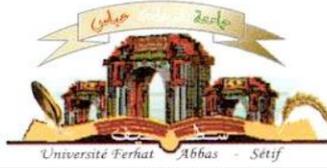


الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

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/2023

THÈSE

Présentée par

GHEDJATI Nadra

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Filière: BIOLOGIE

Spécialité: BIOCHIMIE

THÈME

**Etude de la toxicité aiguë et sub-chronique des extraits de
Ruta montana L. sur les rats albinos wistar: effet sur le
foie, le rein, l'ovogenèse et l'embryogénèse**

Soutenue publiquement le 18/03/2023

DEVANT LE JURY

Président	Djirar Nacer	Pr. UFA Sétif 1
Directeur	Bouzidi Abdelouahab	Pr. UFA Sétif 1
Co-directeur	Mahdeb Nadia	MCA. UFA Sétif 1
Examineurs	Khaldi Fadila	Pr. U. Souk Ahras
	Mosbah Asma	MCA. U. Constantine
	Benslama Abderrahim	MCA. U. M'sila
Invité	Allouni Rima	MCA. UFA Sétif 1

Année Universitaire 2022/2023

Remerciements

*Je remercie le **DIEU** qui m'a donné la santé et la patience d'achever ce travail,
El Hamdouli'Allah.*

*Mes respectueux remerciements s'adressent au Professeur **Bouzidi Abdelouahab** directeur de ma thèse, pour la confiance qu'il m'a accordée pour mener ce travail, sa disponibilité, son soutien, ses remarques et conseils éclairants et ses encouragements. Qu'il trouve ici l'expression de mon respect et de ma gratitude.*

*J'exprime mes remerciements à madame Dr **Mahdeb Nadia** pour avoir accepté de co-encadrer ce travail. Veuillez trouver ici le témoignage de mon respect.*

*Je tiens particulièrement à remercier monsieur **Djirar Nacer**
Pr. UFA Sétif de me faire l'honneur de présider le jury de cette thèse.*

*Je remercie tout particulièrement madame **Khaldi Fadila** Pr. U. Souk Ahras,
madame **Mosbah Asma** MCA. U. Constantine et monsieur **Benslama Abderrahim** MCA. U. M'sila d'avoir accepté d'examiner et de juger ce travail.*

*J'adresse mes vifs remerciements à monsieur le Dr. **Abdellouche** médecin chef
de laboratoire d'anatomi-pathologique au C. H. U. de Sétif, vous m'avez
chaleureusement accueillie au sein du laboratoire d'anatomi-pathologique, de
votre coopération et aide. Je n'oublie pas toutes les techniciennes du
laboratoire, de leur aide pour réaliser les coupes histologiques et de leur
gentillesse.*

*Je n'oublie pas de remercier monsieur le professeur **Zouaoui**, monsieur **Sidani Saïd**, le doctorant **Belguidoum Ahmed** et Tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à l'élaboration de ce travail et dont les noms ne figurent malheureusement pas sur cette page. Qu'ils trouvent ici le témoignage de mon estime et de ma gratitude.*

Dédicace

Je dédie ce travail

A mes chers parents, qu'ils m'ont toujours donné le maximum de ce qu'ils pouvaient. Vous m'avez épaulé dans tous les moments difficiles, voici le couronnement de vos efforts.

A mon mari MOHAMED, pour son soutien, encouragement et sa patience.

A mes chers fils AMIR MEHDI et YOUNES KOSSEI.

A mes chères sœurs et chers frères, pour leurs encouragements et conseils.

A mes chères nièces et chers neveux.

الملخص

تستخدم نبتة السذاب الجبلي (سذابيات) المعروفة محلياً باسم فيجل في الطب التقليدي كمنشط جنسي و مجهض و مخفض للسكر في الدم. تمثل الهدف من هذا البحث في دراسة السمية الحادة عن طريق تحديد الجرعة المميتة المتوسطة (DL₅₀) لمستخلصات الأجزاء الهوائية من النبات في كلا الجنسين لتصنيف السمية المحتملة، و في السمية شبه المزمنة لتقييم تأثير المستخلص الميثانولي على الأعضاء الرئيسية مثل الكبد و الكلى و المبيض و مكونات الدم و على تكاثر الجرذان الإناث. تمت دراسة السمية شبه المزمنة (45 يوماً)، باستخدام 14 جرذان أناث مقسمة إلى مجموعتين؛ تلقت المجموعة المعالجة بالمسلك الصفافي جرعة 38.7149 مغ/كغ = DL₅₀ 30/1 من المستخلص الميثانولي و تلقت المجموعة الشاهدة الماء الفسيولوجي. حيث قيمت التأثيرات على الأعضاء الرئيسية (الكبد و الكلى و المبيض و الدم). تم تحديد تأثير المستخلص الميثانولي لهذا النبات على تكاثر جرذان إناث بتزاوج 12 جرذان إناث متبقية من سمية شبه مزمنة (7 تمت معالجتها بمستخلص النبات و 5 شاهدة) بجرذان ذكور بالغة سليمة (غير معالجة). حيث تم أيضاً تقييم الوسائط السابقة. قدرت قيمة DL₅₀ المحسوبة بطريقة Litchfield و Wilcoxon بـ 524.8075 مغ/كغ (الجرذان الذكور) و 398.1071 مغ/كغ (الجرذان الإناث) للمستخلص القلويدي و 1071.5193 مغ/كغ (الجرذان الذكور) و 1161.4486 مغ/كغ (الجرذان الإناث) للمستخلص الميثانولي. لوحظ في الدراسة شبه المزمنة، انخفاض معنوي في الوزن الجسمي للجرذان المعالجة في الأسبوعين الثاني و السابع (P < 0.05). سجلت الكتلة النسبية للدماغ و المبايض انخفاضاً و زيادة معنوية على التوالي (P < 0.05). لم يسجل الهرمون المنبه للحريبات (FSH) و الهرمون اللوتيني (LH) و الوسائط البيوكيميائية أي فرق معنوي. أظهرت المتغيرات الدموية زيادة و انخفاضاً معنوياً في TCMH و IDR على التوالي (P < 0.05). لم يكشف التشريح المرضي للأنسجة عن أي تشوهات في الأنسجة التي تمت دراستها. لم يسجل في دراسة تأثير المستخلص الميثانولي على تكاثر الجرذان الإناث أي شذوذ في عدد و وزن الأجنة و المعايير الأخرى المدروسة. أوضحت هذه الدراسة أن المستخلص الميثانولي للسذاب الجبلي بالجرعة المختبرة ليس له تأثير سام على تكوين البويضات و تكوين الجنين و الأعضاء المدروسة.

الكلمات المفتاحية: السذاب الجبلي، الجرذان، السمية الحادة وشبه المزمنة، الكبد، الكلى، المبايض، الأجنة.

Résumé

Ruta montana L. (rutaceae) localement connue sous le nom de fidjel est utilisée en médecine traditionnelle comme anaphrodisiaque, abortif et comme hypoglycémiant. Le but de ce travail est d'étudier la toxicité aiguë par la détermination de la dose létale moyenne (DL₅₀) des extraits de la partie aérienne de la plante chez les deux sexes pour une éventuelle classification toxicologique, et la toxicité sub-chronique pour évaluer l'effet de l'extrait méthanolique sur les principaux organes tels que le foie, le rein les ovaires, les constituants du sang et sur la reproduction des rats femelles. Pour la toxicité sub-chronique (45 jours), 14 rats femelles sont divisées en 2 groupes; groupe traité reçu par voie intra-péritonéale 38,7149 mg/kg = 1/30 DL₅₀ de l'extrait méthanolique et groupe témoin reçu de l'eau physiologique. Les effets sur les principaux organes (foie, rein, ovaire et sang) sont évalués. Pour déterminer l'effet de l'extrait méthanolique de cette plante sur la reproduction des rats femelles, 12 rattes restantes de la toxicité sub-chronique (7 traitées par l'extrait de la plante et 5 témoins) sont couplées par des rats mâles adultes sains (non traités) où les précédents paramètres sont aussi évalués. La valeur de la DL₅₀ calculée par la méthode de Litchfield et Wilcoxon a été 524.8075 mg/kg (rats mâles), 398.1071 mg/kg (les femelles) pour l'extrait alcaloïdique et 1071.5193 mg/kg (rats mâles), 1161.4486 mg/kg (les femelles) pour l'extrait méthanolique. Dans l'étude sub-chronique, une diminution significative a été notée dans le poids corporel dans la 2^{ème} et la 7^{ème} semaine (P<0.05). La masse relative du cerveau et des ovaires a enregistré une diminution et une augmentation significatives, respectivement (P < 0,05). La FSH (Follicle Stimulating Hormone) et la LH (Luteinizing Hormone) et les paramètres biochimiques n'ont pas enregistré de différence significative. Les paramètres hématologiques ont présenté une augmentation et une diminution significative dans TCMH (Teneur Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine) et IDR (Indice de Distribution des globules Rouges) respectivement (P<0.05). L'histopathologie n'a révélé aucune anomalie dans les différents tissus étudiés. Dans l'effet de l'extrait méthanolique sur la reproduction des rattes, aucune anomalie n'a été enregistrée dans le nombre et le poids des embryons et les autres paramètres étudiés. Cette étude a révélé que l'extrait méthanolique de *Ruta montana* à la dose testée n'a aucun effet toxique sur l'ovogenèse, l'embryogénèse et les organes étudiés.

Mots clés: *Ruta montana* L., rats, toxicité aiguë et sub-chronique, foie, rein, ovaires, embryons.

Summary

Ruta montana L. (rutaceae) locally known as fidjel is used in traditional medicine as an aphrodisiac, abortive and as hypoglycemic. The aim of this work is to study the acute toxicity by the determination of the mean lethal dose (LD₅₀) of the extracts of the aerial parts of the plant in both sexes for a possible toxicological classification, and the sub-chronic toxicity to evaluate the effect of the methanol extract on the main organs such as liver, kidney, ovaries, blood constituents and on reproduction of female rats. In sub-chronic toxicity (45 days), 14 female rats were divided into 2 groups; treated group received intraperitoneally 38.7149 mg/kg = 1/30 LD₅₀ of the methanol extract and control group received physiological water. Effects on main organs (liver, kidney, ovary and blood) were evaluated. To determine the effect of the methanol extract of this plant on female rat's reproduction, 12 rats remaining from sub-chronic toxicity (7 treated with the extract of the plant and 5 controls) were coupled with healthy adult male rats (no treated) where the previous parameters were also evaluated. The LD₅₀ value calculated by the Litchfield and Wilcoxon method was 524.8075 mg/kg (male rats), 398.1071 mg/kg (females) for the alkaloid extract and 1071.5193 mg/kg (male rats), 1161.4486 mg/kg (females) for the methanol extract. In sub-chronic study, there was a significant reduction in body weight in the 2nd and 7th week (P<0.05). Relative mass of the brain and ovaries registered a significant decrease and increase, respectively (P<0.05). Follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH) and biochemical parameters did not record significant difference. Haematological parameters presented significant increase and decrease in mean corpuscular haemoglobin (MCH) and red cell distribution width (RDW), respectively (P<0.05). The histopathology revealed no abnormalities in different studied tissues. In the effect of methanol extract on female rat's reproduction, no abnormalities were registered in fetus's number and weight and the other studied parameters. The current study revealed that the methanol extract of *Ruta montana* at the tested dose had no toxic effect on ovogenesis, embryogenesis and subjected organs.

Key words: *Ruta montana* L., rats, acute and sub-chronic toxicity, liver, kidney, ovaries, embryos.

الملخص

تستخدم نبتة السذاب الجبلي (سذابيات) المعروفة محلياً باسم فيجل في الطب التقليدي كمنشط جنسي و مجهض و مخفض للسكر في الدم. تمثل الهدف من هذا البحث في دراسة السمية الحادة عن طريق تحديد الجرعة المميتة المتوسطة (DL₅₀) لمستخلصات الأجزاء الهوائية من النبات في كلا الجنسين لتصنيف السمية المحتملة، و في السمية شبه المزمنة لتقييم تأثير المستخلص الميثانولي على الأعضاء الرئيسية مثل الكبد و الكلى و المبيض و مكونات الدم و على تكاثر الجرذان الإناث. تمت دراسة السمية شبه المزمنة (45 يوماً)، باستخدام 14 جرذان أنث مقسمة إلى مجموعتين؛ تلقت المجموعة المعالجة بالمسلك الصفاقي جرعة 38.7149 مغ/كغ = 30/1 DL₅₀ من المستخلص الميثانولي و تلقت المجموعة الشاهدة الماء الفسيولوجي. حيث قيمت التأثيرات على الأعضاء الرئيسية (الكبد و الكلى و المبيض و الدم). تم تحديد تأثير المستخلص الميثانولي لهذا النبات على تكاثر جرذان إناث بتزاوج 12 جرذان إناث متبقية من سمية شبه مزمنة (7 تمت معالجتها بمستخلص النبات و 5 شاهدة) بجرذان ذكور بالغة سليمة (غير معالجة). حيث تم أيضاً تقييم الوسائط السابقة. قدرت قيمة DL₅₀ المحسوبة بطريقة Wilcoxon و Litchfield بـ 524.8075 مغ/كغ (الجرذان الذكور) و 398.1071 مغ/كغ (الجرذان الإناث) للمستخلص القلويدي و 1071.5193 مغ/كغ (الجرذان الذكور) و 1161.4486 مغ/كغ (الجرذان الإناث) للمستخلص الميثانولي. لوحظ في الدراسة شبه المزمنة، انخفاض معنوي في الوزن الجسمي للجرذان المعالجة في الأسبوعين الثاني و السابع ($P < 0.05$). سجلت الكتلة النسبية للدماغ و المبايض انخفاضاً و زيادة معنوية على التوالي ($P < 0.05$). لم يسجل الهرمون المنبه للجريبات (FSH) و الهرمون اللوتيني (LH) و الوسائط البيوكيميائية أي فرق معنوي. أظهرت المتغيرات الدموية زيادة و انخفاضاً معنوياً في TCMH و IDR على التوالي ($P < 0.05$). لم يكشف التشريح المرضي للأنسجة عن أي تشوهات في الأنسجة التي تمت دراستها. لم يسجل في دراسة تأثير المستخلص الميثانولي على تكاثر الجرذان الإناث أي شذوذ في عدد و وزن الأجنة و المعايير الأخرى المدروسة. أوضحت هذه الدراسة أن المستخلص الميثانولي للسذاب الجبلي بالجرعة المختبرة ليس له تأثير سام على تكوين البويضات و تكوين الجنين و الأعضاء المدروسة.

الكلمات المفتاحية: السذاب الجبلي، الجرذان، السمية الحادة و شبه المزمنة، الكبد، الكلى، المبايض، الأجنة.

Résumé

Ruta montana L. (rutaceae) localement connue sous le nom de fidjel est utilisée en médecine traditionnelle comme anaphrodisiaque, abortif et comme hypoglycémiant. Le but de ce travail est d'étudier la toxicité aigüe par la détermination de la dose létale moyenne (DL_{50}) des extraits de la partie aérienne de la plante chez les deux sexes pour une éventuelle classification toxicologique, et la toxicité sub-chronique pour évaluer l'effet de l'extrait méthanolique sur les principaux organes tels que le foie, le rein les ovaires, les constituants du sang et sur la reproduction des rats femelles. Pour la toxicité sub-chronique (45 jours), 14 rats femelles sont divisées en 2 groupes; groupe traité reçu par voie intra-péritonéale $38,7149 \text{ mg/kg} = 1/30 DL_{50}$ de l'extrait méthanolique et groupe témoin reçu de l'eau physiologique. Les effets sur les principaux organes (foie, rein, ovaire et sang) sont évalués. Pour déterminer l'effet de l'extrait méthanolique de cette plante sur la reproduction des rats femelles, 12 rattes restantes de la toxicité sub-chronique (7 traitées par l'extrait de la plante et 5 témoins) sont couplées par des rats mâles adultes sains (non traités) où les précédents paramètres sont aussi évalués. La valeur de la DL_{50} calculée par la méthode de Litchfield et Wilcoxon a été 524.8075 mg/kg (rats mâles), 398.1071 mg/kg (les femelles) pour l'extrait alcaloïdique et 1071.5193 mg/kg (rats mâles), 1161.4486 mg/kg (les femelles) pour l'extrait méthanolique. Dans l'étude sub-chronique, une diminution significative a été notée dans le poids corporel dans la 2^{ème} et la 7^{ème} semaine ($P < 0.05$). La masse relative du cerveau et des ovaires a enregistré une diminution et une augmentation significatives, respectivement ($P < 0,05$). La FSH (Follicle Stimulating Hormone) et la LH (Luteinizing Hormone) et les paramètres biochimiques n'ont pas enregistré de différence significative. Les paramètres hématologiques ont présenté une augmentation et une diminution significative dans TCMH (Teneur Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine) et IDR (Indice de Distribution des globules Rouges) respectivement ($P < 0.05$). L'histopathologie n'a révélé aucune anomalie dans les différents tissus étudiés. Dans l'effet de l'extrait méthanolique sur la reproduction des rattes, aucune anomalie n'a été enregistrée dans le nombre et le poids des embryons et les autres paramètres étudiés. Cette étude a révélé que l'extrait méthanolique de *Ruta montana* à la dose testée n'a aucun effet toxique sur l'ovogenèse, l'embryogénèse et les organes étudiés.

Mots clés: *Ruta montana* L., rats, toxicité aigüe et sub-chronique, foie, rein, ovaires, embryons.

Summary

Ruta montana L. (rutaceae) locally known as fidjel is used in traditional medicine as an aphrodisiac, abortive and as hypoglycemic. The aim of this work is to study the acute toxicity by the determination of the mean lethal dose (LD₅₀) of the extracts of the aerial parts of the plant in both sexes for a possible toxicological classification, and the sub-chronic toxicity to evaluate the effect of the methanol extract on the main organs such as liver, kidney, ovaries, blood constituents and on reproduction of female rats. In sub-chronic toxicity (45 days), 14 female rats were divided into 2 groups; treated group received intraperitoneally 38.7149 mg/kg = 1/30 LD₅₀ of the methanol extract and control group received physiological water. Effects on main organs (liver, kidney, ovary and blood) were evaluated. To determine the effect of the methanol extract of this plant on female rat's reproduction, 12 rats remaining from sub-chronic toxicity (7 treated with the extract of the plant and 5 controls) were coupled with healthy adult male rats (no treated) where the previous parameters were also evaluated. The LD₅₀ value calculated by the Litchfield and Wilcoxon method was 524.8075 mg/kg (male rats), 398.1071 mg/kg (females) for the alkaloid extract and 1071.5193 mg/kg (male rats), 1161.4486 mg/kg (females) for the methanol extract. In sub-chronic study, there was a significant reduction in body weight in the 2nd and 7th week (P<0.05). Relative mass of the brain and ovaries registered a significant decrease and increase, respectively (P<0.05). Follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH) and biochemical parameters did not record significant difference. Haematological parameters presented significant increase and decrease in mean corpuscular haemoglobin (MCH) and red cell distribution width (RDW), respectively (P<0.05). The histopathology revealed no abnormalities in different studied tissues. In the effect of methanol extract on female rat's reproduction, no abnormalities were registered in fetus's number and weight and the other studied parameters. The current study revealed that the methanol extract of *Ruta montana* at the tested dose had no toxic effect on ovogenesis, embryogenesis and subjected organs.

Key words: *Ruta montana* L., rats, acute and sub-chronic toxicity, liver, kidney, ovaries, embryos.

Liste des abréviations

Liste des abréviations

*****: Différence significative, $p < 0.050$.

AFE: Alcaloïdes Totaux des Feuilles.

AFL: Alcaloïdes Totaux des Fleurs.

ANOVA: Analyse de Variance

AT: Alcaloïdes Totaux.

CCM: Chromatographie sur Couche Mince

CCMH: Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine.

DL₅₀: Dose Létale 50

EB: Extrait Brut.

EDTA: Ethylène Diamine Tétra-Acétique.

FNS: Formule Numérique Sanguine.

FSH: Follicle Stimulating Hormone.

GB: Globule Blanc.

GnRH: Gonadotrophin Release Hormone.

GOT: Glutamate-Oxaloacetate Transaminase.

GPT: Glutamate-Pyruvate Transaminase.

GR: Globule Rouge.

H&E: Hématoxyline et Eosine

HCT: Hématocrite.

HGB: Hémoglobine.

IDP: Indice de Distribution des Plaquettes.

IDR: Indice de Distribution des globules Rouges.

LH: Luteinizing Hormone.

PAL: Phosphatase Alcaline.

PLT: Plaquette.

TCMH: Teneur Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine.

UV: Ultraviolet.

VGM: Volume Globulaire Moyen.

VPM: Volume Plaquettaire Moyen.

Liste des figures

Liste des figures

Figure 1 : Classification biogénétique des alcaloïdes des Rutacées.....	8
Figure 2 : Structure de montanine (1) isolé de <i>Ruta montana</i> de Turquie et 1-méthyl-4-méthoxy-2-quinolone (2), évolitrine (3), 2-(nonan-8-one)-(1H)-4-quinolone (4), la 2-(nonan-8-one)-4-méthoxy-quinoléine (5), 2-(nonan-8-one)-N-méthyl-4-quinolone (6) et 2-(décan-9-one)-N-méthyl-4-quinolone (7) isolés de <i>R. montana</i> de Rommani (Morocco).....	9
Figure 3 : Structure génériques des principaux flavonoïdes.....	9
Figure 4 : Structure de rutine isolée du <i>Ruta montana</i> d'Algérie.....	10
Figure 5: Dérivés coumarines isolés de <i>Ruta montana</i> L.....	11
Figure 6: (A) Système reproducteur de la ratte; (B) Distribution des blastocystes au jour 8 de la gestation chez la ratte.....	14
Figure 7: Coupe histologique d'ovaire d'une ratte (<i>Rattus norvegicus</i>).....	14
Figure 8: Cellules prédominantes des quatre phases: proestrus (a), œstrus (b), metestrus (c) et diestrus (d).....	16
Figure 9: Enchaînement des rétroactions réglant la fonction ovarienne.....	17
Figure 10: Profils hormonaux chez la ratte au cours du cycle œstral.....	18
Figure 11: L'ovogenèse chez la ratte.....	20
Figure 12: Schéma illustrant la folliculogénèse. A: antrum, Cf: cellule folliculeuse; CF: cavité folliculaire; CG: cellule de la granulosa; CP: cumulus proligier; CR: corona radiata; LB: lame basale; OV: ovocyte; TH.E: thèque externe; Th.I: thèque interne; VS: vaisseau sanguin; ZP: zone pellucide.....	21
Figure 13: Les phases principales du développement folliculaire et de la maturation ovocytaire. Dans le cas des rongeurs, la dépendance à FSH est acquise au moment de la formation de l'antrum.....	22

Liste des figures

Figure 14: Folliculogénèse chez la ratte. Taux de sortie de la réserve des follicules primordiaux; taille et vitesse de croissance folliculaire.....	23
Figure 15: Schéma illustrant l'embryogénèse des animaux.....	24
Figure 16: Segmentation rotationnelle chez les mammifères.....	24
Figure 17: La gastrulation chez les mammifères.....	25
Figure 18: (A) la plante <i>Ruta montana</i> L. (B) fruit de <i>Ruta montana</i> L	26
Figure 19: Extraction des alcaloïdes totaux de la partie aérienne de la plante <i>Ruta montana</i> L.....	28
Figure 20: Technique de prélèvement de la glaire vaginale de la rate.....	34
Figure 21: Frottis vaginal contenant des spermatozoïdes.....	34
Figure 22: Dissection de la rate gestante (A) et prélèvement de l'utérus (B).....	35
Figure 23: Chromatogrammes des extraits de la partie aérienne de <i>Ruta montana</i> après révélation par révélateur de Dragendorff (A) et UV= 254 nm (B), 365 nm (C). AT: alcaloïdes totaux, AFE: alcaloïdes totaux des feuilles, AFL: alcaloïdes totaux des fleurs, EB: extrait brut.....	38
Figure 24: Droite de détermination de la DL_{50} chez les rats mâles traités par voie intrapéritonéale par l'extrait alcaloïdique de <i>Ruta montana</i> L. par la méthode de Litchfield et Wilcoxon (1949).....	42
Figure 25: Droite de détermination de la DL_{50} chez les rats femelles traités par voie intrapéritonéale par l'extrait alcaloïdique de <i>Ruta montana</i> L. par la méthode de Litchfield et Wilcoxon (1949).....	44
Figure 26: Graphique déterminant la sensibilité de sexe (rats mâles et femelles) à l'extrait alcaloïdique de <i>Ruta montana</i>	45
Figure 27: Droite de détermination de la DL_{50} chez les rats femelles traités par voie intrapéritonéale par l'extrait brut de <i>Ruta montana</i> L. par la méthode de Litchfield et Wilcoxon (1949).....	48

Liste des figures

- Figure 28:** Droite de détermination de la DL₅₀ chez les rats mâles traités par voie intrapéritonéale par l'extrait brut de *Ruta montana* L. par la méthode de Litchfield et Wilcoxon(1949).....50
- Figure 29:** Graphique déterminant la sensibilité de sexe (rats mâles et femelles) à l'extrait brut méthanolique de *Ruta montana*.....51
- Figure 30:** L'évolution de poids corporel (g) des rattes témoins et traitées par la dose de 38.7149 mg/kg (=1/30 DL₅₀) de l'extrait brut méthanolique de la plante *Ruta montana* dans les conditions de la toxicité subchronique. Les valeurs sont présentées en moyenne ± écart type, * significativement différent, P<0.05.....53
- Figure 31:** Taux sériques d'urée et de la créatinine des rattes témoins et traitées dans les conditions de la toxicité subchronique par la dose de 38.7149 mg/kg (=1/ 30 DL₅₀) de l'extrait brut méthanolique de la plante *Ruta montana*. Les valeurs sont présentées en moyenne ±écart type.....54
- Figure 32:** Taux sérique de «GOT, GPT et PAL » des rattes témoins et traitées dans les conditions de la toxicité subchronique par la dose de 38.7149 mg/kg (=1/ 30 DL₅₀) de l'extrait brut méthanolique de la plante *Ruta montana*. Les valeurs sont présentées en moyenne ±écart type.....55
- Figure 33:** Taux sérique de « bilirubine totale, directe et indirecte » des rattes témoins et traitées dans les conditions de la toxicité subchronique par la dose de 38.7149 mg/kg (=1/ 30 DL₅₀) de l'extrait brut méthanolique de la plante *Ruta montana*. Les valeurs sont présentées en myenne ±écart type.....56
- Figure 34:** Taux sérique de « LH, FSH » des rattes témoins et traitées dans les conditions de la toxicité subchronique par la dose de 38.7149 mg/kg (=1/ 30 DL₅₀) de l'extrait brut méthanolique de la plante *Ruta montana*. Les valeurs sont présentées en moyenne ±écart type.....56
- Figure 35:** Coupes histologiques de tissu rénale des rattes témoins (A) et traitées dans les conditions de la toxicité subchronique par la dose de 38.7149 mg/kg (=1/ 30 DL₅₀) de l'extrait brut méthanolique de la plante *Ruta montana* (B) C.S : congestion sanguine. Coloration (H & E).....58

Liste des figures

- Figure 36:** Coupes histologiques de tissu hépatique des rattes témoins (A) et traitées dans les conditions de la toxicité subchronique par la dose de 38.7149 mg/kg (=1/ 30 DL₅₀) de l'extrait brut méthanolique de la plante *Ruta montana* (B) C.S : congestion sanguine. Coloration (H & E).....59
- Figure 37:** Coupes histologiques de tissu ovarien des rattes témoins (A) et traitées dans les conditions de la toxicité subchronique par la dose de 38.7149 mg/kg (=1/ 30 DL₅₀) de l'extrait brut méthanolique de la plante *Ruta montana* (B). F.P : follicule primaire, F.S : follicule secondaire, F.T : follicule tertiaire, C.J : corps jaune. Coloration (H & E).....60
- Figure 38:** Taux sériques de la créatinine et d'urée des rattes témoins et traitées gestantes par la dose de 38.7149 mg/kg (=1/ 30 DL₅₀) de l'extrait brut méthanolique de la plante *Ruta montana*. Les valeurs sont présentées en moyenne ±écart type.....64
- Figure 39:** Taux sérique de «GOT, GPT et PAL » des rattes témoins et traitées gestantes par la dose de 38.7149 mg/kg (=1/ 30 DL₅₀) de l'extrait brut méthanolique de la plante *Ruta montana*. Les valeurs sont présentées en moyenne ±écart type.....64
- Figure 40:** Taux sérique de « bilirubine totale, directe et indirecte » des rattes témoins et traitées gestantes par la dose de 38.7149 mg/kg (=1/ 30 DL₅₀) de l'extrait brut méthanolique de la plante *Ruta montana*. Les valeurs sont présentées en moyenne ±écart type.....65
- Figure 41:** Taux sérique de «LH et FSH» des rattes témoins et traitées gestantes par la dose de 38.7149 mg/kg (=1/ 30 DL₅₀) de l'extrait brut méthanolique de la plante *Ruta montana*. Les valeurs sont présentées en moyenne ±écart type.....65
- Figure 42:** Coupes histologiques de tissu hépatique des rattes témoins (A) et traitées gestantes par la dose de 38.7149 mg/kg (=1/ 30 DL₅₀) de l'extrait brut méthanolique de la plante *Ruta montana* (B) C.S : congestion sanguine. Coloration (H & E).....67
- Figure 43:** Coupes histologiques de tissu rénale des rattes témoins (A) et traitées gestantes par la dose de 38.7149 mg/kg (=1/ 30 DL₅₀) de l'extrait brut méthanolique de la plante *Ruta montana* (B). Coloration (H & E).....68

Liste des figures

Figure 44: Coupes histologiques de tissu ovarien des rattes témoins (A) et traitées gestantes par la dose de 38.7149 mg/kg (=1/ 30 DL₅₀) de l'extrait brut méthanolique de la plante *Ruta montana* (B). F.P : follicule primaire, F.S : follicule secondaire, F.T : follicule tertiaire, F.G : follicule de de Graff, C.J : corps jaune. Coloration (H & E).....69

Liste des tableaux

Liste des tableaux

Tableau 1: Résultats de screening phytochimique de la partie aérienne de la plante <i>Ruta montana</i>	39
Tableau 2: Dose-effet de l'extrait alcaloïdique des parties aériennes de <i>Ruta montana</i> chez les rats mâles traités par voie intra-péritonéale.....	41
Tableau 3: Dose-effet de l'extrait alcaloïdique des parties aériennes de <i>Ruta montana</i> chez les rats femelles traitées par voie intra-péritonéale.....	43
Tableau 4: Les différents paramètres pour déterminer si il' y a une sensibilité de sexe (rats mâles et femelles) à l'extrait alcaloïdique de <i>Ruta montana</i>	45
Tableau 5: Dose-effet de l'extrait brut méthanolique des parties aériennes de <i>Ruta montana</i> chez les rats femelles traitées par voie intra-péritonéale.....	47
Tableau 6: Dose-effet de l'extrait brut méthanolique des parties aériennes de <i>Ruta montana</i> chez les rats mâles traitées par voie intra-péritonéale.....	49
Tableau 7: Les différents paramètres pour déterminer si il' y a une sensibilité de sexe (rats mâles et femelles) à l'extrait brut méthanolique de <i>Ruta montana</i>	51
Tableau 8: La masse relative des organes des rattes témoins et traitées dans les conditions de la toxicité subchronique par la dose de 38.7149 mg/kg (=1/ 30 DL ₅₀) de l'extrait brut méthanolique de la plante <i>Ruta montana</i>	54
Tableau 9: Valeurs des paramètres hématologiques des rattes témoins et traitées dans les conditions de la toxicité subchronique par la dose de 38.7149 mg/kg (=1/ 30 DL ₅₀) de l'extrait brut méthanolique de la plante <i>Ruta montana</i>	61
Tableau 10: Le poids corporel (g) des rattes témoins et traitées gestantes par la dose de 38.7149 mg/kg (= 1/ 30 DL ₅₀) de l'extrait brut méthanolique de la plante <i>Ruta montana</i>	62
Tableau 11: La masse relative des organes des rattes témoins et traitées gestantes par la dose de 38.7149 mg/kg (= 1/ 30 DL ₅₀) de l'extrait brut méthanolique de la plante <i>Ruta montana</i> ..	62

Liste des tableaux

Tableau 12: Nombre des rats et leur poids des rattes témoins et traitées par la dose de 38.7149 mg/kg (=1/ 30 DL₅₀) de l'extrait brut méthanolique de la plante *Ruta montana*.....63

Tableau 13: Valeurs des paramètres hématologiques des rattes témoins et traitées gestantes par la dose de 38.7149 mg/kg (= 1/ 30 DL₅₀) de l'extrait brut méthanolique de la plante *Ruta montana*70

Sommaire

Liste des abréviations	I
Liste des figures.....	II
Liste des tableaux	VII
Introduction	1

Partie I : Revue bibliographique

I- La plante <i>Ruta montana</i> L.....	3
I- 1 Etymologie.....	3
I- 2 Historique.....	3
I- 3 Position dans la systématique	3
I- 4 Description botanique	3
I- 5 Origine et distribution géographique	4
I- 6 Noms communs	4
I- 7 Utilisations de <i>Ruta montana</i>	4
I- 8 Toxicité de <i>Ruta montana</i>	5
I- 8- 1 Circonstances de l'intoxication	5
I- 8- 2 Symptômes de l'intoxication.....	5
I- 9 Traitement des intoxications par <i>Ruta montana</i>	6
II- Principaux métabolites secondaires de <i>Ruta montana</i>L.....	7
II - 1 Les alcaloïdes	7
II - 2 Les flavonoïdes.....	9
II - 3 Les coumarines	10
II- 4 L'huile essentielle.....	11
III- Le rat de laboratoire.....	13
III- 1 Le rat comme un modèle expérimental	13
III- 2 L'appareil reproducteur de la ratte	13
III- 3 Physiologie de la reproduction de la ratte	14
III- 3- 1 Le cycle oestral	15
III- 3- 2 Régulation hormonal du cycle oestral.....	16
III- 3- 3 Variations des niveaux hormonaux au cours de cycle œstral	18

Sommaire

III- 4 La gamétogenèse chez la ratte.....	18
III- 4- 1 L'ovogenèse.....	19
III- 4- 1- 2 Les phases de l'ovogenèse.....	19
III- 4- 2 La folliculogénèse.....	20
III- 4- 2- 1 Les phases de la folliculogénèse.....	22
III- 4- 2- 2 Durée de la croissance folliculaire.....	23
III- 5 L'embryogénèse.....	23
III- 5- 1 La fécondation.....	23
III- 5- 2 La segmentation (ou clivage).....	23
III- 5- 3 La gastrulation.....	25
III- 5- 4 L'organogénèse.....	25

Partie II: Partie pratique

I- Matériel et méthodes.....	26
I- 1 Matériel végétale.....	26
I- 1- 1 Extraction.....	26
I- 1- 1- 1 Extraction des alcaloïdes totaux.....	26
I- 1- 1- 2 Extraction méthanolique de la plante.....	29
I- 1- 2 Analyse qualitative par la chromatographie sur couche mince (CCM).....	29
I- 1- 3 Screening phytochimique de l'extrait méthanolique.....	29
I- 1- 3- 1 Mise en évidence des alcaloïdes.....	30
I- 1- 3- 2 Mise en évidence des tanins.....	30
I- 1- 3- 3 Mise en évidence des anthocyanes.....	30
I- 1- 3- 4 Mise en évidence des coumarines.....	30
I- 1- 3- 5 Mise en évidence des terpénoïdes (réaction de Lieberman Burchard).....	30
I- 1- 3- 6 Mise en évidence des stéroïdes (test de Salkowski).....	31
I- 1- 3- 7 Mise en évidence des flavonoïdes.....	31
I- 1- 3- 8 Mise en évidence des saponines.....	31
I- 2 Matériel animal.....	31
I- 2- 1 Détermination de la DL ₅₀ des alcaloïdes totaux et de l'extrait méthanolique de la partie aérienne de la plante <i>Ruta montana</i> chez les rats mâles et femelles.....	31
I- 2- 2 Toxicité sub-chronique chez les rats femelles.....	32
I- 2- 3 Etude de l'effet de l'extrait méthanolique de la partie aérienne de la plante <i>Ruta montana</i> sur la reproduction chez les rats femelles.....	33

Sommaire

I- 2- 3- 1 Procédure de réalisation du couplage.....	33
I- 2- 3- 1- 1 Technique de prélèvement de la glaire vaginale et réalisation du frottis vaginale.....	33
I- 2- 3- 2 Séparation des rattes couplées.....	34
I- 2- 4 Etude des hormones et quelques paramètres hématologiques et biochimiques sérique.....	36
I- 2- 5 Etude histopathologique.....	36
I- 2- 6 Analyse statistique.....	36

Partie III: Résultats

I- Résultats.....	37
I- 1 Rendement des extractions.....	37
I- 2 Analyse qualitative des alcaloïdes totaux par CCM.....	37
I- 3 Screening phytochimique.....	38
I- 4 Détermination de la DL ₅₀ des alcaloïdes totaux de la partie aérienne de la plante <i>Ruta montana</i> chez les rats mâles.....	41
I- 4- 1 Observation du comportement des animaux.....	41
I- 4- 2 Calcul de la DL ₅₀ par la méthode de Litchfield et Wilcoxon (1949).....	41
I- 5 Détermination de la DL ₅₀ des alcaloïdes totaux de la partie aérienne de la plante <i>Ruta montana</i> chez les rats femelles.....	43
I- 5- 1 Observation du comportement des animaux.....	43
I- 5- 2 Calcul de la DL ₅₀ par la méthode de Litchfield et Wilcoxon (1949).....	43
I- 6 La sensibilité du sexe.....	44
I- 7 Détermination de la DL ₅₀ de l'extrait brut de la plante <i>Ruta montana</i> chez les rats femelles.....	46
I- 7- 1 Observation du comportement des animaux.....	46
I- 7- 2 Calcul de la DL ₅₀ par la méthode de Litchfield et Wilcoxon (1949).....	46
I- 8 Détermination de la DL ₅₀ de l'extrait brut de la plante <i>Ruta montana</i> chez les rats mâles.....	49
I- 8- 1 Observation du comportement des animaux.....	49
I- 8- 2 Calcul de la DL ₅₀ par la méthode de Litchfield et Wilcoxon (1949).....	49
I- 9 La sensibilité du sexe.....	51
I- 10 Toxicité subchronique.....	52

Sommaire

I- 10- 1 Effet de l'extrait brut méthanolique de la plante <i>Ruta montana</i> sur le poids corporel et la masse relative des rats femelles albinos Wistar	52
I- 10- 2 Etude des paramètres biochimiques	54
I- 10- 3 Etude des hormones de reproduction	56
I- 10- 4 Etude des paramètres hématologiques.....	57
I- 10- 5 Etude histopathologique	57
I- 11 Etude de l'effet de l'extrait méthanolique de la partie aérienne de la plante <i>Ruta montana</i> sur la reproduction des rats femelles.....	62
I- 11- 1 Effet de l'extrait brut méthanolique de la partie aérienne de la plante <i>Ruta montana</i> sur le poids corporel et la masse relative des organes des rats femelles gestantes	62
I- 11- 2 Effet de l'extrait brut méthanolique de la plante <i>Ruta montana</i> sur le nombre et le poids des embryons.....	63
I- 11- 3 Etude des paramètres biochimiques	63
I- 11- 4 Etude des hormones de reproduction	65
I- 11- 5 Etude des paramètres hématologiques.....	66
I- 11- 6 Etude histopathologique	66

Partie IV: Discussion

Discussion	71
1. Le rendement des extractions	71
2. La chromatographie sur couche mince (CCM)	72
3. Screening phytochimique	72
4. La DL ₅₀ des alcaloïdes totaux et de l'extrait méthanolique de <i>Ruta montana</i> chez les rats mâles et femelles.....	73
5. La sensibilité du sexe.....	75
6. Toxicité subchronique chez les rats femelles	75
7. Effet de l'extrait méthanolique de <i>Ruta montana</i> sur la reproduction des rats femelles.....	78

Partie V: Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives	80
---	----

Partie VI: Références bibliographiques

Références bibliographiques

Introduction

Introduction

Les plantes médicinales sont utilisées depuis des siècles dans le traitement des maladies humaines, y compris les problèmes de fertilité (Almasad *et al.*, 2007), en raison de la valeur thérapeutique de leurs constituants (Qazan, 2008), sans la connaissance réelle de leur potentiel toxique. Parmi les problèmes de la médication par les plantes; les doses prescrites sont imprécises, entraînant fréquemment un surdosage (Usman *et al.*, 2014).

