

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université Ferhat Abbas Sétif 1
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة فرحات عباس، سطيف 1
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

N°/SNV/2018

THÈSE

Présentée par

ALLOUNI Rima

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Filière: SCIENCES BIOLOGIQUES

Spécialité: BIOCHIMIE

THÈME

**Etude des aspects morphologiques, phytochimiques et pharmaco-
toxicologiques de la plante *Ruta montana***

Soutenue publiquement le **30/06/2018**

DEVANT LE JURY

Président	Bounechada Mustapha	Pr. UFA Sétif 1
Directeur	Bouzidi Abdelouahab	Pr. UFA Sétif 1
Examineurs	Lalaoui Korichi	Pr. U. Constantine
	Battache Azzedine	MCA. U. Bejaia
	Touati Noureddine	MCA. U. BBA

Année Universitaire 2017/2018

Remerciements

*Mes plus vifs remerciements s'adressent d'abord à mon directeur de la thèse, le Professeur **BOUZIDI Abdelouahab**, de m'avoir accordé l'honneur de diriger ce travail, par leurs conseils pertinents, leur aide et la constante disponibilité dont il a fait preuve pour suivre le cheminement de ce travail, qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude et de mon plus profond respect.*

*Je tiens tout particulièrement à remercier vivement Monsieur **BOUNECHADA. M**, Professeur à l'Université de Sétif et Chef de département des études de Base, d'avoir accepté de présider le jury.*

*Remerciement tout particuliers également à Monsieur **LALAOUI. K**, Professeur à l'Université de Constantine, d'avoir accepté d'examiner et de juger ce travail.*

*Mes vifs remerciements s'adressent à Monsieur **Battache .A**, Maître de conférence à L'université de Bejaia, pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant d'examiner et de juger ce travail.*

*J'exprime mes sincères remerciements à Monsieur **Touati N**, Maître de conférence à l'Université de Bordj Bou Arreridj, d'avoir accepté d'examiner et de juger ce travail.*

*Mes remerciements s'adressent à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail, plus particulièrement Mr **El Eulmi** et Mr **Madi** de l'institut de Pasteur-Alger, Mr **Benbacha** à l'Hôpital de BBA, Mme **Omran MA** à Université de Sétif, Mr **Nacer Eddin** de l'Université BBA, les ingénieures de laboratoire à l'Université de BBA **Sabrina** et **Affef**, l'ingénieur de laboratoire **Samir** à l'Université de Sétif, à mes collègues de la promotion.*

Dédicaces

Je dédie cette thèse

Aux êtres les plus chers : Mes parents,

A mon cher père,

Mon plus haut exemple et mon modèle de persévérance pour aller toujours de l'avant et ne jamais baisser les bras. Pour son enseignement continu à m'inculquer les vraies valeurs de la vie et pour ses précieux conseils.

Puisse cette thèse symboliser le fruit de tes longues années de sacrifices consentis pour mes études et mon éducation.

Puisse Dieu, le tout puissant, te protéger et t'accorder meilleure santé et longue vie afin que je puisse te rendre un minimum de ce que je te dois.

J'espère que cette thèse sera à la hauteur de tes attentes.

A ma chère mère,

Je ne trouve pas les mots pour traduire tout ce que je ressens envers une mère exceptionnelle dont j'ai la fierté d'être la fille.

*Que ce travail soit un hommage aux énormes sacrifices que tu t'es imposées afin d'assurer mon bien être, et que Dieu tout puissant, préserve ton sourire et t'assure une bonne santé et une longue vie afin que je puisse te consacrer
à mon amour.*

A mon marie, Fayssal pour leur encouragement, sa compréhension et son aide

A mes fils Younes Saïf Elislam et Mouatez Loay.

A mes chères sœurs et cher frère: Sabrina, Imene, Rahma, Hadil et Abdelkrim

A ma unique et formidable amie Hassina

A mes collègues et tous ceux et toutes celles que j'ai involontairement omis citer et qui n'en demeurent pas moins chers

الملخص

تعد نبتة *Ruta montana* المعروفة باسم فيدجل كنبات طبي، وتستخدم في الطب الجزائري التقليدي كمحفز ومعدل للطمث، مضاد للتشنج ومسكن. وقد أمكننا من خلال الفحص الكيميائي النباتي التأكد من وجود قلويدات، الكومارين، التانان و ثلاثي التربينات و غياب السابونوزيد و الأونتوسيان وقد تم اختبار مستخلصات مختلفة من *Ruta montana* لأنشطتها المضادة للأكسدة، والمضادة للبكتيريا والمضادة للفطريات. وكشف تقييم النشاطية المضادة للأكسدة بواسطة طريقتين (محاصرة DPPH و FRAP) مخبريا أن مختلف المستخلصات ذات نشاط عال وذلك كمضادات للأكسدة ، في حين أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها من الاختبارات المضادة للجراثيم أقطار مناطق تثبيط تتجاوز 18 ملم (B.) عالية للبكتيريا للعوامل المختبرة. أظهرت دراسة تأثير مضاد للفطريات للمستخلصات المختلفة خصوصية ملحوظة لفطر *Aspergillus niger* على فطر *Fusarium oxysporum* لكل من البذور و الأوراق على تأثير القلويدات الكلية. أجريت دراسة لتقييم السمية الحادة والشبه الحادة للقلويدات الكلية المستخلصة من الأجزاء العلوية لنبات *Ruta montana* عند كل من الفئران ذكور و إناث من سلالة *Swiss Albinos*. وقد سمحت لنا طرق الحساب والرسوم البيانية المختلفة من تحديد DL_{50} عند الفئران الذكور والإناث، والتي تقدر ب $372,6 \pm 13,7$ ملغ / كغ و $217 \pm 8,3$ ملغ / كغ على التوالي. يتم تقييم السمية الحادة عن طريق الجرعات $129,68$ مغ / كغ و $75,23$ ملغ / كغ (DL_{50} 3/1) لدى الفئران الذكور والإناث الفئران على التوالي وذلك تحت الصفاق حيث سجل عند الذكور انخفاض معنوي في الوزن النسبي للرتنين بعد 24 ساعة و في الكبد بعد خمسة أيام، في حين لوحظ انخفاض معنوي في الوزن النسبي للرتنة وزيادة معنوية في وزن الكبد بعد 24 ساعة عند الإناث. لم يتغير كل من (ALAT, ASAT, PAL الكرياتينين واليوريا) بشكل معنوي عند الفئران الذكور والإناث. كما أظهرت معاملات الدم (الكريات الدموية البيضاء، نسبة الخلايا للمفاوية و GRA, CCMH) ارتفاعا معنويا وانخفاض معنوي في متوسط الحجم الكلي بعد 24 ساعة عند الفئران إناث، في حين لم يتم تسجيل أي شيء في الخصائص الدموية للذكور. دراسة السمية الشبه الحادة على الفئران الذكور والإناث المعالجة بالقلويدات الكلية لنبات *Ruta montana* بجرعة $19,425$ ملغ / كغ و $11,28$ ملغ / كغ (DL_{50} 20/1) على التوالي لمدة 28 يوما، أظهرت زيادة كبيرة في الكتلة النسبية للخصيتين عند الفئران الذكور والطحال لدى الفئران الإناث على التوالي مع انخفاض في وزن كبد الفئران الذكور، لم يلحظ أي تغيير في قيم اليوريا، والكرياتينين و (ALT, AST, PAL) عند الفئران الذكور ، ولكن كان هناك انخفاض ملحوظ في الفوسفاتيز القلوي عند إناث الفئران، زيادة كبيرة في خلايا الدم الحمراء و GRA لدى الفئران الذكور والإناث على التوالي. وتوضح المقاطع النسجية للكبد و الكلي والدماغ ازدحام كلوي وكبدية مع وأورام دماغية لدى الفئران الذكور والإناث.

الكلمات المفتاحية: *Ruta montana* ، القلويدات الكلية، DL_{50} ، السمية الحادة ، السمية الشبه الحادة، الفئران.

Résumé

Ruta montana communément appelé Fidjel est connue comme plante médicinale, utilisée dans la médecine traditionnelle Algérienne comme emménagogue, antispasmodique et rubéfiant. Le screening phytochimique nous a permis de confirmer la présence des alcaloïdes, des coumarines, des tanins, des stérols et des triterpènes et l'absence des saponosides et des anthocyanes. Les différents extraits de *Ruta montana* ont été testés pour leur activité antioxydante, antibacérienne et antifongique. L'évaluation du pouvoir antioxydant par deux méthodes (piégeage de DPPH[•] et FRAP) a révélé *in vitro* des capacités antioxydantes chez tous les extraits, cependant les résultats des tests antibactériens obtenus ont mis en évidence des zones d'inhibition de diamètres dépassant 18 mm, pour les quatre souches bactériennes (*B. cereus*, *S. aureus*, *S. typhimurium* et *E. coli*) concernant toutes les extraits étudiées, suggérant une forte sensibilité des bactéries aux extraits testés. L'étude de l'effet antifongique des différents extraits a montré une spécificité très marquée pour le champignon *Aspergillus niger* plus que le champignon *Fusarium oxysporum* aussi bien pour les graines et les feuilles que pour les alcaloïdes totaux. Une étude est effectuée pour évaluation de la toxicité aigue et subaigüe des alcaloïdes totaux des parties aériennes de *Ruta montana* sur des souris *Swiss albinos* de sexe mâle et femelle. Les différentes méthodes de calcul et graphique nous a permis de déterminer la DL₅₀ chez les souris mâles et femelles, qui est estimée à 372, 6 ± 13,7 mg/kg et 217 ± 8, 3 mg/kg respectivement. La toxicité aigue est évaluée par l'administration de la dose 1/3 de la DL₅₀ (129, 68 mg/kg et 75, 23 mg/kg) chez les souris mâles et femelles respectivement par voie intrapéritoniale et par simple application a permis d'enregistrer chez les souris mâles une diminution significative de la masse relative des poumons après 24h et 5^{ème} jour et du foie après le 5^{ème} jour. Chez les souris femelles, nous avons constaté une diminution des poumons et une augmentation du foie significative après 24h. Les paramètres sériques (ASAT, ALAT, PAL, Urée et Créatinine) n'ont connu aucun changement significatif chez les souris mâles et femelles. Les paramètres sanguins (GB, CCMH, LYM et GRA) ont connu une augmentation significative et une diminution du VGM après 24h chez les souris femelles, alors rien n'a été enregistré dans les paramètres hématologiques des souris mâles. L'étude de la toxicité subaigüe chez les souris mâles et femelles traitées par des alcaloïdes totaux de *Ruta montana* avec les doses de 1/20 de la DL₅₀ (19,425 mg/kg et 11,28 mg/kg) respectivement pendant 28 jours, a montré une augmentation significative dans la masse relative des testicules chez les souris mâles et de la rate chez femelles avec une diminution de la masse du foie chez les souris mâles. Aucun changement significatif dans les valeurs de l'urée, créatinine et des transaminases hépatiques (ASAT et ALAT et PAL) du sérum des souris mâles, cependant on a enregistré une diminution significative de la phosphatase alcaline dans le sérum des souris femelles, une augmentation significative des globules rouge chez les souris mâles et des granulocytes chez les souris femelles. Des congestions rénales et hépatiques avec des œdèmes cérébraux sont observées sur les coupes histologiques des reins, du foie et du cerveau des souris mâles et femelles.

Mots clés : *Ruta montana*, alcaloïdes totaux, DL₅₀, toxicité aigue, toxicité subaigüe, souris.

Abstract

Ruta montana commonly known as Fidje is known as a medicinal plant, used in traditional Algerian medicine as an emmenagogue, antispasmodic and rubefacient. Phytochemical screening allowed us to confirm the presence of alkaloids, coumarins, tanins, sterols and triterpenes and the absence of saponosides and anthocyanins. The various extracts of *Ruta montana* were tested for their antioxidant, antibacterial and antifungal activity. The evaluation of the antioxidant capacity by two methods (DPPH[·] and FRAP) revealed *in vitro* antioxidant capacities in all extracts, however the results of the antibacterial tests obtained showed zones of inhibition with diameters exceeding 18 mm for the four bacterial strains (*B. cereus*, *S. aureus*, *S. typhimurium* and *E. coli*) for all extracts studied, suggesting a high sensitivity of the bacteria to the extracts tested. The study of the antifungal effect of the various extracts showed a very marked specificity for the fungus *Aspergillus niger* more than the fungus *Fusarium oxysporum* as well for the seeds and the leaves as for the total alkaloids. A study is carried out to evaluate the acute and subacute toxicity of total alkaloids from the aerial parts of *Ruta montana* in male and female *Swiss albinos* mice. The different calculation and graphing methods allowed us to determine the LD₅₀ in male and female mice, which is estimated at 372.6 ± 13.7 mg/kg and 217 ± 8.3 mg/kg respectively. The acute toxicity is evaluated by the administration of the dose 129.68 mg/kg and 75.23 mg/kg (1/3 of the LD₅₀) in the male and female mice respectively intraperitoneally and by simple application allowed in male mice to a significant decrease in the relative mass of the lungs after 24 and 5th day and in liver after 5th day in male mice however, in female mice we found a significant decrease in lungs and significant increase in liver after 24h. Serum parameters (ASAT, ALT, PAL, Urea and Creatinine) did not change significantly in male and female mice. The blood parameters (GB, MCHC, LYM and GRA) showed a significant increase and a significant decrease in VGM after 24h in female mice, whereas no thing was recorded in the hematological parameters of the male mice. The subacute toxicity study in male and female mice treated with total alkaloids of *Ruta montana* with doses of 19.425 mg/kg and 11.28 mg/kg (1/20 of the LD₅₀) respectively for 28 days, showed a significant increase in the relative mass of testes in male mice and spleen in female mice with a decrease in liver mass in male mice, no significant change in urea, creatinine and liver transaminase values (ASAT and ALAT and PAL) in serum from male mice, however there was a significant decrease in serum alkaline phosphatase in female mice, a significant increase in red blood cells in male mice and granulocytes in female mice. Renal and hepatic congestions with cerebral edema are observed on histological sections of the kidneys, liver and brain of male and female mice.

Keywords : *Ruta montana*, total alkaloids, LD₅₀, acute toxicity, subacute toxicity, mices.

Liste des abréviations

(*): Différence Significative ($p < 0,05$).

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ANOVA : Analyse de Variance

ALAT : Alanine Amino Transférase

ASAT : Aspartate Amino Transférase

CCM: Chromatographie sur Couche Mince

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

DMSO : Diméthyle Sulfoxyde

DL50: Dose Létale 50

DPPH : 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl

EAT : Extrait des Alcaloïdes Totaux

EBF : Extrait Brut des Feuilles

EBG : Extrait Brut des Graines

EC50 (IC50): Concentration Effective à 50%

EDTA : Éthylène Diamine Tétra-Acétique

ERO : Espèce Réactive d'Oxygène

FNS : Formule Numérique Sanguine

FRAP : Ferric Reducing Antioxidant Power

HCT: Hématocrite.

HGB: Hémoglobine.

IP : IntraPéritonial

GPx : Glutathion réductase

GRA : Granulocytes.

LYM : Lymphocytes.

MCH : Teneur Corpusculaire en Hémoglobine.

MCHC (CCMH): Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine.

MCV (VGM): Volume Globulaire Moyen

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

PDA : Potato Dextrose Agar

PI : Pourcentage d'Inhibition

PLT : Plaquettes.

RBC : Red Blood Cells.

RDW : Measure de l'homogénéité de la taille de globule rouge (indice d'anisocytose).

SD: Standard Deviation

SEM: Standard Error of Mean

SOD : Super Oxyde Dismutase

WBC: Wight Blood Cells.

UV : Ultra-Violet.

XO : Xanthine Oxydase

χ^2 : Khi-deux

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction	1
Partie I : Synthèse bibliographique	2
Chapitre 1 : La plante <i>Ruta montana</i>	2
1.1.Position dans la systématique	2
1.2.Description botanique.....	3
1.3.Origine, habitat et distribution géographique	4
1.4.Les variétés ornementales et appellations	5
1.5.Usages dans la médecine traditionnelle.....	6
1.6.Toxicité de la plante	7
1.7.Composition chimique.....	9
Chapitre2. Activités biologiques	20
2.1. Activité antioxydante.....	20
2.1.1. Le stress oxydant	20
2.1.2. Les radicaux libres.....	20
2.1.3. Les antioxydants	24
2.2. Activité Antimicrobienne	24
2.2.1. Généralités sur les bactéries étudiées	25
2.2.2. Généralités sur les champignons étudiés	27
2.2.3. Les agents antibactériens et antifongiques	28
Chapitre 3. L'étude toxicologique	29
3.1. Le model animal choisi (souris)	29
3.2.Toxicité aigue	29
3.3.Toxicité subaigüe.....	31

3.4.Symptômes toxiques dans les études de toxicité aiguë et subaiguë	31
3.5.La prise en charge d'un xénobiotique par l'organisme	31
3.6.Le Foie : organe de métabolisation	32
3.6.1.Macroscopiquement	33
3.6.2.Microscopiquement	34
3.6.3.Hépatotoxicité.....	36
3.6.4.Tests de la fonction hépatique	37
3.7.Le rein : organe d'épuration	38
3.7.1.Macroscopiquement	38
3.7.2.Microscopiquement	40
3.7.3.Néphrotoxicité	41
3.7.4.Tests de la fonction rénale.....	42
Partie II Matériels et Méthodes	43
1. Matériel	43
1.1. Matériel Végétal	43
1.2. Les souches microbiennes utilisées	44
1.3. Molécules de références : antibiotiques.....	45
1.4. Matériel animal.....	46
2. Méthodes	46
2.1. Screening phytochimique	46
2.2. Extraction	46
2.2.1. Préparation de l'extrait méthanolique.....	46
2.2.2. Préparation de l'extrait alcaloïdique.....	47
2.3. Chromatographie sur couche mince (CCM).....	50
2.4. Les tests biologiques <i>in vitro</i>	50
2.4.1. Test de l'activité antioxydante.....	50
2.4.1.1. Piégeage du radical libre DPPH	50
2.4.1.2. Réduction du fer : FRAP	51

2.4.2. Test de l'activité antimicrobienne	51
2.4.2.1. Activité Antibactérienne.....	52
2.4.2.2. Activité Antifongique	53
2.5. Les tests biologiques <i>in vivo</i>	54
2.5.1. Détermination de la DL ₅₀ chez les souris mâles et femelles.....	54
2.5.2. Toxicité aigue chez les souris mâles et femelles	55
2.5.3. Toxicité subaigüe chez les souris mâles et femelles.....	56
2.5.4. Etude de quelques paramètres hématologiques et biochimiques sériques	57
2.6. Analyses statistiques.....	57
Partie III Résultats	58
1. Screening phytochimique	58
2. Rendement des extractions	59
3. Chromatographie sur couche mince	60
4. Activité antioxydante.....	62
4.1. Piégeage du radical 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl (DPPH)	62
4.1.1. Evaluation de l'IC ₅₀	65
4.2. Pouvoir réducteur de l'ion ferrique (FRAP).....	66
5. Evaluation de l'activité antimicrobienne	68
5.1. Le potentiel antimicrobien des extraits de <i>Ruta montana</i>	68
5.2. Evaluation de l'activité antifongique.....	71
6. Etude toxicologique.....	76
6.1. Détermination de la DL ₅₀ chez les souris mâles.....	76
6.1.1. Observation du comportement et tableau cliniques des animaux.....	76
6.1.2. Calcul de la DL ₅₀ chez les souris mâles.....	76
6.2. Détermination de la DL ₅₀ chez les souris femelles.....	82
6.2.1. Observation du comportement et tableau clinique des animaux	82
6.2.2. Calcul de la DL ₅₀ chez les souris femelles	82
6.3. La sensibilité du sexe.....	89

6.4.Toxicité aigue chez les souris mâles et femelles	91
6.4.1.Evolution pondéral	91
6.4.2.Masses relatives des organes	92
6.4.3.Etude des paramètres biochimiques	93
6.4.4.Etudes des paramètres hématologiques	95
6.4.5.Évaluation histopathologique	97
6.5.Toxicité subaigüe.....	100
6.5.1.Évolution pondérale.....	100
6.5.2.La masse relative des organes	101
6.5.3.Etude des paramètres biochimiques	102
6.5.4.Etude des paramètres hématologiques.....	105
6.5.5.Examen anatomopathologique	106
PartieVI : Discussion	109
1.Screening phytochimique	109
2.Rendement	110
3.Chromatographie sur couche mince (CCM).....	111
4.Activité antioxydante (DPPH-FRAP)	112
5.Acticité antibactérienne	114
6.Acticité antifongique	116
7.Dose létale médiane chez les souris mâles et femelles.....	117
8.Toxicité aigue chez les souris mâles et femelles	119
9.Toxicité subaigüe chez les souris mâles et femelles.....	122
Conclusion	124
Références bibliographiques	
Annexes	126

Liste des figures

Figure1: La plante <i>Ruta montana</i> L	4
Figure 2: Structure de Chalépensine (A) et Chalépine (B) isolés du <i>Ruta montana</i> de l'Espagne.....	10
Figure 3 : Structure de Rutolide isolé du <i>Ruta montana</i> d'Australie.....	10
Figure 4: Structure de Psoralène (A) et Bergaptène (B) isolés du <i>Ruta montana</i> de l'Espagne	1
Figure 5 : Structure de Rutamarine (A), Xanthotoxine (B),.....	10
Umbelliferone (C), Daphnoretin Méthyl ether (D) et Daphnoretine (E) isolés du <i>Ruta montana</i> de l'Espagne	11
Figure 6 : Structure de Scopoletine isolé du <i>Ruta montana</i> d'Ex. URSS	11
Figure 7 : Structure de Rutine isolé du <i>Ruta montana</i> du Turquie et de Quercétol isolé du <i>Ruta graveolens</i> de Pologne	12
Figure 8 : Structure de Savinine et Saventinine isolés du <i>Ruta graveolens</i>	12
Figure 9 : Quelques alcaloïdes typiques des Rutacées formés à partir de l'acide anthranilique et de l'acétyl coenzyme A.....	13
Figure 10 : Structure de 3-Hydroxy 2-quinoline (A) et Montanine (B) et 4methoxyquinaldine (C) isolés du <i>Ruta montana</i> du Turquie	15
Figure 11 : Structure de 1-méthyl-4- methoxy-2- quinolone (A), Evolitrine (B), 2-(nonan-8-one) –4- methoxy- quinoline (C), 2- (nonan-8- one) –(1H)-4- quinolone (D), et 2-(nonan-8-one) –N methyl-4- quinolone (E) et 2-(decan-9-one)-N-méthyl-4-quinolone (F) isolés du <i>Ruta montana</i> de Maroc.....	16
Figure 12: Cibles moléculaires dans une bactérie (A) et les cellules animales et humaines (B) qui peuvent être affectées par des produits naturels.....	18
Figure 13: Modulation agoniste ou antagoniste des neurorécepteurs par des alcaloïdes mimant les neurotransmetteurs (L'interaction aux récepteurs sérotoninergiques qui lient la sérotonine).....	19
Figure 14 : Origine extra- et intracellulaire des radicaux libres oxygénés.....	22

Figure 15 : Mécanisme d'action des radicaux libres.....	23
Figure 17: Les quatre lobes principaux du foie.....	34
Figure 18: Représentation de la structure d'un lobule du foie. (A) Coupe histologique, (B) Représentation schématique de l'organisation d'un lobule.....	36
Figure 19 : Les reins de la souris sont situés de chaque côté de la colonne vertébrale et les glandes surrénales sont présentes au pôle crânien de chaque rein	39
Figure 20 : Schéma de la coupe longitudinale d'un rein.....	41
Figure 21 : La plante <i>Ruta montana</i>	43
Figure 22 : Localisation géographique de la zone de récolte.....	44
Figure 23: Protocole de préparation des extraits méthanoliques de la plante par macération	47
Figure 24 : Extraction des alcaloïdes totaux du <i>Ruta montana</i>	49
Figure 25 : Séparation des différents extraits de <i>Ruta montana</i> par CCM sous UV.....	61
Figure 26 : Chromatogramme des différents extraits de <i>Ruta montana</i> après révélation	61
Figure27: Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.....	63
Figure 28 : Profils de l'activité antiradicalaire (testes DPPH [•]) de l'extrait brut des feuilles et de l'acide ascorbique	64
Figure 29: Activité antioxydante exprimé en pourcentage d'inhibition du DPPH [•] par l'extrait méthanolique des graines de <i>Ruta montana</i> et l'acide ascorbique.....	64
Figure 30: Profils de l'activité antiradicalaire (teste de DPPH [•]) des alcaloïdes totaux de <i>Ruta montana</i> et de l'acide ascorbique	65
Figure 31 : Pouvoir réducteur de l'extrait méthanolique des feuilles de <i>R. montana</i> et standard en fonction de concentration.....	66
Figure 32 : Pouvoir réducteur de l'extrait méthanolique des graines de <i>Ruta montana</i> et l'acide ascorbique.....	67
Figure 33: Pouvoir réducteur des alcaloïdes totaux de <i>Ruta montana</i> et de l'acide ascorbique	67
Figure 34 : Effet antibactérien de différents extraits de <i>Ruta montana</i>	70
Figure 35 : Activité antifongique des alcaloïdes totaux (A) et des extraits bruts des graines (B) et des feuilles (C) de <i>Ruta montana</i> contre <i>Aspergillus niger</i>	73

Figure 36 : Activité antifongique des alcaloïdes totaux (A) et des extraits bruts des graines (B) et des feuilles (C) de <i>Ruta montana</i> contre <i>Fusarium oxysporum</i>	74
Figure 37 : Effet des extraits (A : extrait brut des graines; B : extrait brut des feuilles; C : extrait alcaloïdique) contre l' <i>Aspergillus niger</i> et <i>Fusarium oxysporum</i>	75
Figure 38: Courbe caractérisant la relation dose-réponse pour la détermination des paramètres létaux chez les souris mâles traitées par simple application avec les alcaloïdes totaux de <i>Ruta montana</i>	78
Figure 39 : Courbe exprimant la mortalité des souris mâles (en unités probits) selon Miller et Tainter	80
Figure 40: Courbe exprimant le pourcentage de mortalité des souris mâles en fonction de dose selon Trevan (1927)	81
Figure 41 : Courbe caractérisant la relation dose-réponse pour la détermination des paramètres létaux chez les souris mâles traitées par simple application avec les alcaloïdes totaux de <i>Ruta montana</i>	82
Figure 42 : Courbe caractérisant la relation dose-réponse pour la détermination des paramètres létaux chez les souris femelles traitées par les alcaloïdes totaux de <i>Ruta montana</i>	84
Figure 43 : Courbe exprimant la mortalité des souris femelles (en unités probits) selon Miller et Tainter, (1944).....	86
Figure 44 : Courbe exprimant le pourcentage de mortalité des souris femelles en fonction de dose selon Trevan (1927)	87
Figure 45 : Courbe caractérisant la relation dose-réponse pour la détermination des paramètres létaux chez les souris femelles traitées par simple application avec les alcaloïdes totaux de <i>Ruta montana</i>	88
Figure 46: La sensibilité de sexe entre les souris mâles et femelles	89
Figure 47: Effet des alcaloïdes totaux des parties aériennes de <i>Ruta montana</i> (129,68 mg/kg \approx 1/3 DL ₅₀) sur quelques paramètres biochimiques de la fonction hépatique chez les souris mâles dans les conditions de la toxicité aiguë.....	93
Figure 48: Effet des alcaloïdes totaux des parties aériennes de <i>Ruta montana</i> (75,23 mg/kg \approx 1/3 DL ₅₀) sur quelques paramètres biochimiques de la fonction hépatique chez les souris femelles dans les conditions de la toxicité aiguë.....	94

Figure 49: Effet des alcaloïdes totaux des parties aériennes de <i>Ruta montana</i> (129,68 mg/kg \approx 1/3 DL ₅₀) sur quelques paramètres biochimiques de la fonction rénale chez les souris mâles dans les conditions de la toxicité aiguë	94
Figure 50: Effet des alcaloïdes totaux de <i>Ruta montana</i> (75,23mg/kg \approx 1/3 DL ₅₀) sur quelques paramètres biochimiques de la fonction rénale chez les souris femelles dans les conditions de la toxicité aiguë	95
Figure 51: Coupe histologique du tissu rénal des souris mâles témoins (A) et traitées dans les conditions de la toxicité aiguë par la dose de 129,68 mg/kg (\approx 1/3 de DL ₅₀) d'alcaloïdes totaux de <i>Ruta montana</i> (B: après 24 heures et C: après 5 jours).	98
Figure 52: Coupe histologique du tissu hépatique des souris mâles témoin (A) et traitées dans les conditions de la toxicité aiguë par la dose de 129,68 mg/kg (\approx 1/3 de DL ₅₀) d'alcaloïdes totaux de <i>Ruta montana</i> (B: après 24 heures et C: après 5 jours)	98
Figure 53 : Coupe histologique du tissu cérébral des souris mâles témoins (A) et autres traitées dans les conditions de la toxicité aiguë par la dose de 129,68 mg/kg (\approx 1/3 de DL ₅₀) d'alcaloïdes totaux de <i>Ruta montana</i> (B: après 24 heures et C: après 5 jours).....	98
Figure 54: Coupe histologique du tissu rénal des souris femelles témoins (A) et autres traitées dans les conditions de la toxicité aiguë par la dose de 75,23 mg/kg (\approx 1/3 de DL ₅₀) d'alcaloïdes totaux de <i>Ruta montana</i> (B: après 24 heures et C: après 5 jours)	99
Figure 55: Coupe histologique du tissu hépatique des souris femelles témoins (A) et traitées dans les conditions de la toxicité aiguë par la dose de 75,23 mg/kg (\approx 1/3 de DL ₅₀) d'alcaloïdes totaux de <i>Ruta montana</i> (B: après 24 heures et C: après 5 jours)	99
Figure 56: Coupes histologiques de tissu cérébral des souris femelles témoins (A) et autres traitées dans les conditions de la toxicité aiguë par la dose de 75,23 mg/kg (\approx 1/3 de DL ₅₀) d'alcaloïdes totaux de <i>Ruta montana</i> (B: après 24 heures et C: après 5 jours).....	99
Figure 57: Evolution pondérale des souris mâles des groupes témoin et traité dans les conditions de la toxicité subaiguë par la dose de 19, 452 mg/kg (\approx 1/20 DL ₅₀) d'alcaloïdes totaux de <i>Ruta montana</i>	100
Figure 58: Evolution pondérale des souris femelles des groupes témoin et traité dans les conditions de la toxicité subaiguë par la dose se 11, 28 mg/kg (\approx 1/20 DL ₅₀) d'alcaloïdes totaux de <i>Ruta montana</i>	101

Figure 59: Taux sérique de « Urée et Créatinine » des souris mâles traitées et témoins dans les conditions de la toxicité subaigüe par la dose 19, 452 mg/kg ($\approx 1/20$ DL ₅₀) d'alcaloïdes totaux de <i>Ruta montana</i>	103
Figure 60: Taux sérique de « Urée et Créatinine » des souris femelles traitées et témoins dans les conditions de la toxicité subaigüe par la dose de 11,28 mg/kg ($\approx 1/20$ DL ₅₀) d'alcaloïdes totaux de <i>Ruta montana</i>	103
Figure 61: Taux sérique de « ASAT, ALAT et PAL » des souris mâles traitées et témoins dans les conditions de la toxicité subaigüe par la dose de 19, 452 mg/kg ($\approx 1/20$ DL ₅₀) d'alcaloïdes totaux de <i>Ruta montana</i>	104
Figure 62: Taux sérique de « ASAT, ALAT et PAL » des souris femelles traitées et témoins dans les conditions de la toxicité subaigüe par la dose de 11,28 mg/kg ($\approx 1/20$ DL ₅₀) d'alcaloïdes totaux de <i>Ruta montana</i>	104
Figure 63: Coupes histologiques du tissu hépatique des souris mâles témoins (A) et traitées (B) dans les conditions de la toxicité subaigüe par la dose de 19,452 mg / kg (1/20 de DL ₅₀) d'alcaloïdes totaux de <i>Ruta montana</i>	106
Figure 64: Coupes histologiques du tissu rénal des souris mâles témoins (A) et traitées (B) dans les conditions de la toxicité subaigüe par la dose de 19,452 mg / kg (1/20 de DL ₅₀) d'alcaloïdes totaux de <i>Ruta montana</i>	106
Figure 65: Coupes histologiques du tissu cérébral des souris mâles témoins (A) et traitées (B) dans les conditions de la toxicité subaigüe par la dose de 19,452 mg / kg (1/20 de DL ₅₀) d'alcaloïdes totaux de <i>Ruta montana</i>	107
Figure 66: Coupes histologiques du tissu rénal des souris femelles témoins (A) et traitées (B) dans les conditions de la toxicité subaigüe par la dose de 11,28 mg / kg (1/20 de DL ₅₀) d'alcaloïdes totaux de <i>Ruta montana</i>	107
Figure 67: Coupes histologiques du tissu hépatique des souris femelles témoins (A) et traitées (B) dans les conditions de la toxicité subaigüe par la dose de 11,28 mg / kg (1/20 de DL ₅₀) d'alcaloïdes totaux de <i>Ruta montana</i>	108
Figure 68 : Coupes histologiques du tissu cérébral des souris femelles témoins (A) et traitées (B) dans les conditions de la toxicité subaigüe par la dose de 11,28 mg / kg (1/20 de DL ₅₀) d'alcaloïdes totaux de <i>Ruta montana</i>	108

Liste des tableaux

Tableau 1: Relation entre structure chimique et activité pharmacologique de quelques alcaloïdes	16
Tableau 2 : Description et pouvoir pathogène des souches testées.....	45
Tableau 3 : Résultats de screening phytochimique mené sur l'espèce <i>Ruta montana</i>	58
Tableau 4 : Rendements en extraits bruts à partir des graines, feuilles et extrait d'alcaloïdes du <i>Ruta montana</i>	60
Tableau 5: Rapports frontaux (RF) des différents extraits du <i>Ruta montana</i>	62
Tableau 6 : Les valeurs de l'IC ₅₀ des différents extraits de <i>Ruta montana</i>	66
Tableau 7 : Moyenne des diamètres des zones d'inhibitions des différents extraits de <i>Ruta montana</i> relatives aux différentes souches	69
Tableau 8 : Taux d'inhibition de différents extraits de <i>Ruta montana</i> sur la croissance d' <i>Aspergillus niger</i> et <i>Fusarium oxysporum</i>	71
Tableau 9: Dose-effet des alcaloïdes totaux des parties aériennes de <i>Ruta montana</i> chez les souris mâles traitées par voie intrapéritonéale.....	77
Tableau 10: Résultats des calculs des pourcentages corrigés et des probits (souris mâles)..	79
Tableau 11 : Etude de la DL ₅₀ des alcaloïdes totaux de <i>Ruta montana</i> par voie intrapéritonéale chez les souris mâles	81
Tableau 12 : Dose-effet des alcaloïdes totaux des parties aériennes de <i>Ruta montana</i> chez les souris femelles traitées par voie intrapéritonéale	83
Tableau 13 : Résultats des calculs des pourcentages corrigés et des probits (souris femelles)	85
Tableau 14 : Etude de la létalité des alcaloïdes totaux de <i>Ruta montana</i> par voie intrapéritonéale chez les souris femelles	87
Tableau 15: La sensibilité de sexe entre les mâles et femelles	89
Tableau 16: Poids corporel des souris mâles traitées avec la dose 129,68 mg/kg ($\approx 1/3$ DL ₅₀) d'alcaloïdes totaux des parties aériennes de <i>Ruta montana</i>	90
Tableau 17: Poids corporel des souris femelles traitées avec la dose 75,23 mg/kg ($\approx 1/3$ DL ₅₀) d'alcaloïdes totaux des parties aériennes de <i>Ruta montana</i>	90

Tableau 18: Masses relatives des organes des souris mâles traitées dans les conditions de la toxicité aiguë par la dose de 129,68 mg/kg ($\approx 1/3 DL_{50}$) d'alcaloïdes totaux des parties aériennes de <i>Ruta montana</i>	91
Tableau 19: Masses relatives des organes des souris femelles traitées dans les conditions de la toxicité aiguë par la dose de 75,23 mg/kg ($\approx 1/3 DL_{50}$) d'alcaloïdes totaux de <i>Ruta montana</i>	91
Tableau 20 : Paramètres hématologiques des souris mâles traitées dans les conditions de la toxicité aiguë par la dose de 129,28 mg/kg ($\approx 1/3 DL_{50}$) d'alcaloïdes totaux de <i>Ruta montana</i>	95
Tableau 21 : Paramètres hématologiques des souris femelles traitées dans les conditions de la toxicité aiguë par la dose de 75,23 mg/kg ($\approx 1/3 DL_{50}$) d'alcaloïdes totaux de <i>Ruta montana</i>	95
Tableau 22: Les valeurs de la masse relative calculée pour chaque organe des souris mâles traitées dans les conditions de la toxicité subaiguë	101
Tableau 23 : Les valeurs de la masse relative calculée pour chaque organe des souris femelles traitées dans les conditions de la toxicité subaiguë	101
Tableau 24 : Paramètres hématologiques chez les souris mâles traitées par voie IP avec les alcaloïdes totaux de <i>Ruta montana</i> (19,452 mg/kg $\approx 1/20 DL_{50}$).....	104
Tableau 25: Paramètres hématologiques chez les souris femelles traitées dans les conditions de la toxicité subaiguë par voie IP avec les alcaloïdes totaux de <i>Ruta montana</i> (11,28 mg/kg $\approx 1/20 DL_{50}$).....	104

Introduction

Depuis des milliers d'années, l'humanité a utilisé diverses plantes trouvées dans son environnement, afin de traiter et soigner toutes sortes de maladies, ces plantes représentent un réservoir immense de composés potentiels attribués aux métabolites secondaires qui ont l'avantage d'être d'une grande diversité de structure chimique et ils possèdent un très large éventail d'activités biologiques. Cependant l'évaluation de ces activités demeure une tâche très intéressante qui peut faire l'intérêt de nombreuses études.

L'Algérie possède une flore végétale riche et diversifiée ; cependant ces ressources végétales potentielles et la valorisation de ses espèces n'ont été que partiellement étudiées, le genre *Ruta* appartient à la famille des Rutaceae, ce dernier est largement répandu surtout dans les régions montagneuses. De nombreuses espèces de ce type sont utilisées en médecine traditionnelle car elles contiennent plusieurs molécules dotées d'activités thérapeutiques; parmi les espèces les plus connues, on trouve *Ruta montana*, communément appelée Fidjel. Cette plante est largement utilisée comme plante médicinale pour ses propriétés abortives et anti-fertilité, antispasmodique, analgésique, antirhumatismale, emménagogue et antiparasitaire, antifongique, médicament anti-inflammatoire; désinfectant; antipyrétique (Oliva *et al.*, 2003 ; Duke *et al.*, 2008 ; Kambouche *et al.*, 2008 ; Belkassam *et al.*, 2011).

Cela due à la présence de divers composés tel que les huiles essentielles (cétones aliphatiques), coumarines (rutarine, furanocoumarines: psoralène, bergaptène, xantotoxine), furoquinolines et dérivés d'acridone), flavonoïdes (rutoside) et tanins (Baba Aissa, 1999 ; Touati, 2000 ; Benziane, 2007 ; Djarri *et al.*, 2013).

Cependant, l'utilisation des plantes comme remède ne signifie pas qu'elles sont toujours bénéfiques pour la santé humaine, en effet les observations de Masri *et al.* (2015), d'un cas d'intoxication aiguë par *Ruta montana*, l'analyse toxicologique de l'urine montre une forte présence d'alcaloïdes.

A partir de ces données, on s'intéresse dans cette présente étude sur l'évaluation de quelques activités pharmacologiques des différents extraits de *Ruta montana* mais beaucoup plus sur la toxicité aiguë et subaiguë liée aux alcaloïdes totaux de cette espèce chez les souris mâles et femelles.

Partie I

Synthèse bibliographique

Partie I : Synthèse bibliographique

Chapitre 1. La plante *Ruta montana*

Ruta montana connu sous le nom vernaculaire Fidjel appartient à la famille des Rutacées (Claisse, 1993). Les Rutacées sont souvent des plantes ligneuses possédant des poches sécrétrices d'un type qui n'est rencontré dans aucune autre famille dites schizolysigènes (Ozenda, 2000). Ces poches, d'origine épidermique, sont toujours superficielles et libèrent leur contenu, une huile essentielle, à la moindre pression. Cette famille compte plus de 1500 espèces en grande partie, arborescentes et poussant dans les pays tropicaux.

Suivant les variations de l'ovaire et du fruit, les Rutacées se divisent en 3 sous-familles :

- Les Rutoïdées
- Les Toddalioidées
- Les Aurantinoïdées (Hyewood, 1996 ; Bossokpi, 2003).

Le genre *Ruta* appartient à la sous famille des Rutoïdées. *Ruta* vient du grec 'rhyté' qui signifie sauvé, prévenir (Doerper, 2008). On rencontre en Algérie 04 espèces : *Ruta montana* , *Ruta chalepensis*, *R. tuberculata* et *R. latifolia*. Les espèces diffèrent entre elles par l'allure des feuilles, de la grappe fructifère, des bractées et des sépales (Quezel et Santa, 1963 ; Bezanger, 1986 ; Ozenda, 1991).

1.1. Position dans la systématique

- **Règne** : Plantae
- **Sous règne** : Tracheobionta (plantes vasculaires)
- **Super division** : Spermatophyta (plantes à graine)
- **Division** : Magnoliophyta (plantes à fleurs)
- **Sous division** : Angiospermae
- **Classe** : Magnoliopsida (dicotylédons)
- **Sous classe** : Rosidae
- **Ordre** : Sapindales
- **Famille** : Rutaceae
- **Genre** : *Ruta*
- **Espèce** : *Ruta montana* (Bonnier, 1999; Wiart, 2006 ; Takhtajan, 2009)

1.2. Description botanique

Ruta montana appelée communément rue des montagnes est un arbrisseau de la famille des Rutaceae, du genre *Ruta*. C'est une plante méditerranéenne semi arbustive, de 40 cm à un mètre de haut environ, très ramifiée et ligneuse à la base (Fournier, 1948 ; Hammiche et Azzouz, 2013 ; Hammiche *et al.*, 2013) (Fig.1).

✓ La partie aérienne

-Tiges : Droites, cylindriques, très rameuses, glabres et glauques de 2 à 5 pieds de hauteurs.

-Feuilles : Pétiolées, alternes, éparses, composées, d'un vert glauque, à folioles ovales obtuses, épaisses, légèrement dentées sur les bords ou entières.

-Fleurs : Jaunes, à cinq pétales concaves qui renferment dix étamines bien plus longues que les pétales et terminées par des anthères presque ronds, pédonculées en corymbe terminal (Miller, 1785, Villars, 1789).

-Fruits : Des capsules globuleuses à lobes arrondies et pédoncule court (4 mm) et se terminent par 4 ou 5 lobes arrondis, apparents ; libérant à maturité de petites graines noirâtres (Hammiche *et al.*, 2013).

-Semences : Réniformes, à embryon renfermé dans un albumen charnu (Thielens, 1862).

-Odeur nauséabonde et **savoir** chaude et amère.

✓ Partie souterraine

-Racines : Blanches, fibreuses et à nombreuses racicules (Thielens, 1862).



Figure1: La plante *Ruta montana* (Amoen, 1756)

1.3. Origine, habitat et distribution géographique

La rue est une plante originaire du Sud Est de l'Europe. Elle est largement répandue dans le monde entier à cause de ses propriétés ornementales et médicinales, elle est souvent cultivée dans les jardins pour ses qualités décoratives en variété de couleur (Bezanger *et al.*, 1976 ;

Bezanger *et al.*, 1986). Elle a été introduite en Grande Bretagne, en Espagne, un peu moins en Italie et en Yougoslavie. L'Espagne est le grand producteur d'huiles essentielles de la Rue. Elle a été introduite en médecine chinoise, il y a près de deux siècles et est devenue très connue par la population (Bezanger *et al.*, 1976 ; Bossard et Cuisance, 1981 ; Rubin, 1988).

La Rue pousse spontanément dans les rochers, les lieux arides, vieux murs, collines sèches et elle est abondante dans les terrains calcaires et bien exposés au soleil dans les régions méditerranéennes (Quezel et Santa, 1963 ; San Miguel, 2003 ; Doerper, 2008), cependant les rues sauvages croissent dans les pays chauds aux lieux rudes, pierreux et montagneux (Lemery, 1732).

En Algérie, elle est rencontrée dans les zones montagneuses de l'intérieur sur l'Atlas Saharien et les pelouses arides (Clevely et Richmond, 1997).

1.4. Les variétés ornementales et appellations

Les espèces de *Ruta* les plus connues sont très proches en forme, composition et en propriétés pharmacologiques :

• ***Ruta montana*** : C'est la rue des montagnes (synonymes : *Ruta legitima* Jacq. ; *Ruta tenuifolia* Gouan) ou bonne rue (Bonnier, 1999), appelée vulgairement en Algérie : ***fidjlet el-djbel*** ou ***Fidjela*** a une odeur fétide très intense (Baba Aissa, 1999) ou encor ***Fijel*** (la rue sauvage) (Lahsissen *et al.*, 2009). Autre appellations comme la Rue puante, péganion, herbe de grâce, plante de bonheur, rue de la bible (Cousin, 1999).

• ***Ruta graveolens*** : Graveolens vient du latin « gravis » qui signifie fort et du verbe « olere » qui veut dire sentir, donc odeur forte et désagréable (Doerper, 2008). Appelée aussi rue officinale, rue-puante, rue fétide, rue des jardins, herbe à la belle-fille, rue des murailles (Bonnier, 1999) et également péganion (LE Moine, 2001), cette espèce est appelée vulgairement ***Fidjen*** (Abdulbasset et Abde Tawab, 2008).

• ***Ruta chalepensis*** : La rue d'Alep, plante herbacée à tige ligneuse à la base, pouvant atteindre 1 m (Baba Aissa, 1999). La rue est citée sous le terme de سذاب ***sadzab*** par Abdulbasset et Abde Tawab (2008), elle est aussi dite en berbère: ***اؤرمي*** ***ouermi***, ***Issel***, ***Issin*** (Baba Aissa, 1999). Autres noms sont indiqués par Duke *et al.* (2008), ***Al Shathap*** الشذاب, ***Bou Ghans***, en grec : ***Pigamzent***.

1.5. Usages dans la médecine traditionnelle

Dioscorides affirme que *Ruta* a les propriétés suivantes: Les graines et les feuilles sont un antidote général contre les toxines, y compris les morsures de serpent. Les extraits sont utiles pour traiter les infections internes et les inflammations (par exemple des bronches), les ulcères externes et l'eczéma. Ces dernières activités peuvent s'expliquer par les activités cytotoxiques et antimicrobiennes des alcaloïdes acridones. En outre, les extraits de *Ruta* ont été utilisés pour l'avortement; dans ce cas, les alcaloïdes et les huiles essentielles peuvent être les ingrédients actifs.

-En Maroc, La rue a de multiples applications : abortif puissant, par son principe actif, elle soigne la jaunisse, elle est utilisée en fumigation pour entrer en contact avec les génies. C'est son action photo sensibilisante qui lui vaut d'être employée dans le vitiligo (Claisse, 1993). Les racines, en décoction, sont employées contre les maux d'estomac, les affections de l'appareil respiratoire et les maladies du foie, alors quand la plante séchée et pulvérisée est associée au laurier, à l'armoise blanche, à la lavande, au thym et à la menthe pouliot pour faire une décoction contre les coliques (Benchaâbane et Abbad, 1997). Un répulsif pour les moustiques et les serpents et un antidote des empoisonnements par les venins de serpents et de scorpions, per os et en cataplasmes au niveau de la morsure ou de la piqûre (Hammiche et Azzouz, 2013).

-En Espagne, l'utilisation de la plante entière par voie orale contre la fièvre, comme emménagogue abortive, antispasmodique contre les vers intestinaux (Front-Quer, 1962).

-En Italie, elle est utilisée pour aromatiser le vinaigre et l'alcool nommé « Grappa » (Kybal, 1987).

-En Algérie, les parties aériennes de la plante sont utilisées comme emménagogue, antispasmodique, rubéfiant et comme poudre écharrotique. Elle est utilisée également contre les affections respiratoires sévères, les gastralgies, les troubles intestinaux, les spasmes, les œdèmes, l'épilepsie et les troubles nerveux (Forment et Roques, 1941).

L'infusion est employée en collyre contre les ulcérations de la cornée, en gouttes auriculaires pour les otites et les bourdonnements d'oreilles, en gouttes nasales pour traiter l'ozène ainsi que les fièvres et les vomissements du nourrisson et de l'enfant.

La décoction dans l'huile soulage, en friction, les rhumatismes, les courbatures et pour combattre toutes les douleurs articulaires, le remède de choix est une pâte préparée à partir des feuilles pilées, destinée à enduire tout le corps (Hammiche et Azzouz, 2013).

L'essence de *Ruta montana* était très appréciée dans l'industrie des parfums synthétiques (Denoël, 1958).

- **Les doses**
 - **Infusion** : 4 g de feuilles pour 1 kg d'eau.
 - **Décoction** : 30 à 60 g pour 1 kg d'eau.
 - **Poudre** : 2 g à 9 deg par jour.
 - **Teinture** : 10 à 30 g.
 - **Huile de rue** : 1 à 10 gouttes.

C'est un médicament très dangereux et qui doit être administré avec la plus grande prudence (Thielens, 1862).

1.6. Toxicité de la plante

Si depuis Hippocrate bien des utilisations ont traversé les siècles, la toxicité, mieux connue, a probablement contribué à éliminer plusieurs usages (Pollio *et al.*, 2008). C'est une plante à manier avec précaution car son huile essentielle est toxique ; elle contient des alcaloïdes, de flavonoïdes, de la vitamine C et des furo-coumarines (LE Moine, 2001).

Les feuilles sont irritantes et vésicantes, propriétés dues aux huiles essentielles particulièrement à la méthylnonylcétone qui est un rubéfiant (El Haji, 1995).

➤ *Activités mutagène et carcinogène*

– Certaines furocoumarines, associées à des rayonnements UV, présentent une activité mutagène, voire létale, vis-à-vis de micro-organismes fongiques ou bactériens (Roelandts, 1984). Leur propriété d'intercalation dans l'ADN est invoquée par les caractères mutagènes et carcinogènes potentiels de ces molécules (Dardalhon *et al.*, 1998). L'addition des dérivés du psoralène peut affecter également les acides gras insaturés membranaires ainsi que certaines protéines (Veronese *et al.*, 1981 ; Dall'Acqua et Martelli, 1991). Des tests effectués sur *Salmonella typhimurium* ont mis en évidence l'activité mutagène des alcaloïdes de type

gravacridone d'un extrait de racines de *Ruta graveolens* (Paulini et Schimmer, 1989 ; Paulini *et al.*, 1991).

– D'autres furocoumarines activent la croissance de certaines cellules tumorales (Pathak et Fitzpatrick, 1992).

➤ **Action sur les enzymes**

Les furocoumarines linéaires sont des inhibiteurs d'enzymes de type cytochrome P450 dans le foie des mammifères ou chez les insectes (Fouin-Fortunet *et al.*, 1986 ; Zumwalt et Neal, 1993). Ces enzymes sont impliquées dans la détoxification des xénobiotiques. Ainsi, lors d'une prise médicamenteuse, associée à une consommation d'aliments contenant des furocoumarines comme le jus de pamplemousse, intervient une inhibition des enzymes hépatiques, ce qui conduit à une accumulation, potentiellement toxique, du médicament chez le sujet (Chan *et al.*, 1998).

➤ **Action sur la sphère génitale**

Des extraits bruts de *Ruta chalepensis*, testés sur des rats femelles, ont mis en évidence l'activité antifertilité des coumarines. Les alcaloïdes n'interviennent pas sur la fertilité (Ulubelen *et al.*, 1994). Les résultats sont similaires avec des extraits aqueux de la même espèce, administrés, per os, pendant quatre jours à des souris gravides. Une forte proportion d'embryons anormaux, a été observée tandis que le développement (préimplantation) et le transfert des embryons ont été retardés (Gutiérrez-Pajares *et al.*, 2003).

Certains travaux, rapportent les effets contraceptifs et abortifs de *Ruta graveolens* dont l'activité antifertilité et les effets abortifs des extraits hydroalcooliques ont été confirmés (Freitas *et al.*, 2005).

Le rôle des extraits de rue sur les organes sexuels et les hormones mâles a également fait l'objet de recherches. Pour la première fois, les extraits de *Ruta chalepensis* révèlent un effet sur la motilité des spermatozoïdes (Gijon, 1995).

L'administration orale durant 30 jours, d'extraits aqueux de *Ruta chalepensis* à des rats mâles a conduit à une diminution de plusieurs paramètres : densité et motilité des spermatozoïdes, volume des testicules avec altération de l'épididyme, taux de testostérone (Al Qarawi, 2005). Les auteurs ont montré l'effet contraceptif de l'extrait aqueux de *Ruta graveolens* sur

l'homme, qui se traduit par une diminution dose-dépendante de la mobilité des spermatozoïdes (Khoury et El-Akawi, 2005 ; Harat *et al.*, 2008).

➤ **Phototoxicité**

Les furocoumarines sont photosensibilisantes et causent de graves dommages cutanés, en particulier le 5-méthoxypsoralène (bergaptène) et le 8-méthoxypsoralène (xanthotoxine), composés volatils présents dans les huiles essentielles de *Ruta montana* et *Ruta graveolens*.

Plusieurs cas de réactions phototoxiques sont signalés chez l'homme, à la suite de contact cutané avec des espèces appartenant à la famille des Rutaceae (plus particulièrement, le genre *Ruta* : *Ruta graveolens* et *Ruta chalepensis*). Cela se traduit par des érythèmes, des dermatites bulleuses parfois sévères, simulant des brûlures, qui diffèrent des réactions de photoallergie (Heskel *et al.*, 1983 ; Schempp *et al.*, 1999 ; Eickhorst *et al.*, 2007 ; Furniss et Adams, 2007).

➤ **Circonstances et symptomatologie de l'intoxication**

Les cas d'intoxication les plus fréquents sont observés à la suite de tentatives d'avortement au cours desquelles la rue fraîche, sèche ou en poudre, est administrée sous forme de décoction buvable et/ou sous forme d'injections vaginales. Elle est souvent associée à d'autres espèces toxiques (*Peganum*, *Cannabis*, etc.), ce qui potentialise la toxicité et égare le diagnostic. La symptomatologie se manifeste par une salivation importante avec gonflement de la langue, une gastroentérite violente, des signes neuropsychiques (excitation, vertiges, puis somnolence, voire de prostration, tremblements). Des douleurs abdominales et des hémorragies utérines suivent. Dans les cas graves, coma et mort peuvent intervenir (Jouglard, 1977 ; Bellakhdar, 1997).

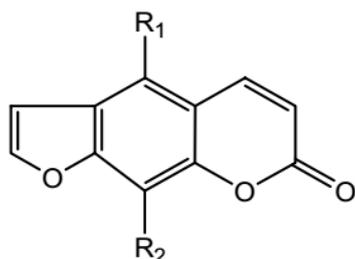
1.7. Composition chimique

➤ **Les coumarines**

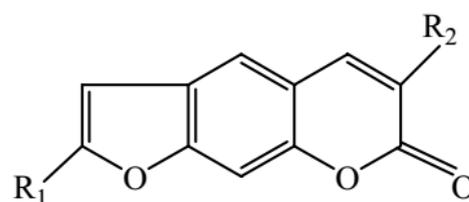
Les coumarines appartiennent à la classe des composés phénoliques, elles constituent avec les flavonoides, les chromones et les isocoumarines, un très vaste ensemble de substances. L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'un noyau benzopyrane (Weterman et Grundon, 1983).

Les coumarines de l'espèce *Ruta montana* se localisent dans toutes les parties de la plante et notamment dans les fruits et les huiles essentielles des graines, elles sont fréquemment à l'origine des hétérosides (Bruneton, 1999).

Dérivés coumarines isolés de l'espèce *Ruta montana* de quelque pays (Fig. 2, 3, 4, 5 et 6)

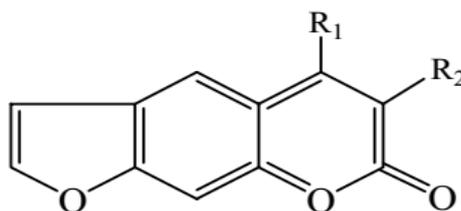


A/ $R_1 = H$ et $R_2 = H$



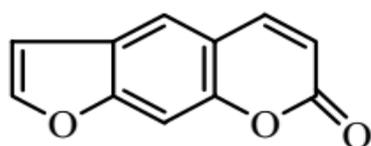
B/ $R_1 = C(CH_3)_2CHCH_2$ et $R_2 = C(CH_3)_2OH$

Figure 2: Structure de Chalépensine (A) et Chalépine (B) isolés du *Ruta montana* de l'Espagne (Kuffner *et al.*, 1973).



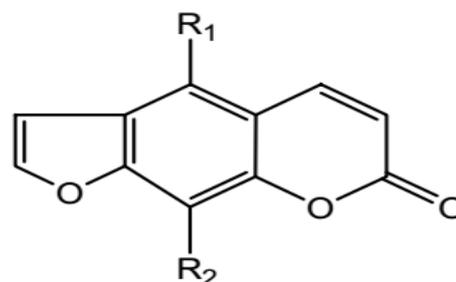
$R_1 = H$ et $R_2 = CHC(CH_3)_2CH_2$

Figure 3 : Structure de Rutolide isolé du *Ruta montana* d'Australie (Sepulveda *et al.*, 1974).



5 psoralène

A



B/ $R_1 = OCH_3$ et $R_2 = H$

Figure 4: Structure de Psoralène (A) et Bergaptène (B) isolés du *Ruta montana* de l'Espagne (Borges *et al.*, 1985).

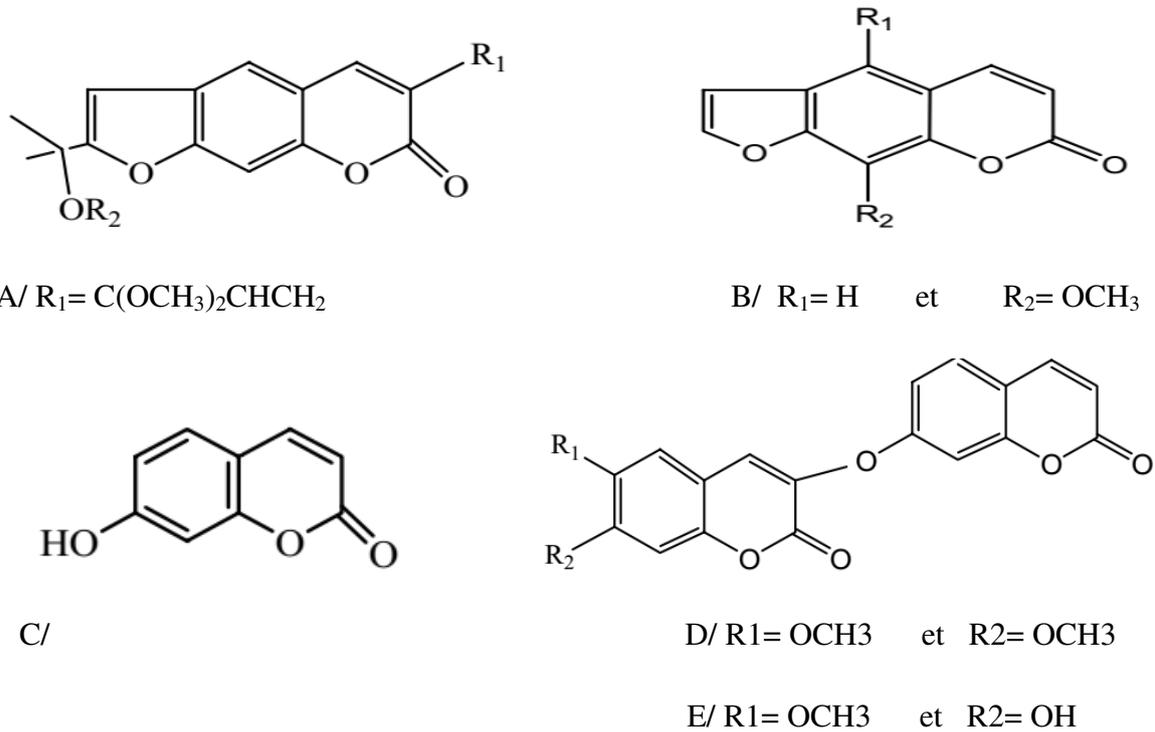


Figure 5 : Structure de Rutamarine (A), Xanthotoxine (B), Umbelliferone (C), Daphnoretin Méthyl ether (D) et Daphnoretine (E) isolés du *Ruta montana* de l'Espagne (Abyshev *et al.*, 1992).

