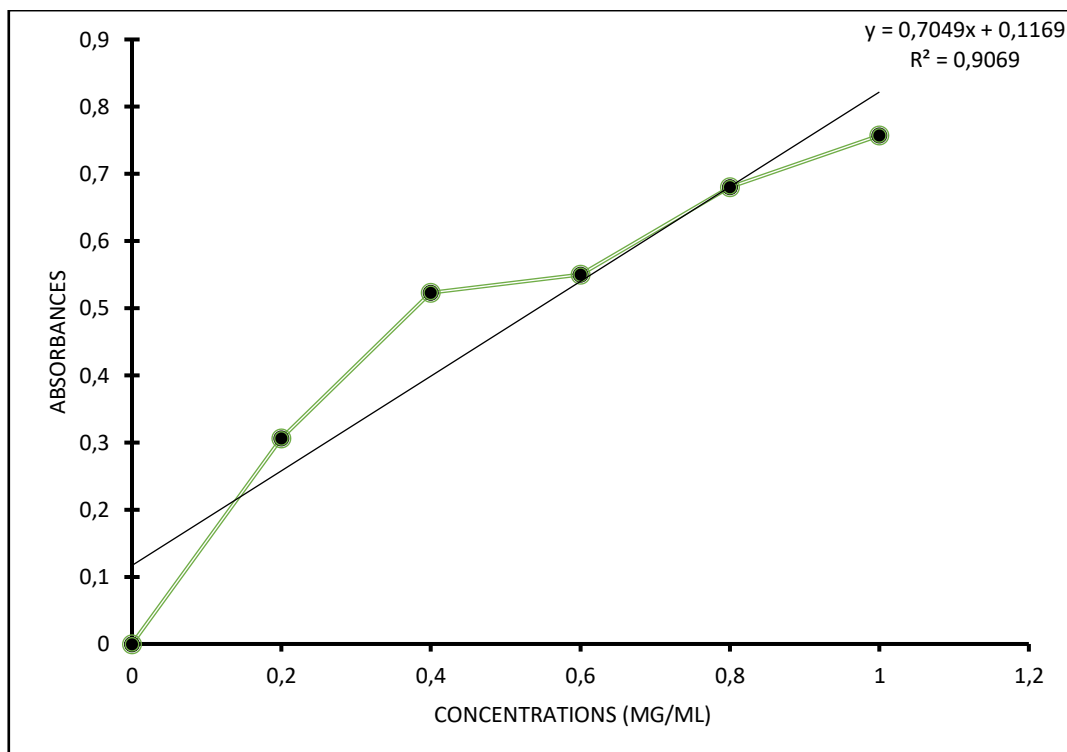
Annexes 2 : Technique d'extraction.



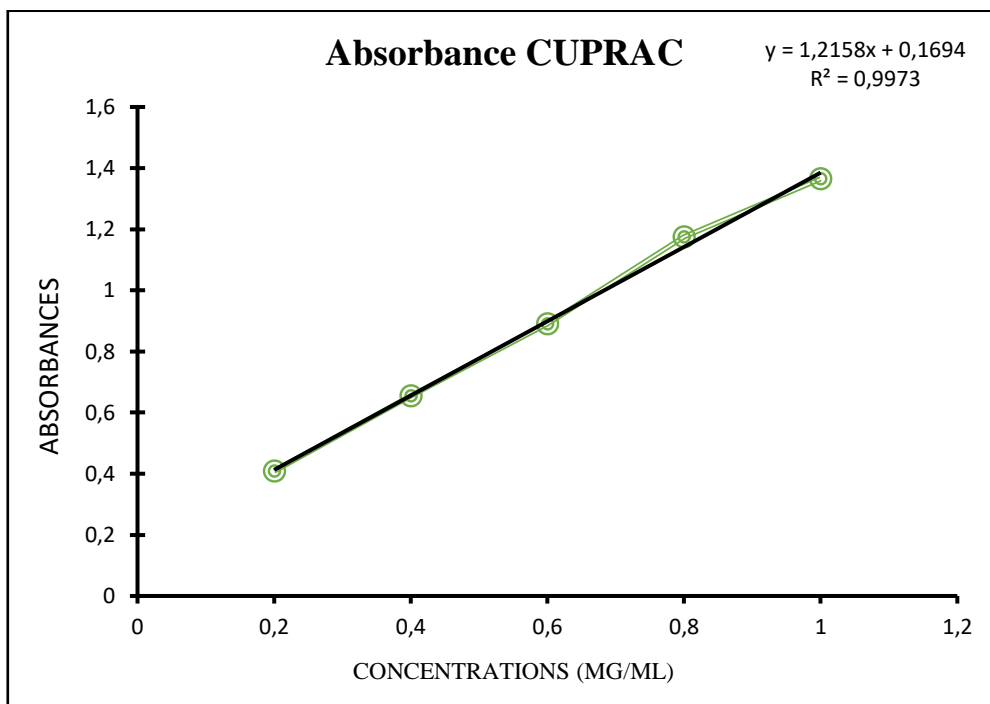
Annexe 3 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique.