Selon l'OMS, les plantes médicinales sont utilisées par plus de 80% des personnes dans le monde pour leurs problèmes de santé, où l'usage traditionnel, la source naturelle et le côté économique, sont les raisons de cette utilisation mondiale (Kpemissi *et al.*, 2020). Parmi ces plantes on trouve *Ruta montana* L.

Ruta montana L. (Rutaceae) est une plante de 20-40 cm (Bonnier, 1990), originaire d'Europe, particulièrement du bassin méditerranéen, mais elle est largement répandue dans toutes les régions tempérées et tropicales (Harsha et Latha, 2011).

Ruta montana L. localement connue sous le nom de fidjel (Bouzidi *et al.*, 2012), contient de nombreux composés appartenant à différentes classes chimiques tels que les alcaloïdes, les coumarines, les flavonoïdes, les huiles essentielles, les saponines, les triterpènes, les phénols et les lignanes (Zellagui *et al.*, 2012). La richesse de cette plante en ces composés explique probablement sa large utilisation en médecine traditionnelle (Kara *et al.*, 2016).

Cette plante n'est presque plus utilisée en Europe; en revanche elle reste une plante appréciée par les tradipraticiens notamment dans le bassin méditerranéen et en Amérique du Sud (Masri *et al.*, 2015); où elle est utilisée comme emménagogue, anaphrodisiaque, abortif (Bellakhdar *et al.*, 1991; Kambouche *et al.*, 2008; Pollio *et al.*, 2008; Masri *et al.*, 2015), également comme antihelminthique (Masri *et al.*, 2015), hypoglycémiant (Benkhniqie *et al.*, 2014), antirhématique (Bellakhdar *et al.*, 1991; Ouarghidi *et al.*, 2013), antipyrétique (Bnouham *et al.*, 2002), dans le traitement des maladies hépatiques (Lakhdar., 2015), l'hypertension (Eddouks *et al.*, 2002) et le vitiligo (Daoudi *et al.*, 2016).

D'après la recherche bibliographique entretenue, la plante *Ruta montana* L. est largement utilisée en médecine traditionnelle et aucune investigation scientifique concernant les études toxicologiques de cette plante sur les rats (albinos wistar) telles que la détermination de la DL₅₀, l'étude subchronique et principalement l'effet des principes actifs de cette plante sur l'évolution de l'ovogenèse et sa répercussion directe sur l'embryogénèse. Le

Introduction

but de cette étude est de déterminer la valeur de la DL₅₀ de l'extrait alcaloïdique et l'extrait brut méthanolique des parties aériennes de *R. montana* sur les rats mâles et femelles (albinos wistar) et l'étude de la toxicité subchronique de l'extrait brut méthanolique des parties aériennes de *Ruta montana* L. sur le foie, le rein, l'ovaire et l'embryogénèse des rats femelles.

Partie I :

Revue bibliographique

I- La plante *Ruta montana* L.

I- 1 Etymologie

Ruta : vient du grec 'rhyté' qui signifie sauver, prévenir, ou de 'reô' qui signifie qui coule faisant certainement référence à ces vertus emménagogues (Doerper., 2008).

I- 2 Historique

Ruta, ce nom est à-peu-près le même dans toutes les langues. Von, en grec; rata, en latin; ruz, en runique ; rude, ruta ou rutu, en anglo-saxon; rutiza, en esclavon; en français et anglais, rue, etc. Cette identité dénote une ancienneté qui rend toute origine difficile à trouver et qui doit en tenir lieu (Théis., 1810).

I- 3 Position dans la systématique

Règne: Plantae.

Sous règne: Tracheobionta.

Embranchement: Spermatophyta.

Sous embranchement: Magnoliophyta.

Classe: Magnoliopsida.

Sous classe: Rosidae.

Super ordre: Rutanae.

Ordre: Rurales.

Famille: Rutaceae.

Sous famille: Rutoideae

Genre: Ruta.

Espèce: *Ruta montana* L. (Bonnier., 1990; Wiart., 2006; Takhtajan., 2009).

I- 4 Description botanique

Ruta montana est une plante de 20-40 cm, glauque, glabre et glanduleuse dans le haut. Ses feuilles sont oblongues dans leur pourtour, finement découpées en segments linéaires-obtus, le terminal un peu plus large (Bonnier., 1990; Coste., 2011). Elle épanouit depuis le mois d'avril jusqu'au mois d'août (Bonnier., 1990) des fleurs jaunes, petites de 8- 10 mm, groupées en grappes serrées, leurs pétales spatules, ondulés et non ciliés. Ses fruits sont sous forme d'une capsule allongée de 6-7 x 5-6 mm à 4-5 lobes aigus à pédicelles atteignant 5-10 mm (Quezel et Santa., 1963; Coste., 2011; Hammiche *et al.*, 2013).

I- La plante Ruta montana L.

I- 5 Origine et distribution géographique

Ruta est originaire d'Europe, particulièrement la région méditerranéenne, mais elle est largement distribuée dans toutes les régions tempérées et tropicales (Harsha et Latha., 2011).

Ruta montana pousse dans la région méditerranéenne de la France, dans l'Europe méridionale, dans le sud-ouest de l'Asie et dans le nord de l'Afrique; elle ne s'élève pas sur les montagnes, en général, au-dessus de 500 m d'altitude (Bonnier., 1990). La rue des montagnes se trouve dans les endroits secs et pierreux (Quezel et Santa., 1963; Bonnier., 1990; Pollio., 2008), elle se développe sur des sols limoneux riches en calcaire total (Bouzidi *et al.*, 2012) et on peut la trouver dans la plupart de n'importe quel genre de sol, fréquemment sur des secteurs dérangés près des maisons ou des routes (Miguel., 2003). En Algérie, on la trouve jusqu'au niveau de l'Atlas saharien (Hammiche *et al.*, 2013; Hazzit *et al.*, 2015).

I- 6 Noms communs

Algérie: fidjel (Bouzidi *et al.*, 2012).

Berbère: awermi (Corriente., 1998).

Maroc: âwermī (Ouarghidi *et al.*, 2013; Eddouks *et al.*, 2002), fijel, fidjel (Lakhdar., 2015; Bnouham., 2002).

Tunisie : figel (Masri *et al.*, 2015).

France: rue des montagnes, rue sauvage (Benkhniqie *et al.*, 2014).

Espagne: chocho de vieja (old woman's cunt), espiguilla (little spike), perejil borriquero (donkey's parsley), rtia, ruda, ruda montesina (wild rue), ruda silvestre (wild rue) (Miguel., 2003).

Turkey: sedefotu (Akalın et Ertug., 2003).

I- 7 Utilisations de *Ruta montana*

Ruta montana n'est quasiment plus utilisée en Europe; par contre elle reste une plante appréciée par les tradipraticiens notamment dans le bassin méditerranéen et en Amérique du sud (Masri *et al.*, 2015).

- ✚ Elle est traditionnellement utilisée comme emménagogue, comme anaphrodisiaque chez les hommes et comme abortive (Bellakhdar *et al.*, 1991; Kambouche *et al.*, 2008; Pollio *et al.*, 2008; Masri *et al.*, 2015).
- ✚ La tige feuillée, en décoction dans l'eau, est administrée contre le diabète à raison de prendre un verre par jour après le déjeuner (Benkhniqie *et al.*, 2014).
- ✚ La rue, et surtout son huile essentielle, sont antihelminthiques (Masri *et al.*, 2015).

I- La plante Ruta montana L.

- ✚ Elle est utilisée comme antirhumatismal (Bellakhdar *et al.*, 1991; Ouarghidi *et al.*, 2013), antipyrétique (Bnouham *et al.*, 2002; Kabouche *et al.*, 2003), et dans le traitement des maladies du foie, les maux d'estomac et les affections de l'appareil respiratoire (Lakhdar., 2015).
- ✚ La partie aérienne de cette plante est utilisée dans le traitement de l'hypertension et des maladies cardiaques dans la région du sud-est du Maroc (Tafilalet) (Eddouks *et al.*, 2002).
- ✚ Le cataplasme des feuilles est utilisé pour traiter surtout les affections dermatologiques telles que le vitiligo, les maux de tête, les contusions et les œdèmes. L'infusion des feuilles est souvent préconisée en cas d'épistaxis, de migraines et d'épilepsie (Daoudi *et al.*, 2016).
- ✚ Elle est aussi employée comme antispasmodique, rubéfiant (Zellagui *et al.*, 2012; Hammami *et al.*, 2015; Kara *et al.*, 2016), diurétique et pour les otites et les bourdonnements d'oreille (Pollio *et al.*, 2008; Hammiche., *et al.* 2013).
- ✚ Elle est employée comme tonique, antioxydant, antimicrobienne et dans le traitement de malaria (Khadhri *et al.*, 2016).
- ✚ Dans quelques régions, la rue est cultivée pour éloigner des moustiques et des souris (Frutos *et al.*, 1995).
- ✚ En Algérie, l'essence de *Ruta montana* était très appréciée dans l'industrie des parfums synthétiques (Hammiche *et al.*, 2013).

I- 8 Toxicité de *Ruta montana*

I- 8- 1 Circonstances de l'intoxication

Les cas d'intoxication les plus fréquents par la rue des montagnes 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 (Benkhnigue *et al.*, 2014; Daoudi *et al.*, 2016). Les autres cas d'intoxication sont lors d'utilisation de la plante en friction sur la peau comme répulsif contre les moustiques, en cataplasmes, lors de certains traitements (vitiligo et psoriasis) et lors de la récolte de la plante ou diverses manipulations de préparation (Hammiche *et al.*, 2013).

I- 8- 2 Symptômes de l'intoxication

L'intoxication par *Ruta montana* se manifeste par une salivation importante avec gonflement de la langue, de la gastroentérite, des vertiges, de la somnolence, de la prostration, un petit pouls, de l'hyperthermie et des hémorragies utérines suivent (Bnouham *et al.*, 2002;

I- La plante Ruta montana L.

Hammiche *et al.*, 2013; Benkhnigue *et al.*, 2014), selon la gravité de l'intoxication, il peut se développer un coma, une insuffisance rénale et hépatique pouvant conduire au décès (Masri *et al.*, 2015). Par contact sur la peau, la rue peut provoquer, en raison de la présence de furocoumarines, des éruptions cutanées prurigineuses et des inflammations avec formation de cloques (Frutos *et al.*, 1995; Benkhnigue *et al.*, 2014).

I- 9 Traitement des intoxications par *Ruta montana*

Le traitement des atteintes dermatologiques est symptomatique lorsqu'il s'agit d'irritation (compresses froides, pommades anti-inflammatoires, etc.); l'hyperpigmentation régresse spontanément en quelques semaines (Hammiche., *et al.* 2013).

II- Principaux métabolites secondaires de *Ruta montana*

Ruta montana renferme de nombreux composés appartenant à différentes classes chimiques: coumarines, flavonoïdes, phénols, triterpènes, saponines, lignanes, huile essentielle et des alcaloïdes (Ulubelen., 1990; Hammiche *et al.*, 2013; Daoudi *et al.*, 2016). La nature et les teneurs de ces composés sont très variables selon le stade de développement et la distribution géographique (Hammiche *et al.*, 2013).

II- 1 Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances azotées basiques, d'origine naturelle, le plus souvent végétale (Zenk et Juenger., 2007). A l'état normal, ils sont généralement salifiés par les acides organiques (tartrates, malates...) ou combinés à des tanins (Guignard *et al.*, 1985).

Les alcaloïdes de *Ruta montana* sont liés aux quinoléines (quinoléine - quinolone) aux quinazolines (quinazoline et quinazolone), aux furoquinoléines et aux dérivés de l'acridone (Hammiche *et al.*, 2013) (fig.1).

❖ Les quinoléines

Ce groupe d'alcaloïdes a deux α structurellement différents; le α des alcaloïdes trouvés dans le genre *Cinchona* (Rubiaceae), est l-tryptophane, tels que la quinine, le deuxième type d'alcaloïde de quinoléine, que l'on trouve surtout dans la famille des Rutacées, a α comme acide anthranilique. La biosynthèse des alcaloïdes furoquinoléiques implique la formation du système cyclique quinoléine avant l'introduction des chaînes latérales citant comme exemple la skimmianine.

❖ Les quinazolines

Les quinazolines contiennent plus de 100 composés. Ils ont été isolés des sources animales et végétales, où la famille des Rutaceae est particulièrement riche en ces alcaloïdes. Le α des quinazolines est l'acide anthranilique, bien qu'il existe aussi dans certains cas une alternative α , telle que phénylalanine dans le cas d'arborine ou d'ornithine. Le β est l'anthranoylphénylalanine. L'alcaloïde typique de ce groupe comprend, par exemple, l'arborine (Aniszewski., 2007).

❖ Les acridones

Plus de 100 alcaloïdes d'acridone sont connus. Les alcaloïdes d'acridone se produisent dans les animaux et les plantes où ils sont particulièrement caractéristiques de la famille des

II- Principaux métabolites secondaires de *Ruta montana*

Rutaceae, dont la biosynthèse met en jeu une unité anthranilique et trois unités acétates (Seigler., 1998).

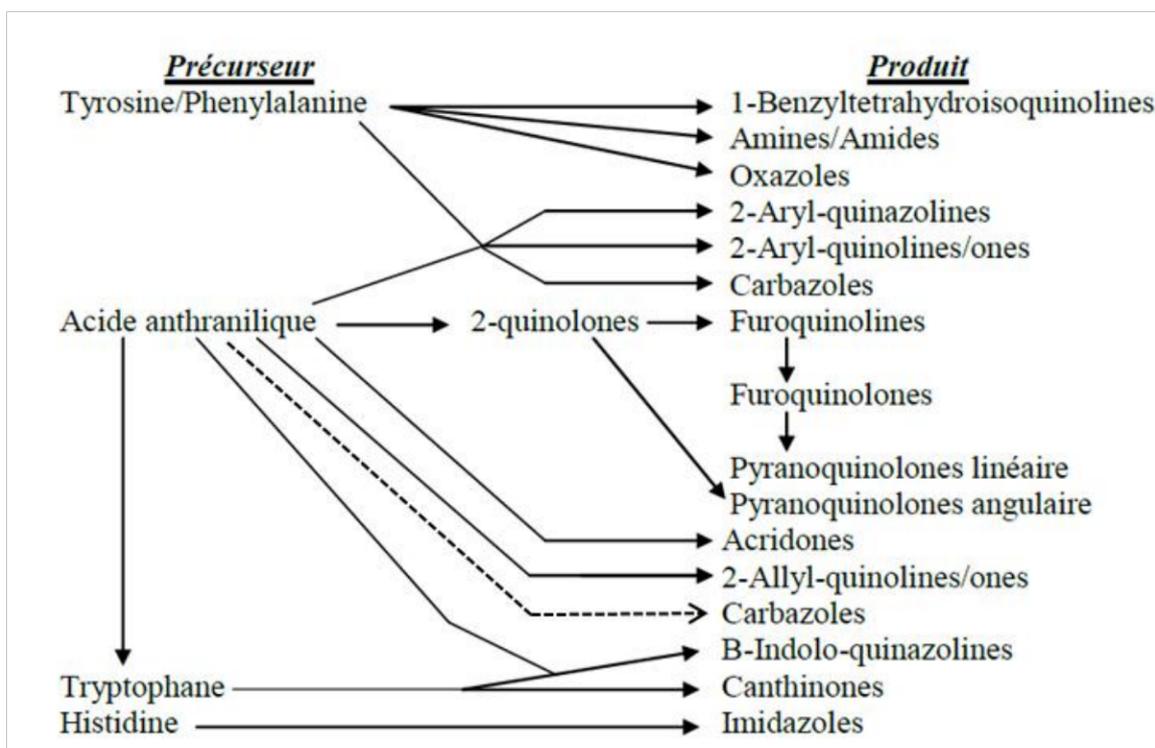


Figure 1 : Classification biogénétique des alcaloïdes des Rutacées (Waterman, 1975).

Ruta montana a été étudié par des groupes de chercheurs citant Ulubelen (1990) qui a isolé un nouvel alcaloïde montanine (**1**) de la partie aérienne de cette plante de Turquie aussi Touati et ces collaborateurs (2000), ont isolé Deux alcaloïdes connus et quatre nouveaux alcaloïdes de type quinoléine et 4-quinolone de *Ruta montana* de Rommani (Morocco). Les composés connus étaient la 1-méthyl-4-méthoxy-2-quinolone (**2**) et l'évolitrine (**3**), les nouveaux étaient la 2-(nonan-8-one)-(1H)-4-quinolone (**4**), la 2-(nonan-8-one)-4-méthoxy-quinoléine (**5**), 2-(nonan-8-one)-N-méthyl-4-quinolone (**6**) et 2-(décan-9-one)-N-méthyl-4-quinolone (**7**) (fig.2).

II- Principaux métabolites secondaires de *Ruta montana*

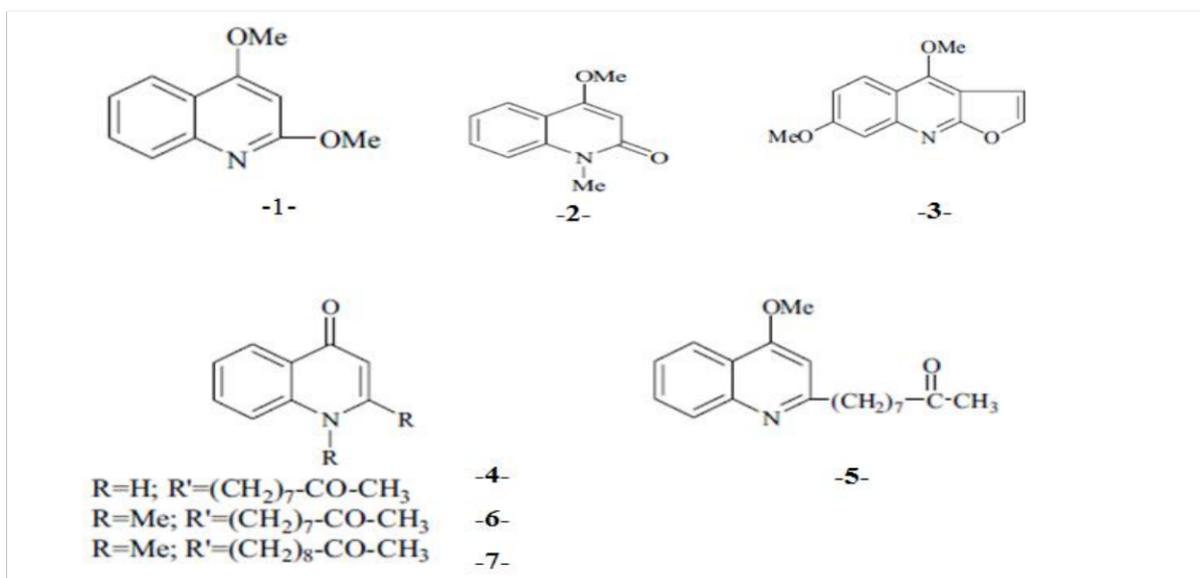


Figure 2: Structure de montanine (1) isolé de *Ruta montana* de Turquie (Ulubelen., 1990) et 1-méthyl-4-méthoxy-2-quinolone (2), évolitrine (3), 2-(nonan-8-one)-(1H)-4-quinolone (4), la 2-(nonan-8-one)-4-méthoxy-quinoléine (5), 2-(nonan-8-one)-N-méthyl-4-quinolone (6) et 2-(décane-9-one)-N-méthyl-4-quinolone (7) isolés de *R. montana* de Rommani (Morocco) (Touati *et al.*, 2000; Ulubelen et Ozturk, 2006).

II- 2 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent la classe la plus répandue des composés phénoliques dans le règne végétal. Comportant quinze carbones, avec deux cycles aromatiques reliés par un pont en trois-carbone. Les principaux sous-classes des flavonoïdes sont les flavones, les flavonols, les flavan-3-ols, les isoflavones, les flavanones et les anthocyanidines (Crozier *et al.*, 2006) (fig.3)

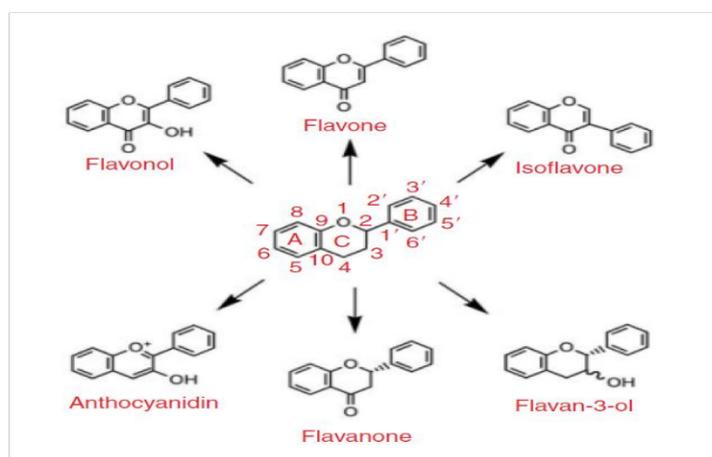


Figure 3: Structure génériques des principaux flavonoïdes (Crozier *et al.*, 2006).

II- Principaux métabolites secondaires de *Ruta montana*

Ce sont des pigments simples ou glycosylés hydrosolubles présents dans les vacuoles des cellules végétales, responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. Chez les plantes supérieures, les flavonoïdes sont impliqués dans la filtration d'UV (ultraviolet) et la fixation symbiotique de l'azote (Krief., 2003; Kabera *et al.*, 2014).

D'après les travaux de Benziane (2007) le seul flavonoïde isolé de *Ruta montana* est la rutine; un flavonoïde diglycosylé (fig.4).

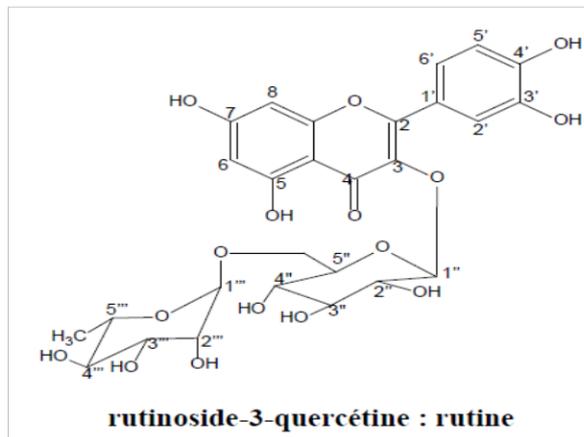


Figure 4: Structure de rutine isolée du *Ruta montana* d'Algérie (Benziane., 2007).

II- 3 Les coumarines

Les coumarines sont des 2H-1- benzopyran -2- ones, ils sont considérés comme étant des lactones des acides 2-hydroxy-Z-cinnamiques (Bruneton., 1999).

Elles se localisent dans toutes les parties de la plante et notamment dans les fruits et les huiles essentielles des graines (Seigler., 1998), elles sont fréquemment à l'origine des hétérosides. Les coumarines libres sont solubles dans les alcools et dans les solvants organiques ou les solvants chlorés avec lesquels on peut les extraire. Les formes hétérosidique sont plus ou moins solubles dans l'eau (Bruneton., 1999).

Les coumarines des Rues sont essentiellement des coumarines simples ou des dimères, des furocoumarines et des dihydrofurocoumarines (Hammiche *et al.*, 2013), parmi les dérivés coumarines isolés de *Ruta montana* L. on a: xanthatoxine, bergaptène, rutamarine, chalepensine, (\pm) -oxypeucedanin, daphnorétine, daphnorétine méthyl éther et le bergaptol (Ulubelen et Öztürk., 2006). (fig.5).

II- Principaux métabolites secondaires de *Ruta montana*

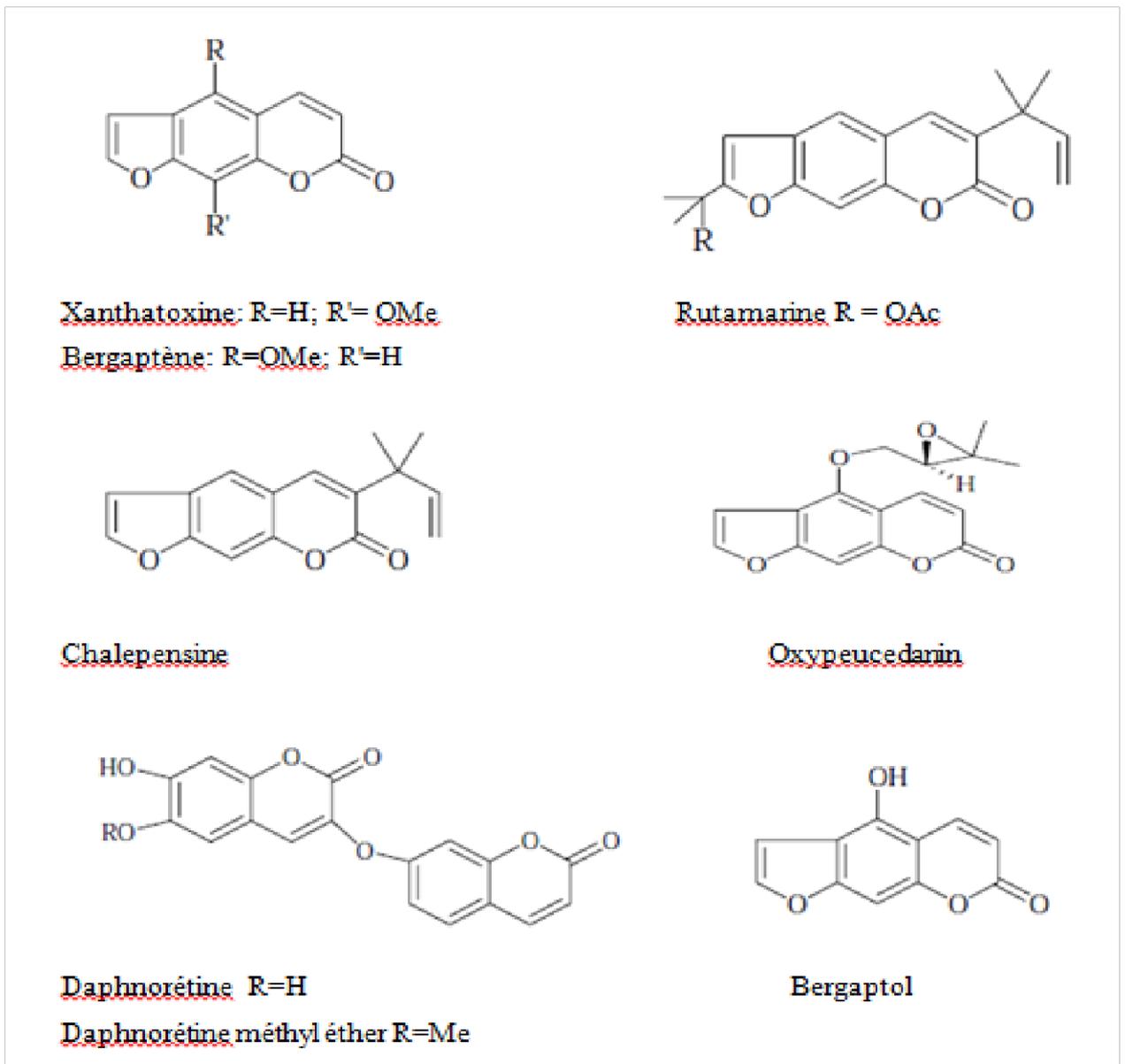


Figure 5: Dérivés coumarines isolés de *Ruta montana* L. (Ulubelen et Öztürk., 2006).

II- 4 L'huile essentielle

Les huiles essentielles sont des liquides huileux, aromatiques et volatils qui peuvent être récoltés à partir de matières végétales (Kabera *et al.*, 2014). Habituellement, elles sont formées dans des cellules ou des groupes spécialisés au sein des tiges ou des feuilles et sont concentrées dans des régions particulières de la plante, telles que l'écorce, les feuilles ou les fruits. Leurs principaux composants sont les hydrocarbures (pinène, limonène et bisabolène), les alcools (linalol et santalol), les acides (acide benzoïque et acide géranique), les aldéhydes (citral), les aldéhydes cycliques (cumin), les cétones (camphre), les lactones (bergaptène),

II- Principaux métabolites secondaires de *Ruta montana*

phénols (eugénol), éthers phénoliques (anéthole), oxydes (1,8 cinéole) et esters (acétate de géranyle) (Böhme *et al.*, 2014).

L'huile essentielle de *Ruta montana* L. d'origine algérienne est composée des monoterpènes oxygénés, caractérisé par la grande prévalence des cétones: undecan- 2-one, nonan-2-one et nonanol-2-acétate (Kambouche *et al.*, 2008), décanone, le phtalate de monoéthylhexyle, le 2-acétoxytridécane et le 2-tridécanol (Belkassam *et al.*, 2011).

III- Le rat de laboratoire

III- 1 Le rat comme un modèle expérimental

Le rat est utilisé comme modèle animal dans les expérimentations pour plusieurs raisons. Tout d'abord, c'est un petit animal, ce qui facilite les manipulations, la courte durée de cycle oestral et de gestation, aussi la courte durée de vie (2 à 3 ans), ce qui réduit les coûts associés à leur logement (Hamid et Zakaria., 2013; Hook., 2014). Parce qu'il partage certaines similitudes avec l'humain, dont l'ovulation spontanée, c'est à-dire, ovulation même en l'absence de mâle ou stimuli sexuels, l'implantation de type hémochoriale, et un placenta discoïde (Déry., 2004; ST-Louis., 2008).

Ces caractéristiques rendent le rat de laboratoire largement utilisé dans les études toxicologiques, nutritionnelles, génétiques, comportementales, environnementales (Hamid et Zakaria., 2013) et aussi dans divers domaines de la recherche sur la reproduction, y compris les études de fertilité, les aspects comportementaux de la reproduction et le criblage de composés pour les effets tératogènes (Lohmiller et Swing., 2006).

III- 2 L'appareil reproducteur de la ratte

Le système reproducteur de la ratte est composé de deux ovaires, deux cornes utérines, de l'utérus, d'un vagin ainsi que d'un clitoris et d'une paire de glandes clitoridiennes (fig.6).

Les ovaires, qui sont reliés aux cornes utérines (O'malley., 2005), assurent plusieurs fonctions tout comme chez l'humain. L'ovaire est le lieu de maturation folliculaire qui mène à la production d'ovules et est un lieu de synthèse d'hormones telles l'œstrogène et la progestérone (Hannon et Curry., 2018). Contrairement à la femme, l'utérus de la ratte est en forme d'Y, tout comme chez la souris.

Histologiquement, la zone interne de l'ovaire est divisée en deux zones: un cortex, qui contient des follicules en développement et des corps jaunes et une médulla qui reçoit les vaisseaux sanguins et les nerfs du hile (fig.7) (Löw *et al.*, 2016).

III- Le rat de laboratoire

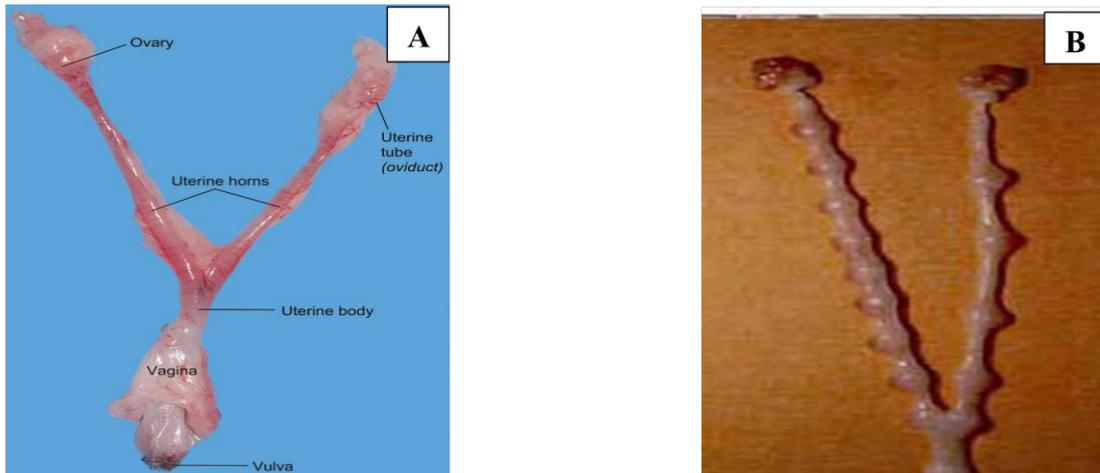


Figure 6: (A) Système reproducteur de la ratte (Knoblauch et Habecker., 2018); (B) Distribution des blastocystes au jour 8 de la gestation chez la ratte (Rugh 1994).