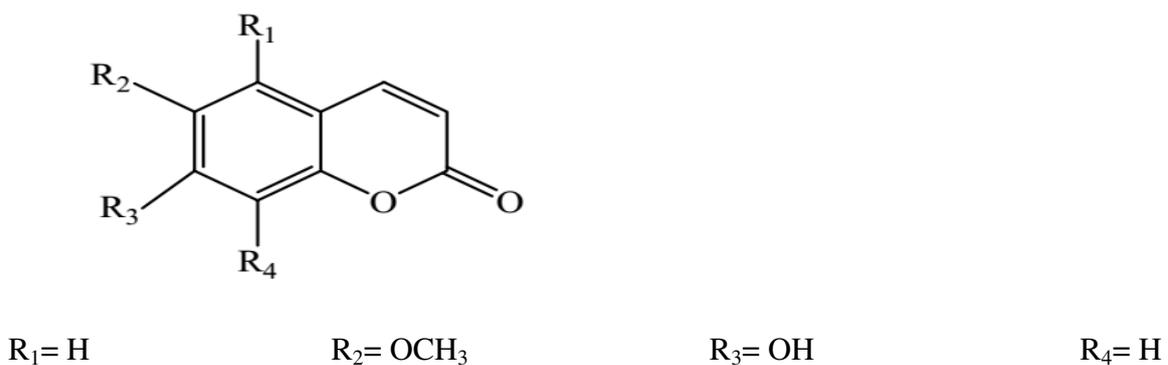


Figure 6 : Structure de Scopoletine isolé du *Ruta montana* d'Ex. URSS (Agullo *et al.*, 1969).

➤ **Les flavonoïdes**

On trouve chez les *Ruta* L., des flavonoides glycosylés appartenant en particulier aux groupes des flavones comme la rutine et la quercétine, les deux sont largement répandues chez les Rutaceae ; et des flavonoides non glycosylés comme le quercetol isolé du *Ruta graveolens* (Schemmer et Leismeister, 1989) (Fig.7).

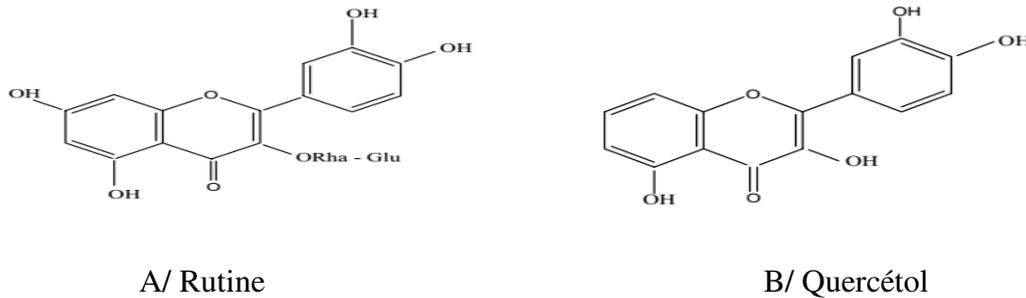


Figure 7 : Structure de Rutine isolé du *Ruta montana* du Turquie (Toker *et al.*, 1998 ; Dobsons, 2000) et de Quercétol isolé du *Ruta graveolens* de Pologne (Kowalewski et Pasich, 1967).

➤ **Les lignanes**

Les lignanes sont issus du couplage oxydatif intramoléculaire de deux unités phénylpropanoïques, la savinine et la saventinine (Paulini et Schemmer, 1989) (Fig.8).

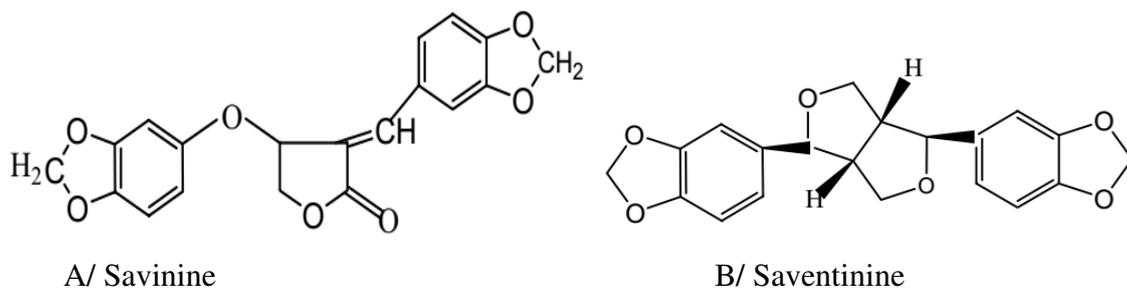


Figure 8 : Structure de Savinine et Saventinine isolés du *Ruta graveolens* (Paulini et Schemmer, 1989).

➤ **Les huiles volatiles**

Les principaux composés étaient des monoterpènes oxygénés, caractérisés par la grande prévalence de deux composés cétones-undécane-2-one (32,8%) et non-2-one (29,5%) et acétate-nonanol-2-acétate (18,2%) (Kambouche *et al.*, 2008).

➤ **Les alcaloïdes**

C'est le nom générique de substances azotées d'origine végétale, de structure souvent complexe et de poids moléculaire élevé. Ce sont des bases primaires, secondaires et tertiaires ou des hydrates d'ammonium quaternaires renfermant des noyaux hétérocycliques (Richter, 1993). Les alcaloïdes constituent, à côté des coumarines, un second groupe de métabolites secondaires largement répandus dans la famille des Rutaceae et plus particulièrement dans le genre *Ruta* (Mohr *et al.*, 1982).

❖ Biosynthèse

Les alcaloïdes provenant de l'acide anthranilique sont en grande partie confinés à une famille, les Rutaceae (Waterman, 1993). Dans la plupart des cas, l'acide anthranilique participe à la formation d'un noyau de quinoléine 2,4-dioxygène en combinaison avec une unité à deux carbones provenant de l'acétyl coenzyme A. Les alcaloïdes simples de 2-quinolone et de 4-quinolone sont souvent prénylés et permis la formation des furoquinoléines et des pyranoquinoléines. Les furo-(2,3-*b*)-quinoléines, dont la biogenèse met en jeu la substitution électrophile d'une quinolone par une unité isoprène activée suivie d'une cyclisation, sont très largement représentées chez les *Ruta* L. (Waterman, 1990). *Platydesmenium* (A), présente dans les différentes parties de *R. graveolens* (Reisch *et al.*, 1969), reflète cette origine biogénétique. A partir de tels composés, une oxydation en position benzylique suivie d'une élimination acido-catalysée d'eau et d'acétone, permet l'aromatisation du noyau furane. Les furo-(2, 3-*b*)-quinoléines totalement aromatiques, telle que la dictamine (B), la γ -fagarine (C) et la skimmianine (D), constituent une série d'alcaloïdes ubiquistes dans la famille des Rutaceae (Mester, 1983) (Fig.9).

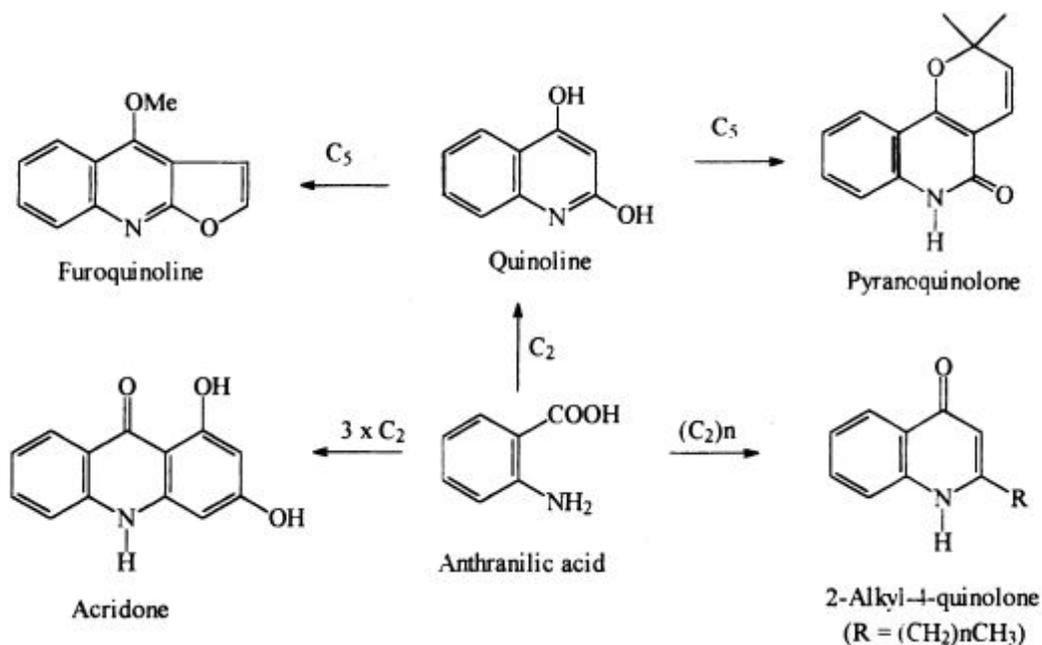
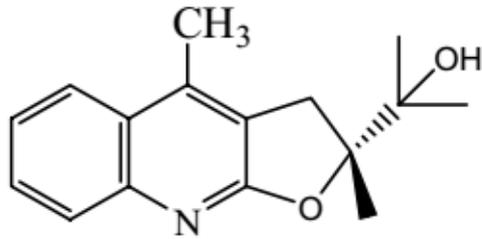
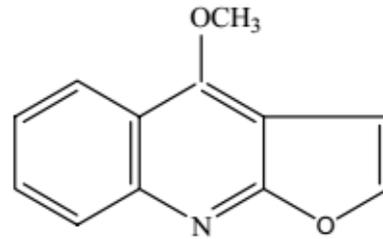


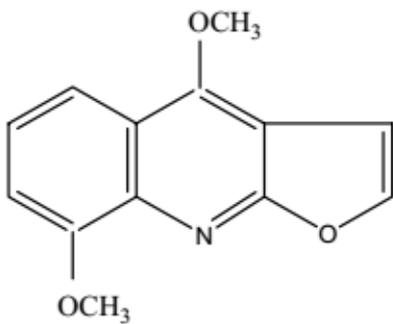
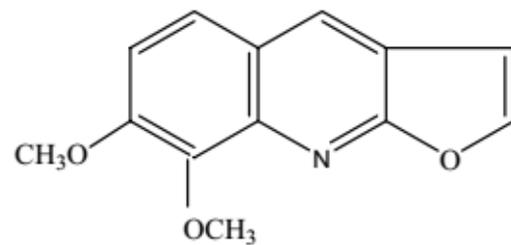
Figure 9 : Quelques alcaloïdes typiques des Rutacées formés à partir de l'acide anthranilique et de l'acétyl coenzyme A (Waterman, 1975).



(A) platydesmenium

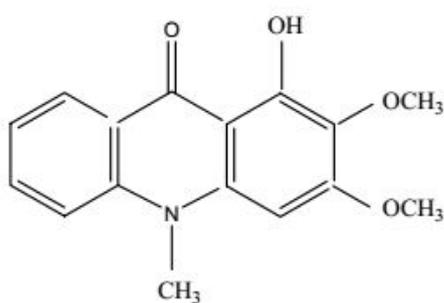


(B) dictamnine

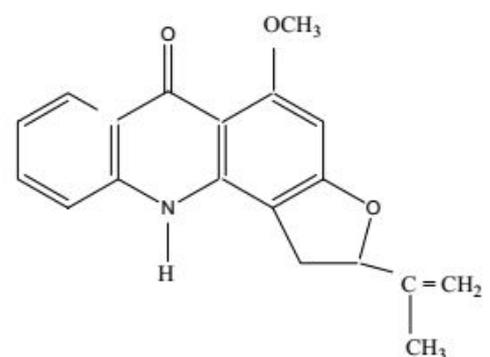
(C) γ -fagarine

(D) skimmianine

Les acridones, dont la biosynthèse met en jeu une unité anthranilique et trois unités acétates sont rencontrés uniquement dans la famille des Rutaceae. Nous pouvons citer, à titre d'exemple l'arborinine (E) et la rutacridone (F), tandis qu'un plus grand nombre d'acétates donnera des 2-alkyl-4-quinolones (Palmer, 1956).



(E) arborinine



(F) rutacridone

La famille des Rutaceae est caractérisée également par une abondance relative de bases isoquinoléique (Bézanger-Beauquesne, 1958).

L'étude récente sur l'espèce mener par Ulubelen (2006), a permis d'isoler un nouveau alcaloïde, il s'agit de la montanine (Fig. 10). Une autre étude sur l'extrait chloroformique de

la plante entière a révélé la présence de quatre nouveaux alcaloïdes (2-nonan-8one)-(1H)-4-quinolone, 2-(nonan-8-one)-4-méthoxyquinoline, 2-(nonan-8-one)-N-méthyl-4-quinolone et 2-(décan-9-one)-N-méthyl-4-quinolone (Fig.10 et 11).

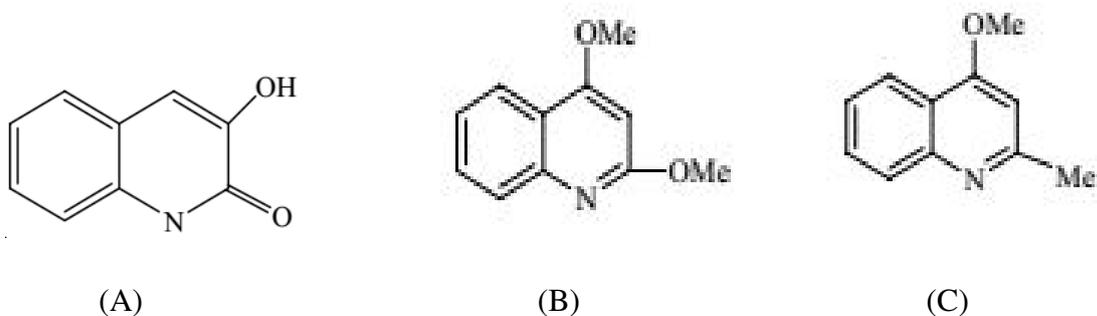


Figure 10 : Structure de 3-Hydroxy 2-quinoline (A) (Ekiert et Kisiel, 1997) et Montanine (B) et 4-méthoxyquinaldine (C) (Ulubelen et Ozturk, 2006) isolés du *Ruta montana* de Turquie.

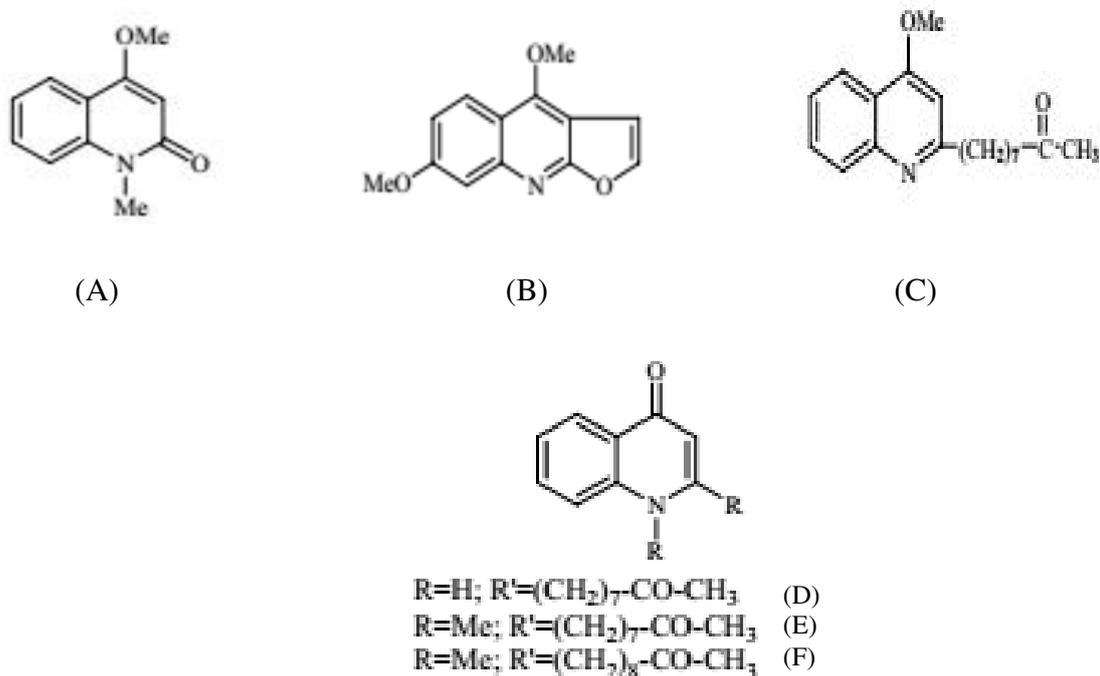


Figure 11 : Structure de 1-méthyl-4- méthoxy-2- quinolone (A), Evolitrine (B), 2-(nonan-8-one) –4- méthoxy- quinoline (C), 2- (nonan-8- one) –(1H)-4- quinolone (D), et 2-(nonan-8-one) –N méthyl-4- quinolone (E) et 2-(decan-9-one)-N-méthyl-4-quinolone (F) isolés du *Ruta montana* de Maroc (Touati, 2000 ; Ulubelen et Ozturk, 2006).

❖ Intérêt pharmacologique

En général, les alcaloïdes servent de produits chimiques de défense contre les herbivores et, dans une moindre mesure, contre les bactéries, les champignons et les virus, ou fournissent un moyen d'interaction avec d'autres plantes. Pour remplir cette fonction, les alcaloïdes doivent interagir étroitement avec des cibles spécifiques, c'est-à-dire qu'ils doivent soit inhiber, soit déréguler les processus importants qui sont vitaux pour ces organismes (Wink, 2007).

Les alcaloïdes isolés des espèces du genre *Ruta* présentent des intérêts pharmacologiques et le tableau 1, les résume clairement.

Tableau 1: Relation entre structure chimique et activité pharmacologique de quelques alcaloïdes.

Alcaloïde	Activité	Réf
Dictamine	Spasmolytique, Antibactérienne Mutagénique, photo toxicité Photomutagenecité	(Pelletier, 1983)
γ -fagarine	Spasmolytique, mutagénique Provoque les échanges entre les chromatides homologue Photomutagenecité	(Phillipson <i>et al.</i> , 1985)
Skimmianine	Spasmolytique, phototoxicité Propagation des virus de DNS Mutagénique Photomutagenecité	(Phillipson <i>et al.</i> , 1985)
Kokusaginine	Spasmolytique, mutagénique	(Phillipson <i>et al.</i> , 1985)
Arborinine	Spasmolytique Propagation des virus de DNS Inhibition de l'acétyl - β -méthyle choline : responsable de la contraction des grandes artères.	(Bruneton, 1987)
1-Hydroxy-2,3-diméthyl-N-méthylacridone	Spasmolytique	(Reish <i>et al.</i> , 1967)

4-Hydroxy-2,3-dimethoxy-10-methylacridone	Spasmolytique Propagation des virus de DNS	(Novak <i>et al.</i> , 1967)
Rutacridone epoxide	Antibactérienne Mutagénique	(Wolters et Eilert, 1981)
Hydroxyrutacridone epoxide	Antibactérienne	(Wolters et Eilert, 1981)
Pteleine	Mutagénique	(Nieschulz, 1996)
Rutacridone	Mutagénique	(Eilert <i>et al.</i> , 1982)
Isogravacridone chlorine	Mutagénique	(Eilert <i>et al.</i> , 1982)
Rutamarine	Antispasmodique	(Minker <i>et al.</i> , 1979)

❖ Cibles moléculaires et mécanisme d'action

Pour dissuader, repousser ou inhiber la diversité des ennemis potentiels, allant des arthropodes et des vertébrés aux bactéries, aux champignons et aux virus, les alcaloïdes doivent pouvoir interférer avec des cibles cellulaires et moléculaires importantes. Un bref aperçu de ces cibles potentielles est donné dans la figure 12. La modulation d'une cible moléculaire influencera négativement sa communication avec d'autres composants du réseau cellulaire, en particulier les protéines (interférence des protéines), ou des éléments, ou des transducteurs de signal. En conséquence, le métabolisme et la fonction des cellules, des tissus, des organes et éventuellement de l'organisme entier seront affectés (Wink, 2007)

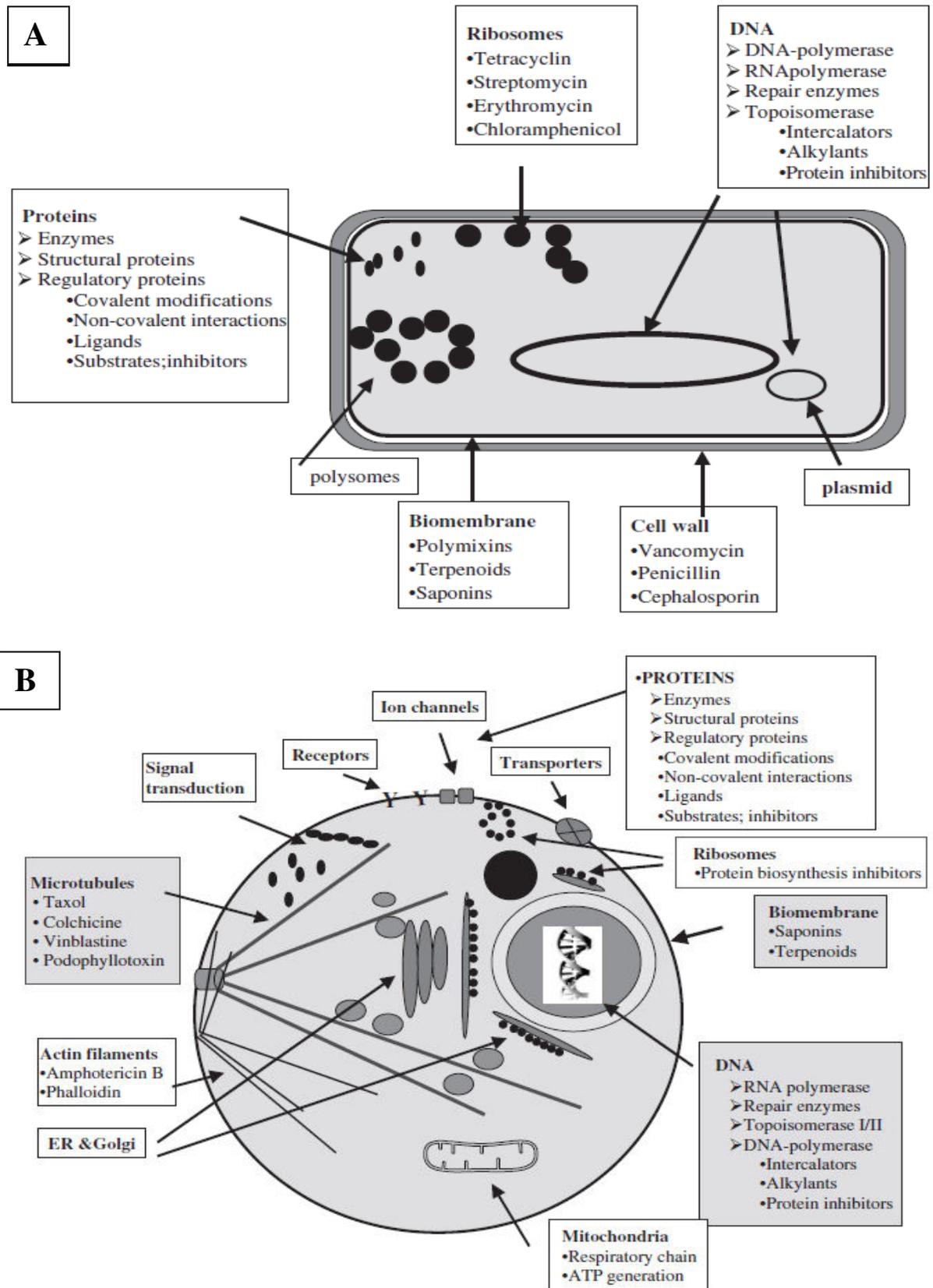


Figure 12: Cibles moléculaires dans une bactérie (A) et les cellules animales et humaines (B) qui peuvent être affectées par des produits naturels (Wink, 2007).

Les alcaloïdes qui imitent structurellement les neurotransmetteurs peuvent se lier aux neurorécepteurs et activer (agonistes) ou inactiver (antagonistes) les neurotransmetteurs. La transduction du signal neuronal est une cible très critique chez les animaux, puisque tous les organes sont contrôlés par le système nerveux parasympathique ou sympathique. Sa perturbation empêche la fonction des organes (cœur et circulation, respiration), la mobilité, l'orientation et la capacité de vol chez la plupart des animaux. De nombreux alcaloïdes sont en effet des neurotoxines fortes (voire mortelles) ou ont des propriétés psychotropes et hallucinogènes.

Les alcaloïdes kokusagine et skimmianine isolés des différentes espèces du genre *Ruta* (*R. graveolens*, *R. chalepensis*, *R. angustifolia*) agissent comme des antagonistes des récepteurs de la sérotonine, d'autres quinolines et isoquinoliques agissent sur les récepteurs adrénergiques (Wink, 2007) (Fig. 13).

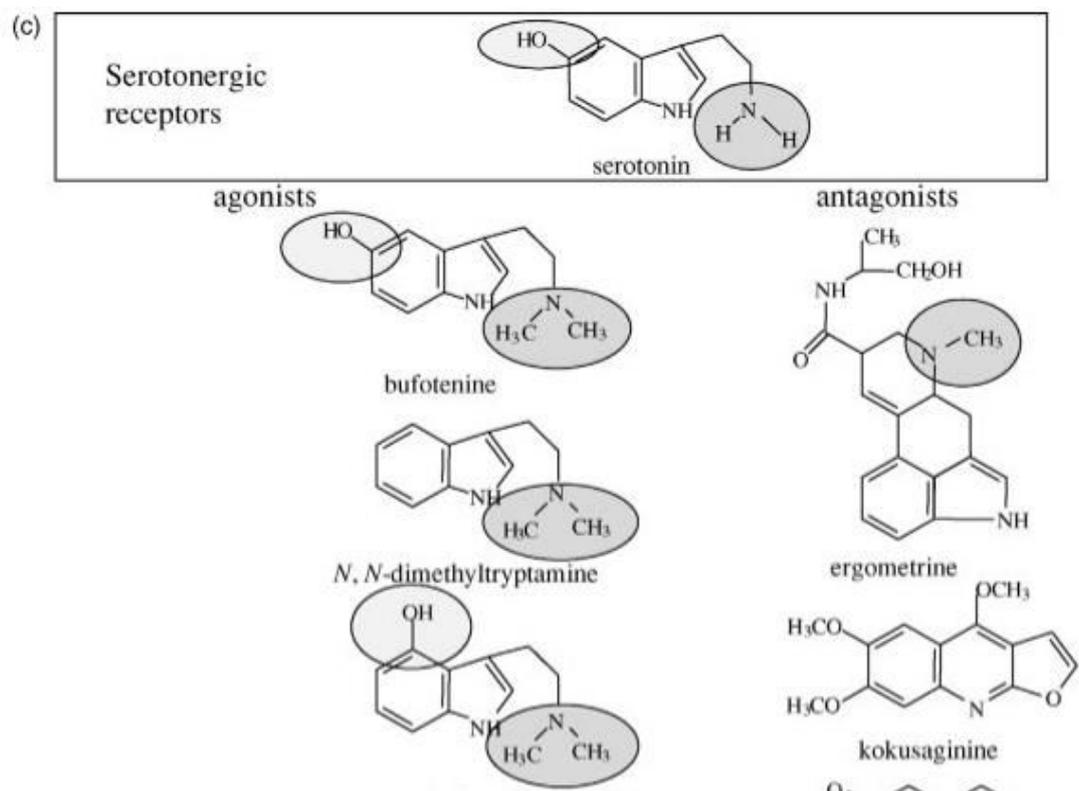


Figure 13: Modulation agoniste ou antagoniste des neurorécepteurs par des alcaloïdes mimant les neurotransmetteurs (L'interaction aux récepteurs sérotoninergiques qui lient la sérotonine) (Fattorusso et Tagliatela-Scafati, 2008).

Chapitre 2. Activités biologiques

2.1. Activité antioxydante

La recherche sur la capacité antioxydante représente un enjeu scientifique important ; notion largement relatée dans l'étude des propriétés biologiques de la plante médicinale.

2.1.1. Le stress oxydant

Le stress oxydant dû à l'exagération d'un phénomène physiologique, normalement très contrôlé, la production de radicaux dérivés de l'oxygène. Toutefois, une production excessive de ces molécules réactives ou une insuffisance des mécanismes antioxydants peut déséquilibrer la balance oxydant/antioxydant (Papazian et Roch, 2008 ; Christophe et Christophe, 2011). Ce déséquilibre peut avoir diverses origines, telle que l'exposition aux radiations ionisantes, la pollution, le contact avec certains pesticides et solvants, la consommation de tabac et d'alcool, la prise de certains médicaments (Médart, 2009).

2.1.2. Les radicaux libres

Les radicaux libres sont des espèces chimiques, atomiques ou moléculaires, contenant un ou plusieurs électron(s) libre(s) non apparié(s) sur leurs orbitales externes (Lehucher-Michel *et al.*, 2001). Cela lui confère une grande réactivité donc une demi-vie très courte. En effet, ce radical libre aura toujours tendance à remplir son orbitale en captant un électron célibataire sur un atome d'oxygène ou d'azote pour devenir plus stable. Ceci leur confère la dénomination d'espèces réactives de l'oxygène (EOR ou ROS) ou de l'azote (EAR ou RNS) (Goudable et Favier, 1997).

-Différents types des radicaux libres

- **Les radicaux primaires** qui dérivent directement de l'oxygène, à savoir l'anion superoxyde (O_2^{\bullet}), le radical hydroxyle (OH^{\bullet}), le monoxyde d'azote (NO^{\bullet}), le radical peroxyde (ROO^{\bullet}) et le radical alkoxyde (RO^{\bullet}) (Favier, 2003).
- **Les radicaux secondaires** comme le radical peroxyde ROO^{\bullet} , radical alkoxyde RO^{\bullet} , qui se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule (Novelli, 1997).

-Les espèces réactives oxygénées ERO

On distingue alors deux grands groupes de molécules réactives impliquées dans le stress oxydant: les espèces radicalaires et les espèces non-radicalaires (Delattre *et al.*, 2005).

Les principales ERO sont des formes réduites de O₂: l'anion superoxyde (O₂^{•-}, réduction à 1 électron), le radical hydroxyl (OH[•], réduction à 3 électrons), mais aussi les radicaux alkoxy (RO[•]), peroxy (ROO[•]) et le monoxyde d'azote (NO[•]). Les ERO incluent aussi des espèces non radicalaires, notamment le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂, réduction à 2 électrons), le dioxygène singulet (¹O₂), l'acide hypochloreux (HOCl), l'ozone (O₃) et le peroxynitrite (ONOO⁻) (Baudin, 2006 ; Aron et Kennedy, 2008).

-La production de radicaux libres**➤ La production intracellulaire**

La production des ERO dans les cellules mammifères découle de plusieurs sources possibles mais est essentiellement d'origine enzymatique. Il s'agit principalement de la NADPH oxydase membranaire et du complexe enzymatique mitochondrial de la chaîne respiratoire.

➤ La production extracellulaire

L'environnement et le mode de vie sont également responsables de la création et de l'accumulation de radicaux libres dans l'organisme. Les rayonnements UV, une alimentation chimique, ect favorisent la genèse des radicaux libres (Martinez, 2004 ; Mena *et al.*, 2009) (Fig.14).

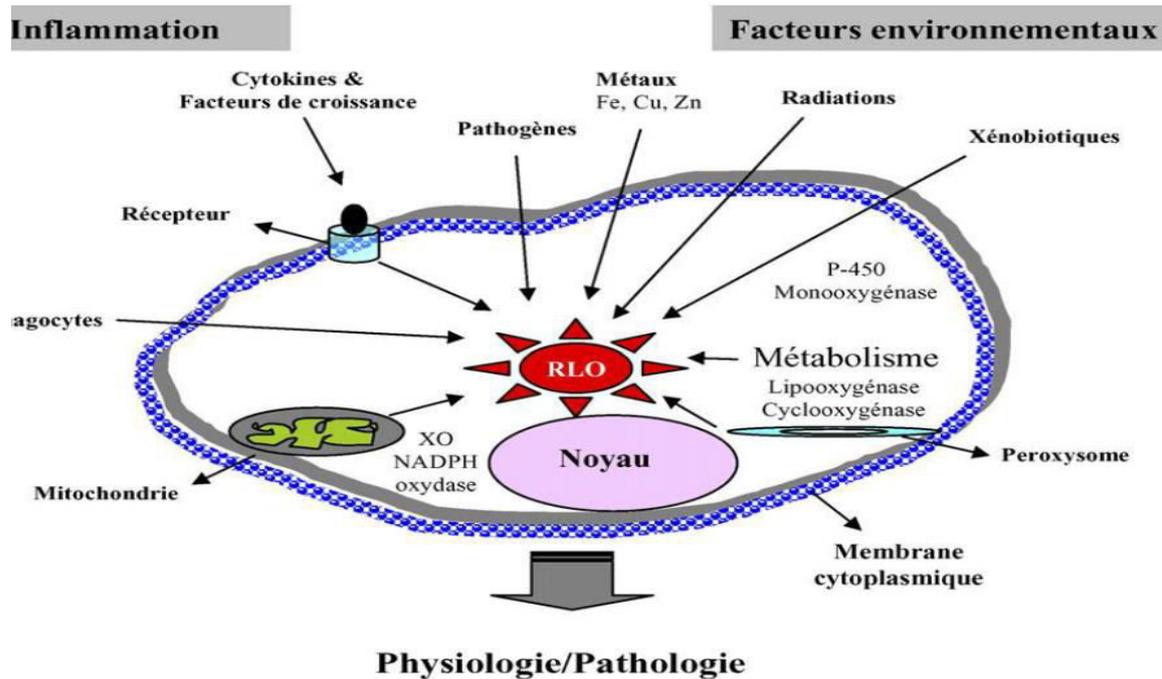


Figure 14 : Origine extra- et intracellulaire des radicaux libres oxygénés (RLO) (XO: xanthine oxydase; P-450 : cytochrome P-450) (Afonso *et al.*, 2007).

-Mécanismes d'action des radicaux libres

L'organisme se défend contre les radicaux libres, grâce aux enzymes antioxydantes contenues dans nos cellules. Ces enzymes sont aidées dans leur action antiradicalaire par la vitamine E, C, provitamine A, le zinc et le sélénium. Si ces systèmes de défense sont débordés ou insuffisants, les radicaux libres ont tout le loisir d'être nuisibles : ils s'attaquent alors aux membranes cellulaires dont les acides gras insaturés sont dénaturés (leur structure est modifiée); ils agressent également les protéines, les microfibrilles de collagène, l'acide hyaluronique, les acides nucléiques des chromosomes et l'ADN lui-même est transformé entraînant l'apparition d'où une série d'anomalie dont le risque de cancérisation (Franceschini, 1994) (Fig.15).

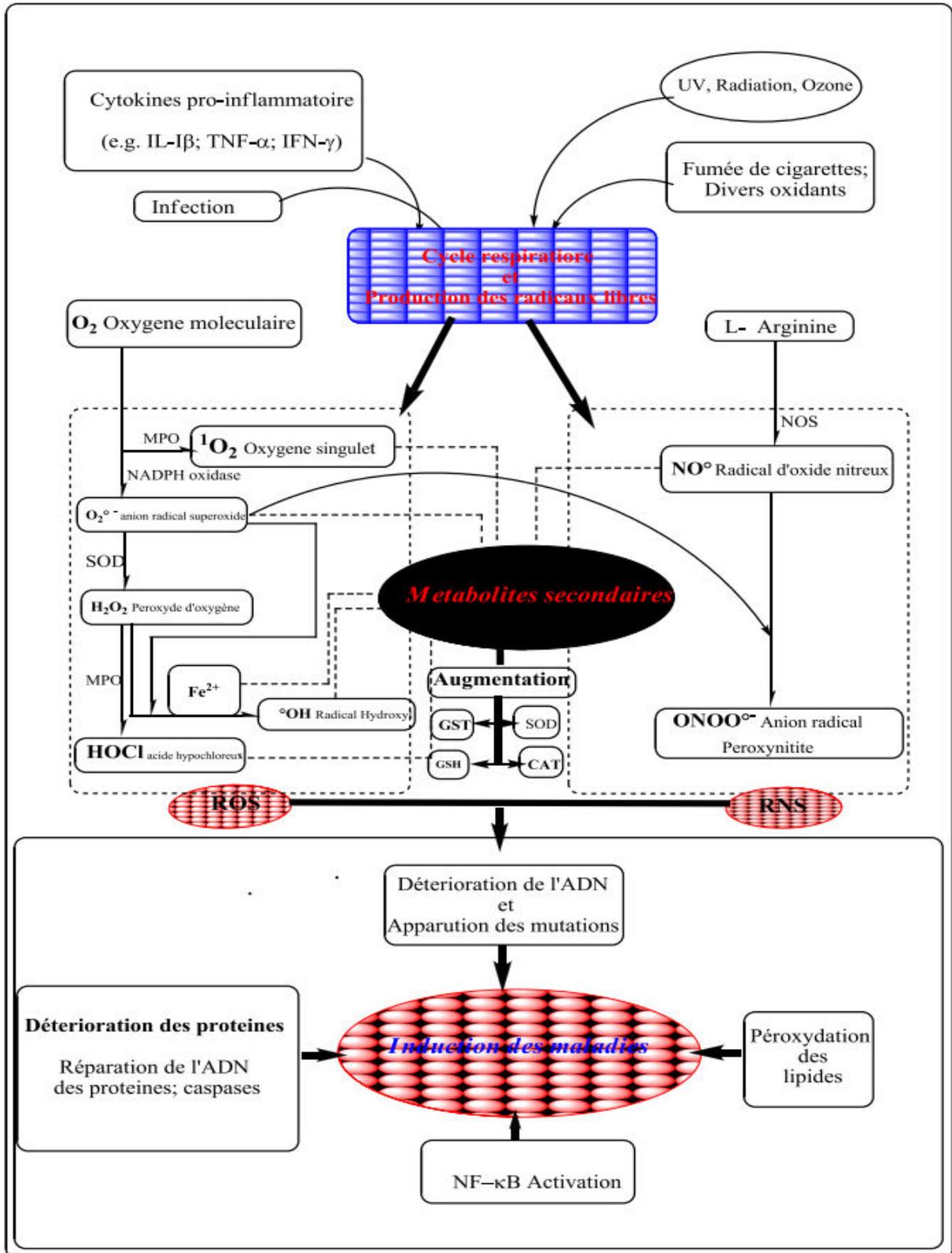


Figure 15 : Mécanisme d'action des radicaux libres (Muanda, 2010).

2.1.3. Les antioxydants

Un antioxydant est toute molécule endogène ou exogène présente en faible concentration qui est capable de prévenir, de retarder et de réduire l'ampleur de la destruction oxydante des biomolécules (Virot, 2004).

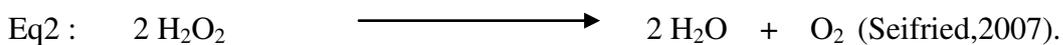
-Système enzymatique

Il s'agit principalement de trois enzymes ; la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx). Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du $O_2^{\bullet-}$ et du H_2O_2 , conduisant finalement à la formation de l'eau et de l'oxygène moléculaire (Lehucher-Michel *et al.*, 2001). Selon les réactions suivantes :

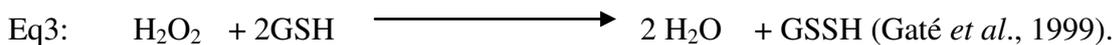
Superoxyde dismutase



Catalase



Glutathione peroxydase



-Système non enzymatique

Ce sont des antioxydants exogènes, obtenue à partir de l'alimentation sous forme de fruits et légumes riches en vitamine C, vitamine E, caroténoïdes, ubiquinone, coenzyme Q, flavonoïdes, glutathion et acide lipoïque (Haleng *et al.*, 2007).

2.2. Activité Antimicrobienne

Les maladies infectieuses causées par les bactéries affectent des millions de personnes dans le monde entier et causent de lourdes pertes au niveau économique. Ces infections bactériennes sont traitées par des antibiotiques qui sont des agents antimicrobiens non ou relativement peu toxiques pour l'organisme humain ou animal (Rhayour, 2002). A coté des antibiotiques, beaucoup de plantes aromatiques sont caractérisées par la synthèse

de molécules odorantes connues pour leur activité antiseptique et thérapeutique dans la médecine populaire.

2.2.1. Généralités sur les bactéries étudiées

Les bactéries sont des organismes unicellulaires microscopiques. Il en existe des milliers de types différents et elles vivent dans tous les environnements possibles, partout dans le monde.

Seul un petit nombre de bactéries provoquent des maladies, elles sont dites pathogènes ; ces bactéries peuvent provoquer des maladies en fabriquant des substances nocives (les toxines), en envahissant les tissus.

-*Escherichia coli*

✓ Définition

C'est une bactérie qui appartient à la famille des entérobactéries. Elles ont comme dimensions moyennes 2 à 3 micromètres de long et 0,6 micromètre de large. Cette bactérie est connue depuis longtemps comme commensale du tube digestif et pathogène pour l'appareil urinaire.

✓ La sensibilité aux antibiotiques

Les souches d'*E. coli* sont généralement sensibles aux antibiotiques actifs sur les bacilles gram négatif: amino-pénicillines, céphalosporines, quinolones, aminosides, triméthoprime - sulfaméthoxazole (Avril *et al.*, 1992).

- *Staphylococcus aureus*

✓ Définition

Ce sont des cocci à Gram positif très fréquents chez l'homme à l'état commensal ou pathogène. Il est immobile, non sporulé et ne possède pas de capsule visible au microscope optique. Il mesure 0,8 à 1 micromètre. Ils se présentent de façon isolée, en diplocoques ou groupés en amas.

✓ La sensibilité aux antibiotiques

La pénicilline G et les aminopénicillines sont habituellement inactives. Les pénicillines M et céphalosporines non hydrolysées par la pénicillinase, reste actives, sauf en milieu hospitalier où 20% des souches sont résistantes. Ces souches sont dites « méticilline résistantes » ou

« méti-R ». Les aminosioles, la gentamicine, la tobramycine, la nétilmicine et l'amikacine sont actives sur les souches de *S. aureus* sauf les " Méti-R". Les souches " Méti-R " sont irrégulièrement sensibles aux macrolides (lincosamides et synergistines). La vacomycine et la téicoplanine sont actives sur toutes les souches (Flandrois, 1997).

-*Bacillus cereus*

✓ Définition

Bacillus cereus est une bactérie Gram positive mobile, aéro-anaérobie facultative dont la cellule végétative mesure 3 à 5 µm de long pour un diamètre de 1 à 2 µm. Certaines souches sont psychrotrophes et peuvent se développer lors du stockage en froid, à savoir entre 0 et 4 °C, mais celles-ci sont rares. Sa gamme de températures de croissance s'échelonne plutôt entre 5 et 50 °C (Reed, 1994). Le bacille peut produire six types de toxines, à savoir cinq entérotoxines et une toxine émétique, qui peuvent être thermostables ou thermolabiles, selon les souches (Logan et Rodrigez-Diaz, 2006).

✓ La sensibilité aux antibiotiques

B. cereus est sensible à l'imipénem et à la vancomycine; la plupart des souches sont aussi sensibles au chloramphénicol, aux aminosides, à la ciprofloxacine, à l'érythromycine et à la gentamicine, certaines souches présentent une sensibilité modérée à la clindamycine et à la tétracycline (Murry *et al.*, 2007).

- *Salmonella Typhimurium*

✓ Définition

Les *Salmonella* appartient à la famille des *Enterobacteriaceae* du genre *Salmonella*, il a été divisé en 2 espèces distinctes : *S. enterica* et *S. bongori* (Popoff *et al.*, 2004). Sur la base des critères morphologiques, ce sont des bacilles droits à Gram négatif de 2 à 3 µm de longueur et de 0,6 à 0,8 µm de large souvent mobile, sans capsule, possèdent une nitrate réductase mais pas d'oxydase. Elles fermentent le glucose avec ou sans production de gaz et poussent sur des milieux ordinaires, aéro-anaérobies (Kabir, 2010). L'intestin des Vertébrés constitue le principal réservoir des salmonelles. Elles peuvent y survivre pendant plusieurs mois si les conditions de température, de pH et d'humidité sont favorables (Targant, 2010).

✓ Sensibilité aux antibiotiques

L'Organisation Mondiale de la Santé a dernièrement signalé l'augmentation alarmante de l'incidence de souches de *Salmonella* résistantes aux antibiotiques ; cette résistance est observée principalement chez *S. Typhimurium*, le sérotype prédominant en pathologie humaine et animale (Casin *et al.*, 1996 ; Martel *et al.*, 1996).

À l'état sauvage, *S. enterica* sérotype Typhimurium est naturellement sensible aux différents antibiotiques actifs sur les entérobactéries (Courvalin *et al.*, 2006) mais depuis les années 1970, des souches multirésistantes ont émergé à travers le monde portant des plasmides de résistances aux trois principales molécules : chloramphénicol, ampicilline et au cotrimoxazole (Gbadoé *et al.*, 2008 ; Weill, 2009).

Plus récemment encore, des souches ont été touchées par des mutations au niveau du gène *gyrA* (codant pour l'ADN gyrase), leur conférant ainsi une résistance aux quinolones (Hirose *et al.*, 2001).

2.2.2. Généralités sur les champignons étudiés

Les moisissures peuvent être définies comme des microorganismes hétérotrophes filamenteux et immobiles, dont la structure cellulaire est celle d'une cellule eucaryote classique (Nicklin *et al.*, 2000). Certaines vivent en symbiose avec des végétaux, d'autres sont des parasites des végétaux ou des animaux, d'autres enfin sont des saprophytes (Leveau et Bouix, 1993).

-*Aspergillus niger*

Les champignons du genre *Aspergillus* sont des moisissures, autrement dit des champignons microscopiques filamenteux, qui vivent en saprobiose dans de très nombreux écosystèmes. Une taxonomie prend *A. niger* dans la classe des *Eurotiomycètes*, l'ordre des *Eurotiales*, la famille des *Trichocomaceae* et le genre *Aspergillus*. *A. niger* est un champignon ubiquiste qui se développe très rapidement. Les souches peuvent être isolées de nombreux habitats écologiques différents tels que le sol, les débris végétaux et les fruits (Bennett, 2010 ; Thierry, 2011)

-*Fusarium oxysporum*

Parmi les champignons, agents de maladies vasculaires, ceux appartenant au genre *Fusarium*, sont les plus fréquents et dommageables pour les cultures (Messiaen *et al.*, 1991). De toutes les espèces du genre *Fusarium* que l'on rencontre dans le sol, c'est l'espèce *F. oxysporum* qui

est la plus répondu. L'identification des espèces *Fusarium* est assez difficile, elle est basée sur la morphologie des spores asexuées (Fisher *et al.*, 1982 ; Burgess et Liddell, 1983).

Les agents antibactériens et antifongiques

Les agents bactériostatiques et fongostatiques inhibent respectivement la croissance des bactéries et des champignons. Par contre, les agents germicides (bactéricides et fongicides) tuent les germes pathogènes mais pas nécessairement les endospores. Il existe différentes classes d'agents antimicrobiens : chimiques (oxydants, alcools, aldéhydes et gaz), physiques (température et rayonnement) et chimiothérapeutiques (antibiotiques).

➤ **Les antibiotiques**

Ce sont des molécules qui inhibent sélectivement certaines voies métaboliques des microbes (bactéries, champignons, protozoaires) à très faibles doses, sans exercer habituellement d'effets toxiques pour les organismes supérieures. Cette propriété les distingue des antiseptiques. L'activité des antibiotiques *in vitro* peut être mesurée en déterminant leur capacité à inhiber, et arrêter la croissance microbienne : microbistatique, ou de les tuer : microbicide (Nauciel et Vildé, 2009).

➤ **Les plantes, source naturelle d'antimicrobien**

Les plantes synthétisent plus de 100 000 petites molécules dotées pour la plupart d'une activité antibiotique. En général cette activité est inférieure à celle exercée par les antibiotiques d'origine microbienne (Lewis et Ausubel, 2006). En effet une molécule phytochimique est considérée comme antimicrobienne si elle inhibe la croissance des micro-organismes pour des concentrations minimales inhibitrices (CMI) comprises entre 100µg/ml et 1000µg/ml (Tegos *et al.*, 2002).

Chapitre 3. L'étude toxicologique

Les criblages de toxicité aiguë et subaiguë des plantes médicinales sont les moyens les plus rapides d'évaluer les profils toxicologiques des plantes médicinales. Cela aide à avoir une idée rapide de la nocivité ou de l'innocuité des médicaments (Naudot, 2013 ; Kuete, 2014).

3.1. Le modèle animal choisi (souris)

Les souris ont de nombreux avantages en tant qu'animaux de laboratoire pour les tests de toxicité. Ils sont petits, relativement économiques à obtenir et ils sont généralement faciles à manipuler. Les souris sont généralement plus économiques que les rats à cet égard ; avec une manipulation régulière et douce, elles sont facilement gérées. D'autres avantages de l'espèce comprennent une courte période de gestation et une courte durée de vie naturelle. Ces caractéristiques permettent des études qui incluent l'évaluation de la performance reproductive ou l'exposition à une substance de test pour des périodes approchant la durée de vie attendue (par exemple, l'évaluation du potentiel cancérigène) (Cox Gad, 2016).

3.2. Toxicité aigue

Au cours des dernières 50 années, les problèmes liés aux toxicités aiguës des produits chimiques ont considérablement augmenté en nombre et en complexité. Des données sur la sécurité des animaux ont été jugées nécessaires pour une grande variété de produits chimiques, et les objectifs pour lesquels le test DL₅₀ a été appliqué se sont également multiples. Une liste des raisons les plus importantes pour lesquelles les tests DL₅₀ sont effectués :

① Pharmacologie et toxicologie

- Détermination de la dose létale pour la standardisation biologique des médicaments
- Détection des effets aigus et dangereux
- Identification des organes cibles et des systèmes de toxicité
- Détermination de l'indice thérapeutique d'un nouveau médicament
- Informations sur le choix de la dose pour les études pharmacologiques et de toxicité à doses répétées
- Informations sur la biodisponibilité
- Évaluation des dangers pour les combinaisons de médicaments

② Sécurité humaine

- Prédiction de la dose toxique et létale chez l'homme
- Prédiction de la symptomatologie de l'intoxication humaine
- Informations sur la réversibilité des lésions toxiques aiguës
- Détection des dangers pour les populations à risque (par exemple les bébés)
- Informations sur l'utilité des antidotes et autres mesures thérapeutiques

③ Règlements gouvernementaux

- Partie intégrante du dossier d'enregistrement
- Informations de base pour la classification des produits chimiques dans les listes de substances toxiques (Zbinden, 1986).

La détermination de DL_{50} était seulement effectuée par une expérience de toxicité, le test de toxicité aiguë reste le test pharmacologique le plus universellement utilisé. La procédure est similaire dans la plupart des laboratoires: Le médicament est administré une fois, par voie orale ou parentérale, à diverses doses à des groupes de pas moins de 5 et rarement plus de 10 souris ou rats qui ont jeûné pendant 18 heures. Au moins 3 doses entraînant une mortalité inférieure à 100% doivent être utilisées. Les animaux sont observés et le nombre de décès enregistrés après 24 et 72 heures. Dans certains laboratoires, l'autopsie et l'examen histologique de divers organes sont systématiquement pratiqués (Boyd, 1959). La DL_{50} , c'est la dose qui tue la moitié des animaux, est déterminé par diverses procédures; le plus commode est la méthode graphique de Lichtfield et Wilcoxon (1949), qui permet une estimation rapide de la dose létale médiane, la pente d'une courbe de dose-effet et les limites de confiance. Les données sous leur forme originale; la méthode du papier graphique probit logarithmique de Miller et Tainter (1944), et une autre méthode de calcul graphique de De Beer (1945). Avec certains médicaments, les animaux ne meurent souvent pas dans les trois jours et la période d'observation doit être prolongée de 7 à 10 jours (Zbinden, 1963).

Bien que la DL_{50} soit un outil utile pour classer les substances en fonction de leur degré de toxicité, elle présente certaines limites. Il ne peut pas être considéré comme une constante biologique en raison de sa variabilité. Il fournit moins d'informations sauf les fonctions physiologiques; examens biochimiques et histopathologiques sont incorporés à l'essai. Pour l'évaluation du comportement pharmacocinétique et de la biodisponibilité, le test DL_{50} ne donne que des résultats semi-quantitatifs et souvent ambigus (Zbinden et Flury-Roversi, 1981). Cependant, l'estimation de la valeur DL_{50} pourrait encore fournir des informations

précieuses sur la toxicité d'un composé et actuellement l'Environmental Protection Agency (EPA) des États-Unis et d'autres organisations internationales recommande maintenant l'utilisation d'un test pour estimer la DL₅₀ (OECD, 2001).

3.3. Toxicité subaiguë

Des tests de dosage répétés à court terme (1 à 4 semaines) sont effectués pour obtenir des informations sur la toxicité d'une substance après une administration répétée et sont généralement requis pour la conception réussie d'étude subaiguë (Eaton et Klaasen, 2001 ; Wilson *et al.*, 2001). L'objectif principal des études à court terme est de déterminer les effets indésirables à faibles doses, la réponse à la dose, et parfois identifier les organes cibles (Kennedy *et al.*, 1986).

3.4. Symptômes toxiques dans les études de toxicité aiguë et subaiguë

En général, les animaux soumis à une étude de toxicité aiguë sont observés quotidiennement pendant 14 jours au total. Les observations (quel que soit le mode d'administration du médicament) comprennent les modifications de la peau et de la fourrure, des yeux et des muqueuses, des systèmes respiratoire, circulatoire, nerveux autonome et central et de l'activité somatomotrice et du comportement. Une attention particulière doit être accordée aux tremblements, aux convulsions, à la salivation, à la diarrhée, à la léthargie, aux torsions, à l'œdème, aux opisthotonos, à l'exophtalmie, à l'opacité cornéenne (acuité visuelle), au gonflement ou à la rougeur des yeux, au sommeil et au coma (Bafor et Igbinuwen, 2009).

3.5. La prise en charge d'un xénobiotique par l'organisme

Le cheminement d'un xénobiotique dans l'organisme se réalise en 4 phases : l'absorption, la distribution, le métabolisme (ou biotransformation) et l'excrétion. C'est ce qu'on appelle les paramètres ADME, présentés ci-dessous.

➤ L'absorption

L'absorption est le processus par lequel les xénobiotiques atteignent la circulation sanguine après avoir traversé des membranes ou barrières biologiques. Ce passage au travers des membranes cellulaires a lieu grâce à différents types de transports. Les xénobiotiques absorbés par les principales voies d'accès : poumons, peau, tractus gastro-intestinal, sont ensuite transférés par les milieux sanguins et lymphocytaires vers d'autres organes (reins, foie et d'autres) (De Sousa et Baertschi, 2002).

➤ **La distribution**

Une fois les xénobiotiques présents dans la circulation sanguine, ceux-ci sont distribués dans les divers tissus et organes, où ils vont exercer un effet (bénéfique ou délétère), être stockés ou être éliminés. Trois facteurs ont un impact important sur la distribution des xénobiotiques dans l'organisme : le débit sanguin de l'organe ou du tissu concerné, la capacité du xénobiotique à diffuser hors du sang vers les cellules de l'organe concerné et l'affinité des xénobiotiques pour les tissus ou organes (Shitara *et al.*, 2006).

➤ **Le métabolisme/biotransformation**

Le métabolisme correspond à la transformation du xénobiotique par le système enzymatique de l'organisme. Cette modification est réalisée dans le but de le rendre plus hydrosoluble et donc plus facilement éliminable. De nombreux organes peuvent réaliser ces transformations (poumons, reins, intestins, etc.) mais c'est le foie qui métabolise majoritairement les xénobiotiques (Loichot et Grima 2004 ; Custodio *et al.*, 2008).

➤ **L'élimination et excrétion**

Le processus d'excrétion conduit à l'élimination du xénobiotique hors de l'organisme. Les molécules et leur métabolites sont principalement éliminés par le rein (urine) et l'élimination rénale peut être de deux sortes : filtration glomérulaire et sécrétion tubulaire, mais l'élimination peut aussi se faire par la bile (féces), par les poumons dans l'air exhalé, par le lait (allaitement), la salive et parfois même par les cheveux ou les ongles (Zamek-Gliszczyński *et al.*, 2006).

3.6. Le Foie : organe de métabolisation

Le foie est un organe polyvalent qui joue un rôle important dans une variété de fonctions essentielles : la digestion, l'épuration, le stockage, la détoxification du sang ainsi que la production et la sécrétion des composants du plasma et la bile. Le foie est également impliqué dans le métabolisme des protéines, des stéroïdes et des graisses. Il permet le stockage de vitamines, du fer et du glucose (LeCluyse *et al.*, 2012).

3.6.1. Macroscopiquement

Le foie est une grande glande occupant le tiers antérieur de la cavité abdominale. La surface antérieure convexe est pressée contre la voûte du diaphragme, et la surface concave postérieure s'adapte et cache partiellement l'estomac et le duodénum. Il y a quatre lobes principaux reliés dorsalement: le lobe médian subdivisé en parties droite et gauche par une bifurcation profonde, le lobe latéral gauche non divisé, le lobe latéral droit divisé horizontalement en parties antérieure et postérieure, et un lobe caudal constitué de deux lobes foliaires dorsaux et ventral à l'œsophage à la courbure moindre de l'estomac (Knoblauch *et al.*, 2011) (Fig.17). Bien que ce modèle de lobation soit le plus fréquent, au moins 13 modèles différents ont été décrits, la tendance étant à la fission plutôt qu'à la fusion, et des différences de sexe et de souche ont été rapportées. Le foie de la femelle pèse toujours plus que celui du mâle (Webster et Liljegren, 1955).

La souris diffère du rat par la vésicule biliaire; celle-ci est située à la base de la bifurcation profonde du lobe médian. Le canal hépatique du foie et le canal cystique de la vésicule biliaire s'unissent pour former le canal cholédoque.

Pour l'histologie en prenant habituellement un échantillon de lobe latéral gauche et des lobes médians gauche et droit avec la vésicule biliaire (Ruehl-Fehlert *et al.*, 2003).



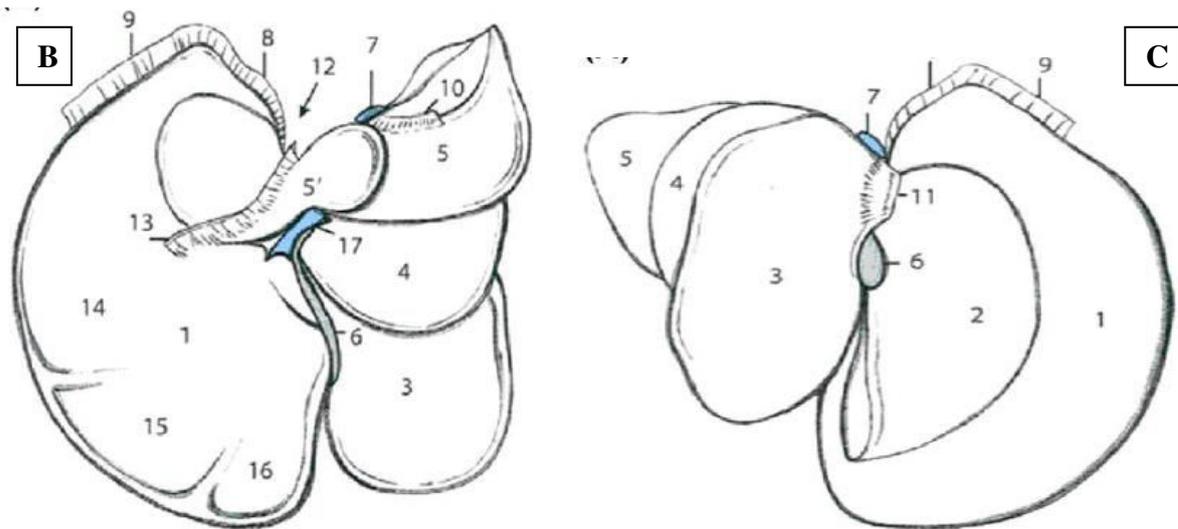


Figure 17: Les quatre lobes principaux du foie: (B) face diaphragmatique et (C) la face vasculaire (« A » Scudamore, 2014 ; « B, C » Hedrich, 2012).