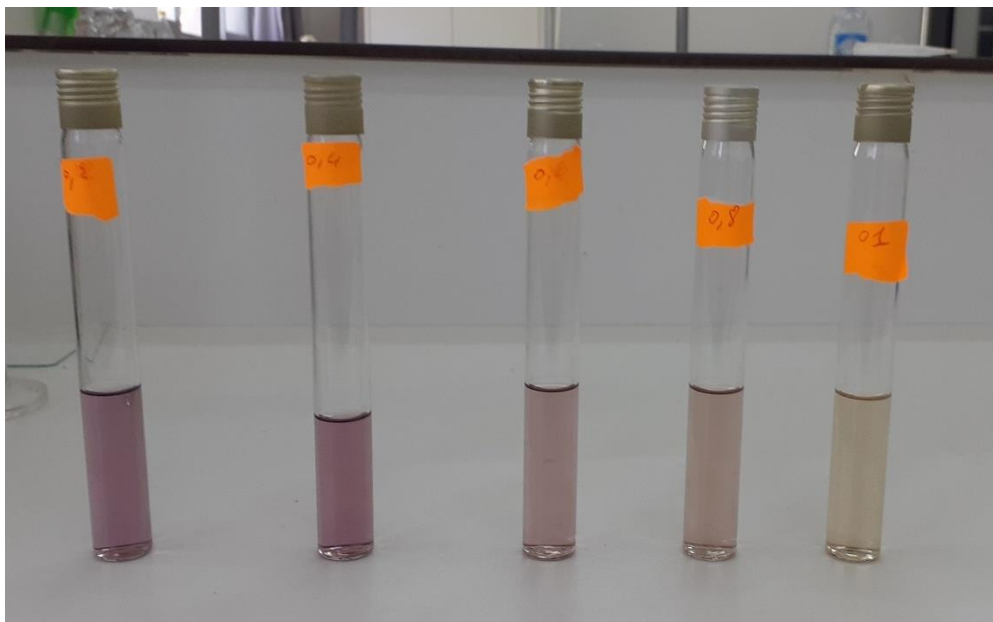
Annexes 4 : Courbe d'étalonnage de la quercétine.




Annexes 5 : Courbe d'étalonnage de l'acide tannique.



Annexes 6 : Courbe d'étalonnage du CUPRAC.



Annexes 7 : Virement de la couleur pour le DPPH dans différentes concentrations.



*Production  
scientifique*

## LC MS/MS Phytochemical analysis of *Ruta montana* and the Hepatic Preventive Effects in male Rats exposed to Tebuconazole

Badis Aouzal<sup>1</sup>, Souheila Slimani<sup>1</sup>, Fatima Kamah<sup>1</sup>, Ismahane Ounissi<sup>1</sup>, Anissa Bouacha<sup>1</sup> and Samira Elmokli<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Research Laboratory of Interactions, Biodiversity, Ecosystems and Biotechnology, Department of Nature and Life Sciences, Faculty of Sciences, University 20 August 1955 Skikda, Skikda 21000, Algeria

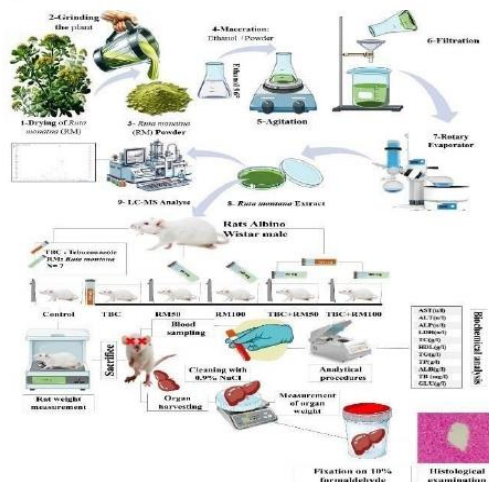
<sup>2</sup>Laboratory of anatomopathology Saad Guermech hospital Skikda 21000, Algeria