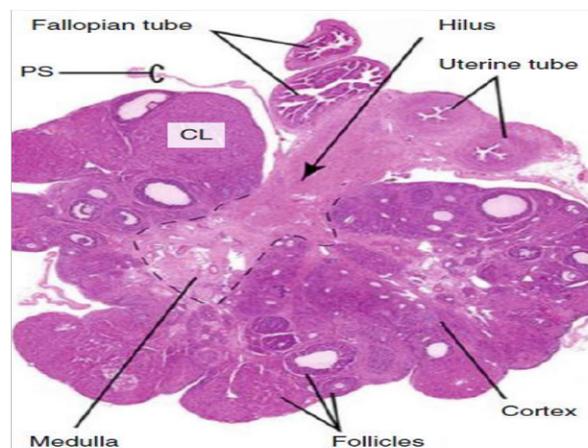


Figure 7: Coupe histologique d'ovaire d'une ratte (*Rattus norvegicus*) (Löw *et al.*, 2016).

III- 3 Physiologie de la reproduction de la ratte

La ratte atteint sa maturité sexuelle dès l'âge de 4 à 5 semaines, où elle subit un cycle hormonal appelée cycle œstral. Cette dernière peut durer de 4 à 5 jours, à ovulation spontanée, et se termine entre 10 et 15 mois de vie (Maynard et Downes., 2019).

La gestation est relativement courte dure de 21 à 23 jours (Antunes *et al.*, 2016; Frohlich., 2020). Elle peut avoir jusqu'à 5 portées par an mais la durée de vie reproductrice est relativement courte. La ratte a en moyenne 10 ratons par portée et les sites d'implantation sont situés au niveau des cornes utérines (fig.6), où l'implantation est de type hémochoriale tout comme l'humain, c'est-à-dire, qu'il y a un contact direct entre le sang maternel et l'embryon (Lohmiller et Swing., 2006; Antunes *et al.*, 2016).

III- 3- 1 Le cycle oestral

Le cycle oestral correspond à l'ensemble des changements physiologiques intervenant dans l'appareil génital (les ovaires, l'utérus et le vagin). Il se produit tout au long de l'année, sans influence saisonnière, depuis la puberté jusqu'à sénescence, y compris la période post-partum. Le cycle oestral est divisé en quatre phases: le diestrus (phase lutéale), le proestrus (phase folliculaire), l'oestrus (ovulation) et le métrustrus. Chaque phase de ce cycle peut être identifiée par la composition cellulaire des frottis vaginaux (fig.8) (Lohmiller et Swing., 2006; Paccola *et al.*, 2013).

a. Le proestrus: cette phase est caractérisée par la présence des cellules épithéliales avec prédominance de grandes cellules nucléées et occasionnellement de cellules cornifiées. Elle dure de 12 à 14 h et précède l'oestrus.

b. L'oestrus: elle est représentée par la prédominance des cellules cornifiées. Cette phase commence la nuit et dure environ 25 à 27 h. Au cours de cette phase, l'ovulation se produit spontanément et les femelles deviennent réceptives aux mâles et présentent des altérations comportementales qui augmentent la probabilité de s'accoupler.

c. Le métrustrus: cette phase est souvent appelée diestrus I et se caractérise par la présence de peu de leucocytes, de mucus et de quelques cellules épithéliales cornifiées (nucléées). Elle dure environ 6 à 8 h, au cours desquelles une tuméfaction vulvaire et une masse caséuse apparaissent dans le vagin. C'est la phase lutéinique qui correspond à la formation de corps jaunes à la surface de l'ovaire. Les corps jaunes produisent la progestérone, qui empêche la maturation de nouveaux follicules et permet le maintien de la grossesse.

d. Le diestrus: elle est également reconnue comme diestrus II. Les cellules prédominantes sont les leucocytes, il y a peu de cellules épithéliales et il y a du mucus abondant dans le frottis vaginal. Il s'agit de la phase la plus longue et dure généralement entre 55 et 57 h. Cette période correspond à l'action de la progestérone dans l'empêchement de la maturation des nouveaux follicules. La durée de la phase dépend du temps qu'il faut pour que la régression des corps jaunes se produise, signalant l'arrêt de l'action de la progestérone (Freeman., 2006; Antunes *et al.*, 2016).

III- Le rat de laboratoire

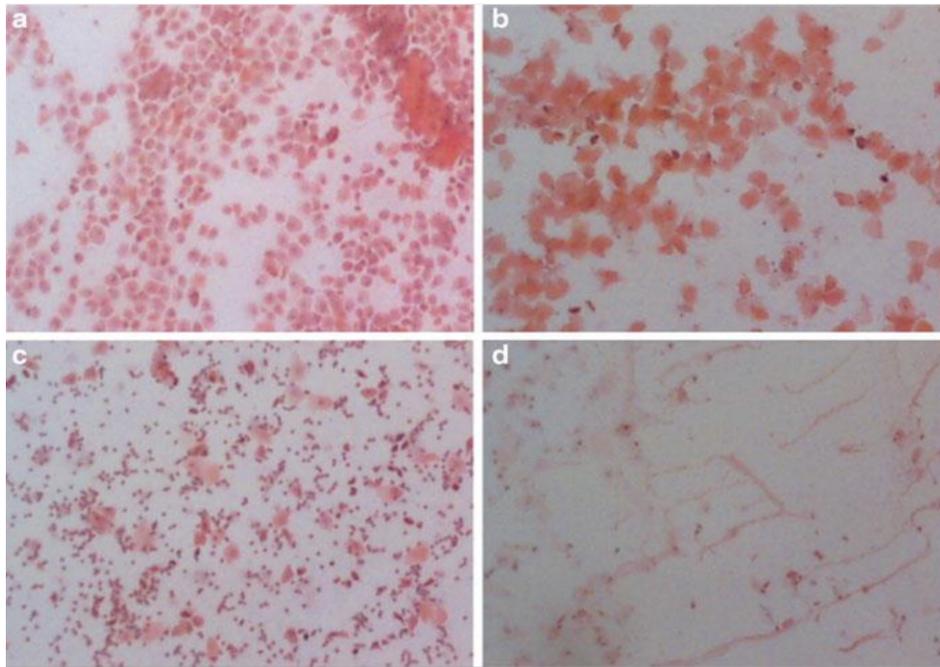


Figure 8: Cellules prédominantes des quatre phases: proestrus (a), œstrus (b), metestrus (c) et diestrus (d) (Antunes *et al.*, 2016).

Le cycle oestral de la ratte est divisé en phase folliculaire et phase lutéale, où l'œstrogène est prédominant dans la première et la progestérone dans la deuxième tout comme le cycle menstruel, notant que le proestrus est considéré comme la phase folliculaire et le diestrus comme la phase lutéale (Antunes *et al.*, 2016).

III- 3- 2 Régulation hormonal du cycle oestral

La fonction de reproduction est contrôlée par le complexe hypothalamo-hypophysaire. Où le GnRH (gonadotrophin-release-hormone) sécrété par l'hypothalamus, stimule la sécrétion et la libération des gonadotrophines la FSH et la LH par l'hypophyse. La libération de gonadotrophine stimule les gonades femelles à synthétiser et libérer des hormones stéroïdes, principalement l'œstradiol et la progestérone. Ces stéroïdes participent dans le contrôle des modifications cellulaires et comportementales au cours du cycle oestral (Antunes *et al.*, 2016; Sharmaa *et al.*, 2020).

La FSH régule la croissance des follicules dans les ovaires et la LH induit l'ovulation et La formation des corps jaunes. Ces deux gonadotrophines stimulent également les œstrogènes et la sécrétion de progestérone par les ovaires, qui à leur tour favorisent le développement de l'appareil reproducteur féminin et la rétroaction vers le système hypothalamo-hypophysaire pour réguler la libération de gonadotrophine (Meites *et al.*, 1980). La FSH et LH stimulent le

III- Le rat de laboratoire

développement, les capacités de synthèse et la maturation de tous les follicules gonadodépendants ayant quitté la réserve folliculaire (environ 10 par jour chez la ratte adulte) mais ne sont pas impliqués dans l'initiation de la croissance folliculaire.

L'inhibine sécrétée par les cellules de la granulosa ainsi que la faible augmentation de la concentration plasmatique d'oestrogènes exerce une rétro-inhibition sur la libération des gonadotropines par l'adénohypophyse (Driancourt *et al.* 2001).

La croissance des follicules pré-ovulatoires entraîne une augmentation importante de la concentration d'oestrogènes qui exerce alors une rétro-activation sur le complexe hypothalamo-hypophysaire. L'adénohypophyse libère brusquement une grande quantité de LH, et de la FSH (en moindre proportion), ce qui produit la décharge ovulante nécessaire à l'expulsion de l'ovule hors du follicule ovarique mûr.

Sous l'effet de la LH, le follicule rompu se transforme en glande endocrine sécrétant principalement de la progestérone et un peu d'oestrogène. La sécrétion de ces deux hormones provoque une puissante rétro-inhibition sur la libération de la FSH et LH par l'adénohypophyse. La diminution graduelle du taux sanguin de LH supprime le stimulus de l'activité du corps jaune, qui commence alors à dégénérer.

L'arrêt de l'activité du corps jaune s'accompagne de l'arrêt de la sécrétion des hormones ovariennes ce qui met fin à l'inhibition de la sécrétion de FSH et LH: un nouveau cycle peut commencer (Marieb, 1999) (fig.9).

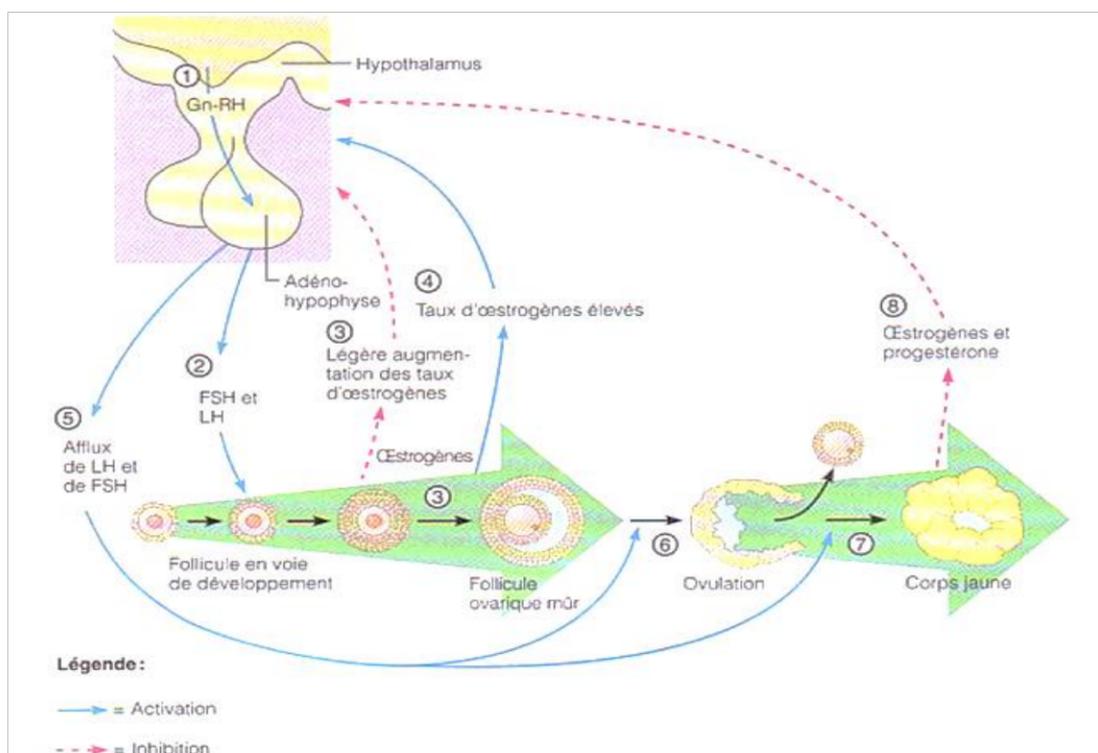


Figure 9: Enchaînement des rétroactions réglant la fonction ovarienne (Marieb, 1999).

III- Le rat de laboratoire

III- 3- 3 Variations des niveaux hormonaux au cours de cycle œstral

Le cycle hormonal de la ratte est original à 2 titres (fig.10):

- Un deuxième pic de FSH suit l'ovulation, stimule la formation de l'antrum des follicules qui ovuleront au cycle suivant, 3 jours plus tard. Leur croissance provoque l'élévation d'estradiol, observable en début de proestrus, et l'élévation régulière des concentrations d'inhibine A. la montée de la progestérone qui se produit dès le proestrus est responsable de l'apparition de l'œstrus et joue un rôle important dans l'ovulation. C'est la chute brutale après l'ovulation des concentrations d'inhibine A et B qui permet au 2^{ème} pic de FSH de se produire immédiatement.
- Le corps jaune cyclique a une activité fonctionnelle très brève, les niveaux de progestérone ne sont élevés qu'entre le metestrus et le diestrus. Bien que non fonctionnels, les corps jaunes ne régressent que très lentement et plusieurs populations de corps jaunes d'âges décroissants sont visibles sur les ovaires (Driancourt et Levasseur., 2001).

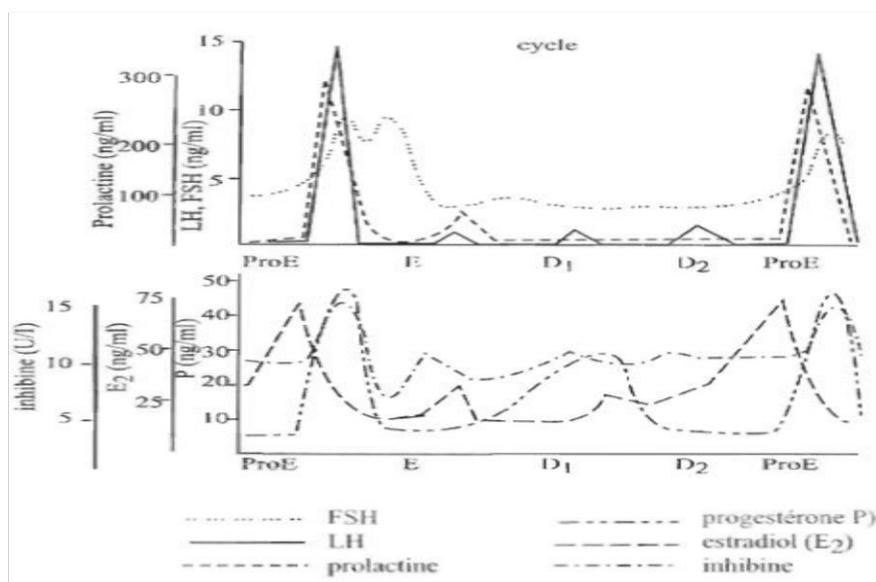


Figure 10: Profils hormonaux chez la ratte au cours du cycle œstral (Driancourt et Levasseur., 2001).

III-4 La gamétogenèse chez la ratte

La production de gamètes femelles est le résultat de deux phénomènes indissociables: l'ovogenèse et la folliculogénèse.

III- 4- 1 L'ovogenèse

L'ovogenèse est l'ensemble des processus permettant la différenciation d'une ovogonie en ovule (Nguyen et Ferry., 2007) (fig.11), c'est un phénomène discontinu puisque certains stades ne seront atteints qu'à partir de la puberté (Choisi., 2010). L'ovogenèse se déroule dans l'ovaire plus précisément dans le cortex (Monniaux *et al.*, 2009).

III- 4- 1- 2 Les phases de l'ovogenèse

L'ovogenèse comporte 3 phases: — Phase de multiplication;
— Phase de croissance;
— Phase de maturation.

A. Phase de multiplication

Des cellules d'origine extra-embryonnaire, les cellules germinales primordiales, migrent pour aller coloniser les crêtes génitales (Felici *et al.*, 2004). Au cours de la vie fœtale, les cellules germinales primordiales ovariennes, devenues des ovogonies qui se divisent par mitoses entre 14.5 et 17.5 jours post-conception (jpc) chez le rat. Ces ovogonies se transforment en ovocytes I en commençant la division réductionnelle de la méiose (18.5 jpc) mais en restant au stade de la prophase (Beaumont., 1962). Tandis que chaque ovocyte s'entoure d'une couche de cellules somatiques, les cellules de granulosa, pour former un follicule primordial (Monniaux *et al.* 2009).

Notons que les follicules primordiaux restent longtemps quiescents. Le plus grand nombre subit un processus involutif, dégénératif. Cette atresie folliculaire atteint chez la ratte 75% des follicules, à lieu après la naissance.

B. Phase de croissance

Le volume de l'ovocyte augmente, le follicule se transforme en follicule primaire, puis en follicule secondaire et en follicule tertiaire. L'ovocyte est alors séparé des cellules folliculeuses (granulosa) par une couche hyaline, la zone ou membrane pellucide.

C. Phase de maturation

Les maturations de l'ovocyte et de la paroi folliculaire sont synchrones. Dans le follicule mûr, l'ovocyte I achève la première division réductionnelle de la méiose en se transformant en ovocyte II (n chromosome) avec émission du premier globule polaire. Aussitôt après débute la deuxième division équationnelle de la méiose. Au moment de

III- Le rat de laboratoire

l'ovulation, l'ovocyte II est au stade de la métaphase. Chez la ratte le premier globule polaire est expulsé environ 4 heures avant l'ovulation (Vaissaire *et al.*, 1977).

Si aucun spermatozoïde ne pénètre dans l'ovocyte II, celui-ci dégénère. Par contre, en cas de pénétration par un spermatozoïde, l'ovocyte II termine la deuxième division équationnelle de la méiose, ce qui donne un gros ovule et un minuscule ovule polaire II. La fin de la méiose II est l'union de l'ovocyte et du noyau du spermatozoïde (Marieb., 1999; Freeman., 2006).

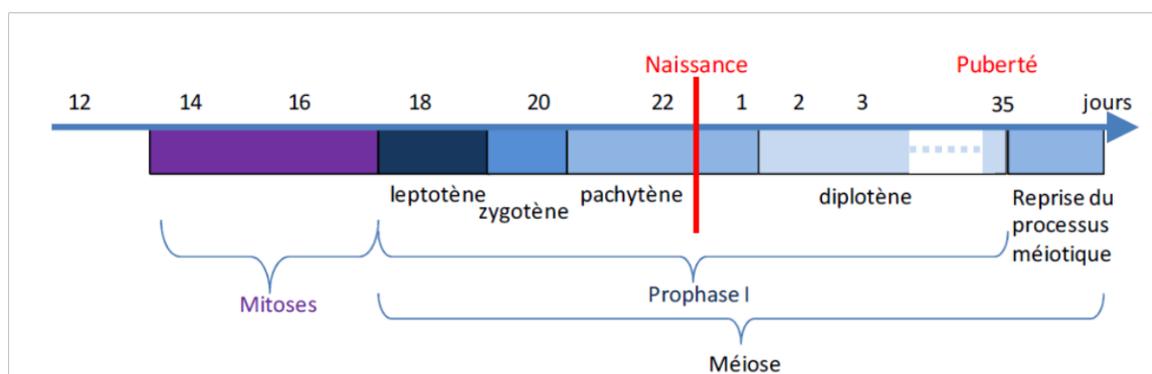
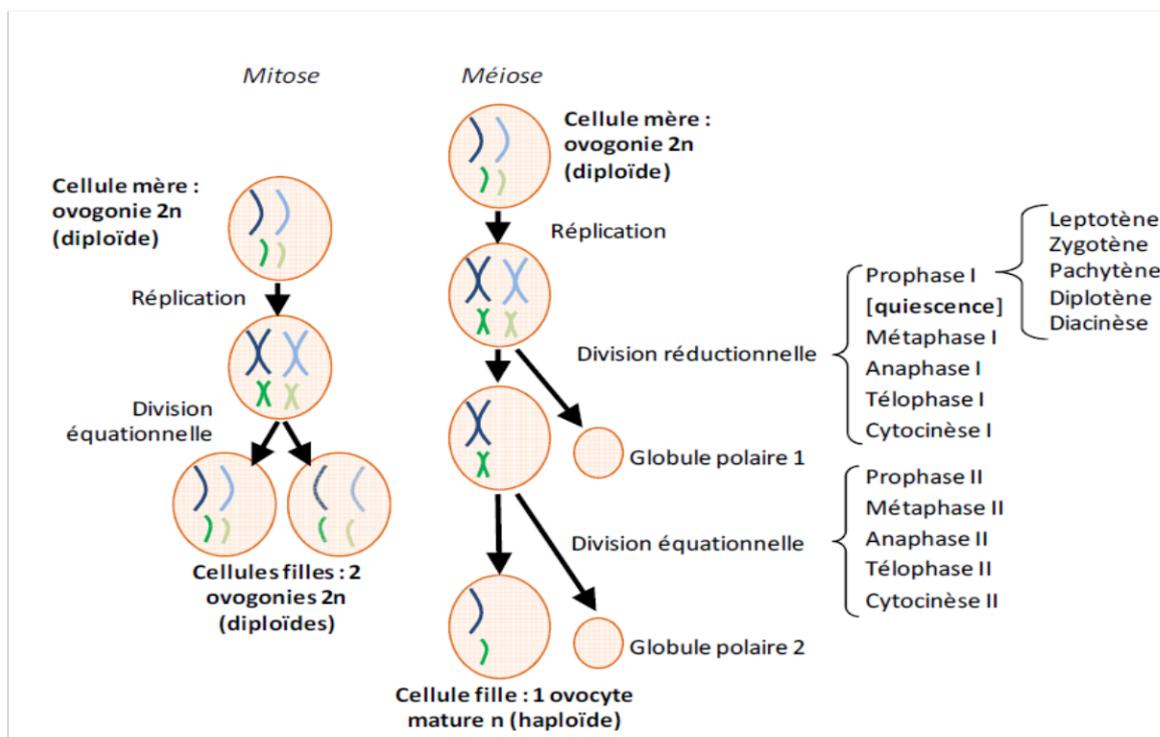


Figure 11: L'ovogénèse chez la ratte (Beaumont et Mandl., 1962).

III- 4- 2 La folliculogénèse

La folliculogénèse est la succession des différentes étapes du développement du follicule depuis le moment où il sort de la réserve, constituée pendant la vie embryonnaire lors de l'ovogénèse, jusqu'à sa rupture au moment de l'ovulation. C'est un phénomène continu

III- Le rat de laboratoire

puisque chaque jour, des follicules entrent en phase de croissance (Driancourt *et al.* 2001) (fig.12).

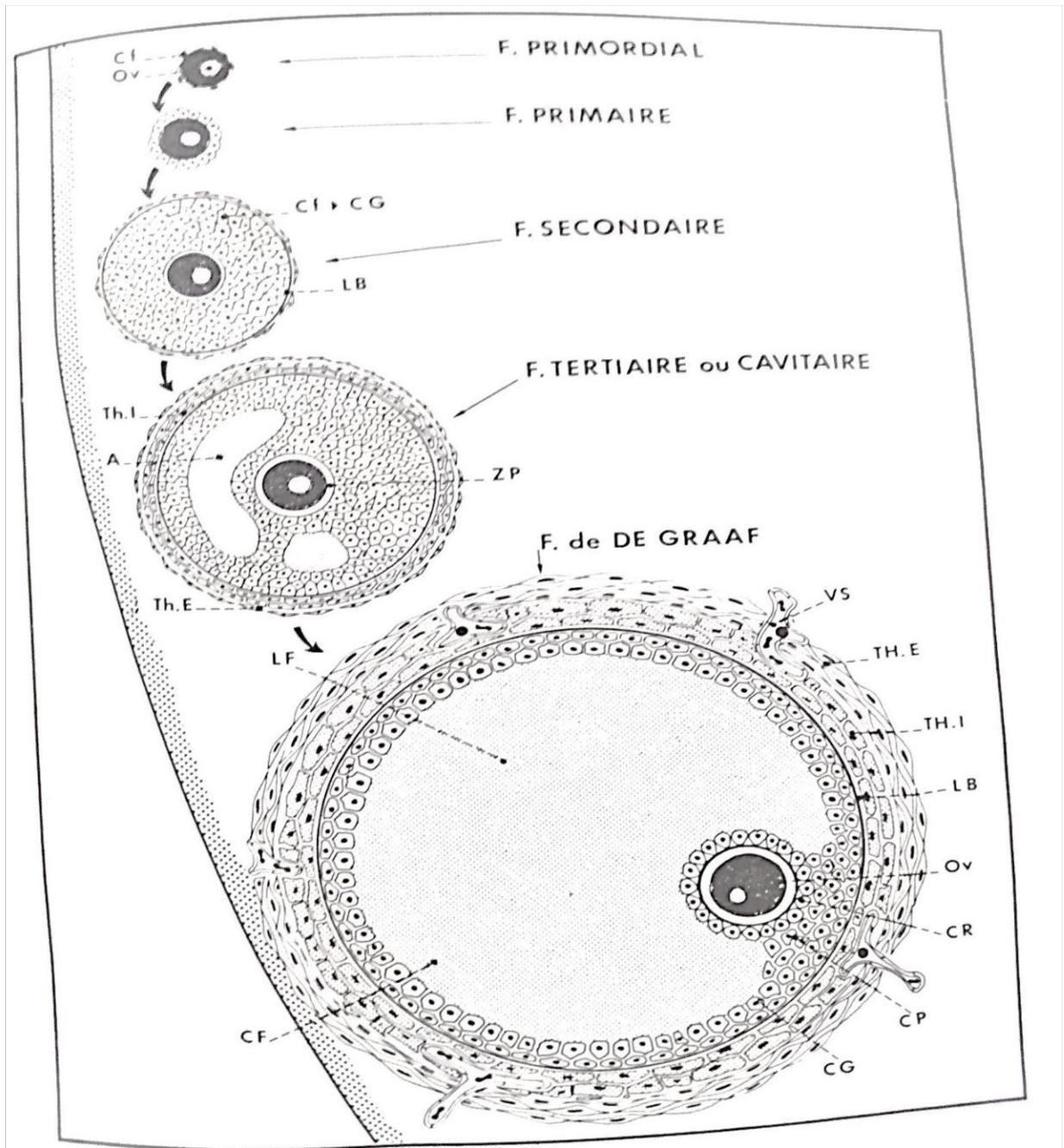


Figure 12: Schéma illustrant la folliculogénèse. A: antrum, Cf: cellule folliculeuse; CF: cavité folliculaire; CG: cellule de la granulosa; CP: cumulus proligier; CR: corona radiata; LB: lame basale; OV: ovocyte; Th.E: thèque externe; Th.I: thèque interne; VS: vaisseau sanguin; ZP: zone pellucide (Vaissaire *et al.*, 1977).

III- 4- 2- 1 Les phases de la folliculogénèse

D'un point de vue fonctionnel, le développement folliculaire peut se subdiviser en deux phases successives : la folliculogénèse basale et la folliculogénèse terminale (fig.13).

A. La folliculogénèse basale:

La folliculogénèse basale se déroule en l'absence de FSH, cette phase est contrôlée par de nombreux facteurs de croissance, d'origines ovocytaire et somatique, agissant essentiellement selon un mode paracrine de régulation (ovocyte/granulosa). Chez la ratte elle comprend l'entrée en croissance d'un pool de follicules primordiaux jusqu'à l'apparition de l'antrum.

B. La folliculogénèse terminale:

La folliculogénèse terminale est strictement dépendante de la présence de FSH et, pour les stades terminaux de maturation du follicule préovulatoire, de la présence de LH. L'apparition de récepteurs de LH sur les cellules de granulosa est la signature d'une maturité complète du follicule, qui devient apte à ovuler. Donc cette phase va du stade de follicule antral jusqu'à l'ovulation (Driancourt *et al.* 2001; Monniaux *et al.*, 2009; Gobe et Mandon-Pepin., 2019).

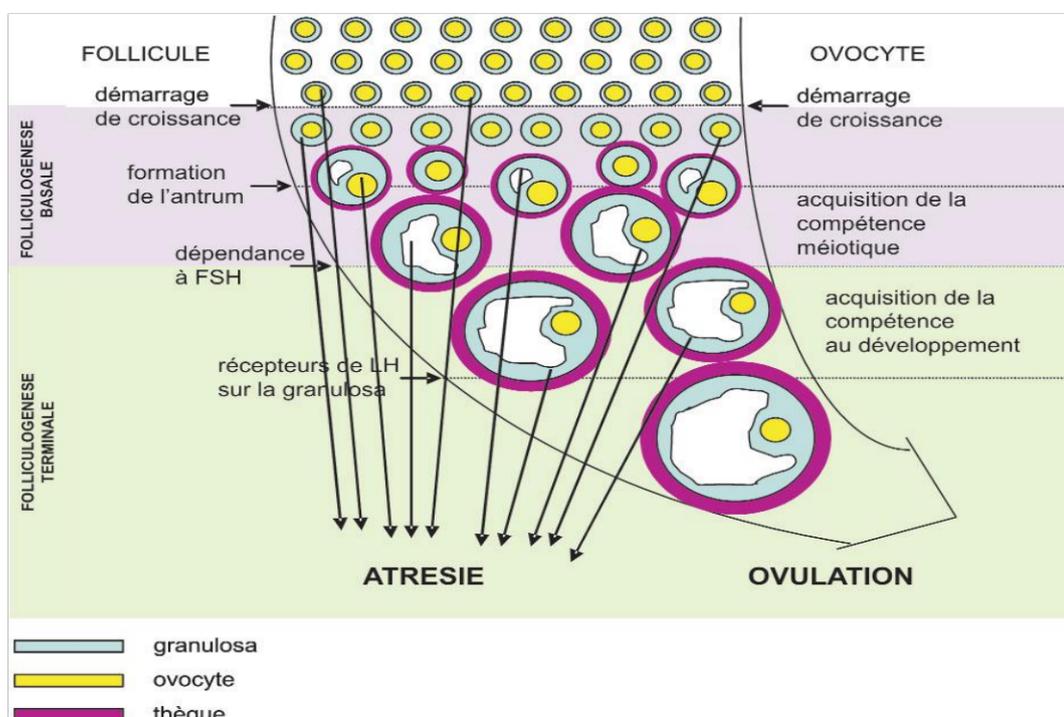


Figure 13: Les phases principales du développement folliculaire et de la maturation ovocytaire. Dans le cas des rongeurs, la dépendance à FSH est acquise au moment de la formation de l'antrum (Monniaux *et al.*, 2009).

III- Le rat de laboratoire

III- 4- 2- 2 Durée de la croissance folliculaire

Chez la ratte, la durée de croissance folliculaire depuis la sortie de la réserve jusqu'à l'ovulation a été estimée à environ 21 jours (Driancourt *et al.* 2001) (fig.14).

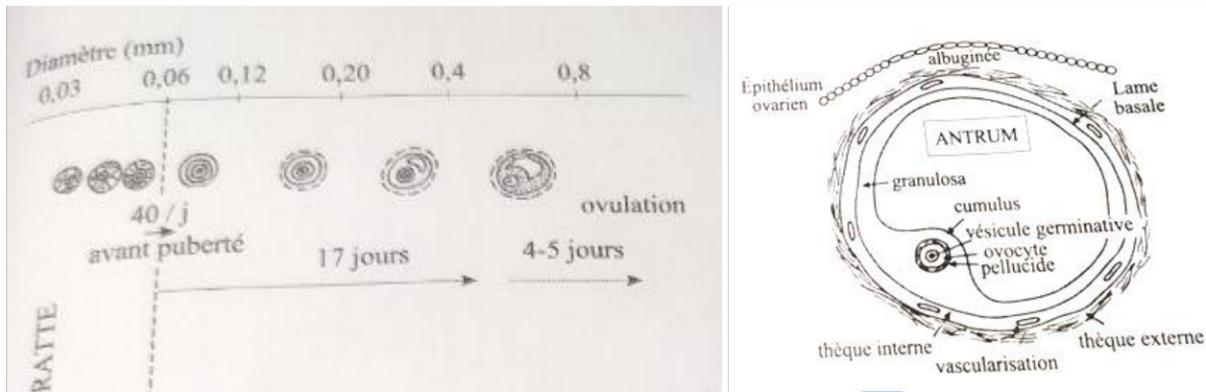


Figure 14: Folliculogénèse chez la ratte. Taux de sortie de la réserve des follicules primordiaux; taille et vitesse de croissance folliculaire (Driancourt *et al.* 2001).

III- 5 L'embryogénèse

Lorsqu'un oeuf a été fécondé, sa segmentation débute. Trois feuilletts, ectoderme, mésoderme et endoderme se mettent en place lors de la gastrulation et la neurulation. La différenciation progressive des organes ou organogénèse constitue la fin du développement (fig.15).

III- 5- 1 La fécondation

La fécondation est l'union des gamètes mâles et femelles pour créer un nouvel individu. Elle consiste en trois événements : la pénétration du sperme et fusion membranaire, activation des œufs et fusion des noyaux (Raven *et al.*, 2017; Sebastian et Borjeson., 2020). Chez la ratte la fécondation a lieu dans les ampoules des oviductes (Erb., 2006).

III- 5- 2 La segmentation (ou clivage)

La segmentation correspond à une succession de divisions cellulaires donnant des cellules filles ou blastomères, pour les œufs alécithes des mammifères placentaires la segmentation est totale ou holoblastique de type rotationnel (Le Moigne et Foucrier., 2009; Foucrier *et al.*, 2019) (fig.16).

III- Le rat de laboratoire

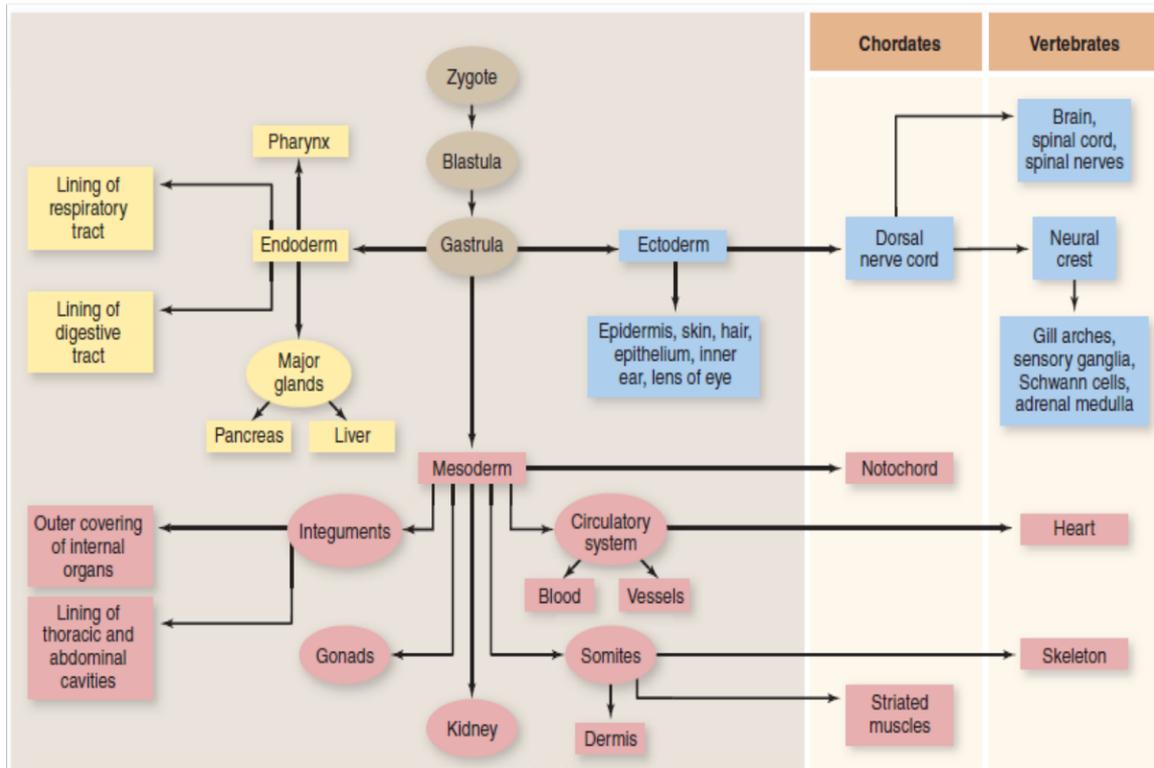


Figure 15: Schéma illustrant l'embryogénèse des animaux (Raven *et al.*, 2017).

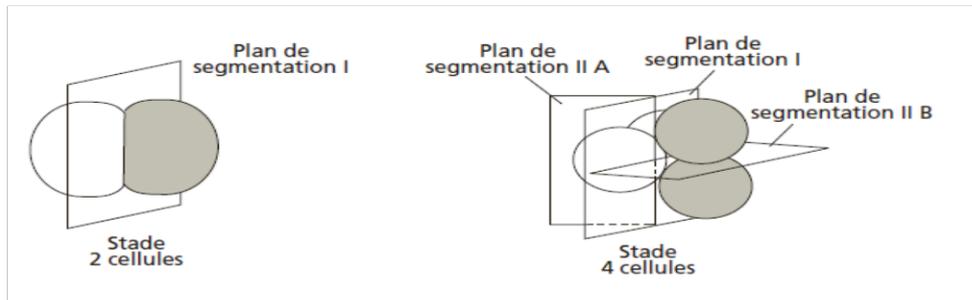


Figure 16: Segmentation rotationnelle chez les mammifères (Le Moigne et Fourier., 2009).