3.6.2. Microscopiquement

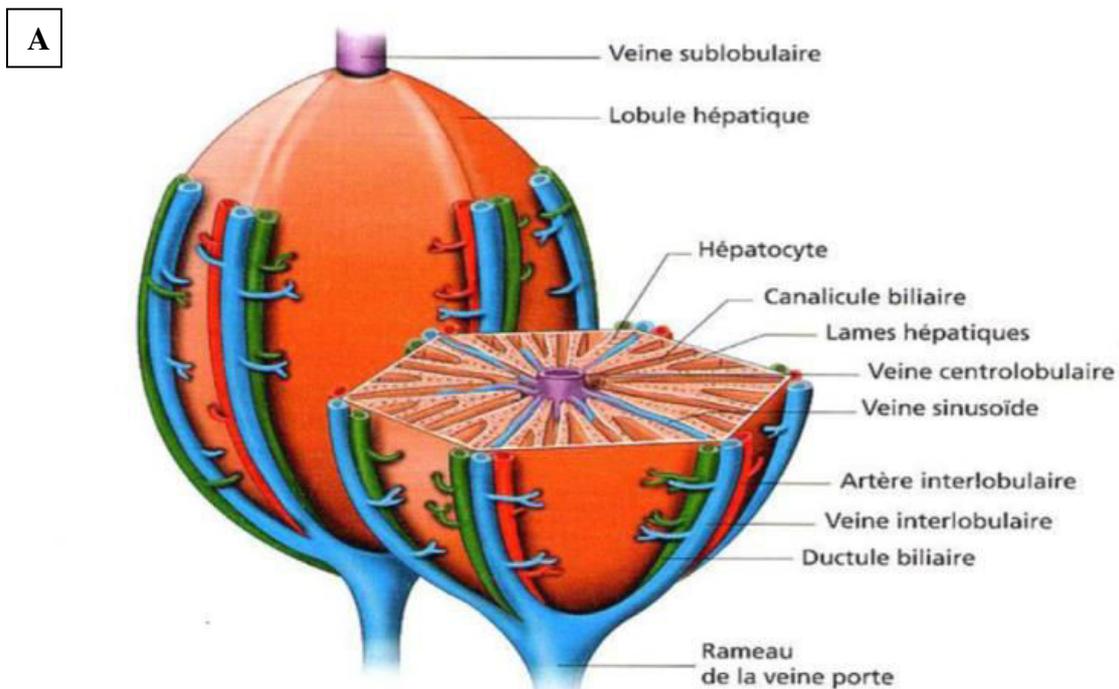
La surface du foie est recouverte d'une fine séreuse à partir de laquelle des fins brins de tissu conjonctif réticulaire se projettent vers l'intérieur pour former le cadre de soutien des cellules hépatiques, des vaisseaux sanguins et des voies biliaires. La séparation en lobules ou en unités hépatiques est très indistincte et les septa sont visibles seulement autour des branches interlobulaires de l'artère hépatique et de la veine porte hépatique dans les sinusoides séparant les cordons des cellules hépatiques et convergeant vers une veine centrale. Les sinusoides sont des endothéliums contenant des cellules phagocytaires spécialisées, les cellules de Kupffer, qui peuvent éventuellement assurer une répartition homogène du sang dans les cellules hépatiques.

Le foie est doté des cellules parenchymateuses (les hépatocytes) sont disposées dans des plaques rayonnant de la veine centrale vers la périphérie lobulaire, elles sont grandes et polygonales avec de grands noyaux centraux avec un ou plusieurs nucléoles. Le contour de la cellule est souvent indistinct et le cytoplasme a une apparence extrêmement variable. Il peut être granuleux, vacuolé, coloration profonde ou très pâle. Plus quatre types cellulaires non parenchymateux (20% des cellules endothéliales sinusoidales, 5% des cellules périssinusoidales stellaires ou cellules d'Ito, ces cellules sont dans des espaces compris entre les cellules sinusoidales et les cellules hépatiques appelé espace de Disse, leur cytoplasme contient des gouttelettes lipidiques et stockant la vitamine A, 10% des cellules de Kupffer

(des macrophages) et les cellules épithéliales biliaires lui conférant une hétérogénéité cellulaire (Benhamou et Erlanger, 2008) (Fig.18)

Des mégacaryocytes sont présents dans le stroma du foie pendant les premières semaines de la vie postnatale et disparaissent plus tard (Fortuyn, 1933).

L'apparition d'hépatocytes peut varier nettement en fonction de l'état nutritionnel des animaux. Hépatocytes normaux des souris ont un cytoplasme clair abondant qui a une apparence «feinte» en raison de la présence de glycogène mais également une caractéristique du foie de souris est habituellement une anisocytose ; par exemple une grande variation de la taille des cellules du foie et de leurs noyaux (Hedrich, 2012 ; Scudamore, 2014).



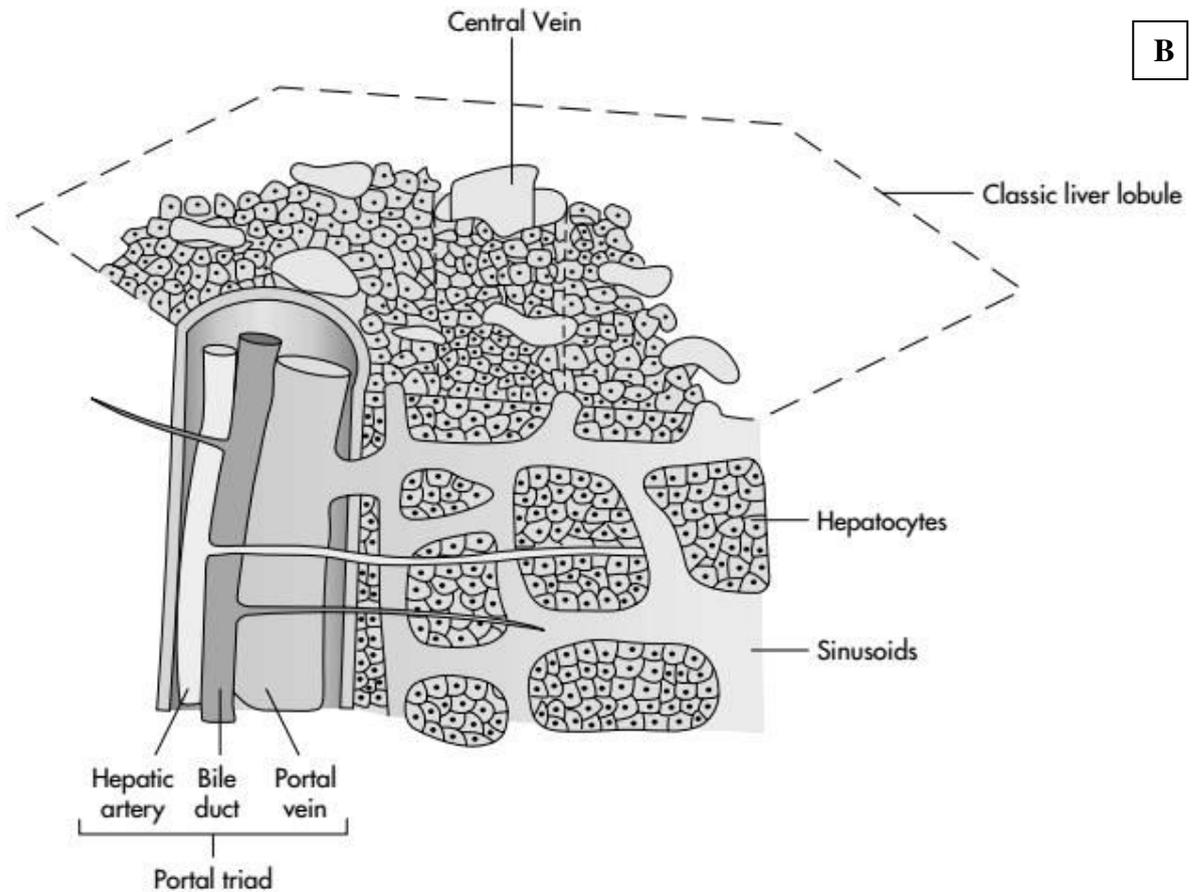


Figure 18: Organisation du lobule hépatique. (A) Coupe histologique (LeCluyse *et al.*, 2012), (B) Représentation schématique (Gilbert, 2003).

3.6.3. Hépatotoxicité

Elle est définie comme le pouvoir d'une substance (médicaments ou plantes) et quelque soient les mécanismes mis en jeu, de provoquer des dommages au foie. La pathogénie des atteintes hépatiques toxiques reste classée en toxicité directe, toxicité indirecte et toxicité par surcharge et/ou accumulation (Rachel, 2009)

-Toxicité directe « obligatoire, prévisible »

Elle correspond à une action directe du xénobiotique sur des constituants cellulaires vitaux sans intervention du système immunitaire. Elle présente plusieurs caractéristiques, mais elle est principalement dose-dépendante (Tome, 1999).

- **Stress oxydatif :** Le métabolisme des Xénobiotiques augmente la production des ERO responsable de la dégradation d'ADN, lipides et protéines (El-Demerdash *et al.*, 2013).

- **Peroxydation lipidique :** Les lipides insaturés sont oxydés et coupés en petits fragments (alcènes, malondialdéhyde MDA, alcanes) qui sont eux-mêmes réactifs et se lient par des liaisons covalentes aux protéines.
- **Liaisons covalentes aux protéines :** Ce phénomène implique essentiellement les métabolites électrophiles et les groupements nucléophiles des protéines ou d'acides nucléiques. Par conséquent, certaines enzymes sont inactivées, des transporteurs membranaires et des protéines régulatrices sont altérés.
- **Déplétion en glutathion :** Les métabolites électrophiles réagissent aussi avec le groupe SH du glutathion, la formation accrue des conjugués au glutathion avec diminution du glutathion hépatique à des conséquences toxicologiques (Tome, 1999).

- Toxicité indirecte « facultative, imprévisible »

Elle est liée au phénomène d'hypersensibilité de l'hôte, deux types de réactions sont envisagées : Toxicité immuno-allergique et toxicité à une prédisposition génétique. Elle se caractérise principalement par une absence de relation dose-effet (Meyer, 2016)

-Toxicité par surcharge et/ou accumulation

Substances accumulées dans certaines cellules du foie (exemple : vitamine A dans les cellules parasinusoïdales) (Martin et Feldmann, 1983).

3.6.4. Tests de la fonction hépatique

C'est un test sanguin permettant de déterminer les taux sériques d'un groupe de constituants, généralement:

- Bilirubine
- Enzymes plasmatiques
- Protéines plasmatiques (dans certains laboratoires).

➤ **Bilirubine sérique**

Le produit de dégradation de l'hémoglobine et dans une moindre mesure, des enzymes contenant de l'hème; 95% de la bilirubine provient de globules rouges sénescents et suite à la dégradation des globules rouges dans le système réticulo-endothélial, cela a lieu dans le foie, la rate et la moelle osseuse. La bilirubine est transportée vers le foie dans le sérum attaché à l'albumine et, à ce stade, elle n'est pas conjuguée. Les hépatocytes transforment la bilirubine non conjuguée en une forme conjuguée hydrosoluble qui est excrétée par la bile dans l'intestin. Ici, une partie est convertie en urobilinogène et excrétée par les reins, la majorité étant convertie en stercobiline et excrétée dans les fèces (North-Lewis, 2008).

➤ *Enzymes plasmatiques*

Les enzymes utilisées dans l'évaluation de la fonction hépatique sont l'aspartate et l'alanine aminotransférases (autrefois appelées transaminases et encore abrégées sous la forme ASAT et ALAT, respectivement), la phosphatase alcaline (PAL) et la γ -glutamyl-transférase (GGT). En général, ces enzymes ne constituent pas des marqueurs spécifiques de dysfonctionnement hépatique. L'activité ALAT est plus spécifique du foie que l'ASAT.

L'ALT et l'AST sont des enzymes libérées par les hépatocytes lorsqu'ils sont endommagés, ce qui entraîne des taux sériques élevés en cas de lésion hépatocellulaire (Friedman et Keeffe, 2004).

La phosphatase alcaline est liée à la membrane canaliculaire hépatique; elle est l'une des nombreuses isoenzymes de phosphatases alcalines trouvées chez l'homme. Test sensible pour la détection d'une obstruction des voies biliaires (la production est augmentée quand il y a des dommages aux voies biliaires); l'interférence avec le débit biliaire peut être intra- ou extra-hépatique, une augmentation de la phosphatase alcaline sérique résulte d'une augmentation de la synthèse hépatique de l'enzyme plutôt que d'une fuite dans les cellules des voies biliaires ou de l'absence de libération en circulation de la phosphatase alcaline. Cependant, d'autres isoenzymes de la phosphatase alcaline sont présentes dans des parties du corps telles que les os, les reins, l'intestin et le placenta, d'où une phosphatase alcaline élevée isolée peut ne pas être associée à un dysfonctionnement hépatique (North-Lewis, 2008).

➤ *Protéines plasmatiques*

Le foie est responsable de la fabrication de nombreuses protéines plasmatiques, dont l'albumine, l' α 1-antitrypsine, l' α -fêto-protéine et la prothrombine. La mesure de la protéine plasmatique totale est peu utile pour déterminer la fonction hépatique, car les valeurs peuvent être normales malgré les perturbations dans la production de protéines individuelles. Les deux protéines qui sont importantes pour déterminer la fonction hépatique, c'est l'albumine et la prothrombine (North-Lewis, 2008).

3.7. Le rein : organe d'épuration

3.7.1. Macroscopiquement

Les reins sont situés de chaque côté de la colonne vertébrale et seront observés une fois que les organes abdominaux auront été enlevés. Les glandes surrénales sont présentes au pôle crânien de chaque rein (Fig.19). Les glandes surrénales des souris femelles sont plus grandes que celles des souris mâles et sont généralement de couleur jaune pâle (contrairement aux glandes surrénales chez les hommes, qui sont de couleur brun rougeâtre) alors que les reins

des souris mâles sont plus grands que les reins de souris femelles. Le rein droit est toujours situé dans une position légèrement plus crânienne que le rein gauche (Knoblauch *et al.*, 2011).

Les reins sont normalement d'une couleur brun rougeâtre et des anomalies des reins comprennent des reins petits, rétréci, fermes, jaune pâle avec une surface granulaire rugueuse, cela peut indiquer une glomérulonéphropathie chronique, qui est fréquente chez les souris âgées (Frith et Ward, 1988).

Le rein est aplati dorso-ventralement et présente un large latéral convexe et une courte bordure médiane concave. La concavité est le hile où les vaisseaux sanguins et l'uretère rejoignent le rein. Deux couches, le cortex et la medulla, peuvent être vues sans l'aide d'une lentille si le rein est divisé en deux. Le cortex suit les contours de la frontière convexe, et la médulle est comme une large pyramide avec sa base convexe ajustée contre la surface concave du cortex (Brown, 1931 ; Carter, 1954).

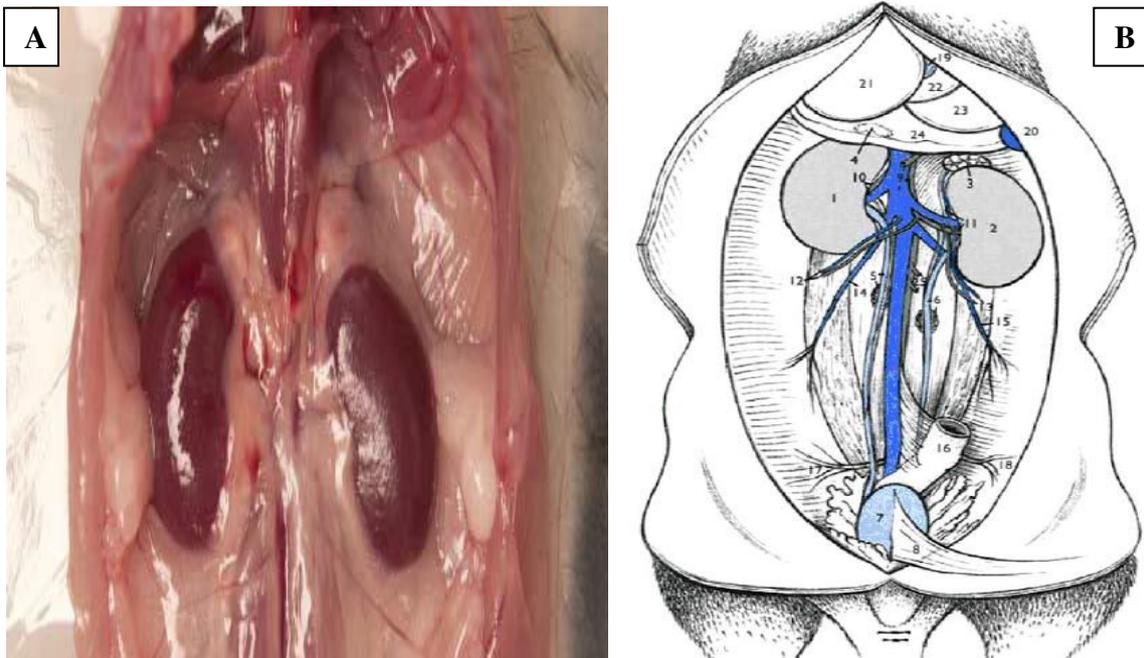


Figure 19 : Les reins de la souris sont situés de chaque côté de la colonne vertébrale et les glandes surrénales sont présentes au pôle crânien de chaque rein (« A » Scudamore, 2014 ; « B » Hedrich, 2012).

3.7.2. Microscopiquement

Le rein est composé d'unités ou de néphrons maintenus ensemble par des brins de tissus conjonctifs délicats et richement vascularisés et enfermés dans une fine capsule. Chaque néphron a un tubule à extrémité élargie, une capsule de Bowman, renfermant une touffe de capillaires sanguins et un glomérule. Le tubule se compose de parties contournées proximales et distales avec un segment droit, la boucle de Henle. Les néphrons s'écoulent dans des tubules collecteurs droits qui se rejoignent pour former de gros tubules s'ouvrant dans le bassin près de la pointe de la papille.

La zone externe du cortex est composée principalement de glomérules et de tubes convolutés. Les tubules droits des anses de Henle sont groupés en faisceaux et donnent un aspect rayonné à la zone interne du cortex. La médulle a un aspect strié, se composant principalement de tubules collecteurs droits convergeant vers la papille.

Certaines caractéristiques du rein de la souris sont remarquables. Comparé aux animaux mâles de nombreuses espèces, la souris a un volume glomérulaire (nombre et taille) d'environ la moitié de celui prédit sur la base de la taille et du volume des reins (Rytand, 1938). Les cellules granulaires dans les parois des artères glomérulaires afférentes (l'appareil juxtaglomérulaire) sont facilement démontrées chez la souris, contrairement aux difficultés de les révéler chez l'homme (Dunn, 1949). Le glomérule est entouré par la capsule de Bowman qui, dans la plupart des souches de souris, est considérée comme présentant un dimorphisme sexuel: les cellules épithéliales pariétales sont cubiques chez les mâles et aplaties chez les femelles (Hedrich, 2012).

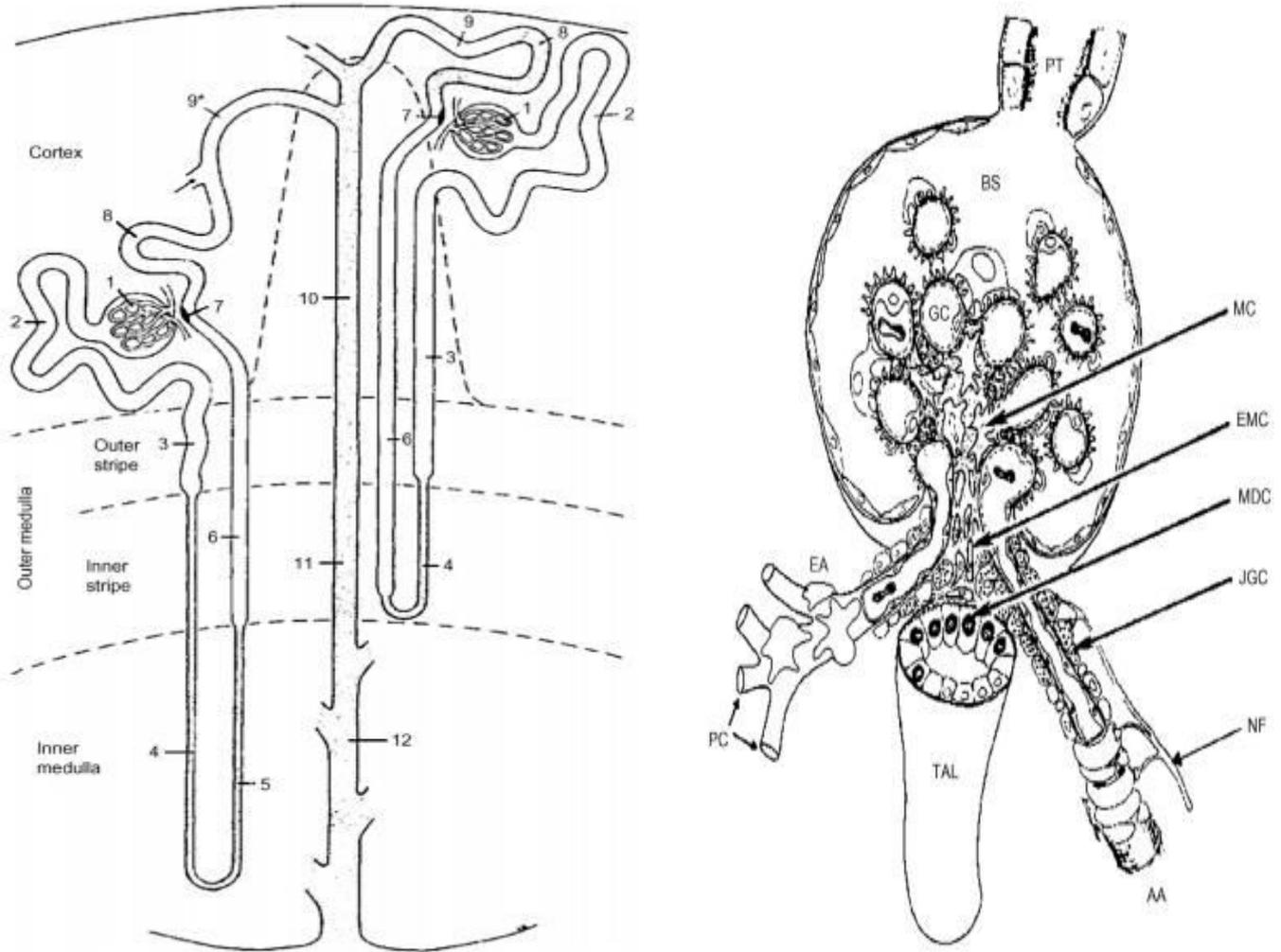


Figure 20 : Schéma du néphron (A) et glomérule (B) (Kariz et Bankir, 1998).

3.7.3. Néphrotoxicité

La néphrotoxicité se manifeste cliniquement par une insuffisance rénale aiguë de degré variable, accompagnée d'une protéinurie minimale et d'une leucocyturie qui précèdent une diminution de la filtration glomérulaire. Sur le plan histologique, la lésion rénale est représentée par une nécrose tubulaire. Les signes d'atteinte rénale ont également été rapportés à des faibles doses chez l'homme et chez l'animal (Rouas, 2010).

3.7.4. Tests de la fonction rénale

➤ *Créatinine plasmatique*

La concentration plasmatique de la créatinine est le marqueur biochimique de la fonction glomérulaire le plus simple et le plus fiable. Une créatinine plasmatique normale n'implique pas nécessairement une fonction rénale normale, bien qu'une augmentation de la créatinine plasmatique traduise généralement une altération de la fonction rénale. Ainsi, on observe une diminution en cas de jeûne et dans l'amaigrissement; une augmentation survient en phase de renutrition (Marshall et Bangert, 2005).

➤ *Urée plasmatique*

L'urée est synthétisée dans le foie et résulte primitivement des réactions de désamination des acides aminés. Son élimination dans l'urine est la voie principale d'excrétion de l'azote. Elle est filtrée au niveau glomérulaire, mais il y a une réabsorption tubulaire significative par diffusion passive. Bien que la concentration plasmatique de l'urée soit souvent utilisée comme indice de la fonction glomérulaire, le dosage de la créatinine plasmatique est un moyen d'évaluation plus précis. La production de l'urée augmente avec la ration protéique alimentaire et l'inverse. La réabsorption tubulaire augmente si le débit urinaire diminue (par exemple dans une déplétion hydrique), ce qui peut entraîner une augmentation de la concentration plasmatique de l'urée, même si la fonction rénale est normale (Marshall et Bangert, 2005).

Partie II

Matériels et Méthodes

Partie II Matériels et Méthodes

1. Matériel

1.1. Matériel Végétal

La plante *Ruta montana* (rue des montagnes) a été récoltée à maturité entre le mois d’Août et Septembre 2014-2016 (Fig.21), dans la région Beni Aziz wilaya de Sétif –Nord Est d’Algérie (36° 28’ 00’’Nord 5° 39’ 00’’ Est) à climat continental semi-aride (Fig.22). Elle a été identifiée sur la base de caractères morphologiques (Quazel et Santa, 1963).

Les parties aériennes (fruit et feuilles) ont été débarrassées du sable collé puis séchées dans un endroit aéré à température ambiante et à l’abri de la lumière.

Après séchage, les deux parties sont broyées à l’aide d’un moulin électrique en poudre fine et conservées dans des bocaux hermétiques à une température de 4°C jusqu’à l’utilisation.



Figure 21 : La plante *Ruta montana* (photo originale, 2016).

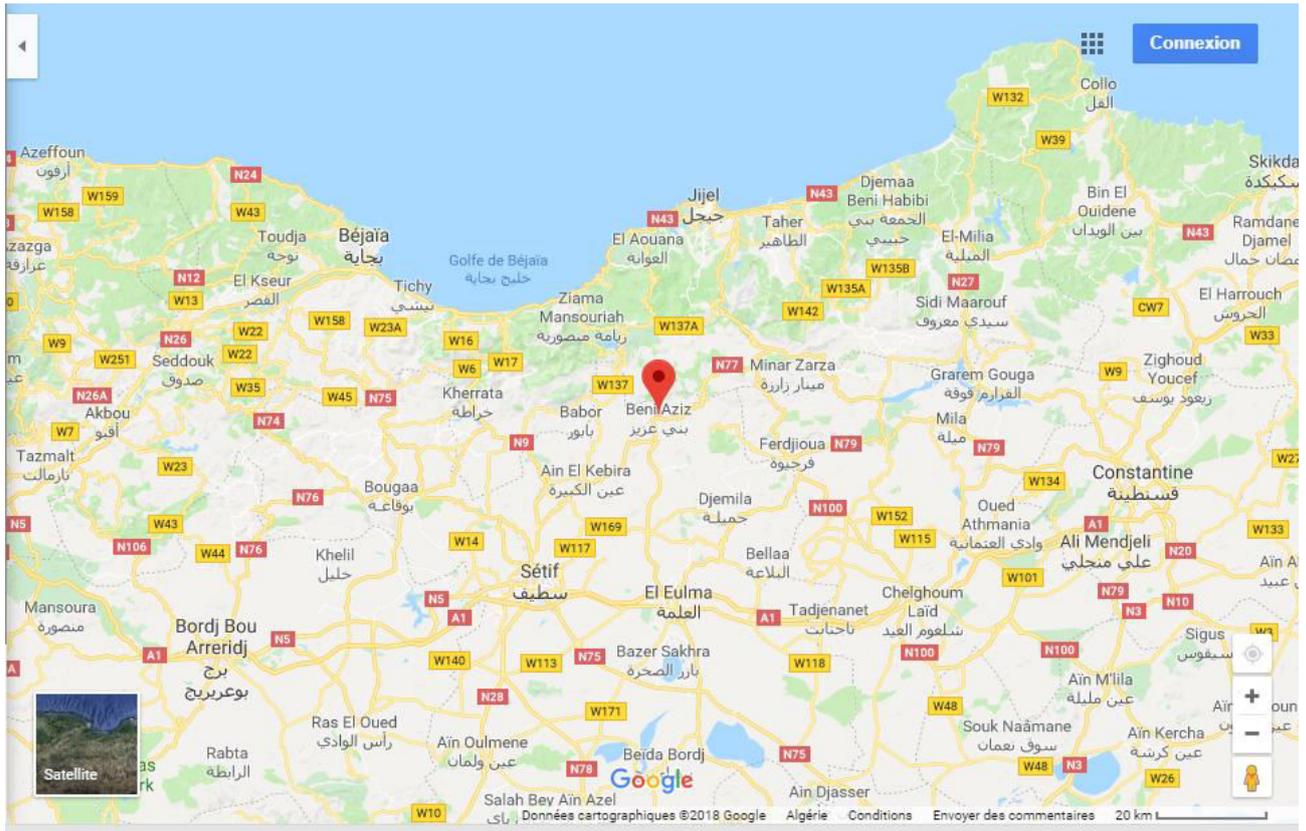


Figure 22 : Localisation géographique de la zone de récolte (Beni Aziz, wilaya de Sétif) (<https://www.google.com/maps>).

1.2. Les souches microbiennes utilisées

Les souches utilisées sont des souches de référence de l'American type culture collection (ATCC), conservées à 4 °C dans des tubes à essais contenant de la gélose inclinée.

Tableau 2 : Description et pouvoir pathogène des souches testées.

Groupes de germes	Espèces	Références	Habitat préférentiel	Infections hospitalières les plus fréquentées.
Bacille Gram+	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 10876	Sol, poussières, eaux, aliments, lait (en poudre)	Intoxications alimentaires Septicémies chez les immunodéprimés.
Cocci Gram-	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Peau, cheveux, Nasopharynx, périnée, poussières, air, aliments contaminés	Infections cutanées, plaies, brûlures, abcès, ostéites, ostéomyélites, endocardites, septicémies, infections pulmonaires, intoxications alimentaires.
Bacille Gram-	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Matières fécales, aliments contaminés, eaux usées	Infections urinaires, plaies, septicémies, infections respiratoires.
Bacille Gram-	<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 13311	L'intestin des vertébrés, sols	Diarrhées, fièvre typhoïde
Moisissures	- <i>Fusarium oxysporum</i> - <i>Aspergillus niger</i>		-Présent dans les sols sous forme sporulée	-Agent d'onyxis, de kératites, d'endophtalmies, e péritonites et d'infections disséminées chez les patients atteints d'hémopathie maligne.

1.3. Molécules de références : antibiotiques

La sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis l'Amoxicilline (**AX : 5 µg/disque**), Cefotaxime (**CAZ : 30 µg/disque**), Céfazoline (**CZ : 30 µg/disque**) et Co-trimoxazole

(SXT : 25 µg/disque) une association de Triméthoprimine et Sulfaméthoxazole à été testée comme contrôle positif et du DMSO (10 µl/disque) comme contrôle négatif.

1.4. Matériel animal

Des souris blanches *Swiss albinos*, des deux sexes mâles et femelles ; adultes âgées de 2 mois, pesant entre 20 à 36 g provenant de l'institut Pasteur d'Alger ont été employées pour l'étude toxicologique.

Les souris sont hébergées au niveau de l'animalerie du " Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Ferhat Abbas-Sétif, Algérie" dans des cages en plastique transparent d'une longueur de 55 cm, d'une largeur de 33 cm et d'une hauteur de 19 cm ; tapissées d'une litière renouvelable trois fois par semaine. Les animaux ont disposé d'eau du robinet et de nourriture *ad libitum*.

Les animaux sont acclimatés aux conditions de l'animalerie pendant une quinzaine de jours avant l'expérimentation.

2. Méthodes

2.1. Screening phytochimique

Les méthodes de screening chimique sont indiquées par Farnsworth (1966) (Voire les annexes).

2.2. Extraction

2.2.1. Préparation de l'extrait méthanolique

Les extraits méthanoliques des feuilles et des graines de *Ruta montana* sont préparés selon la méthode de Benbott *et al.* (2013). Une quantité de 50 g de la poudre végétale des feuilles ou des graines de *Ruta montana* est mis à macérer dans 250 ml méthanol pur pendant 72 heures, à l'ombre et à température ambiante. L'extrait récupéré par filtration est soumis à une évaporation du méthanol sous pression réduite à 35°C dans un rota vapeur. La solution obtenue est séchée dans une étuve puis les extraits sont conservés à 4°C jusqu'à l'utilisation (Fig.23).

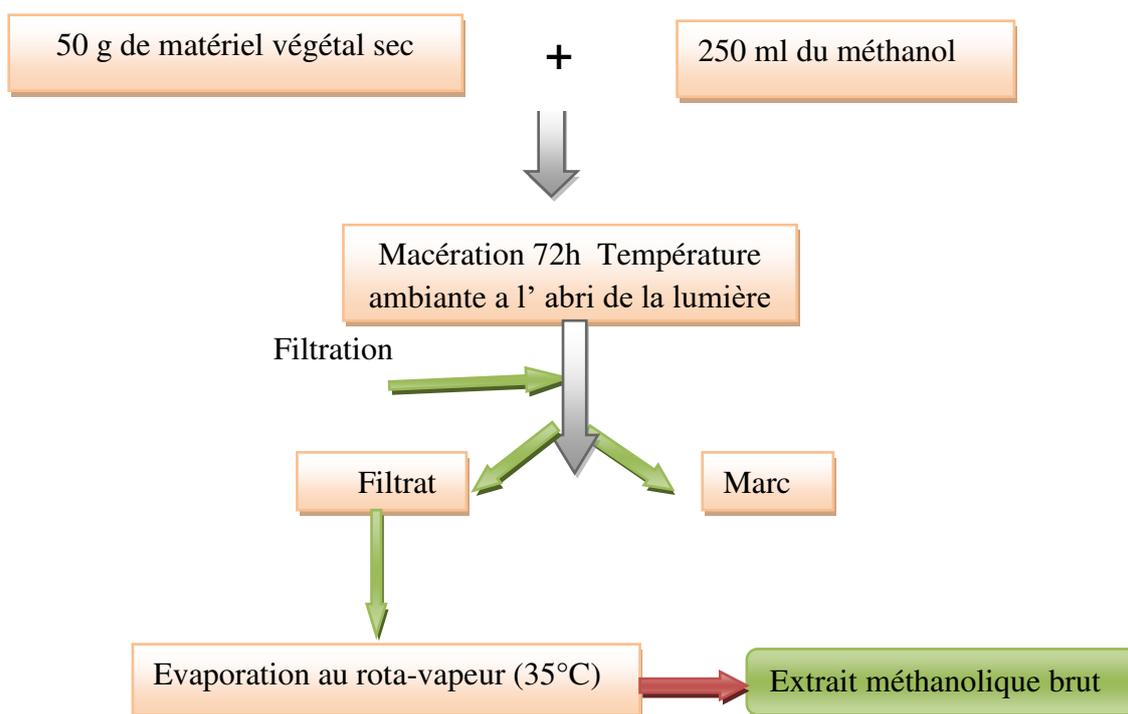


Figure 23: Protocole de préparation des extraits méthanoliques de la plante par macération (Benbott *et al.*, 2013).

2.2.2. Préparation de l'extrait alcaloïdique

L'extraction des alcaloïdes totaux à partir de la partie aérienne du *Ruta montana* est obtenue par une extraction liquide-liquide, basée sur la différence de solubilité des alcaloïdes en milieu acide et alcalin ($\text{NH}_4\text{OH}-\text{H}_2\text{SO}_4-\text{NH}_4\text{OH}$) dans l'eau d'une part et d'autre part dans les solvants organiques (Forgacs *et al.*, 1983).

La partie aérienne de la plante est finement broyée par un broyeur électrique. 100 g de la poudre obtenue est dégraissée par 250 ml d'éther de pétrole par macération et sous agitation à température ambiante pendant 3 à 4 heures.

Après filtration, le marc (la poudre moulu débarrassées de la matière grasse) est alcalinisé par une solution 40 ml d'ammoniaque (0,5N) pendant au moins 24 heures à température ambiante permettant ainsi aux alcaloïdes de passer de la forme sel à la forme organique.

Les alcaloïdes totaux sont extraits par l'extracteur de Soxhlet en utilisant un solvant non miscible avec l'eau où la poudre alcalinisée (le marc) est placée dans une cartouche en cellulose, celle-ci est placée à son tour dans l'appareil de Soxhlet ; ce dernier est monté sur un

ballon contenant 300 ml de chloroforme et est surmonté d'un réfrigérant. Le solvant est vaporisé puis condensé tout en restant en contact avec le matériel végétal. La solution collectée dans le ballon s'enrichit de plus en plus en soluté, alors de 5 à 8 cycles sont nécessaires pour un épuisement total des alcaloïdes.

A l'issue de cette opération, l'extrait chloroformique est lavé trois fois successives par une solution de 150 ml d'acide sulfurique (0,5N) pour chaque volume, les trois fractions sont reprises dans une ampoule à décantation, alcalinisées jusqu'à pH 9 par ajout de quelques ml d'ammoniaque pur.

Nous épuisons ensuite trois fois la solution par 150 ml d'éther d'éthylque, en agitant doucement l'ampoule à chaque fois. Nous récupérons les trois fractions organiques dans un Erlen-Mayer, qui seront déshydratées par filtration sur papier filtre soutenant du sulfate de sodium anhydre.

L'extrait recueilli dans un bêcher taré est évaporé à sec sur plaque chauffante. Après refroidissement, nous pesons à nouveau le bêcher, la différence représente la masse ou rendement des alcaloïdes totaux, puis les alcaloïdes totaux sont conservés à 4°C (Bruneton, 1999 ; Vercauteren, 2006) (Fig.24).

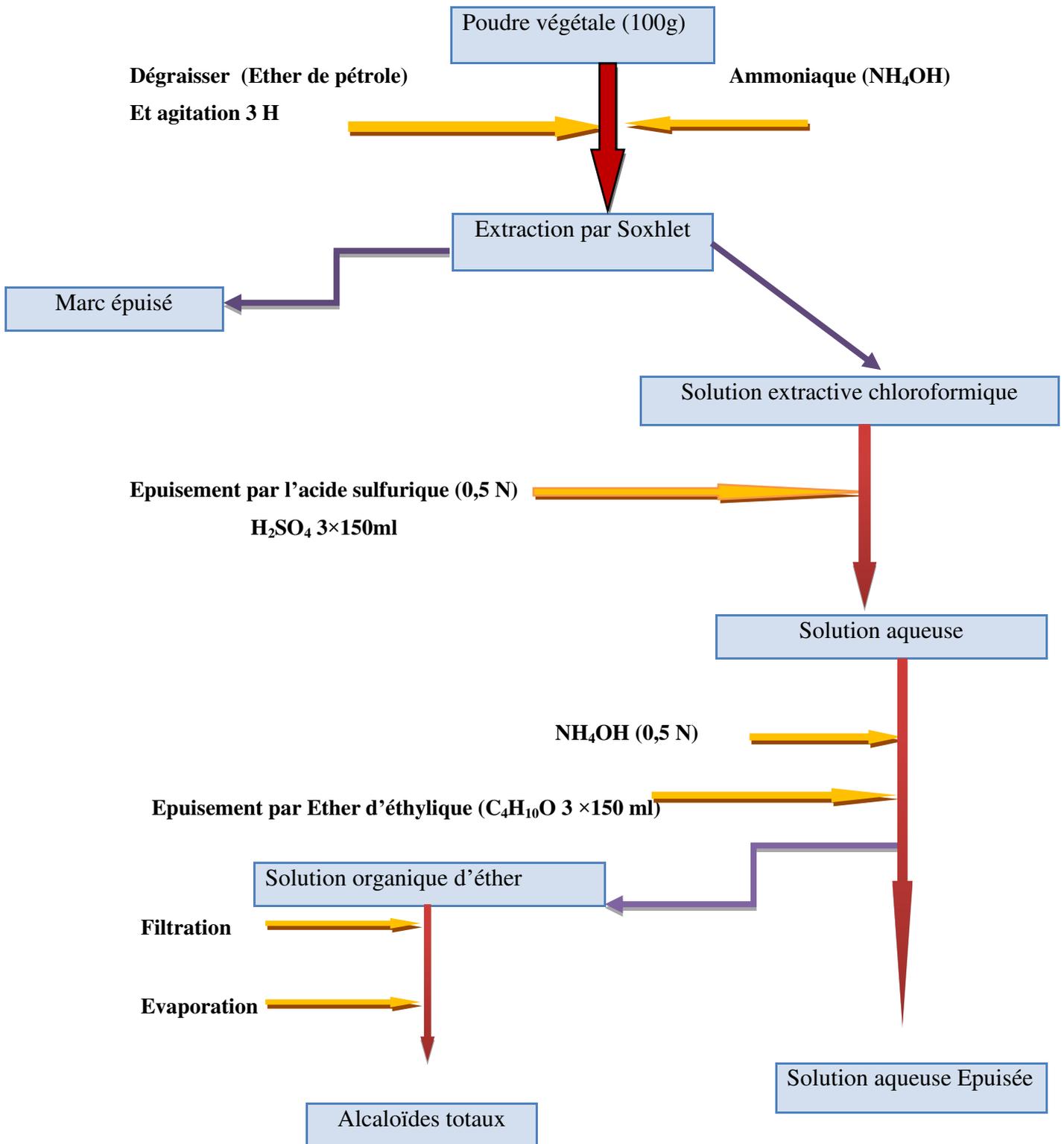


Figure 24 : Extraction des alcaloïdes totaux du *Ruta montana* (Bruneton, 1999).

2.3. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Une première estimation de la richesse en alcaloïdes des extraits peut se faire par CCM. On utilise comme phase stationnaire, des plaques Silica gel 60 F254F254 avec des dimensions 20 X 20 cm de marque MACHEREY-NAGEL (Germany). On dépose à 1 cm du bord inférieur en petits spots (3 à 4 fois) 5 µL de chaque échantillon (5 mg de chaque extrait dans 1 ml de méthanol). La phase mobile utilisée pour la migration des alcaloïdes est composé de «méthanol/chloroforme/ammoniaque» : 78,5/20/1,5 (V/V/V) (Wagner et Bladt, 1995).

Les solvants vont monter par capillarité dans la plaque de silice et entraîner les produits contenus dans les échantillons selon leur affinité. La plaque est sortie quand le solvant arrive à environ 3 cm du bord supérieur et on laisse les solvants s'évaporer pendant quelques min (on peut accélérer l'évaporation à l'aide d'un sèche-cheveux).

La plaque est observée et photographiée sous une lampe UV à une longueur d'onde $\lambda = 360$ nm, puis pulvérisation avec le réactif de Bouchardât jusqu'à l'apparition de spots colorés.

On Calcule les R_f (Rapport frontal) pour chaque constituant selon la formule suivante :

R_f = Distance parcourue par le constituant / Distance parcourue par le front de l'éluant

2.4. Les tests biologiques *in vitro*

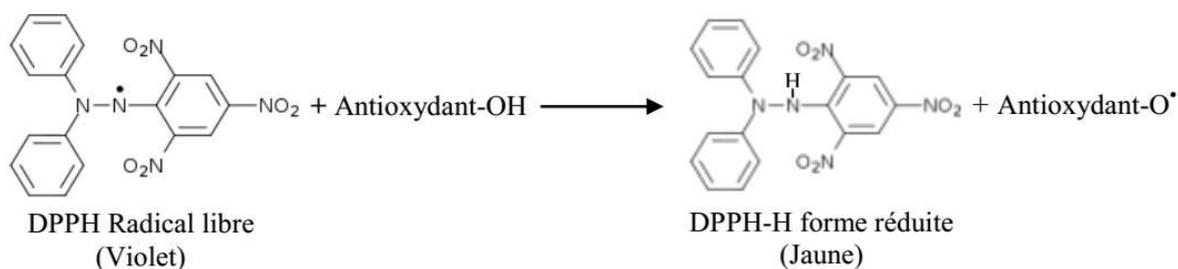
2.4.1. Test de l'activité antioxydante

2.4.1.1. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl)

De point de vue méthodologique, le test du radical libre DPPH est recommandé pour des composés contenant SH, NH et OH groupes (Salah *et al.*, 1995). Il s'effectue à température ambiante, ceci permettant d'éliminer tout risque de dégradation thermique des molécules thermolabiles. Le test est largement utilisé au niveau de l'évolution des extraits hydrophiles très riches en composés phénoliques (Yi-Zhong *et al.*, 2006, Hatzidimitriou *et al.*, 2007). L'activité antiradicalaire des différents extraits à tester a été déterminée selon méthode décrite par Mansouri *et al.* (2005) qui utilise le DPPH comme un radical libre relativement stable qui absorbe dans le visible à la longueur d'onde λ de 517 nm.

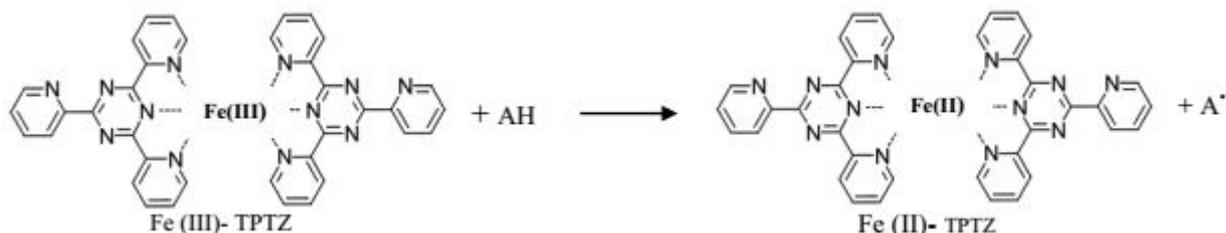
La technique consiste à mettre le radical libre DPPH (de couleur violette), en présence de l'antioxydant (extrait brut méthanolique, extrait alcaloïdique) va être réduit et vire vers le

jaune. Ce changement se traduit par une diminution de l'absorbance. La réaction de DPPH est représentée dans la figure suivante:



2.4.1.2. Réduction du fer : FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

La méthode FRAP est basée sur la réaction de réduction de fer ferrique (Fe_3^+) présent dans le complexe $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en fer ferreux (Fe_2^+) par un antioxydant, la réaction est révélée par le virement de la couleur jaune du fer ferrique (Fe_3^+) à la couleur bleue - vert du fer ferreux (Fe_2^+). L'intensité de cette coloration est mesurée par spectrophotométrie à 700 nm. Le mécanisme réactionnel de la réduction de fer est illustré dans la figure suivante :



2.4.2. Test de l'activité antimicrobienne

Afin d'évaluer l'activité antimicrobienne des extraits de la plante, nous avons utilisé la méthode de diffusion en milieu gélosé (antibiogramme), où les disques sont imbibés de 10 μl de chaque extrait de *Ruta montana* (Sokmen *et al.*, 2004).

-Préparation des dilutions d'extraits de *Ruta montana*

Les extraits de *Ruta montana* sont dissous dans le diméthyle sulfoxyde (DMSO) pour préparer les différentes concentrations avec des dilutions successives au demi, sachant que la concentration de la solution mère des extraits méthanoliques (Graines et feuilles) et alcaloïdique est de 200mg/ml.

2.4.2.1. Activité Antibactérienne

L'évaluation de l'activité antibactérienne des différents extraits est réalisée par la méthode de diffusion sur disques, en raison de sa simplicité et son efficacité pour tester la sensibilité des bactéries.

Cette méthode repose sur le pouvoir migratoire des extraits sur un milieu solide à l'intérieur d'une boîte de Pétri. Cette méthode nous permet de mettre en évidence l'effet antibactérien des différents extraits sur les bactéries, ainsi que la détermination de la résistance ou la sensibilité de ces bactéries vis-à-vis de cet extrait. La méthode de diffusion des disques appliquée est celle décrite par Rasooli *et al.* (2008).

Les résultats sont observés après 24 h d'incubation à 37°C, en mesurant les diamètres des zones d'inhibition, correspond à l'absence de la croissance et plus le diamètre de cette zone est grand plus la souche est sensible (Choi *et al.*, 2006).

Les tests ont été répétés deux fois, des disques imprégnés de DMSO et d'éthanol sont aussi utilisés (témoins négatifs).

D'après Ponce et ces collaborateurs (2003), la sensibilité des bactéries a été classée par le diamètre des halos d'inhibition :

- ❖ *Non sensible (-) pour les diamètres moins de 8 mm;*
- ❖ *Sensible (+) pour des diamètres de 8 à 14 mm;*
- ❖ *Très sensible (++) pour des diamètres de 15 à 19 mm;*
- ❖ *Extrêmement sensible (+++) pour les diamètres plus de 20 mm.*

➤ **Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)**

Les concentrations inhibitrices minimales (CMI) ont été déterminées par la technique de diffusion en gélose décrite par Rajbhandari et Schopke (1999). La plus forte concentration d'extrait testé pendant l'expérience était de 200 mg/ml. La CMI correspond à la plus faible concentration de l'extrait d'essai capable d'inhiber la croissance microbienne visible.

➤ **L'Antibiogramme**

Un antibiogramme est une technique de laboratoire visant à tester la sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis d'un ou plusieurs antibiotiques supposés ou connus.

Le principe consiste à placer la culture de bactéries en présence du ou des antibiotiques et à observer les conséquences sur le développement et la survie de celle-ci. On peut placer plusieurs pastilles imbibées d'antibiotiques sur une souche bactérienne déposée dans une boîte de Pétri.

Ce test a été réalisé pour étudier l'antibiogramme standard des germes utilisés et le comparer avec l'effet de nos extraits bruts. Les disques d'antibiotiques sont déposés à la surface d'un milieu gélosé, préalablement ensemencé avec une culture pure de la souche à étudier. La sensibilité des bactéries aux antibiotiques est appréciée selon le même protocole qu'avec les disques de papiers imprégnés d'extrait.

2.4.2.2. Activité Antifongique

La méthodologie qu'on a suivie pour l'évaluation de l'effet antifongique des alcaloïdes totaux et des extraits méthanoliques de *Ruta montana* est la méthode de contact direct qui permet la mise en évidence de l'activité antifongique (Satrani, 2001).

Les extraits de différentes concentrations entre 6,25 et 200 mg/ml de l'extrait avec tween 20, sont incorporés dans le milieu de culture PDA (Potato Dextrose Agar) après autoclavage à 121° C pendant 30 min.

Le mélange de chaque un milieu, est coulé dans des boîtes de Pétri et à l'aide d'un pince steril, la culture fongique est déposée au centre de la boîte de pétri. Nous opérons de la même façon pour chaque champignons et chaque concentration de l'extrait, les boîtes de pétri sont ensuite fermées hermétiquement par le para film et incubées à 25°C, pendant 7 jours.

Pour chaque concentration, trois répétitions sont préparées de la même façon, afin de minimiser l'erreur expérimentale.

$I_c (\%) = (D_0 - D_c) / D_0 \times 100$, D_0 étant la croissance diamétrale du témoin et D_c la croissance diamétrale du champignon en présence d'une concentration (c) du fongicide (Serghat *et al.*, 2004).

2.5. Les tests biologiques *in vivo*

Cette étude est envisagée uniquement pour tester la toxicité des alcaloïdes totaux de la plante *Ruta montana*.

2.5.1. Détermination de la DL₅₀ chez les souris mâles et femelles

La DL₅₀ est défini comme la dose dérivée statistiquement qui, lorsqu'elle est administrée dans un test de toxicité aiguë, devrait causer la mort chez 50% des animaux traités dans une période donnée, cette détermination est fondée sur l'évaluation des réponses de tout ou rien : mort ou survie des animaux.

La valeur DL₅₀ (précise ou approximative) est actuellement la base de la classification toxicologique des produits chimiques et est donc requise par les autorités gouvernementales dans différentes situations. Les animaux traités sont étroitement observés chaque heure pendant les premières 24 heures et chaque jour pendant 2 semaines et les changements dans l'apparence et le comportement sont notés. Un grand nombre de signes cliniques peuvent être utilisés pour caractériser la toxicité systémique aiguë et décrire sa progression. Dans le passé, la DL₅₀ a été utilisée pour les produits chimiques industriels en tant que base des divers systèmes de classification de la toxicité qui sont ou ont été en service dans le monde entier (Walum, 1998).

Le protocole expérimental consiste à expérimenter sur 6 à 7 lots de 8 animaux auxquels sont administrées des doses croissantes de la substance à essayer de manière que le pourcentage de mortalité varie entre 0 et 100 %. Ceci parce qu'il est impossible d'obtenir immédiatement 50 % de morts à partir d'un seul group.

Les souris mâles et femelles sont pesées, identifiées par un marquage et réparties en 6 groupes pour les souris mâles et de 7 groupes pour les souris femelles de 8 animaux pour chaque groupe.

Les souris mâles et femelles sont soumis à un jeun durant 18 h, l'extrait alcaloïdique de *Ruta montana* à tester est solubilisé dans quelques gouttes de méthanol et dilué dans de l'eau physiologie et est administrée par voie intrapéritonéale aux différents lots de souris, à raison d'une dose par lot :

(100, 200, 300, 400, 500 et 600 mg/kg du poids de souris mâles).

(50, 100, 150, 200, 250, 300 et 350 mg/kg du poids de souris femelles).

Après l'administration de l'extrait, les animaux sont observés individuellement chaque heure et pendant 8 heures puis chaque jour pendant 14 jours.

Durant cette période, nous avons enregistré le nombre de souris morts ainsi que le comportement et les troubles symptomatologiques observés à l'œil nu. Les principaux signes recherchés sont : De même, les symptômes observés lors des tests de toxicité chronique chez modification de la pression artérielle, perte d'appétit, agressivité, agitation, faiblesse musculaire, perte de poids, perte de cheveux, salivation excessive, vomissements et / ou convulsions, diarrhée sanglante, gonflement local et généralisé, saignement des orifices corporels (bouche, narines, oreille et anus), coma et mort.

La DL_{50} et son intervalle de confiance sont calculés par des méthodes de Lichfield et Wilcoxon (1949), Miller et Tainter (1944), Trevan (1927) et méthode des moindres carrées (<https://www.analystsoft.com/fr/products/biostat>) et des méthodes graphique.

La valeur de la DL_{50} permet de classer l'extrait étudié sur l'échelle de toxicité proposée en 1980 par Hodge et Sterner chez le rat ou la souris (Hodge et Sterner, 1943):

- Extrêmement toxique : $DL_{50} < 1$ mg/kg
- Très toxique : DL_{50} de 1 à 50 mg/kg
- Moyennement toxique : DL_{50} de 50 à 500 mg/g
- Faiblement toxique : DL_{50} de 500 à 5000 mg/kg
- Pratiquement non toxique : DL_{50} de 5000 à 15000 mg/kg
- Relativement sans danger: $DL_{50} > 15000$ mg/kg

2.5.2. Toxicité aigüe chez les souris mâles et femelles

Des souris mâles et femelles sont identifiées par un marquage et sont repartis en 6 groupes renfermant chacun 14 souris. Avant le traitement les animaux sont mis à jeûne 24 heures et ils sont pesés.

- Des souris mâles sont reparties en 3 groupes :
 - Un groupe témoin (moyen de poids est 30g) a reçu de l'eau physiologie (0,9 % NaCl) contenant quelque goutte de méthanol pour seule application par voie IP.
 - Un premier groupe (moyen de poids est 30 g) traité par la dose 129,68 mg/kg ($\approx 1/3 DL_{50}$) des alcaloïdes totaux de *Ruta montana* pour une seule application par voie IP, sacrifié après 24heures,.
 - Un deuxième groupe (moyen de poids est 30,28 g) traité par la dose 129,68 mg/kg ($\approx 1/3 DL_{50}$) des alcaloïdes totaux de *Ruta montana* pour seule application par voie IP, sacrifié après 5 jours.

- Les souris femelles sont réparties en 3 groupes aussi :

➤ Un groupe témoin (moyen de poids est 27,64 g) a reçu de l'eau physiologie (0,9 % NaCl) contenant quelque goutte de méthanol pour une seule application par voie IP.

➤ Un premier groupe (moyen de poids est 31,64 g) traité par la dose 75,23 mg/kg ($\approx 1/3$ DL₅₀) des alcaloïdes totaux de *Ruta montana* pour seule application par voie IP, sacrifié après 24 heures.

➤ Un deuxième groupe (moyen de poids est 29,06 g) traité par la dose 75,23 mg/kg ($\approx 1/3$ DL₅₀) des alcaloïdes totaux de *Ruta montana* pour une seule application par voie IP, sacrifié après 5 jours.

Les groupes sont traités par voie IP avec une dose qui correspond à $1/3$ DL₅₀, une dose importante mais non mortel afin de déterminer les organes cibles (Antov *et al.*, 1991).

Après le traitement, les animaux sont observés chaque heure pendant le premier jour et chaque jour pour le deuxième lot, pour noter le comportement et la carte clinique. A la fin de l'expérience, les animaux (souris mâles et femelle) sont anesthésiés par inhalation de chloroforme sous une cloche en verre et avant leurs sacrifices le sang est prélevé par une ponction cardiaque afin d'effectuer les différentes analyses hématologiques et biochimiques.

Le sacrifice après 24 heures et 5 jours de traitement représentant la toxicité hépatique aiguë maximale selon Szymanowicz et Danel (2005).

Après dissection, le foie, la rate, les reins, les poumons, le cœur et le cerveau sont observés macroscopiquement *in situ*, puis prélevés et déposés dans l'eau physiologie, dégraissés, séchés par le papier filtre et pesés. Des morceaux du foie, des reins et de cerveau sont conservés dans une solution de formol à 10 % pour l'étude histopathologique.

2.5.3. Toxicité subaiguë chez les souris mâles et femelles

Pour étudier la toxicité subaiguë, des souris de deux sexes sont répartis en 04 groupes, deux groupes témoins (mâles et femelles) et deux groupes traités (mâles et femelles) de 14 souris pour chaque groupe.

-Le groupe traité des souris mâles (moyen de poids est 28,43 g) reçoit par IP une dose de 19,452 mg/kg ($\approx 1/20$ DL₅₀ mg/kg) des alcaloïdes totaux de *Ruta montana* pendant 28 jours.

-Le groupe traité des souris femelles (moyen de poids est 28,35 g) reçoit par voie intra péritonéal une dose de 11,28 mg/kg ($\approx 1/20$ DL₅₀ mg/kg) des alcaloïdes totaux de *Ruta*

montana pendant 28 jours au même temps les groupes témoins (moyen de poids est 25,81 g) sont traités seulement avec de l'eau physiologie.

Les animaux sont pesés avant l'expérience, une fois chaque semaine pendant l'expérience et avant leurs sacrifices.

Après 28 jours, les souris mâles et femelles sont anesthésiées par inhalation de chloroforme sous une cloche en verre, le sang est prélevé par ponction cardiaque pour réaliser des analyses hématologiques et biochimiques ensuite les animaux sont sacrifiés. Les reins, le foie, les poumons, la rate, le cœur et le cerveau sont observés macroscopiquement, ensuite prélevés, placés dans l'eau physiologie, dégraissés, séchés et pesés, le foie, le rein et le cerveau sont conservés dans du formol à 10 % pour l'étude histopathologique.

2.5.4. Etude de quelques paramètres hématologiques et biochimiques sériques

Au départ les souris sont anesthésiées par inhalation sous une cloche à l'aide de chloroforme puis des prélèvements du sang sont effectués à l'aide d'une seringue par ponction cardiaque. Le sang a été collecté dans des tubes EDTA pour la FNS et des tubes héparines pour les paramètres biochimiques (bilans rénal et hépatique) pour chaque animal.

Les tubes héparines sont centrifugés à 3000 tours/min pendant 5 min, ensuite le surnageant (plasma) est placé dans des épendorffs afin de quantifier les paramètres biochimiques suivants: Urée, Créatinine, ASAT, ALAT et PAL.

L'analyse des paramètres hématologiques (RBC, WBC, PLT, HGB, HCT, MCV, MPV, RDW, MCH, MCHC) a été effectuée à l'aide d'un ABX micros 6-Français alors, le dosage des paramètres sériques (Urée, Créatinine, les transaminases, phosphatase alcalin) a été fait l'aide d'un Integra Roche-Français, les kits utilisés sont de la même marque « Integra-Roche ».

2.6. Analyses statistiques

Tous les résultats sont exprimés en $M \pm SD$ pour les tests biologiques *in vitro* et en $M \pm SEM$ pour les tests biologiques *in vivo*. Les IC_{50} sont calculées par la méthode de la régression linéaire. L'analyse statistique est réalisée en utilisant le *test t de Student* pour la comparaison de deux échantillons, ou l'analyse de la variance (one way ANOVA) suivie par les post-tests *de Tukey et Dunnet* pour la comparaison de plusieurs échantillons par le logiciel GraphPad Prism 5.

Partie III

Résultats

Partie III Résultats

1. Screening phytochimique

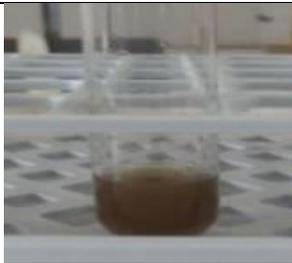
La mise en évidence des différentes classes des métabolites secondaires contenues dans une plante, nous permet d'avoir une bonne idée sur ses activités pharmacologiques. Pour cela nous avons réalisé des tests phytochimiques qualitatifs sur les extraits de la partie aérienne de la plante.

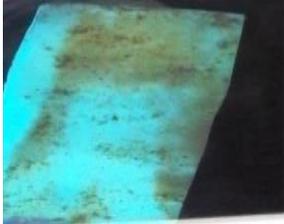
Ces tests sont en relation avec l'intensité du précipité et de turbidité ou la coloration est proportionnelle à la quantité de la substance recherchée. Ainsi :

- Une réaction positive est représentée par : +
- L'absence de la substance est représenté par : –

Les réactions de caractérisation ont permis de mettre en évidence plusieurs groupes chimiques. Les résultats sont présentés dans le tableau 3.