Received: 08/10/2024, Accepted: 30/10/2024, Available online: 05/11/2024

\*to whom all correspondence should be addressed: e-mail: badisaouzal@gmail.com

<https://doi.org/10.30955/gnj.06877>

### Graphical abstract



### Abstract

In this investigation, we assessed the phytochemical composition and hepatoprotective properties of *Ruta montana*, a plant indigenous to Algeria, against liver damage provoked by the systemic fungicide tebuconazole in male Wistar rats. We distributed forty-two rats, each weighing an average of  $178 \pm 67.2$  g, into six groups consisting of seven animals each. The first group, serving as the control, received no intervention. The second group underwent treatment with tebuconazole at a concentration of 100 mg/kg. The third and fourth groups were treated with *Ruta montana* extracts at dosages of 50 mg/kg and 100 mg/kg, respectively. The fifth and sixth groups received combined treatments of tebuconazole (100 mg/kg) and *Ruta montana* extracts at 50 mg/kg and 100 mg/kg, respectively. Over a period of 50 days, we administered these treatments via oral gavage. The ethanolic extract of *Ruta montana*, prepared through maceration, underwent analysis using LC-MS/MS, which revealed the presence of nine significant phenolic compounds. The findings demonstrate that exposure to

tebuconazole significantly decreased both body and liver weights, and notably altered levels of hepatic enzymes (AST, ALT), indicative of liver toxicity. In contrast, treatment with *Ruta montana* extract ameliorated these adverse effects, confirming its protective efficacy. Histopathological examinations further substantiated the amelioration of liver tissue damage in rats receiving the plant extract. This research underscores the significant role of bioactive phenolic compounds in *Ruta montana* in mitigating hepatic injuries induced by tebuconazole, thereby highlighting its potential therapeutic benefits.

**Keywords:** *Ruta montana*, LC-MS, Tebuconazole, Rat, Liver.

### 1. Introduction

The liver, being the primary organ responsible for metabolizing foreign substances, is vulnerable to damage that can lead to many disorders including hepatitis, cirrhosis, and hepatocellular cancer. Exposure to various environmental contaminants and chemicals is a significant contributing factor to the development of many illnesses. (Alter, 2006).

Conazole, such as tebuconazole fungicides (TBC), are compounds that belong to the triazole family (Bošković *et al.* 2021). Tebuconazole plays a crucial role in modern agriculture, it's used to manage a diverse range of fungal infections, such as grains, crops, and fruit and vegetables (Li *et al.* 2012; Ben Othmène *et al.* 2020). However, its widespread application has led to potential exposure among mammals (De Rossi *et al.* 2003). Substantial evidence from multiple studies Ben Othmène *et al.* (2020) suggests that exposure to tebuconazole, absorbed through various pathways, may elicit health implications and induce pathological changes across several organs (Goetz *et al.* 2007).

The TBC exposure can cause immunological, neurobehavioral, and neuropathological insufficiency (Ben Saad *et al.* 2017). Some toxicological investigations have revealed that tebuconazole can also lead to elevated chromosomal Occurrences of abnormalities and exchanges between sister chromatids in lymphocytes from the