Chez la ratte, le premier clivage se produit au début du 2^{ème} jour après la fécondation, et le stade à 2 cellules qui en résulte dure environ 24 h. À la fin du 2^{ème} jour après la fécondation, l'embryon à 2 cellules a parcouru un peu plus de la moitié de la longueur de l'oviducte. L'une des cellules se divise généralement avant l'autre, ce qui donne un stade à 3 cellules. A la fin du 3^{ème} jour, seuls des embryons à 4 cellules se trouvent dans l'oviducte. Au stade de 16 cellules correspond au 4^{ème} jour après la fécondation, le terme morula est utilisé et les cellules deviennent encore plus étroitement liées et ne sont plus facilement reconnaissables en tant que cellules individuelles. Au début du 5^{ème} jour, les morulas de 24 à 32 cellules se trouvent libres dans la lumière de l'utérus, espacées d'une manière similaire à la façon dont elles s'implanteront. Vers le 5^{ème} jour, commence la formation du blastocœle par cavitation de

III- Le rat de laboratoire

la morula (30-32 cellules), à ce stade l'embryon est désigné par le terme de blastocyste et se trouve à l'entrée de l'utérus chez la ratte (Erb., 2006; Sebastian et Borjeson., 2020).

La période de préimplantation (fécondation et clivage) est habituellement considérée comme une période pendant laquelle l'agression toxique entraîne généralement la mort embryonnaire ou l'absence d'effet en raison des pouvoirs régénératifs des cellules pluripotentes de l'embryon à ce stade (effets "tout ou rien") (Erb., 2006; Sebastian et Borjeson., 2020).

III- 5- 3 La gastrulation

La période de gastrulation (le 8,5 à 9,5 jour chez le rat) correspond à des migrations coordonnées des cellules embryonnaires aboutissant à la mise en place des trois feuillets: un feuillet externe, l'ectoderme, un feuillet profond, l'endoderme et un feuillet moyen, le mésoderme (Erb., 2006; Le Moigne et Foucier., 2009; Sebastian et Borjeson., 2020) (fig.17).

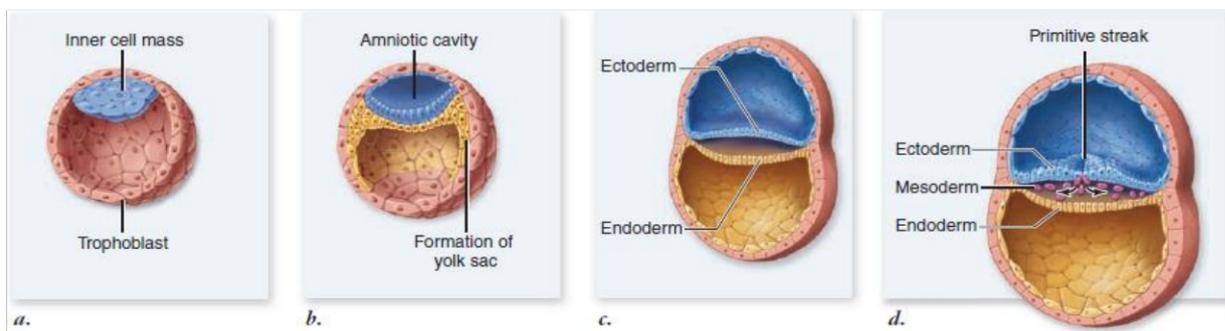


Figure 17: La gastrulation chez les mammifères (Raven *et al.*, 2017).

III- 5- 4 L'organogenèse

Les mouvements morphogénétiques qui suivent la gastrulation mettent en place, selon le plan d'organisation de l'espèce, les ébauches d'organes qui se différencient (Le Moigne et Foucier., 2009). Où l'endoderme donne naissance aux : muqueuse des voies digestives et respiratoires et foie, pancréas, thymus, thyroïde. L'ectoderme donne l'épiderme de la peau, système nerveux et organes des sens tandis que le mésoderme forme le squelette, les muscles, les vaisseaux sanguins, le cœur, le sang, les tissus conjonctifs, les reins et les gonades et le derme de la peau (Raven *et al.*, 2017). Chez le rat, cette période est entre le 8^{ème} et le 15^{ème} jour de gestation (Lallemand., 1984).

Partie II:

Partie pratique

I- Matériel et méthodes

I-1 Matériel végétale

La partie aérienne de la plante *Ruta montana* L. est récoltée au mois de Juin 2020, période de maturation de la plante dans la région de Beni-Aziz caractérisée par un climat méditerranéen et située à 50 Km au nord-est de la wilaya de Sétif. La plante est identifiée sur la base de ses propriétés morphologiques et confirmée par Dr. Nouiwa W. (Department de biologie végétal et écologie), faculté des sciences de la nature et de la vie, université Ferhat Abbas, Sétif 1). (Fig.18).

La partie aérienne de la plante est séchée à température ambiante et à l'abri du soleil pendant quinze jours. Elle est purifiée des tiges et de toutes les impuretés. Ensuite, elle est conservée (au sec) dans un récipient hermétique jusqu'à l'utilisation.



Figure 18: (A) la plante *Ruta montana* L. (B) fruit de *Ruta montana* L. (L'auteur, 2020).

I-1-1 Extraction

I-1-1-1 Extraction des alcaloïdes totaux

L'extraction des alcaloïdes totaux à partir de la partie aérienne de la plante est obtenue par une extraction liquide - liquide, basée sur la différence de solubilité des alcaloïdes en milieu acide et alcalin.

La partie aérienne de la plante *Ruta montana* L. (feuilles, fleurs et capsules) est finement broyée par un broyeur électrique. 100 g de la poudre obtenue est dégraissée par 200

I-Matériel et méthodes

ml d'éther de pétrole par macération et sous agitation mécanique, à température ambiante pendant 2 heures.

Après filtration, le marc (la poudre débarrassée de la matière grasse) est alcalinisé par 40 ml d'ammoniaque (0.5N) pendant au moins 8 heures à température ambiante, permettant ainsi aux alcaloïdes de passer de la forme sel à la forme basique.

La poudre alcalinisée est placée dans une cartouche en cellulose, celle-ci est placée à son tour dans le Soxhlet. Ce dernier est monté sur un ballon contenant du chloroforme. Les alcaloïdes en première étape sont extraits à chaud sous reflux par 300 ml de chloroforme pendant 3 à 4 heures (au moins 5 cycles sont nécessaires pour un épuisement total de la poudre).

A l'issue de cette opération, l'extrait brut est passé à la purification par trois extractions successives par une solution de 150 ml d'acide sulfurique (0.5N), les trois fractions sont reprises dans une ampoule à décantation et alcalinisées jusqu'à pH 10 par l'ajout de quelques ml d'ammoniaque (0.5N).

Nous épuisons ensuite la solution obtenue trois fois par 150 ml de dichlorométhane, en agitant doucement l'ampoule à chaque fois (Bruneton, 1999).

Nous récupérons les trois fractions organiques dans un erlen Mayer, qui seront déshydratées par filtration sur un buchner contenant du sulfate de sodium anhydre à l'aide d'une pompe à vide. L'extrait recueilli dans un bêcher taré est évaporé à sec sur plaque chauffante. Après refroidissement, nous pesons à nouveau le bêcher. Le résidu sec représente l'extrait des alcaloïdes totaux. Ce dernier est conservé au réfrigérateur jusqu'à son utilisation (Fig.19).

I-Matériel et méthodes

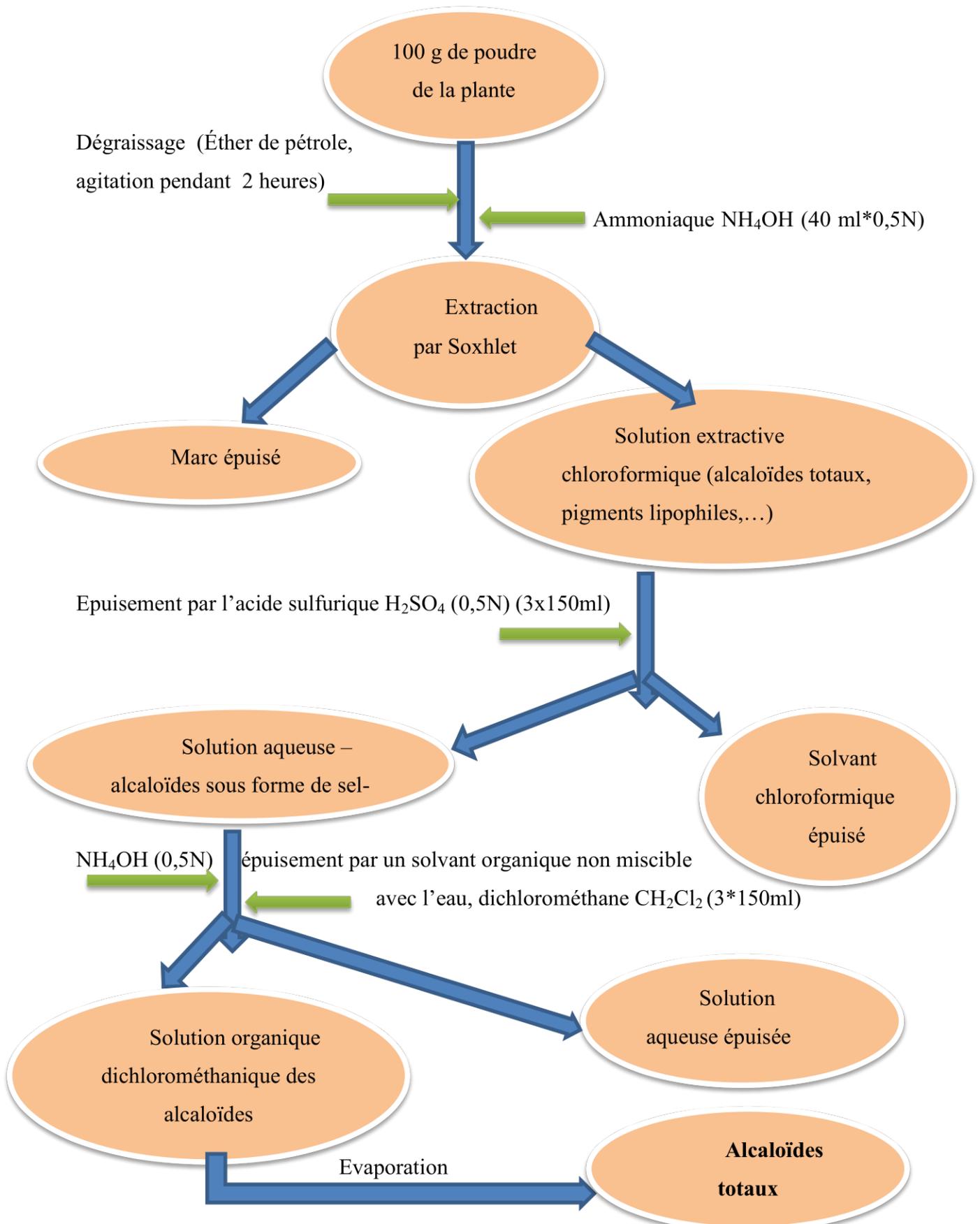


Figure 19: Extraction des alcaloïdes totaux de la partie aérienne de la plante *Ruta montana* L. (Bruneton., 1999).

I-1-1-2 Extraction méthanolique de la plante

La partie aérienne de la plante *Ruta montana* L. (feuilles, fleurs et capsules) est finement broyée par un broyeur électrique. 100 g de la poudre obtenue est ajoutée à 500 ml de méthanol (90 %), et ont été laissés pour macérer à température ambiante pendant une semaine. L'erenmeyer a été quotidiennement agité une heure pendant cette période. Après filtration, le méthanol a été évaporé à 30°C à basse pression (Sofowora., 2010). L'extrait brut obtenu est conservé au réfrigérateur jusqu'à son utilisation.

I-1-2 Analyse qualitative par la chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince est couramment utilisée pour séparer et identifier rapidement des composés d'un mélange; a été utilisée pour vérifier la présence des alcaloïdes dans les extraits. Des plaques de CCM prêtes à l'emploi, de gel silice 60 F – Merck sur support d'aluminium de marque Macherey-Nagel (avec des dimensions 20 x 20 cm), ont été utilisées.

La phase mobile utilisée est celle de Masri *et al.* (2014), où nous avons utilisé un mélange de méthanol/ chloroforme/ ammoniacque: 10/ 90/ 1 (V/ V/ V).

En pratique, après dissolution des extraits dans du méthanol, nous déposons une aliquote de 10 µl de chaque solutions à l'aide d'une micropipette sur la plaque, préalablement activée dans une étuve à 110° c pendant 3 à 5 min, à 1 cm du bord inférieur sur la ligne de base. Chaque dépôt est séché à l'aide d'un sèche-cheveux. La plaque est ensuite mise dans la cuve contenant et saturée par la phase mobile.

Quand le front du solvant arrive à 3 cm du bord supérieur de la plaque (la migration d'une seizaine de cm prend plus ou moins 1 heure), la plaque est retirée séchée et observée sous une lampe UV à une longueur d'onde $\lambda = 254$ et 365 nm, ensuite pulvérisée avec le réactif de Dragendorff jusqu'à l'apparition des spots colorés (orange).

I- 1- 3 Screening phytochimique de l'extrait méthanolique

Le screening phytochimique est un moyen pour mettre en évidence la présence des groupes de familles chimiques présentes dans une drogue donnée, les tests de caractérisation sont basés en partie sur l'analyse qualitative, soit sur la formation de complexes insolubles en utilisant les réactions de précipitation, soit sur la formation de complexes colorés, en utilisant des réactions de coloration (Badiaga., 2011).

L'extrait méthanolique de la partie aérienne de la plante *Ruta montana* est analysé pour mettre en évidence la présence des métabolites secondaires tels que: les alcaloïdes, les tanins,

les stéroïdes, les coumarines et les flavonoïdes. La mise en évidence de ces métabolites est effectuée par des tests chimiques et pour les alcaloïdes une CCM sur gel de silice a été réalisée, où les techniques analytiques utilisées sont celles décrites par (Farnsworth., 1966; Harborne., 1984; Békro *et al.*, 2007; Parekh et Chanda., 2007; Daoudi *et al.*, 2016; EL-Haoud *et al.*, 2018).

I- 1- 3- 1 Mise en évidence des alcaloïdes

5g de poudre de la plante + 25 ml de H₂SO₄ (10%) dans une erlen Meyer soumis à une agitation et macération pendant 24 h ensuite filtrée et lavée par l'eau distillé complété à 25ml.

1ml du filtrat + 5 gouttes de réactif de Dragendorff, l'apparition de précipité orange reflète la présence des alcaloïdes.

I- 1- 3- 2 Mise en évidence des tanins

5g de poudre de la plante + 100 ml d'eau distillé bouillante puis filtré et complété à 100 ml (S1). 5 ml de S1 + 1ml FeCl₃ (2%), l'apparition de coloration verdâtre ou bleu noirâtre indique la présence des tanins.

➤ Tanins catéchiques

5 ml de S1 + 15 ml de réactif de Stiasny (10 ml de formol à 30 % + 5 ml de HCL) dans un bain-marie à 80°C pendant 30 min, l'apparition d'une précipité explique la présence des Tanins catéchiques.

➤ Tanins galliques

5 ml de S1 + 5 ml d'acétate de sodium + 3 gouttes de FeCl₃ (2%), une coloration bleu-noir intense indique la présence des Tanins galliques.

I- 1- 3- 3 Mise en évidence des anthocyanes

5 ml de S1 + 5 ml de l'acide sulfurique à 10% + quelques gouttes de NH₄OH, une coloration bleu-violacé explique la présence des d'anthocyanes.

I- 1- 3- 4 Mise en évidence des coumarines

1 g de poudre de la plante dans bicher recouvert par un papier filtre imbibé avec NaOH (10%) placé dans un bain marie bouillant pendant quelque minutes, ensuite le papier filtre est examiné sous UV à 365 nm. Une fluorescence jaune-vert indique la présence des coumarines.

I- 1- 3- 5 Mise en évidence des terpénoïdes (réaction de Lieberman Burchard)

Un volume de 2 ml d'extrait est mélangé avec 5 ml d'anhydride acétique et 5 ml de chloroforme puis 1 ml de H₂SO₄ concentré sur les parois de béccher sans agiter. Après un

I-Matériel et méthodes

repos de 20 minutes, s'il y a formation d'un anneau rouge brunâtre à la zone de contact des deux liquides et une coloration verte ou violette de la couche surnageant indique un résultat positif.

I- 1- 3- 6 Mise en évidence des stéroïdes (test de Salkowski)

Un volume de 2.5 ml d'extrait est traité avec 0.4 ml de chloroforme et 0.6 ml H₂SO₄ concentré. Un anneau marron-rouge est formé à l'interface en cas de présence des stéroïdes.

I- 1- 3- 7 Mise en évidence des flavonoïdes

2 g de matière végétale est extraits avec 10 ml d'alcool (éthanol) ou d'eau. A 2 ml de filtrat, quelques gouttes de HCl concentré suivies de 0,5 g de zinc ou de magnésium ont été ajoutées. Après 3 minutes la couleur rouge magenta ou rose indique la présence de flavonoïdes.

I- 1- 2- 8 Mise en évidence des saponines

Un volume de 2 ml d'extrait est mélangé avec 2 ml d'eau, le mélange est agité pendant 15 secondes. La hauteur de la mousse formée est mesurée, une hauteur de 1 cm indique la présence des saponines ; la mousse est mélangée avec quelques gouttes d'huile d'olive, la formation d'émulsion indique la présence des saponines

I-2 Matériel animal

Des rats mâles et femelles albinos Wistar adultes provenant de l'institut Pasteur d'Alger (Algérie) ont été utilisés pour évaluer la toxicité aiguë et sub-chronique. Ils sont hébergés dans des cages en grille métallique (55x33x19 cm). Les animaux ont disposé d'eau du robinet et de nourriture standard *ad libitum*, cependant la litière est renouvelée deux fois par semaine. Les animaux sont acclimatés aux conditions de l'animalerie de la faculté des sciences de la nature et de la vie, université de Sétif pendant deux semaines avant les expériences.

I-2-1 Détermination de la DL₅₀ des alcaloïdes totaux et de l'extrait méthanolique de la partie aérienne de la plante *Ruta montana* chez les rats mâles et femelles

Des rats albinos Wistar adultes sont utilisées dans cette étude; ils sont divisés en groupes, où chaque animal a subit un marquage par une solution de Blue de méthylène sur une partie du corps. Les animaux sont mis à jeûne la nuit avec accès libre à l'eau avant le traitement et ils sont pesés juste avant le traitement.

➤ **Traitement par les alcaloïdes totaux**

L'extrait alcaloïdique a testé est solubilisé dans quelques gouttes de méthanol puis dilué avec l'eau physiologie.

Des rats mâles et femelles pesant entre (150- 210 g) et (140- 205 g) successivement; sont divisés en trois groupes pour les mâles et les femelles, contenant chacun dix rats. Chaque groupe a reçu par voie intra-péritonéale une simple dose de (400, 500, 600 mg/kg).

➤ **Traitement par l'extrait méthanolique**

L'extrait méthanolique a testé est solubilisé dans quelques gouttes de méthanol puis dilué avec l'eau physiologie.

- **Les rats mâles**

Des rats mâles pesant entre (145- 225 g); sont divisées en six groupes, contenant chacun six rats. Chaque groupe a reçu par voie intra-péritonéale une simple dose de (600, 800, 1000, 1200, 1400 et 1800 mg/kg).

- **Les rats femelles**

Des rats femelle pesant entre (110-155 g); sont divisées en cinq groupes, contenant chacun six rats. Chaque groupe a reçu par voie intra-péritonéale une simple dose de (800, 1000, 1200, 1400 et 1600 mg/kg).

Les animaux traités sont observés chaque heure pendant les premières 24 heures et chaque jour pendant 14 jours pour noter les signes de toxicité, les changements de comportement et la mortalité.

La DL_{50} et son intervalle de confiance sont calculés par la méthode de Litchfield et Wilcoxon (1949).

I-2-2 Toxicité sub-chronique chez les rats femelles

Des rats femelles adultes pesant entre (150-190 g); sont divisées en deux groupes, un groupe traité de 14 rattes et un groupe témoin de 12 rattes où chaque animal a subit un marquage par une solution de Blue de méthylène sur une partie de son corps.

Le groupe traité a reçu quotidiennement par voie intra-péritonéale une dose de 38,7149 mg/kg (= 1/30 DL_{50}) de l'extrait méthanolique de *Ruta montana* L. solubilisé dans l'eau physiologie (0.9 % NaCl) contenant quelque gouttes de méthanol pendant 45 jours au même temps le groupe control est injecté par l'eau physiologie et quelque gouttes de méthanol. Les animaux des deux groupes sont pesés avant l'expérience, une fois chaque semaine pendant l'expérience et avant leurs sacrifices.

I-Matériel et méthodes

Après 45 jours, 12 rattes (7 traitées et 5 témoins) sont laissés pour les accoupler avec des mâles sains (non traités). Les restes des rattes (7 traitées et 7 témoins) sont anesthésiés par inhalation de chloroforme, dans une cloche en verre et avant leurs sacrifices un prélèvement sanguin est effectué à partir de la veine orbitale à l'aide des tubes d'hématocrite.

Après dissection, le foie, la rate, les reins, les poumons, le cœur, les ovaires et le cerveau sont observés macroscopiquement *in situ*, puis prélevés et lavés avec l'eau physiologie, dégraissés, séchés par le papier filtre et pesés.

Des morceaux du foie, les reins et les ovaires sont conservés dans une solution de formol 10 % pour l'étude histo-pathologique.

I- 2- 3 Etude de l'effet de l'extrait méthanolique de la partie aérienne de la plante *Ruta montana* sur la reproduction chez les rats femelles

I- 2- 3- 1 Procédure de réalisation du couplage

Pour cette étude, on a utilisé les 12 rattes restantes de la toxicité sub-chronique (7 traitées par l'extrait de la plante et 5 témoins). Afin de coupler les rattes des deux groupes; traité et témoin, un rat mâle adulte sain (non traité) est mis avec chaque trois femelle dans la même cage pendant 5 jours , puis un nouveau mâle sain est introduit dans la cage à nouveau pendant cinq jours pour les rattes non fécondées (Guy., 1981). En même temps, chaque matin à 8: 00 heures, un prélèvement de glaire vaginale est effectué pour rechercher la présence des spermatozoïdes. Si l'analyse détecte la présence des spermatozoïdes, ce jour-là est considérée comme le premier jour de gestation de la ratte considérée.

I- 2- 3- 1- 1 Technique de prélèvement de la glaire vaginale et réalisation du frottis vaginale

Le prélèvement de la glaire vaginale est réalisé par une simple méthode à l'aide d'un compte goutte contenant l'eau physiologie tiède (à 37°). Le bout de compte goutte est introduit dans l'orifice vaginal de la ratte à environ 1cm, un lavage vaginale (2 à 3 fois) est réalisé pour chaque ratte. Le liquide prélevé (glaire vaginale + l'eau physiologie) est collecté dans des eppendorfs numérotés selon les rattes (fig.20).



Figure 20: Technique de prélèvement de la glaire vaginale de la ratte.

Pour chaque prélèvement, et à l'aide d'une micropipette une goutte est étalée sur une lame pour l'analyse par un microscope optique (X 40) afin de mettre en évidence la présence des spermatozoïdes (Marcondes *et al.*, 2002) (fig.21).

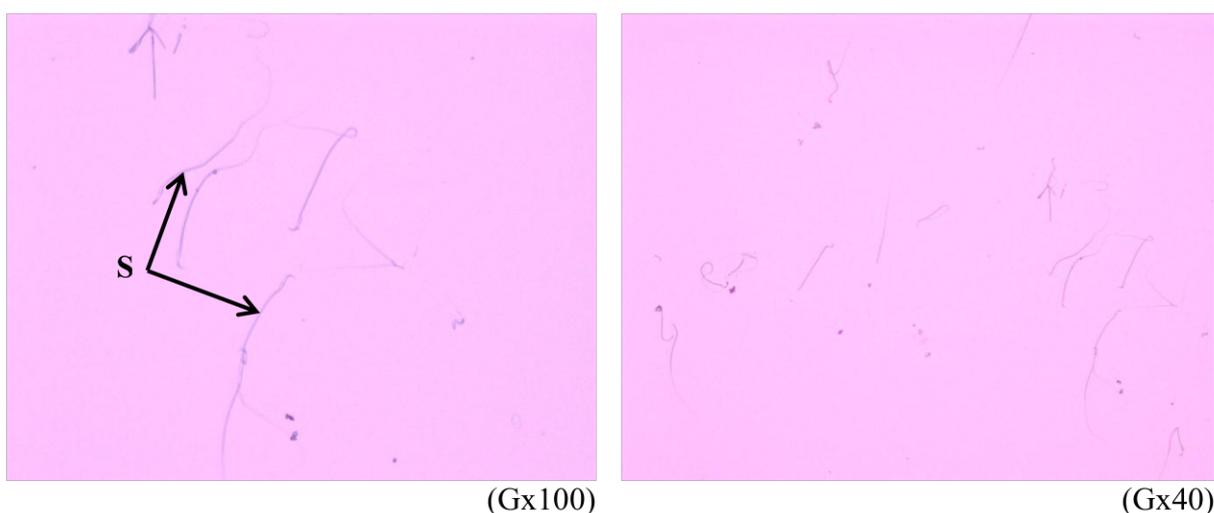


Figure 21: Frottis vaginal contenant des spermatozoïdes (S).

I- 2- 3- 2 Séparation des rattes couplées

Chaque ratte présente un test positif (présence des spermatozoïdes dans sa glaire vaginale) est séparée dans une autre cage, et pour les rattes présentant un test négatif sont réintroduit avec le mâle jusqu'à leur copulation. A la fin on a obtenu 2 groupes :

- Un groupe préalablement traités (toxicité sub-chroniques de 45 jours) par 1/30 DL₅₀ d'extrait méthanolique de *Ruta montana* L. constitué de 7 rattes gestantes.
- Un groupe témoin (préalablement injecté par l'eau physiologie pendant 45 jours) constitué de 5 rattes gestantes.

I-Matériel et méthodes

Les rattes sont enregistrées dans une liste (concernant leur 1^{er} jour de fécondation) et elles ont disposé d'eau du robinet et de nourriture standard *ad libitum*, pendant 18 jours de gestation.

Le 19^{ème} jour de gestation, les rattes sont pesées ensuite anesthésiées par inhalation de chloroforme, dans une cloche en verre et avant leurs sacrifices un prélèvement sanguin est effectué à partir de la veine orbitale à l'aide des tubes d'hématocrite.

Après dissection, l'utérus, le foie, la rate, les reins, les poumons, le cœur, les ovaires et le cerveau sont observés macroscopiquement *in situ*, puis prélevés et déposés dans l'eau physiologie, dégraissés, séchés par le papier filtre et pesés.

➤ Prélèvement de l'utérus et les ovaires

Après le prélèvement de l'utérus (fig.22), les embryons sont séparés de l'utérus, dénombrés, déposés dans l'eau physiologie, séchés par le papier filtre et bien observés afin de détecter s'il y a des malformations au niveau de la tête, les pattes (les doigts), la queue et la peau et en fin pesés.

Des morceaux du foie, les reins et les ovaires sont conservés dans une solution de formol 10 % pour l'étude histo-pathologique.

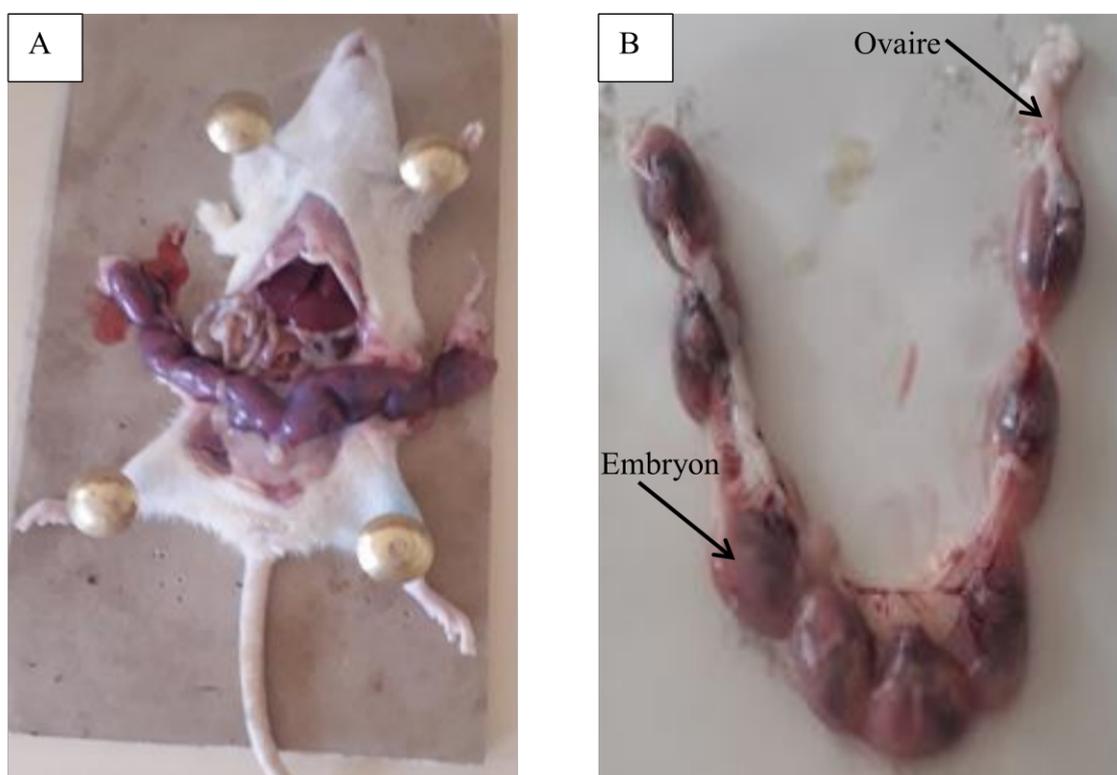


Figure 22: Dissection de la ratte gestante (A) et prélèvement de l'utérus (B).

I-2-4 Etude des hormones et quelques paramètres hématologiques et biochimiques sérique

Après l'anesthésie des animaux par inhalation de chloroforme dans une cloche en verre, des prélèvements sanguins sont effectués à l'aide des tubes d'hématocrite à partir de la veine orbitale de la ratte, le sang a été collecté dans des tubes EDTA pour la FNS et des tubes héparines pour les hormones (FSH et LH) et les paramètres biochimiques (bilan rénal et hépatique) pour chaque animal.

L'analyse des paramètres hématologiques (GR, HGB, HCT, VGM, CCMH, TCMH, IDR, IDRa, PLT, IDP, VPM, GB, LPCR, PTC) a été effectuée à l'aide d'un Sysmex coulter XN 350 (Kits- Sulfolyser, fluorocell, cellpack, lysercell, Germany). Le dosage des paramètres biochimiques incluant urée, créatinine, les transaminases (GOT et GPT) (Kits- biosystems sa costa brava 30 Barcelona, Spain), phosphatase alcaline (PAL) (Kits- Spinreact S.A.U, Spain) et bilirubine (Kits- Biolabo, France) a été réalisé à l'aide d'un Biosystem. Pour le dosage des hormones reproductives FSH (follicle stimulating hormone) et LH (luteinizing hormone) a été opéré par un Vidas (Kits- Biomerieux, France).

I- 2- 5 Etude histopathologique

Des procédures histologiques de routine ont été faites sur des échantillons de reins, de foie et des ovaires. Ils sont fixés dans le formol 10 %, puis placés dans des cassettes en plastique et mis dans l'automate pour les déshydratés (alcool), les nettoyés (xylène) et les solidifiés (paraffine). En suite des coupes de 4 µm ont été montées sur des lames et colorés avec l'hématoxyline et l'éosine (H&E) pour être prête à lire avec un microscope optique (Alturkistani *et al.*, 2015).

Ce travail a été réalisé au niveau de laboratoire d'anatomie-pathologique de C.H.U de Sétif.

I- 2- 6 Analyse statistique

Les résultats obtenus ont été analysés statistiquement par le test One Way ANOVA suivi de Tukey test et sont exprimés par la moyenne \pm Ecart type. Des différences ont été considérées significatives à $p < 0.05$. L'analyse statistique a été exécutée par le logiciel Sigma Stat 3.5.

Partie III:

Résultats

I- Résultats

I- 1 Rendement des extractions

L'extraction des alcaloïdes totaux de la partie aérienne de la plante *Ruta montana* L. (feuilles, fleurs et capsules) par la méthode liquide - liquide, en utilisant le Soxhlet, nous a permis d'obtenir un extrait sous forme d'une pâte d'une couleur verte avec un rendement de 0.19 ± 0.024 %.

L'extraction par macération de la partie aérienne de la plante dans le méthanol a permis d'obtenir un extrait brut sous forme d'une pâte collante d'une couleur verte avec un rendement de 12.4258 %.

I- 2 Analyse qualitative des alcaloïdes totaux par CCM

La chromatographie sur couche mince a permis de mettre en évidence la présence des alcaloïdes dans l'extrait méthanolique et des alcaloïdes aux moins les majoritaires dans l'extrait alcaloïdique de la partie aérienne de *Ruta montana* L. Ces composants sont apparus sous forme de spot fluorescente sous UV à 254 et 365 nm et orange après révélation par le réactif de Dragendorff. (Fig.23)

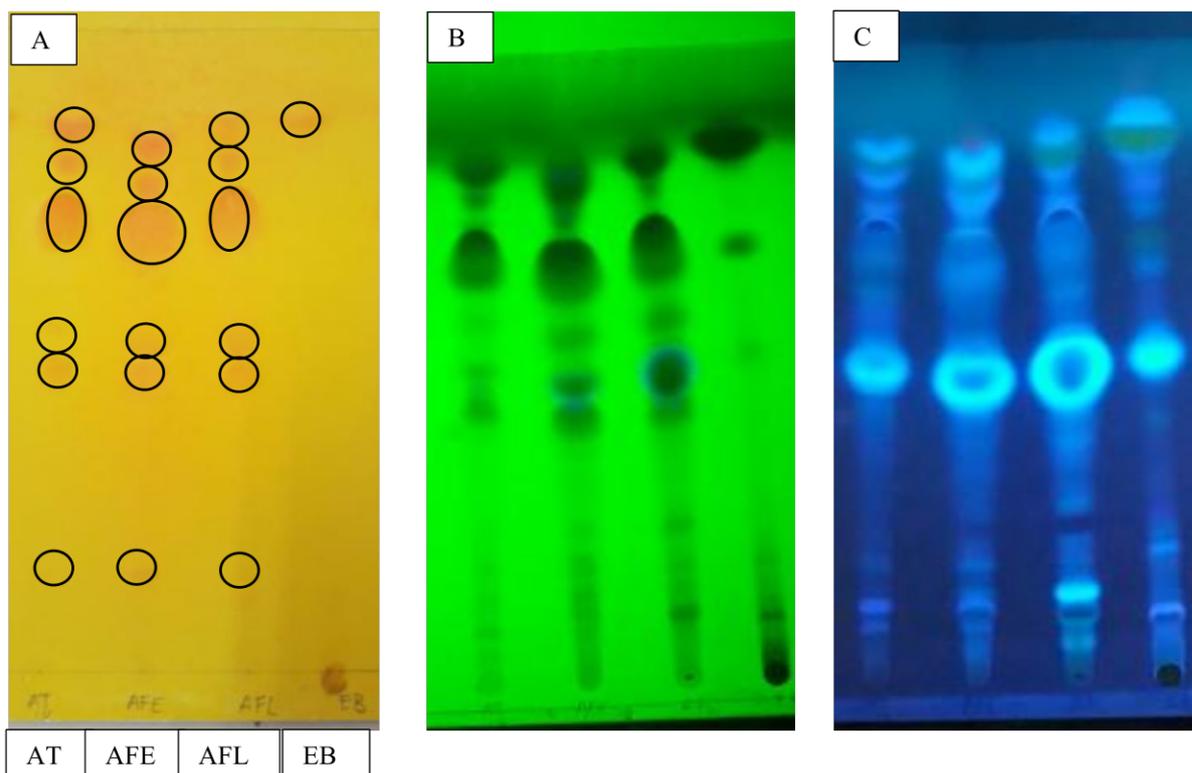


Figure 23: Chromatogrammes des extraits de la partie aérienne de *Ruta montana* après révélation par révélateur de Dragendorff (A) et UV= 254 nm (B), 365 nm (C). AT: alcaloïdes totaux, AFE: alcaloïdes totaux des feuilles, AFL: alcaloïdes totaux des fleurs, EB: extrait brut.