Tableau 3 : Résultats de screening phytochimique mené sur l'espèce *Ruta montana*

Principe chimique	Test effectué	Résultat	Image
Tanins	FeCl	(+)	
Alcaloïdes	Wagner Bouchardât Mayer	(+) (+) (+)	

Anthocyanes	HCl+Ammoniac	(-)	
Coumarines	NaOH	(+)	
Stérols et Triterpènes	Anhydride acétique+ Chloroforme	(+)	
Saponosides	Indice de mousse	(-)	

Ce screening phytochimique indique la présence de quatre groupes de métabolites secondaires : les tanins, les terpènes et stérols, les coumarines et les alcaloïdes avec l'absence totale des antocyanes et des saponosides.

2. Rendement des extractions

Le tableau 4 présente les rendements en extraits alcaloïdiques et les extraits méthanoliques bruts des différentes parties de la plante (feuilles et graines), ces derniers ont été déterminés par la formule suivants : $R\% = \frac{PEB}{PMV}$

R : Rendement

PEB : Poids de l'extrait brut méthanolique (g)

PMV : Poids de matière végétale (g)

Tableau 4 : Rendements en extraits bruts à partir des graines, feuilles et extrait d'alcaloïdes du *Ruta montana*.

Extrait	Aspect	Rendement %
Extrait méthanolique des feuilles	Pâte collante verte	6,46
Extrait méthanoliques des grains	Pâte collante brune claire	5,52
Extrait alcaloïdique	Pâte collante brune foncé	0,26

L'extraction par macération à partir des feuilles et des graines a permis d'obtenir des rendements variables selon la partie de la plante, un rendement en extrait brut des feuilles important par rapport à l'extrait brut des graines. L'extraction liquide-liquide des alcaloïdes totaux des parties aériennes de *Ruta montana* donne un rendement de $0,26 \pm 0,05$ g/100g de la poudre végétale, un rendement très faible en comparaison avec les rendements en extrait brut.

3. Chromatographie sur couche mince

L'analyse par chromatographie sur couche mince et l'observation des chromatogrammes des extraits de *Ruta montana* sont effectuées sous une lampe à UV à 360 nm. Le système de migration selon Wagner et Bladt (1995) est constitué de méthanol, de Chloroforme et d'ammonique (78,5V/20V/1,5V) a permis d'avoir une séparation chromatographique et une visibilité acceptable des spots. Les spots et les fluorescences observées nous informent, après révélation des chromatogrammes avec le réactif Bouchardât, sur la présence des alcaloïdes. Les résultats obtenus sont représentés dans les figures 25 et 26, les Rfs correspondants à chaque spot sont présentés dans le tableau 5.

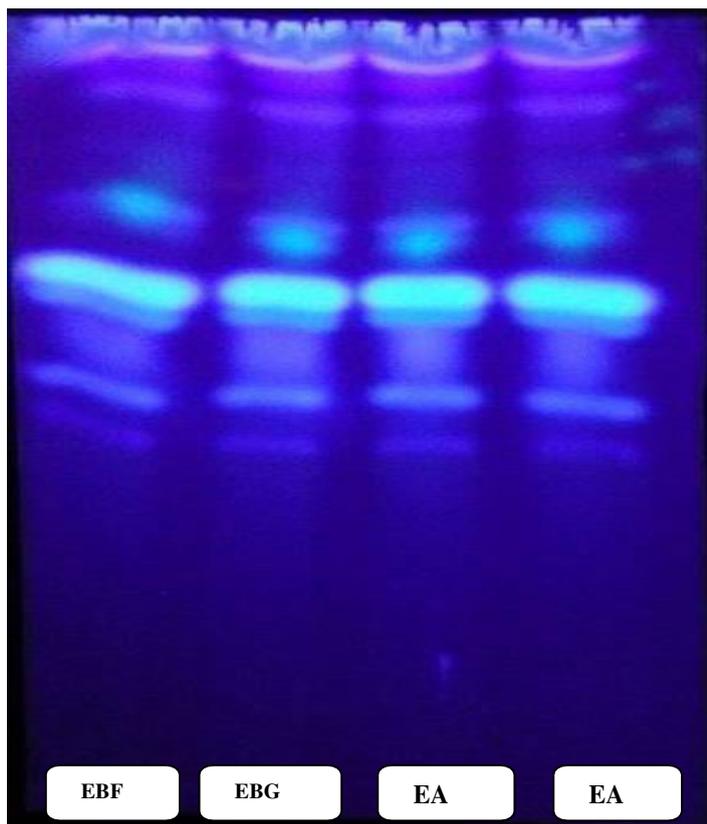


Figure 25 : Séparation des différents extraits de *Ruta montana* par CCM sous UV, $\lambda = 360$ nm
 phase mobile : Méthanol/ Chloroforme/ Ammoniaque 78,5/20/1,5 (V/V/V).

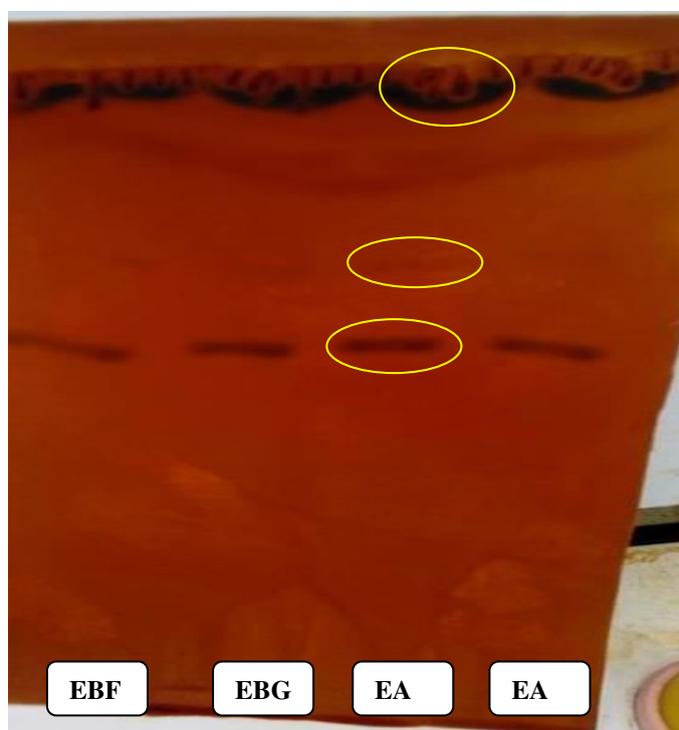


Figure 26 : Chromatogramme des différents extraits de *Ruta montana* après révélation
 Révélateur : réactif Bouchardat, $\lambda = 254$ nm

Tableau 5: Rapports frontaux (RF) des différents extraits du *Ruta montana*

Spots	Rapports frontaux (RF)	Extrait brut des feuilles	Extrait brut des grains	Extrait alcaloïdique
1	0,68	(+)	(+)	(+)
2	0,72	(+)	(+)	(+)
3	0,9	(+)	(+)	(+)

Les chromatogrammes des extraits méthanoliques des feuilles et des graines et d'extrait alcaloïdique de l'espèce *Ruta montana* présentent de nombreux spots correspondant aux différentes molécules, qui sont probablement des alcaloïdes, des polyphénols, des stérols ou des terpénoïdes.

Le réactif Bouchardât a révélé la présence de trois spots de couleur rouge brique pour chaque extrait, cette couleur indique la présence des alcaloïdes. Ces spots correspondent aux RF suivants (RF= 0,68-0,72-0,9).

4. Activité antioxydante

La capacité antioxydante des extraits de plante sont largement dépendant de la composition de ces extraits ainsi que les conditions de manipulation des tests *in vitro*, l'évaluation de l'activité est donc nécessairement réalisée par au moins deux méthodes différentes (Wong *et al.*,2006).

4.1. Piégeage du radical 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl (DPPH')

L'activité antioxydante des différents extraits (méthanoliques et alcaloïdique) de *Ruta vis-à-vis* du radical DPPH' a été évaluée spectrophotométriquement en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 517 nm (Fig. 27)

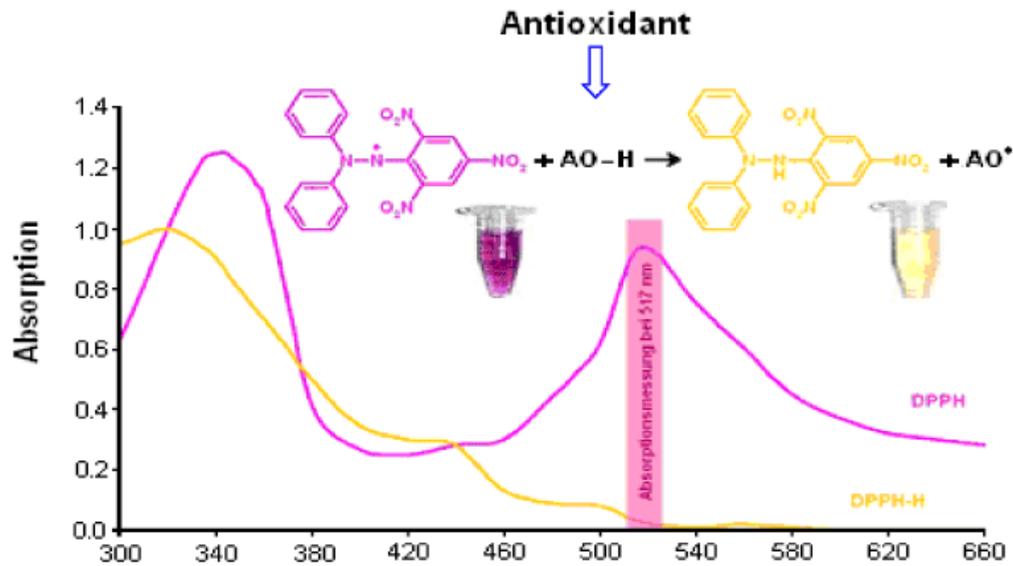


Figure27: Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH

En faisant varier la concentration des extraits de 2 à 100µg/ml, 1 à 80µg/ml, 1 à 250 µg/ml et de 0,5 à 8µg/ml pour les extraits méthanoliques des feuilles, des graines, extrait alcaloïdique et l'acide ascorbique respectivement et en calculant pour chaque concentration le pourcentage d'inhibition correspondant (I%), nous avons établi les profils d'activité antiradicalaire présentés dans les figures 28, 29 et 30.

Les profils d'activité antiradicalaire obtenus révèlent que les extraits de *Ruta montana* possèdent une activité antiradicalaire dose-dépendante.

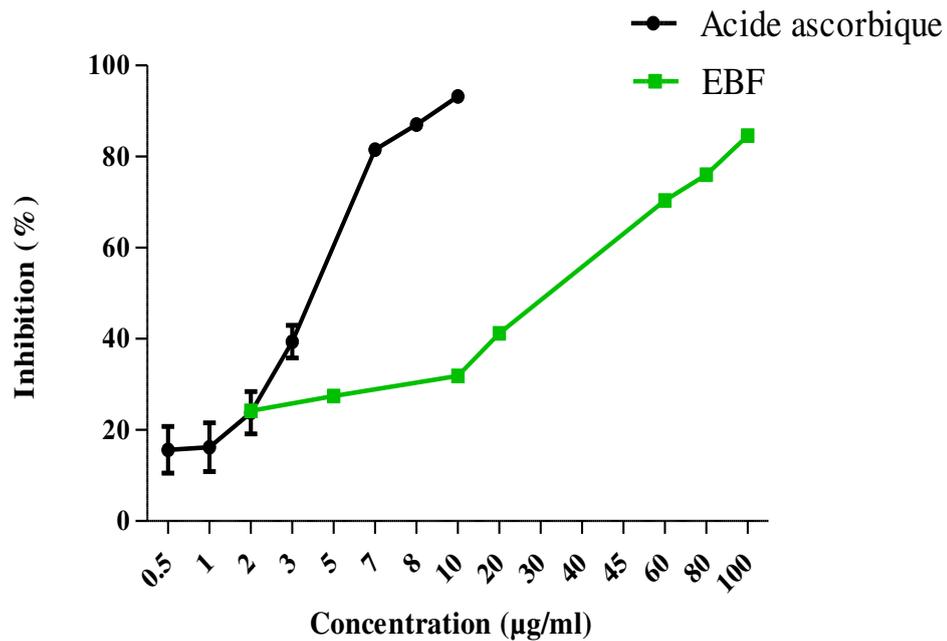


Figure 28 : Profils de l'activité antiradicalaire (testes DPPH') de l'extrait brut des feuilles et de l'acide ascorbique. Les valeurs sont représentées sous forme $M \pm SD$.

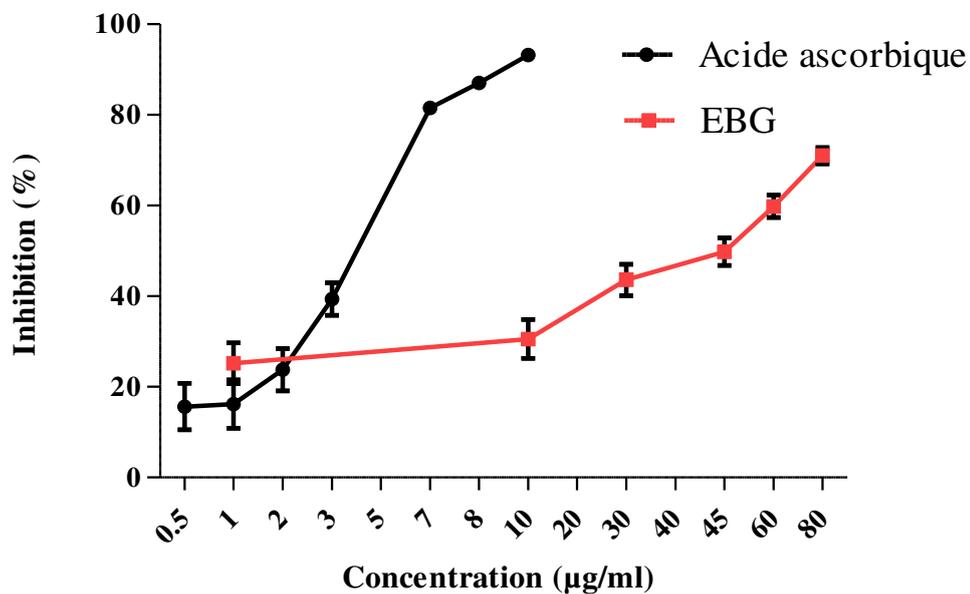


Figure 29: Activité antioxydante exprimé en pourcentage d'inhibition du DPPH' par l'extrait méthanolique des graines de *Ruta montana* et l'acide ascorbique. Les valeurs sont représentées sous forme $M \pm SD$.

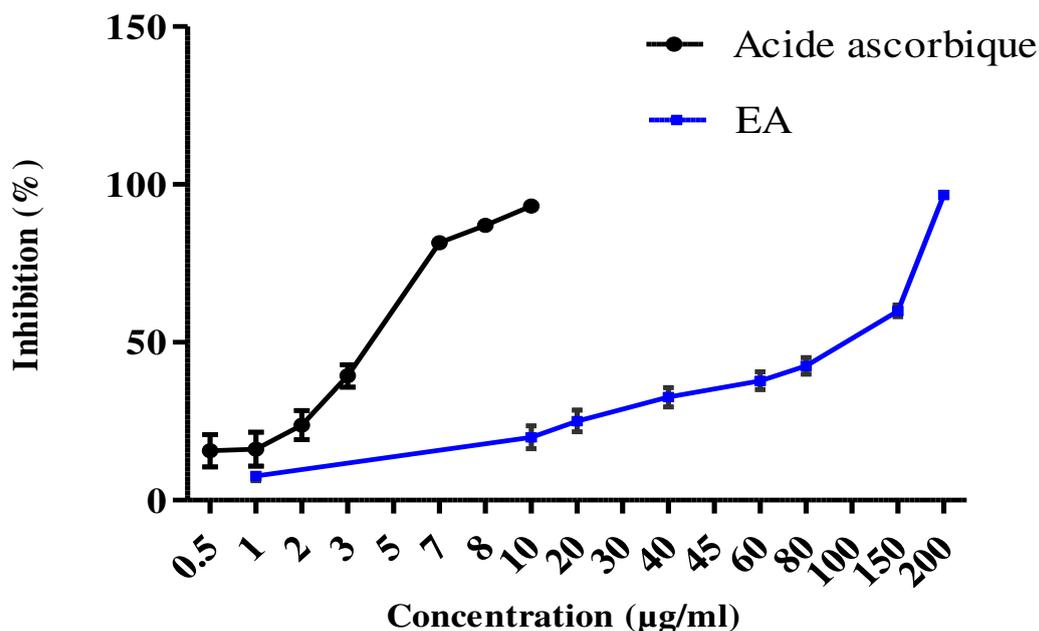


Figure 30: Profils de l'activité antiradicalaire (teste de DPPH) des alcaloïdes totaux de *Ruta montana* et de l'acide ascorbique. Les valeurs sont représentées sous forme $M \pm SD$.

Les extraits bruts des feuilles et des graines de *Ruta montana* ont montré un pouvoir réducteur plus important par rapport à l'extrait alcaloïdique. A une concentration de 60 µg/ml, ils ont atteint un pourcentage d'inhibition égale à 70,403 % et 59,796 % alors que l'extrait des alcaloïdes totaux n'a atteint que 37,84 % à cette même concentration.

4.1.1. Evaluation de l'IC₅₀

IC₅₀ est inversement lié à la capacité antioxydante d'un composé, car il exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. Plus la valeur d'IC₅₀ est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est élevée (Pokorny *et al.*, 2001). La concentration de l'échantillon nécessaire pour inhiber 50% du DPPH radicalaire, a été calculée par régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations d'extraits préparés. Les valeurs des IC₅₀ présentées dans le tableau 6 ont permis d'évaluer et de comparer l'efficacité des extraits.

Tableau 6 : Les valeurs de l'IC₅₀ des différents extraits de *Ruta montana*. Les valeurs sont présentées sous forme M ± SD.

Les extraits	EBF	EBG	EAT	A. Ascorbique
IC ₅₀ µg/ml	38,61 ± 0,9259	44,1 ± 4,397	96,87 ± 6,242	4,14 ± 0,31

À des fins comparatives, un antioxydant standard a été utilisé (l'acide ascorbique). Il a montré une activité antiradicalaire très puissante avec IC₅₀ de 4,14 ± 0,31 µg/ml. Les extraits de *Ruta montana* ont présenté une importante activité anti-radicalaire envers le radical DPPH. Dont l'EBF et EBG représentent les extraits les plus actifs avec des IC₅₀ de l'ordre 38,61 ± 0,9259 µg/ml et 44,1 ± 4,397 µg/ml respectivement. Ces effets obtenus sont bien meilleur que celui produit par l'extrait alcaloïdique qui présente une activité antiradicalaire plus au moins faible (IC₅₀ de l'ordre de 96,87 ± 0,31 µg/ml).

4.2. Pouvoir réducteur de l'ion ferrique (FRAP)

L'évaluation de l'activité antioxydante par réduction de fer est une méthode facile et reproductible, pour cela elle est très utilisée pour distinguer les extraits les plus actifs (Li et al, 2007). Les résultats obtenus sont présentés dans les figures 31, 32 et 33.

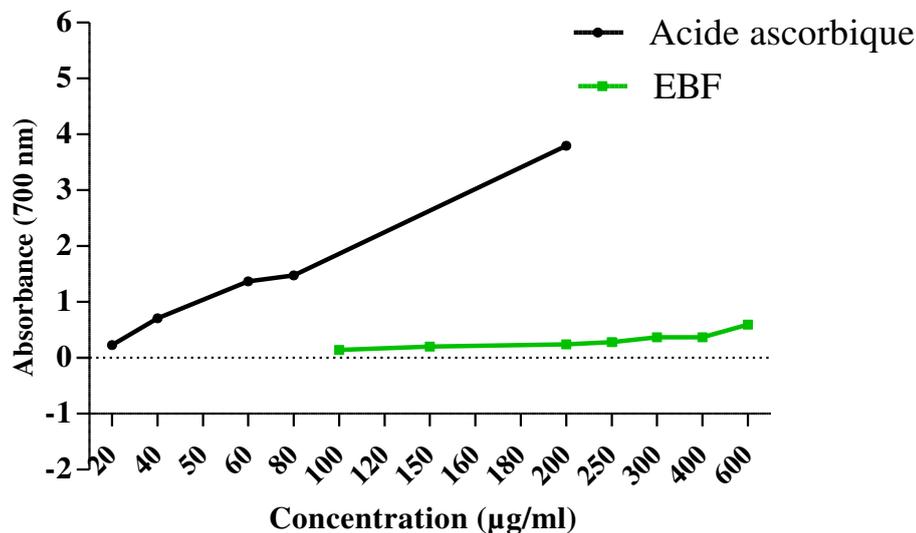


Figure 31 : Pouvoir réducteur de l'extrait méthanolique des feuilles de *R. montana* et l'acide ascorbique en fonction de concentration. Les valeurs sont présentées sous forme M ± SD.

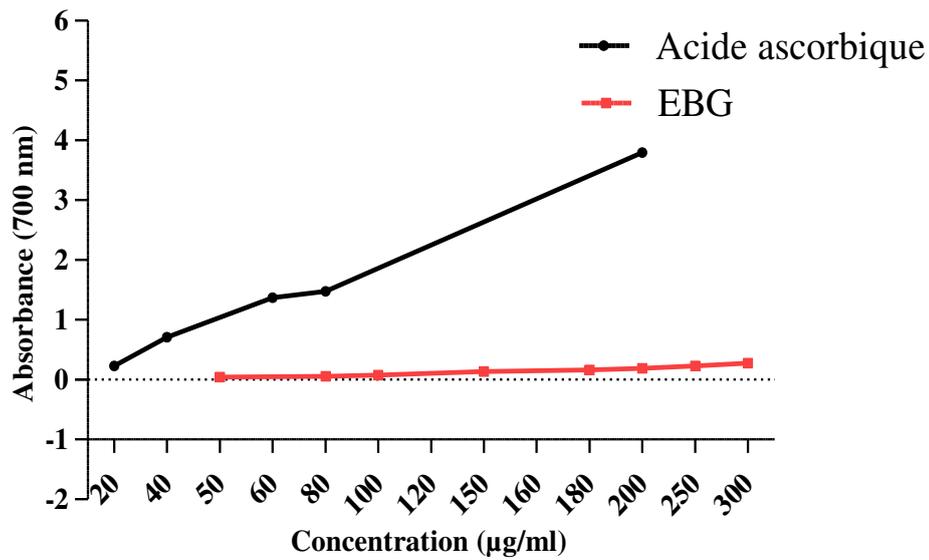


Figure 32 : Pouvoir réducteur de l'extrait méthanolique des graines de *Ruta montana* et l'acide ascorbique. Les valeurs sont représentées sous forme $M \pm SD$.

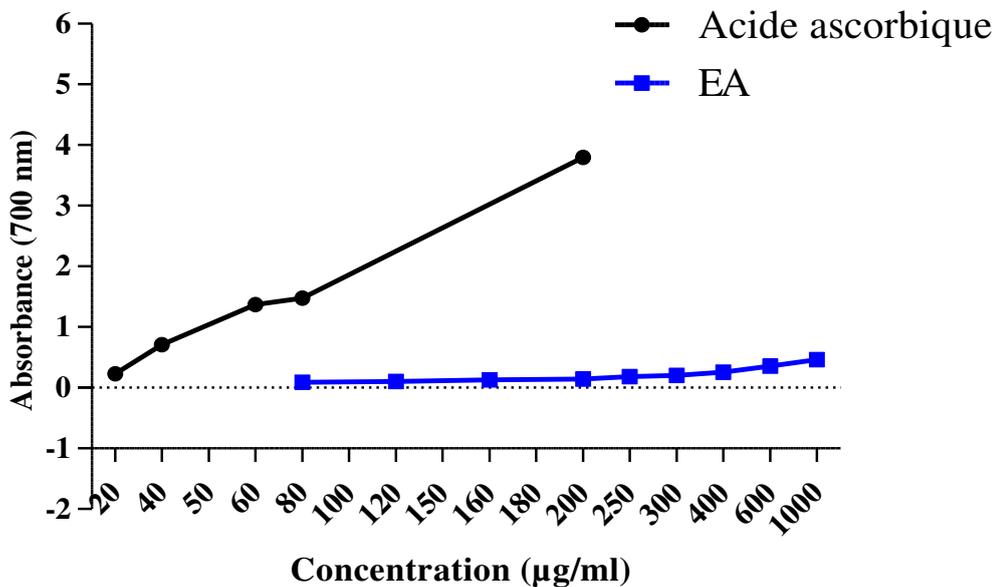


Figure 33: Pouvoir réducteur des alcaloïdes totaux de *Ruta montana* et de l'acide ascorbique. Les valeurs sont représentées sous forme $M \pm SD$.

Les résultats obtenus montrent que la capacité de réduction est proportionnelle à l'augmentation de la concentration des échantillons. Tous les extraits de la plante présentent des activités antioxydants nettement inférieures à celles du produit de référence (acide

ascorbique).

L'extrait méthanolique des feuilles est généralement le plus actif avec une densité optique de 0,370 nm à une concentration de 300 µg/ml, suivis par l'extrait brut des graines et l'extrait des alcaloïdes totaux avec des absorbances 0,276 nm et 0,206 nm respectivement à 300 µg/ml. Ces résultats confirment ceux obtenus par le test DPPH dont les extraits méthanoliques ont des activités antioxydantes puissantes en comparaison avec les alcaloïdes totaux de la plante.

5. Evaluation de l'activité antimicrobienne

5.1. Le potentiel antibactérien des extraits de *Ruta montana*

L'activité antibactérienne des différents extraits de *Ruta montana* a été évaluée contre les bactéries Gram-positives (*B. cereus* et *S.aureus*) et Gram-négatif (*E. coli* et *S. typhimurium*) en utilisant la méthode de diffusion sur disque, une technique qualitative basée sur la mesure du diamètre des halos d'inhibition apparents autour des disques chargés d'extraits végétaux (Fig.34).

Nous rapportons dans le tableau 7 les diamètres des zones d'inhibition des différents extraits de *Ruta montana*.

Tableau 7 : Moyenne des diamètres des zones d'inhibitions des différents extraits de *Ruta montana* relatives aux différentes souches. Les valeurs sont représentées sous forme M ± SD.

mg/ml(10µl/disc)	<i>Bacillus cereus</i>			<i>Salmonella typhimurium</i>		
	EBF	EBG	EA	EBF	EBG	EA
200	32,5±1,32	34,46±0,57	34,5±1,5	21,66±2,51	21,66±0,57	22,5±0,5
100	28,33±0,57	21,66±1,52	31,16±0,76	18±1	17,5±0,5	20,66±0,57
50	23±1	19,5±0,5	27,5±0,5	17±0,5	15±0,16	17,83±0,76
25	20,16±1,04	17,16±0,28	23,16±1,75	12,5±0,5	11,33±0,28	14,16±0,76
12,5	18,16±0,76	13±1,32	15,5±1,32	8,83±0,28	9,16±0,28	11,83±0,28
6, 25	10,33±1,52	8,16±0,28	11,16±1,04	7,33±0,28	7,83±0,28	9±0,5

3,12	6,66±0,28	6,5±0,00	6,5±0,00	6,5±0,00	6,5±0,00	6,5±0,00
CMI	3,12 mg/ml			3,12 mg/ml		
DMSO	6			6		
AX	13,5			17		
CAZ	12,3			16		
CZ	22,5			20		
SXT	17			21		

	<i>Echerichia coli</i>			<i>Staphylococcus aureus</i>		
mg/ml(10µl/disc)	EBF	EBG	EA	EBF	EBG	EA
200	18,66±0,57	20,5±0,5	24,5±0,5	19,66±0,57	19,16±0,28	25±1
100	16,83±0,76	16,83±0,28	22±0,5	17,83±0,76	17,83±0,76	14,5±0,5
50	14,5±0,5	15,5±0,5	18,83±0,28	16±1	15,16±0,28	12±1
25	12,16±0,76	10,66±0,57	15,5±0,86	12,5±0,5	12,5±0,5	9,16±0,76
12,5	8,66±0,57	8,83±0,28	11,5±0,5	11,83±0,76	8,83±0,28	8,66±0,28
6,25	7,33±0,28	7,16±0,76	8,83±0,28	10,83±1,15	7,83±0,76	7,33±0,57
3,12	6,5±0,00	6,5±0,00	6,5±0,00	6,5±0,00	6,5±0,00	6,5±0,00
MCI	3,12 mg/ml			3,12 mg/ml		
DMSO	6			6		
AX	11,9			15		
CAZ	11			10		
CZ	23,5			15		
SXT	24,2			11,7		

CMI: concentration minimale inhibitrice (mg/ml), EBF: extrait brut des feuilles, EBG: extrait brut des graines, EA: extrait alcaloïdique, DMSO : Diméthylsulfoxyde (contrôle négatif), contrôles positifs : AX : Amoxicillin, CAZ : Ceftazidime, CZ : Céfazoline et SXT : Co-trimoxazol.

Tous les extraits de *Ruta montana* ont empêché la croissance des bactéries testés avec un diamètre de zone d'inhibition qui augmente proportionnellement avec les concentrations des échantillons testés. L'inhibition obtenue sur les souches de bactéries varie de 34,5 à 6,5 ; de 34,46 à 6,5 et de 32,5 à 6,5 mm pour l'extrait alcaloïdique, extrait méthanolique des graines et des feuilles respectivement. Il s'est avéré que toutes les bactéries testées ont été sensibles vis-à-vis des trois extraits notamment *Bacillus cereus*, l'effet de ces extraits est plus important que ceux obtenus avec les antibiotiques standards utilisés. L'extrait des alcaloïdes totaux semble avoir l'effet inhibiteur le plus élevé que les extraits méthanoliques de *Ruta montana* contre toutes les bactéries testées avec une zone d'inhibition importante enregistrée à 200 mg/ml sur *B. cereus* ($36,5 \pm 1,52$ mm), cet effet est plus considérable que celui obtenu avec les antibiotiques standards. Un effet inhibiteur important par la même concentration contre la croissance d'*E. coli* et *S. typhimurium* avec des zones d'inhibition de ($24,5 \pm 0,5$ mm et $22,5 \pm 0,5$ mm respectivement), ces zones sont proche à ceux enregistré sous l'action de SXT ($24,2$ mm et 21 mm respectivement), cependant l'EA inhibe également la croissance de *S. aureus* (25 ± 1 mm).

Tous les extraits de *Ruta montana* ont présenté une concentration minimale inhibitrice de 3,125 mg/ml qui permet de donner un diamètre de zone d'inhibition de 6,5 mm.

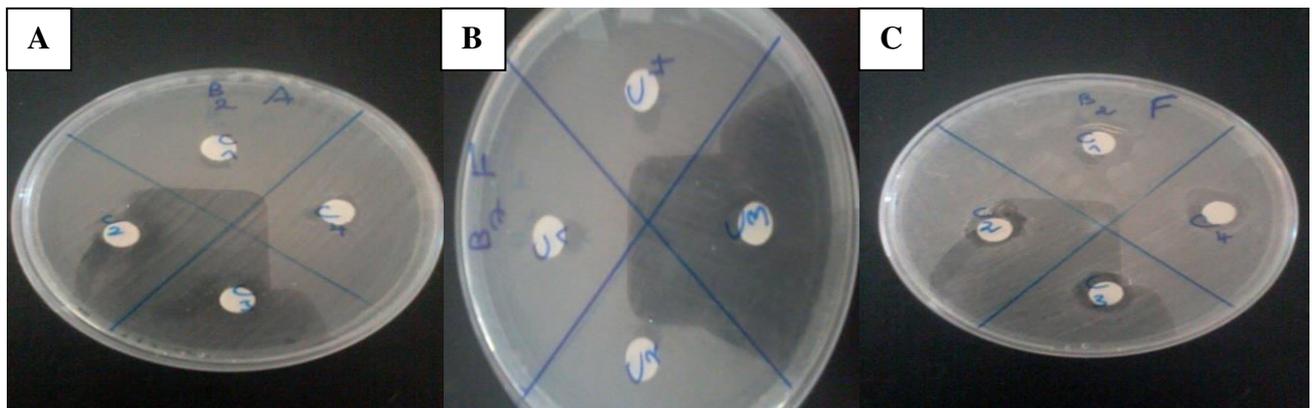


Figure 34 : Effet antibactérien de différents extraits de *Ruta montana* (A : extrait alcaloïdique; B : extrait brut des graines; C : extrait brut des feuilles).

5.2. Evaluation de l'activité antifongique

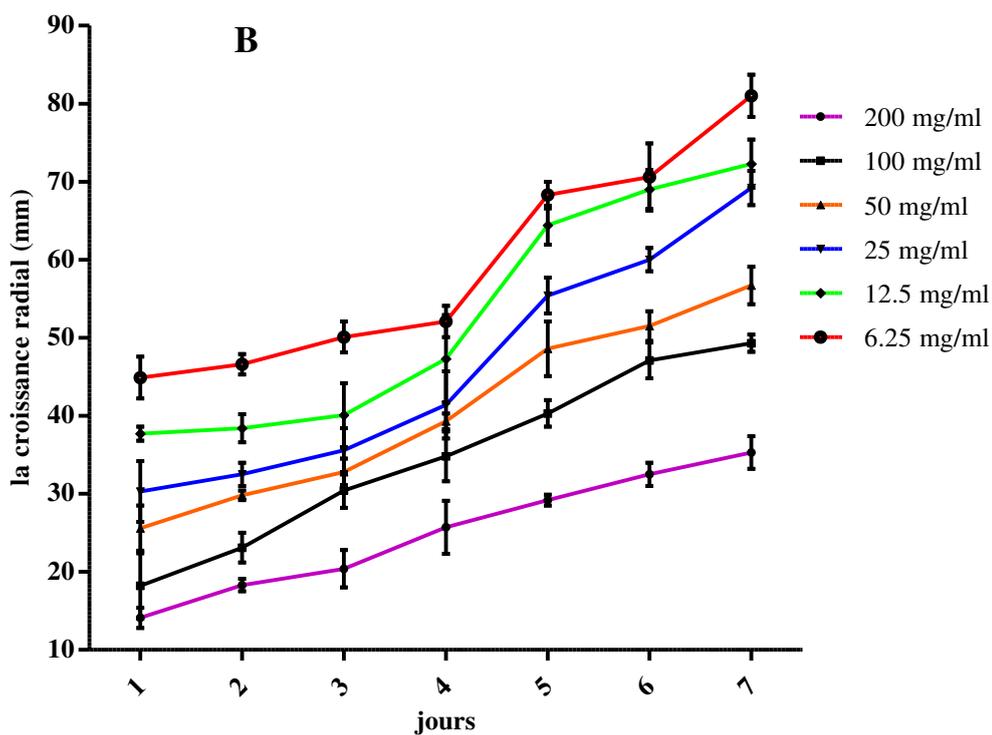
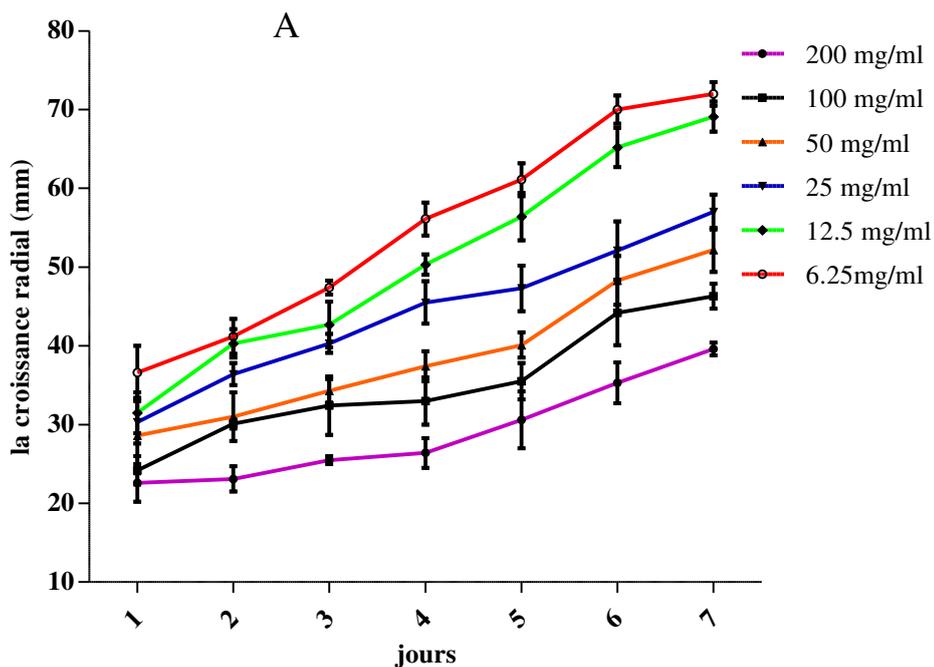
L'activité antifongique des différents extraits de *Ruta montana* contre *Aspergillus niger* et *Fusarium oxysporum* est présentée dans le tableau 8 où les résultats du dernier jour de la croissance, en appliquant trois mesures parallèles, sont donnés selon Majhenic *et al.* (2007).

Les résultats de l'étude antifongique des différents extraits de *Ruta montana* ; indiquent que la sensibilité d'*Aspergillus niger* et *Fusarium oxysporum* est accrue en fonction de l'augmentation de la concentration (Fig.35, 36 et 37).

Selon les résultats l'*Aspergillus niger* est plus sensible aux différents extraits de *Ruta montana* avec un taux d'inhibition de 60,77 % avec l'EBG, de 57,11 % avec l'EBF et de 56% avec l'EAT à une concentration de 200 mg/ml alors que l'effet de ces extraits sur *Fusarium oxysporum* est apparu meilleur avec l'EAT avec des taux d'inhibition importantes aux différentes concentrations testées par rapport aux extraits méthanoliques.

Tableau 8 : Taux d'inhibition de différents extraits de *Ruta montana* sur la croissance d'*Aspergillus niger* et *Fusarium oxysporum*.

Concentration (mg/ml)	Pourcentage d'inl					
	<i>Fusarium oxysporum</i>			<i>Aspergillus niger</i>		
	EA	EBF	EBG	EA	EBF	EBG
200	55	43,33	37,55	56	57,11	60,77
100	49,44	22,22	24,22	48,55	48,33	45,22
50	36	19,33	22,33	42	43,33	37
25	32,66	16,44	18,55	36,66	37	23,11
12,5	19,22	14	16,44	23,22	22,55	19,66
6,25	8,88	7,77	6,66	20	18,55	10



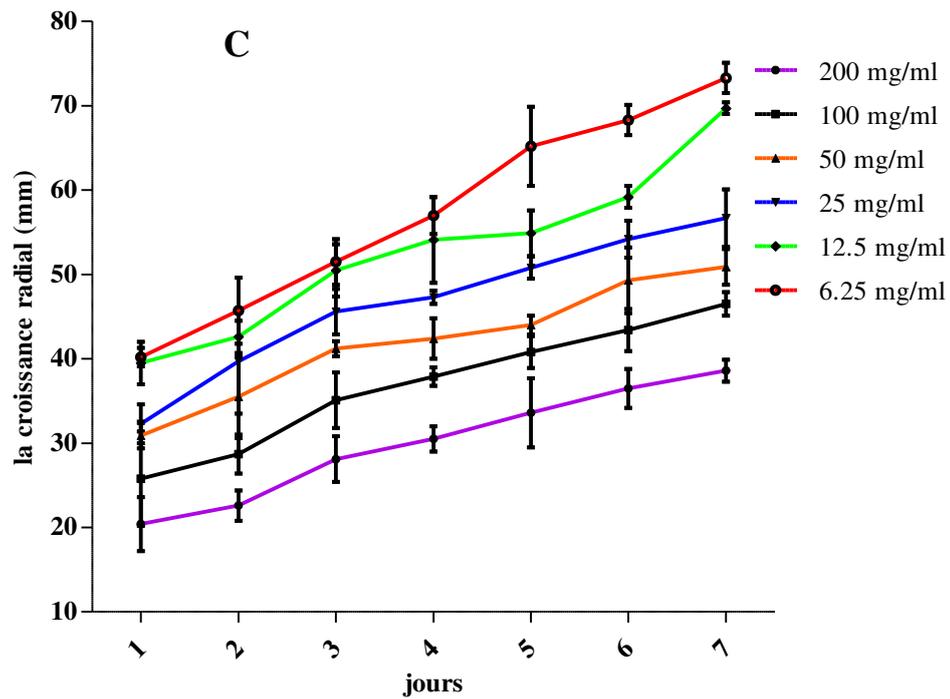
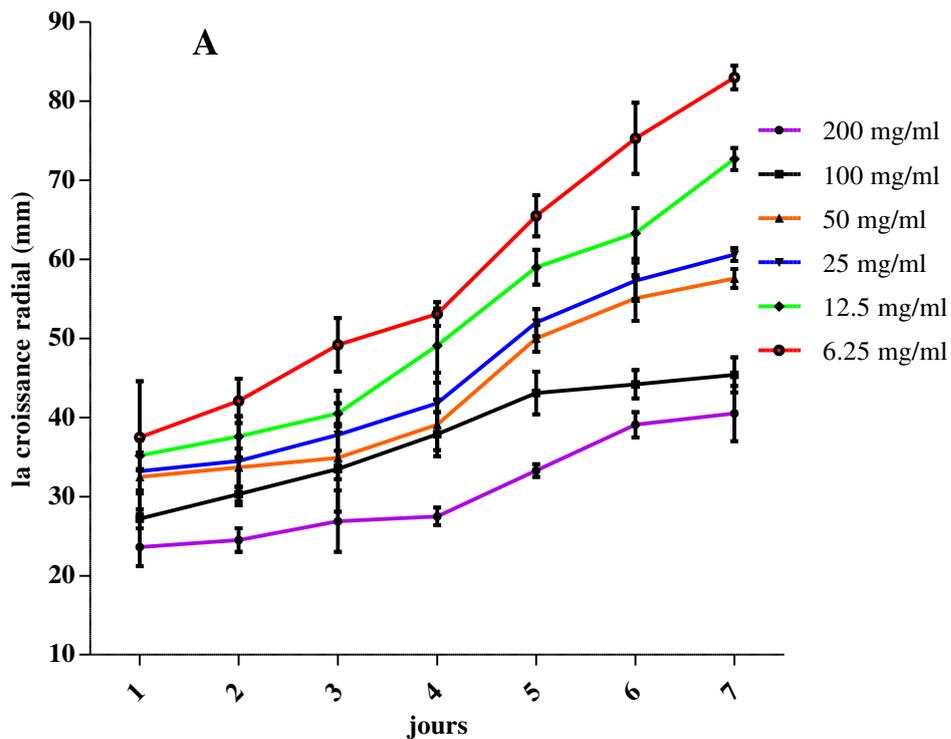


Figure 35 : Activité antifongique des alcaloïdes totaux (A) et des extraits bruts des graines (B) et des feuilles (C) de *Ruta montana* contre *Aspergillus niger*. Les valeurs sont représentées sous forme $M \pm SD$.



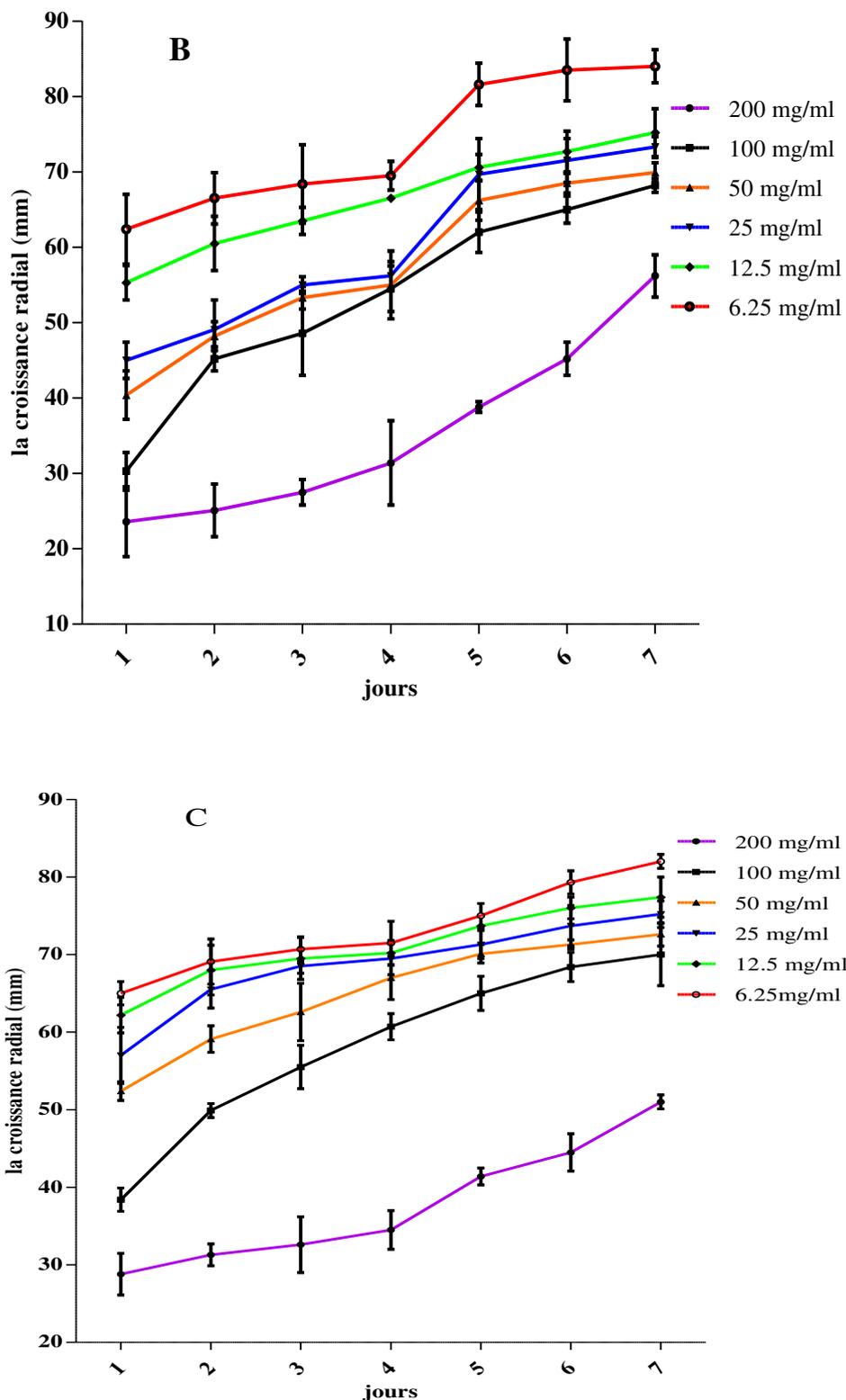


Figure 36 : Activité antifongique des alcaloïdes totaux (A) et des extraits bruts des graines (B) et des feuilles (C) de *Ruta montana* contre *Fusarium oxysporum*. Les valeurs sont représentées sous forme $M \pm SD$.

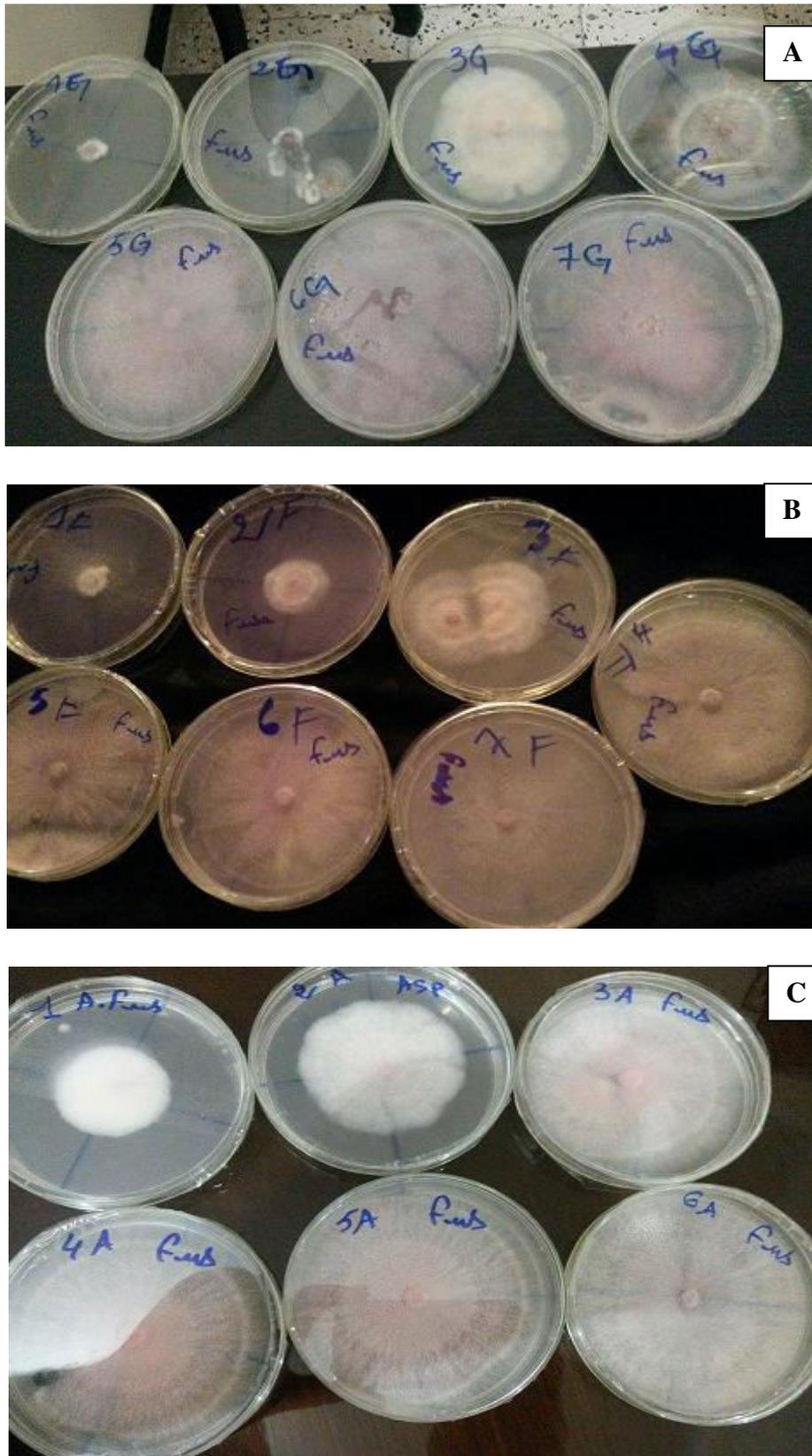


Figure 37 : Effet des extraits (A : extrait brut des graines; B : extrait brut des feuilles; C : extrait alcaloïdique) contre l'*Aspergillus niger* et *Fusarium oxysporum*.

6. Etude toxicologique

6.1. Détermination de la DL₅₀ chez les souris mâles

6.1.1. Observation du comportement et tableau cliniques des animaux

Le traitement des souris mâles avec différentes doses des alcaloïdes totaux des parties aériennes de *Ruta montana* et par voie intra péritonéale, nous a permis de constater chez les animaux une carte clinique caractérisée par des symptômes cliniques sévères :

- Des convulsions et des tremblements.

-Tachycardie et une difficulté de respiration marquée par une cyanose de la tête.

Secondairement, l'activité locomotrice se réduit, une sédation puis peu à peu une paralysie des pattes postérieures. Bien qu'il y ait eu des décès dès les premières 15 minutes à 24 heures, cependant les animaux qui ont survécu présentent un comportement normal, similaire aux animaux du groupe témoin.

6.1.2. Calcul de la DL₅₀ chez les souris mâles

- **Méthode de Lichfield et Wilcoxon 1949**

Les alcaloïdes totaux de *Ruta montana* administrés par voie intra péritonéale, aux différents lots de huit souris, et avec les doses comprises entre 100 mg/kg et 600 mg/kg, ont permis d'établir le tableau 9, qui illustre la mortalité des souris en pourcentage et en unités probits en fonction de la dose.

Tableau 9: Dose-effet des alcaloïdes totaux des parties aériennes de *Ruta montana* chez les souris mâles traitées par voie intrapéritonéale.

Dose mg/kg	N° de mort/ expérience	Log dose	Effect observé		Effect attendu		Difference %	χ^2
			Probit	%	Probit	%		
100	0/8	2	2,99	2,2	3,50	6,6	4,4	0,03
200	1/8	2,301	3,85	12,5	3,72	10,1	2,4	0,0058
300	2/8	2,477	4,33	25	4,49	30,5	5,5	0,014
400	4/8	2,602	5,00	50	5,07	52,7	2,7	0,0029
500	6/8	2,698	5,67	75	5,50	69,2	5,8	0,016
600	8/8	2,778	6,59	94,2	5,89	81,3	12,9	0,1

La sommes des χ^2 : $\Sigma \chi^2 \text{ expérimental} = 0,1687$. La valeur théorique du χ^2 pour le seuil de probabilité $p = 0,05$ correspond à $n = 4$ [Nombre de degré de liberté = K (Nombre de dose) - 2] est $\chi^2 \text{ théorique} = 9,49$.

Donc $\chi^2 \text{ expérimental} < \chi^2 \text{ théorique}$ donc le travail est acceptable.

A partir des données présentées au tableau, on trace le courbe probit = f (log dose) (Fig.38)

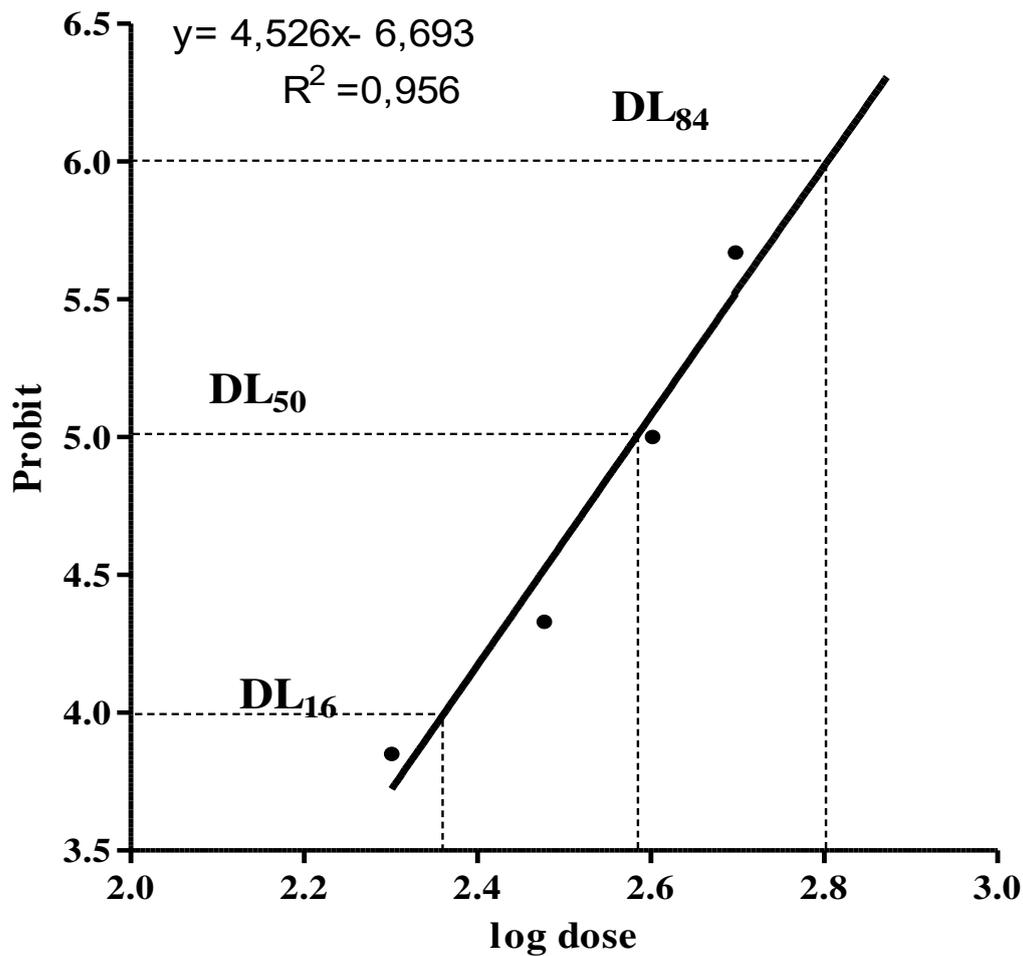


Figure 38: Courbe caractérisant la relation dose-réponse pour la détermination des paramètres létaux chez les souris mâles traitées par simple application avec les alcaloïdes totaux de *Ruta montana*.

A partir de la courbe on tire les valeurs :

$$DL_{16} = 226,46 \text{ mg/kg}$$

$$DL_{50} = 389,04 \text{ mg/kg}$$

$$DL_{84} = 512,86 \text{ mg/kg}$$

La pente(S)

$$S = (DL_{84}/ DL_{50} + DL_{50}/ DL_{16})/2 = 1,427$$

L'intervalle de confiance

Pour le seuil de probabilité $p = 0.05$ L'intervalle de confiance de la DL_{50} est le suivant :

477,17 mg/kg < DL₅₀ < 317,32 mg/kg (la limite supérieure : DL₅₀.f DL₅₀ et la limite inférieure: DL₅₀ /f DL₅₀ avec $f DL_{50} = S^{2.77/\sqrt{N}}$, N' : le nombre d'animaux situés entre DL₁₆ et DL₈₄).

- **Méthode de Miller et Tainter (1944)**

Les pourcentages des souris mâles morts dans chaque lot sont relevés et convertis en unités probits (Tab.10).

Tableau 10: Résultats des calculs des pourcentages corrigés et des probits.

Lots	Doses (mg)	Log dose	Pourcentage de morts	Pourcentages corrigés	Probit
1	100	2	0	3,125	3,13
2	200	2,301	12,5	12,5	3,84
3	300	2,477	25	25	4,33
4	400	2,602	50	50	5
5	500	2,698	75	75	5,67
6	600	2,778	100	96,875	6,85

Correction des effets 0% et 100%

Correction de 0% : $Y(0) = 100 (0,25 / n)$

Correction de 100% : $Y(100) = 100 (n - 0,25 / n)$

Dont **n** c'est le nombre des animaux des lots qui ont donné les pourcentages de mortalité 0 et 100%, donc **Y (0) = 3,125 % et Y (100) = 96,875 %**.

La courbe de Miller et Teinter (1944) (% de mortalité (probit) = f (log dose)) donnant le pourcentage de mortalité en fonction du logarithme de la dose nous a permis de calculer la dose correspondante à 50 % de mortalité (Fig.39)

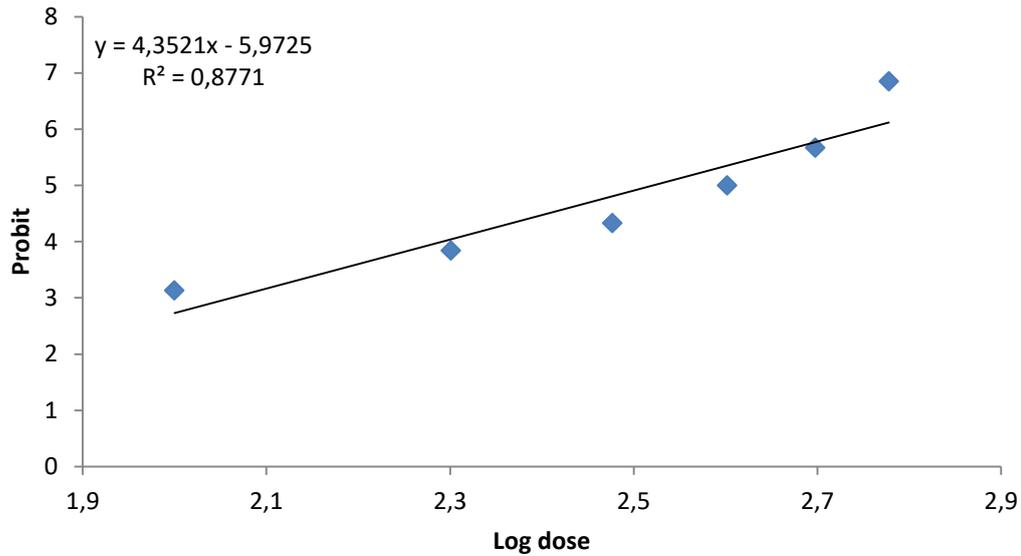


Figure 39 : Courbe exprimant la mortalité des souris mâles (en unités probits) selon Miller et Tainter (1944).