**Nom Prénom : Aouzal Badis**

**Thème : Modération des effets toxiques du fongicide Tébuconazole par l'extrait de *Ruta montana* chez le rat Wistar.**

**Diplôme de Doctorat en Ecophysiologie Animale**

**Résumé :**

Cette étude se propose d'évaluer le potentiel phytochimique ainsi que les propriétés biologiques de l'extrait éthanolique de *Ruta montana*. L'approche méthodologique intègre une caractérisation approfondie des métabolites secondaires, une évaluation multiparamétrique de ses activités biologiques incluant des tests *in vitro* (capacités antioxydantes, inhibition enzymatique et action antimicrobienne), et une analyse *in vivo* de ses effets protecteurs contre la toxicité hépatique et rénale induite par le tébuconazole (TBC) chez un modèle murin (rats Wistar mâles). En complément, une investigation par modélisation moléculaire *in silico* a été conduite pour prédire les propriétés ADME (absorption, distribution, métabolisme, excrétion) et le profil toxicologique des principaux composés phytochimiques identifiés. L'extraction hydroéthanolique a révélé que le rendement était 11,994 %. La mesure des polyphénols (méthode de Folin-Ciocalteu), les flavonoïdes (par réaction à l' $\text{AlCl}_3$ ) et les tanins (méthode à la vanilline) a mis en évidence des niveaux importants de polyphénols ( $3,31 \pm 0,04$  mg EAG/g ES), de flavonoïdes ( $3,35 \pm 0,10$  mg EQ/g ES) et de tanins ( $1,61 \pm 0,004$  mg EAT/g ES). L'analyse par LC-MS/MS a permis d'identifier neuf composés bioactifs, parmi lesquels l'hespéridine a été quantifiée à 22,86 mg/g. L'extrait a démontré une activité antioxydante significative avec des valeurs d' $\text{IC}_{50}$  de  $0,126 \pm 0,05$  mg/ml pour le DPPH et de  $0,104 \pm 0,04$  mg/ml pour l'ABTS, ainsi qu'un TAC de  $0,291 \pm 0,03$  pour le CUPRAC  $\text{A}_{0.5} = 0,271 \pm 0,08$ . De plus, une activité antimicrobienne a été observée par la méthode de diffusion sur gélose : L'extrait a démontré une forte activité antimicrobienne contre *Escherichia coli* (18,5 mm) et *Klebsiella pneumoniae* (19 mm), avec des zones d'inhibition atteignant 20 mm pour *Pseudomonas aeruginosa*. Les effets anti-inflammatoires (évalués via le modèle d'œdème auriculaire induit par le xylène) et analgésiques (mesurés par le test d'immersion de la queue) ont été testés *in vivo* sur des rats Wistar. L'administration de l'extrait de RM à 100 mg/kg a réduit l'épaisseur de l'oreille de 38,23 % ( $p < 0,05$ ) après 90 minutes, un effet comparable à celui de l'aspirine. Par ailleurs, le test d'immersion de la queue a mis en évidence un effet analgésique dose-dépendant, se traduisant par un prolongement du temps de latence de réaction jusqu'à 4,0 secondes ( $p < 0,05$ ). L'étude de l'évaluation de l'effet modérateur de notre extrait a été réalisée sur un total de 42 rats mâles ayant un poids moyen de  $178 \pm 67,2$  g, qui ont été répartis en six groupes composés de sept animaux chacun. Un groupe témoin, un groupe TBC traité par 100 mg/kg de tébuconazole. Le troisième (RMI) et le quatrième groupe (RMII) ont été traités par 50 mg/kg et 100 mg/kg de l'extrait de *Ruta montana* respectivement. Le groupe cinq (TBC+RMI) et le groupe six (TBC+RMII) ont été traités par la combinaison de tébuconazole et l'extrait de *Ruta montana*. Après 50 jours du traitement oral des rats, un dosage hématologique, biochimique et hormonal a été réalisé en plus, d'un spermogramme et une étude histologique. Nos résultats ont montré clairement que le TBC provoque une hépatotoxicité (augmentation des AST, ALT, ALP), une néphrotoxicité (hausse de la créatinine et de l'urée), une perturbation hormonale (diminution de la testostérone) et des lésions histologiques (foie, reins, testicules). L'administration de la combinaison (TBC + RM) a montré une récupération de ces paramètres. Les analyses *in silico* réalisées via SwissADME et pkCSM ont confirmé la biodisponibilité et la sécurité des composés de RM. Cette étude démontre clairement que l'extrait de *Ruta montana* possède un potentiel antioxydant, anti inflammatoire, et antimicrobien avec un pouvoir modérateur efficace contre la toxicité induite par le Tébuconazole, soulignant son potentiel thérapeutique en tant qu'agent protecteur naturel.

**Mots-clés :** *Ruta montana*, LCMS, Activités biologiques *in vitro*, Rats, Tébuconazole, Toxicité hépatorenale, Test *in silico*

**Université 20 août 1955- Skikda**

**2024-2025**