L'examen de chromatographie sur couche mince des extraits des alcaloïdes totaux de la partie aérienne (AT), des feuilles (AFE) et des fleurs (AFL) a indiqué les mêmes alcaloïdes pour les trois extraits, seulement l'extrait brut méthanolique (EB) n'a pas présenté les mêmes alcaloïdes.

I- 3 Screening phytochimique

Les résultats de screening phytochimique sont classés en fonction des différents critères d'observation en:

- Réaction positive (+)
- Test négatif (-).

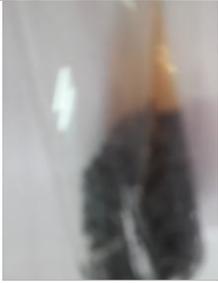
Les résultats des réactions d'identification des métabolites secondaires sont affichés dans le tableau ci-dessous.

I-Résultats

Tableau 1: Résultats de screening phytochimique de la partie aérienne de la plante *Ruta montana*.

Métabolites secondaires	Test effectué	Résultats
Alcaloïdes	Dragendorff	 (+)
Tanins	FeCl ₃ 2%	 (+)
T. catéchiques	Stiasny	 (+)
T.galliques	Acétate de sodium + FeCl ₃ 2%	 (+)
Anthocyanes	H ₂ SO ₄ 10% + NH ₄ OH	 (-)

I-Résultats

Coumarines	NaOH 10%	 (+)
Flavonoïdes	HCl + 0.5 g de zinc	 (+)
Terpénoïdes	anhydride acétique + Chloroforme + H ₂ SO ₄	 (+)
Stéroïdes	Chloroforme + H ₂ SO ₄	 (+)
Saponines	Agitation	 (-)

I-Résultats

I- 4 Détermination de la DL₅₀ des alcaloïdes totaux de la partie aérienne de la plante *Ruta montana* chez les rats mâles

I- 4- 1 Observation du comportement des animaux

Au cours de traitement par l'extrait alcaloïdique de la plante *Ruta montana*, on a enregistré chez les animaux traités des symptômes différents qui s'aggravent avec les doses les plus élevées, parmi les :

- Poils dressés, difficulté de marche (paralysie), regroupement dans le coin de la cage.
- Tachycardie, difficulté de respiration suivie par une cyanose.

La mortalité a été enregistrée à partir de la première heure de traitement (après presque 15 minutes) jusqu'à 24^{ème} heures. Pour les animaux survivants, les symptômes sont régressés progressivement, et après 24 heures, un comportement normal a été constaté comparer à celui des témoins.

I- 4- 2 Calcul de la DL₅₀ par la méthode de Litchfield et Wilcoxon (1949)

L'administration de l'extrait alcaloïdique de *Ruta montana*, par voie intra-péritonéale, aux trois groupes, de dix rats, et avec les doses 400, 500 et 600 mg/kg, a permis d'établir le tableau 2 qui présente la mortalité des rats mâles en pourcentage et en unités de probits en fonction de la dose.

Tableau 2: Dose-effet de l'extrait alcaloïdique des parties aériennes de *Ruta montana* chez les rats mâles traités par voie intra-péritonéale.

Dose mg/kg	Nbre des morts/groupe	Log dose	Effet observé		Effet attendu		Différence de %	χ^2
			%	Probit	%	Probit		
400	2/10	2.6021	20	4.16	21.3	4.2	1.3	0
500	5/10	2.6990	50	5	42.3	4.8	7.7	0.0225
600	6/10	2.7782	60	5.25	61.9	5.3	1.9	0.0015

La somme des diverses contributions au χ^2 : $\Sigma \text{ cont. } \chi^2 = 0.024$.

$\chi^2 \text{ de la droite}$: $\Sigma \text{ cont. } \chi^2 \cdot N/K = 0.024 \cdot 30/3 = 0.24$.

(N/K : nombre moyen d'animaux par dose, N : nombre total d'animaux, K : nombre total des doses).

I-Résultats

χ^2 théorique : pour le seuil de probabilité $p= 0.05$ et pour le nombre de degré de liberté $n = 3-2$ (nombre total des doses-2) est 3.84.

➤ χ^2 expérimental < χ^2 théorique donc le travail est accepté.

A partir des données présentées au tableau 2, on a tracé la droite: probit = f(log dose) (Fig.24)

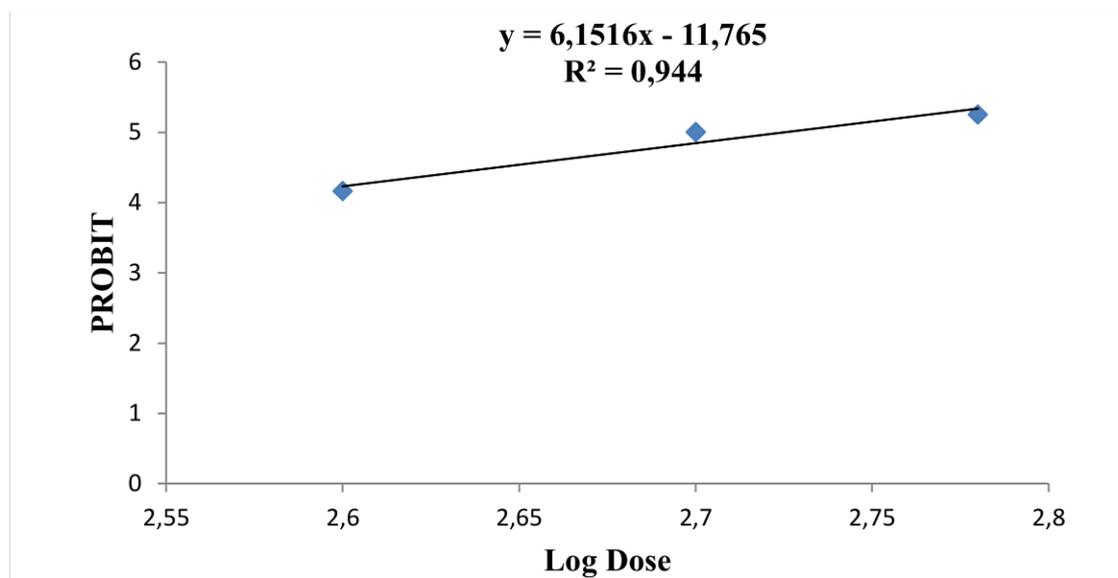


Figure 24: Droite de détermination de la DL_{50} chez les rats mâles traités par voie intrapéritonéale par l'extrait alcaloïdique de *Ruta montana* L. par la méthode de Litchfield et Wilcoxon (1949).

A partir de la droite tracée, on a déterminé les valeurs suivantes:

- * La DL_{16} (probit 4) = 371.5352 mg/kg.
- * La DL_{50} (probit 5) = 524.8075 mg/kg.
- * La DL_{84} (probit 6) = 776.2471 mg/kg.

Calcul de la pente S

$$S = (DL_{84}/ DL_{50} + DL_{50}/ DL_{16})/2 = 1.4458.$$

Les limites de confiance de la DL_{50}

Pour le seuil de probabilité $p= 0.05$, les limites de la de la DL_{50} sont les suivant :

$$435.5610 \text{ mg/kg} < DL_{50} < 632.3406 \text{ mg/kg.}$$

- * Limite supérieure = $DL_{50} \cdot f DL_{50} = 632.3406 \text{ mg/kg.}$
- * Limite inférieure = $DL_{50}/ f DL_{50} = 435.5610 \text{ mg/kg.}$

Où le facteur de correction $f DL_{50} = S^{2.77/\sqrt{N}}$, N: le nombre d'animaux situés entre DL_{16} et DL_{84} .

I-Résultats

I- 5 Détermination de la DL₅₀ des alcaloïdes totaux de la partie aérienne de la plante *Ruta montana* chez les rats femelles

I- 5- 1 Observation du comportement des animaux

Le comportement des rats femelles traités par l'extrait alcaloïdique de la plante *Ruta montana* est comparable à celui des rats mâles, où on a aussi enregistré la mortalité à partir de la première heure de traitement (après presque 15 minutes) jusqu'à 24^{ème} heures. Pour les animaux survivants, les symptômes sont régressés progressivement, et après 24 heures, un comportement normal a été constaté comparé à celui des témoins.

I- 5- 2 Calcul de la DL₅₀ par la méthode de Litchfield et Wilcoxon (1949)

L'administration de l'extrait alcaloïdique de *Ruta montana*, par voie intra-péritonéale, aux trois groupes, de dix rattes, et avec les doses 400, 500 et 600 mg/kg, a permis d'établir le tableau 3 qui présente la mortalité des rats femelles en pourcentage et en unités de probits en fonction de la dose.

Tableau 3: Dose-effet de l'extrait alcaloïdique des parties aériennes de *Ruta montana* chez les rats femelles traitées par voie intra-péritonéale.

Dose mg/kg	Nbre des morts/groupe	Log dose	Effet observé		Effet attendu		Différence de %	χ^2
			%	Probit	%	Probit		
400	5/10	2.6021	50	5	50.1	5	0.1	0
500	6/10	2.6990	60	5.25	60.1	5.3	0.1	0
600	7/10	2.7782	70	5.52	69.3	5.5	0.7	0

La somme des diverses contributions au χ^2 : $\Sigma \text{ cont. } \chi^2 = 0$.

χ^2 de la droite : $\Sigma \text{ cont. } \chi^2.N/K = 0.30/3 = 0$.

(N/K : nombre moyen d'animaux par dose, N : nombre total d'animaux, K : nombre total des doses).

χ^2 théorique : pour le seuil de probabilité $p = 0.05$ et pour le nombre de degré de liberté $n = 3-2$ (nombre total des doses-2) est 3.84.

➤ χ^2 expérimental < χ^2 théorique donc le travail est accepté.

A partir des données présentées au tableau 3, on a tracé la droite: probit = f(log dose) (Fig.25)

I-Résultats

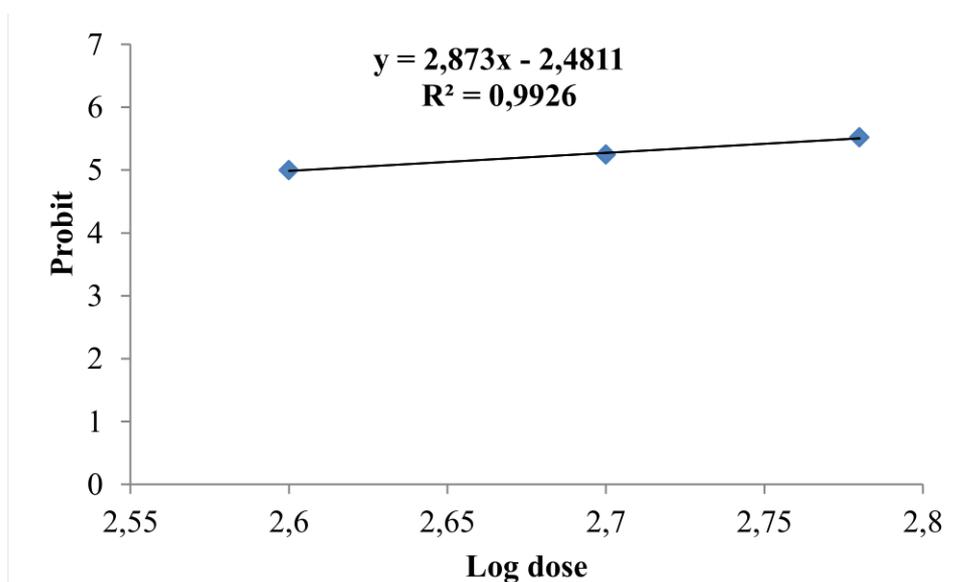


Figure 25: Droite de détermination de la DL_{50} chez les rats femelles traités par voie intrapéritonéale par l'extrait alcaloïdique de *Ruta montana* L. par la méthode de Litchfield et Wilcoxon (1949).

A partir de la droite tracée, on a déterminé les valeurs suivantes:

- * La DL_{16} (probit 4) = 218.7761 mg/kg.
- * La DL_{50} (probit 5) = 398.1071 mg/kg.
- * La DL_{84} (probit 6) = 851.1380 mg/kg.

Calcul de la pente S

$$S = (DL_{84}/DL_{50} + DL_{50}/DL_{16})/2 = 1.9788.$$

Les limites de confiance de la DL_{50}

Pour le seuil de probabilité $p = 0.05$, les limites de la de la DL_{50} sont les suivant :

$$281.9255 \text{ mg/kg} < DL_{50} < 562.1670 \text{ mg/kg}.$$

- * Limite supérieure = $DL_{50} \cdot f_{DL_{50}} = 562.1670 \text{ mg/kg}$.
- * Limite inférieure = $DL_{50}/f_{DL_{50}} = 281.9255 \text{ mg/kg}$.

Où le facteur de correction $f_{DL_{50}} = S^{2.77/\sqrt{N}}$, N : le nombre d'animaux situés entre DL_{16} et DL_{84} .

I- 6 La sensibilité du sexe

Afin de trouver si il' y a une sensibilité de sexe à l'extrait alcaloïdique de la partie aérienne de *Ruta montana* (Fig.26), on a comparé les valeurs SR par f_{SR} et PR avec f_{PR} . voir tableau 4.

I-Résultats

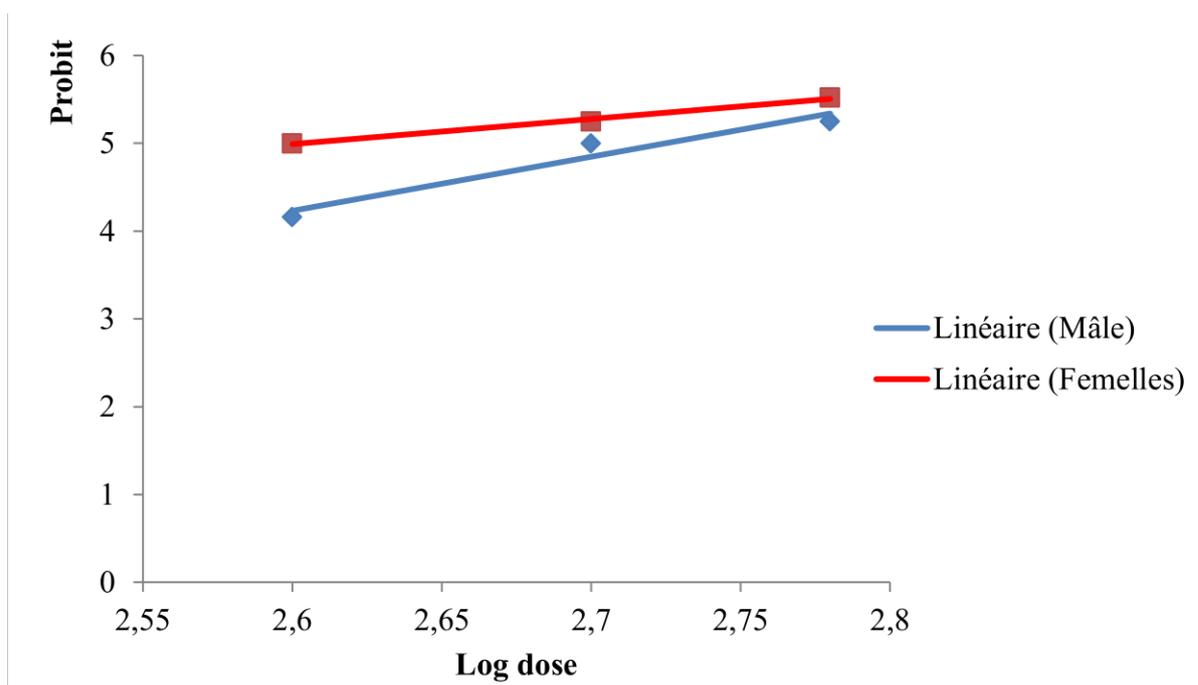


Figure 26: Graphique déterminant la sensibilité de sexe (rats mâles et femelles) à l'extrait alcaloïdique de *Ruta montana*.

Tableau 4: Les différents paramètres pour déterminer si il' y a une sensibilité de sexe (rats mâles et femelles) à l'extrait alcaloïdique de *Ruta montana*.

Paramètres	Formule de calcul	les rats mâles	les rats femelles
DL ₅₀ (mg/kg)		524.8075	398.1071
DL ₁₆ (mg/kg)		371.5352	218.7761
DL ₈₄ (mg/kg)		776.2471	851.1380
Zone de l'action létale (Z)	$Z = DL_{84} / DL_{16}$	2.0892	3.8904
La pente S	$S = \frac{DL_{84}/DL_{50} + DL_{50}/DL_{16}}{2}$	1.4458	1.9788
Facteur de risque (K)	$K = \frac{1}{DL_{50} \cdot S}$	0.001317	0.001269
SR	$SR = \frac{S_1}{S_2} \quad S_1 > S_2$	1.3686	
R	$R = \frac{\text{la plus grande dose}}{\text{la petite dose}}$	1.5	1.5
A		1.5	3

I-Résultats

Indicateur I		1.2	1.2
f_{DL50}		1.24	1.4
f_S		1.65	3.8
f_{SR}		>1.95	
PR	$PR = \frac{DL50_1}{DL50_2} \quad DL_{50}1 > DL_{50}2$	1.3183	
f_{PR}		1.49	

Si $SR < f_{SR}$ donc les droites sont en parallèle, dans notre cas $SR < f_{SR}$ alors les deux droites sont en parallèle donc l'extrait alcaloïdique de *Ruta montana* pourrait avoir le même mécanisme léthal chez les deux sexes. Donc on vérifie son activité biologique sur les deux sexes, on comparant PR avec f_{PR} :

Si $PR > f_{PR}$ il y a une différence significative entre les deux droites comparées pour $P=0.05$ et l'activité biologique est différente sur les deux sexes. Dans notre cas $PR < f_{PR}$ donc il n'y a pas une différence significative entre les deux droites comparées pour $P=0.05$ alors l'activité biologique pourrait être la même pour les deux sexes.

I- 7 Détermination de la DL_{50} de l'extrait brut méthanolique de la plante *Ruta montana* chez les rats femelles

I- 7- 1 Observation du comportement des animaux

Au cours de traitement par l'extrait brut méthanolique de la plante *Ruta montana*, on a enregistré chez les animaux traités des symptômes différents qui s'aggravent avec les doses les plus élevées et ils sont comparables à ceux observés chez les animaux traités par l'extrait alcaloïdique, où on a aussi enregistré:

- Poils dressés, difficulté de marche (paralysie), regroupement dans le coin de la cage.
- Tachycardie, difficulté de respiration suivie par une cyanose.

La mortalité a été enregistrée à partir de la première heure de traitement (après presque 15 minutes) jusqu'à 24^{ème} heures. Pour les animaux survivants, les symptômes sont régressés progressivement, et ont regagné un comportement normal après 24 heures en comparaison avec les animaux témoins.

I- 7- 2 Calcul de la DL_{50} par la méthode de Litchfield et Wilcoxon (1949)

L'administration de l'extrait brut méthanolique de *Ruta montana*, par voie intrapéritonéale, aux cinq groupes, de six rattes, et avec des doses comprises entre 800 et 1600

I-Résultats

mg/kg, a permis d'établir le tableau 5 présentant la mortalité des rats femelles en pourcentage et en unités de probits en fonction de la dose, selon la méthode de Litchfield et Wilcoxon (1949).

Tableau 5: Dose-effet de l'extrait brut méthanolique des parties aériennes de *Ruta montana* chez les rats femelles traitées par voie intra-péritonéale.

Dose mg/kg	Nbre des morts/groupe	Log dose	Effet observé		Effet attendu		Différence de %	χ^2
			%	Probit	%	Probit		
800	0/6	2.9030	0.5	2.42	1.4	2.8	0.9	0.006
1000	1/6	3	16.7	4.03	18.5	4.1	1.8	0.002
1200	4/6	3.0791	66.6	5.43	58.1	5.2	8.5	0.03
1400	5/6	3.1461	83.3	5.97	86.5	6.1	3.2	0.0085
1600	6/6	3.2041	98.6	7.20	95.8	6.73	2.8	0.018

La somme des diverses contributions au χ^2 : $\Sigma \text{ cont. } \chi^2 = 0.0645$.

χ^2 de la droite : $\Sigma \text{ cont. } \chi^2 \cdot N/K = 0.0645 \cdot 30/5 = 0.387$.

(N/K : nombre moyen d'animaux par dose, N : nombre total d'animaux, K : nombre total des doses).

χ^2 théorique : pour le seuil de probabilité $p = 0.05$ et pour le nombre de degré de liberté $n = 5 - 2$ (nombre total des doses - 2) est 7.82.

➤ **χ^2 expérimental < χ^2 théorique donc le travail est accepté.**

A partir des données présentées au tableau 5, on a tracé la droite: probit = f(log dose) (Fig.27)

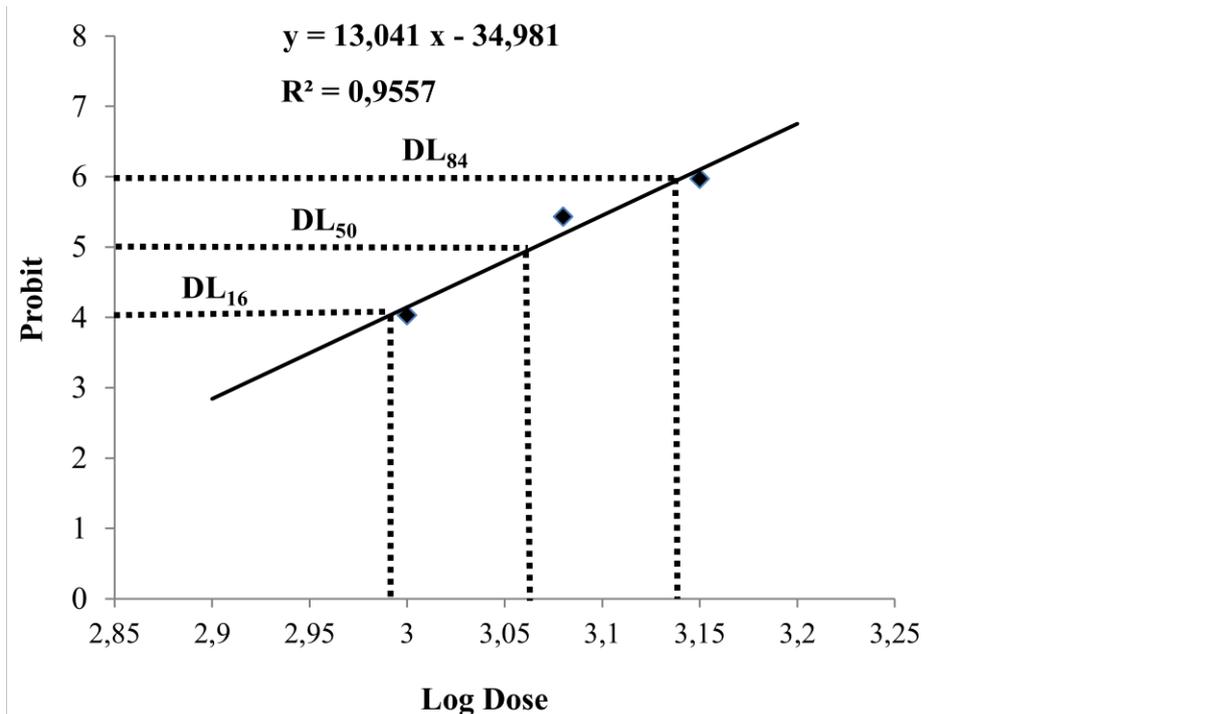


Figure 27: Droite de détermination de la DL₅₀ chez les rats femelles traités par voie intrapéritonéale par l'extrait brut méthanolique de *Ruta montana* L. par la méthode de Litchfield et Wilcoxon (1949).

A partir de la droite tracée, on a déterminé les valeurs suivantes:

- * La DL₁₆ = 977.2372 mg/kg.
- * La DL₅₀ = 1161.4486 mg/kg.
- * La DL₈₄ = 1380.3842 mg/kg.

Calcul de la pente S

$$S = (DL_{84}/DL_{50} + DL_{50}/DL_{16})/2 = 1.1885.$$

Les limites de confiance de la DL₅₀

Pour le seuil de probabilité $p = 0.05$, les limites de la de la DL₅₀ sont les suivant :

$$1011.7148 \text{ mg/kg} < DL_{50} < 1333.3429 \text{ mg/kg}.$$

- * Limite supérieure = $DL_{50} \cdot fDL_{50} = 1333.3429 \text{ mg/kg}$.
- * Limite inférieure = $DL_{50}/fDL_{50} = 1011.7148 \text{ mg/kg}$.

Où le facteur de correction $fDL_{50} = S^{2.77/\sqrt{N}}$, N': le nombre d'animaux situés entre DL₁₆ et DL₈₄.

I- 8 Détermination de la DL₅₀ de l'extrait brut méthanolique de la plante *Ruta montana* chez les rats mâles

I- 8- 1 Observation du comportement des animaux

Le même comportement que celui des animaux traités soit par l'extrait alcaloïdique ou bien méthanolique a été enregistré chez les rats mâles traités par l'extrait brut méthanolique de la plante *Ruta montana*

I- 8- 2 Calcul de la DL₅₀ par la méthode de Litchfield et Wilcoxon (1949)

L'administration de l'extrait brut méthanolique de *Ruta montana*, par voie intra-péritonéale, aux six groupes, de six rats, et avec des doses comprises entre 600 et 1800 mg/kg, a permis d'établir le tableau 6 qui présente la mortalité des rats mâles en pourcentage et en unités de probits en fonction de la dose, selon la méthode de Litchfield et Wilcoxon (1949).

Tableau 6: Dose-effet de l'extrait brut méthanolique des parties aériennes de *Ruta montana* chez les rats mâles traitées par voie intra-péritonéale.

Dose mg/kg	Nbre des morts/groupe	Log dose	Effet observé		Effet attendu		Différence de %	χ^2
			%	Probit	%	Probit		
600	0/6	2.7781	0.8	2.59	2.3	3	1.5	0.01
800	1/6	2.9030	16.7	4.03	16.1	4	0.6	0
1000	2/6	3	33.3	4.57	42.3	4.8	9	0.034
1200	4/6	3.0791	66.6	5.43	65.5	5.4	1.1	0
1400	5/6	3.1461	83.3	5.97	81.7	5.9	1.6	0.0019
1800	6/6	3.2552	98.8	7.26	96.4	6.8	2.4	0.016

La somme des diverses contributions au χ^2 : $\Sigma \text{ cont. } \chi^2 = 0.0619$.

$\chi^2 \text{ de la droite}$: $\Sigma \text{ cont. } \chi^2 \cdot N/K = 0.0645 \cdot 36/6 = 0.37$.

(N/K : nombre moyen d'animaux par dose, N : nombre total d'animaux, K : nombre total des doses).

I-Résultats

χ^2 théorique : pour le seuil de probabilité $p= 0.05$ et pour le nombre de degré de liberté $n = 6-2$ (nombre total des doses-2) est 9.49.

➤ χ^2 expérimental < χ^2 théorique donc le travail est accepté.

A partir des données présentées au tableau 6, on a tracé la droite: probit = f(log dose) (Fig.28)

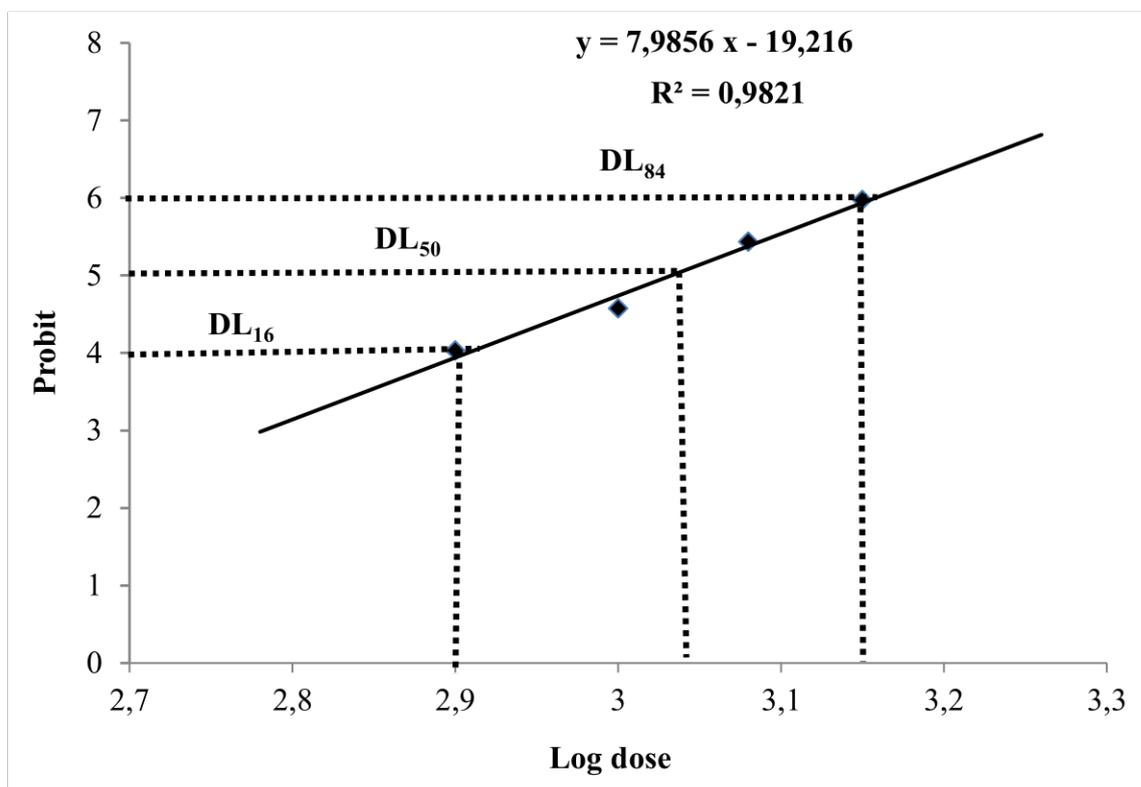


Figure 28: Droite de détermination de la DL_{50} chez les rats mâles traités par voie intrapéritonéale par l'extrait brut méthanolique de *Ruta montana* L. par la méthode de Litchfield et Wilcoxon (1949).

A partir de la droite tracée, on a déterminé les valeurs suivantes:

- * La DL_{16} = 794.3282 mg/kg.
- * La DL_{50} = 1071.5193 mg/kg.
- * La DL_{84} = 1445.4397 mg/kg.

Calcul de la pente S

$$S = (DL_{84}/DL_{50} + DL_{50}/DL_{16})/2 = 1.3489.$$

Les limites de confiance de la DL_{50}

Pour le seuil de probabilité $p = 0.05$, les limites de la de la DL_{50} sont les suivant:

904.7701 mg/kg < DL_{50} < 1269.0003 mg/kg.

- * Limite supérieure = $DL_{50} \cdot fDL_{50} = 1269.0003$ mg/kg.
- * Limite inférieure = $DL_{50}/fDL_{50} = 904.7701$ mg/kg.

I-Résultats

Où le facteur de correction $f_{DL_{50}} = S^{2.77/\sqrt{N}}$, N': le nombre d'animaux situés entre DL₁₆ et DL₈₄.

I- 9 La sensibilité du sexe

Afin de trouver si il' y a une sensibilité de sexe à l'extrait brut méthanolique de la partie aérienne de *Ruta montana* (Fig.29), on a comparé les valeurs SR par f_{SR} et PR avec f_{PR} . voir tableau 7.

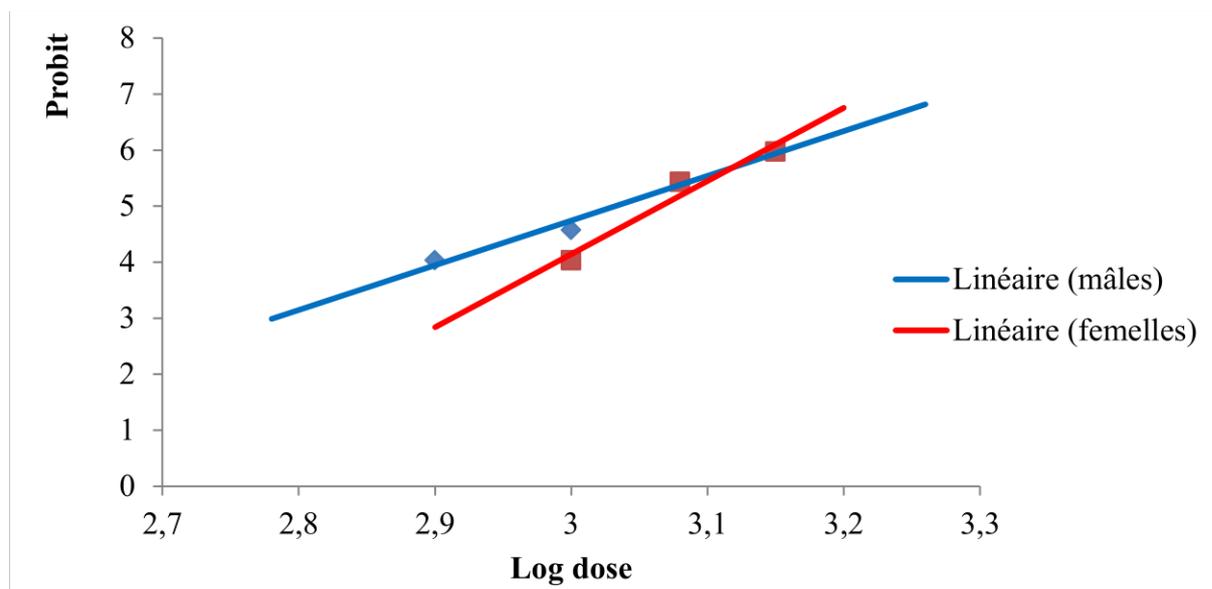


Figure 29: Graphique déterminant la sensibilité de sexe (rats mâles et femelles) à l'extrait brut méthanolique de *Ruta montana*.

Tableau 7: Les différents paramètres pour déterminer si il' y a une sensibilité de sexe (rats mâles et femelles) à l'extrait brut méthanolique de *Ruta montana*.

Paramètres	Formule de calcul	les rats mâles	les rats femelles
DL ₅₀ (mg/kg)		1071.5193	1161.4486
DL ₁₆ (mg/kg)		794.3282	977.2372
DL ₈₄ (mg/kg)		1445.4397	1380.3842
Zone de l'action létale (Z)	$Z = DL_{84} / DL_{16}$	1.8197	1.4125
La pente S	$S = \frac{DL_{84}/DL_{50} + DL_{50}/DL_{16}}{2}$	1.3489	1.1885
Facteur de risque (K)	$K = \frac{1}{DL_{50} \cdot S}$	0.0006618	0.0007244

I-Résultats

SR	$SR = \frac{S1}{S2} \quad S1>S2$	1.1350	
R	$R = \frac{\text{la plus grande dose}}{\text{la petite dose}}$	3	2
A		1.09	1.05
Indicateur I		1.7	2.3
f_{DL50}		1.2	1.15
f_S		1.15	1.12
f_{SR}		1.2	
PR	$PR = \frac{DL50\ 1}{DL50\ 2} \quad DL_{50}1>DL_{50}\ 2$	1.0839	
f_{PR}		1.26	

Si $SR < f_{SR}$ donc les droites sont en parallèle, dans notre cas $SR < f_{SR}$ alors les deux droites sont en parallèle donc l'extrait brut méthanolique de *Ruta montana* pourrait avoir le même mécanisme léthal chez les deux sexes. Mais en analysant les deux droites, on trouve que pour les doses inférieures à 1200 mg/kg, les deux droites sont parallèles, elles ne se croisent pas et pour les doses supérieures à 1300 mg/kg, elles sont croisées.

Dans ce cas, on vérifie son activité biologique, on comparant PR avec f_{PR} :

Si $PR > f_{PR}$ il y a une différence significative entre les deux droites comparées pour $P=0.05$ et l'activité biologique est différente sur les deux sexes. Dans notre cas $PR < f_{PR}$ donc il n'y a pas une différence significative entre les deux droites comparées pour $P=0.05$ alors l'activité biologique pourrait être la même sur les deux sexes.