Obtention du Log DL₅₀, DL₁₆ et DL₈₄ de l'équation de régression à permis de donner les valeurs suivantes : DL₅₀= 331,97 mg/kg

DL₁₆=195,43 mg/kg

DL₈₄= 563,5 mg/kg

Calcul de l'erreur standard

SE de DL₅₀ = (Log DL₈₄ – Log DL₁₆) / $\sqrt{2N}$ (N= Nombre des animaux dans chaque groupe)
(Randhawa, 2009)

➤ SE = 0,0574

Donc la DL₅₀ des alcaloïdes totaux de *Ruta montana* quand ils sont administrés par voie intrapéritonéale chez les souris mâles est 331,97 ± 0,057 mg/kg.

- **Méthode de Trevan (1927)**

L'administration de doses croissantes des alcaloïdes totaux de *Ruta montana* chez tous les animaux du lot tout en notant le pourcentage de mortalité (Tab.11), ce qui nous a permis d'obtenir une courbe sigmoïde

Tableau 11 : Etude de la létalité des alcaloïdes totaux de *Ruta montana* par voie intrapéritonéale.

Doses mg/kg	100	200	300	400	500	600
Nombre de souris testées	8	8	8	8	8	8
Nombre de souris mortes	0	1	2	4	6	8
% de morts	0	12.5	25	50	75	100

La dose létale 50 (DL₅₀) a été calculée grâce à la courbe de Trevan (% de mortalité= f (dose)) (Fig.40).

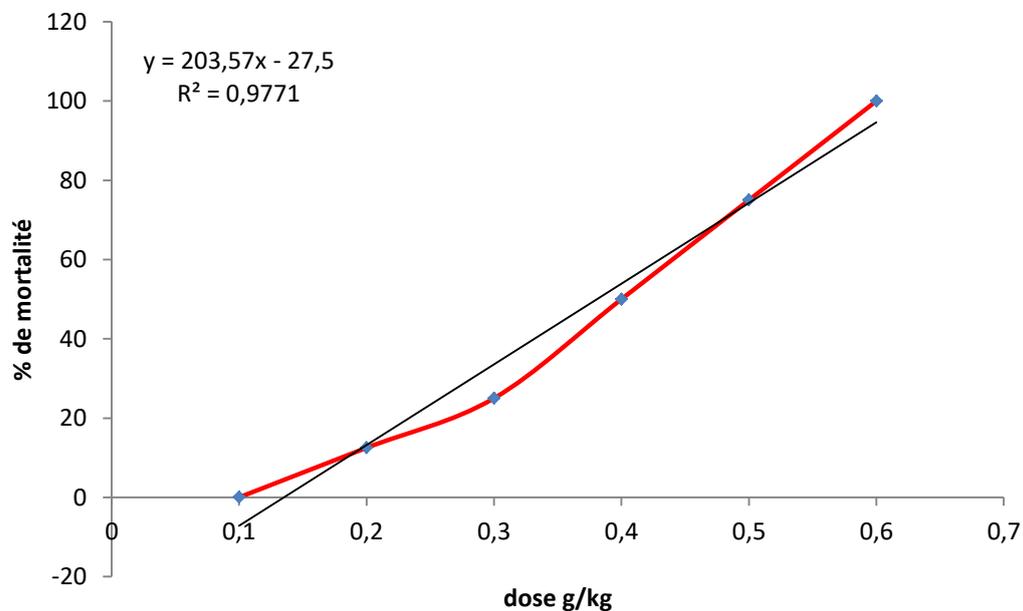


Figure 40: Courbe exprimant le pourcentage de mortalité des souris mâles en fonction de dose selon Trevan (1927).

Selon la méthode, la détermination des paramètres létaux est effectuée graphiquement

DL₅₀= 381 mg/kg

DL₁₆=213,8 mg/kg

DL₈₄= 547,7 mg/kg

- Méthode de probits

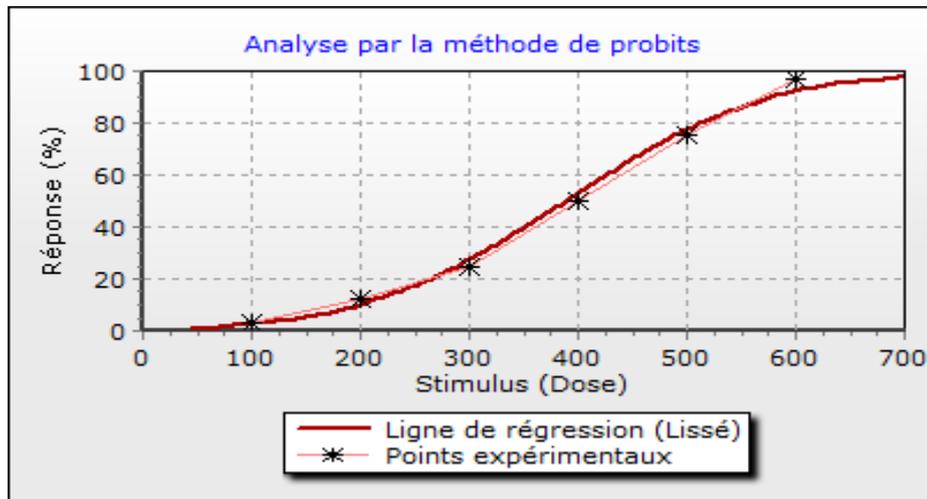


Figure 41 : Courbe caractérisant la relation dose-réponse pour la détermination des paramètres létaux chez les souris mâles traitées par simple application avec les alcaloïdes totaux de *Ruta montana*.

Les paramètres létaux chez les souris mâles traités par les alcaloïdes totaux de *Ruta montana* par une simple application et par voie IP sont calculés :

$$DL_{50} = 388,44 \text{ mg/kg}$$

$$DL_{16} = 240,54 \text{ mg/kg}$$

$$DL_{84} = 536,35 \text{ mg/kg}$$

6.2. Détermination de la DL_{50} chez les souris femelles

6.2.1. Observation du comportement et tableau clinique des animaux

Le tableau clinique des souris femelles traitées avec les alcaloïdes totaux de *Ruta montana* est comparable à celui des souris mâles et est caractérisé par des convulsions, tachycardie, cyanose, diminution de l'activité locomotrice avec paralysie des pattes postérieures.

La mort survient à partir de la 15^{ème} min jusqu'à 24 heures. Après 72 heures, les animaux survivants retrouvent un comportement normal comparable à celui des témoins.

6.2.2. Calcul de la DL₅₀ chez les souris femelles

- **Méthode de Lichfield et Wilcoxon 1949**

Après administration par voie IP des alcaloïdes totaux des parties aériennes de *Ruta montana*, aux différents lots de huit souris et avec les doses comprises entre 50 mg/kg et 350 mg/kg, la mortalité des souris en pourcentage et en unités probits en fonction de la dose ont été relevés dans le tableau 12.

Tableau 12 : Dose-effet des alcaloïdes totaux des parties aériennes de *Ruta montana* chez les souris femelles traitées par voie intrapéritonéale.

Dose mg/kg	N° de mort/ expérience	Log dose	Effect observe		Effect attendu		Difference %	χ ²
			Probit	%	Probit	%		
50	0/8	1,698	2,35	0,4	2,76	1,3	0,9	0,0063
100	1/8	2	3,85	12,5	3,74	10,5	2	0,0044
150	2/8	2,177	4,33	25	4,36	26,2	1,2	0,0005
200	3/8	2,301	4,68	37,5	4,84	43,8	6,3	0,017
250	4/8	2,398	5,00	50	5,15	56	6	0,015
300	6/8	2,477	5,67	75	5,41	66	9	0,038
350	8/8	2,544	6,47	92,9	5,68	75,3	17,6	0,17

La sommes des χ² : **Σ χ² expérimental = 0,0385**

La valeur théorique du χ² pour le seuil de probabilité p= 0,05 correspond à n =4 [Nombre de degré de liberté = K (Nombre de dose) -2] est **χ² théorique= 11,1**.

Donc χ² expérimental < χ² théorique donc le travail est acceptable.

A partir des données présentées au tableau, on trace le courbe probit = f (log dose) (Fig.42)

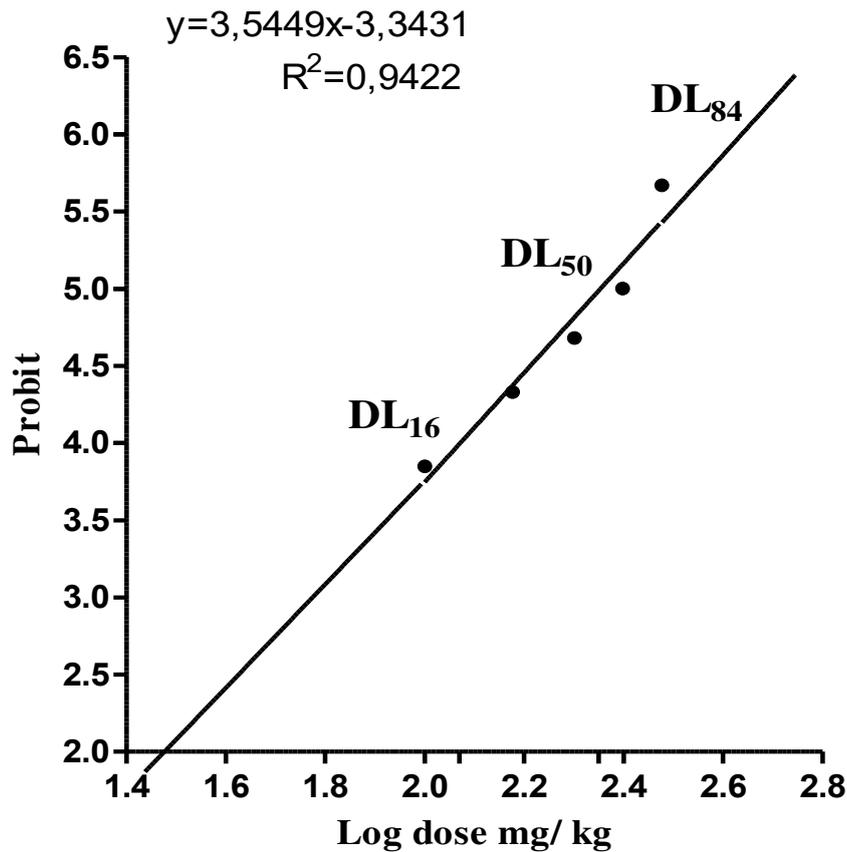


Figure 42 : Courbe caractérisant la relation dose-réponse pour la détermination des paramètres létaux chez les souris femelles traitées par les alcaloïdes totaux de *Ruta montana*.

DL₁₆ = 117,48 mg/kg

DL₅₀ = 225, 70 mg/kg

DL₈₄ = 426,16 mg/kg

La pente S

$$S = (DL_{84} / DL_{50} + DL_{50} / DL_{16}) / 2 = 1,90$$

L'intervalle de confiance

Pour le seuil de probabilité p= 0.05 L'intervalle de confiance de La DL₅₀ est le suivant :

310,11 mg/kg < DL₅₀ < 164,14 mg/kg (la limite supérieure : DL₅₀ · f DL₅₀ et la limite inférieure: DL₅₀ / f DL₅₀ avec $f DL_{50} = S^{2.77/\sqrt{N}}$, N' : le nombre d'animaux situés entre DL₁₆ et DL₈₄).

- **Méthode de Miller et Tainter (1944)**

Les pourcentages des souris femelles mortes dans chaque lot sont relevés et convertis en unités probits (Tab.13).

Tableau 13 : Résultats des calculs des pourcentages corrigés et des probits.

Lots	Doses (mg)	Log dose	Pourcentage de morts	Pourcentages corrigés	Probit
1	50	1,698	0	3,125	3,13
2	100	2	12,5	12,5	3,84
3	150	2,177	25	25	4,33
4	200	2,301	37,5	37,5	4,68
5	250	2,398	50	50	5
6	300	2,477	75	75	5,67
7	350	2,544	100	96,875	6,85

La courbe de Miller et Teinter (1944) (% de mortalité (probit) = f (log dose)) donnant le pourcentage de mortalité en fonction du logarithme de la dose nous a permis de calculer la dose correspondante à 50 % de mortalité (Fig. 43).

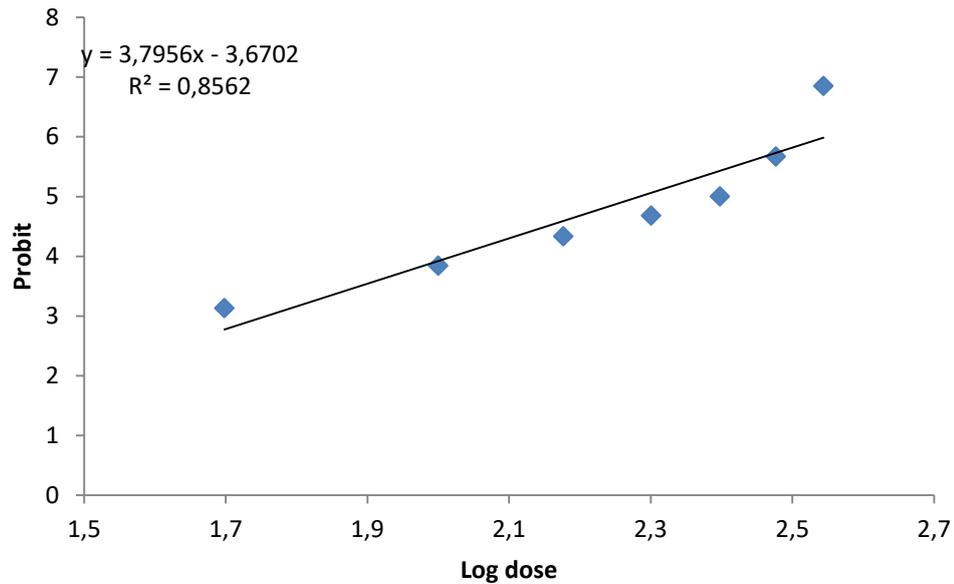


Figure 43 : Courbe exprimant la mortalité des souris femelles (en unités probits) selon Miller et Tainter (1944).

Obtention du Log DL₅₀, DL₁₆ et DL₈₄ de l'équation de régression à permis de donner les valeurs suivantes :

$$DL_{50} = 192,31 \text{ mg/kg}$$

$$DL_{16} = 104,97 \text{ mg/kg}$$

$$DL_{84} = 353,26 \text{ mg/kg}$$

Calcul de l'erreur standard:

SE de DL₅₀ = (Log DL₈₄ – Log DL₁₆) / $\sqrt{2N}$ (N= Nombre des animaux dans chaque groupe)
(Randhawa, 2009)

➤ SE = 0,0658

Donc la DL₅₀ des alcaloïdes totaux de *Ruta montana* quand ils sont administrés par voie intrapéritonéale est 192,31 ± 0,0658 mg/kg.

• Méthode de Trevan (1927)

Tableau 14 : Etude de la létalité des alcaloïdes totaux de *Ruta montana* par voie intrapéritonéale chez les souris femelles.

Doses mg/kg	50	100	150	200	250	300	350
Nombre de souris testées	8	8	8	8	8	8	8
Nombre de souris mortes	0	1	2	3	4	6	8
% de morts	0	12,5	25	37,5	50	75	100

La dose létale 50 (DL₅₀) a été calculée grâce à la courbe de Trevan (Fig.44)

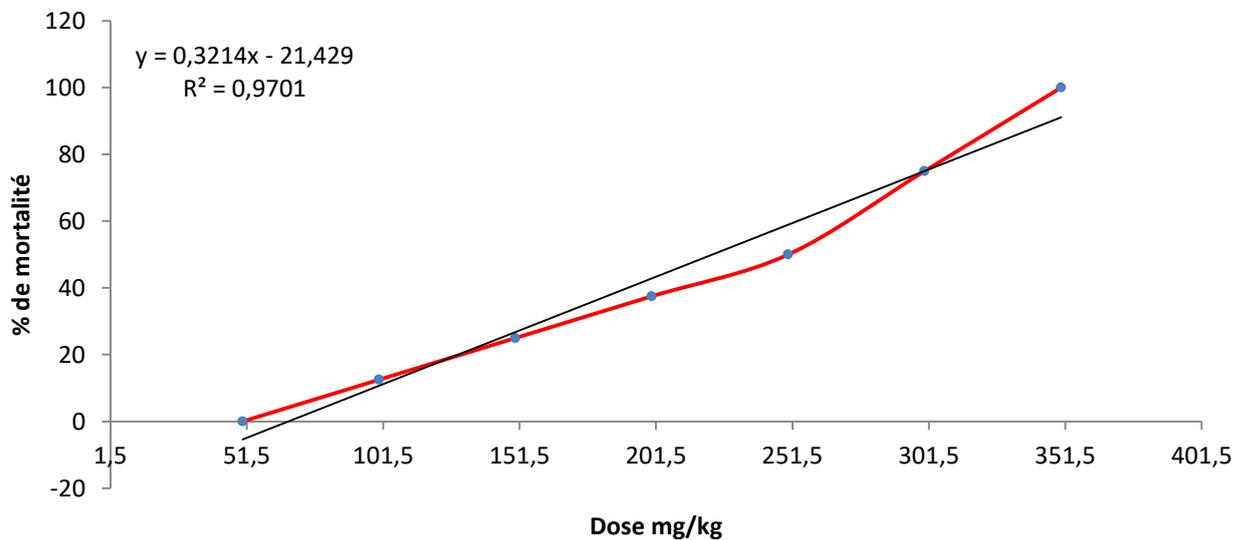


Figure 44 : Courbe exprimant le pourcentage de mortalité des souris femelles en fonction de dose selon Trevan (1927).

Selon cette méthode, la détermination des paramètres létaux est effectuée graphiquement

DL₅₀= 222, 24 mg/kg ; DL₁₆= 116,45 mg/kg ; DL₈₄= 328.03 mg/kg

- Méthodes des moindres carées

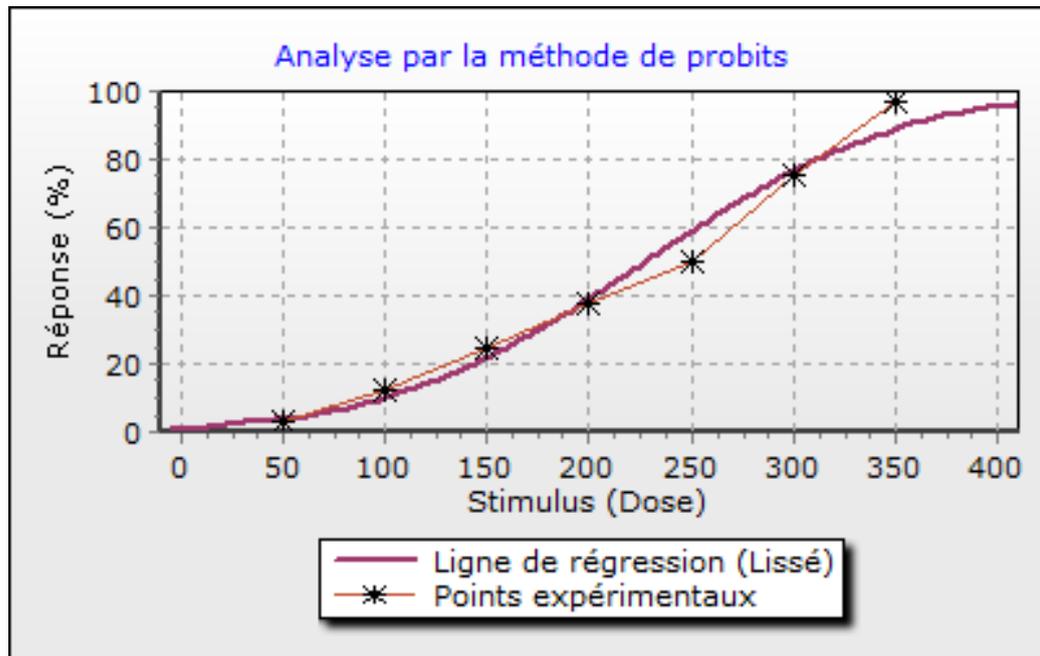


Figure 45 : Courbe caractérisant la relation dose-réponse pour la détermination des paramètres létaux chez les souris femelles traitées par simple application avec les alcaloïdes totaux de *Ruta montana*.

Les paramètres létaux chez les souris femelles traités par les alcaloïdes totaux de *Ruta montana* sont calculés :

$$DL_{50} = 227,62 \text{ mg/kg}$$

$$DL_{16} = 127,81 \text{ mg/kg}$$

$$DL_{84} = 327,44 \text{ mg/kg}$$

6.2.3. La sensibilité du sexe

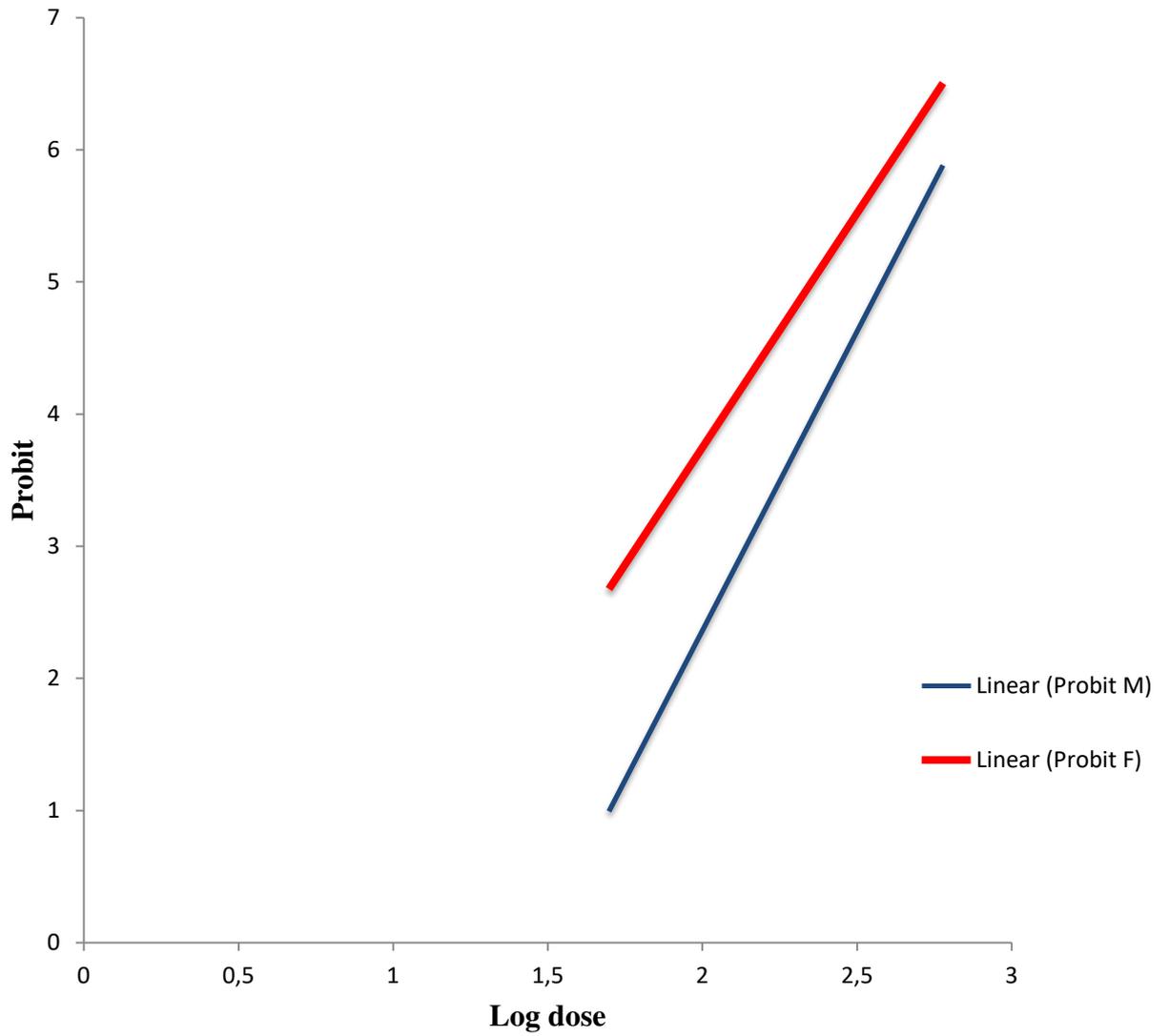


Figure 46: La sensibilité de sexe entre les souris mâles et femelles.

Tableau 15: La sensibilité de sexe entre les souris mâles et femelles.

Paramètres	Formule de calcule	Souris mâles	Souris femelles
DL ₅₀		389,04	225, 70
DL ₁₆		226,46	117,48
DL ₈₄		512,86	426,16
Zone d'action létale	$Z = DL_{84}/DL_{16}$	2,26	3,66
La pente	$S = \frac{DL_{84}/DL_{50} + DL_{50}/DL_{16}}{2}$	1,427	1,91
Facteur de risque	$K = \frac{1}{DL_{50} \cdot S}$	0,00169	0,00231
R	R= grande dose/ petite dose	6	7
A		1,08	1,27
Indicateur I		1,45	1,38
Coefficient d'intervalle f_s		1,12	1,4
La relation entre les fonctions des pentes SR	$SR = S1/S2$	1,338	
Coefficient de relation entre les pentes f_{SR}		1,4	
La relation entre les DL ₅₀ PR	$PR = DL_{501}/DL_{502}$	1,72	
Coefficient d'intervalle de la dose létale $f_{DL_{50}}$	$f_{DL_{50}} = S^{2.77/NN}$	1,19	1,32
Coefficient de relation DL ₅₀ f_{PR}		1,39	

Pour savoir si les souris mâles et femelles réagissent par le même mécanisme ou non aux alcaloïdes totaux de *Ruta montana* on calcule le SR et f_{SR} .

$SR < f_{SR}$ donc les droites sont parallèle et probablement les alcaloïdes de *Ruta montana* ont le même mécanisme létale.

Pour savoir s'il y a une différence significative ou non en termes de l'effet biologique entre les droites des souris mâle et femelle on calcule le PR et le F_{PR} .

$PR > f_{PR}$, cela veut dire que les deux droites sont parallèle et statistiquement il y a une différence significative à $p < 0,05$ entre les souris mâles et femelles.

6.4. Toxicité aigüe chez les souris mâles et femelles

Les souris traitées mâles ou femelles dans les conditions de la toxicité aigüe par l'administration intrapéritonéale d'une dose unique de 129,68 mg/kg ($\approx 1/3 DL_{50}$) et de 75,23 mg/kg ($\approx 1/3 DL_{50}$) chez les souris mâles et femelles respectivement de l'extrait alcaloïdique de *Ruta montana* n'ont montré aucune mortalité ou comportement anormal par rapport aux groupes témoins.

6.4.1. Evolution pondéral

Aucun effet biologique significatif de l'extrait d'alcaloïdes totaux des parties aériennes de *Ruta montana* n'a été noté sur le gain de poids corporel chez les souris mâles et femelles traitées par rapport aux témoins (Tab.16, 17)

Tableau 16 : Poids corporel des souris mâles traitées avec la dose 129,68 mg/kg ($\approx 1/3 DL_{50}$) d'alcaloïdes totaux des parties aériennes de *Ruta montana*. Les valeurs sont exprimées en $M \pm SEM$.

Groupes	Poids corporel (g)		
	1 ^{er} jour	5 ^{ème} jour	Différence
Traité 1 ^{er} jour	30 \pm 2,062		
Traité 5 ^{ème} jour	30,28 \pm 2,036	32,45 \pm 1,054	2,1 \pm 0,352
Témoin	30 \pm 0,597	32 \pm 1,658	1,9 \pm 0,213

Tableau 17 : Poids corporel des souris femelles traitées avec la dose 75,23 mg/kg ($\approx 1/3 DL_{50}$) d'alcaloïdes totaux des parties aériennes de *Ruta montana*. Les valeurs sont exprimées en $M \pm SEM$.

Groupes	Poids corporel (g)		
	1 ^{er} jour	5 ^{ème} jours	Différence
Traité 1 ^{er} jour	31,64 \pm 0,6039		
Traité 5 ^{ème} jours	29,06 \pm 0,2085	28,18 \pm 0,4487	0,8783 \pm 0,4948
Témoin	27,64 \pm 0,3631	28,24 \pm 0,7288	0,5925 \pm 0,8142

6.4.2. Masses relatives des organes

Macroscopiquement, les différents organes (foie, reins, poumons, cœur, cerveau et rate) des souris femelles et en plus les testicules chez les souris mâles traitées n’ont montré aucun changement pathologique remarquable dans la couleur, la forme et la texture, cependant statistiquement, chez les souris mâles traités et sacrifiées il y a une diminution significative de la masse relative des poumons après 24h et 5 jours de 10,81% et 17,56 % respectivement, avec une diminution significative de la masse relative du foie après 5 jours de 45,04 % comme est indiqué dans le tableau 18. Alors il y avait une élévation significative de la masse relative du foie de 12,28 % et une diminution significative de la masse relative des poumons de 10,76 % chez les souris femelles traitées et sacrifiées après 24 heures (Tab. 19).

Tableau 18: Masses relatives des organes des souris mâles traitées dans les conditions de la toxicité aiguë par la dose de 129,68 mg/kg ($\approx 1/3$ DL₅₀) d’alcaloïdes totaux des parties aériennes de *Ruta montana*.

	Foie	Reins	Poumons	Cœur	Cerveau	Rate	Testicules
Témoins	0,0464±0,0019	0,0122±0,0008	0,0074±0,0002	0,0054±0,0001	0,0129±0,0001	0,0054±0,0003	0,0074±0,0002
Traités 1^{er} J	0,0493±0,0037	0,0135±0,0011	0,0066±0,0001*	0,0048±0,0001	0,0137±0,0001	0,0051±0,0003	0,0068±0,0004
Traités 5^{ème} J	0,0255±0,0069*	0,0129±0,0005	0,0061±0,0001***	0,0116±0,0063	0,0135±0,0049	0,0067±0,0007	0,0064±0,0004

Les valeurs sont exprimées en M ± SEM. *** P < 0, 05 comparant aux témoins.

Tableau 19 : Masses relatives des organes des souris femelles traitées dans les conditions de la toxicité aiguë par la dose de 75,23 mg/kg ($\approx 1/3$ DL₅₀) d’alcaloïdes totaux de *Ruta montana*.

	Foie	Reins	Poumons	Cœur	Cerveau	Rate
Témoins	0,0464±0,0019	0,0093±0,0003	0,0065±0,0001	0,0048±0,0002	0,0143±0,0004	0,0039±0,0002
Traités 1^{er} J	0,0521±0,0008**	0,009±0,0003	0,0058±0,0001*	0,0042±0,0001	0,0136±0,0003	0,0039±0,0004
Traités 5^{ème} J	0,0455±0,0009	0,0087±0,0004	0,006±0,0002	0,0044±0,0001	0,0147±0,0004	0,0038±0,0004

Les valeurs sont exprimées en M ± SEM. *P < 0,05 comparant aux témoins.

6.4.3. Etude des paramètres biochimiques

L'analyse biochimique des marqueurs de la fonction hépatique et rénale (ASAT, ALAT, PAL, Urée et Créatinine) évalués dans les sérums des souris mâles et femelles traitées par les alcaloïdes totaux des parties aériennes de *Ruta montana*, ont montré une diminution remarquable de l'ASAT non significative pendant le 1^{ier} et le 5^{ème} jours chez les souris mâles (Fig.47) et une augmentation non significative de l'ALAT pendant le 1^{ier} jour, qui retrouve son niveau vers le 5^{ème} jours chez les souris femelles (Fig. 48)

L'urée et la créatinine n'ont montré aucun changement significatif par rapport aux groupes témoins (Fig. 49 et 50).

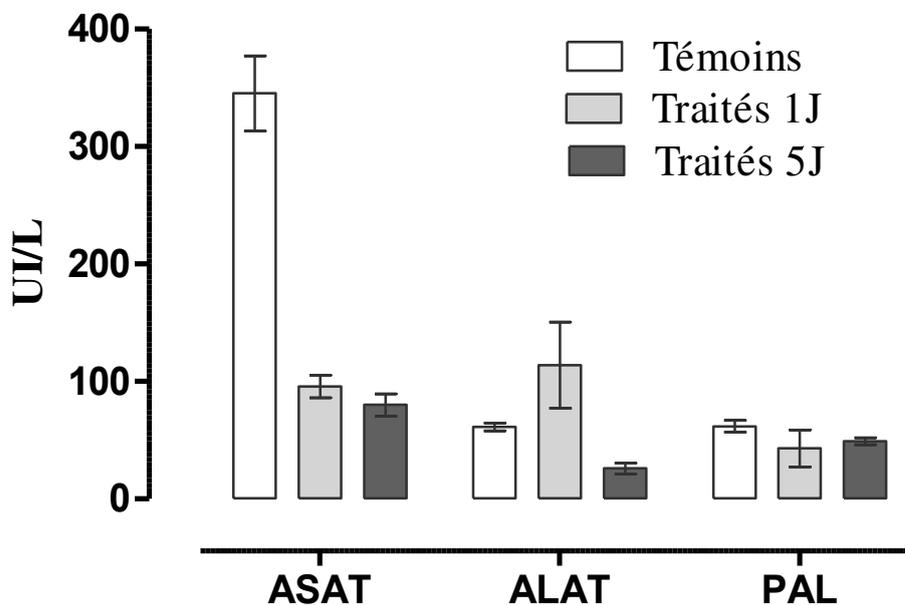


Figure 47 : Effet des alcaloïdes totaux des parties aériennes de *Ruta montana* (129,68 mg/kg \approx 1/3 DL₅₀) sur quelques paramètres biochimiques de la fonction hépatique chez les souris mâles dans les conditions de la toxicité aiguë. Les valeurs sont exprimées en $M \pm SEM$.

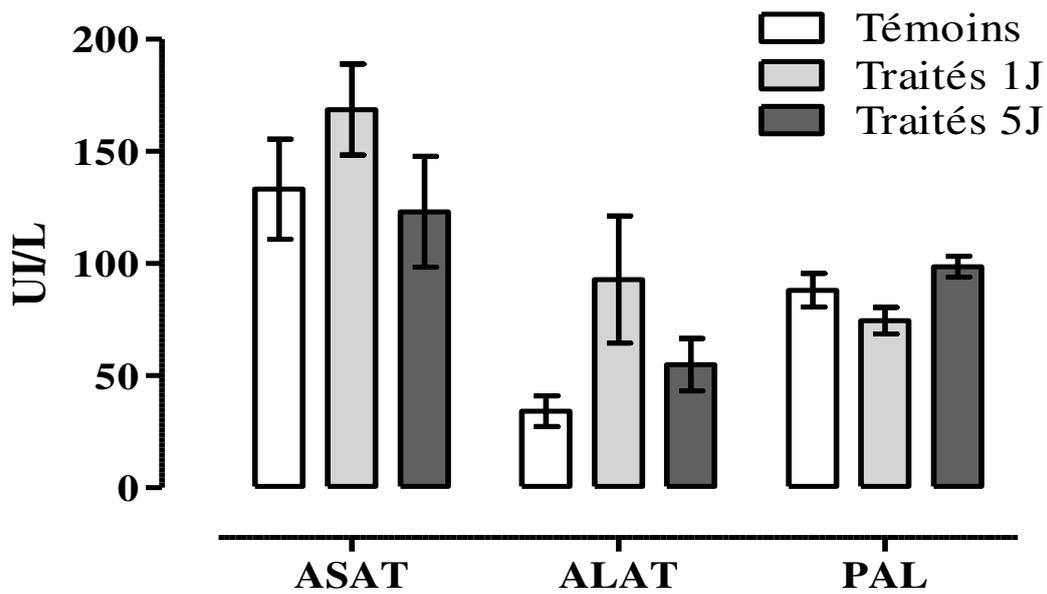


Figure 48 : Effet des alcaloïdes totaux des parties aériennes de *Ruta montana* (75,23 mg/kg \approx 1/3 DL₅₀) sur quelques paramètres biochimiques de la fonction hépatique chez les souris femelles dans les conditions de la toxicité aiguë. Les valeurs sont exprimées en M \pm SEM.

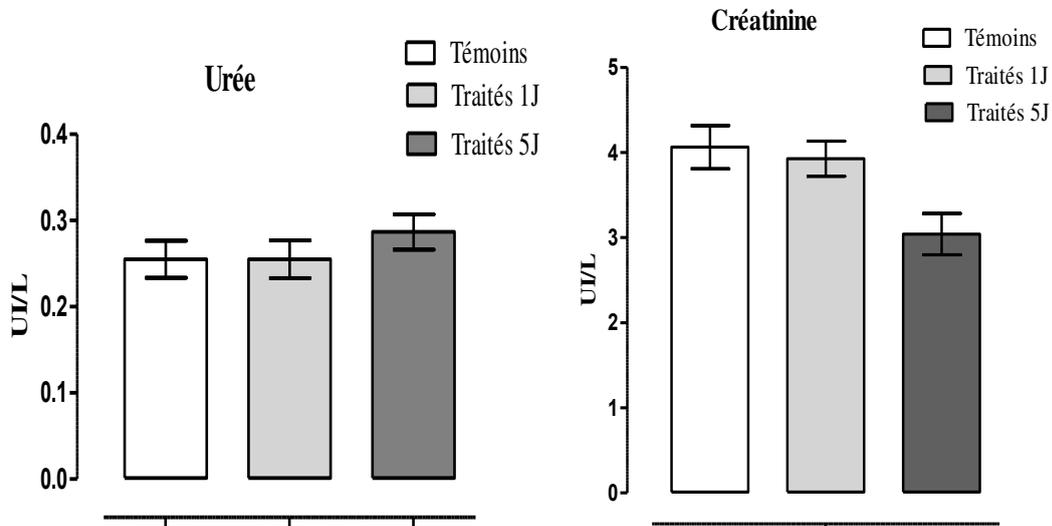


Figure 49: Effet des alcaloïdes totaux des parties aériennes de *Ruta montana* (129,68 mg/kg \approx 1/3 DL₅₀) sur quelques paramètres biochimiques de la fonction rénale chez les souris mâles dans les conditions de la toxicité aiguë. Les valeurs sont exprimées en M \pm SEM.

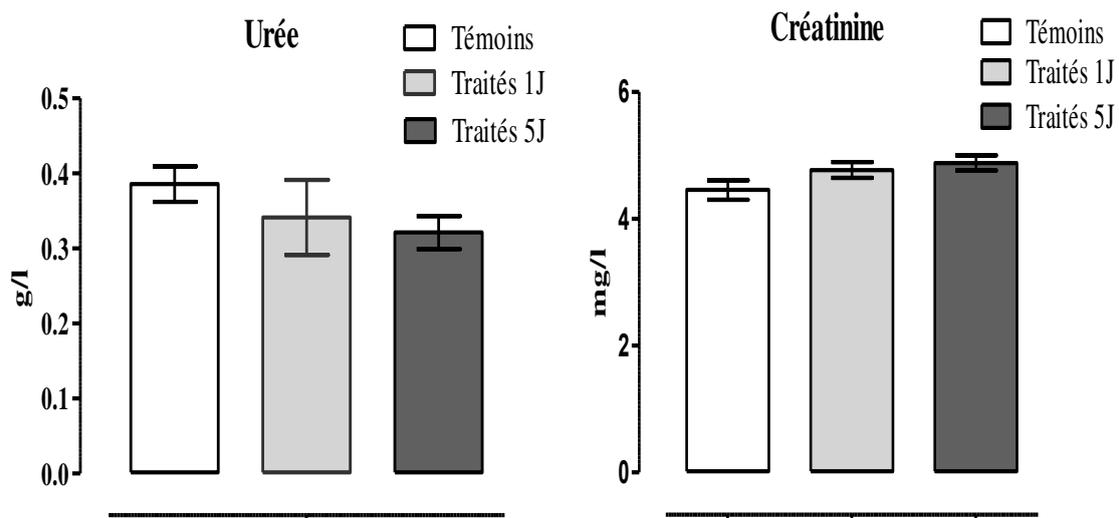


Figure 50: Effet des alcaloïdes totaux de *Ruta montana* (75,23mg/kg \approx 1/3 DL₅₀) sur quelques paramètres biochimiques de la fonction rénale chez les souris femelles dans les conditions de la toxicité aiguë. Les valeurs sont exprimées en M \pm SEM.

6.4.4. Etudes des paramètres hématologiques

Les paramètres hématologiques des souris mâles et femelles traitées par les alcaloïdes totaux de *Ruta montana* sont présentés dans les tableaux 20 et 21. Statistiquement, aucun changement significatif n'est observé dans les valeurs des paramètres hématologiques des groupes traités mâles par rapport au groupe témoin. Cependant, on a enregistré une augmentation significative du GB, CCMH, Lymphocytes et Granulocytes de 96,12%, 4,34%, 93,20% et 125,62% respectivement avec une diminution significative de volume globulaire moyen de 8,03% dans le sang des souris femelles traitées et sacrifiées après 24 heures par rapport au groupe témoin.

Tableau 20 : Paramètres hématologiques des souris mâles traitées dans les conditions de la toxicité aiguë par la dose de 129,28 mg/kg ($\approx 1/3$ DL₅₀) d'alcaloïdes totaux de *Ruta montana*.

Test	GR	MCV	RDW	HCT	PLT	MPV	GB	HGB	MCH	MCHC
Groupes	10 ⁶ /mm ³	μm ³	%	%	10 ³ /mm	μm ³	10 ³ /mm ³	g/dL	Pg	
Témoins	7,66	42,75	20,83	32,75	471	8,733	8,1	11,22	14,98	35,12
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,5187	0,6756	1,791	2,293	77,82	1,571	1,038	0,3177	0,9864	2,371
Traités 1 ^{er} J	7,863	42,25	19,52	33,45	443,2	7,217	8,083	12,18	15,68	37,42
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,6623	1,215	0,6457	3,487	59,85	0,4743	0,6188	0,6814	0,6058	2,259
Traités 5 ^{ème} J	7,225	42,73	19,85	30,90	582,3	6,583	11,10	10,73	14,90	34,97
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,3034	0,7775	0,4264	1,442	33,67	0,4175	1,424	0,2777	0,4740	1,393

Les valeurs sont représentées sous forme M ± SEM.

Tableau 21 : Paramètres hématologiques des souris femelles traitées dans les conditions de la toxicité aiguë par la dose de 75,23 mg/kg ($\approx 1/3$ DL₅₀) d'alcaloïdes totaux de *Ruta montana*.

Test	GR	VGM	HCT	PLT	VPM	IDP	PTC	GB	HGB	TCMH	CCMH	LYM	GRAN
Groupes	10 ⁶ /mm ³	fl	%	%	fl	fl	%	10 ⁹ /l	g/dl	pg	g/dl	10 ⁹ /l	10 ⁹ /l
Témoins	8,943	49,91	44,67	575,1	7,3	10,83	0,4157	6,2	14,27	15,96	32	4,843	0,6143
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,2025	0,7089	1,341	55,92	0,2507	0,3932	0,0399	0,414	0,2533	0,2543	0,6016	0,3206	0,0799
Traités 1 ^{er} J	9,33	45,9	42,81	586,7	7,314	11,27		12,16	14,27	15,27	33,39	9,357	1,386
	±	±	±	±	±	±	0,4314	±	±	±	±	±	±
	0,1726	0,7684**	0,7288	60,43	0,3997	0,7269		1,478***	0,1848	0,2925	0,5721***	1,277**	0,1299*
Traités 5 ^{ème} J	8,934	48,61	43,33	536,9	7,043	10,30	0,3743	8,843	13,94	15,63	32,17	6,943	0,9429
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,2392	1,007	0,7174	66,84	0,2918	0,4515	0,0456	0,6535	0,2935	0,2296	0,3029	0,453	0,1901

Les valeurs sont exprimées en M ± SEM. *** P < 0,05 comparant aux témoins.

6.4.5. Évaluation histopathologique

L'étude histologique du foie a montré une conservation du lobule hépatique, néanmoins une surcharge hépatocytaire en graisses chez les souris mâles traitées et sacrifiées après 24 heures et des congestions sinusoidales et portales chez les animaux traités et sacrifiés après 5 jours (Fig. 51). Aucun changement n'est observé dans l'architecture rénale des souris mâles traitées en comparaison avec les témoins (Fig. 52). Des œdèmes sont observés au niveau du cerveau des souris mâles traitées et sacrifiées après 24 heures et 5 jours par rapport aux témoins (Fig. 53).

Rien n'a été observé sur les coupes histologiques des tissus hépatiques, rénales et cérébrales des souris femelles traitées et sacrifiées après 24 heures en comparaison avec le groupe témoin, cependant des congestions rénales et des œdèmes cérébraux ont été observés dans les conditions de la toxicité aigüe après le 5^{ème} jour du traitement (Fig. 54, 55 et 56)

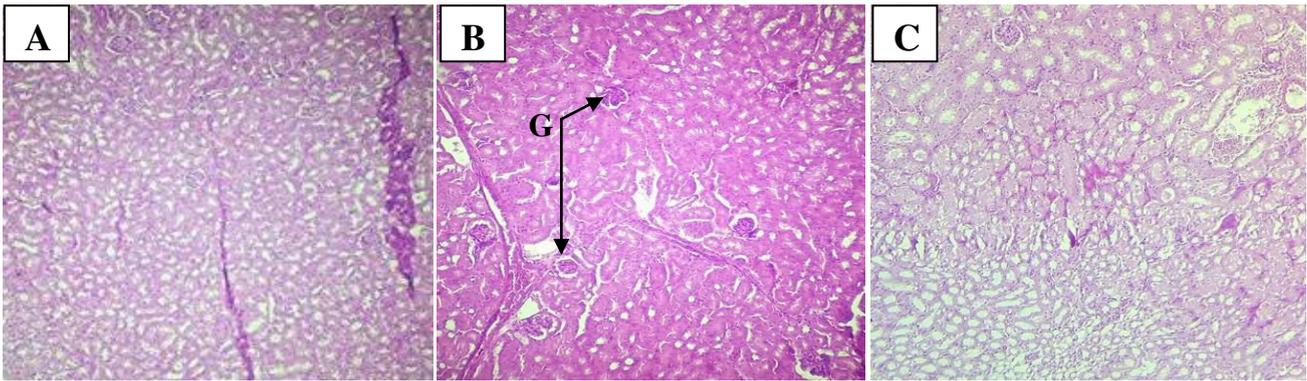


Figure 51: Coupe histologique du tissu rénal des souris mâles témoins (A) et traitées dans les conditions de la toxicité aigue par la dose de 129,68 mg/kg ($\approx 1/3$ de DL_{50}) d'alcaloïdes totaux de *Ruta montana* (B: après 24 heures et C: après 5 jours). Coloration éosine hématoxyline $\times 10$. **G** : Glomérules.

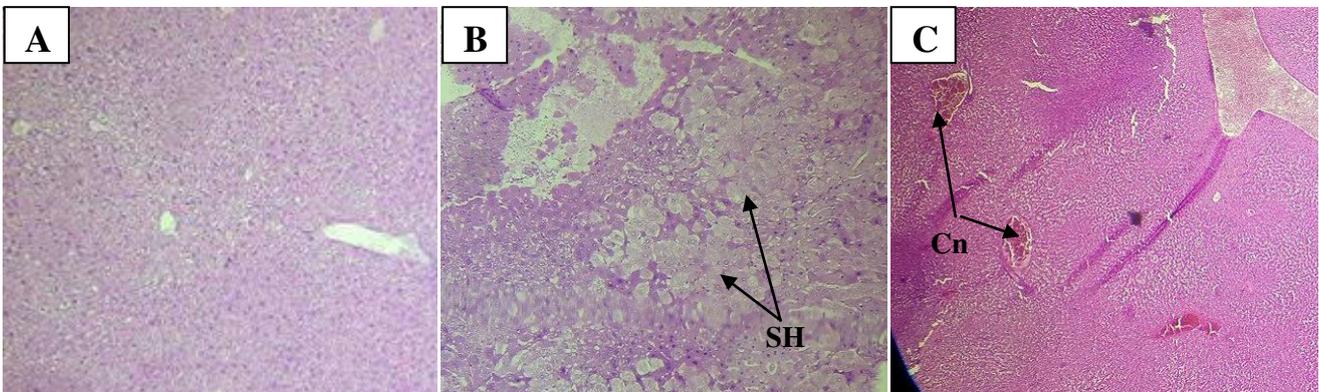


Figure 52: Coupe histologique du tissu hépatique des souris mâles témoin (A) et traitées dans les conditions de la toxicité aigue par la dose de 129,68 mg/kg ($\approx 1/3$ de DL_{50}) d'alcaloïdes totaux de *Ruta montana* (B: après 24 heures et C: après 5 jours). Coloration éosine hématoxyline $\times 10$.

SH: Surcharge hépatocytaire, **Cn:** Congestion sinusoidale et portale.

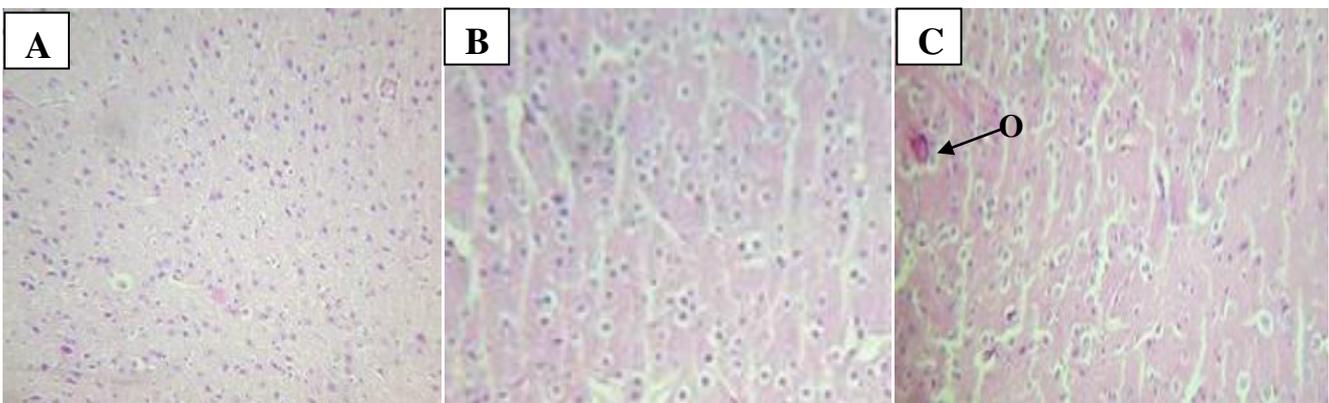


Figure 53: Coupe histologique du tissu cérébral des souris mâles témoins (A) et autres traitées dans les conditions de la toxicité aigue par la dose de 129,68 mg/kg ($\approx 1/3$ de DL_{50}) d'alcaloïdes totaux de *Ruta montana* (B: après 24 heures et C: après 5 jours). Coloration éosine hématoxyline $\times 10$. **O** : Œdème.

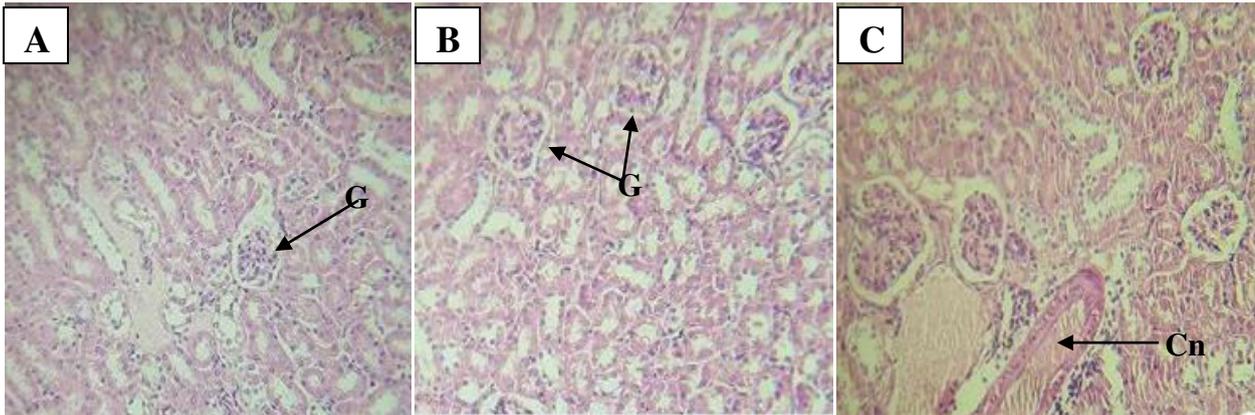


Figure 54: Coupe histologique du tissu rénal des souris femelles témoins (A) et autres traitées dans les conditions de la toxicité aiguë par la dose de 75,23 mg/kg ($\approx 1/3$ de DL_{50}) d'alkaloïdes totaux de *Ruta montana* (B: après 24 heures et C: après 5 jours). Coloration éosine hématoxyline $\times 40$. **Cn** : Congestion rénale., **G** : Glomérules

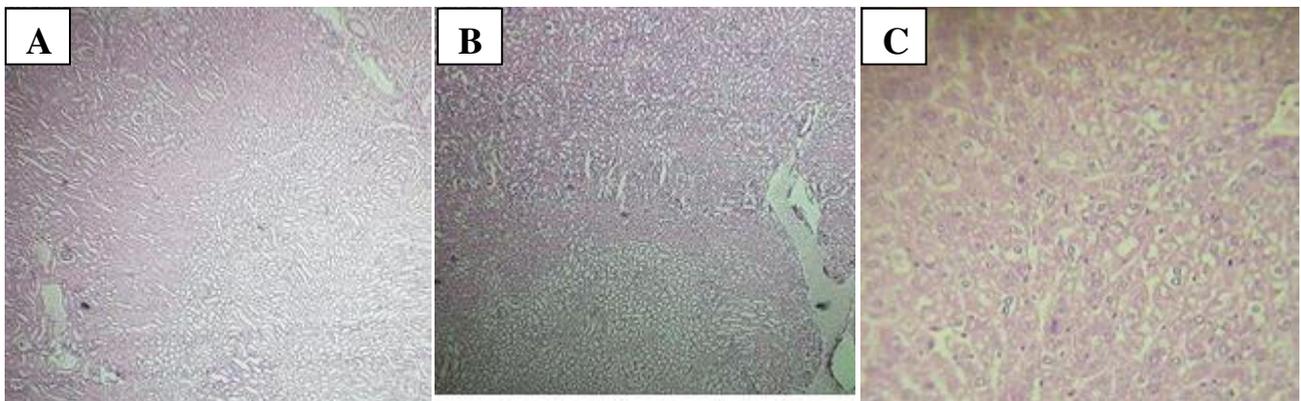


Figure 55: Coupe histologique du tissu hépatique des souris femelles témoins (A) et traitées dans les conditions de la toxicité aiguë par la dose de 75,23 mg/kg ($\approx 1/3$ de DL_{50}) d'alkaloïdes totaux de *Ruta montana* (B: après 24 heures et C: après 5 jours). Coloration éosine hématoxyline $\times 10$ et $\times 40$.

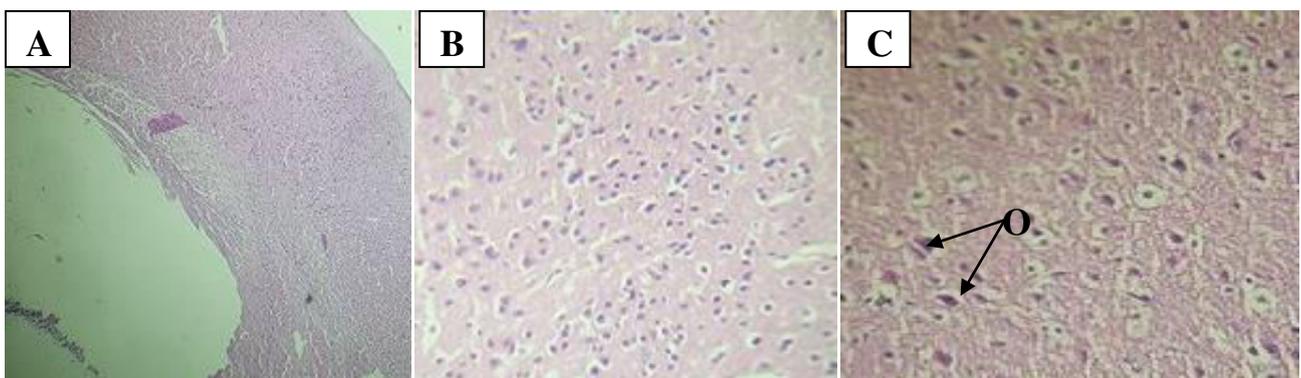


Figure 56: Coupes histologiques de tissu cérébral des souris femelles témoins (A) et autres traitées dans les conditions de la toxicité aiguë par la dose de 75,23 mg/kg ($\approx 1/3$ de DL_{50}) d'alkaloïdes totaux de *Ruta montana* (B: après 24 heures et C: après 5 jours). Coloration éosine hématoxyline $\times 10$ et $\times 40$. **O** : Œdème cérébral.

6.5. Toxicité subaigüe

L'administration de la dose de 19,452 mg/kg chez les souris mâles et de 11,28 mg/kg chez les souris femelles, qui correspondent aux 1/20 DL₅₀ mg/kg des alcaloïdes totaux de *Ruta montana* pendant 28 jours n'ont provoqués aucune mortalité. Cependant, durant le traitement par les alcaloïdes totaux, on a observé une chute des poiles de souris mâles traités par rapport aux témoins dès la deuxième semaine.

6.5.1. Évolution pondérale

Pas de changement significatif a observé dans l'évolution du poids des souris mâles ou femelles traités dans les conditions de la toxicité subaigüe par les alcaloïdes totaux de *Ruta montana*, cependant une légère diminution du poids corporel des souris mâles traités pendant la 2^{ème} et la 4^{ème} semaine et uniquement pendant la dernière semaine de traitement chez les souris femelles par rapport aux groupes témoins. Les témoins ont présenté une évolution normale de leurs poids (Fig. 57 et 58).

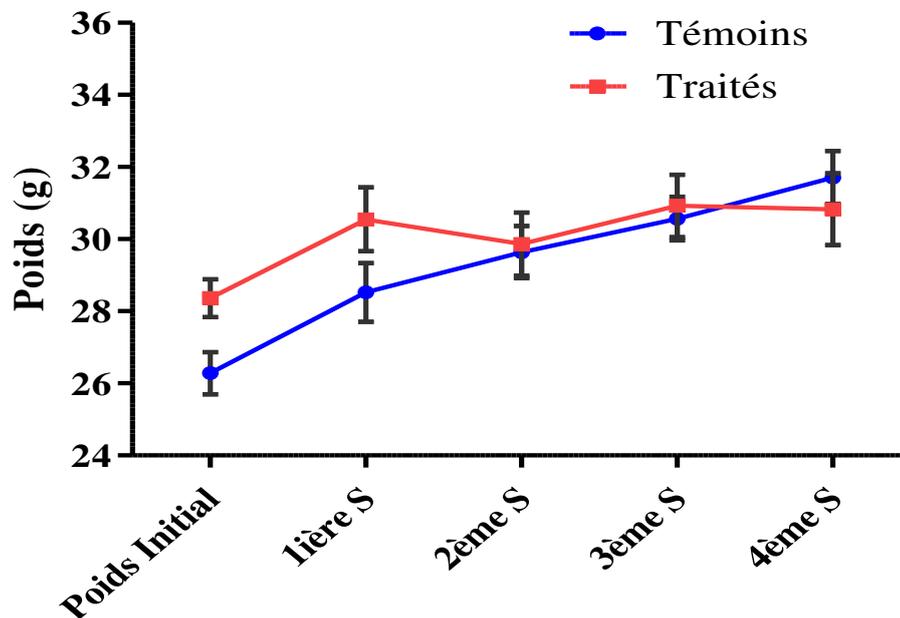


Figure 57: Evolution pondérale des souris mâles des groupes témoin et traité dans les conditions de la toxicité subaigüe par la dose de 19, 452 mg/kg (\approx 1/20 DL₅₀) d'alcaloïdes totaux de *Ruta montana*. Les valeurs sont exprimées en $M \pm SEM$.

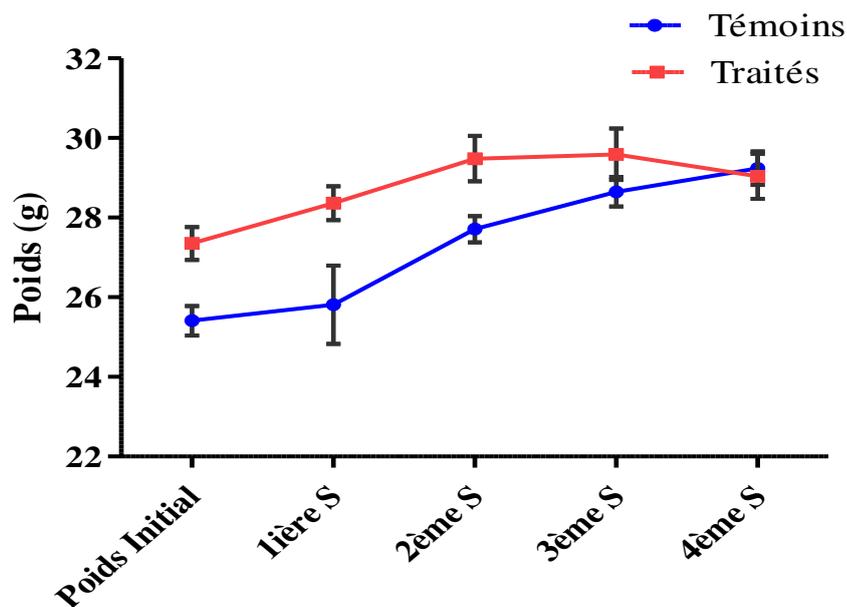


Figure 58: Evolution pondérale des souris femelles des groupes témoin et traité dans les conditions de la toxicité subaigüe par la dose de 11, 28 mg/kg ($\approx 1/20$ DL₅₀) d'alcaloïdes totaux de *Ruta montana*. Les valeurs sont exprimées en $M \pm SEM$.