I- 10 Toxicité subchronique

Les rattes albinos Wistar traitées avec la dose de 38.7149 mg/kg de l'extrait brut méthanolique de la plante *Ruta montana* (1/30 DL_{50}) dans les conditions de la toxicité subchronique n'ont montré aucun symptôme visible de toxicité pendant 45 jours d'observation.

I- 10- 1 Effet de l'extrait brut méthanolique de la plante *Ruta montana* sur le poids corporel et la masse relative des rats femelles albinos Wistar

L'évolution de poids corporel des rattes traitées et témoins est présentée dans la figure 30. L'évolution du poids corporel des rattes traités a enregistré une diminution

I-Résultats

significative dans la 2^{ème} et la 7^{ème} semaine de 7.63 % et 7.34 % respectivement en comparaison avec le groupe témoin ($P < 0.05$), cependant les restes des semaines ont connu une évolution normale. Le groupe témoin a présenté une évolution normale dans son poids corporel.

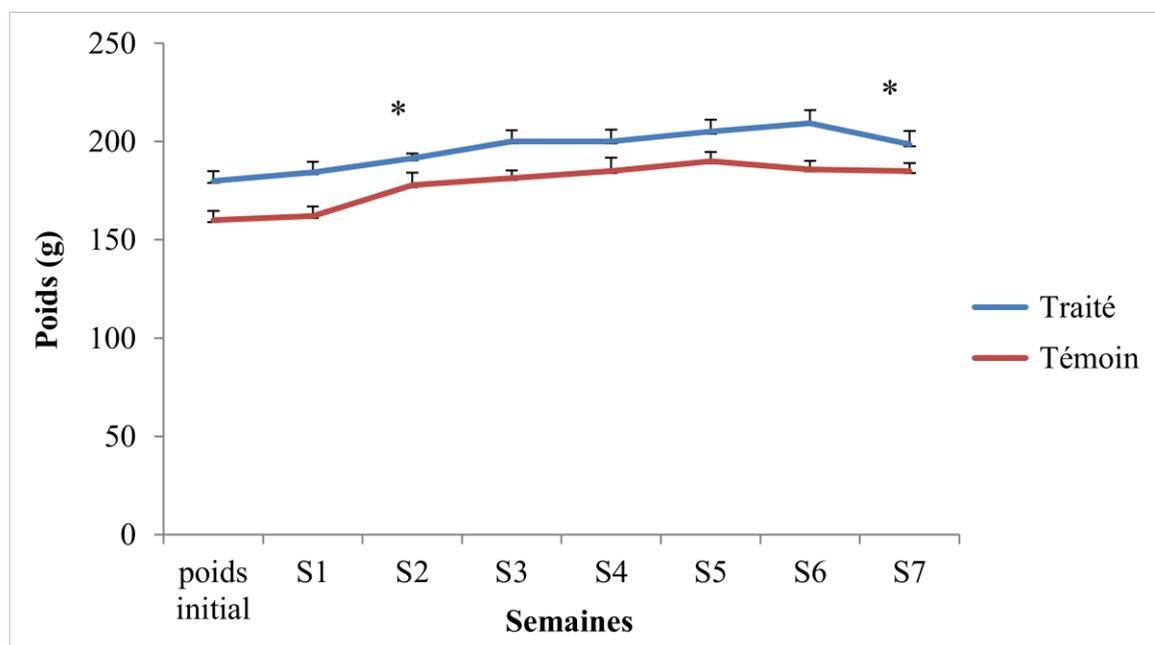


Figure 30: L'évolution de poids corporel (g) des rattes témoins et traitées par la dose de 38.7149 mg/kg (1/30 DL₅₀) de l'extrait brut méthanolique de la plante *Ruta montana* dans les conditions de la toxicité subchronique. Les valeurs sont présentées en moyenne \pm écart type, * significativement différent, $P < 0.05$.

Les masses relatives des organes des rattes témoins et traitées sont présentées dans le Tableau 8. Macroscopiquement, aucune anomalie n'a été constatée dans les organes interne chez tous les rattes, mais statistiquement, on a noté une diminution significative dans la masse relative du cerveau de 16.5% et une augmentation significative de la masse relative des ovaires de 36.05% chez les rattes traités par rapport aux témoins ($P < 0.05$), tandis que les autres organes aucune différence significative n'a été enregistrée.

I-Résultats

Tableau 8: La masse relative des organes des rattes témoins et traitées dans les conditions de la toxicité subchronique par la dose de 38.7149 mg/kg (= 1/30 DL₅₀) de l'extrait brut méthanolique de la plante *Ruta montana*.

	Foie	Reins	Cœur	Rate	Cerveau	Poumons	Ovaires
Traité	0,0309	0,00669	0,00332	0,00294	0,00825*	0,007	0,000819*
	±	±	±	±	±	±	±
	0,00201	0,000441	0,000309	0,000752	0,000405	0,00104	0,000169
Témoin	0,0314	0,00672	0,00323	0,00285	0,00988	0,00735	0,000602
	±	±	±	±	±	±	±
	0,00354	0,000509	0,000207	0,000502	0,000595	0,000833	0,0000486

Les valeurs sont présentées en moyenne ± écart type, * significativement différent, P<0.05.

I- 10- 2 Etude des paramètres biochimiques

❖ Les paramètres biochimiques de la fonction rénale

Les paramètres biochimiques de l'évaluation de la fonction rénale sont présentés dans la figure 31. Aucune différence significative n'a été enregistrée dans les concentrations de l'urée et de la créatinine chez les rattes traitées en comparaison avec les animaux témoins.

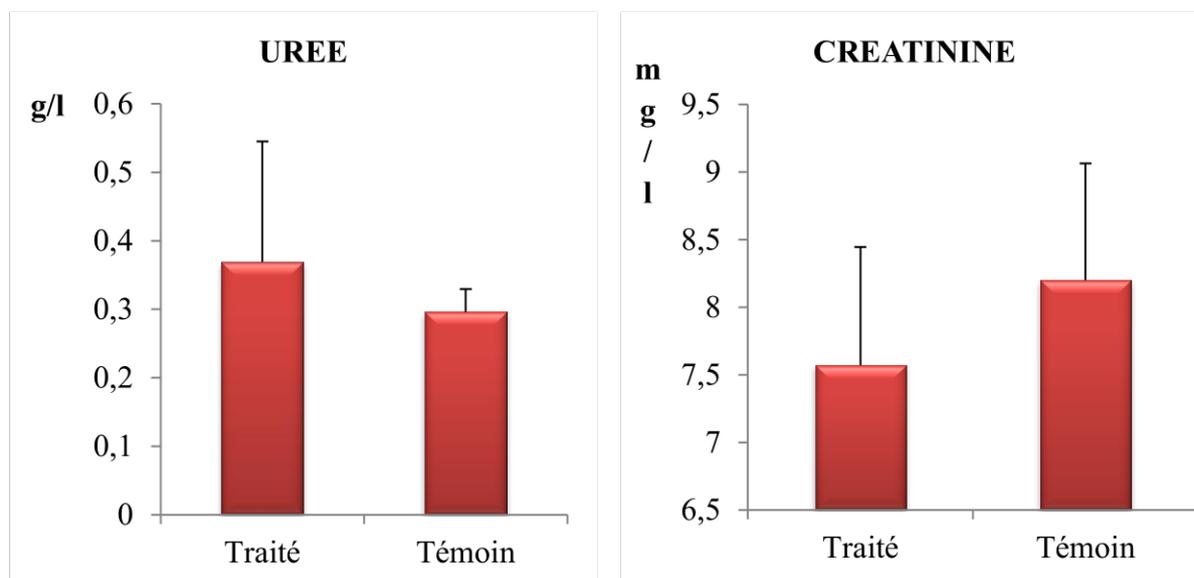


Figure 31: Taux sériques d'urée et de la créatinine des rattes témoins et traitées dans les conditions de la toxicité subchronique par la dose de 38.7149 mg/kg (= 1/30 DL₅₀) de l'extrait brut méthanolique de la plante *Ruta montana*. Les valeurs sont présentées en moyenne ±écart type.

I-Résultats

❖ Les paramètres biochimiques de la fonction hépatique

Les paramètres biochimiques de l'évaluation de la fonction hépatique sont présentés dans les figures ci-dessous. Aucune différence significative n'a été enregistrée dans GOT, GPT et PAL, dans la bilirubine totale directe et indirecte comparées aux valeurs des animaux témoins (Fig.32, 33).

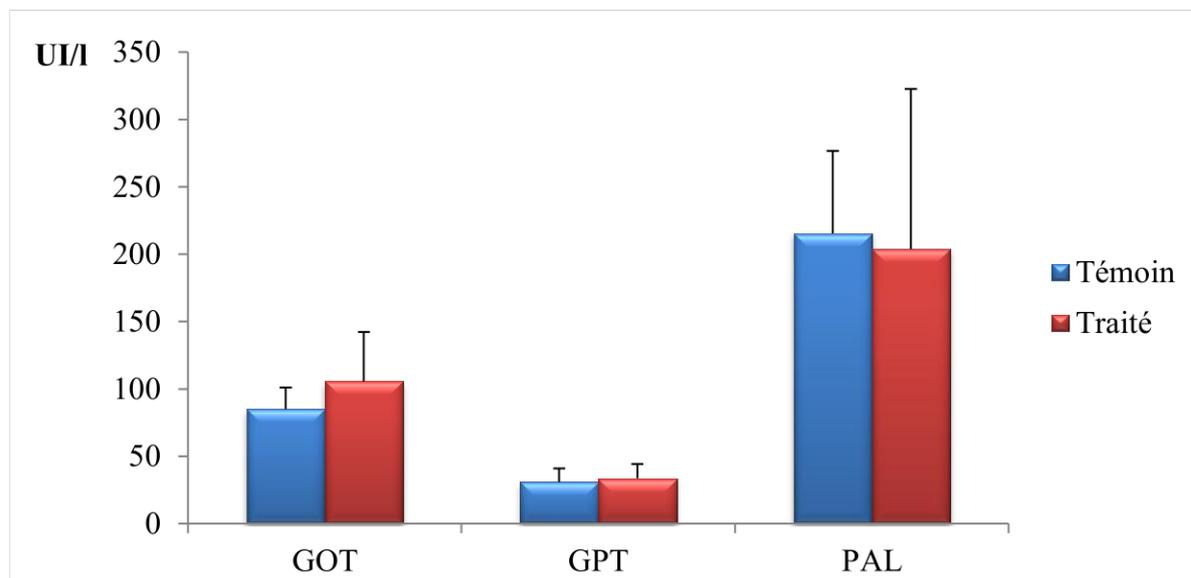


Figure 32: Taux sérique de «GOT, GPT et PAL » des rattes témoins et traitées dans les conditions de la toxicité subchronique par la dose de 38.7149 mg/kg (= 1/30 DL₅₀) de l'extrait brut méthanolique de la plante *Ruta montana*. Les valeurs sont présentées en moyenne \pm écart type.

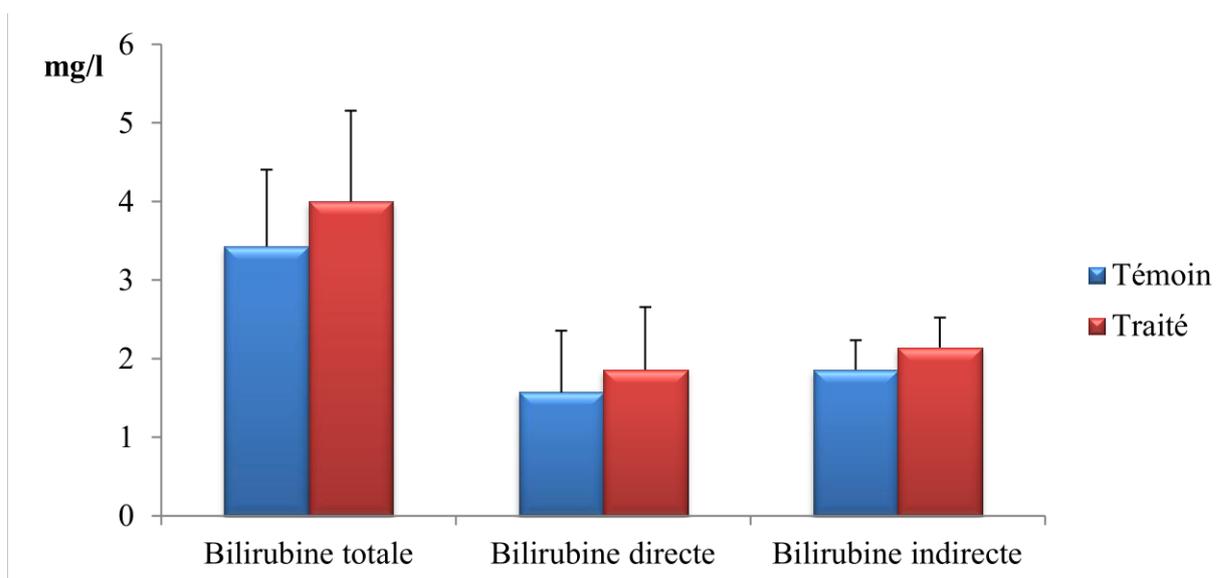


Figure 33: Taux sérique de « bilirubine totale, directe et indirecte » des rattes témoins et traitées dans les conditions de la toxicité subchronique par la dose de 38.7149 mg/kg (= 1/30 DL₅₀) de l'extrait brut méthanolique de la plante *Ruta montana*. Les valeurs sont présentées en moyenne ±écart type.

I- 10- 3 Etude des hormones de reproduction

Les valeurs des hormones de reproduction; FSH (follicle stimulating hormone) et LH (luteinizing hormone) sont présentés dans la figure 34. Aucune différence significative n'a été enregistrée dans les valeurs de FSH et LH chez les rattes traitées en comparaison avec les témoins.

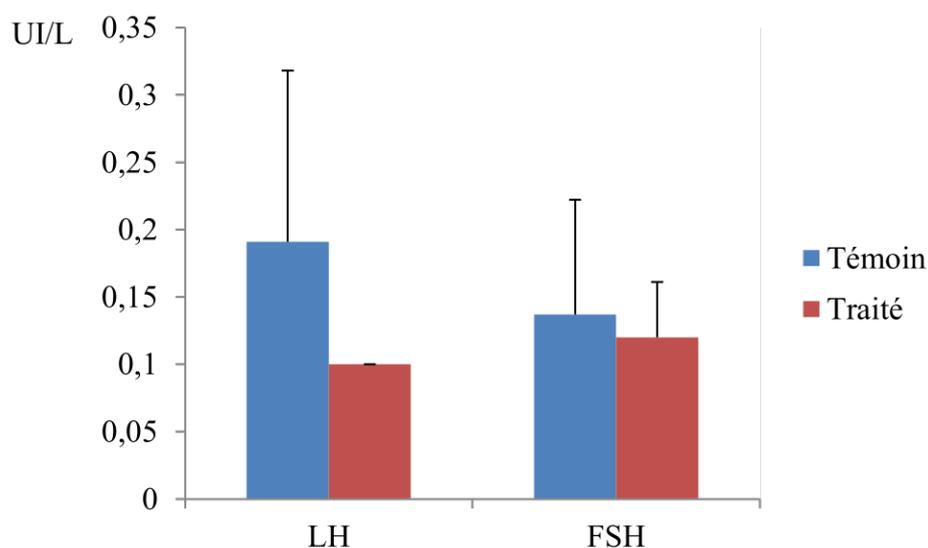


Figure 34: Taux sérique de « LH, FSH » des rattes témoins et traitées dans les conditions de la toxicité subchronique par la dose de 38.7149 mg/kg (= 1/30 DL₅₀) de l'extrait brut méthanolique de la plante *Ruta montana*. Les valeurs sont présentées en moyenne ±écart type.

I- 10- 4 Etude des paramètres hématologiques

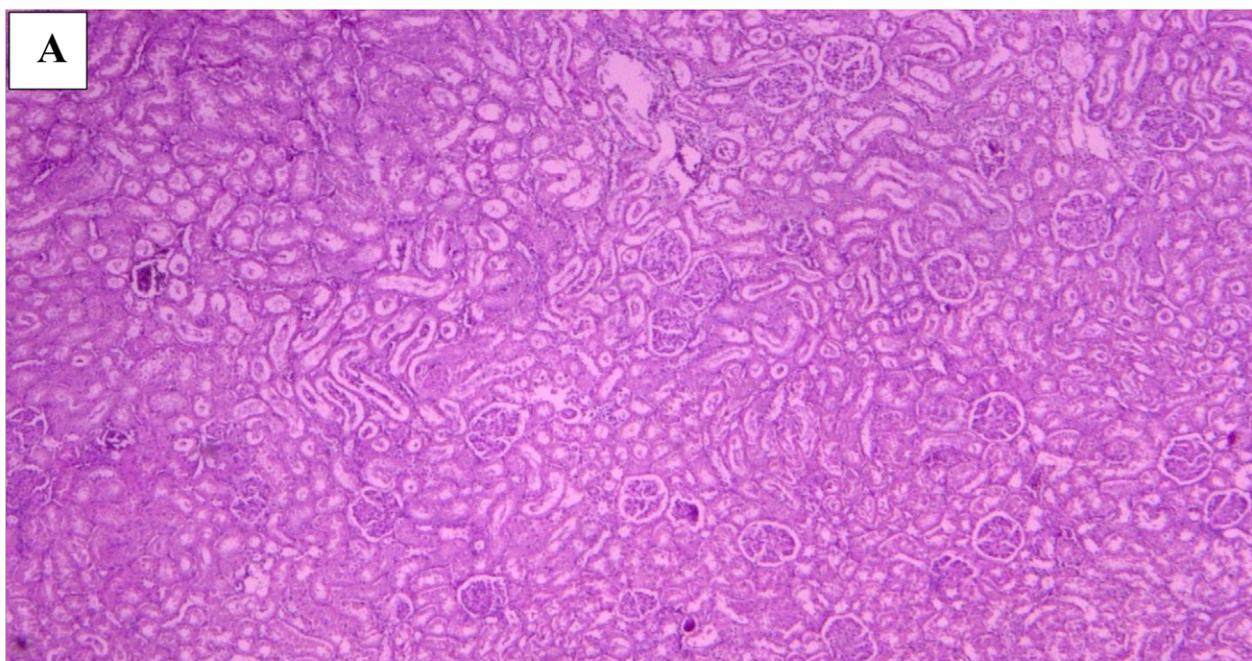
Les valeurs des différents paramètres hématologiques sont mentionnées dans le tableau 9. On a enregistré une augmentation significative dans la valeur de TCMH de 3.46 % et une diminution significative dans le pourcentage d'IDR de 6.95 % chez les rattes traitées en comparaison avec les témoins ($P < 0.05$). Cependant les autres paramètres n'ont pas marqués une différence significative chez les rattes traitées par rapport aux témoins.

I- 10- 5 Etude histopathologique

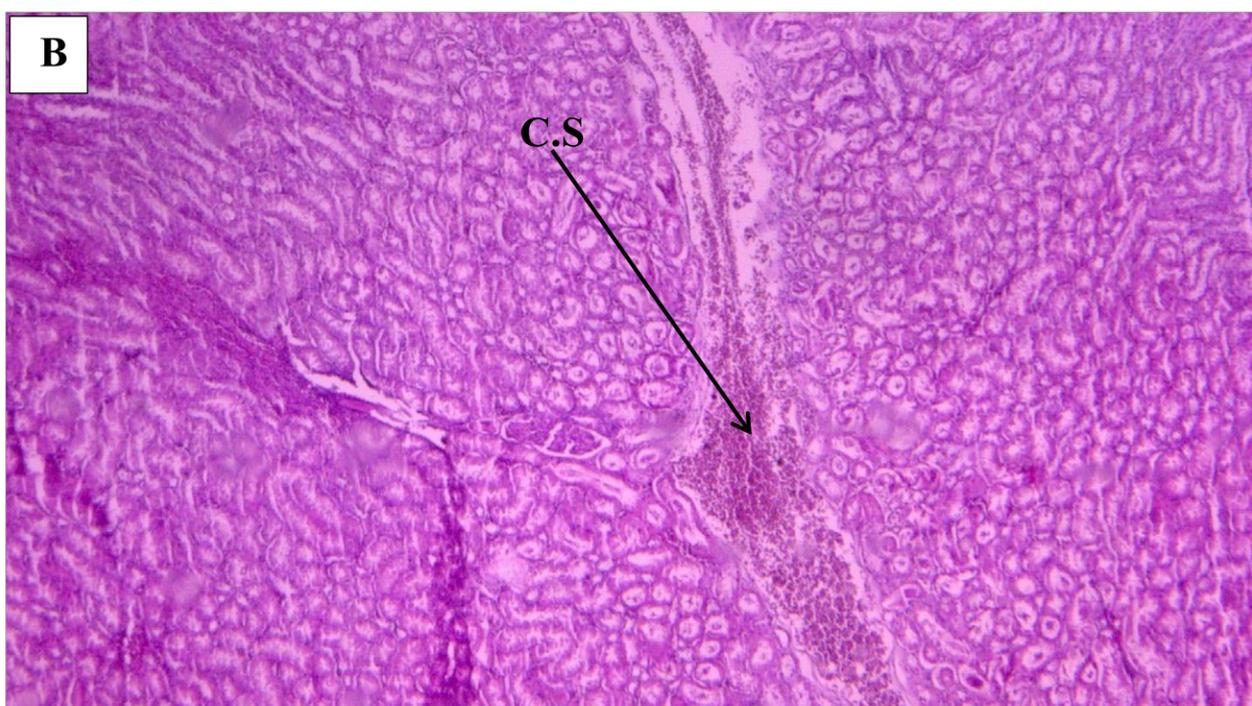
L'observation des coupes histologiques des reins des rattes témoins et traitées dans les conditions de la toxicité subchronique par la dose de 38.7149 mg/kg (= 1/30 DL₅₀) de l'extrait brut méthanolique de la plante *Ruta montana* a montré la conservation de l'architecture du parenchyme rénale avec la présence de quelques congestions sanguines chez les rattes traités par rapport aux témoins (Fig.35).

Tandis que les coupes histologiques des foies des rattes traitées ont révélé l'existence de congestions sanguines par rapport aux animaux témoins, avec conservation de l'architecture lobulaire hépatique (Fig.36).

L'observation histologique des ovaires des rattes traitées a montré un parenchyme ovarien normal en comparaison avec le groupe témoin (Fig.37).

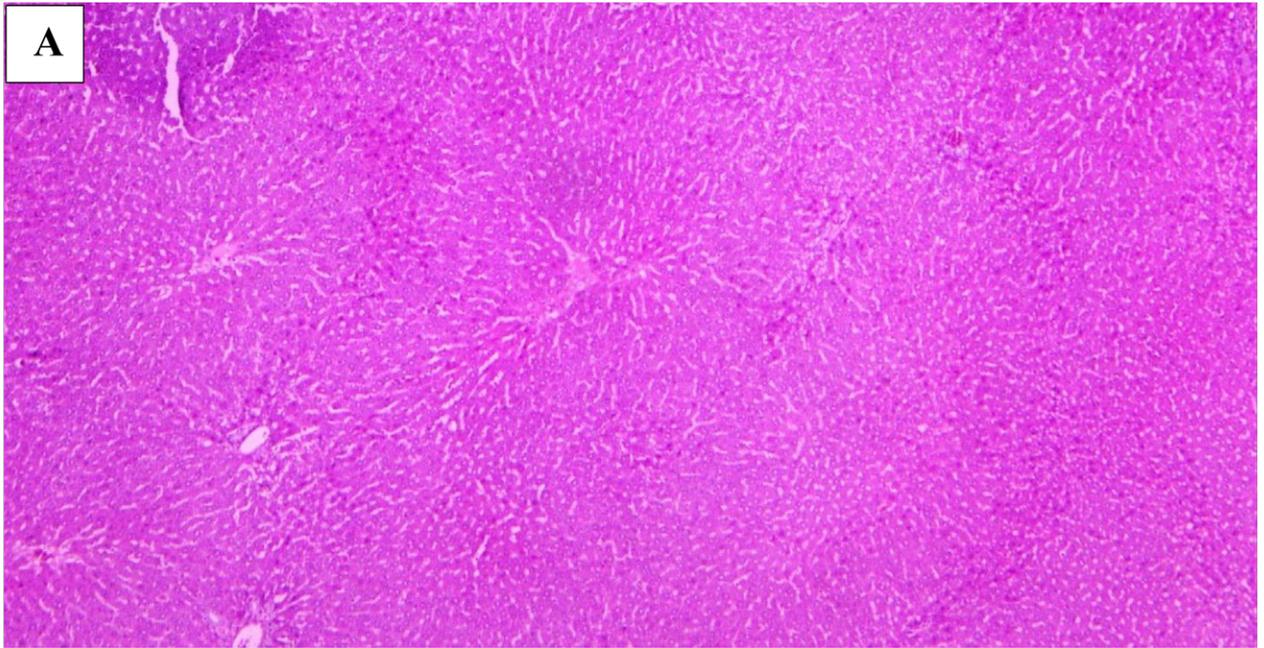


(Gx40)

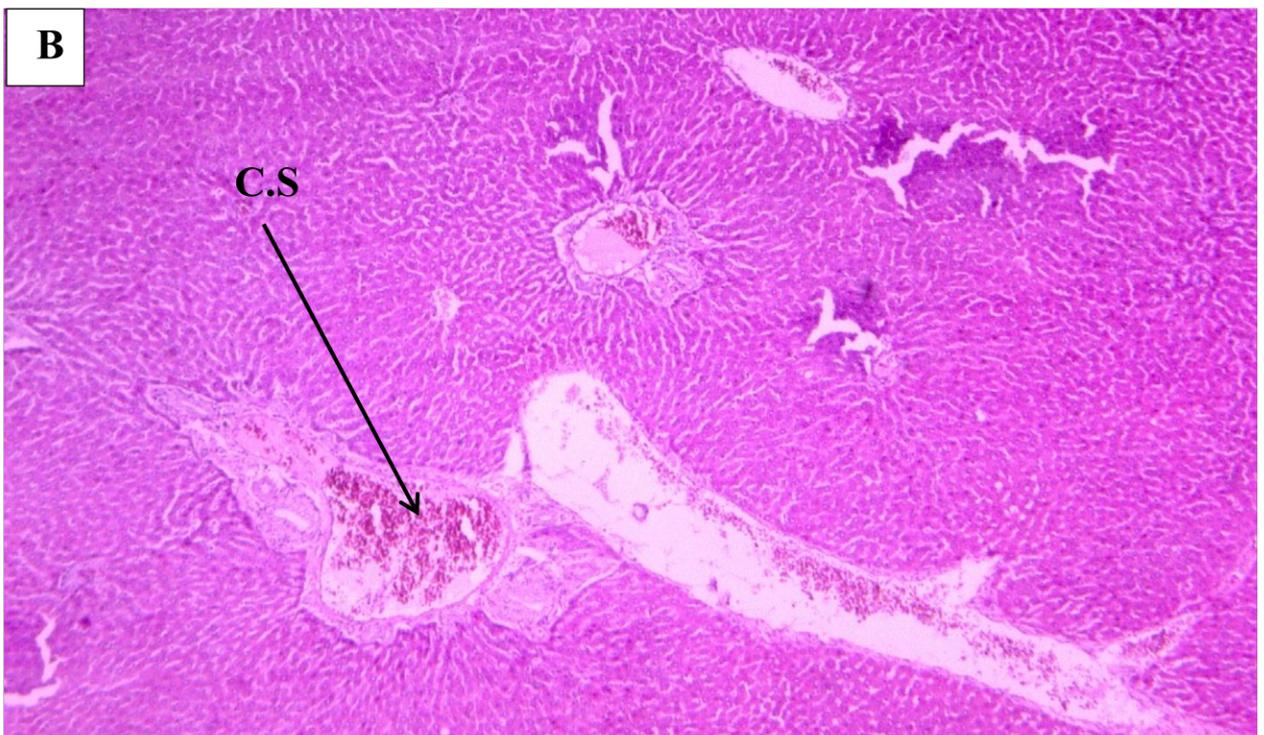


(Gx40)

Figure 35: Coupes histologiques de tissu rénale des rattes témoins (A) et traitées dans les conditions de la toxicité subchronique par la dose de 38.7149 mg/kg (= 1/30 DL₅₀) de l'extrait brut méthanolique de la plante *Ruta montana* (B) C.S : congestion sanguine. Coloration (H & E).



(Gx40)



(Gx40)

Figure 36: Coupes histologiques de tissu hépatique des rattes témoins (A) et traitées dans les conditions de la toxicité subchronique par la dose de 38.7149 mg/kg (= 1/30 DL₅₀) de l'extrait brut méthanolique de la plante *Ruta montana* (B) C.S : congestion sanguine. Coloration (H & E).

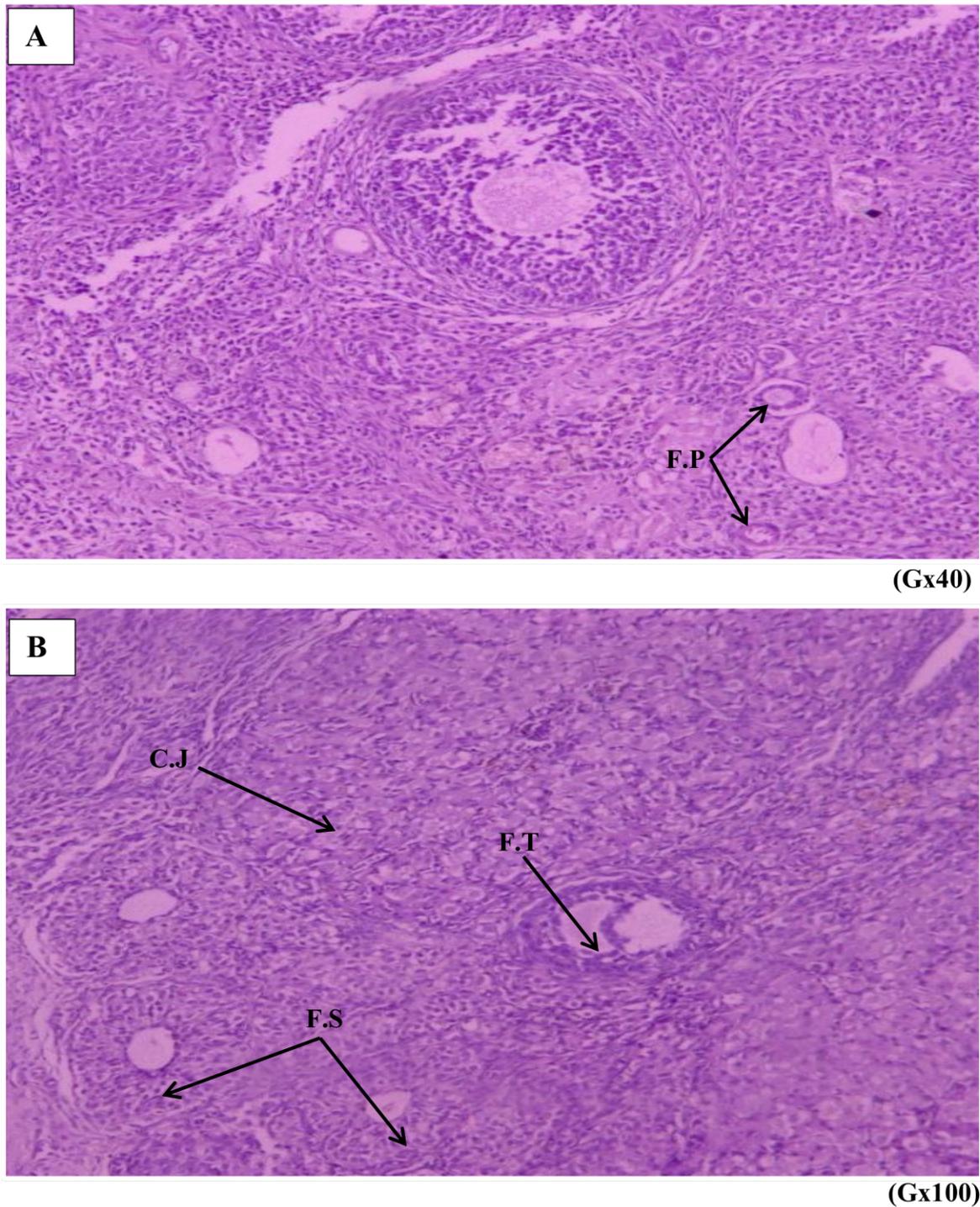


Figure 37: Coupes histologiques de tissu ovarien des rattes témoins (A) et traitées dans les conditions de la toxicité subchronique par la dose de 38.7149 mg/kg (= 1/30 DL₅₀) de l'extrait brut méthanolique de la plante *Ruta montana* (B). F.P : follicule primaire, F.S : follicule secondaire, F.T : follicule tertiaire, C.J : corps jaune. Coloration (H & E).

I-Résultats

Tableau 9: Valeurs des paramètres hématologiques des rattes témoins et traitées dans les conditions de la toxicité subchronique par la dose de 38.7149 mg/kg (= 1/ 30 DL₅₀) de l'extrait brut méthanolique de la plante *Ruta montana*.

	GR 10 ¹² /l	HGB g/dl	HCT %	VGM fl	TCMH pg	CCMH g/dl	IDR %	IDRa fl	PLT 10 ⁹ /l	IDP fl	VMP fl	GB 10 ⁹ /l	LPCR %	PTC %
Témoin	7.327	13	40.414	55.143	17.743	32.186	15.629	35.3	711	8.743	5.543	4.657	2.8	0.393
	± 0.194	± 0.231	± 0.505	± 1.778	± 0.538	± 0.353	± 0.763	± 0.663	± 90.303	± 0.172	± 0.127	± 1.855	± 0.539	± 0.053
Traité	7.001	12.843	39.886	56.957	18.357*	32.243	14.543*	35.571	618	8.833	5.583	4.843	3.6	0.323
	± 0.420	± 0.746	± 2.769	± 1.878	± 0.547	± 0.479	± 0.435	± 1.314	± 67.186	± 0.258	± 0.223	± 2.272	± 1.304	± 0.066

Les valeurs sont présentées en moyenne ± écart type, * significativement différent, P<0.05.

I-Résultats

I- 11 Etude de l'effet de l'extrait méthanolique de la partie aérienne de la plante *Ruta montana* sur la reproduction des rats femelles

I- 11- 1 Effet de l'extrait brut méthanolique de la partie aérienne de la plante *Ruta montana* sur le poids corporel et la masse relative des organes des rats femelles gestantes

Le poids corporel des rattes traitées et témoins gestantes par la dose de 38.7149 mg/kg (= 1/ 30 DL₅₀) de l'extrait brut méthanolique de la plante *Ruta montana* est présentée dans le tableau 10. On a enregistré une évolution normale du poids corporel des rattes traitées et témoins gestantes ou aucune différence significative n'a été enregistrée.

Tableau 10: Le poids corporel (g) des rattes témoins et traitées gestantes par la dose de 38.7149 mg/kg (= 1/ 30 DL₅₀) de l'extrait brut méthanolique de la plante *Ruta montana*.

	1 ^{ère} semaine	3 ^{ème} semaine
Témoins gestantes	177,2 ± 7,2938	218,2 ± 9,3380
Traitées gestantes	199,5714 ± 14,5928	242 ± 19,7905

Les valeurs sont présentées en moyenne ± écart type.

Les masses relatives des organes des rattes témoins et traitées gestantes sont présentées dans le tableau 11. Macroscopiquement, aucune anomalie n'a été constatée dans les organes internes chez tous les rattes, et statistiquement, aucune différence significative n'a été trouvée chez toutes les rattes traitées et témoins gestantes.

Tableau 11: La masse relative des organes des rattes témoins et traitées gestantes par la dose de 38.7149 mg/kg (= 1/ 30 DL₅₀) de l'extrait brut méthanolique de la plante *Ruta montana*.

	Foie	Reins	Cœur	Rate	Cerveau	Poumons	Ovaires
Traité	0,0349	0,00582	0,00284	0,00225	0,00705	0,00491	0,000572
	± 0,00323	± 0,000414	± 0,000206	± 0,000622	± 0,000858	± 0,000432	± 0,0000585
Témoin	0,0353	0,00609	0,00276	0,00240	0,00787	0,00525	0,000583
	± 0,00230	± 0,000699	± 0,000185	± 0,000632	± 0,000378	± 0,000855	± 0,000107

Les valeurs sont présentées en moyenne ± écart type.

I- 11- 2 Effet de l'extrait brut méthanolique de la plante *Ruta montana* sur le nombre et le poids des embryons

Le nombre et le poids des embryons des rattes témoins et traitées sont présentées dans le tableau 12. Une légère élévation non significative de 8.059 % a été enregistrée dans le nombre des embryons, chez les rattes traitées en comparaison avec les témoins.