6.5.2. La masse relative des organes

La taille, la forme et la couleur des organes (foie, reins, cœur, cerveau, poumons, rate et testicules) des souris mâles traitées dans les conditions de la toxicité subaigüe par la dose de 19,452 mg/kg ($1/20$ DL₅₀) n'ont pas de changement notable en comparaison avec les animaux du groupe témoin. Cependant, on a noté une diminution significative de la masse relative du foie de 13,08% avec une augmentation significative de la masse relative des testicules de 14,07% chez les souris mâles traités par rapport aux témoins (Tab.22).

L'étude de la masse relative de différents organes des souris femelles traitées dans les conditions de la toxicité subaigüe par la dose de 11,28 mg/kg ($1/20$ DL₅₀ mg/kg) d'alcaloïdes totaux de *Ruta montana* a montré une augmentation significative de masses relative de la rate par rapport à celle du groupe témoin (45,45%) (Tab.23).

Tableau 22: Les valeurs de la masse relative calculée pour chaque organe des souris mâles traitées dans les conditions de la toxicité subaigüe.

	Foie	Reins	Poumons	Cœur	Cerveau	Rate	Testicules
Témoins	0,0596±0,0018	0,0128±0,0010	0,0063±0,0004	0,0048±0,0003	0,0128±0,0004	0,0101±0,0015	0,0068±0,0002
Traités	0,0518±0,0021*	0,0131±0,0004	0,0074±0,0005	0,0046±0,0002	0,0136±0,0007	0,0075±0,0003	0,0078±0,0003*

Chaque valeur sont représentées sous forme M ± SEM. * P< 0,05 comparant avec le groupe témoin.

Tableau 23 : Les valeurs de la masse relative calculée pour chaque organe des souris femelles traitées dans les conditions de la toxicité subaigüe.

	Foie	Reins	Poumons	Cœur	Cerveau	Rate
Témoins	0,0505±0,0022	0,0094±0,0003	0,0068±0,0003	0,0047±0,0003	0,0149±0,0004	0,0033±0,0002
Traités	0,0514±0,0017	0,0099±0,0005	0,0067±0,0002	0,0048±0,0002	0,0147±0,0007	0,0048±0,0003**

Chaque valeur sont représentées sous forme M ± SEM. ** P< 0,05 comparant avec le groupe témoin.

6.5.3. Etude des paramètres biochimiques

Les résultats, obtenus après l'examen des paramètres sériques des animaux, n'ont indiqué aucun changement significatif dans les valeurs de l'urée, créatinine et des transaminases hépatiques (ASAT et ALAT et PAL) du sérum des souris mâles traités dans les conditions de la toxicité subaigüe comparés à ceux du groupe témoins (Fig. 59 et 61).

Cependant, on a enregistré une diminution significative de 48,62% dans la phosphatase alcaline sérique des souris femelles traitées dans les conditions de la toxicité subaigüe par rapport au groupe témoin, les concentrations de l'urée et la créatinine n'ont connu aucune différence significative par rapport aux témoins (Fig. 60 et 62).

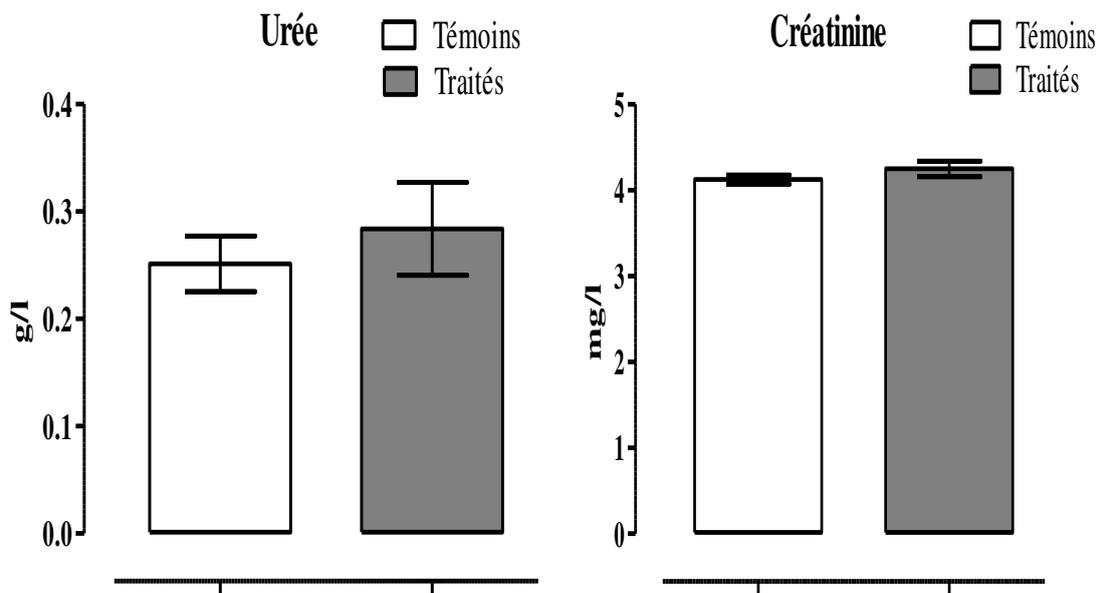


Figure 59: Taux sérique de « Urée et Créatinine » des souris mâles traitées et témoins dans les conditions de la toxicité subaiguë par la dose 19, 452 mg/kg ($\approx 1/20$ DL₅₀) d’alcaloïdes totaux de *Ruta montana*. Les valeurs sont représentées sous forme M ± SEM.

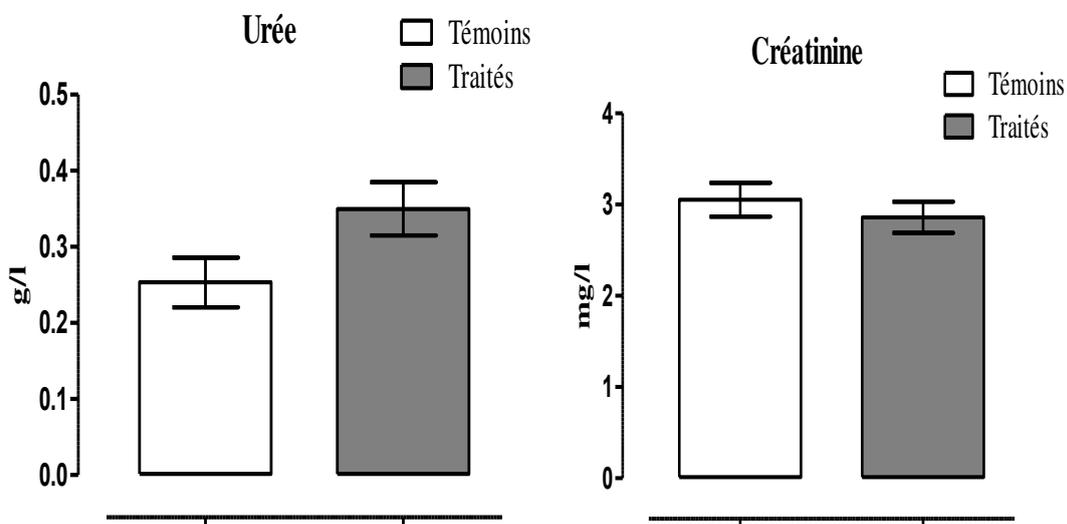


Figure 60: Taux sérique de « Urée et Créatinine » des souris femelles traitées et témoins dans les conditions de la toxicité subaiguë par la dose de 11,28 mg/kg ($\approx 1/20$ DL₅₀) d’alcaloïdes totaux de *Ruta montana*. Les valeurs sont exprimées en M ± SEM.

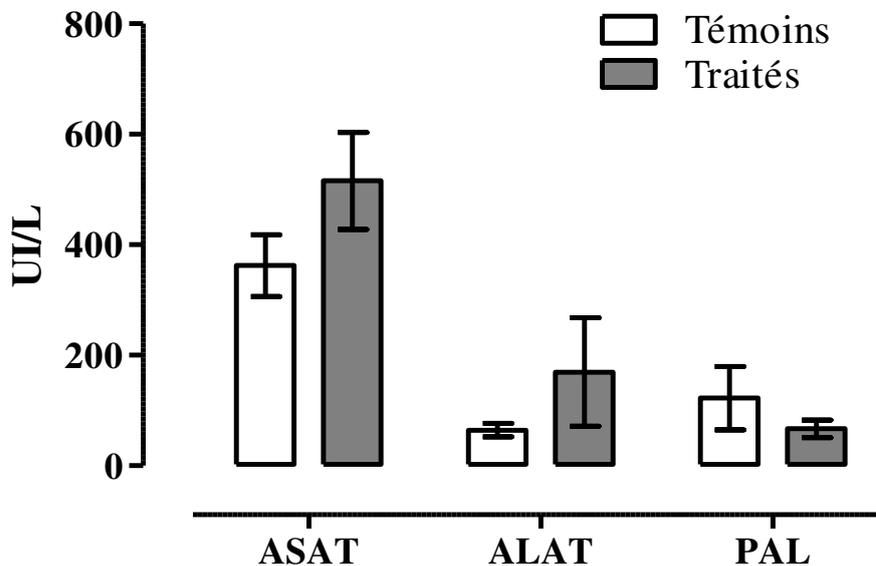


Figure 61: Taux sérique de « ASAT, ALAT et PAL » des souris mâles traitées et témoins dans les conditions de la toxicité subaiguë par la dose de 19, 452 mg/kg ($\approx 1/20$ DL₅₀) d'alcaloïdes totaux de *Ruta montana*. Les valeurs sont exprimées en $M \pm SEM$.

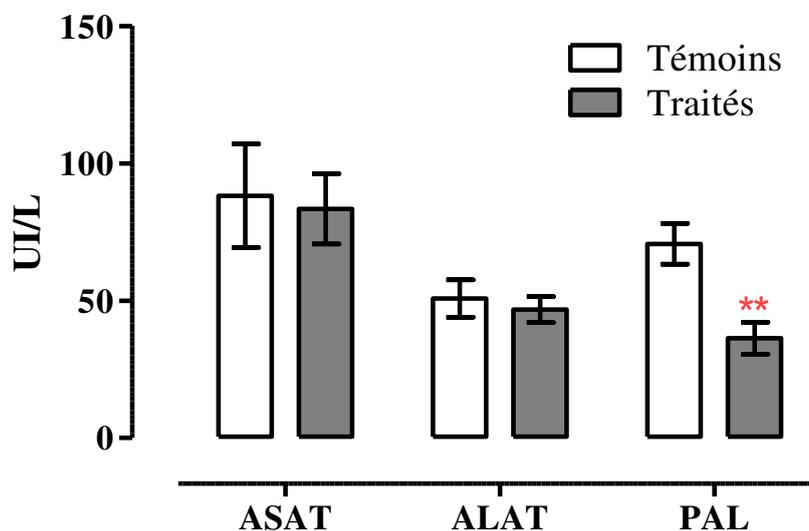


Figure 62: Taux sérique de « ASAT, ALAT et PAL » des souris femelles traitées et témoins dans les conditions de la toxicité subaiguë par la dose de 11,28 mg/kg ($\approx 1/20$ DL₅₀) d'alcaloïdes totaux de *Ruta montana*. Les valeurs sont exprimées en $M \pm SEM$. **P < 0,05 comparant aux témoins.

6.5.4. Etude des paramètres hématologiques

L'examen hématologique effectué de souris traitées quotidiennement par voie IP avec les alcaloïdes totaux de *Ruta montana* par la dose de 19, 452 mg/kg ($\approx 1/20$ DL₅₀), a montré une augmentation significative de 12,99% des globules rouge par rapport au groupe témoin (Tab.24). D'autre part les résultats illustrés dans le tableau 25 révèlent une augmentation significative de 71,06% des granulocytes des souris femelles traitées dans les conditions de la toxicité subaigüe par la dose de 11,28 mg/kg d'alcaloïdes totaux de *Ruta montana* par rapport aux témoins.

Tableau 24 : Paramètres hématologiques chez les souris mâles traitées par voie IP avec les alcaloïdes totaux de *Ruta montana* (19,452 mg/kg $\approx 1/20$ DL₅₀).

Test Groupes	GB 10 ³ /mm ³	GR 10 ⁶ /mm ³	HB g/dl	HCT %	VGM fl	TCMH pg	CCMH g/dl	PLT 10 ³ /mm ³	LYM %	MON %	GRAN %	MPV fl	PDW %
Témoins	11	7,613	12,50	38,32	50,33	16,43	32,63	1184	61,23	28,68	10,08	9,917	15,27
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	2,443	0,2412	0,5502	1,503	1,085	0,4551	0,6222	116,9	4,886	3,532	1,439	0,7463	0,6243
Traités	10,10	8,602	13,45	43,22	50	15,65	31,30	1197	59,63	26,88	13,48	9,35	15,43
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,8132	3,3233*	0,5169	2,428	1,115	0,2655	0,7358	131,5	2,793	1,853	1,477	0,6276	0,4842

Les valeurs sont représentées sous forme M ± SEM. * P < 0,05 comparant aux témoins

Tableau 25: Paramètres hématologiques chez les souris femelles traitées dans les conditions de la toxicité subaigüe par voie IP avec les alcaloïdes totaux de *Ruta montana* (11,28 mg/kg $\approx 1/20$ DL₅₀).

Test Groupes	GR 10 ¹² /l	VGM fl	HCT %	PLT 10 ⁹ /l	VPM fl	IDP fl	PTC %	GB 10 ⁹ /l	HGB g/dl	TCMH pg	CCMH g/dl	LYM 10 ⁹ /l	GRAN 10 ⁹ /l
Témoins	8,692	51,60	44,97	623,8	6,367	9,3	0,3867	8,833	14,03	16,15	31,42	6,983	0,75
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,1614	1,718	1,934	104,2	0,2616	0,4159	0,0566	0,6849	0,1282	0,2247	1,022	0,5275	0,1335
Traités	8,55	51,03	43,68	626,3	7,067	10,40	0,4167	9,6	13,27	15,52	30,53	6,75	1,283
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,1614	1,643	1,721	118,6	0,4814	0,6865	0,0495	0,9757	0,3947	0,2088	0,9204	0,7112	0,1956*

Les valeurs sont représentées sous forme M ± SEM. * P < 0,05 comparant aux témoins.

6.5.5. Examen anatomopathologique

L'observation des coupes histologiques de foie et des reins des souris mâles et femelles témoins et traitées dans les conditions de la toxicité subaigüe a révélé que l'architecture cellulaire (lobulaire et tubulaire) du parenchyme des deux organes est bien conservée chez les deux groupes des animaux en comparaison avec les témoins. Cependant quelques particularités ont été observées, des discrètes congestions hépatiques et rénales avec des œdèmes cérébraux chez les souris traitées par rapport aux témoins (Fig.de 63 à 68).

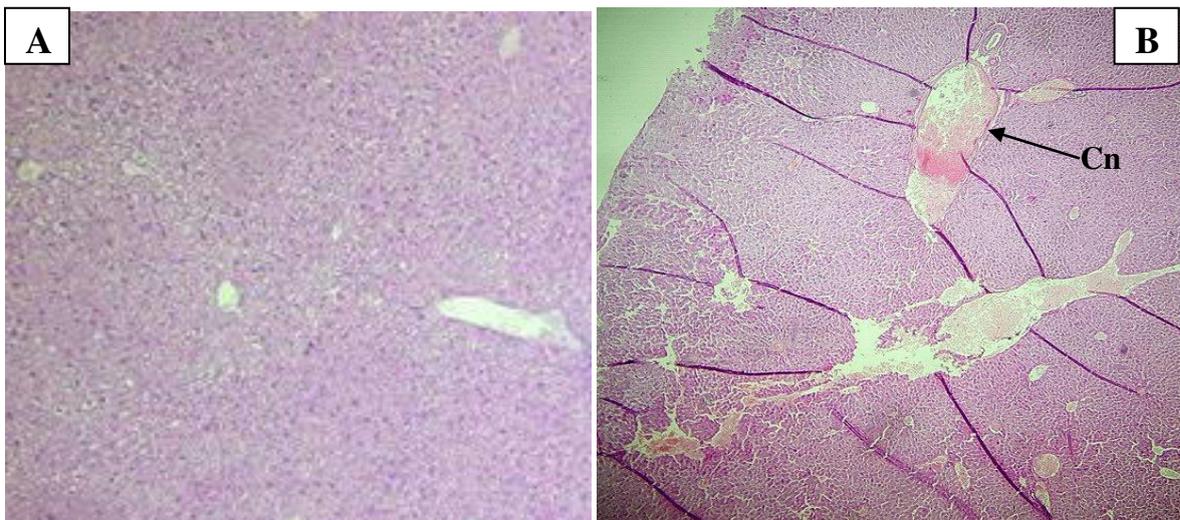


Figure 63: Coupes histologiques du tissu hépatique des souris mâles témoins (A) et traitées (B) dans les conditions de la toxicité subaigüe par la dose de 19,452 mg / kg (1/20 de DL₅₀) d'alcaloïdes totaux de *Ruta montana*. Coloration éosine hématoxyline ×10. Cn : Congestion hépatique.

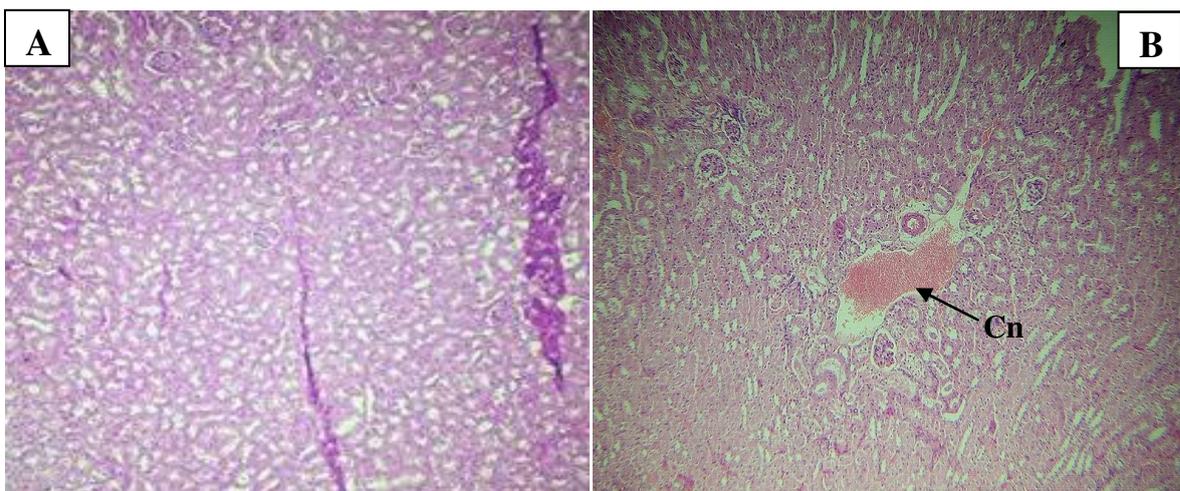


Figure 64: Coupes histologiques du tissu rénal des souris mâles témoins (A) et traitées (B) dans les conditions de la toxicité subaigüe par la dose de 19,452 mg / kg (1/20 de DL₅₀) d'alcaloïdes totaux de *Ruta montana*. Coloration éosine hématoxyline ×10. Cn : Congestion rénale.

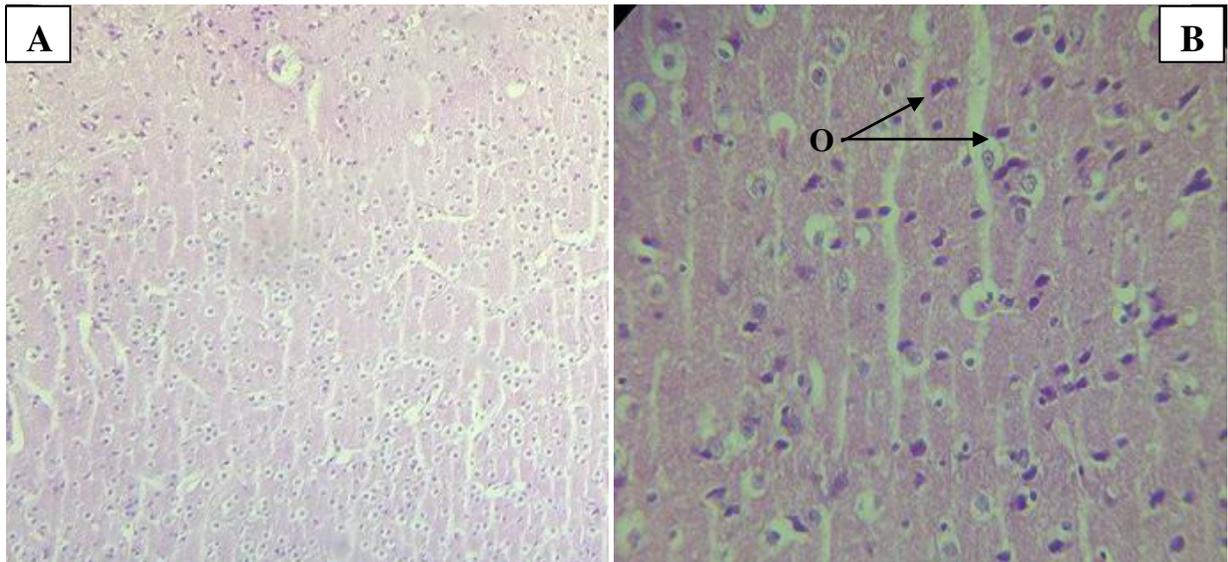


Figure 65: Coupes histologiques du tissu cérébral des souris mâles témoins (A) et traitées (B) dans les conditions de la toxicité subaigüe par la dose de 19,452 mg / kg (1/20 de DL₅₀) d'alcaloïdes totaux de *Ruta montana*. Coloration éosine hématoxyline × 10. O : Œdème.

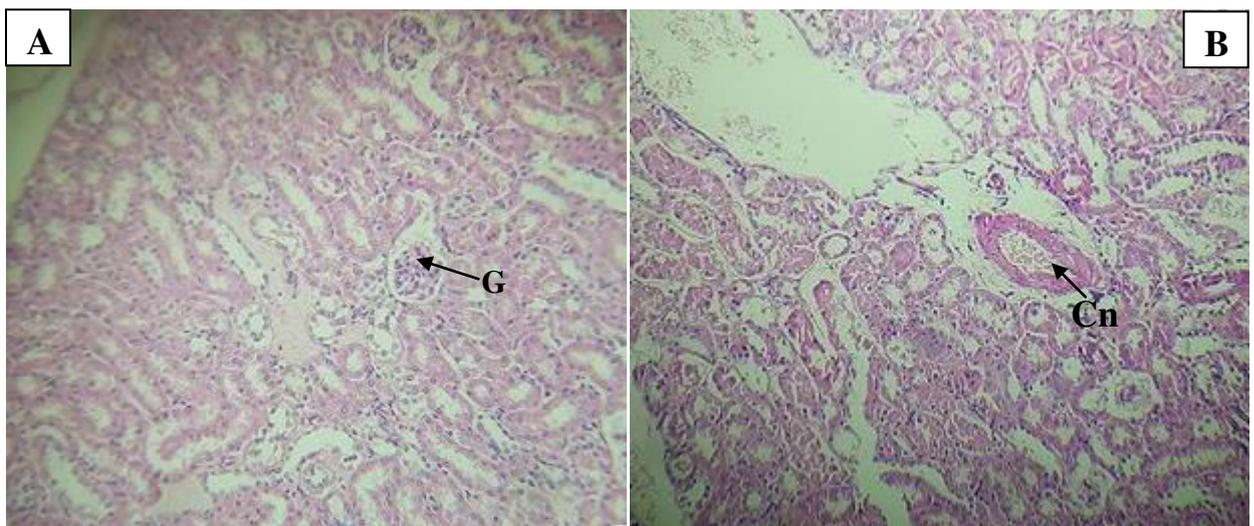


Figure 66: Coupes histologiques du tissu rénal des souris femelles témoins (A) et traitées (B) dans les conditions de la toxicité subaigüe par la dose de 11,28 mg / kg (1/20 de DL₅₀) d'alcaloïdes totaux de *Ruta montana*. Coloration éosine hématoxyline × 40. Cn : Congestion rénale.

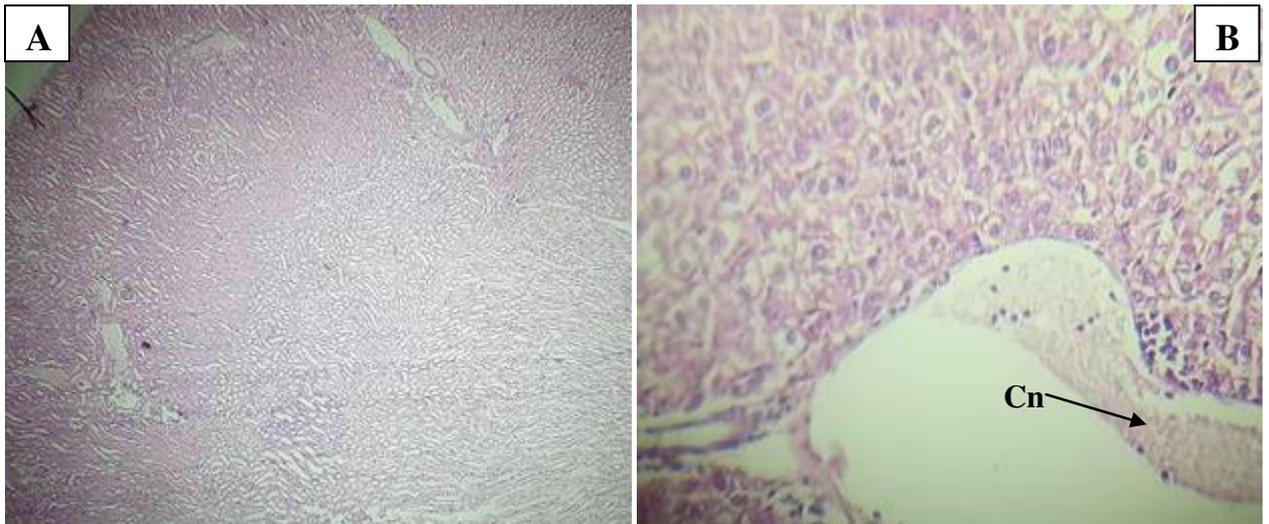


Figure 67: Coupes histologiques du tissu hépatique des souris femelles témoins (A) et traitées (B) dans les conditions de la toxicité subaigüe par la dose de 11,28 mg / kg (1/20 de DL₅₀) d'alkaloïdes totaux de *Ruta montana*. Coloration éosine hématoxyline × 10 et × 40. **Cn** : Congestion hépatique.

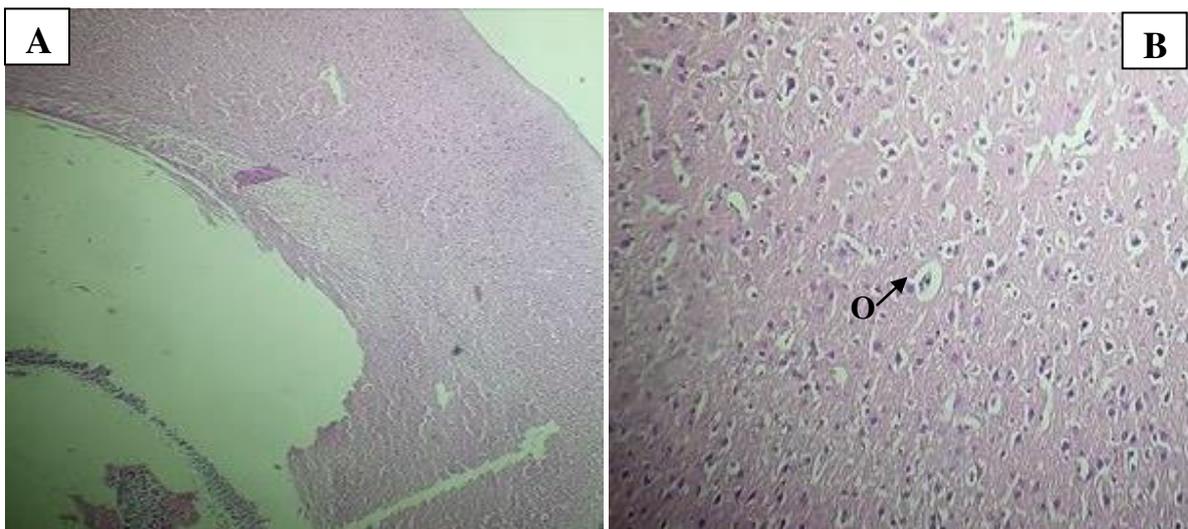


Figure 68 : Coupes histologiques du tissu cérébral des souris femelles témoins (A) et traitées (B) dans les conditions de la toxicité subaigüe par la dose de 11,28 mg / kg (1/20 de DL₅₀) d'alkaloïdes totaux de *Ruta montana*. Coloration éosine hématoxyline × 10 et × 40. **O** : Œdème.

Partie VI

Discussion

Partie VI : Discussion

Ruta montana a été utilisée dans la médecine traditionnelle contre les maladies de l'estomac, les maladies respiratoires et hépatiques, dans les troubles digestifs et l'helminthiase, elle est traditionnellement connue pour ses effets abortifs et aphrodisiaques, emmenagogue, comme désinfectant; antipyrétiques (Kabouche *et al.*, 2003 ; Duke *et al.*, 2008 ; Lahsissene *et al.*, 2009 ; Djarri *et al.*, 2013 ; Hammiche et Azzouz, 2013). En fait, leurs propriétés thérapeutiques sont dues à la présence de milliers de métabolites secondaires dont les huiles essentielles et les alcaloïdes (Baba Aissa, 1999).

1. Screening phytochimique

Les essais phytochimiques effectués sur les extraits de la partie aérienne ont révélé la présence des tanins, des alcaloïdes, les coumarines, les stérols et triterpènes alors le test de recherche des saponosides et des anthacyanes a été négatif sur notre échantillon. Ces résultats sont complètement en accord avec les travaux de Daoudi *et al.* (2016), sur *R.montana* et *R.chalepensis*.

Les groupes chimiques détectés confirment les travaux de Benkiki (2006), Al-Said (1990), Vasudevan et Luckner (1968), Ulubelen (1990), Touati *et al.* (1999), Sener et Mutlugil (1985) sur *R.montana* et Ulubelen et ces collègues (1986), sur *R. chalepensis* mais également prouvés par des études effectuées sur *R.graveolens* (steck *et al.*, 1971).

Les tests avec les réactifs de Mayer et Wagner révèlent la présence des alcaloïdes ce qui explique la toxicité de *Ruta montana* rapportée par (Collin, 2012). La présence des alcaloïdes dans la plante pourrait impliquer des activités biologiques intéressantes, notamment antiproliférative et antalgique (Somboro, 2010).

Les résultats de ce criblage permettent d'élaborer des hypothèses pour expliquer l'activité biologique d'un extrait par la présence d'une famille chimique particulière.

2. Rendement

La plante *Ruta montana* L. a été récoltée de la région Beni-Aziz pour l'extraction des extraits bruts et alcaloïdiques, dont on a utilisé la partie aérienne (Tige, Feuilles et Graines) sous forme poudre sèche. Il est recommandé pour obtenir une meilleur extraction d'utiliser le matériel végétal sec, congelé ou lyophilisé ; étant donné que certains composés antioxydants (certains flavonoïdes et particulièrement les glycosides) sont instables ou peuvent être dégradés sous l'action des enzymes du matériel végétal frais (Suhaj, 2006 ; Bruneton, 1999).

La macération par le méthanol permet d'obtenir des rendements en extraits bruts variables selon la partie de la plante où la quantité des molécules extraites est supérieure dans les feuilles (6,46%) par rapport aux graines. Cela est dû préalablement au solvant utilisé d'une part et d'autre part à la richesse de *Ruta montana* en substances solubles dans le méthanol. En effet des études ont indiqué qu'un rapport de 70% de méthanol est utilisé généralement dans l'extraction des flavonoïdes, des acides phénols et leurs dérivés et plusieurs une large gamme des biomolécules (Al-Farsi et Lee, 2008).

Les résultats de EL-Said et ces collaborateurs (1990), sur *R. chalepensis*, ont donné un rendement en extrait brut des parties aériennes entières est de 3.75%, ce rendement est inférieure à celui obtenu dans notre étude, cela peut être due aux caractéristiques de chaque espèces et la région de récolte (sol, température).

Le rendement en extrait alcaloïdique des parties aériennes entières est de 0.27%. C'est un rendement nettement inférieur à celui obtenu par l'extraction à froid par simple macération. Cela est peut-être dû à l'utilisation de soxhlet où la température pendant plusieurs heures qui peut dégrader certains constituants sensibles (tels les polyphénols) (Andersen et Markham, 2006). Un rendement de 3.4% d'alcaloïdes des partie aérienne de *R. montana* est obtenu par Benkiki (2006), ces résultats sont très importantes par rapport à notre résultats, cette différence en rendement peut être attribuée à de nombreux facteurs, notamment, le stade de croissance de ma plante, les conditions pédoclimatiques et édaphiques de la région, le lieu de séchage, la température et la durée de séchage, les parasites et la technique et solvant d'extraction (Fellah *et al.* , 2006).

D'une manière générale, les teneurs en extraits secs varient non seulement d'une plante à une autre de la même famille mais également en fonction des paramètres de l'extraction solide-liquide des polyphénols, liquide-liquide des alcaloïdes, le solvant d'extraction, la taille des

particules et le coefficient de diffusion de solvant.

3. Chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince des extraits bruts et alcaloïdique a permis de séparer plusieurs substances qui ont été observées sous UV à 360 nm et trois spots ont été observées après révélation par le réactif Bouchardât. Ce qui explique que les alcaloïdes sont présents en quantités importantes aussi bien dans les feuilles que dans les graines.

L'examen en chromatographie sur couche mince (CCM) des extraits bruts méthanoliques (EBF et EBG) montre des tâches fluorescentes correspondant aux différentes molécules, qui sont probablement alcaloïdes, des coumarines, des stérols ou des terpénoïdes ; c'est également plusieurs zones fluorescentes avec des R_fs allant de 0,6 à 0,9 sont observées par Wagner et Bladt (1995), lors la séparation d'un extrait méthanolique de *Ruta graveolens* correspond principalement à des alcaloïdes et des coumarines.

Les travaux de Wagner et Bladt (1995), sur *R. graveolens* ont mis en évidence plus de deux spots, dont deux sont identifiés comme étant des alcaloïdes fagarine et kokusaginine et les autres spots sont des fausses réactions de Dragendorff positive, il se pourrait que les trois spots obtenu avec *Ruta montana*, deux d'entre eux correspondant à fagarine et kokusaginine.

4. *Activité antioxydante (DPPH-FRAP)*

L'activité antioxydante des extraits bruts des feuilles, des graines et extrait alcaloïdique de *Ruta montana* et de l'antioxydant standard (acide ascorbique) *vis-à-vis* du radical DPPH a été évaluée à l'aide d'un spectrophotomètre en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette (DPPH•) à la couleur jaune (DPPH-H) mesurable à 517nm. Cette capacité de réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance induite par des substances anti radicalaires (Majhenic *et al.*, 2007).

La méthode de piégeage du radical libre DPPH[•] est capable de mesurer la puissance anti radicalaire d'antioxydants. Cette activité est habituellement représentée par la valeur IC50, définie comme la concentration de l'antioxydant nécessaire pour récupérer 50% du DPPH présent dans la solution d'essai. Par conséquent, l'extrait méthanolique des feuilles a exprimé l'activité antioxydante la plus élevée (IC50 38, 61 ± 0,9259 µg/ml) par rapport à EBG et EAT, qui ont donné des IC50 de 44,1 ± 4,397 µg/ml et 96,87 ± 6,242µg / ml respectivement, mais pas plus forte que l'acide ascorbique (IC50 = 4,14 ± 0,31µg/ml). Ainsi, les extraits au méthanol sont plus actifs que l'extrait d'alcaloïdes totaux, cela est dû à la complexité des extraits bruts avec des substances phénoliques et la synergie entre eux pour une meilleure activité antioxydante d'une part (Vermerris et Nicholson, 2006), et d'autre part, d'après Klervi (2005) et Sokol *et al.* (2007), ont proposé l'hypothèse que l'activité anti radicalaire des extraits méthanoliques et aqueux des plantes est probablement liée à leur contenu en polyphénols, en flavonoïdes et en tanins. Les composés phénoliques semblent être des bons candidats pour leur activité antioxydante du fait de la présence de nombreux hydroxyles, pouvant réagir avec les radicaux libres.

Le test de dépistage phytochimique a montré la présence des tanins et des coumarines dans la plante, cela est susceptible d'être responsable sur les effets anti-radicalaires observées, où les phénols ont la capacité de faire un don d'électrons / hydrogène qui se traduit par la conversion des radicaux libres très réactifs aux molécules –non réactive (stables) (Mohamed Said Al-Hadhrami et Amzad Hossai, 2016), la forte activité de piégeage des radicaux libres de l'extrait brut de feuilles avec IC50 = 38, 61 ± 0,9259µg / ml peut être dû à la grande quantité de phénols et des flavonoïdes présents. Ceci indique que l'EBF de *R. montana* possède une bonne source potentielle naturelle d'antioxydants pour prévenir les dommages sans oxydation radicale.

Khelifi *et al.* (2013), a estimé avec *R. chalpensis* une IC50 de 70,01 mg/ml de, *R. montana* a

montré une activité plus puissante en piégeant DPPH· radical que celui de *R. chalepensis* et *R. graveolens* selon Fekhfekh *et al.* (2011), où les extraits aqueux et l'éthanoliques sont plus actifs que les huiles essentielles. Ces résultats concordent également ceux trouvés par Ouerghammi *et al.* (2016), indiquant que l'extrait méthanolique des feuilles de *Ruta chalepensis* exerce un effet antioxydant radicalaire vis-vis le DPPH mieux que celui des fleurs avec des IC50 de $23.73 \pm 0.1 \mu\text{g/ml}$ et $30.69 \pm 0.041 \mu\text{g/ml}$ respectivement.

Ainsi à des fins comparatives, extrait de feuilles éthanolique de *R. chalepensis* a montré une plus forte activité dans le piégeage du radical DPPH· que celle de *Ruta graveolens* (19,37% d'inhibition à 0,4 mg/ml) (Pandey *et al.*, 2011). L'huile essentielle de *Ruta montana* L. présente une forte activité d'élimination des radicaux DPPH· avec une IC50 = 16,7 $\mu\text{l/ml}$ due probablement aux mono terpènes (Kambouche *et al.*, 2008).

La capacité antioxydante des extraits a été également évaluée par dosage FRAP car il présentait également une grande reproductibilité (Thaipong *et al.*, 2006). Réduire le pouvoir, c'est mesurer l'activité réductrice d'antioxydant et elle est évaluée par transformation de Fe_3^+ en Fe_2^+ en donnant un électron.

D'après les résultats obtenus qui expriment la capacité réductrice d'extrait méthanolique des feuilles, des graines et des alcaloïdes totaux par rapport à l'acide ascorbique, on a constaté que le pouvoir réducteur des extraits augmentait avec l'augmentation de leurs concentrations. Tous les extraits présentaient une activité antioxydante nettement faible par rapport à la vitamine C de référence; ce dernier atteint un pouvoir réducteur presque total à 200 $\mu\text{g/ml}$. Les extraits bruts, qui contiennent la plus grande quantité des phénols totaux sont plus actifs par rapport aux extraits alcaloïdiques, ces résultats sont identiques avec ceux trouvés par Fakhfakh (2012), les extraits aqueux et éthanoliques ont donné un pouvoir réducteur plus élevé par rapport aux huiles essentielle de *R. chalepensis* L.

5. *Acticité antibactérienne*

Dans le but de contribuer à la valorisation de la flore Algérienne en vue d'identifier de nouvelles substances potentiellement intéressantes sur les plans biologique et thérapeutique, nous avons procédé à l'étude *in vitro* de l'effet de l'extrait alcaloïdique et méthanoliques des feuilles et des graines de la rue des montagnes (*Ruta montana* L.) sur un ensemble de bactéries Gram+ et Gram-.

Selon Boussoualim (2014), l'activité antibactérienne dépend de plusieurs facteurs à savoir : l'espèce de la plante, la préparation de l'extrait, le solvant utilisé, et la sensibilité des bactéries.

Les résultats obtenu dans notre étude ont montré que les trois extraits de *Ruta montana* L. ont empêché la croissance de tous les microorganismes cela due à l'effet antibactérien des coumarines notamment les furocoumarines, les alcaloïdes et les polyphénols selon des études précédentes mené par Wink (2007).

Les alcaloïdes totaux de *Ruta montana* ont exercé un effet inhibiteur important de la croissance bactérienne contre *B. cereus*, *E. coli*, *S. typhimurium* aux différentes concentrations et contre *S. aureus* avec la concentration de 200 mg/ml par rapport aux extraits bruts, cela peut être expliqué par la régulation de l'expression des transporteurs membranaires d'efflux, qui peut contribuer à la sensibilité aux alcaloïdes de type quinolones chez les bactéries Gram-positives et Gram-négatives (Hooper, 1995).

D'après Ponce *et al.* (2003), la sensibilité des bactéries a été classée par le diamètre des halos d'inhibition, donc à une concentration de 100 mg/ml on a :

-Avec l'extrait alcaloïdique *B. cereus* présente une extrême sensibilité ($31,16 \pm 0,76$ mm) suivi par *E. coli*, *S. typhimurium* ensuite *S. aureus*

Pelletier (1983), a décrit que l'alcaloïde Dictamine des Rutaceae agit comme antibactérien ainsi les alcaloïdes acridone de *Ruta graveolens*, la rutacridone epoxide et l'hydroxyrutacridone epoxide sont très actifs contre un large spectre de bactéries et des champignons selon Wolters et Eilert (1981). Ces alcaloïdes étaient plus actifs que l'antibiotique synthétique lactate d'éthacridine. Ce qu'on a observé, une action inhibitrice puissante des alcaloïdes contre les souches testées par rapport aux contrôles positifs utilisés.

Les alcaloïdes quinolones inhibent également les activités de la topoisomérase IV d'*Escherichia coli*, mais à des concentrations supérieures à celles inhibant l'ADN gyrase. Au contraire, chez *Staphylococcus aureus*, ces profils suggèrent que la topoisomérase IV pourrait être une cible primaire de l'action de la quinolone (Hooper, 1995).

Des études ont été effectuées par El-Sayed et ses collaborateurs (2000), afin de tester l'activité antimicrobienne des alcaloïdes isolés de l'espèce *R. chalepensis*, ont donné que l'alcaloïde de furanoquinoline connu, pteleine, a montré une activité antimicrobienne modérée en inhibant la croissance de *Mycobacterium smegmatis*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans*, tandis que la dictamnine, la skimmianine et l'isogravacridonéchlorine étaient moins actifs contre *M. smegmatis* et *B. subtilis* et inactifs contre les autres micro-organismes.

Dans *E. coli*, la dictamnine a été signalée comme étant une mutagène à action directe produisant des mutations dans l'obscurité (Ashwood-Smith *et al.*, 1982). En plus de présenter une activité génotoxique dans l'obscurité, les furoquinolines étaient également capables d'induire des dommages génétiques à la lumière. Lorsque les cellules procaryotes et eucaryotes étaient irradiées avec de l'ultraviolet à ondes longues (UV A) en présence de dictamnine, la furanoquinoline était liée de manière covalente à l'ADN (Pfyffer et Towers, 1982).

-Les extraits bruts des feuilles ou des graines de *Ruta montana* inhibent la croissance des quatre souches testées ce qui peut être expliqué par la richesse de ces extraits en substances antimicrobienne comme les furocoumarines et selon Roelandts (1984), ces molécules présentent une activité mutagène voire létale, vis-à-vis de micro-organismes fongiques ou bactériens, alors Dall'Acqua et Martelli (1991), ont montré que l'addition de coumarine le Psoralène des Rutaceae peut affecter les acides gras insaturés membranaires, ainsi que certains protéines selon Verones et ses collaborateurs (1981). Les saponines et les terpènes présents dans la plante peuvent entrer dans des interactions hydrophobes ou amphiphiles avec les protéines membranaires entraînant la perturbation de la fluidité membranaire conduisant à la libération des constituants intracellulaires (Wink, 2007).

Les extraits bruts ont montré une sensibilité extrême de *B. cereus* suivi par *S. typhimurium*, *S. aureus* et *E. coli*. La résistance d'*E. coli* aux extraits méthanoliques peut être due à la nature de bactérie, selon Normak et Normak (2002), les bacilles à Gram- sont naturellement résistants aux antibiotiques hydrophobes car ces molécules ont des difficultés à passer la membrane externe de leur paroi, ce qui concorde avec les travaux de Pavlović et ses collaborateurs (2014), sur l'espèce *Ruta graveolens* où les extraits méthanoliques et éthanoliques présentent une action inhibitrice puissante contre les bactéries Gram+.

Les travaux de Zallagui *et al.* (2012), montrent avec les huiles essentielles de *Ruta montana* L, que l'*E. coli* est plus sensible que *S. aureus* ceci est concorde avec les résultats obtenus dans notre étude avec l'EAT. En outre plusieurs études sur l'action de l'huile essentielle de *R.*

graveolens L., *R. chalepensis* L. et *R. montana* L. contre les microorganismes pathogènes, conviennent que les huiles essentielles sont plus efficaces contre les bactéries Gram-positives que contre Gram négatif (Belkassam *et al.*, 2011; França Orlanda et Nascimento, 2015), ces résultats sont proche à notre résultats.

Les travaux de Daoudi *et al.* (2016), avec des extraits bruts, les huiles essentielles et les alcaloïdes de *R. montana* L. et *R. chalepensis* L., ont montré que *S. aureus* était plus sensible et aucune inhibition d'*E. coli* et *B. cereus*. Ce qui incompatible avec notre résultats.

6. Acticité antifongique

Tous les extraits de *Ruta montana* ont présenté une activité antifongique modérée contre les champignons testés, Les résultats montrent que les alcaloïdes totaux ont un effet inhibiteur important contre la croissance de *F. oxysporum* (55%) rapport aux extraits bruts, d'après le les études précédentes effectuées sur l'espèce; les principales classes de métabolites secondaires identifiés dans la rue sauvage étaient les alcaloïdes, les flavonoïdes, les dérivés coumariniques, les lignanes, les terpénoïdes, les alcools primaires et secondaires, les quinine, les acides gras, les stéroïdes et d'autres composants mineurs (Benazir *et al.*, 2011). Outre les méthoxypsoralènes, généralement cytotoxiques et largement reconnus comme fongitoxiques, les alcaloïdes de quinoléine et de quinolone sont importants pour la plante de la rue dans la défense contre les pathogènes des plantes (Oliva *et al.*, 2003).

Cependant aux différentes concentrations l'EBF et l'EAT inhibent mieux la croissance d'*A. niger* en comparaison avec l'EBG, la CCM réalisé nous a permis d'identifier la présence des alcaloïdes et d'autres substances apparus sous UV dans l'extrait brut des feuilles, qui peut être des composés de nature phénolique. La plupart des études sur le mécanisme des composés phénoliques ont mis l'accent sur leurs effets sur les membranes cellulaires. En fait, les composés phénoliques non seulement attaquent les parois cellulaires et les membranes cellulaires, affectant ainsi la perméabilité et la libération des constituants intracellulaires, mais ils interfèrent également avec la fonction de la membrane. Ainsi, les terpènes phénoliques actifs pourraient avoir plusieurs cibles invasives qui pourraient conduire à l'inhibition des champignons phytopathogènes (Wink, 2007).

7. Dose létale médiane chez les souris mâles et femelles

D'après Bellakhdar (1997), les cas d'intoxications les plus fréquents au Maroc sont observés à la suite de tentatives d'avortement au cours desquelles la rue est administrée soit sous forme de décoction buvable, soit sous forme de lavements vaginaux. Aussi, Selon Hammiche

(2013), plusieurs cas de réactions phototoxiques sont signalés chez l'homme, à la suite de contact cutané avec des espèces appartenant à la famille des Rutaceae (plus particulièrement, le genre *Ruta*); cela se traduit par des érythèmes, des dermatites brûleuses parfois sévères, stimulant des brûlures bien différentes des réactions de photoallergie.

Dans le cadre d'évaluer la toxicité aigüe et subaigüe des alcaloïdes totaux de *Ruta montana* chez les souris blanches *Swiss Albinos* mâles et femelles, nous avons déterminé les DL₅₀ chez les deux sexes d'animaux.

La carte clinique des souris mâles et femelles traitées par les alcaloïdes totaux des parties aériennes de *Ruta montana* L. s'est caractérisée par une sédation, une diminution de l'activité locomotrice avec paralysie des pattes postérieures, des convulsions, des tremblements, cyanose et une perturbation du rythme cardiaque. Les extraits de *Ruta montana* contiennent plusieurs composants. On pense que les alcaloïdes de quinoline et les coumarines telles que les furocoumarines sont les constituants actifs (Hoffmann, 2003). La skimmianine, un alcaloïde furoquinoléine commun contenu dans les Rutaceae, a un effet inhibiteur sélectif sur les réponses vasopressines induites par la 5-hydroxytryptamine (5-HT) dans les études animales et a produit un blocage non spécifique des fonctions cardiovasculaires à forte concentration entraînant une hypotension (Cheng *et al.*, 1990).

Les convulsions et la paralysie sont expliqués selon Tamokou et Kuete (2014), par l'action de la substance toxique sur des récepteurs en modifiant la structure des récepteurs ce qui conduit à des effets biochimiques telle que la perturbation du métabolisme et la perturbation des échanges à travers les membranes cellulaires se traduisant par des modifications des réponses comportementaux et physiologiques. La symptomatologie observée est concorde les symptômes décrits par Jouglard (1977) et Bellakhdar (1997).

Elle est actuellement la base de la classification toxicologique des produits chimiques. Lorsque l'administration orale est combinée avec une administration parentérale, on obtient des informations sur la biodisponibilité du composé testé (Walum, 2016).

L'analyse des résultats obtenus montre qu'au fur et à mesure que la dose des alcaloïdes totaux de *Ruta montana* augmente, le taux de mortalité des souris mâles ou femelles augmente. Ceci a permis de déduire un effet dose-réponse de l'extrait alcaloïdique de *R. montana* sur les souris.

Les méthodes (Leichtfeld et Wilcoxon (1949), Miller et Tainter (1944), Trevan (1927) et la méthode des moindres carrés), ont permis d'obtenir des DL_{50} chez les souris mâles de 389,04 mg/kg, 331,97 mg/kg, 381 mg/kg et 388,44 mg/kg et de 225,7 mg/kg, 192,31 mg/kg, 222,24 mg/kg et 227,62 mg/kg chez les souris femelles, selon la classification de Hodge et Sterner (1949), les alcaloïdes totaux des parties aériennes de *Ruta montana* sont considérés comme un produit modérément toxique et comme un produit très toxique selon Gosselin *et al.* (1957).

Les résultats montrent la sensibilité des souris femelles aux alcaloïdes de *Ruta montana*, cette sensibilité est due probablement à une différence physiologique. Laroche *et al.* (1986), soulignent la variation de la sensibilité selon le sexe des animaux vis-à-vis d'une substance médicamenteuse donnée.

L'étude de la sensibilité du sexe, nous a permis de calculer le facteur de risque K en utilisant la DL_{84} , DL_{50} , DL_{16} et S et qui était inférieur à 0,1 ce qui indique que les alcaloïdes totaux de *Ruta montana* sont classés parmi les produits chimiques les moins toxiques à l'animal selon Yalonova (1970), alors qu'en pharmacologie il est classé comme un poison fort à l'être humain (Fabre et Truhaut, 1965).

La détermination des valeurs SR et PR et ces facteurs F_{SR} et F_{PR} respectivement d'enregistrer une différence significative en terme d'impact biologique entre les souris mâles et femelles.

Les doses comprises entre 0 et 200 mg/kg chez les souris mâles et entre 0 et 100 mg/kg chez les souris femelles ont montré une absence de mortalité. Ces doses qui apparaissent comme celles tolérées par l'organisme pourraient en conséquence être utilisées potentiellement à titre expérimentale dans une étude de toxicité aiguë où subaiguë.

Les résultats obtenus pendant la période de 14 jours qui ont suivi la première journée d'observation permettent de constater que l'extrait d'alcaloïdes totaux de *R. montana* administré en dose unique exercerait son action toxique sur une période allant de 15 minutes à 24 heures.. Au-delà de 24 heures, les souris traitées ayant survécu, rentrent dans une phase de récupération qui devient totale au bout de 48 heures. Il pourrait que la mortalité provoquée est due aux molécules mères des alcaloïdes et non à leurs métabolites. Au regard de cette observation, il apparaît que l'organisme animal a des capacités de métaboliser les alcaloïdes de la plante au bout de 48 heures soit en rendant inoffensive la substance, soit en l'éliminant entièrement par les voies d'excrétion naturelles, soit en éliminant une grande partie des

alcaloïdes, sous forme inchangées, soit en transformant les alcaloïdes en métabolites plus polaires et faciles à éliminer.

8. Toxicité aiguë chez les souris mâles et femelles

Un test de toxicité aiguë peut donner plus d'informations sur les propriétés biologiques d'un composé chimique que n'importe quel autre test (Walum, 2016). Les alcaloïdes totaux de *Ruta monataka* administré par voie IP avec la dose 129,68 mg/kg (1/3 DL₅₀) chez les souris mâles et avec la dose 75,23 mg/kg (1/3 DL₅₀) chez les souris femelles n'ont produit aucun signe de toxicité ou de décès dans les deux groupes de souris soit mâles soit femelles.

Divers paramètres sont importants dans l'évaluation de la toxicité des plantes médicinales. Ceux-ci incluent le poids corporel et la masse absolue et relative des organes avec leurs biomarqueurs respectifs et le profil hématologique (Anderson *et al.*, 1999 ; Nadir et Suat, 2007 ; Akhigbe, 2014 ; Li *et al.*, 2015).

Le foie est le carrefour beaucoup de fonctions métaboliques, le métabolisme des aliments, des médicaments et des xénobiotiques. Il est considéré comme l'organe intervenant dans la détoxification des substances toxiques endogènes ou exogènes, c'est pourquoi il est la cible de beaucoup xénobiotiques (Udem *et al.*, 2009). Parmi les paramètres mettant en évidence la teinte du foie, la fuite des enzymes cellulaires dans le plasma, quand les membranes cellulaires hépatiques sont endommagées, beaucoup d'enzymes présents naturellement dans les cellules sont libérés dans la circulation sanguine. Les transaminases ASAT et ALAT sont utilisées comme des biomarqueurs pour évaluer le degré d'altération du foie (Taj *et al.*, 2014 ; Awounfack *et al.*, 2016 ; Bashir *et al.*, 2016 ; Jacques *et al.*, 2016). L'augmentation de la phosphatase alcaline sérique indique un blocage des voies biliaires (Udem *et al.*, 2009 ; Werner et Giostra, 2013).

Les reins régulent l'excrétion de l'urée et la réabsorption des électrolytes dans le sang (Bashir *et al.*, 2016). Lors de l'évaluation de la toxicité des plantes médicinales, il est essentiel d'évaluer les fonctions rénales parallèlement aux fonctions hépatiques. Bien que de nombreux tests soient effectués pour évaluer les fonctions rénales, les tests de base rapportés régulièrement sont la clairance de la créatinine, la clairance de l'urée (Sembulingam et Sembulingam, 2010).

Dans la présente étude de la toxicité aigüe, les alcaloïdes totaux de *Ruta montana* n'ont aucun effet sur l'évolution pondéral des souris mâles ou femelles. Bien que la masse des organes soit l'un des indicateurs de toxicité par une drogue (Piao *et al.*, 2013) et peut être utilisée pour indiquer un gonflement, une atrophie ou une hypertrophie (Maina *et al.*, 2016). Des changements ont été observés chez les souris traitées mâles, une diminution significative dans la masse relatif des poumons (Après 24h et 5 jours) qui peut être due à une peroxydation lipidique ou à une oxydation des acides gras polyinsaturés dans les mitochondries ce qui conduit à la formation de peroxyde de lipide avec des dommages cellulaires (Gurr et James, 1980) ; avec une baisse significative dans la masse relative du foie (après 5 jours), cela peut être en relation avec la pression veineuse systémique accrue est reflétée par l'hypertension veineuse hépatique qui peut provoquer une atrophie des cellules hépatiques par des congestions sinusoidales selon Freedman et Keefe (2004), cette diminution est accompagnée par une diminution remarquable non significative de l'ASAT au 1^{er} jour et qui continue jusqu'à 5^{ème} jour, les modifications de l'ASAT peuvent représenter une atteinte extra-hépatique (Wilkinson, 1970).

Les coupes histologiques du foie, du rein et du cerveau des souris mâles traités dans les conditions de la toxicité aigüe avec la dose de 129,68 mg/kg (1/3 DL₅₀) montrent une surcharge hépatocytaire et congestion sinusoidale et portale dans les tissus hépatiques cela peut être due aux alcaloïdes totaux de *R. montana*, qu'ils peuvent causer des perturbations des échanges cellulaires, ces observations sont en accord avec celles de El-Agraa et ses collègues (2002), sur les chèvres mâles. *Ruta graveolens* a provoqué une vacuolisation cytoplasmique grasse des hépatocytes centro-lobulaires et une nécrose des cellules tubulaires rénales étaient significatives.

Des œdèmes cérébraux ont été observés, alors que l'architecture tissulaire des reins est conservée et aucun changement dans les indicateurs de la fonction rénale (Urée et Créatinine) n'a été enregistré.

Le système hématopoïétique est l'un des cibles les plus sensibles pour les produits chimiques toxiques et un indice important du statut physiologique et pathologique chez les humains et les animaux (Nghonjuyi *et al.*, 2016). Dans cette étude, aucune différence significative n'a été trouvée dans les paramètres hématologiques des souris mâles à la fin du traitement par rapport au groupe témoin. Ainsi, les résultats suggèrent que les alcaloïdes totaux administrés par voie

intrapéritonéale à 129,68 mg/kg n'ont aucune influence sur le système sanguin chez les souris mâles.

Les calculs des masses relatifs des différents organes chez les souris femelles traitées avec la dose de 75,23 mg/kg (1/3 DL₅₀) des alcaloïdes totaux de *Ruta montana* dans les conditions de la toxicité aiguë ont indiqué également une diminution significative de la masse relative des poumons avec une augmentation significative de la masse relative du foie après 24 heures de traitement, cela peut être due à des hémorragies associés à quelques foyers de nécroses selon Girish *et al.* (2009). Par conséquent, aucun changement dans les activités ASAT et ALP, mais il y a un changement considérable dans ALAT au premier jour qui se rétablit au 5^{ème} jour, cela est expliqué par une métabolisation et une élimination rapide des alcaloïdes administrés selon Hardman *et al.* (1998).

Les analyses hématologiques ont permis d'enregistrer une augmentation significative des globules blancs, lymphocytes, granulocytes et CCMH après 24h du traitement avec les alcaloïdes totaux de *Ruta montana* (75,23 mg/kg). Les globules blancs sont des indicateurs de la capacité à combattre les infections (Yakubu et Afolayan, 2009). Suite à l'administration d'un extrait, une augmentation du nombre de globules blancs révèle l'effet stimulant de l'extrait sur le système immunitaire et selon Shah *et al.* (1988), l'augmentation de GB indique une activité proliférative des cellules de la moelle osseuse qui peut être attribué aux tanins et aux alcaloïdes constituant la plante. Kumer *et al.* (2005), expliquent l'augmentation des basophiles après l'administration d'un extrait végétal par une activité inflammatoire de l'extrait cependant, la diminution de VGM après exposition à un produit végétal révèle le potentiel antihématique (potentiel d'induction de l'anémie) de l'extrait (Saka *et al.*, 2011), la diminution du VGM chez la souris selon Fox *et al.* (2007), est considéré également comme un indicateur d'une anémie microcytaire, cela peut être en relation avec la diminution de la masse relative des poumons ce qui entraîne une diminution des apports en oxygène, ces changements ne sont pas observés chez les souris femelles traitées et sacrifiées après 5 jours ce qui est probablement expliqué par un effet immédiat des alcaloïdes totaux de *Ruta montana* et qui disparaît après 48 heures.