Pour le poids moyen des embryons, on a constaté une légère élévation non significative de 3.7946 % chez les rattes traitées en comparaison avec les témoins (tableau 11).

Tableau 12: Nombre des ratons et leur poids des rattes témoins et traitées par la dose de 38.7149 mg/kg (= 1/ 30 DL₅₀) de l'extrait brut méthanolique de la plante *Ruta montana*.

Groupe	Nombre des ratons	Poids des ratons (g)
Témoin	7,8 ± 0,8367	1,2834 ± 0,1765
Traité	8,4286 ± 0,5345	1,3321 ± 0,1229

Les valeurs sont présentées en moyenne ±écart type.

I- 11- 3 Etude des paramètres biochimiques

❖ Les paramètres biochimiques de la fonction rénale

Les paramètres biochimiques de l'évaluation de la fonction rénale sont présentés dans la figure 38. L'urée et la créatinine n'ont pas montré une différence significative chez les rattes traitées gestantes comparés aux témoins.

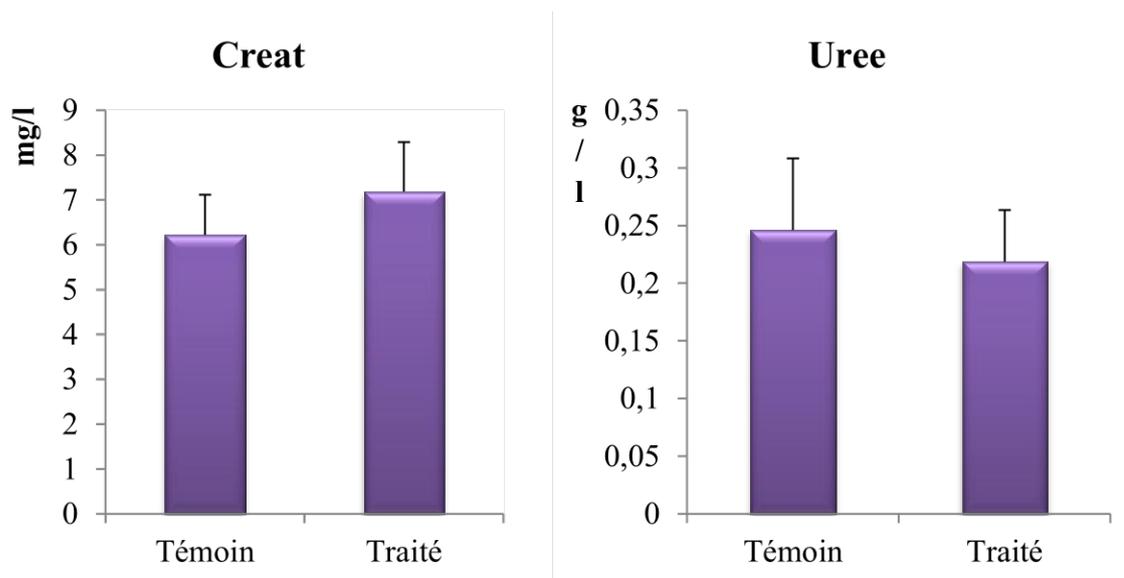


Figure 38: Taux sériques de la créatinine et d'urée des ratte témoins et traitées gestantes par la dose de 38.7149 mg/kg (= 1/30 DL₅₀) de l'extrait brut méthanolique de la plante *Ruta montana*. Les valeurs sont présentées en moyenne \pm écart type.

❖ Les paramètres biochimiques de la fonction hépatique

Le taux sérique des différents paramètres de l'évaluation de la structure et de la fonction hépatique est présenté dans les figures 39 et 40 où on n'a pas noté une différence significative dans les paramètres étudiés chez les ratte traitées gestantes en comparaison avec les ratte gestantes témoins.

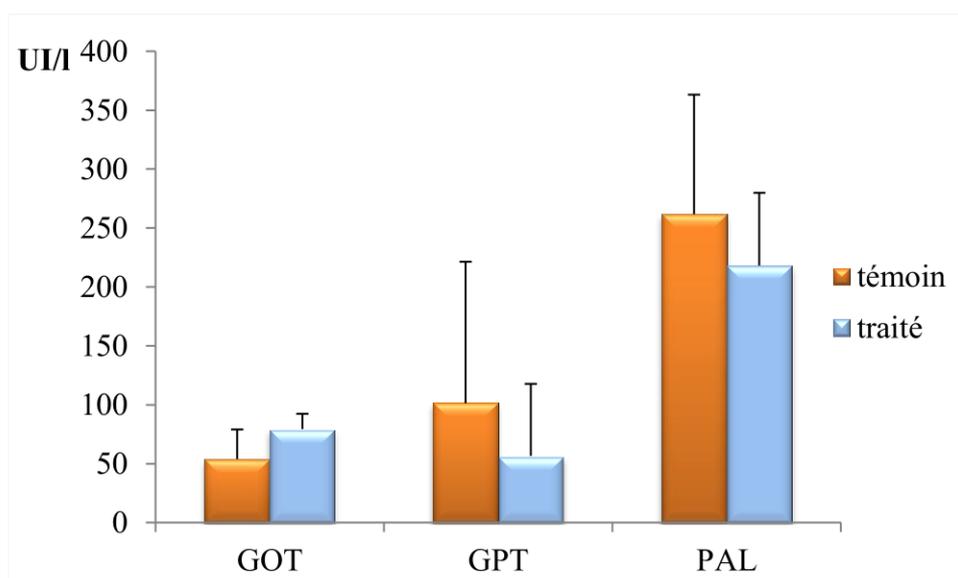


Figure 39: Taux sérique de «GOT, GPT et PAL » des ratte témoins et traitées gestantes par la dose de 38.7149 mg/kg (= 1/30 DL₅₀) de l'extrait brut méthanolique de la plante *Ruta montana*. Les valeurs sont présentées en moyenne \pm écart type.

I-Résultats

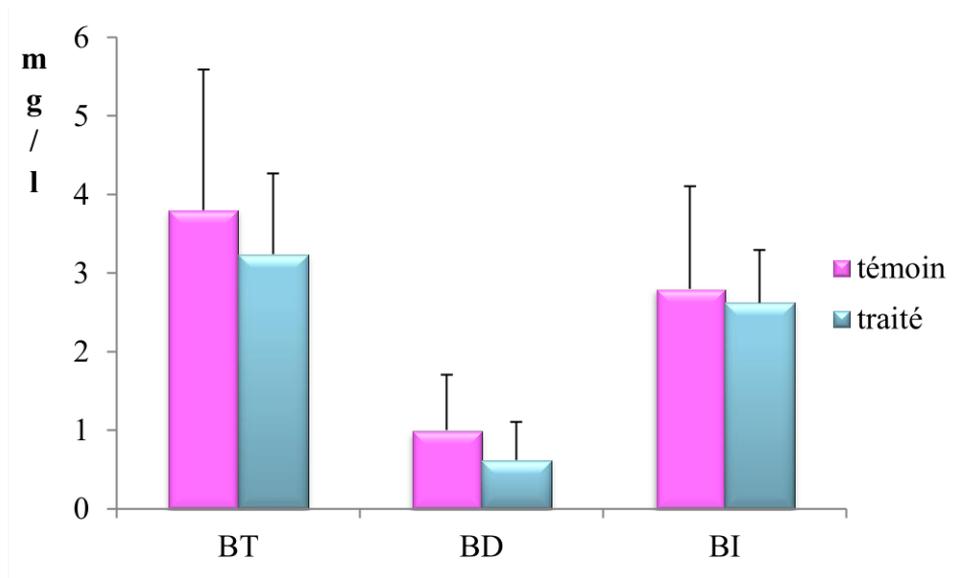


Figure 40: Taux sérique de « bilirubine totale, directe et indirecte » des rattes témoins et traitées gestantes par la dose de 38.7149 mg/kg (= 1/ 30 DL₅₀) de l'extrait brut méthanolique de la plante *Ruta montana*. Les valeurs sont présentées en moyenne ±écart type.

I- 11- 4 Etude des hormones de reproduction

Les valeurs des hormones reproductives sont présentées dans la figure 41. Aucune différence significative n'a été enregistrée dans les valeurs de FSH et LH chez les rattes traitées gestantes en comparaison avec les rattes gestantes témoins.

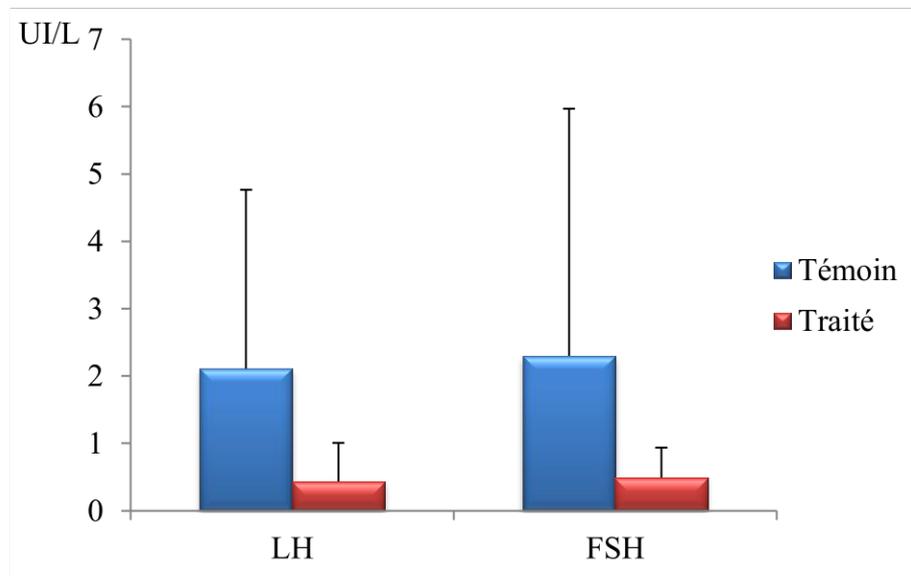


Figure 41: Taux sérique de «LH et FSH» des rattes témoins et traitées gestantes par la dose de 38.7149 mg/kg (= 1/ 30 DL₅₀) de l'extrait brut méthanolique de la plante *Ruta montana*. Les valeurs sont présentées en moyenne ±écart type.

I- 11- 5 Etude des paramètres hématologiques

Les valeurs des différents paramètres hématologiques sont mentionnées dans le tableau 13, où on n'a pas enregistré une différence significative chez les rattes traitées gestantes par rapport aux rattes gestantes témoins.

I- 11- 6 Etude histopathologique

L'observation des coupes histologiques des foies, des reins et des ovaires (fig. 42, 43 et 44) des rattes témoins et traitées gestantes a montré l'absence des anomalies histologiques avec la conservation de chaque organe de son parenchyme sauf que le parenchyme hépatique présente quelques congestion sanguine chez les rattes traitées gestantes comparées aux rattes témoins gestantes.

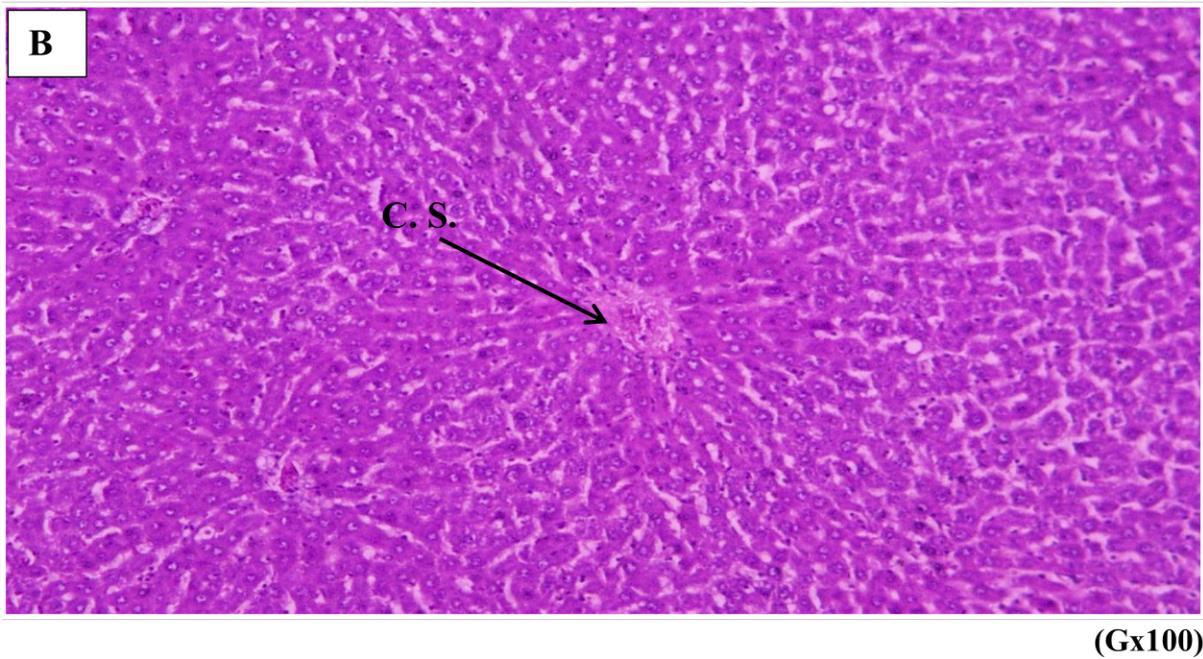
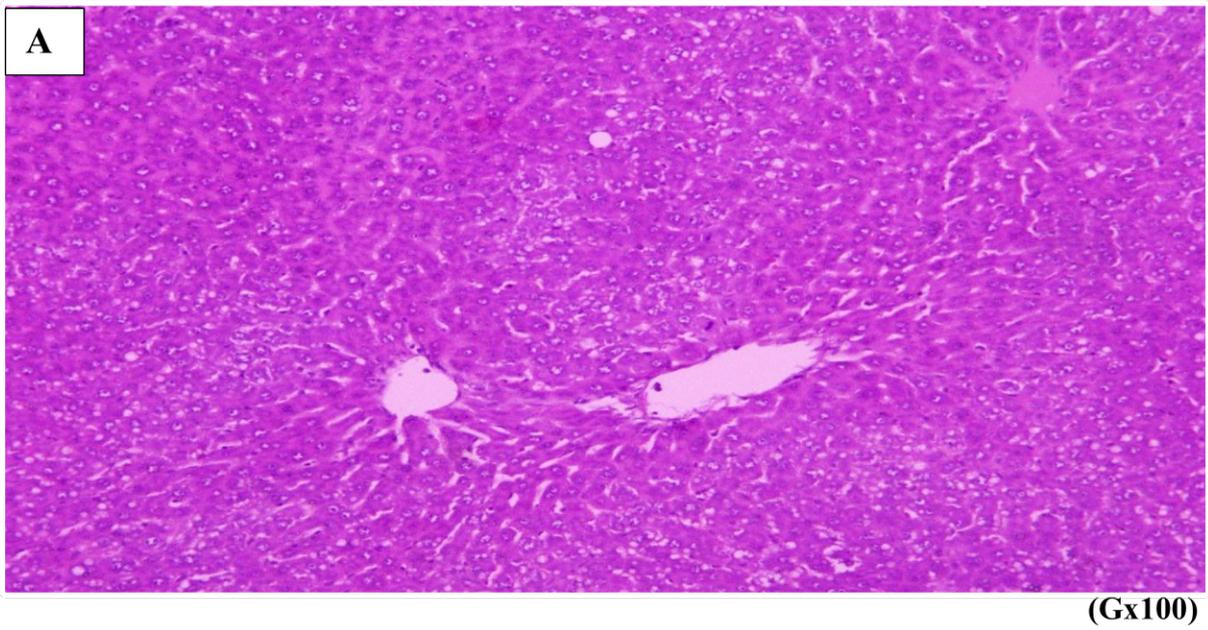


Figure 42: Coupes histologiques de tissu hépatique des rattes témoins (A) et traitées gestantes par la dose de 38.7149 mg/kg (= 1/ 30 DL₅₀) de l'extrait brut méthanolique de la plante *Ruta montana* (B) C.S : congestion sanguine. Coloration (H & E).

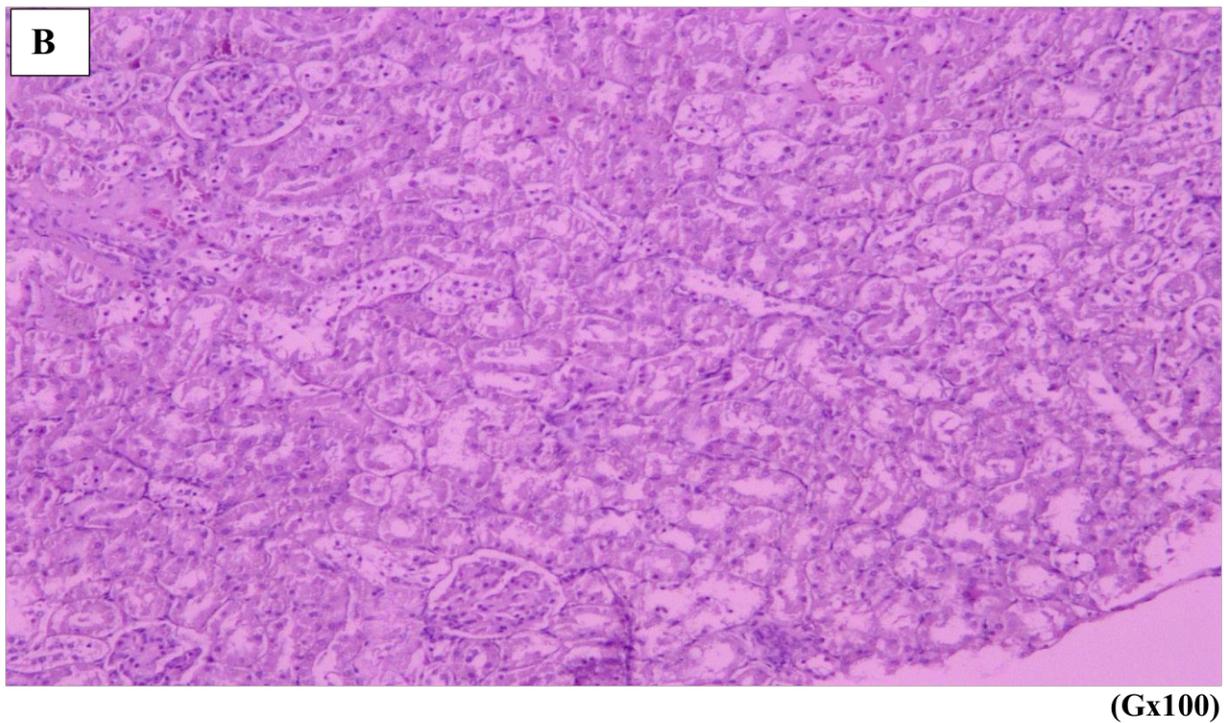
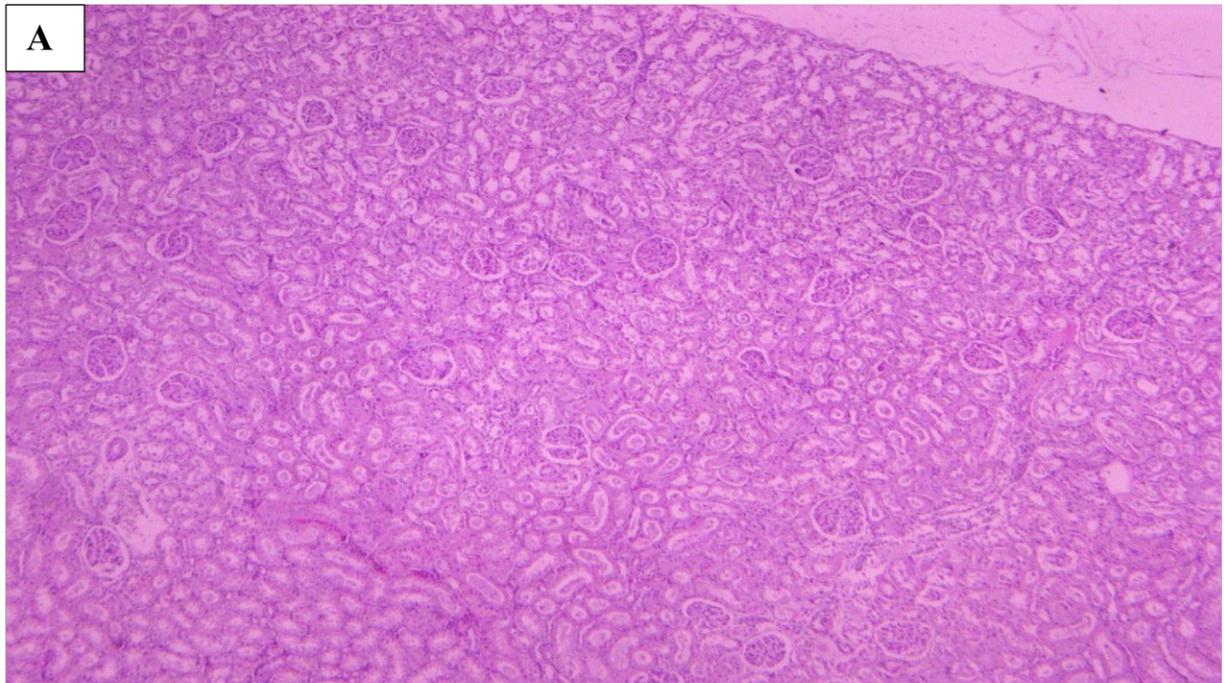


Figure 43: Coupes histologiques de tissu rénale des rattes témoins (A) et traitées gestantes par la dose de 38.7149 mg/kg (= 1/ 30 DL₅₀) de l'extrait brut méthanolique de la plante *Ruta montana* (B). Coloration (H & E).

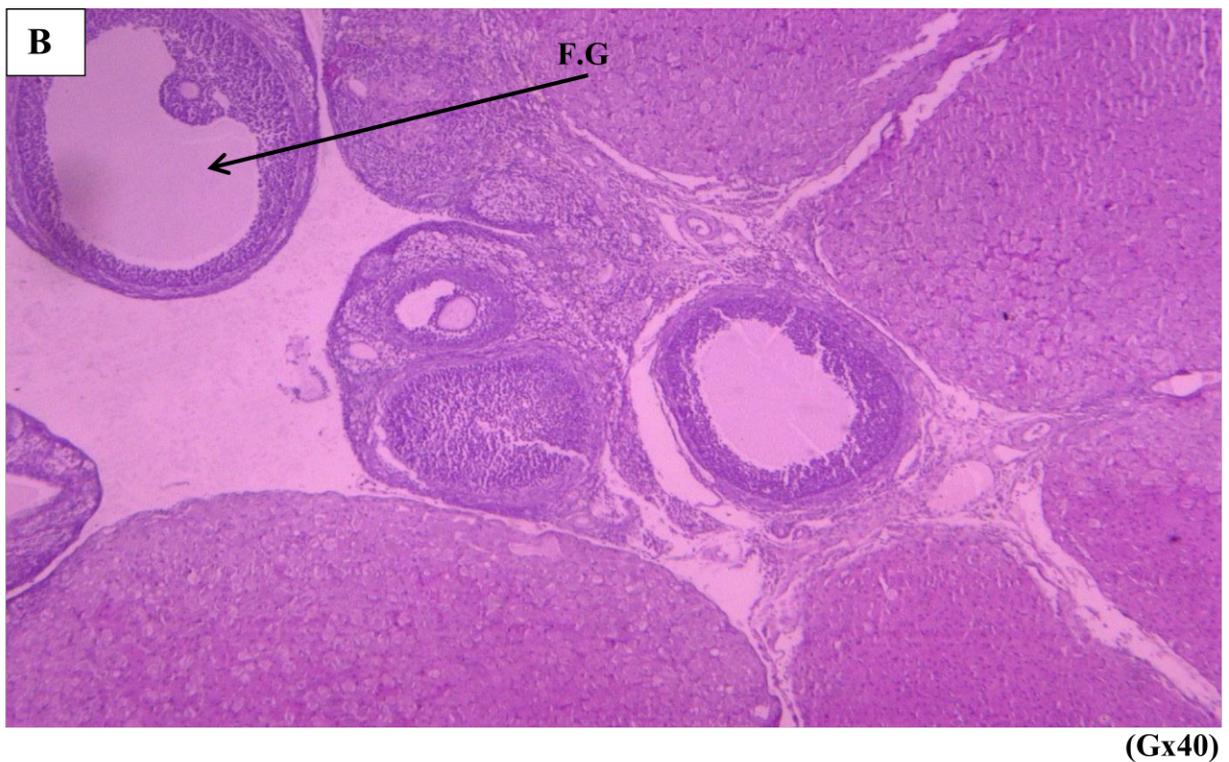
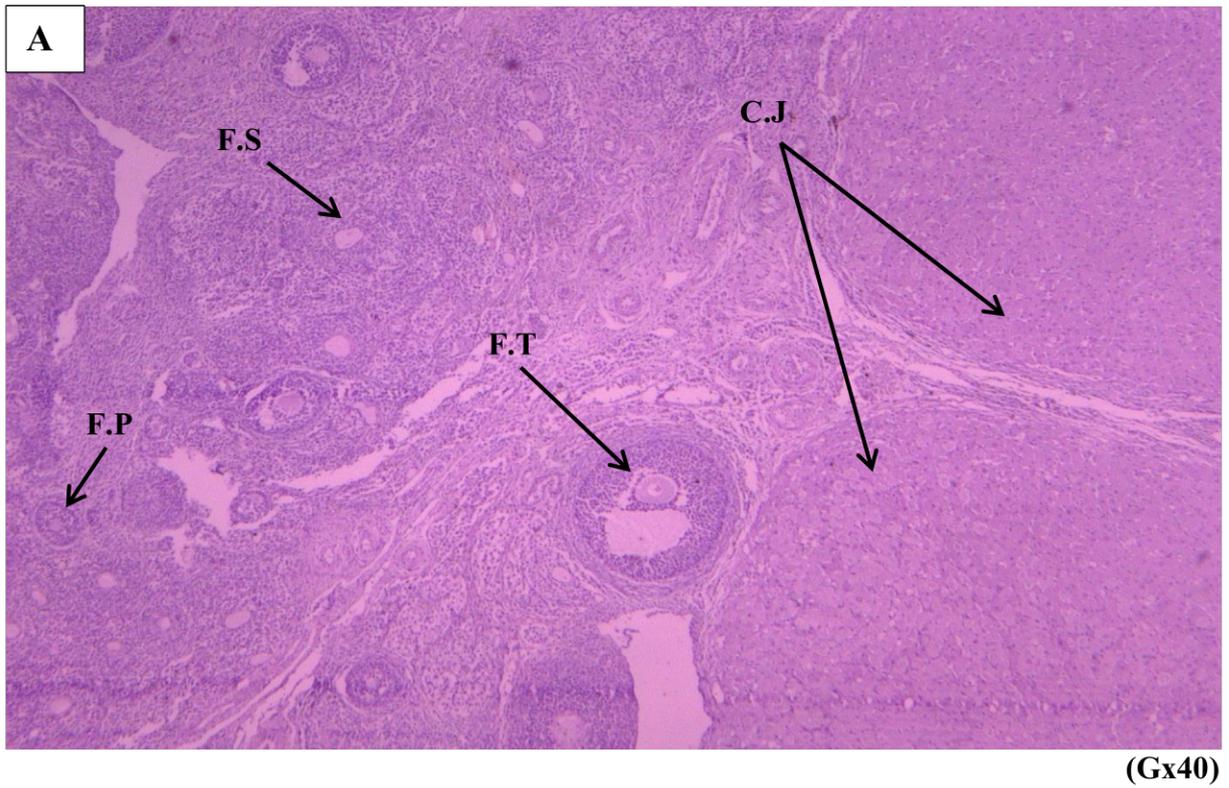


Figure 44: Coupes histologiques de tissu ovarien des rattes témoins (A) et traitées gestantes par la dose de 38.7149 mg/kg (= 1/ 30 DL₅₀) de l'extrait brut méthanolique de la plante *Ruta montana* (B). F.P : follicule primaire, F.S : follicule secondaire, F.T : follicule tertiaire, F.G : follicule de de Graff, C.J : corps jaune. Coloration (H & E).

I-Résultats

Tableau 13: Valeurs des paramètres hématologiques des rattes témoins et traitées gestantes par la dose de 38.7149 mg/kg (= 1/ 30 DL₅₀) de l'extrait brut méthanolique de la plante *Ruta montana*.

	GR	HGB	HCT	VGM	TCMH	CCMH	RDW	PLT	VMP	PDW	PCT	GB
	10 ¹² /l	g/dl	%	fl	pg	g/dl	%	10 ⁹ /l	fl	fl	%	10 ⁹ /l
Gestante	6,894	12,029	35,7	51,871	17,5	33,7	15,986	1090	7,414	7,614	0,806	6,9
traitée	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,541	0,547	1,810	1,838	0,804	0,520	1,038	186,880	0,308	0,584	0,133	0,632
Gestante	6,468	11,58	34,16	52,88	17,92	33,92	15,18	966	7,58	7,6	0,7	8,075
Témoin	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,671	1,057	3,258	0,944	0,409	0,466	1,337	341,639	0,698	0,894	0,235	0,922

Les valeurs sont présentées en moyenne ± écart type.

Partie IV:
Discussion

Discussion

La grande majorité des médicaments modernes sont dérivés à l'origine d'anciennes traditions à base de plantes (Qazan, 2008). Dans le monde, environ 25% des médicaments modernes sont développées à partir des plantes (Alelign *et al.*, 2020).

Afin d'assurer la sécurité de l'homme et des animaux, les tests de toxicité sont développés pour obtenir des informations sur l'activité biologique d'une substance chimique et mieux comprendre ses mécanismes d'action. Plus encore, les études d'évaluation toxicologique sont des aspects importants du développement de médicaments et pour l'extension de leurs potentiels thérapeutiques (Kale *et al.*, 2019).

Ruta montana localement connue sous le nom de Fidjel (Bouzidi *et al.*, 2012), appartient à la famille des rutaceae (Takhtajan, 2009). Cette plante contient plusieurs composés phytochimiques tels que les alcaloïdes, les flavonoïdes, les huiles essentielles, les coumarines et les phénols qui la rendent largement utilisée en médecine traditionnelle (Hammiche *et al.*, 2013; Daoudi *et al.*, 2016); surtout comme emménagogue, anaphrodisiaque et abortive, mais aussi elle est connue pour ses propriétés toxiques où les cas d'intoxication les plus fréquemment observés sont suite à des essais d'avortement ,au cours duquel la plante est consommée , soit sous forme de décoction buvable, soit sous forme de lavements vaginaux (Benkhniq *et al.*, 2014; Daoudi *et al.*, 2016).

1. Le rendement des extractions

La teneur en alcaloïdes varie en fonction de la partie de la plante, de son stade de développement, du lieu où elle pousse, de la période de récolte et du climat (Desachy *et al.*, 1997; Marc *et al.*, 2007; Chollet *et al.*, 2010). Le rendement de l'extrait alcaloïdique de la partie aérienne de *Ruta montana* était 0.19%, ce rendement est inférieur à celui trouvé par Benkiki (2006) et Allouni (2018) qu'ont obtenu des rendements 3.4% et 0.27%, respectivement. Cette variation dans le rendement peut être attribuée non seulement aux facteurs cités précédemment mais également aux lieu de séchage, à la température et à la durée de séchage, aux parasites et à la technique d'extraction (Fellah *et al.*, 2006).

Le rendement du contenu phytochimique total d'une plante est significativement affecté par les caractéristiques des solvants d'extraction, ou la polarité du solvant est un paramètre important. Ainsi, plus la polarité est élevée, plus la solubilité des composés est meilleure (Ogbuehi *et al.*, 2015). Des études antérieures ont montré que le méthanol extrait plus de

phyto-constituants qu'un autre solvant (Ogbuehi *et al.*, 2015). Dans ce travail, le méthanol 90% a donné un rendement supérieur à celui obtenu par Allouni (2018), cette différence est probablement due aux conditions environnementales où la plante a poussé, ou à la période de récolte (Chollet *et al.*, 2010).

2. La chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince a permis de mettre en évidence au moins la présence des alcaloïdes majoritaires dans les extraits méthanolique et alcaloïdiques, citant que l'extrait méthanolique n'a présenté qu'un seul spot après révélation par le réactif de Dragendorff, tandis que les extraits alcaloïdiques des feuilles, des fruits et de la partie aérienne ont présenté six spots, ce qui probablement indique qu'ils ont les mêmes alcaloïdes. Touati et ses collaborateurs (2000) ont travaillé sur *Ruta montana* collecté dans la région de Rommani (nord -ouest de Maroc) et ils ont trouvé que les feuilles et les fruits de cette plante ont les mêmes alcaloïdes, où ils ont détecté quatre alcaloïdes de ces parties qui sont: 2-(nonan-8-one)-(1H)-4-quinolone, 2-(nonan-8-one)-4-méthoxy-quinoléine, 2-(nonan-8-one)-N-méthyl-4-quinolone et 2-(décan-9-one)-N-méthyl-4-quinolone. Citant également Ulubelen (1990) qui a isolé un nouvel alcaloïde montanine de la partie aérienne de *R. montana* collecté en Turquie. Cinq des spots obtenus avec les extraits alcaloïdiques pourraient correspondre aux alcaloïdes trouvés par Ulubelen (1990) et Touati *et al.* (2000). Le seul spot alcaloïdique dans l'extrait méthanolique peut être expliqué par le fait que l'extrait brut méthanolique représente une forme diluée de l'extrait alcaloïdique.

3. Screening phytochimique

La première étape d'une étude phytochimique est la recherche des grandes classes de composés chimiques de la plante à étudier. En effet, le criblage phytochimique consiste à réaliser une analyse chimique qualitative basée sur des réactions de coloration ou de précipitation plus ou moins spécifiques à chaque classe de principes actifs. Le screening phytochimique réalisé sur l'extrait méthanolique de la partie aérienne de *Ruta montana* a permis de mettre en évidence la présence de différents groupes phytochimiques: les alcaloïdes, les tanins (catéchiques et galliques), les flavonoïdes, les coumarines, les terpénoïdes et les stéroïdes tandis que les saponines et les anthocyanes ont été absents dans l'extrait étudié. Les résultats obtenus sont en accord avec ceux obtenus par Benziane (2007), Daoudi *et al.* (2016) et Allouni (2018). Cette richesse en principes actifs confirme la large utilisation de la rue en pharmacopée traditionnelle.

4. La DL₅₀ des alcaloïdes totaux et de l'extrait méthanolique de *Ruta montana* chez les rats mâles et femelles

Les plantes synthétisent une variété de métabolites, dont certains peuvent être bénéfiques ou potentiellement toxiques, dépendant de la nature de principe actif et de la dose (Najem *et al.*, 2018; Kale *et al.*, 2019).

La détermination de la DL₅₀ est fréquemment utilisée pour obtenir des informations générales sur la toxicité d'une substance chimique, et elle est utilisée comme base pour la classification des produits chimiques dans les listes officielles des substances toxiques. En réalité la DL₅₀ est loin d'être une constante biologique (Zbinden et Rovers, 1981).

Les signes d'intoxication par *Ruta montana* commencent par salivation importante avec gonflement de la langue, de la gastroentérite, des vertiges, de la somnolence, de la prostration, un petit pouls, de l'hyperthermie et des hémorragies utérines suivent (Bnouham *et al.*, 2002; Hammiche *et al.*, 2013; Benkhniqie *et al.*, 2014), selon la gravité de l'intoxication, il peut se développer un coma, une insuffisance rénale et hépatique pouvant conduire au décès (Masri *et al.*, 2015). Par contact sur la peau, la rue peut provoquer, en raison de la présence de furocoumarines, des éruptions cutanées prurigineuses et des inflammations avec formation de cloques (Frutos *et al.*, 1995; Benkhniqie *et al.*, 2014).

Au cours de traitement par l'extrait alcaloïdique et brut méthanolique de la plante *Ruta montana*, on a enregistré chez les animaux traités des symptômes différents qui s'aggravent avec les doses les plus élevées et ils sont comparables pour les deux extraits, où on a enregistré: poils dressés, difficulté de marche (paralysie), regroupement dans le coin de la cage. Tachycardie, difficulté de respiration suivie par une cyanose. Les extraits de *R. montana* contiennent plusieurs composants. Les alcaloïdes de quinoléine et les coumarines telles que les furocoumarines sont supposés être des constituants actifs (Seak et Lin., 2007). Cheng et ces collaborateurs (1990) ont montré que la skimmianine, un alcaloïde furoquinoléines commun contenu dans les rutacées, a un effet inhibiteur sélectif sur les réponses vasopressines induites par la 5-hydroxytryptamine (5-HT) dans des études animales, et a produit un blocage non spécifique des fonctions cardiovasculaires à haute concentration entraînant une hypotension.