L'étude histopathologique a permis d'observer chez les souris femelles des congestions rénales et des œdèmes cérébraux après le 5^{ème} jour du traitement, il est probablement dû à une perturbation des échanges cellulaires cérébraux.

Les résultats de l'étude de la toxicité aiguë n'ont montré aucun effet néfaste sur les marqueurs habituels de la toxicité hépato-rénale (ASAT, ALAT, ALP, urée et créatinine). On peut conclure que les alcaloïdes des parties aériennes de *Ruta montana* n'ont pas induit des dommages importants à ces organes chez les souris femelles ce qui est en accord avec les travaux de Mergham (2015).

9. Toxicité subaiguë chez les souris mâles et femelles

Dans l'étude de la toxicité subaiguë chez les souris *Albino swiss* mâles et femelles traités par les alcaloïdes totaux de *Ruta montana* avec la dose de 19,452 mg/kg et de 11,28 mg/kg respectivement, par simple application et par voie IP.

La carte clinique des souris mâles traitées s'est caractérisé par une perte des poiles dès la deuxième semaine, la perte des cheveux dans une étude de toxicité subchronique par voie orale c'est un indicateur d'une toxicité d'après (Adejuwon, 2014) ; l'évolution pondérale a montré une légère diminution dans la 2^{ème} et la 4^{ème} semaine chez les souris mâles et dans la 2^{ème} semaine chez les souris femelles, la réduction du poids est associée probablement à une baisse de consommation des aliments (Hispard *et al.*, 2007 ; Ige *et al.*, 2011), dans l'ensemble le poids corporel n'a pas connu de changement notable. La courbe d'évolution des poids a montré une allure similaire chez les souris traitées et témoins mâles et femelles, ce qui est en concordance avec les résultats de Merghem (2015), dans une étude chronique de l'effet de l'extrait aqueux de *Ruta montana* chez les rats.

Les résultats hématologiques montrent des changements dans les paramètres hématologiques liés à la toxicité subaiguë des alcaloïdes totaux de *Ruta montana* chez les souris mâles et femelles en comparaison avec les groupes témoins, une augmentation significative des globules rouges chez les souris mâles traitées expliquée par une déshydratation ou une diminution de l'apport d'oxygène aux tissus (Brockus et Andreasen, 2003; Misago *et al.*, 1986). En parallèle, une augmentation significative des granulocytes chez les souris femelles traitées avec la dose de 11,28 mg/kg d'alcaloïdes totaux de *Ruta montana*, d'après Ghule *et al.* (2006), dans une étude de l'effet des feuilles de *Capparis zeylanica* Linn, l'augmentation des granulocytes peut aider à augmenter l'immunité, cela peut être en relation avec l'augmentation significative enregistrée dans la masse relative de la rate. Selon Scudamore (2014), chez la souris, l'élargissement de la rate (splénomégalie) et peut indiquer un processus tumoral (souvent un lymphome, hyperplasie lymphoïde ou augmentation dans les

cellules hémopoïétiques extramédullaires (granulocytes ou des érythrocytes précurseurs) en réponse à des réactions systémiques des processus inflammatoires ou des globules rouges (en réponse à l'anémie) dans la pulpe rouge.

Le foie, il est étroitement lié à une membrane lipidique dans la zone canaliculaire, de sorte que toute interférence avec le flux biliaire, intra hépatique ou extra-hépatique, entraîne une diminution de l'activité sérique de la phosphatase alcaline (Vandenberghe, 1995). Dans la présente étude, nous avons enregistré une diminution de la phosphatase alcaline chez les souris femelles traitées avec la dose de 11, 28 mg/kg d'alcaloïdes totaux de *Ruta montana*. Selon Kumar *et al.* (2002), les dommages causés sur la membrane cellulaire entraînent une peroxydation lipidique, ce qui conduit à un déséquilibre entre la synthèse et la dégradation des protéines enzymatiques, réduisant ainsi l'activité enzymatique. Par ailleurs les autres paramètres biochimiques caractérisant la fonction rénale et hépatiques chez les souris mâles et femelles traités dans les conditions de la toxicité subaigüe n'ont pas montré de changements significatifs, ceci pourrait être due la capacité des animaux à métaboliser et à éliminer rapidement des alcaloïdes de la plante *Ruta montana* (Hardman *et al.*, 1998).

Les indicateurs de la fonction hépatique et rénale n'ont montré aucun changement, alors l'examen histopathologique des sections hépatiques, rénales et cérébrales des souris mâles et femelles a révélé des discrètes congestions hépatiques et rénales avec des œdèmes cérébraux chez les souris traitées par rapport aux témoins.

Conclusion et Perspectives

Conclusion et perspectives

A l'issue du présent travail qui représente l'étude phytochimique, pharmacologique et toxicologique de la plante *Ruta montana* L. connue sous le nom Fidjel, de la famille des Rutaceae du l'Est du l'Algérie.

- Nous sommes arrivés à des résultats qui nous ont permis l'identification des composés de types alcaloïdes, tanins, stérols, triterpènes et coumarines.
- L'analyse de la capacité antioxydante des différents extraits issus de l'espèce *Ruta montana* selon la méthode de la réduction du Fer et celle du piégeage du radical libre DPPH a montré que les extraits méthanoliques des feuilles et des graines ont des activités importantes par rapport aux alcaloïdes totaux. Les résultats du pouvoir réducteur viennent confirmer ceux du test de piégeage du radical DPPH, en effet les extraits méthanoliques présentent une capacité réductrice meilleure par rapport aux alcaloïdes totaux. Ces extraits méthanoliques pourraient donc constituer une alternative à certains additifs synthétiques. Cette activité reste néanmoins nettement inférieure à celle de l'acide ascorbique, mais il s'agit d'extraits bruts contenant un grand nombre de composés différents.
- Les alcaloïdes totaux de *Ruta montana* ont révélé un effet inhibiteur important vis-à-vis les souches bactériennes testées par rapport aux extraits méthanoliques.
- les extraits méthanoliques et les alcaloïdes totaux de *Ruta montana* ont montré une activité antifongique plus ou moins importante.
- La détermination de la DL₅₀ chez les souris mâles et femelles a permis de classer les alcaloïdes totaux de *Ruta montana* dans la catégorie des produits chimique très toxique selon Gosselin (1957) et une sensibilité liée au sexe entre les souris mâles et femelles.
- Les changements observés dans le comportement des animaux traités au cours de l'étude de la toxicité aiguë et subaiguë appelé à une étude biochimique et histologique approfondie du cerveau.
- L' étude de la toxicité aiguë et subaiguë chez les souris mâles et femelles a montré dans l' ensemble l' absence des modifications importantes des paramètres biochimiques avec la perturbation de quelques paramètres hématologiques.
- L'observation histologique s'est caractérisée par quelques modifications structurales.

Les résultats obtenus dans cette étude peuvent être approfondis par des études suivantes:

- L'isolement, caractérisation et l'identification des composés actifs par des méthodes spécifiques.
- Des études approfondies sur la pharmacocinétique et la pharmacodynamique des principes actifs seraient utiles pour la détermination des doses préventives et thérapeutiques.
- Une étude de la toxicité chronique des alcaloïdes totaux est indispensable afin d'évaluer la toxicité cumulative des substances.

Références bibliographiques

Les références

1. Abdulbasset, M. E. S et Abde Tawab, A. H. 2008. Médicinal herbal guide; Ed: Alfa Publishing, p: 428 - 429.
2. Abyshev, A. Z., Gindin, V. A., Kerimov, Y. B., Ismailov, E. S., Agaev, E. M et Isaev, N. Y.1992. Khim. Priro. Soed., (3,4), 438.
3. Adjuwon, A.A. 2014. Subchronic and Chronic Toxicities of African Medicinal Plants, in Toxicological Survey of African Medicinal Plants, p100.
4. Afonso, V., Champy, R., Mitrovic, D., Collin, P et Lomri, A. 2007. Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxyde dismutases μ rôle dans les maladies rhumatismales. Revue du Rhumatisme, 74 : 636–643.
5. Agullo, M. E., Buton, F. J. L., Gonzalez, G. A et Rodriguez, L. F. 1969. An Quim, 65(9-10), 809.
6. Akhigbe, R. E. 2014. Discordant Results in Plant Toxicity Studies in Africa: Attempt of Standardization in Toxicological Survey of African Medicinal Plants. P 54.
7. Al Qarawi, A. A. 2005. Stimulatory effect of the aqueous extract of *Ruta chalepensis* on the sex organs and hormones of male rats.J Appl Res, 5(1): 11-206.
8. Al-Farsi, M. A et Lee, C. Y. 2008. Optimization of phenolics and dietary fibre extraction from data seeds. Food Chemistry , Vol.108, n°3, pp 977-985.
9. Al-Said, M. S., Tariq, M., Al-Yahya, M. A., Rafatullah, S., Ginnawi, O. T et Ageel, A. M. 1990. J. Ethnopharmacol. 28, 305.
10. Amoen, A. 1976. *Ruta montana* L. eFlore, la flore électronique de Tela Botanica. 3: 52.
11. Andersen, O. M et Markham, K. R. 2006. Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications; Ed: CRC PRESS: Taylor & Francis, p: 1-247.
12. Anderson, H., Larsen, S., Splid, H et Christenson, N. D. 1999. Multivariate statistical analysis of organ weights in toxicity studies. Toxicology, 136:67.
13. Antov, G., Zaikov, C., Bouzidi, A., Mitova, S.,Michaelova, A., Halkova, J.et Choumkov, N. 1991. Biochemical and histological changes after acute oral poisoning with the acetanilide herbicide acetochlor. Journal de toxicologie clinique et expérimentale, 11: 349-356.
14. Aron, P. M., Kennedy, J. A. 2008. Flavan-3ols: Nature, occurrence and biological activity, Molecular Nutrition and Food Research, 52: 79-104.

15. Ashwood-Smith, M. J., Towers, G.H.N., Abramowski, Z., Poulton, G. A et Liu, M. 1982. Photobiological studies with dictamnine, a furoquinoline alkaloid. *Mutation Research*, 102, 401-412. Elsevier Biomedical Press.
16. Avril, J. L., Dabernat, H et Denis, F. 1992. *Bactériologie clinique*, 2^{ème} édition, Paris, édition Marketing, p 9 – 195.
17. Awounfack, C. F., Ateba, S. B., Zingue, S., Mouchili, O. R et Njamen, D. 2016. Safety evaluation (acute and sub-acute studies) of the aqueous extract of the leaves of *Myrianthus arboreus* P. Beauv. (Cecropiaceae) in Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 194: 169–178.
18. Baba Aissa, F. 1999. *Encyclopédie des plantes utiles : Flore d’Algérie et du Maghreb ; ed : Librairie Moderne – Rouiba*, p : 243 - 244.
19. Bafor, E. E et Igbinuwen, O. 2009. Acute toxicity studies of the leaf extract of *Ficus exasperata* on haematological parameters, body weight and body temperature. *J Ethnopharmacol*, 123:3027.
20. Bashir, L., Shittu, O. K., Oibiokpa, F. I., Mohammed, H et Umar, S. I. 2016. Antimicrobial evaluation, acute and sub-acute toxicity studies of *Allium sativum*. *Journal of Acute Disease*, 5(4): 296–301.
21. Baudin, B. 2006. Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires, *MT Cardio*, 2 (1): 43-52.
22. Belkassam, A., Zellagui, A., Gherraf, N., Lahouel, M et Rhouati. 2011. Essential oil composition of Algerian *Ruta montana* (Clus.) L. and its antibacterial effects on microorganisms responsible for respiratory infections. *Advances in Natural and Applied Sciences*, 5(3), 264-268.
23. Bellakhdar, J. 1997. *La pharmacopée marocaine traditionnelle*. Ibis Press, Paris, France, pp. 480–2.
24. Benazir, J. F., Suganthi, R., Renjini Devi, M. R., Suganya, K., Monisha, K., Nizar Ahamed, K. P et Santhi, R. 2011. Phytochemical profiling, antimicrobial and cytotoxicity studies of methanolic extracts from *Ruta graveolens*. *Journal pharmacy research*, 4 (5), 1407-1409.
25. Benbott, L., Bahri, L., Boubendir, A., Yahia, A. 2013. Study of the chemical components of *Peganum harmala* and evaluation of acute toxicity of alkaloids extracted in the *Wistar albino* mice, 4:558-565.
26. Benchaâbane, A et Abbad, A. 1997. *Les plantes médicinales commercialisées à Marrakech* ed. Info, Marrakech, pp 74.

27. Benhamou, J et Erlanger, S. 2008. Maladie du foie et des voies biliaires, 5^{ème} édition. Paris : flammariion medicine science, p 220.
28. Benkiki, N. 2006. Thèse Doctorat “Etude phytochimiques des plantes médicinales algériennes: *Ruta montana*, *Matricaria pubescens* et *Hypericum perforatum*”
29. Bennett, J. 2010. An Overview of the Genus *Aspergillus*. In M. Machida and K. Gomi (ed.), *Aspergillus Molecular Biology and Genomics*.
30. Bezanger, B. L., Pinkas, M., Torck, M. 1976. Les plantes dans la thérapeutique moderne, Maloine, Paris.
31. Bezanger, B. L., Pinkas, M., Torck, M. 1986. Les plantes dans la thérapeutique moderne, 2eme Ed.
32. Bezanger-Beauquesne, L. 1958. Les alcaloïdes dans les plantes, Bulletin de la société botanique de France, 105:5-6, 266-291, doi: 10.1080/00378941.1958.10837879.
33. Bonnier, G.1999. La Grande flore en couleur; ed : Belin; Tome 3; p:205 - 206.
34. Borges, D. J., Rodriguez, L. F., Rodriguez, U. J. C et Secundino, L. M. 1985. Latinoam. Quim., 16(1), 15.
35. Bossard, R et Cuisance, P. 1981. Arbres et arbustes d’ornement des régions tempérées et méditerranéennes, Paris, France.
36. Bossokpi I. P. L. 2003. Thèse Doctorat « Etude des activités biologiques de *Fagara zanthoxyloides* Lam (Rutaceae), p : 42.
37. Boussoualim, N. 2014. Thèse doctorat « Activités biologiques de plantes médicinales: *Anchusa azurea* Mill. et *Globularia alypum* L. ». Université Ferhat Abbas, Sétif-1.
38. Boyd, E. M. 1959. The acute oral toxicity of acetylsalicylic acid. Tozicot and Appl, Pharmacol. 1:229.
39. Brockus, C. W et Andreasen, C. B. 2003. Erythrocytes, In Duncan and Prasse’s veterinary laboratory medicine: clinical pathology, 4th ed, Latimer, K.S., Mahaffey, E.A., Prasse, K.W., eds., pp. 3–45. Iowa State Press, Ames, IA.
40. Brown, A. L. 1931. An analysis of he developing metanephros in mouse embryos with abnormal kidneys. Amer. J. Anat. 47: 117-172.
41. Bruneton, J. 1987. Eléments de Phytochimie et de Pharmacognosie, Technique et documentation Lavoisier, Paris, 373.
42. Bruneton, J. 1999. Pharmacognosie, photochimie des plantes médicinales, 3éme Ed., Technique et documentation. Lavoisier, Paris 230, p 647- 1120.
43. Burgess, L. W et Liddell, C. M. 1983. Laboratory manual,for *Fusarium* research. Australia: the university of sydney.
44. Carter, T. C. 1954. The genetics of luxate mice. IV. Embryology. J. Geent, 52: 1-35.

45. Casin, I., Brisabois, A., Berger, N., Breuil, J et Collatz, E. 1996. Phenotypes et genotypes de résistance de 182 souches de *Salmonella* serotype typhimurium résistances à l'ampicilline d'origine humaine et animale. *Med Mal Infect*, 26: 426-30.
46. Cheng, J. T., Chang, S. S et Chen, IS. Cardiovascular effect of skimmianine in rats. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1990; 306:65–74.
47. Choi, Y. M., Noh, D. O., Cho, S. Y., Suh, H. J., Kim, K. M et Kim, J. M. 2006. Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *LWT*. 39:756-761.
48. Christophe, P., Christophe, S. 2011. *Physiologie, pathologie et thérapie de la reproduction chez l'humain*, Edition Springer, p 84.
49. Claisse, R. 1993. *Plantes à usage dermatologique de la pharmacopée traditionnelle marocaine. Médicaments et aliments .l'approche ethnopharmacologique.*
50. Clevely, A et Richmond, K. 1997. *Plantes et herbes aromatiques, connaître et préparer*, Larousse Paris.
51. Collin, F. 2012. *Tela-botanica*.
52. Courvalin, P., Leclercq, R et Bingen, E. 2006. *Antibiogramme*, 2e Éd, ESKA.
53. Cousin, P. 1999. *La Grande Encyclopédie De La Nature*, Ed., Bordas, Paris / Montréal, p 216.
54. Cox Gad, S. 2016. *Animal models in toxicology*; 3rd edition, International Standard Book Number-13: 978-1-4665-5429-0, p 24.
55. Custodio, J. M., Wu, C. Y et Benet, L. Z. 2008. Predicting drug disposition, absorption/elimination/transporter interplay and the role of food on drug absorption. *Advanced drug delivery reviews*, 60 : 717-733.
56. Dall'Acqua, F et Martelli, P. 1991. Photosensitizing action of furocoumarins on membrane components and consequent intracellular events. *J Photochem Photobiol B* 8: 235–54.
57. 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, 7 (3), 926-935.
58. Dardalhon, M., Massy, B., Nicolas, A et Averbek, D. 1998. Mitotic recombination localized DNA double-strand breaks are induced after 8-methoxypsoralen and UVA irradiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*, 34: 30–42.
59. De Freitas, T. G., Augusto, P. M et Montanari, T. 2005. Effect of *Ruta graveolens* L. on pregnant mice. *Contraception* 71 (1): 74–7.

60. De Sousa, R. C et Baertschi, A. J. 2002. Transport membranaire.
61. Delattre, J., Beaudoux, J. L et Bonnefont- Rousselot, D. 2005. Radicaux libres et stress oxydant, aspects biologiques et pathologiques, p 1- 23, p 87-108.
62. Denoël, A. 1958. Matière médicale végétale (pharmacognosie). Presses Universitaires de Liège, 2^{ème} ed., T1, p : 481.
63. Djarri, L., Ferhat, M., Merabet, G., Chelghoum, A., Laggoune, S., Semra, Z., Smati, F et Kabouche, Z. 2013. Composition and antibacterial activity of the essential oil of *Ruta montana* from Constantine (Algeria). Scholars Research Library Der Pharmacia Lettre , 5 (4):70-73.
64. Dobsons, S. 2000. Gyogyszert, 44(4), 244.
65. Doerper, S. 2008. Thèse Doctorat « Modification de la synthèse des furocoumarines chez *Ruta graveolens* L. par une approche de génie métabolique », p: 39-41.
66. Duke, A. J., Duke, P. A. K et Ducellie, J. L. 2008. Duke's handbook of medicinal plants of the bible, p: 394– 398.
67. Duke, A. J., Duke, P. A. K et Ducellie, J. L. 2008. Duke's Handbook of Medicinal Plants of the Bible, Ed: CRC Press, p: 394 – 397.
68. Dunn, T.B. 1949. Some observations on the normal and pathological anatomy of the kidney of the mouse. J. Nat. Cancer Inst. 9: 285-301.
69. Eaton, D. L et Klaasen, C. D. Principles of toxicology. In: Klaasen CD, editor. Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons. New York, NY: McGraw-Hill. 2001. P 1134.
70. Eilert, U., Wolters, B., Nahrstedt, A et Wray, V. 1982. Z. Naturforsch, 37(1-2), 132.
71. Ekiert, H et Kisiel, W. 1997. Acta Soci Bot Pol, 66(3-4), 329.
72. El Agraa, S. E., El Badwi, S.M et Adam, S. E. 2002. Preliminary observations on experimental *Ruta graveolens* toxicosis in Nubian goats. Trop Anim Health, 34:271– 281.
73. El Haji, M. 1995. Thèse doctorat « Contribution à l'étude des plantes toxiques médicinales dans les régions Nord du Maroc (Provinces de Tanger, Tétouan et Chefchaouan), p : 275.
74. El-Demerdash, F. M., Dewar, Y., Elmazoudy, R. H et Attia, A. 2013. Kidney antioxidant status, biochemical parameters and histopathological changes induced by methomyl in CD1mice. Experimental and Toxicological Pathology, p 65: 897-901.
75. El-Sayed, K., Al-Said, M.S., El-Ferally, F.S et Ross, S.A. 2000. J. Nat. Prod., 63(7), 995.

76. Fabre, R et Truhaut. 1965. Précis de toxicologie. Tome II. Société d'édition d'enseignement supérieur, Paris, pp. 446-454.
77. Fakhfakh, N., Zouari, S., Zouari, M., Loussayef, C et Zouari, N. 2012. Journal of Medicinal Plants Research, 6(4), 593-600, doi: 10.5897/jmpr11.1121.
78. Farnsworth, N. R. 1966. Journ. of Pharm. Sci, 55, 225.
79. Fattorusso, E et Tagliatela-Scafati, O. 2008. Modern alkaloids, structure, isolation, synthesis and biology, p15.
80. Favier, A. 2003. Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique, l'actualité chimique, p 108-115.
81. Fellah, S., Romdhane, M., Abderraba, M. 2006. J Société Algérienne de Chimie. 16, p 193.
82. Fisher, N. L., Burgess, L. W., Toussoun, T. A et Nelson, P. E. 1982. Carnation leaves as a substrate and for preserving cultures of *Fusarium* species. Phytopathology, 72: 151-153.
83. Flandrois, J. P. 1997. Bactériologie Médicale. Lyon: Presses Universitaires de Lyon, p 107 - 180.
84. Forgacs, P., Jacquemin, H., Moretti, C., Provost, J et Touche, A. 1983. Etudes phytochimiques et activités biologiques de 18 plantes de la Guyane Française., Plantes médicinales et phytothérapie Toine XVII, n I, p. 22-32.
85. Forment, M et Roques, H. 1941. Répertoire des plantes médicinales et aromatiques d'Algérie, Ed. Ofalac, p: 59.
86. Fouin-Fortunet, H., Tinel, M., Descatoire, V *et al.* 1986. Inactivation of cytochrome P-450 by the drug methoxsalen. J Pharmacol Exp Ther, 236: 237-47.
87. Fournier, P. 1948. Les plantes médicinales et vénéneuses en France. Ed Paul Lechvalier, tome III, Paris, p : 356-361.
88. Fox, J. G., Barthold, S. W., Davisson, M. T., Newcomer, C. E., Quimby, F. W et Smith, A. L. 2007. The Mouse in Biomedical Research (Normative biology, Husbandry and Models), 3^{ème} édition, p 161-169.
89. França Orlanda, J. F et Nascimento, A. R. 2015. Chemical composition and antibacterial activity of *Ruta graveolens* L. (Rutaceae) volatile oils, from São Luís, Maranhão, Brazil. South African Journal of Botany, 99 , 103-106.
90. Franceschini, P. 1994. La peau et son vieillissement. Ed Flammarion Dominos, Paris, p125.

91. Friedman, S. L et Keeffe, B. E. 2004. Handbook of liver disease second edition , p 1-8.
92. Frith, C. H et Ward, J. M. 1988. Color atlas of neoplastic and non-neoplastic lesions in aging mice. Elsevier, Amsterdam.
93. FrontQuer, P. 1962. Plantes médicinales el discorides renovado, Ed Hebon S.A Barcelona, 426.
94. Furniss, D et Adams, T. 2007. Herb of Grace: an unusual cause of phytophotodermatitis mimicking burn injury. J Burn Care Res, 28 (5): 9-767.
95. Gaté, L., Paul, J., Ba, G. N., Tew, K. D et Tapiero, H. 1999. Oxidative stress induced in pathologies: The role of antioxidants, Biomed Pharmacother, 53(4):169-180.
96. Gbadoé, A. D., Lawson-Evi, K., Dagnra, A. Y., *et al.* 2008. Les salmonelloses chez l'enfant au CHU Tokoin de Lomé (Togo). Med Mal Infect, 38:8–11.
97. Ghule, B. V., Muruganathan, G., Nakhat, P. D et Yeole, P. G. 2006. Immunostimulant effects of *Capparis zeylanica* Linn. Leaves. Journal of Ethnopharmacology, 108 , p 311–315.
98. Gijon, E., Cartas, L., Lorenzana-Jimenez, M et Garcia, X. 1995. Immobilization of frog sperm by exposure to *Ruta chalepensis* extract. Proc West Pharmacol Soc, 38: 53–4.
99. Gilbert, V. 2003. Anatomie du foie et du pancréas, p 99-107.
100. Girish, C., Koner, B. C., Jayanthi, S., Rao, K. R., Rajesh, B et Pradhan, S. C. 2009. Hepatoprotective activity of six polyherbal formulations in paracetamol induced liver toxicity in mice. Indian J Med Res 129, pp 569-578.
101. Gosselin, R. E., Smith, R. P et Hodge, H. C. 1957. Clinical Toxicology of Commercial Products. Williams and Wilkins Baltimore, London, United Kingdom.
102. Goudable, J et Favier, A. 1997. Radicaux libres oxygénés et antioxydants. Nutrition clinique et métabolisme, 11,115-120.
103. Gurr, M. I et James, A.T. 1980. Lipid biochemistry. 3rd ed. New York, NY: Sciences Publisher, p. 230.
104. Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C et Chapelle, J. P. 2007. Le stress oxidant, Rev Med Liege, 62(10):628-638.
105. Hammiche, V et Azzouz, M. 2013. Les rues « ethnobotanique, phytopharmacologie et toxicité », phytothérapie 11 : 22-30.
106. Hammiche, V., Merad , R et Azzouz, M., 2013. Plantes toxiques à usage médicinal du pourtour méditerranéen, Springer, p 212.

107. Harat, Z. N., Sadeghi, M. R., Sadeghipour, H. M *et al.* 2008. Immobilization effect of *Ruta graveolens* L. on human sperm: a new hope for male contraception. *J Ethnopharmacol*, 115(1–4): 36–41.
108. Hardman, J.G., Limbird, L.E., Molinoff, P.B., Ruddon, R.W et Gilman, A.G. 1998. Les bases pharmacologiques de l'utilisation des médicaments. 9ème éd. McGraw-Hill, London.
109. Hatzidimitriou, E, F., Nenadis, N., Tsimidou, M, Z., 2007. Changes in the catechin and epicatechin content of grape seeds on storage under different water activity (aw) conditions. *Food Chemistry*, 105: 1504-1511.
110. Hedrich, H. 2012. The laboratory mouse, Academic press, Elsevier Ltd, p187.
111. Heywood, V.H. 1996. Les plantes à Fleurs, Ed. Nathan, Paris.
112. Hirose, K., Tamura, K., Sagara, H., *et al.* 2001. Antibiotic susceptibilities of *Salmonella enterica* Serovar Typhi and *S. enterica* Serovar Paratyphi A isolated from patients in Japan. *Antimicrob Agents Chemother*, 45:956–8.
113. Hispard, F., Vaufleury, A., Martin, H., Devaux, S., Cosson, R. P et Scheifler, R, *et al.* 2007. Effects of subchronic digestive exposure to organic or inorganic cadmium on biomarkers in rat tissues. *Ecotox Environ Safe*, 24:4550.
114. Hodge, A. C et Sterner, J. H. 1980. Etudes de toxicité: quelques données fondamentales (Done A.K). *Tempo Médical Afrique* N°7.
115. Hoffmann, D. 2003. *Materia medica*. In: *Medical herbalism: the science and practice of herbal medicine Canada: Haling Art Press*, p 579.
116. Hooper, D. C. 1995. Quinine Mode of Action *Drugs*49 (Suppl. 2): 10-15.
117. Ige, S.F., Akhigbe, R. E., Edeogho, O., Ajao, F.O., Owolabi, O. Q., Oyekunle, O. S., *et al.* 2011. Hepatoprotective activities of *Allium cepa* in cadmium-treated rats. *Int J Pharm Pharm Sci*, 3:603.
118. Jacques, D. T., Kpodekon, T. M., Houessionon, M. J et Kiki, S. P. 2016. Histological and biochemical evaluations of the liver and kidney of Wistar rats fed with fish meal of *Sarotherodon melanotheron* captured with *Tephrosia vogelii*'s powder. *African journal of biotechnology*, 15(11): 417-422.
119. Jouglard, J. 1977. Intoxications d'origine végétale. *Encyclopédie médicochirurgicale*, 16065 A20-6, Paris.
120. Kabir, S. M. L. 2010. Avian Colibacillosis and Salmonellosis: A Closer Look at epidemiology, pathogenesis, diagnosis, control and public health concerns international.

121. Kabouche, Z., Benkiki, N., Seguin, E et Bruneau, C.2003. A new dicoumarinyl ether and two rare furocoumarins from *Ruta montana*. *Fitoterapia*, 74: 194–196.
122. Kambouche, N., Merah, B., Bellahouel, S., Bouayed, J., Dicko, A., Derdour, A., Younos, C et Soulimani, R. 2008. Chemical composition and antioxidant potential of *Ruta montana* L. essential oil from Algeria. *J Med Food*.11(3):593-5. doi: 10.1089/jmf.2007.0515.
123. Kennedy, J. G. L., Ferenz, R. L et Burgess, B. A. 1986. Estimation of acute toxicity in rats by determination of the approximate lethal dose rather than the LD₅₀. *J Appl Toxicol*, 6 (3):1458.
124. Khlifi, D., Sghaier, R. M., Amouri, S., Laouini, D., Hamdi, M et Bouajila, J. 2013. *Food Chem Toxicol.*, 55, 202-8, doi: 10.1016/j.fct.2013.01.004.
125. Khouri, N. A et El-Akawi, Z. 2005. Antiandrogenic activity of *Ruta graveolens* L. in male *Albino* rats with emphasis on sexual and aggressive behavior. *Neuro Endocrinol Lett*, 26(6): 9-823.
126. Klervi, L.L. 2005. Connaissance chimiotaxonomique du genre *Turbinaria* et étude des composés de défense de différents espèces de Sargassacées des Iles Salmon (Pacific sud). 210p.
127. Knoblauch, S., Randolph Habecker, J et Rath, S. 2011. Necropsy and histology, in *Comparative anatomy and histology: A Mouse and Human Atlas* (eds P.M. Treuting and S. Dintzis), Elsevier, Amsterdam, p 15–41.
128. Kowalewski, Z et Pasich, B.1967. *Ann.Pharm.*, 635.
129. Kriz, W., Bankir, L. 1998. A standard nomenclature for structures of the kidney. *Am J Physiol*; 254:F18.
130. Kuete, V. 2014. Toxicological survey of African medicinal plants, page 47.
131. Kuffner, F., Nikiferov, A et Schulz, G. 1973. *Montash. Chem.*, 104(4), 911.
132. Kumar, V., Abbas, A. K et Fausto, N. 2005. Acute and chronic inflammation. *Robbins and cotran pathologic basis of disease*. 7th ed. Elsevier, Saunders.
133. Kybal, J. 1987. *Plantes aromatiques et culinaires*. Gründ ed., Paris, p : 172.
134. Lahsissen, H., Kahouadji, A., Tijan, M et Hseini, S. 2009. Catalogue des plantes médicinales utilisées dans la région de Zaër (Maroc occidental). *Revue De Botanique-Nouvelle série* N° 186-2.
135. Laroche, M. J., Fabiani, P et Rousselet, F. 1986. *L'expertise toxicologique des médicaments*. Edition masson, Paris, p 367.
136. LE Moine, E. 2001. *Les Plantes : Aromatiques et Médicinales*; Ed : Moliere (Paris), p : 92.

137. LeCluyse, E. L., Witek, R. P., Andersen, M. E et Powers, M. J. 2012. Organotypic liver culture models: meeting current challenges in toxicity testing. *Critical reviews in toxicology*, 42: 501-48.
138. Lehucher-Michel, M. P., Lesgards, J. F., Delubac, O., Stocker, P., Durand, P et Prost, M. 2001. Stress oxydant et pathologies humaines, *la presse médicale*, 30: 1076-1081.
139. Lemery, N. 1732. *Traité universel de drogues simples, mise en ordre alphabétique*, 4^{ème} édition, p : 734-735.
140. Leveau, S. B et Bouix, M. 1993. Les microorganismes d'intérêt industriel, *Lavoisier Apria*, p 110-163.
141. Lewis, K et Ausubel, F. M. 2006. Prospects for plant derived antibacterials. *Nature Biotechnology*, 24 (12), p 1504-1507.
142. Li, F., He, X., Niu, W., Feng, Y., Bian, J et Xiao, H. 2015. Acute and sub-chronic toxicity study of the ethanol extract from leaves of *Aralia elata* in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 175: 499–508.
143. Li, H. B., Cheng, K. W., Wong, C. C., Fan, K, W., Chen, F et Jiang, Y., 2007. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae; *Food chemistry* 102, p 771-776.
144. Litchfield, J. J., Wilcoxon, F. 1985. A simplified method of evaluating dose effective experiment. In Kalayanova. Sofia.
145. Logan, N. A et Rodriguez-Diaz, M. 2006. *Bacillus spp.* and Related Genera. In S. H. Gillespie, P. M. Hawkey (Eds.), *principles and practice of clinical bacteriology*, 2nd ed., pp. 139-158.
146. Loichot, C et Grima, M. 2004. Métabolisme des médicaments.
147. Maina, E. N., Kinyi, H. W., Ochwang'I, D. O., Meroka, A. M et Wanyonyi, W C. 2016. Liver toxicity of Crude extract of *Ficus natalensis* traditionally used in South Western Uganda. *African Journal of Pharmacology and Therapeutics*, 3 (4):116-121.
148. Majhenic, L., Skerget, M et Knez, Z. 2007. Antioxidant and antimicrobial activity of Guarana seed extracts. *Food Chemistry*, 104.,1258–1268.
149. Mansouri, A., Guendez, E., Kokkalou, E et Kefalas, P. 2005. Phenolic profile and antioxidant activity of Algerian ripe date palm (*Phoenix dactylifera*). *Food.Chem*, 89:411-420.
150. Marshall, W. J et Bangert, S. K. 2005. *Biochimie médicale : Physiopathologie et diagnostic*. P 59.

151. Martel, J. L., Chaslus-Dancla, E., Coudert, M., Lafont, J. P. 1996. Evolution de la sensibilité aux antibiotiques des salmonelles d'origine bovine en France. *Med Mal Infect*, 26: 415-9.
152. Martin, E et Feldmann, G. 1983. Histopathologie du foie et des voies biliaires de l'adulte et de l'enfant. Ed. Masson, p 64,157-166.
153. Martinez, S. M. T. 2004. Thèse Doctorat « Valorisation d'hydrolysats de co-produits de crevettes :étude de l'activité antiradicalaire et antioxydante, fractionnement des substances actives et effet de la glycation », p 188.
154. Médart, J. 2009. Manuel pratique de nutrition: L'alimentation préventive et curative. Editions De Boeck Supérieur, p 49.
155. Mena, S., Ortega, A., Estrela, J. M. 2009. Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis, *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 674(1-2): 36-44.
156. Merghem, M. 2015. Thèse doctorat «Evaluation of toxicity in mice and rats and antioxydant activities of *Ruta montana* L. extracts ». Université Ferhat Abbas-Sétif-1.
157. Messiaen, C.M., Blancard, D., Rouxel, F et Lafon, R. 1991. Les maladies des cultures maraichères, 3^{ème} édition. INRA. Paris (FR).
158. Mester, I. 1983. Structural diversity, distribution of alkaloids in the Rutales in: chemistry, chemical taxonomy of the Rutales, London Academic Press, 31-96.
159. Meyer, C. 2016. Dictionnaire des sciences animales, Cirad, Montpellier, France.
160. Miller, L. C et Tainter, M. L.1944. Estimation of DL₅₀ and its Error by means of Logarithmic Probit Paper. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 57: 261–264.
161. Miller, P. 1785. Dictionnaire des jardiniers, ouvrage traduit de l'Anglais sur la huitième édition, p 410-411.
162. Minker, E., Csilla, B., Zsuzanna, R et Reisch, J. 1979. *Planta Med*, 37, 156.
163. Misago, M., Chiba, S., Kikuchi, M., Tsukada, J et Suzuki, H. 1986. Effect of absolute and relative changes of hematocrit on erythropoiesis in mice, *Int J Cell Cloning* 4, 320–330.
164. Mohamed Said Al-Hadhami, R., Amzad Hossain, M. 2016. Evaluation of antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of seeds crude extracts of *Ammi majus* growth in Oman. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, 3, 329-334.
165. Mohr, N., Budzi, K. H et El-Tawil, B. A. H. 1982. *Phytochemistry*, 7(9), 1838.

166. Muanda, F. N. 2010. Thèse doctorat « Identification de polyphenols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques », p 92.
167. Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Landry, M. L et Pfaller, M. A. 2007. *Manual of Clinical Microbiology* (9th ed.). American society of microbiology press.
168. Nadir, R et Suat, E. 2007. Oral administration of lycopene reverses cadmium-suppressed body weight loss and lipid peroxidation in rats. *Biol Trace Elem Res*, 118:17583.
169. Nauciel, C et Vildé, J. L. 2009. *Bactériologie Médicale*, 2ème édition Masson.
170. Naudot, M. 2013. Thèse doctorat « Caractérisation par imagerie en temps réel de cultures cellulaires hépatiques en biopuces mic rofluidiques », p23.
171. Nghonjuyi, W., Tiambo, C. K., Taiwe, G. S., Toukala, J. P., Lisita, F., Juliano, R. S et Kimbi, H. K. 2016. Acute and sub-chronic toxicity studies of three plants used in Cameroonian ethnoveterinary medicine: *Aloe vera* (L.) Burm. f.(Xanthorrhoeaceae) leaves, *Carica papaya* L. (Caricaceae) seeds or leaves, and *Mimosa pudica* L. (Fabaceae) leaves in Kabir chicks Ndaleh. *Journal of Ethnopharmacology*, 178: 40–49.
172. Nicklin, J., Graeme-Cook, K., Paget, T et Killington, R. 2000. *L'essentiel en microbiologie*, Berti, Paris, p 210-216.
173. Nieschulz, O. 1996. *Sci Pharm Proc*, 559.
174. Normak, H. B et Normak, S. 2002. Evolution and spread of antibiotic resistance . *Journal of Internal Medicine*, Vol. 252, n°2, pp.91-106.
175. North-Lewis, P. 2008. *Drugs and the liver (A guide to drug handling in the liver dysfunction)*. Pharmaceutical Press, p 75-80.
176. Novak, I., Buzas, G., Minker, E., Kolttai, M et Szendrei, K. 1967. *Acta. Pharm. Hung*, 37(3), 131.
177. Novelli, G. P. 1997. Role of free radicals in septic shock. *J. Physiol. Pharmacol*, 48: 517-527.
178. Oliva, K. M., Meepagala, D. E., Wedge, D., Harries, A. L., Hale, G., Aliotta, S et Duk, O. 2003. Natural Fungicides from *Ruta graveolens* L. Leaves, Including a New Quinolone Alkaloid. *J. Agri. Food Chem.* 51 (4), 890-896.
179. Organisation for Economic Cooperation and Development. *Guideline for testing of chemicals. OECD TG 425. Acute oral toxicity-revised up and down procedure*. Paris : OECD. 2001.
180. Ouerghemmi, I., Bettaieb Rebey, I., Rahali, F. Z., Bourgou, S., Pistelli, L., Ksouri, R., Marzouk, B et Saidani Tounsi, M. 2016. Antioxidant and antimicrobial

- phenolic compounds from extracts of cultivated and wild-grown Tunisian *Ruta chalepensis*. Journal of Food and Drug Analysis, XXX 1-10.
181. Ozenda P. 2000. Les Végétaux : Organisation et diversité biologique, Ed. Dunod, p 425.
 182. Ozenda, P. 1991. Flore et végétation du Sahara. 3rd Edition. Centre National de la Recherche Scientifique (C.N.R.S), Paris.
 183. Palmer, K. H. 1956. Thèse doctorat « Recherches sur Quelques Rutaceae à Alcaloïdes ». Faculté de Pharmacie de Paris, Paris.
 184. Pandey, P., Mehta, A., Hajra, S., John, J et Mehta, P. 2011. Antioxidant property, total Phenolic content and inhibition of α -amylase activity of *Ruta graveolens* L. leaves extract. J. Pharm. Res, 4: 1735-1737.
 185. Papazian, L., Roch, A. 2008. Le syndrome de détresse respiratoire aiguë, édition Springer, p 153.
 186. Pathak, M. A et Fitzpatrick, T. B. 1992. The evolution of photochemotherapy with psoralens and UVA (PUVA): 2000 BC to 1992 AD. J Photochem Photobiol B, 14: 3–22.
 187. Paulini, H et Schimmer, O. 1989. Mutagenicity testing of rutacridone epoxide and rutacridone, alkaloids in *Ruta graveolens* L., using the Salmonella/microsome assay. Mutagenesis, 4(1): 45–50.
 188. Paulini, H., Popp, R et Schimmer, O, *et al.* 1991. Isogravacridonchlorine: a potent and direct acting frameshift mutagen from the roots of *Ruta graveolens*. Planta Med, 57: 59–61.
 189. Pavlović, D. R., Vukelić, M., Najman, S., Kostić, M., Zlatković, B., Mihajilov-Krstev, T et Kitić, D. 2014. Assessment of polyphenol content, *in vitro* antioxidant, antimicrobial and toxic potentials of wild growing and cultured rue Journal of Applied Botany and Food Quality 87, 175 – 181, DOI:10.5073/JABFQ.2014.087.025.
 190. Pelletier, S. W. 1983. Alkaloids, Chemical , Biological Perspectives, Ed. John Wiley, New York.
 191. Pfyffer, G. E et Towers, G.H.N. 1982. Photochemical interaction of dictamnine, a furoquinoline alkaloid, with fungal DNA *in vitro* and *in vivo*. J. Microbiol. 28: 468-473.
 192. Phillipson, J. D., Roberts, M. F., Zenk, M. H. 1985. The Chemistry, Biology of Isoquinoline Alkaloids, Springer Verlag, Berlin.

193. Piao, Y., Liu, Y et Xie , X. 2013. Change Trends of Organ Weight Background Data in Sprague Dawley Rats at Different Ages. *Journal of Toxicologic Pathology*, 26: 29–34.
194. Pokorny, J., Yanishlieva, N et Gordon, M. 2001. Antioxydants in food, Practical applications. Woolhead Publishing Limited. ISBN: 185573-463X.
195. Pollio, A., De Natale, A et Appetiti, E., 2008. Continuity and change in the mediterranean medical tradition: *Ruta* spp. (Rutaceae) in Hippocratic medicine and present practices. *J Ethopharmacol* 116: 82-469.
196. Ponce, A. G., Fritz, R., Del Valle, C et Roura, S. I. 2003. *J. Lebensm.-Wiss. u.-Technol*, 36: 679-684.
197. Ponce, A. G., Fritz, R., Del Valle, C. E. et Roura, S. I. 2003. Antimicrobial activity of essential oils on the native microfora of organic Swiss chard. *Lebensmittel-Wissenschaft und - Technologie*, 36: 679-684.
198. Popoff, M. Y., Bockemuhl, J et Gheesling, L. L. 2004. Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann-White scheme, *Res Microbiol* 155, 568-570.
199. Quezel, P et Santa, S. 1963. Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertique méridionales. CNRS, Paris.
200. Rachel, T. 2009. Pharmacist, Bpharm, Msc Unité Hospitalière De Recherche Et d'enseignement VIH/Sida Centre Hospitalier De l'Université De Montréal.
201. Rajbhandari, M et Schopke, T. 1999. Antimicrobial activity of some Nepalese.
202. Randhawa, M. A. 2009. Calculation of LD₅₀ values from the method of Miller and Tainter, 1944, *J Ayub Med Coll Abbottabad*, 21(3).
203. Rasooli, I., Fakoor, M. H., Yadegarinia, D., Gachkar, L., Allameh, A et Rezaei, MB. 2008. *Food Chem*, 135-140.
204. Reed, G. 1994. Foodborne illness (Part 4): *Bacillus cereus* gastroenteritis. *Dairy, Food and Environmental Sanitation* 14 (2), 87.
205. Reish. J., Szendrei, K., Minker, E et Novak, I. 1967. *Acta. Pharm. Suic.*, 4(4), 265.
206. Rhayour, K. 2002. Thèse de doctorat « Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Esherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum* ».
207. Richter, G. 1993. Métabolisme des Végétaux, Physiologie et Biochimie 5^{ème} Ed. Lausanne, 339.
208. Roelandts, R. 1984. Mutagenicity and carcinogenicity of methoxsalen plus UV-A. *Arch Dermatol*, 120: 9-662.

209. Rouas, C. 2010. Thèse doctorat « Etude des mécanismes mis en jeu lors d'une exposition à l'Uranium appauvri sur le système de détoxification *in vivo* et *in vitro* », p 60.
210. Rubin, M. 1988. Que Sais-Je? Phytothérapie, 1ere Ed., Presses universitaires de France.
211. Ruehl-Fehlert, C., Kittel, B., Morawetz, G., *et al.* 2003. Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice – Part 1. Experimental and Toxic Pathology, 55, 91–106.
212. Rytand, D. A. 1938. The number and size of mammalian glomeruli as related to kidney and body weight, with methods for their enumeration and measurement. Amer. J. Anat, 62: 507-520.
213. Saka, W.A., Akhigbe, R. E., Azeez, O. M., Babatunde, T. R. 2011. Effects of pyrethroid insecticide exposure on haematological and haemostatic profiles in rats. Pak J Biol Sci, 14:10247.
214. Salah, N., Miller, N. J., Paganga, G., Tijburg, L., Bolwell, G. P et Rice-Evans, C, A., 1995. Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. Archives of Biochemistry and Biophysics. 339-346.
215. San Miguel, E. 2003. Rue (*Ruta L.*, Rutaceae) in traditional Spain: frequency and distribution of its medicinal and symbolic applications. Economic Botany 57(2): 231-244.
216. Satrani, B; Farah, A; Fechtal, M; Blaghen, M et Chaouch, A. 2001. Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Satureja calamintha* et *Satureja alpina* du Maroc. ANN. FAIS. EXP. CHIM. 94(956) :241-250.
217. Schemmer, O et Leismester, U.1989. Mutagenesis, 467.
218. Scudamore, C. L. 2014. A Practical Guide to the Histology of the Mouse, p 11-12.
219. Scudamore, C. L. 2014. A Practical Guide to the Histology of the Mouse, p 10.
220. Seifried, H. E., Anderson, D. E., Fisher, E. I et Milner, J. A., 2007. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species, J Nutr Biochem, 18(9):567-579.
221. Sembulingam, K et Sembulingam, P. 2010. Essentials of medical physiology. 5th ed. New Delhi, India: Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd.
222. Sener, B et Mutlugil, A.1985. Gazi Univ., Eczacilik Fak. Dergisi, 2, 109.
223. Sepulveda, A. J., Viguera, L. J et Sanchez, P. J. 1974. An Quim., 70(12), 1022.

224. Serghat, S., Mouria, A., Ouazzani, T., Badoc, D. 2004. Eeffet de quelques fongicides sur le développement in vitro de *Pyricularia grisea* et *Helminthosporium oryzae* bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 143, 7-18.
225. Shah, A. H., Qureshi, S., Tariq, M et Ageel, A. M. 1989. Toxicity Studies on Six Plants Used in the Traditional Arab System of Medicine, *Phytotherapy Research*, Vol. 3, No. 1, p 29.
226. Shitara, Y., Horie, T et Sugiyama, Y. 2006. Transporters as a determinant of drug clearance and tissue distribution. *European journal of pharmaceutical sciences*, 27 : 425-46.
227. Sokmen, A., Gulluce, M., Askin Akpulat, H., Daferera, D., Tepe, B., Polissiou, M., Sokmen, M et Sahin, F. 2004. The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. *Food Control*, 15: 627-634.
228. Sokol-Letowska, A., Oszmiansk, J et Wojdylo, A. 2007. Antioxydant activity of the phenolic compounds of Hawthorn, pine and skullcap. *Food chemistry*, 103:853-859.
229. Somboro, A. A. 2010. Thèse doctorat.
230. Steck, W., Bailey, B. K., Shyluk, J. P et Gamborg, O. L. 1971. Coumarins and alkaloids from cell cultures of *Ruta graveolens*. *Phytochemistry*, 10, 191-194.
231. Suhaj, M. 2006. Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: à review. *Jornal of food Composition and analysis*, 19 (6-7), 531-537.
232. Szymanowicz, A et Danel, V. 2005. Toxicological biomarkers in acute intoxications. *Immuno-analyse et Biologie Spécialisée*, 20: 144-160
233. Taj, D., Khan, H., Sultana, V et Ara, J., et Ehteshamul-Haque, S. 2014. Antihepatotoxic effect of golden berry (*Physalis peruviana* Linn.) in carbon tetrachloride (CCl4) intoxicated rats. *Pak. Journal of Pharmacology Science*, 27 (3): 491-494.
234. Takhtajan, A. 2009. *Flowering Plants*; Ed 2: Springer; p: 33 - 41, 375.
235. Tamokou, J. D et Kuete, V. 2014. Toxic plants used in African traditional medicine in *Toxicological Survey of African Medicinal Plants*, p137.
236. Targant, H. 2010. Thèse Doctorat « L'îlot de multirésistance aux antibiotiques, *Salmonella* Genomic Island 1 (SGI1) : variabilité, diffusion inter -espèces et implication dans la virulence ».

237. Tegos, G., Stermitz, F. R., Lomovskaya, O et Lewis, K. 2002. Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46 (10), p 3133-3141.
238. Thaipong, K., Boonprakoba, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L et Hawkins B. D. 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J Food Compos Anal*, 19:669-675.
239. Thielens, A. 1862. *Flore medicale Belge*, p 255-256.
240. Thierry, S. 2011. Thèse doctorat « Etude de la diversité génétique et du pouvoir pathogène d'*Aspergillus fumigatus* et de *Chlamydomphila psittaci* chez les oiseaux ».
241. Toker, G., Turkoz, S et Erdemoglu, N. 1998. *J. Nat. Prod.*, 20(4), 240.
242. Tome. 1999. *Toxicologie*. 2^{ème} édition, p 61-66.
243. Touati, D., Rahmanb, A et Ulubelen, A. 2000. Alkaloids from *Ruta montana*. *Phytochemistry*, 53 (2) , 9-277.
244. Udem, S.C., Obidoa, O et Asuzu, I.U. 2009. Acute and chronic toxicity studies of *Erythrina senegalensis* DC stem bark extract in mice. *Comparative Clinical Pathology*, 19: 275-282.
245. Ulubelen, A. 1990. *Journal of Natural Products*, 53(1), 207-208.
doi:10.1021/np50067a034.
246. Ulubelen, A., Ertugrul, L., Birman, H *et al.* 1994. Antifertility effects of some coumarins isolated from *Ruta chalepensis* and *Ruta chalepensis* var. *latifolia* in rodents. *Phytother Res*, 8(4): 6-233.
247. Ulubelen, A., Terem, B., Tijzlaci, E., Cheng, K. C et Kong, Y. C.1986. Alkaloids and coumarins from *Ruta chalepensis*. *Phytochemistry*, Vol. 25, No. 11.pp. 2692-2693.
248. Ulubelena, A et Öztürk, M. 2006. Alkaloids and coumarins from *Ruta* Species. *Natural product communications*, Vol1 N 10, 851-857.
249. Vandenberghe, J. 1995. Hepatotoxicology: Mechanisms of liver toxicity and methodological aspects. In *Toxicology: principles and applications*. Edited by : J M Niesink, D J Vries, M A Hollinger Boca Raton (CRC Press), p 718.
250. Vasudevan, T. N et Luckner, M. 1968. Alkaloids from *Ruta angustifolia* Pers., *Ruta chalepensis* L., *Ruta graveolens* L. and *Ruta montana* Mill. *Pharmazie*, 23 (9), 520-1.
251. Vercauteren, J., 2006. Plan, Schémas, Formules sur Cours de Pharmacognosie, Université Montpellier 1, Laboratoire de Pharmacognosie.

252. Vermerris, W et Nicholson, R. 2006. Phenolic compound chemistry; ed: springer, p 1-70.
253. Veronese, F. M., Schiavon, O., Bevilacqua, R., *et al.* 1981. The effect of psoralens and angelicins on proteins in the presence of UV-A irradiation. *Photochem Photobiol*, 34: 351–4.
254. Villars, M. 1789. Histoire des plantes de Dauphiné (Contenant les espèces, les caractères, les synonymes et les vertus générales), p 582- 583.
255. Virot, S. 2004. Thèse de doctorat « Les petites protéines de stress et leur rôle dans la mort cellulaire. Etude de leur fonction chaperon à travers l'exemple de la mutation R120G de l' $\beta\alpha$ -cristalline », Université Claude Bernard-Lyon 1.
256. Wagner, H et Blatt, S. 1995. Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas, Photographs by Rickl, V. Second Edition-Springer, page 5.
257. Walum, E. 2016. Acute oral toxicity. *environmental health perspectives*, 106 (2).
258. Walum, E. 1998. Acute oral toxicity. *Environmental Health Perspectives*, Vol 106.
259. Waterman, P. G et Grundon, M. E. 1983. Chemistry and chemical taxonomy of the Rutales, Academic Press, San Diego.
260. Waterman, P. G. 1990. Chem osystematics of the Rutaceae: Comments on the interpretation of Da Silva *et al.*. *Plant Syst Evo*, 173:39-48.
261. Waterman, P. G. 1993. Phytochemical diversity in the order Rutales, *Recent. Adv. Phytochem*, 27: 203-233.
262. Webster, S. H et Liljegren, E. J. 1955. Organ body-weight ratios for certain organs of laboratory animals. III. White Swiss mouse. *Amer. J. Anat*, 97: 129-153.
263. Weill, F. X. 2009. *Salmonella*: épidémiologie, typage et résistance aux antibiotiques, *Rev Fr labo*, 409 (1):25–35.
264. Werner, C et Giostra, E. 2013. Elévation des tests hépatiques. Hôpitaux universitaires de Genève.
265. Wiart, C. 2006. Medicinal Plants of the Asia – Pacific: Drugs for the future; Ed: World scientific, p: 401 - 416.
266. Wilkinson, J. H. 1970. Clinical significance of enzyme activity measurements. *Clin. Chem.* 16,882.
267. Wilson, N. H., Hardisty, J. F et Hayes, J. R. Short-term, subchronic and chronic toxicology studies. In: Hayes AW, editor. Principles and methods of toxicology. 4th ed. Philadelphia, PA: Taylor and Francis. 2001. P : 754.

268. Wink, M. 2007. Molecular Modes of Action of Cytotoxic Alkaloids: From DNA Intercalation, Spindle Poisoning, Topoisomerase Inhibition to Apoptosis and Multiple Drug Resistance. In *The Alkaloids*, vol 64.
269. Wolters, B et Eilert, U. 1981. Antimicrobial substances in cell cultures of *Ruta graveolens*, *Planta Med*, 43 166-174.
270. Wong, S. P., Leong, L. P et Koh, J. H.W., 2006. Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants; *Food Chemistry* 99, p 775–783.
271. Yakubu, M.T et Afolayan, A. J. 2009. Effect of aqueous extract of *Bulbine natalensis* Baker stem on haematological and serum lipid profile of male Wistar rats. *Indian J Exp Biol*, 47:2838.
272. Yalonova, I. P., 1970. Les degrés de nuisibilités de substances industrielles, les différents aspects de sensibilité et les coefficients de sécurité au cours de fixation CMT, *Medicina*, Moscou, 1970, 65-76.
273. Yi-Zhong, C., Mei, S., Jie, X., Qiong, L., Corke, H., 2006. Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sciences*, 78(25): 2872-2888.
274. Zamek-Gliszczyński, M. J., Hoffmaster, K. A., Nezasa, K. I., Tallman, M. N et Brouwer, K. L. R. 2006. Integration of hepatic drug transporters and phase II metabolizing enzymes: mechanisms of hepatic excretion of sulfate, glucuronide, and glutathione metabolites. *European journal of pharmaceutical sciences*, 27: 447-86.
275. Zbindin, G. 1963. Experimental and clinical aspects of drug toxicity. *Adv Pharmac* 2 : 1-112.
276. Zbindin, G et Flury-Roversi, M. 1981. Significance of the LD₅₀-test for the toxicological evaluation of chemical substances. *Arch Toxicol*, 47:7799.
277. Zellagui, A., Belkassam, A., Belaidi, A et Gherraf, N. 2012. Environmental impact on the Chemical Composition and yield of essential oils of Algerian *Ruta montana* (Clus.) L and their antioxidant and antibacterial activities. *Advances in Environmental Biology*, 6(10): 2684-2688.
278. Zumwalt, J. G et Neal, J. J. 1993. Cytochromes P450 from *Papilio polyxenes*: adaptations to host plant allelochemicals. *Comp Biochem Phys*, 106 : 8-111.

Les annexes

❖ Screening phytochimique

❖ Tanins

A 2ml de décocté aqueux à 5% (5g de la poudre végétale dans 100 ml de l'eau distillée) sont ajoutées quelques gouttes de solution FeCl_3 à 5% dans l'éthanol. Une coloration brune verte se développe, ce qui révèle la présence des tanins

❖ Alcaloïdes

La poudre végétale (10 g) dans un erlen meyer de 250 ml+ 50 ml de H_2SO_4 dilué au 1/10 (50ml).Agitation et macération pendant 24 heures à la température ambiante du laboratoire. Filtration sur papier lavé à l'eau distillée de manière à obtenir environ 50 ml de filtrat.

- Réactions de caractérisation

- 1 ml de filtrat + 5 gouttes du réactif de MAYER ; s'il apparaît un précipité c'est qu'on est en présence d'alcaloïdes (Précipité blanc jaunâtre)

- 1 ml de filtrat+ 5 gouttes de réactif de WAGNER ; s'il apparait un précipité brun c'est qu'on est en présence d'alcaloïdes.

❖ Anthocyanes

Une infusion de 5 g de poudre végétale dans 100 ml de l'eau distillée bouillante pendant 15 minutes puis une filtration, 2 ml de filtrat sont ajoutées à 2 ml de l' HCl (2N) mélanger avec quelque gouttes d'ammoniac, le test est négatif si aucune coloration ne se développe.

❖ Stérols et tri-terpènes

Macération de 5g de poudre végétale dans l'éther à 5% pendant 24h ensuite évaporer à sec puis ajouter 0,5 ml d'anhydride acétique, 0,5 ml de chloroforme et H_2SO_4 ; en cas de réaction positive il se forme un anneau rouge-brunâtre ou violet à la zone de contact des deux liquides.

❖ Coumarines

1 g de matière végétale dans un tube à essai recouvert par un papier filtre imbibé avec NaOH dilué (10%) placé dans un bain marie bouillant pendant quelque minutes le papier filtre est ensuite examiné sous UV. Une fluorescence jaune indique la présence des coumarines.

❖ Saponosides

A 2 g de poudre végétale sont ajoutées 80 ml d'eau distillée, une ébullition pendant 5 min puis filtration ; refroidit et agité vigoureusement pendant 2 minute on filtre l'extrait et ensuite, la formation d'une mousse plus ou moins importantes indique la présence de saponosides.

❖ Préparation de la solution DPPH et échantillons

La solution du DPPH est préparée par solubilisation de 1 mg de DPPH dans 25 ml de méthanol absolu. Un volume de 1,5 ml des solutions d'extraits à différentes concentrations sont ajoutés à 0,5 ml d'une solution DPPH.

La solution d'antioxydant de référence (acide ascorbique) est également préparée dans les mêmes conditions pour servir de témoin positif. Le témoin négatif est constitué uniquement de DPPH et du méthanol. Le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min jusqu'à décoloration. Le dosage est réalisé par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 517 nm.

Le contrôle négatif est représenté par la solution méthanolique du DPPH.

Le contrôle positif est représenté par l'acide ascorbique.

Le pourcentage d'inhibition (I%) du radical DPPH par les différents extraits de *Ruta montana* est estimé selon l'équation ci-dessous:

$$I\% = \frac{(\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon})}{\text{Abs contrôle}} \times 100.$$

➤ Evaluation du potentiel anti-radicalaire par le calcul de l'IC₅₀

L'IC₅₀ (Concentration inhibitrice 50), appelée également EC₅₀ (*Efficient concentration 50*), est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% du radical DPPH. Les IC₅₀ sont calculés graphiquement par des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des extraits testés (Torres *et al.*, 2006).

Chaque test est réalisé en triplicata et les résultats sont représentés en moyenne ± écart type.

❖ Le test FRAP

Pour le test de FRAP, nous avons suivi la technique de (Yildirim *et al.*, 2001) qui consiste à prélever 0,5 ml de l'extrait brut méthanolique (feuilles, graines) et alcaloïdiques à différentes concentrations et les mélanger avec 1.25 ml d'une solution tampon phosphate à 0,2 M (pH= 6,6) et 1,25 ml d'une solution de ferricyanure de potassium K₃Fe(CN)₆ à 1%. Le tout est incubé à 50°C pendant 20 min, puis refroidi à la température ambiante. 1,25 ml d'acide trichloracétique à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction, puis les tubes sont centrifugés à 3000 tr/min pendant 10 min. 1,25 ml du surnageant sont ajoutés à 1,25 ml d'eau distillée et

250 µl d'une solution de chlorure de fer (FeCl₃) à 0,1%. La lecture des absorbances se fait par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 700nm. Des témoins de contrôle utilisant l'acide ascorbique sont inclus dans l'expérimentation.

❖ Milieu de culture

Les milieux de culture microbienne utilisés sont :

- La gélose nutritive pour l'isolement et l'entretien des souches bactériennes.
- La gélose Mueller Hinton pour l'étude de la sensibilité des bactéries aux différents extraits.
- PDA pour l'étude la sensibilité des champignons aux différents extraits

Les compositions des ces différents milieux de culture sont présentées dans le Tableau 1.

Tableau 1 : les milieux de culture utilisés

Milieu de culture	Composition	Quantité
PDA	Pomme de terre	4g
	Glucose	20g
	Agar	38g
	L'eau distillée	1L
La gélose Mueller Hinton	Mueller Hinton	20g
	L'eau distillée	1L

❖ Stérilisation du matériel

L'eau distillée, le milieu de culture, les tubes à essai utilisés dans la préparation des solutions bactériennes et les disques en papier Wattman (6 mm de diamètre) enrobés dans du papier aluminium ont été stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 25 minutes.

➤ *L'inoculum*

-à partir d'une culture pure des bactéries à tester sur milieu d'isolement (ayant au maximum 24h), racler à l'aide d'une anse de platine ou d'une pipette pasteur scellée, quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.

-décharger l'anse ou la pipette pasteur dans 5 ml d'eau physiologique stérile à 0,9 %. bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0,5 Mc Farland ou à une Do de 0,08 à 0,10 lue à 625 nm.

- ajuster l'inoculum, soit en ajoutant de la culture s'il est trop faible ou l'eau physiologique stérile, s'il est trop fort.

-l'ensemencement doit se faire en moins de 15 min après la préparation de l'inoculum.

➤ *L'ensemencement*

-le milieu de culture utilisé est Muller – Hinton, qui est le milieu le plus employé pour les tests de sensibilité aux agents antibactériens.

-tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne (il évite la contamination du manipulateur et de la paillasse).

-l'essorer en le pressant fermement, en tournant sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum.

-frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées.

-répéter l'opération deux fois, en tournant la boîte de Pétri de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

-dans le cas de l'ensemencement de plusieurs boîtes de Pétri il faut recharger l'écouvillon à chaque fois.

➤ *Préparation des disques*

-Des disques de papier filtres stériles Whatmann de 6 millimètres de diamètre sont imprégnés de différentes solutions des extraits préalablement dissouts dans le diméthylsulfoxyde (DMSO).

-À l'aide d'une pince stérile les disques sont déposés à la surface d'un milieu ensemencé (étalé) par une suspension bactérienne.

➤ *Incubation et Lecture*

Pendant 18 à 24 heures à 37°C, pour toutes les boîtes, et à température ambiante (température de la chambre).

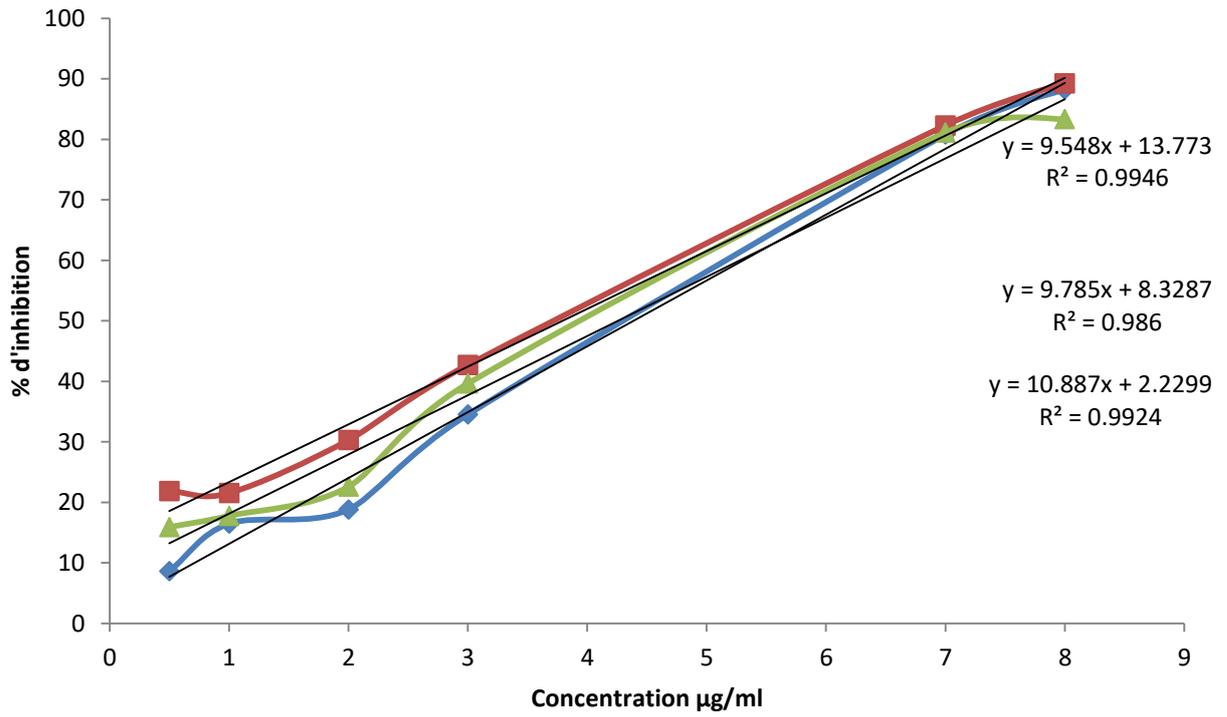
❖ **Technique histologique**

Après la fixation des fragments (des foies, reins, cerveaux) dans le formol 10 % pendant 24 heures, ils sont placés dans des cassettes en plastique numérotées selon l'échantillon déposé et mis dans l'automate. Cet appareil est équipé par 6 bacs d'alcool (déshydratation), 3 bacs de xylène (nettoyage) et 2 bacs de paraffine (solidification), dans chaque bac les cassettes restent une heure.

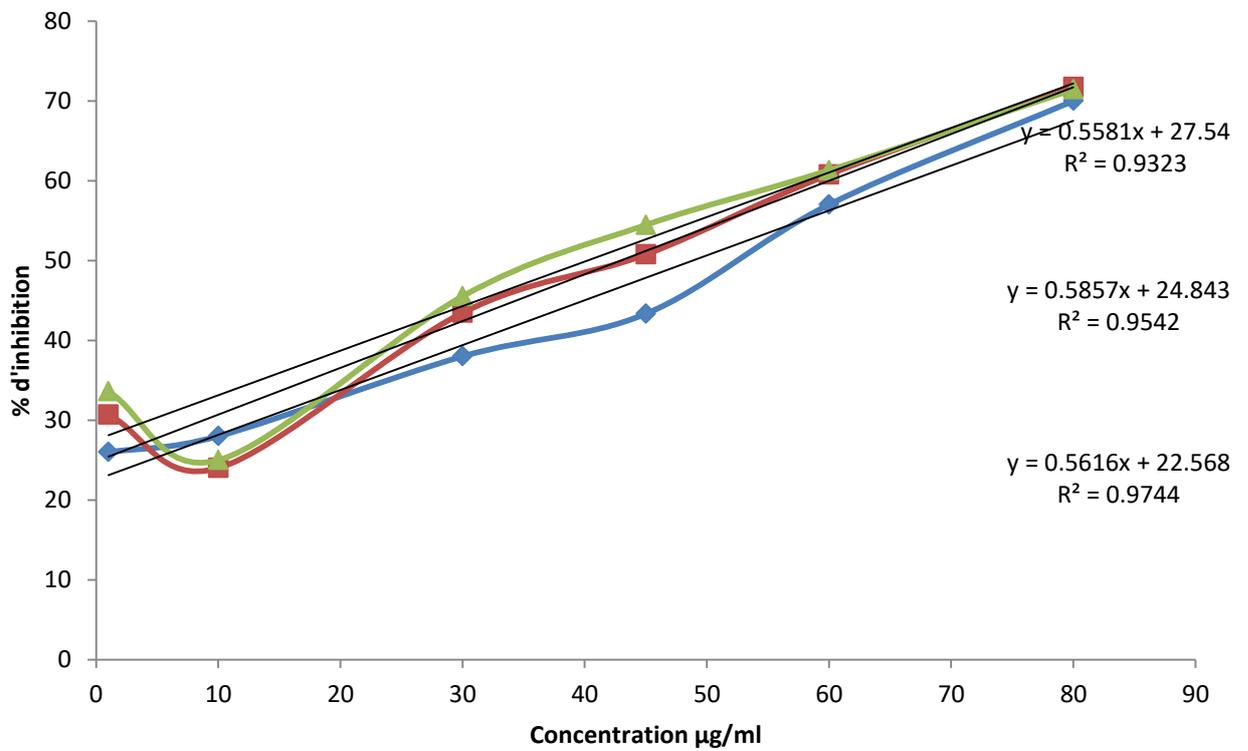
L'étape suivante est l'inclusion, qui consiste à enrober les fragments dans la paraffine liquide (67° c) à l'aide des moules métalliques et après refroidissement, on obtient des blocs de paraffine. Puis les blocs sont dégrossés à 50 microns (enlever l'excès de paraffine) et coupés à 5 microns. Les coupes réalisées sont placées dans un bain d'alcool absolu et d'eau (v/v) puis dans l'eau gélatineuse sur des lames numérotées préalablement. Les lames restent une nuit dans l'étuve.

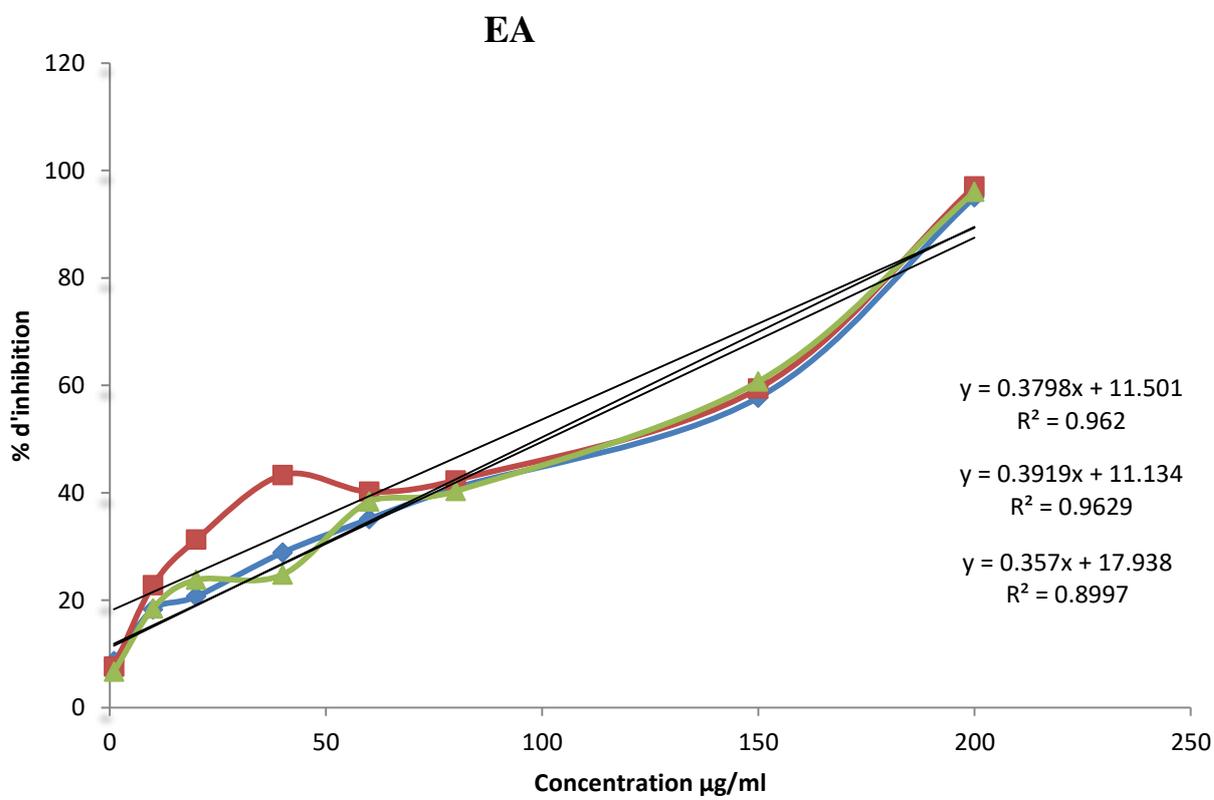
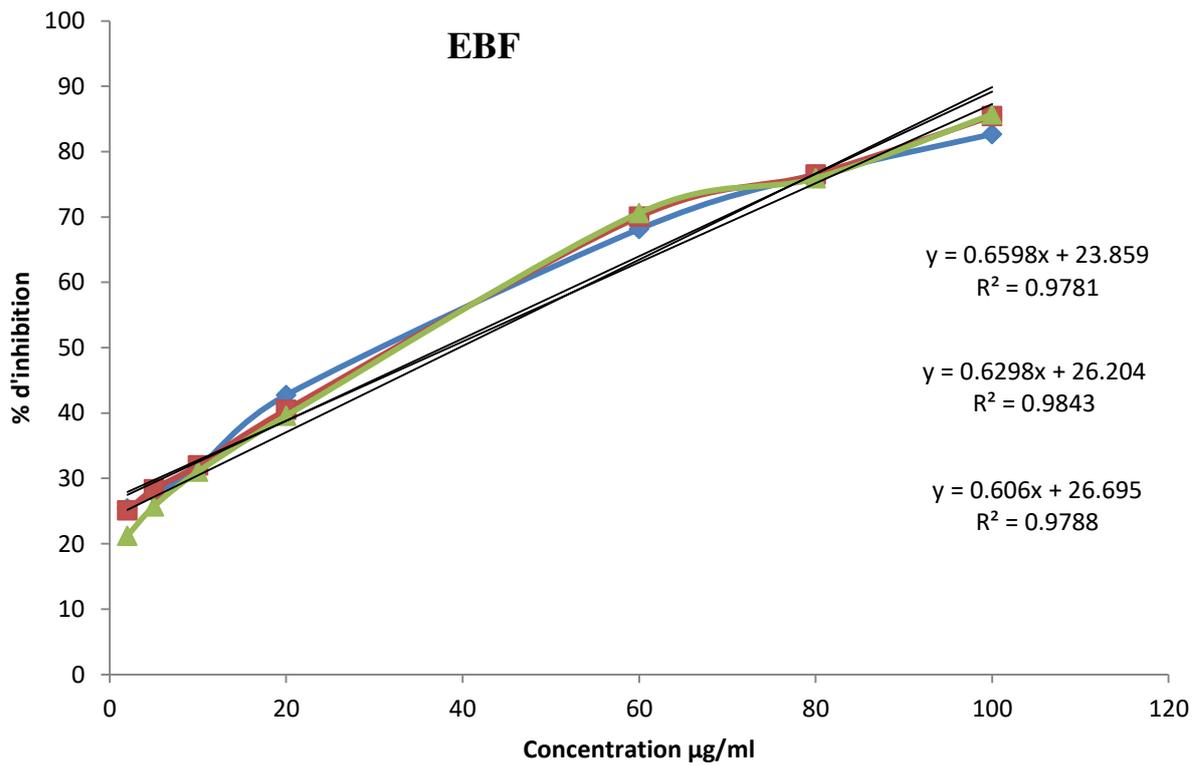
Pour la coloration, les lames sont lancées dans un appareil contenant 6 bacs de xylène (déparaffinage), 4 bacs d'alcool (hydratation), 1 bac d'eau (rinçage), 1 bac d'hématoxyline (coloration des noyaux en bleue), 1 bac d'eau (rinçage), 1 bac d'éosine (coloration du cytoplasme en rose), 2 bacs d'eau (rinçage), 3 bacs d'alcool (déshydratation) et 3 bacs de xylène (l'éclaircissement). Dans chaque bac les lames restent 2 minutes. Après la coloration, la lamelle est fixée sur la lame par l'Eukit (montage), immergée dans le xylène et séchée à l'air. Enfin les lames sont prêtes à la lecture par le microscope optique.

A. Ascorbique



EBG





Acute Toxicity Study of the Total Alkaloids of *Ruta montana* in Male Mice

R Allouni^{1*}, H Guergour^{1,2}, N Mahdeb¹, M Omrane³, A Bouzidi¹

¹Departement of Biochemistry, Faculty of natural sciences and life, University Ferhat Abbas, Setif19000, Algeria

²Departement of Biology, Faculty of natural sciences and life, University Elbachir El Ibrahimi, Bordj Bou Arriridj 34000, Algeria

³Hospitalo-Universitary Centre, CHU of Setif, Algeria

Received: 17th April, 17; Revised 9th July, 17, Accepted: 15th Aug, 7; Available Online: 25th Aug, 17

ABSTRACT

Ruta montana commonly called Fidjel is known as medicinal plant which has been used as emmenagogue, antispasmodic, rubefiant and powder echarrotic in traditional Algeria medicine. Aim of the study: For the first time, this study evaluated the lethal dose 50 and the potential toxicity of alkaloid extract from aerial parts of *Ruta montana* after acute administration in male mice. Materials and methods: Lethal dose 50 of total alkaloid extract of *Ruta montana* was determined using Litchfield and Wilcoxon method, mice were received the alkaloid extract at doses of 100, 200, 300, 400, 500 and 600 mg/kg (n=8/group) by intra-peritoneal route. Abnormal behavior, toxic symptom, and death were observed for 14 consecutive days. In acute toxicity a single intra-peritoneal administration of total alkaloid extracted from aerial parts of *Ruta montana* at 129.68 mg/kg (1/3 LD₅₀). Body weight, biochemical and hematological parameters were recorded. Histopathological examination of liver and kidney were assessed.

Keywords: *Ruta montana*, total alkaloids, mice, acute toxicity, hematological and biochemical parameters.

INTRODUCTION

Medicinal plants were one of the only sources of cure for many diseases, including more than 80 per cent of the population of the countries in the process of development and almost exclusively used in traditional medicine for their primary health needs. In addition, around 25% of the prescriptions worldwide are herbal⁴. Algeria has a vegetable flora rich and diversified, among the medicinal plants that constitute the vegetal cover, is the genus *Ruta* belongs to the family Rutaceae, this last is widely distributed especially in the mountainous regions. Many species of this type are used in traditional medicine because they contain several molecules endowed with therapeutic activities; among the most well-known species are *Ruta montana*, commonly called Fidjel; Plant with yellow flowers, strong odor, ornamental, aromatic, known for its richness in secondary metabolites. Phytochemical studies indicate the presence of various compounds: essential oils (aliphatic ketones)⁹, coumarins (rutarin, furanocoumarins: psoralen, bergapten, xantotoxin) Furoquinolines and acridone derivatives²⁴, flavonoids (rutoside) and tannins^{2,6}. This plant widely used as a medicinal plant for its abortifacient and anti-fertility properties¹⁵, antispasmodic, analgesic, antirheumatic, emmenagogue and antiparasitic⁵. However, the use of plants as a remedy does not mean that they are always beneficial to human health, and following the observations of Masri et al., 2015 of a case of acute poisoning by *Ruta montana* where the toxicological

analysis of the urine shows a strong presence of alkaloids, starting from theirs works, we try to evaluate the lethal dose 50 and the acute toxicity of the total alkaloids from the aerial parts of *Ruta montana* in male mice.

MATERIALS AND METHODS

Plant collection and identification

The aerial parts of *Ruta montana* was collected from Beni-Aziz region in North Setif (East Algeria), in the end of August, were identified by a botanist, Dr Kirouani Abd Al Razak, Department of Biology, Mohammed Al Bachir Al Ibrahimi University of Bordj Bou Arreridj, Algeria. The aerial parts were dried in air at room temperature and stored until use (See Fig. 1).

Extraction of totals alkaloids

50 g of air dried powdered of aerial parts was defatted with 200 ml of petroleum ether under reflux, and then the powder were witted with 40 ml of NH₄OH (0.5N) for 24 h, and were extracted to exhaustion with CHCl₃ using a soxhlet apparatus for 5 h. The organic extract (containing free alkaloids with lipophilic impurities) is then shaken three times with 150 ml aqueous sulphuric acid (0.5N). The acid extracts (alkaloids salts) are treated three times with 50 ml NH₄OH.(0.5N) to pH 9 to liberate the free alkaloids which are separated by extraction with 150 ml CH₂Cl₂, and then dried with Na₂SO₄ and concentrated to dryness under reduced pressure to obtain crude alkaloids⁸. The yield of this extract was approximately 0.27 ± 0.02% (w/w).



Figure 1: Plant of *Ruta montana*.

Experimental animals

Male Swiss albino mice of weights 22-32g, they were purchased from the Pasteur Institute in Algiers, were used to evaluate the lethal dose₅₀, for acute studies. The mice were housed in hanging transparent plastic cages (55 × 33 × 19 cm) in the animal room. The animals were fed with a standard pellet and tap water *ad libitum*. The animals are acclimated to the conditions of the animal room for two weeks prior to the experiments.

Determination of LD₅₀

Six groups of height mice each were used. The mice were given alkaloid extract of *Ruta montana* through intra-peritoneal route at doses of 100, 200, 300, 400, 500 and 600 mg/kg body weight in each group. The extract was administered once and the treated animals are closely observed during the first 24 hour (every hour) and then daily for two weeks and changes in appearance and behavior are noted. The median lethal dose (LD₅₀) was calculated according to the Lichtfield and Wilcoxon method in 1949.

Acute

toxicity

Two groups of 12 Swiss albino mice were given single dose of 129.68 mg/kg (1/3 DL₅₀) body weight of alkaloids by intra-peritoneal route. The control group (12 mice) received saline water with few drops of methanol at the same volume. Animals were observed and recorded systematically 1, 2, 3, 4, 5, and 6 h and daily after test substance administration. The visual observations included changes in skin and fur (hair), eyes and mucous membranes, and also respiratory, circulatory, autonomic and central nervous system. The first group was sacrificed after 24 h of treatment; and the second group after 5 days⁷.

Blood samples were collected by cardiac puncture for the measurement of hematological (EDTA-coated tubes) and biochemical (Heparine tubes) parameters. Organs such as heart, liver, kidneys, spleen, testes, brain and lungs were excised. The organs were then weighed, and the relative weight of each organ was calculated and compared with the value of the control.

Blood analysis

The hematological components including white blood cell (WBC), red blood cell (RBC), hematocrit (HCT), hemoglobin (HGB), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular volume (MCV), mean

corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), platelet (PLT) were determined using the automated hematologic analyzer (Medonic).

Heparine tubes containing collected blood were centrifuged at 2000 rpm at 5 °C for 15 min to obtain the serum, for the measurement of biochemical parameters including alkaline phosphatase (ALP), alanine transaminase (ALAT) aspartate transaminase (ASAT), urea (UREA) and creatinine (CREA), all these parameters were evaluated using commercial Kits- Advia chemistry and were determined using a fully automatic biochemistry analyzer (Advia 1008).

Histopathological analysis

The liver, kidneys and brain were removed and fixed in 10% neutral formalin. The histological sections (5 μm) of the liver, kidney and brain tissues were assessed by haematoxylin and eosin (H and E) for evaluation through light microscopy.

Statistical analysis

Statistical comparisons between groups of acute toxicity were determined by one way analysis of variance ANOVA followed by the Dunnet's test. Data are expressed as the mean ± standard error mean (SEM). Differences were considered significant at P < 0.05.

RESULTS

Lethal Dose 50

The intra-peritoneal administration of total alkaloids extract of aerial parts of *Ruta montana* characterized by severe clinical symptoms, including decrease in locomotors activity with paralysis of the hind legs, cyanosis and tachycardia. Though there were deaths 15th minute to 24 hours; however, the animals which survived exhibited a normal behavior, similar to the animals of the control group. The toxicity was observed to be a dose-dependent phenomenon. The LD₅₀ value of the extracts was calculated to be 389.04 mg/kg (See Tab. 1, Fig. 2).

n = 4, so theoretical $\chi^2 = 9.49$ therefore experimental $\chi^2 <$ theoretical χ^2 .

LD₁₆ = 226.46 mg/kg, LD₅₀ = 389.04 mg/kg, LD₈₄ = 512.86 mg/kg

Acute toxicity

In acute toxicity studies, the intra-peritoneal administration in Swiss albino mice of single dose of 129.68 mg/kg body weight of alkaloid extract showed no mortality or abnormal behavior. As compared to control group, no biological significant effects of total alkaloids extract were noted on body weight gain (See Tab. 2) In addition, no significant pathological changes in the colors and textures of vital organs, including the liver, kidney, brain, heart, lung, spleen and testes were observed via macroscopic examination, but statistically there were significant decrease in the relative weight of the lungs of the mice sacrificed after 24h and 5 days with also significant decrease in the relative weight of liver of the mice sacrificed after 5 days as showed in Table 3.

The haematological parameters of the mice treated with total alkaloid extract are presented in Table 4. There was a statistically no significant change in the values of

Table 1: Calculus of median lethal dose of total alkaloids extracted from *Ruta montana* using Lichtfield and Wilcoxon method.

Dose mg/kg	N° of death/exp	Log dose	Observation effect		Attend effect		Difference %	χ^2
			Probit	%	Probit	%		
100	0/8	2	2.99	2.2	3.50	6.6	4.4	0.03
200	1/8	2.301	3.85	12.5	3.72	10.1	2.4	0.0058
300	2/8	2.477	4.33	25	4.49	30.5	5.5	0.014
400	4/8	2.602	5.00	50	5.07	52.7	2.7	0.0029
500	6/8	2.698	5.67	75	5.50	69.2	5.8	0.016
600	8/8	2.778	6.59	94.2	5.89	81.3	12.9	0.1

$\Sigma\chi^2=0.1687$, theoretical value of χ^2 for P= 0.05 correspond to n[Number of degrees of freedom = K (Number of doses) -2].

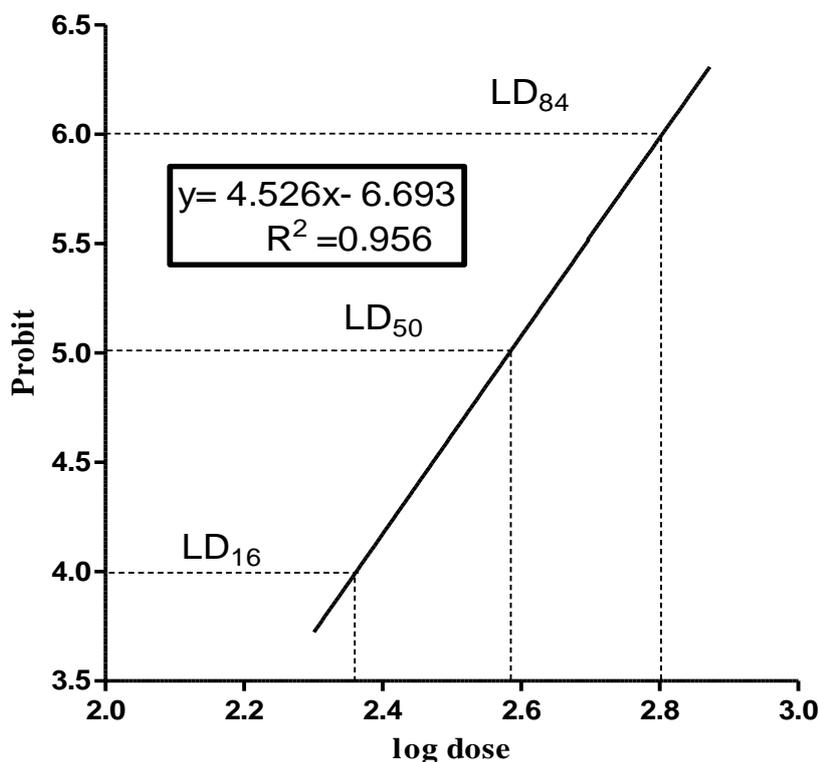


Figure 2: Curve characterizing the dose-response relationship for the determination of lethal parameters in male mice treated by simple application with the total alkaloids of *Ruta montana* (LD₅₀= 389.04mg/kg).

Table 2: Body weights of male mice treated with 129.68 mg/kg of total alkaloids extract from aerial parts of *Ruta montana*. Values are mean ± SEM.

Groups	Body weight (g)		
	1st Day	5th Day	Difference
1	30 ± 2.062		
2	30.28±2.036	32.45±1.054	2.1± 0.352
Control	30±0.597	32±1.658	1.9± 0.213

haematological parameters of treated groups when compared with control group. Biochemical analyses of the blood samples showed that the parameters, including ALAT, ASAT, and ALP, which indices of liver function did not show significant differences (See Fig. 3). As showed Figure 4, there were no changes in Urea and Creatinine.

DISCUSSION

Ruta montana has been used in traditional medicine against stomach ailment, respiratory and liver diseases¹⁶, in digestive disorders and helminthiasis, it's traditionally known for its abortive and aphrodisiac effects^{9,14}, emmenagogue¹³, as disinfectant; antipyretic and pest-destroying¹⁰. In fact, their therapeutic properties are due to the presence of thousands of secondary metabolites in particular essential oils and alkaloids². However, no study dealing with the safety assessment of this popular food and medicinal plant is reported. Therefore, the acute intraperitoneal toxicity of the total alkaloids extract of the aerial parts of *Ruta montana* was carried out in order to evaluate its safety.

Table 3: Relative organ weights of male mice treated with 129.68 mg/kg of total alkaloids extract from aerial parts of *Ruta montana*. Values are mean \pm SEM.

	Liver	Kidney	Lungs	Heart	Brain	Spleen	Testis
Control	0.0464 \pm 0.0019	0.0122 \pm 0.0008	0.0074 \pm 0.0002	0.0054 \pm 0.0001	0.0129 \pm 0.0001	0.0054 \pm 0.0003	0.0074 \pm 0.0002
Group 1st day	0.0493 \pm 0.0037	0.0135 \pm 0.0011	0.0066 \pm 0.0001*	0.0048 \pm 0.0001	0.0137 \pm 0.0001	0.0051 \pm 0.0003	0.0068 \pm 0.0004
Group 5th day	0.0255 \pm 0.0069*	0.0129 \pm 0.0005	0.0061 \pm 0.0001***	0.0116 \pm 0.0063	0.0135 \pm 0.0049	0.0067 \pm 0.0007	0.0064 \pm 0.0004

Table 4: Haematological values mice treated with total alkaloids extract of *Ruta montana* (129.68mg/kg). Values are mean \pm SEM.

Teste	RBC 10 ⁶ /mm ³	MCV μ m ³	RDW %	HCT %	PLT 10 ³ /mm ³	MPV μ m ³	WBC ₁₀ ³ /mm ³	HGB g/dL	MCH pg	MCHC
Control	7.66 \pm 0.5187	42.75 \pm 0.6756	20.83 \pm 1.791	32.75 \pm 2.293	471 \pm 77.82	8.733 \pm 1.571	8.1 \pm 1.038	11.22 \pm 0.3177	14.98 \pm 0.9864	35.12 \pm 2.371
Group 1st day	7.863 \pm 0.6623	42.25 \pm 1.215	19.52 \pm 0.6457	33.45 \pm 3.487	443.2 \pm 59.85	7.217 \pm 0.4743	8.083 \pm 0.6188	12.18 \pm 0.6814	15.68 \pm 0.6058	37.42 \pm 2.259
Group 5 th day	7.225 \pm 0.3034	42.73 \pm 0.7775	19.85 \pm 0.4264	30.90 \pm 1.442	582.3 \pm 33.67	6.583 \pm 0.4175	11.10 \pm 1.424	10.73 \pm 0.2777	14.90 \pm 0.4740	34.97 \pm 1.393

In this study we determined the lethal dose 50 and we tested the acute toxicity of the total alkaloids extract from aerial parts of *Ruta montana* in male mice.

The LD₅₀ value, defined as the statistically derived dose that, when administered in an acute toxicity test, is expected to cause death in 50% of the treated animals in a given period, is currently the basis or toxicologic classification of chemicals. When oral administration is combined with parenteral, information on the bioavailability of the tested compound is obtained²⁵.

The median lethal dose determined by intraperitoneal administration of total alkaloid extract from aerial parts of *Ruta montana* was 389.04 mg/kg and according to the classification of Hodge and Sterner¹¹, chemical substances with a LD₅₀ between 50 and 500 mg/kg body weight determined after a single doses in mice is considered as moderately toxic product.

An acute toxicity test can give more information about the biologic properties of a chemical compound than any other single test²⁵ so in the acute toxicity study, the alkaloid extract was administered by intra-peritoneal route at doses of 129.68 mg/kg (1/3 LD₅₀) body weight to both groups of mice. The acute treatment for 1 and 5 days indicated that *Ruta montana* alkaloid extract on intra-peritoneal route with the doses 129.68 mg/kg body weight did not produce any sign of toxicity or death in both groups of mice.

Since changes in body weight have been used as an indicator of adverse effects of drugs and chemicals, organ weights have been used as sensitive indicator to evaluate the toxic effects of drugs in toxicological studies¹⁷. In this study *Ruta montana* had no effect on the body weight of male mice. While Organ weight is one of the most sensitive drug toxicity indicators, and it changes often

precede morphological changes²¹ and can be used to indicate organ swelling, atrophy or hypertrophy¹⁸, in this study a significant changes were observed in the relative organ weight of lungs (after 24h and 5 days) and liver (after 5 days) were significantly decreased, therefore the decrease in the liver-body weight ratios in groups receiving the extract may be attributed to atrophy.

Hematological and biochemical parameters are the main diagnostic criteria in clinical practice. The values of some hematological and biochemical parameters indicate the adverse effects of drugs on organs or systems. The haematopoietic system is one of the most sensitive targets for toxic chemicals and an important index of physiological and pathological status in humans and animals²⁰. In this study, no significant differences were found in some hematological parameters at the end of the treatment as compared with control group. Thus, the results suggested that the total alkaloid administered by intra-peritoneal route at 129.68 mg/kg has no influence on the system of blood in male mice.

Alkaline phosphatases are often used to assess the integrity of plasma membrane and endoplasmic reticulum³. ALAT is a sensitive and specific marker of hepatocellular affect is exclusively present in the cytoplasm of hepatocytes and released into the circulation after cellular damage^{1,12,23}. ASAT is less sensitive and less specific than ALAT for the liver; it is also finds in other organs, especially in the skeletal muscles, heart muscle and brain while PAL, this enzyme is found especially in the liver and bones²⁶. Generally, any damage to the parenchymal liver cells results in elevations of both transaminases in the blood²³. Therefore, no changes in ASAT and ALP activities but there are a considerable change in ALAT on first day and

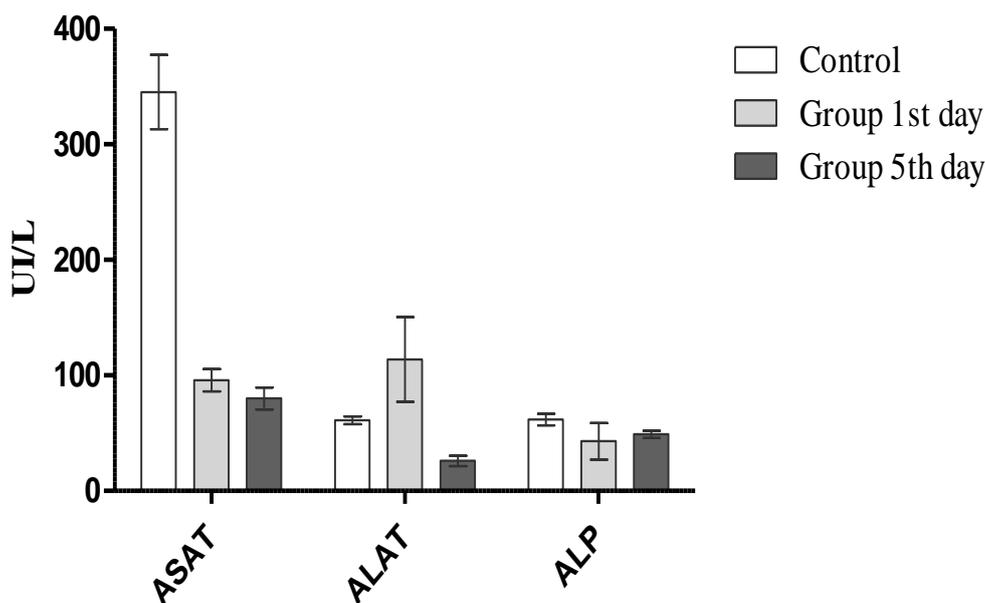


Figure 3: Effect of administration of total alkaloid extract of *Ruta montana* (129.68 mg/kg) on some biochemical parameters of liver function in male mice in acute toxicity study. Values are mean \pm SEM.

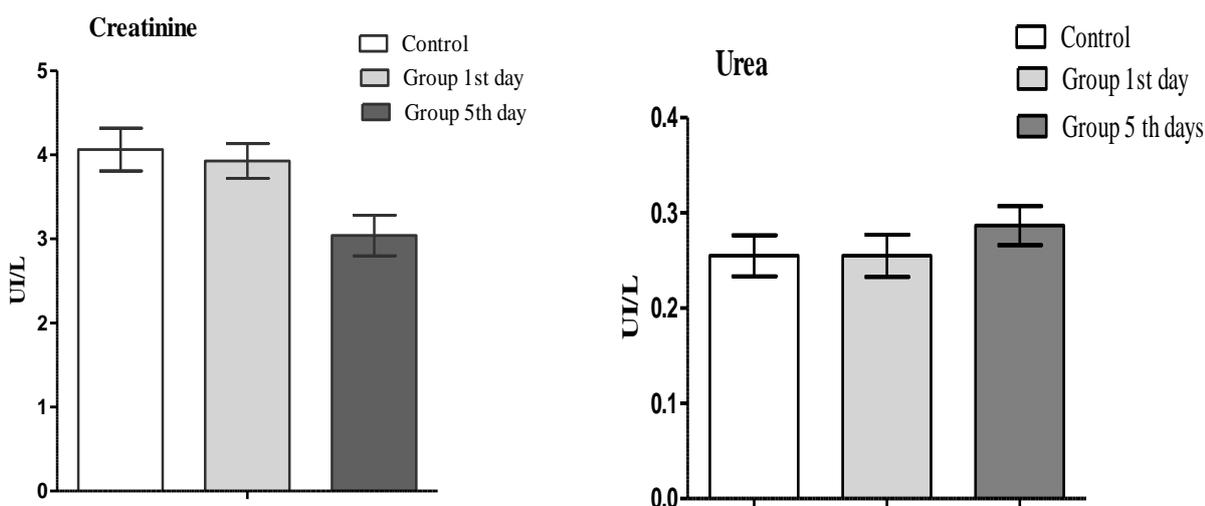


Figure 4: Effect of administration of total alkaloid extract of *Ruta montana* (129.68 mg/kg) on some biochemical parameters of kidney function in male mice in acute toxicity study. Values are mean \pm SEM.

recovers on the 5th day, as known ALT is considered the most liver-specific enzyme because it is present in higher quantities in hepatocyte cytosol. Therefore, its presence in the serum is considered a marker of hepatocellular necrosis.

The kidneys regulate the excretion of urea and reabsorption of electrolytes into the blood. When there is a compromise of normal glomerular function, substances normally cleared by the kidneys such as urea and creatinine accumulate in the biological³. This study showed no significant difference between treated group by total alkaloids of *Ruta montana* and control group, this results suggest that *Ruta montana* extract did not alter the renal function.

However, the results of acute study showed no adverse effects on the usual markers of liver and kidney toxicity (ASAT, ALAT, ALP, Urea and Creatinine). It may be concluded that the alkaloid extracts of *Ruta montana* aerial parts did not induce significant damage to these organs.

The liver and kidney are sensitive organs, and their functions are known to be affected by a number of factors, such as drugs, including plant phytochemicals, ultimately leading to renal failure and liver toxicity.

The histopathological observation of the principal vital organs of the treated mice compared with control group revealed that there were no pathological changes in the kidney these confirmed by no changes in creatinine and urea so the activity and the morphology of kidney didn't

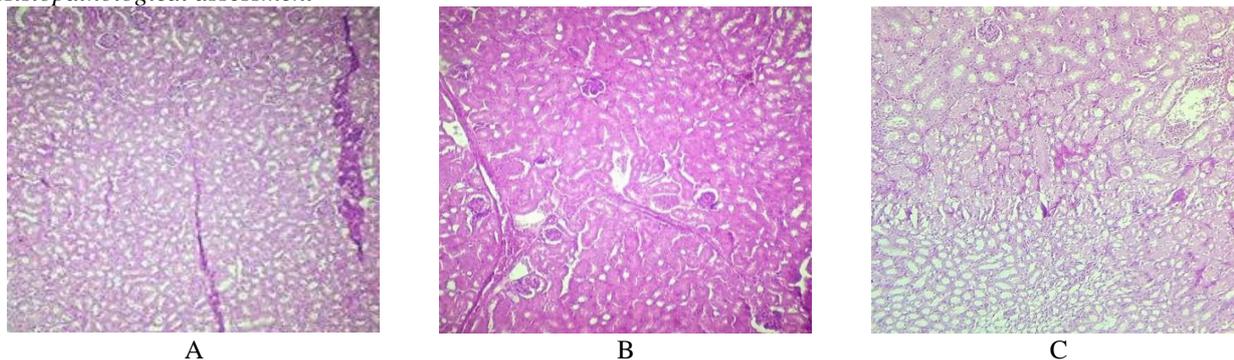
Histopathological assessment

Figure 5: Histology of the kidney (HE×10); A: Control group and treated mice with total alkaloid extract of *Ruta montana* at the dose of 129.68 mg/kg (1/3 LD₅₀) (B: After 24 hour and C: After 5 days).

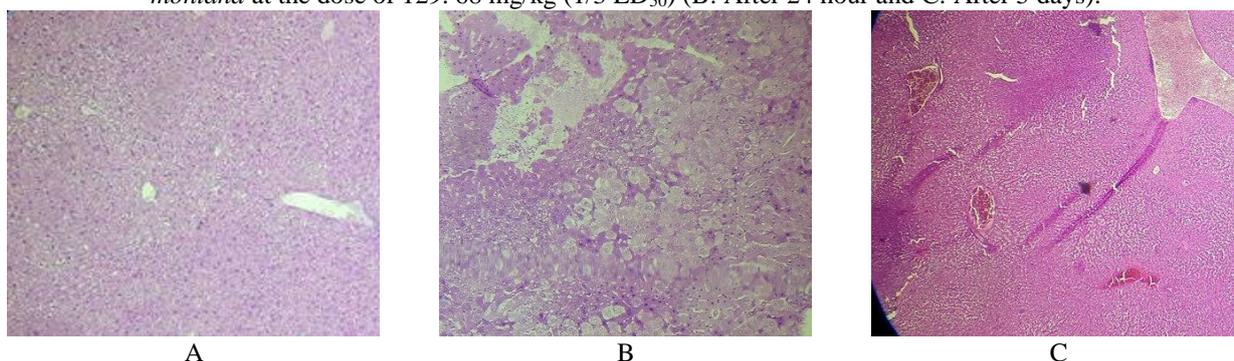


Figure 6: Histology of the liver (HE×10); A: Control group and treated mice with total alkaloids extract of *Ruta montana* at the dose of 129.68 mg/kg (1/3 LD₅₀) (B: After 24 hour and C: After 5 days). GG: Ground glass appearance of the hepatocytes, Cn: Sinusoidal and Portal congestion.

altered after the intraperitoneal administration of total alkaloids of *Ruta montana*. Although changes in the liver morphology characterized by the presence of ground glass appearance in hepatocytes after 24h, sinusoidal and portal congestion after 5 days with decrease in relative weight of liver, while the results of serum analysis showed no changes in ALAT, ASAT and ALP, that may be due to the administration of total alkaloids into organism, they may reflect the deregulation of the process of absorption of a normal substance.

CONCLUSION

In conclusion, the total alkaloids extracted from the aerial parts of *Ruta montana* were classified as moderately toxic, then the acute toxicity study with intra-peritoneal administration of *Ruta montana* alkaloids at dose of 129.68 mg/kg may not exert severe toxic effects. However, the safety of *Ruta montana* in humans needs further investigation and toxicological data should be collected and confirmed over repeated long term studies.

ACKNOWLEDGEMENTS

Special thanks addresses to Dr. Omrane (Hospitalo-Universitary Centre, CHU of Setif, Algeria) and Dr Faycel Benbacha and the staff of the laboratory of Anatomopathology (Hospitalof Bordj Bou Arreridj).

REFERENCES

1. Awounfack C F, Ateba S B, Zingue S, Mouchili O R, Njamen D. Safety evaluation (acute and sub-acute

studies) of the aqueous extract of the leaves of *Myrianthus arboreus* P. Beauv. (Cecropiaceae) in Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology* 2016; 194: 169–178.

2. Baba iassa F. *Encyclopédie des Plantes Utiles : Flore d'Algérie et du Maghreb* ; Ed : Librairie Moderne – Rouiba 1999, 243 - 244.
3. Bashir L ,Shittu O K, Oibiokpa F I, Mohammed H, Umar S I. Antimicrobial evaluation, acute and sub-acute toxicity studies of *Allium sativum*. *Journal of Acute Disease* 2016 ; 5(4): 296–301.
4. Benkiki N. Thèse doctorat « Etude phytochimique des plantes médicinales algériennes : *Ruta montana*, *Matricaria pubescens* et *Hypericum perforatum* » 2006.
5. Belkassam A, Zellagui A, Gherraf N, Lahouel M, Rhouati S. Essential Oil Composition of Algerian *Ruta Montana* (Clus.) L. and its Antibacterial Effects on Microorganisms Responsible for Respiratory Infections. *Advances in Natural and Applied Sciences* 2011, 5(3): 264-268.
6. Benziane M M. Thèse doctorat « Screening photochimique de la plante *Ruta montana*. Extraction de l'huile essentielle et de la rutine. Activité antioxydant de la plante » 2007.
7. Bouzidi A, Mahdeb N, Kara N. Toxicity studies of alkaloids of seeds of *Datura stramonium* and synthesis alkaloids in male rats. *Journal of Medicinal Plants Research* 2011, 5(15), 3421-3431.

8. Bruneton J. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Edn Lavoisier, Paris 1999.
9. Djarri L, Ferhat M, Merabet G, Chelghoum A, Laggoune S, Semra Z, Smati F, Kabouche Z. Composition and antibacterial activity of the essential oil of *Ruta montana* from Constantine (Algeria). Scholars Research Library Der Pharmacia Lettre 2013, 5 (4):70-73.
10. Duke A J, Duke P A K, Duce J L. Duke's handbook of medicinal plants of the bible 2008, 394– 398.
11. Frank CLU. Toxicologie, Données générales, procédures d'évaluation, organes cibles, évaluation du risque Paris 1992.
12. Jacques D T, Kpodekon T M, Houessionon M J, Kiki S P. Histological and biochemical evaluations of the liver and kidney of Wistar rats fed with fish meal of *Sarotherodon melanocheilus* captured with *Tephrosia vogelii*'s powder. African journal of biotechnology 2016. 15(11): 417-422.
13. Hammiche V, Azzouz M. Les rues : ethnobotanique, phytopharmacologie et toxicité 2013.
14. Kabouche Z, Benkiki N, Seguin E, Bruneau C. A new dicoumarinyl ether and two rare furocoumarins from *Ruta montana*. Fitoterapia 2003, 74: 194–196.
15. Kambouche N, Merah B, Bellahouel S, Bouayed J, Dicko A, Derdour A, Younos C, Soulimani C. Chemical Composition and Antioxidant Potential of *Ruta montana* L. Essential Oil from Algeria. Journal of medicinal food 2008, 11 (3) 593–595.
16. Lahsissene H, Kahouadji A, Tijane M, Hseini S. Catalogue des plantes médicinales utilisées dans la région de zaër (maroc occidental), be-issn 2009, 0457-4184.
17. Li F, He X, Niu W, Feng Y, Bian J, Xiao H. Acute and sub-chronic toxicity study of the ethanol extract from leaves of *Aralia elata* in rats. Journal of Ethnopharmacology 2015, 175: 499–508.
18. Maina E N, Kinyi H W, Ochwang' I D O, Meroka A M, Wanyonyi W C. Liver toxicity of Crude extract of *Ficus natalensis* traditionally used in South Western Uganda. African Journal of Pharmacology and Therapeutics 2016, 3 (4) :116-121.
19. Masri W, Belwaer I, Khelifi F, Nouioui A, Ben salah D, Amira D, Hedhili A. A propos d'un cas d'intoxication aiguë par *Ruta montana*, Acute poisoning by *Ruta montana*: A case report ; Phytothérapie 2015, 13:36-38.
20. Nghonjuyi W, Tiambo C K, Taiwe G S, Toukala J P, Lisita F, Juliano R S, Kimbi H K. Acute and sub-chronic toxicity studies of three plants used in Cameroonian ethnoveterinary medicine: *Aloe vera* (L.) Burm. f. (Xanthorrhoeaceae) leaves, *Carica papaya* L. (Caricaceae) seeds or leaves, and *Mimosa pudica* L. (Fabaceae) leaves in Kabir chicks Ndaleh. Journal of Ethnopharmacology 2016, 178: 40–49.
21. Piao Y, Liu Y, Xie X. Change Trends of Organ Weight Background Data in Sprague Dawley Rats at Different Ages. Journal of Toxicologic Pathology 2013, 26: 29–34.
22. Sellers R S, Morton D, Michael B, Roome N, Johnson J K, Yano B, Perry R, Schafer K. Society of Toxicologic Pathology Position Paper: Organ Weight Recommendations for Toxicology Studies. Journal of Toxicologic Pathology 2007, 35:751–755.
23. Taj D, Khan H, Sultana V, Ara J, Ehteshamul-Haque S. Antihepatotoxic effect of golden berry (*Physalis peruviana* Linn.) in carbon tetrachloride (CCl₄) intoxicated rats. Pak. Journal of Pharmacology Science 2014, 27 (3): 491-494.
24. Touati D, Atta-ur-Rahman , Ulubelen A. Alkaloids from *Ruta montana*. Phytochemistry 2000, 53: 277–279.
25. Walum E. Acute oral toxicity. Environmental Health Perspectives 2016, 106 (2).
26. Werner C and Giostra E. Elévation des tests hépatiques. Hôpitaux universitaires de Genève 2013.

تعد نبتة *Ruta montana* المعروفة باسم فيدجل كنبات طبي، وتستخدم في الطب الجزائري التقليدي كمحفز ومعدل للطمث، مضاد للتشنج ومسكن. وقد أمكننا من خلال الفحص الكيميائي النباتي التأكد من وجود قلويدات، الكومارين، التانان و ثلاثي التربينات و غياب السابونوزيد و الأونوسيان وقد تم اختبار مستخلصات مختلفة من *Ruta montana* لأنشطتها المضادة للأكسدة، والمضادة للبكتيريا والمضادة للفطريات. وكشف تقييم النشاطية المضادة للأكسدة بواسطة طريقتين (محاصرة DPPH و FRAP) مخبريا أن مختلف المستخلصات ذات نشاط عال وذلك كمضادات لأكسدة، في حين أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها من الاختبارات المضادة للجراثيم أقطار مناطق تثبيط تتجاوز 18 ملم (*E. coli* و *B. cereus*, *S. aureus*, *S. typhimurium*) لجميع المستخلصات التي تمت دراستها، مما يشير إلى حساسية عالية للبكتيريا للعوامل المختبرة. أظهرت دراسة تأثير مضاد للفطريات للمستخلصات المختلفة خصوصية ملحوظة لفطر *Aspergillus niger* على فطر *Fusarium oxysporum* لكل من البذور و الأوراق على تأثير القلويدات الكلية. أجريت دراسة لتقييم السمية الحادة والتشبه الحادة للقلويدات الكلية المستخلصة من الأجزاء العلوية لنبات *Ruta montana* عند كل من الفئران ذكور و إناث من سلالة *Swiss Albinos*. وقد سمحت لنا طرق الحساب والرسوم البيانية المختلفة من تحديد DL₅₀ عند الفئران الذكور والإناث، والتي تقدر ب 372,6 ± 13,7 ملغ / كغ و 217 ± 8,3 ملغ / كغ على التوالي. يتم تقييم السمية الحادة عن طريق الجرعات 129,68 ملغ / كغ و 75,23 ملغ / كغ (3/1 DL₅₀) لدى الفئران الذكور والإناث الفئران على التوالي وذلك تحت الصفاق حيث سجل عند الذكور انخفاض معنوي في الوزن النسبي للرنيتين بعد 24 ساعة و في الكبد بعد خمسة أيام، في حين لوحظ انخفاض معنوي في الوزن النسبي للرنية و زيادة معنوية في وزن الكبد بعد 24 ساعة عند الإناث. لم يتغير كل من (ASAT, ALAT, PAL الكرياتينين واليوريا) بشكل معنوي عند الفئران الذكور والإناث. كما أظهرت معاملات الدم (الكريات الدموية البيضاء ونسبة الخلايا اللمفاوية و GRA, CCMH) ارتفاعا معنويا وانخفاض معنوي في متوسط الحجم الكلي بعد 24 ساعة عند الفئران إناث، في حين لم يتم تسجيل أي شيء في الخصائص الدموية للذكور. دراسة السمية الشبه الحادة على الفئران الذكور والإناث المعالجة بالقلويدات الكلية لنبات *Ruta montana* بجرعة 19,425 ملغ / كغ و 11,28 ملغ / كغ (DL₅₀ 20/1) على التوالي لمدة 28 يوما، أظهرت زيادة كبيرة في الكتلة النسبية للخصيتين عند الفئران الذكور والطحال لدى الفئران الإناث على التوالي مع انخفاض في وزن كبد الفئران الذكور، لم يلحظ أي تغيير في قيم اليوريا، والكرياتينين و (PAL, ALT, AST) عند الفئران الذكور، ولكن كان هناك انخفاض ملحوظ في الفوسفاتيز القلوي عند إناث الفئران، زيادة كبيرة في خلايا الدم الحمراء و GRA لدى الفئران الذكور والإناث على التوالي. وتوضح المقاطع النسيجية للكبد و الكلي والدماغ. ازدحام كلوي وكبدية مع أورام دماغية لدى الفئران الذكور والإناث.

الكلمات المفتاحية: *Ruta montana* ، القلويدات الكلية، DL₅₀، السمية الحادة، السمية الشبه الحادة، الفئران.

Résumé

Ruta montana communément appelé Fidjel est connue comme plante médicinale, utilisée dans la médecine traditionnelle Algérienne comme emménagogue, antispasmodique et rubéfiante. Le screening phytochimique nous a permis de confirmer la présence des alcaloïdes, des coumarines, des tanins, des stéroïdes et des triterpènes et l'absence des saponosides et des anthocyanes. Les différents extraits de *Ruta montana* ont été testés pour leur activité antioxydante, antibactérienne et antifongique. L'évaluation du pouvoir antioxydant par deux méthodes (piégeage de DPPH[•] et FRAP) a révélé *in vitro* des capacités antioxydantes chez tous les extraits, cependant les résultats des tests antibactériens obtenus ont mis en évidence des zones d'inhibition de diamètres dépassant 18 mm, pour les quatre souches bactériennes (*B. cereus*, *S. aureus*, *S. typhimurium* et *E. coli*) concernant toutes les extraits étudiées, suggérant une forte sensibilité des bactéries aux extraits testés. L'étude de l'effet antifongique des différents extraits a montré une spécificité très marquée pour le champignon *Aspergillus niger* plus que le champignon *Fusarium oxysporum* aussi bien pour les graines et les feuilles que pour les alcaloïdes totaux. Une étude est effectuée pour évaluation de la toxicité aiguë et subaiguë des alcaloïdes totaux des parties aériennes de *Ruta montana* sur des souris *Swiss albinos* de sexe mâle et femelle. Les différentes méthodes de calcul et graphique nous a permis de déterminer la DL₅₀ chez les souris mâles et femelles, qui est estimée à 372,6 ± 13,7 mg/kg et 217 ± 8,3 mg/kg respectivement. La toxicité aiguë est évaluée par l'administration de la dose 129,68 mg/kg et 75,23 mg/kg (1/3 de la DL₅₀) chez les souris mâles et femelles respectivement par voie intrapéritoniale et par simple application a permis d'enregistrer chez les souris mâles une diminution significative de la masse relative des poumons après 24h et 5^{ème} jour et du foie après le 5^{ème} jour. Chez les souris femelles, nous avons constaté une diminution des poumons et une augmentation du foie significative après 24h. Les paramètres sériques (ASAT, ALAT, PAL, Urée et Créatinine) n'ont connu aucun changement significatif chez les souris mâles et femelles. Les paramètres sanguins (GB, CCMH, LYM et GRA) ont connu une augmentation significative et une diminution du VGM après 24h chez les souris femelles, alors rien n'a été enregistré dans les paramètres hématologiques des souris mâles. L'étude de la toxicité subaiguë chez les souris mâles et femelles traitées par des alcaloïdes totaux de *Ruta montana* avec les doses de 19,425 mg/kg et 11,28 mg/kg (1/20 de la DL₅₀) respectivement pendant 28 jours, a montré une augmentation significative dans la masse relative des testicules chez les souris mâles et de la rate chez femelles avec une diminution de la masse du foie chez les souris mâles. Aucun changement significatif dans les valeurs de l'urée, créatinine et des transaminases hépatiques (ASAT et ALAT et PAL) du sérum des souris mâles, cependant on a enregistré une diminution significative de la phosphatase alcaline dans le sérum des souris femelles, une augmentation significative des globules rouge chez les souris mâles et des granulocytes chez les souris femelles. Des congestions rénales et hépatiques avec des œdèmes cérébraux sont observées sur les coupes histologiques des reins, du foie et du cerveau des souris mâles et femelles.

Mots clés : *Ruta montana*, alcaloïdes totaux, DL₅₀, toxicité aiguë, toxicité subaiguë, souris.

Abstract

Ruta montana commonly known as Fidje is known as a medicinal plant, used in traditional Algerian medicine as an emmenagogue, antispasmodic and rubefacient. Phytochemical screening allowed us to confirm the presence of alkaloids, coumarins, tanins, sterols and triterpenes and the absence of saponosides and anthocyanins. The various extracts of *Ruta montana* were tested for their antioxidant, antibacterial and antifungal activity. The evaluation of the antioxidant capacity by two methods (DPPH[•] and FRAP) revealed *in vitro* antioxidant capacities in all extracts, however the results of the antibacterial tests obtained showed zones of inhibition with diameters exceeding 18 mm for the four bacterial strains (*B. cereus*, *S. aureus*, *S. typhimurium* and *E. coli*) for all extracts studied, suggesting a high sensitivity of the bacteria to the extracts tested. The study of the antifungal effect of the various extracts showed a very marked specificity for the fungus *Aspergillus niger* more than the fungus *Fusarium oxysporum* as well for the seeds and the leaves as for the total alkaloids. A study is carried out to evaluate the acute and subacute toxicity of total alkaloids from the aerial parts of *Ruta montana* in male and female *Swiss albinos* mice. The different calculation and graphing methods allowed us to determine the LD₅₀ in male and female mice, which is estimated at 372.6 ± 13.7 mg/kg and 217 ± 8.3 mg/kg respectively. The acute toxicity is evaluated by the administration of the dose 129.68 mg/kg and 75.23 mg/kg (1/3 of the LD₅₀) in the male and female mice respectively intraperitoneally and by simple application allowed in male mice to a significant decrease in the relative mass of the lungs after 24 and 5th day and in liver after 5th day in male mice however, in female mice we found a significant decrease in lungs and significant increase in liver after 24h. Serum parameters (ASAT, ALT, PAL, Urea and Creatinine) did not change significantly in male and female mice. The blood parameters (GB, MCHC, LYM and GRA) showed a significant increase and a significant decrease in VGM after 24h in female mice, whereas no thing was recorded in the hematological parameters of the male mice. The subacute toxicity study in male and female mice treated with total alkaloids of *Ruta montana* with doses of 19.425 mg/kg and 11.28 mg/kg (1/20 of the LD₅₀) respectively for 28 days, showed a significant increase in the relative mass of testes in male mice and spleen in female mice with a decrease in liver mass in male mice, no significant change in urea, creatinine and liver transaminase values (ASAT and ALAT and PAL) in serum from male mice, however there was a significant decrease in serum alkaline phosphatase in female mice, a significant increase in red blood cells in male mice and granulocytes in female mice. Renal and hepatic congestions with cerebral edema are observed on histological sections of the kidneys, liver and brain of male and female mice.

Keywords : *Ruta montana* L, total alkaloids, LD₅₀, acute toxicity, subacute toxicity, mice.