Selon Lompo *et al.* (1995), le regroupement des rats dans le coin de la cage peut être relié à un effet hypothermisant de l'extrait de la plante. Cela explique l'utilisation

Discussion

traditionnelle de *Ruta montana* comme antipyrétique (Bnouham *et al.*, 2002; Kabouche *et al.*, 2003).

La diminution de l'activité motrice est une manifestation de l'activité sédatrice, des déresseurs du système nerveux central, des relaxants musculaires, de la paralysie ou de l'anesthésie (Hidayat *et al.*, 2021). La difficulté de marche chez les rats peut être expliquée par l'effet perturbateur des extraits de *Ruta montana* sur le système nerveux qui contrôle les mouvements tels que celui des pieds. Hidayat *et al.* (2021) ont trouvé une diminution de l'activité motrice chez des souris traitées par l'extrait éthanolique de *Ruta Angustifolia* et ils ont montré que plus la dose administrée est élevée, plus l'effet sédatif provoqué par l'extrait sur les animaux de laboratoire est rapide.

Selon Ikeda *et al.* (2017), la régulation de la respiration se situe dans le bulbe rachidien et la partie inférieure du tronc cérébral et de la moelle épinière. La difficulté de respiration chez les rats traités peut être expliquée par l'effet de l'extraits de *Ruta montana* sur l'un des sites régulateur de la respiration cités précédemment. Un état similaire a été rapporté par Masri et ses collaborateurs (2015) chez une femme hospitalisée après la prise d'infusion des feuilles et des tiges de *Ruta montana* qui a présenté un état de détresse respiratoire sévère.

Concernant la mortalité enregistrée à partir de la première heure de traitement (après presque 15 minutes) jusqu'à 24^{ème} heures, est probablement due aux molécules mères (principalement les alcaloïdes) et non pas à leurs métabolites. Tandis que la récupération des animaux survivants au bout de 48 heures est due à la capacité de l'organisme animal à métaboliser les alcaloïdes et les autres métabolites secondaires du *Ruta montana* au bout de 48 heures, en facilitant leurs éliminations entièrement par les voies d'excrétion naturelles.

Dans cette expérience, la valeur calculée de la DL₅₀ de l'extrait alcaloïdique de la rue par la méthode de Litchfield et Wilcoxon (1949) a été 524.8075 mg/kg chez les rats mâles et 398.1071 mg/kg chez les rats femelles traités par voie intra-péritonéale. Selon la classification de Zbinden et Rovers (1981) les substances chimiques avec une DL₅₀ entre 500- 5000 mg/kg (cas des rats mâles) et 50- 500 mg/kg (cas des rats femelles) sont respectivement considérées comme substance modérément toxique et très toxique, et selon la classification de Loomis et Hayes (1996) comme légèrement toxiques et modérément toxique, respectivement.

La valeur calculée de la DL₅₀ de l'extrait méthanolique de la même plante avec la même méthode a été 1161.4486 mg/kg chez les rats femelles et 1071.5193 mg/kg chez les rats mâles

Discussion

et selon la classification de Zbinden et Rovers (1981) les substances chimiques avec une DL₅₀ entre 500 - 5000 mg/kg sont considérées comme substance modérément toxique et comme substance légèrement toxique selon Loomis et Hayes (1996).

En général, plus la valeur de la DL₅₀ est petite, plus le produit chimique est toxique et plus la valeur de la DL₅₀ est élevée, plus la toxicité est faible (Gadanya *et al.*, 2011).

5. La sensibilité du sexe

Les différences entre les sexes dans le comportement, l'exposition, l'anatomie, la physiologie, la biochimie et la génétique influencent la toxicocinétique et la toxicodynamique au niveau moléculaire de l'animal (Gochfeld., 2017). Les résultats de la sensibilité de sexe de l'extrait alcaloïdique et méthanolique de *Ruta montana* ont probablement le même mécanisme d'action léthal chez les deux sexes avec les mêmes activités biologiques. Pour l'extrait alcaloïdique, l'utilisation de plus de trois doses pourrait probablement donner un mécanisme léthal différent chez les deux sexes puisque les valeurs obtenues de DL₅₀ chez les deux sexes appartiennent à des intervalles différents de classification de toxicité des substances où les rats femelles ont une DL₅₀ inférieur à celle des rats mâles, ce qui confirme que les rats femelles sont plus sensibles que les rats mâles pour les toxiques (Alelign *et al.*, 2020). D'après les résultats obtenus, il est probable que les extraits étudiés agissent par le même mécanisme léthal chez les deux sexes des rats albinos wistar pour les doses inférieures à 1200 mg/kg et 600 mg/kg pour l'extrait méthanolique et alcaloïdique respectivement.

6. Toxicité subchronique chez les rats femelles

Les études avancées de toxicité subchronique dans un modèle animal peuvent contribuer à la prévision de l'effet toxique des extraits des plantes, à partir desquelles nous pouvons corréliser une interpolation éventuelle de la réponse avec l'homme. Aussi, on peut également avoir une idée sur l'organe cible (Sharif *et al.*, 2015). Le taux de mortalité forme un aspect important de l'étude de toxicité (Kale *et al.*, 2019). Dans cette étude, aucune mortalité n'a été constatée dans le traitement subchronique. L'absence de mortalité pendant la période d'étude confirme l'absence d'effet cumulatif de l'extrait méthanolique de *Ruta montana* chez les rats femelles.

Les changements du poids corporel représentent le marqueur apparent des effets nocifs des substances chimiques (Tédong *et al.*, 2007). Dans cette expérience, une réduction significative a été enregistrée dans le poids corporel des rats traités dans la 2^{ème} et la 7^{ème} semaine de traitement par rapport au groupe témoin. Selon Ghelani *et al.*(2016), cette

Discussion

diminution est probablement due à l'extrait administré pouvant provoquer une anorexie et des troubles du métabolisme des glucides, des lipides ou des protéines, probablement expliquée en partie par l'interaction entre les tanins (dont les ellagitanins) présents dans l'extrait méthanolique des parties aériennes de *R. montana* (Benziane, 2007; Allouni, 2018) et les protéines. Cette interaction inhibe la digestion des protéines, entraînant une perte de poids (Patel *et al.*, 2008).

Le poids des organes est un autre indicateur important pour évaluer les états physiologiques et pathologiques des animaux (Ogbuehi *et al.*, 2015). Dans cette étude, une augmentation et une diminution significatives ont été enregistrées dans les masses relatives des ovaires et du cerveau, respectivement. Comme indiqué par Rockett *et al.*, (2006), le nombre de corps jaunes ou les œdèmes ovariens peut affecter le poids des ovaires. Dans cette étude, les ovaires des rats traités ont révélé l'absence d'œdème ou d'autres anomalies histologiques, de sorte que l'augmentation de la masse relative des ovaires pourrait être due au nombre des corps jaunes présent dans l'ovaire.

Le foie et les reins sont des organes importants dans le métabolisme et l'excrétion des déchets, respectivement. Pour évaluer la toxicité de n'importe quel composé, une analyse biochimique est effectuée car c'est le principal outil pour vérifier l'état de ces deux organes vitales (Kpemissi *et al.*, 2020). Des cas de toxicité hépatique et rénale ont été enregistrés après l'administration des produits phytothérapeutiques (Arsad *et al.*, 2013).

L'évaluation de la fonction rénale repose généralement sur la détermination du taux de créatinine et d'urée dans le sang. Ces paramètres, en cas de toxicité rénale chronique ou aiguë, sont fréquemment multipliés par quatre par rapport à la valeur normale des animaux témoins (Arsad *et al.*, 2013). Dans ce travail, l'extrait méthanolique de *R. montana* n'a aucun effet sur les taux d'urée et de créatinine, donc cet extrait n'a pas affecté la fonction rénale et cela a été confirmé par l'absence d'anomalies histologique à l'exception présence de certaines congestions sanguines. Ceux-ci confirment l'absence de toxicité rénale.

Les paramètres biochimiques de l'estimation de la fonction hépatique comme le PAL pour les altérations des voies biliaires, le GOT et le GPT pour l'intégrité des hépatocytes et la bilirubine pour la fonction hépatique (Patel *et al.*, 2008) n'ont pas montré des changements significatifs suite à l'administration de l'extrait méthanolique du *R. montana*. De plus l'absence

Discussion

des anomalies histopathologiques au niveau du foie (sauf la présence de quelques congestions sanguines) confirme que l'extrait n'a pas de potentiel hépatotoxique.

LH et FSH sont des hormones de nature glycoprotéiques libérées par l'antéhypophyse (Jashni *et al.*, 2016); ce sont des régulateurs importants de la croissance et de la différenciation des follicules ovariens. (Yaghmaei *et al.*, 2009), où la LH contrôle la production d'estradiol dans les cellules de la thèque ovarienne et la FSH régule le développement et la maturation des follicules dans les ovaires, de sorte que la concentration accrue de FSH peut augmenter le nombre des follicules et le poids des ovaires (Monsees et Opuwari, 2017). La réduction des valeurs de LH et de FSH chez les animaux traités peut être probablement due à l'effet inhibiteur de l'extrait sur l'hypothalamus ou l'antéhypophyse (Lilaram et Nazeer, 2012). La régulation de la libération de ces deux hormones est principalement réalisée par GnRH (gonadotropin releasing hormone) libérée par l'hypothalamus (Lilaram et Nazeer, 2012) et également par des hormones stéroïdiennes telles que les œstrogènes (Monsees et Opuwari, 2017). Dans la toxicité subchronique, l'extrait méthanolique de *Ruta montana* n'a eu aucun effet sur les niveaux de production de FSH et de LH. L'histologie des ovaires a indiqué un parenchyme ovarien normal, avec des follicules à différents stades de développement, des vaisseaux sanguins et des corps jaunes normaux (indiquant des ovulations normales). Sur la base des résultats obtenus, nous suggérons que l'extrait n'a pas affecté l'axe hypothalamus-hypophyse-ovaire à cette dose.

Le système hématopoïétique est un indicateur essentiel de l'état pathologique et physiologique chez l'homme et l'animal aussi il est une cible très sensible aux composés toxiques (Amna *et al.*, 2013). Les paramètres hématologiques sont des indicateurs pertinents pour l'évaluation du risque (Alelign *et al.*, 2020). MCHC et MCV sont des indices de GR, qui sont utilisés dans la détermination de l'anémie chez la plupart des animaux (Amna *et al.*, 2013), où le premier avec MCH exprime la concentration d'hémoglobine tandis que le second révèle la taille des GR. L'HGB et PCV (packed cell volume) sont d'autres indices sanguins liés à la population totale des globules rouges. L'hématocrite ou PCV désigne la proportion des globules rouges dans le sang et sont utilisée dans le diagnostic de l'anémie. La réduction ou l'augmentation anormale du taux des plaquettes provoque une hémorragie ou une coagulation, respectivement (Alelign *et al.*, 2020). Selon Olson *et al.* (2000), les modifications du système hématologique possèdent une grande importance prédictive pour la toxicité humaine lorsque les données sont extrapolées à partir des études animales. Aucune

anomalie n'a été enregistrée dans les paramètres sanguins des rats femelles, suite à l'administration de l'extrait méthanolique de *R. montana* dans la toxicité subchronique, à l'exception d'une diminution et d'une augmentation significative dans les valeurs de RDW et MCH, respectivement. L'extrait méthanolique de *Ruta montana*, à cette dose, probablement ne provoquera pas d'anomalies telles que l'anémie ou l'hémorragie chez les êtres vivants.

7. Effet de l'extrait méthanolique de *Ruta montana* sur la reproduction des rats femelles

La reproduction est une fonction essentielle de l'organisme et implique deux systèmes: les organes génitaux masculin et féminin. Les conséquences des lésions des organes reproducteurs peuvent également être une cause de développement anormal des embryons. Au cours des dernières décennies, l'inquiétude a augmenté sur la diminution de la fécondité et de la fertilité dans la population humaine (Gannes *et al.*, 2013).

La toxicité maternelle peut être observée à travers différentes approches telles que l'observation clinique de la perte de poids corporel, de l'altération locomotrice, de la diarrhée, de l'horripilation, de la réduction de l'apport alimentaire et des décès maternels (Maganha *et al.*, 2006). Dans cette étude, aucun signe clinique de toxicité maternel n'a été observé, ou les rattes témoins et traitées gestantes par la dose de 38.7149 mg/kg (= 1/30 DL₅₀) de l'extrait brut méthanolique de la plante *Ruta montana*, n'ont montré aucune différence significative dans l'évolution du poids corporel et la masse relative des organes.

A nos connaissances, il n'y a pas des travaux qui traitent l'effet des principes actifs des plantes sur l'évolution de l'ovogenèse et sa répercussion directe sur l'embryogénèse.

L'embryotoxicité est souvent évaluée par le nombre, le poids et les malformations des embryons des animaux et dans les laboratoires développés, elle est complétée par une observation approfondie des coupes histologiques des embryons obtenus (El Ghareeb *et al.*, 2018). Dans ce travail l'extrait méthanolique de *Ruta montana* n'a pas d'effet marqué sur le nombre, le poids et les malformations des embryons, tandis que les coupes histologiques des embryons n'ont pas été faites en raison d'absence des spécialistes dans ce domaine. L'absence des anomalies dans le nombre, le poids et les malformations des embryons suggère que la dose utilisée de l'extrait méthanolique de cette plante n'a pas d'effet embryotoxique. D'un autre côté, ce résultat confirme que la dose utilisée pendant l'étude sub-chronique n'a pas affectée le déroulement de l'ovogenèse.

Discussion

Les paramètres biochimiques de l'évaluation de la fonction hépatique et rénale n'ont montré aucune différence et cela a été confirmé par l'absence des anomalies histologiques à l'exception présence de certaines congestions sanguines au niveau du parenchyme hépatique chez les rattes traités gestantes.

Le taux des hormones reproductives la LH et la FSH n'a présenté aucune différence et l'examen histopathologique des ovaires a montré un parenchyme ovarien normal, donc l'administration de l'extrait méthanolique de *Ruta montana* n'a pas altéré la qualité reproductive des rattes concernant le développement des embryons.

Les valeurs des paramètres hématologiques n'ont pas montré des différences significatives.

L'étude de la toxicité est d'ailleurs un excellent critère pour orienter la recherche d'activité pharmacologique. « Tout est poison, rien n'est poison, seule la dose compte ». Cette fameuse idée de Paracelse conduit à faire attention au médicament. La frontière entre médicament et toxique est floue, c'est souvent une question de dose (Kpemissi *et al.*, 2020).

Partie V:
Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

D'après les données bibliographiques et expérimentales:

- 1- La plante *Ruta montana* de la famille des rutaceae connue localement sous le nom de Fidjel est une plante toxique.
- 2- Selon la DL_{50} , l'extrait alcaloïdique de *Ruta montana* est respectivement considéré comme substance modérément toxique et très toxique chez les rats mâles et les rats femelles, suggérant une sensibilité liée au sexe. Tandis que l'extrait méthanolique de cette plante est considéré comme substance modérément toxique chez les deux sexes.
- 3- Selon les symptômes observés chez les rats traités soit par l'extrait alcaloïdique ou l'extrait méthanolique dans les conditions de la toxicité aigüe, la gravité de l'intoxication par *Ruta montana* confirme la relation « Dose - Effet ».
- 4- L'étude subchronique de l'extrait méthanolique de cette plante par la dose de 38,7149 mg/kg = 1/30 DL_{50} chez les rats femelles n'a pas d'effets marqués sur les paramètres hématologiques, l'ovogenèse et les paramètres biochimiques de l'évaluation de la fonction hépatique et rénale.
- 5- L'extrait méthanolique de *Ruta montana* n'a pas d'effet sur la reproduction des rats femelles.

En perspectives, la plante *Ruta montana* est largement utilisée en médecine traditionnelle due à sa richesse en principes actifs mais pour éviter tout cas d'intoxication, il est intéressant de faire des études plus approfondis tel que:

- ✓ L'isolement, la purification, l'identification et la quantification de chaque principe actif de cette plante.
- ✓ La réalisation des expériences *in vivo* sur des extraits purifiées afin de déterminer précisément les composés responsable d'une part des effets toxiques et d'autre part des effets pharmacologiques.
- ✓ La réalisation des expériences complémentaires soit de côté toxicologique ou de côté pharmacologique par l'utilisation d'une gamme des doses avec d'au moins deux voies d'administration afin de constituer un dossier toxicologique ou pharmacologique complet.
- ✓ Des études approfondis sur la toxicocinétique et la toxicodynamique des principes actifs responsables de la toxicité.

Partie VI:

Références

bibliographiques

Références bibliographiques

1. Akalin E., Ertug F. 2003. An anatomical and ethnobotanical study on ruta species in Turkey. J. fac. Pharm. Istanbul., 35-36 (2): 121-132.
2. Alelign T., Chalchisa D., Fekadu N., Solomon D., Sisay T., Debella A., Petros B. 2020. Evaluation of acute and sub-acute toxicity of selected traditional antiurolithiatic medicinal plant extracts in wistar albino rats. Toxicol Rep., 7: 1356-1365.
3. Allouni R. 2018. Etude des aspects morphologiques, phytochimiques et pharmacotoxicologiques de la plante *Ruta montana*. Thèse doctorat. Université Farhet Abbas Sétif.
4. Almasad M.M., Qazan W.S., Daradka H. 2007. Reproductive toxic effects of *Artemisia herba alba* ingestion in female Spague-dawley rats. Pak J Biol Sci., 10 (18): 3158- 3161.
5. Alturkistani H.A., Tashkandi F.M., Mohammedsaleh Z.M. 2015. Histological stains: A literature review and case study. Glob. J. Health. Sci., 8 (3):72-79.
6. Amna F.O., Noorain H., Noriham A., Azizah A.H., Husna N.R. 2013. Acute and oral subacute toxicity study of ethanolic extract of *Cosmos caudatus* leaf in sprague dawley rats. Int. J. Biosci. Biochem. Bioinforma., 3 (4): 301-305.
7. Aniszewski T. 2007. Alkaloids– secrets of life alkaloid chemistry, biological significance, applications and ecological role. 1st edition, Elsevier B.V. pp 105-107, 114-118.
8. Antunes I.B., Silva A.d., Kawakami R., Andersen M.L. 2016. The female rat, chapter 8 in: Rodent model as tools in ethical biomedical research. Springer International Publishing Switzerland.
9. Arsad S.S., Esa N.M., Hamzah H., Othman F. 2013. Evaluation of acute, subacute and subchronic oral toxicity of *Rhaphidophora decursiva* (Roxb.) Schott extract in male Sprague Dawley rats. J. Med. Plant. Res., 7 (41): 3030-3040.
10. Badiaga M. 2011. Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea latifolia* Smith, une plante médicinale africaine récoltée au Mali. Thèse doctorat. Université Blaise Pascal - Clermont- Ferrand II. Français. Mali. NNT : 2011CLF22187.
11. Beaumont H.M., Mandl A.M. 1962. A quantitative and cytological study of oogonia and oocytes in the foetal and neonatal rat. Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci., 155: 557–579.
12. Békro Y.A., Békro M.J. Aboua B.B., Tra Bi F.H., Éhilé E.E. 2007. Étude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia benthamiana* (Baill.) Herend. et Zarucchi (Caesalpinaceae). Sci. & Nat., 4 (2): 217-225.

Références bibliographiques

13. Belkassam A., Zellagui A., Gherraf N., Lahouel M., Rhouati S. 2011. Essential oil composition of Algerian *Ruta montana* (clus.) l. and its antibacterial effects on microorganisms responsible for respiratory infections. *Adv. Nat. Appl. Sci.*, 5 (3): 264-268.
14. Bellakhdar J., Claisse R., Fleurentin J., Younos C. 1991. Reportory of standard herbal drugs in the Moroccan pharmacopoeia. *J. Ethnopharmacol.*, 35 (2): 123-143.
15. Benkhnigue O., Ben Akka F., Salhi S., Fadli M., Douira A., Zidane L. 2014. Catalogue des plantes médicinales utilisées dans le traitement du diabète dans la région d'Al Haouz-Rhamna (Maroc). *J. Anim. Plant. Sci.*, 23 (1): 3539-3568.
16. Benkiki N. 2006. Etude phytochimiques des plantes médicinales algériennes: *Ruta montana*, *Matricaria pubescens* et *Hypericum perforatum*. Thèse Doctorat. Université El-Hadj Lakhdar Batna.
17. Benziane M.M. 2007. Screening photochimique de la plante *Ruta montana*. Extraction de l'huile essentielle et de la rutine. Activité antioxydant de la plante. Thèse magister. Université d'Oran Es-Senia.
18. Bnouham M., Mekhfi H., Legssyer A., Ziyat A. 2002. Medicinal plants used in the treatment of diabetes in Morocco. *Int. J. Diabetes & Metab.*, 10 (1): 33-50.
19. Böhme K., Velázquez J.B., Calo-Mata P. 2014. Antibacterial, antiviral and antifungal activity of essential oils: mechanisms and applications. In *Antimicrobial Compounds*. Berlin: Springer. 51-81.
20. Bonnier G., Douin R. 1990. La grande flore en couleurs de Gaston Bonnier. Edition bellin, Paris, p 205.
21. Bouzidi M.A., Faraoun F., Meliani H., Boubekour I., Kralifa M., Zattal Z. 2012. Characterization of the soil occupied by *Ruta* genus species in Tessala Mountain (north-west of Algeria). *Technol. Lab.*, 7 (28): 79-84.
22. Bruneton J. 1999. Pharmacognosie, photochimie, plantes médicinales, 3^{ème} Ed. Technique et documentation. Lavoisier, Paris pp.263-267, 793-795.
23. Cheng J.T., Chang S.S., Chen I.S. 1990. Cardiovascular effect of skimmianine in rats. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, 306: 65-74.
24. Choisi T.J. 2010. L'hormone antimüllérienne expression, régulation et bio-marqueur des follicules ovariens. Mémoire de maîtrise en science expérimentales de la santé. INRS-institut Armand Frappier, université du Québec.

Références bibliographiques

25. Chollet S., Papet Y., Mura P., Brunet B. 2010. Détermination des teneurs en atropine et scopolamine de différentes espèces sauvages et ornementales du genre *Datura*. *Ann. Toxicol. Anal.*, 22 (4): 173-179.
26. Corriente F. 1998. Le berbère en AL-andalus¹. *Etudes et documents Berbères*, 15-16: 269-275.
27. Coste. 2011. *Ruta montana* (L.) L. eFlore, la flore électronique de Tela Botanica. BDTFX v.3.02.
28. Crozier A., Clifford M.N., Ashihara H. 2008. *Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet*. Blackwell Publishing Ltd.
29. Daoudi A., Hrouk H., Belaidi R., Slimani I., Ibibjijen J., Nassiri L. 2016. Valorization of *Ruta montana* and *Ruta chalepensis*: Ethnobotanical study, phytochemical screening and Antibacterial activity. *J. Mater. Environ. Sci.*, 7 (3): 926-935.
30. Déry M.C. 2004. Régulation de l'apoptose dans les cellules endométriales durant le cycle oestral chez le rat. Mémoire de recherche présenté à l'université du Québec à trois-rivières.
31. Desachy A., François B., Vignon P., Roustan J., Gay R. 1997. Une intoxication rare au *Datura stramonium* A propos de deux cas. *Réan Urg.*, 6 (1): 51-53.
32. Doerper S. 2008. Modification de la synthèse des furocoumarines chez *Ruta graveolens* L. par une approche de génie métabolique. Thèse doctorat. Université de Nancy France.
33. Driancourt M.A., Gougeon A., Monniaux D., RoyèreD., Thibault C. 2001. Folliculogenèse et ovulation. Chapitre 15 dans la reproduction chez les mammifères et l'homme. Edition INRA, pp 316-345.
34. Driancourt M.A., Levasseur M.C. 2001. Cycles estriens et cycles menstruels. Chapitre 30 dans la reproduction chez les mammifères et l'homme. Edition INRA, pp 680-696.
35. Eddouks M., Maghrani M., Lemhadri A., Ouahidi M.L., Jouad H. 2002. Ethnopharmacological survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes mellitus, hypertension and cardiac diseases in the south-east region of Morocco (Tafilalet). *J. Ethnopharmacol.*, 82 (2-3): 97-103.
36. El Ghareeb A.W., Mostafa R., Abd El-Rahman H.A., Hanafy D. 2018. Histological study of domperidone effect on albino rat fetuses. *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.*, 9 (1): 493-504.

Références bibliographiques

37. EL-Haoud H., Boufellous M., Berrani A., Tazougart H., Bengueddour R. 2018. Phytochemical screening of a medicinal plant: *Mentha Spicata* L. Am. J. Innov. Res. Appl. Sci., 7 (4): 226-233.
38. Erb C. 2006. Embryology and teratology, chapter 28 in the laboratory rat. 2nd edition. Elsevier Inc, pp. 818-841.
39. Farnsworth N. R. 1966. Biological and phytochemical screening of plants. J. Pharm. Sci., 55 (3): 225-276.
40. Felici M.D., Scaldaferrri M.L., Lobascio M., Iona S., Nazzicone V., Klinger F.G., Farini D. 2004. Experimental approaches to the study of primordial germ cell lineage and proliferation. Hum. Reprod. Update., 10 (3): 197-206.
41. Fellah S., Romdhane M., Abderraba M. 2006. Extraction et étude des huiles essentielles de la *Salvia officinalis* L. cueillie dans deux régions différentes de la Tunisie. J. Soc. Alger. Chim., 16 (2): 193-202.
42. Foucrier J., Vervoort M., Franquinet R. 2019. Atlas d'embryologie descriptive 4^{ème} édition. Edition dunod, pp. 1-9.
43. Freeman M.E. 2006. Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat, chapter 43 in Knobil and Neill's physiology of reproduction, third edition edited by Jimmy D. Neill, Elsevier, pp 2328-2367.
44. Frohlich J. 2020. Rats and Mice. Section III, chapter 25, In book: Ferrets, rabbits, and rodents clinical medicine and surgery. 4th edition, Elsevier Inc, pp 345-367.
45. Frutos O.F.J., Sanchez B., Garcia B., Iglesias L., Sanchez-Mata D. 1995. Photocontact dermatitis from rue (*Ruta montana* L.). Contact. Derm., 33: 284.
46. Gadanya A.M., Sule M.S., Atiku M.K. 2011. Acute toxicity study of "gadagi" tea on rats. Bayero J. Pure. Appl. Sci., 4 (2): 147-149.
47. Gannes F.P., Billaudel B., Haro E., Taxile M., Le Montagner L., Hurtier A., Ait Aissa S., Masuda H., Percherancier Y., Ruffié G., Dufourd P., Veyret B., Lagroye I. 2013. Rat fertility and embryo fetal development: Influence of exposure to the Wi-Fi signal. Reprod. Toxicol., 36: 1-5.
48. Ghelani H., Chapala M., Jadav P. 2016. Diuretic and antiurolithiatic activities of an ethanolic extract of *Acorus calamus* L. rhizome in experimental animal models. J. Tradit. Complement Med., 6 (4): 431- 436.

Références bibliographiques

49. Gobe C., Mandon-Pepin B. 2019. Des souris et des femmes: une ovogenèse foetale similaire?. *Médecine de la Reproduction.*, 21 (2): 111-126.
50. Gochfeld M. 2017. Sex differences in human and animal toxicology: Toxicokinetics. *Toxicol. Pathol.*, 45 (1): 172-189.
51. Guignard J.L., Cosson L., Henry M. 1985. *Abrégé de phyto-chimie*. Masson, Paris, pp 175-191.
52. Guy J. 1981. *Le rat de laboratoire, technique de laboratoire 7, 1- réactif biologique*. Masson, Paris, pp 33-44.
53. Hamid H.Y., Zakaria Md Z.A.B. 2013. Reproductive characteristics of the female laboratory rat. *Afr. J. Biotechnol.*, 12 (19): 2510-2514.
54. Hammami I., Smaoui S., Ben Hsouna A., Hamdi N., Triki M.A. 2015. *Ruta montana* l. leaf essential oil and extracts: Characterization of bioactive compounds and suppression of crown gall disease. *EXCLI. J.*, 14: 83-94.
55. Hammiche V., Merad R., Azzouz M. 2013. *Plantes toxiques à usage médicinal du pourtour méditerranéen*, Springer, p 212.
56. Hannon P. R., Curry T. E. 2018. Folliculogenesis. In *Encyclopedia of Reproduction*, 2nd edition, volume 2. Edition Elsevier Inc.
57. Harborne J. B. 1984. *Phytochemical Methods- A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis- 2nd edition*, Springer.
58. Harsha S.N., Latha B.V. 2011. *In vitro* antioxidant and *in vitro* anti-inflammatory activity of *Ruta graveolens* methanol extract. *Asian. J. Pharm. Clin. Res.*, 5(1): 32-35.
59. Hazzit M., Benchabane A., Baaliouamer A., Alloun K., Kaci M. 2015. Composition chimique et activité antimicrobienne de l'extrait non volatil et des huiles essentielles de la rue des montagnes (*Ruta montana* L.). *Recherche agronomique N° 27*: 118-129.
60. Hidayat V., Elisma, Lestari I. 2021. Toxicity test of inggu (*Ruta angustifolia* (L)) ethanol leaves extract to male white mice (*Mus musculus*). *J.Bigme*, 1 (2): 21-28.
61. Hook M.A. 2014. Animal models of spinal cord injury, chapter 1 in *handbook of laboratory animal science*, 3rd edition, volume III animal models. Taylor & Francis Group, LLC, p.05.
62. Ikeda K., Kawakami K., Onimaru H., Okada Y., Yokota S., Koshiya N., Oku Y., Lizuka M., Koizumi H. 2017. The respiratory control mechanisms in the brainstem and spinal

Références bibliographiques

- cord: integrative views of the neuroanatomy and neurophysiology. *J. Physiol. Sci.*, 67: 45-62.
- 63.** Jashni H.K., Jahromi H.K., Ranjbary A.G., Jahromi Z.K., Kherameh Z.K. 2016. Effects of aqueous extract from *Asparagus officinalis* L. roots on hypothalamic-pituitary-gonadal axis hormone levels and the number of ovarian follicles in adult rats. *Int. J. Reprod. BioMed.*, 14 (2): 75-80.
- 64.** Kabera J.N., Semana E., Mussa A.R., He X. 2014. Plant secondary metabolites: biosynthesis, classification, function and pharmacological properties. *J. Pharm. Pharmacol.*, 2: 377-392.
- 65.** Kabouche Z., Benkiki N., Seguin E., Bruneau C. 2003. A new dicoumarinyl ether and two rare furocoumarins from *Ruta montana*. *Fitoterapia*, 74: 194-196.
- 66.** Kale O.E., Awodele O., Akindele A.J. 2019. Subacute and subchronic oral toxicity assessments of *Acridocarpus smeathmannii* (DC.) Guill. & Perr. root in wistar rats. *Toxicol. Rep.*, 6: 161-175.
- 67.** Kambouche N., Merah B., Bellahouel S., Bouayed J., Dicko A., Derdour A., Younos C., Soulimani R. 2008. Chemical composition and antioxidant potential of *Ruta montana* L. essential oil from Algeria. *J. Med. Food.*, 11 (3): 593-595.
- 68.** Kara A.W., Ihoual S., Abidli N. 2016. Antioxidant and MDR reversal activity in resistant human ovarian cancer cells of methanolic extract from *Ruta montana* located in the North of Algeria. *Der Pharma Chemica.*, 8 (12): 215-223.
- 69.** Khadhri A., Bouali I., Belkhir S., Mokded R., Smiti S., Falé P., Araújo E.M.M., Serralheiro M.L.M. 2016. In vitro digestion, antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of two species of *Ruta*: *Ruta chalepensis* and *Ruta montana*. *Pharm. Biol.*, 55 (1): 101-107.
- 70.** Knoblaugh S.E., Habecker J.R. 2018. Chapter 3: necropsy and histology in book: comparative anatomy and histology a mouse, rat, and human atlas. 2nd Edition. Elsevier Inc, pp 38-39.
- 71.** Kpemissi M., Metowogo K., Melilaa M., Veerapur V.P., Negru M., Taulescu M., Potarniche A.V., Suhas D.S., Puneeth T.A., Vijayakumar S., Gadegbeku K.E., Aklikokou K. 2020. Acute and subchronic oral toxicity assessments of *Combretum micranthum* (Combretaceae) in wistar rats. *Toxicol. Rep.*, 7: 162-168.

Références bibliographiques

72. Krief S. 2003. Métabolites secondaires des plantes et comportement animal: surveillance sanitaire et observations de l'alimentation des chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées. Sciences du Vivant [q-bio]. Museum national d'histoire naturelle - MNHN PARIS, Français.
73. Lakhdar L. 2015. Evaluation de l'activité antibactérienne d'huiles essentielles marocaines sur *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: étude in vitro. Thèse doctorat. Université Mohamed V de Rabat.
74. Lallemand J. 1984. Effets des rayonnements ionisants sur le développement in utero. Radioprotection, GEDIM., 19 (1): 37-51.
75. Le Moigne A., Foucrier J. 2009. Biologie du développement 7^{ème} édition. Edition Dunod, Paris, pp 99-103.
76. Lilaram, Raichur A.N. 2012. Effect of ethanolic seed extract of *Caesalpinia bonducella* on female reproductive system of albino rat: a focus on antifertility efficacy. Asian. Pac. J. Trop. Dis., 2: S957-S962.
77. Litchfield J.R.J.T., Wilcoxon f. 1949. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. J. Pharmacol. Exp. Ther., 96 (2): 99-113.
78. Lohmiller J. J., Swing S.P. 2006. Reproduction and breeding, chapter 6 in book the laboratory rat, 2nd edition. Elsevier Academic Press, pp 148-153.
79. Lompo M., Guissou I.P., Kabore I.Z., Sawadogo M. 1995. Effet hypothermisant et toxicité générale aigue chez les souris des écorces de tronc de kase. Pharm. Méd. trad. Afro., 73-80.
80. Loomis Ted A., Hayes W.A. 1996. Loomis's essentials of toxicology. 4th ed. Academic Press, p 25.
81. Lów P., Molnár K., Kriska G. 2016. Dissection of the Rat (*Rattus norvegicus*), chapter 12 in: Atlas of animal anatomy and histology, 1st edition. Springer International Publishing Switzerland.
82. Maganha J., Rocha E. de S., Brandão M.A.F., Peters V.M., Guerra M. de O. 2006. Embryo development alteration in rats treated with lapachol. Braz. Arch. Biol. Technol., 49 (6): 927-934.
83. Marc B., Martis A., Moreau C., Arlie G., Kintz P., Leclerc J. 2007. Intoxications aiguës à *Datura stramonium* aux urgences. Presse Med., 36: 1399-1403.

Références bibliographiques

84. Marcondes F.K., Bianchi F.J., Tanno A.P. 2002. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz. J. Biol.*, 62 (4a): 609-614.
85. Marieb E.N. 1999. Anatomie et physiologie humaine, 2^{ème} édition française. Edition Erpi, pp 1062-1068.
86. Masri W., Belwaer I., Khelifi F., Nouioui A., Ben salah D., Amira D., Hedhili A. 2015. Acute poisoning by *Ruta montana*: A case report. *Phytothérapie*, 13 (1): 36-38.
87. Maynard R.L., Downes N. 2019. Female reproductive tract, chapter 19, in book: anatomy and histology of the laboratory rat in toxicology and biomedical research. Elsevier, pp 219-228.
88. Meites J., Steger R.W., Huang H.H. 1980. Relation of neuroendocrine system to the reproductive decline in aging rats and human subjects. *Fed. Proc.*, 39: 3168-72.
89. Miguel E.S. 2003. Rue (*ruta l.*, rutaceae) in traditional Spain: frequency and distribution of its medicinal and symbolic applications. *Econ. Bot.*, 57 (2): 231-244.
90. Monniaux D., Caraty A., Clément F., Dalbiès-Tran R., Dupont J., Fabre S., Gérard N., Mermillod P., Mongetp, Uzbekova S. 2009. Développement folliculaire ovarien et ovulation chez les mammifères. *Inra. Prod. Anim.*, 22 (2): 59-76.
91. Monsees T.K., Opuwari C.S. 2017. Effect of rooibos (*Aspalathus linearis*) on the female rat reproductive tract and liver and kidney functions in vivo. *S. Afr. J. Bot.*, 110: 208-215.
92. Najem M., Belaidi R., Bouiamrine H., Ibijbijen J., Nassiri L. 2018. La rue de montagne « *Ruta montana L.* » : Usages en pharmacopée traditionnelle au Moyen Atlas central et risques de toxicité. *Proceedings BIOSUNE'1 – 2018*, 62-66.
93. NguyenV., Ferry N. 2007. La reproduction des vertébrés. Edition de boeck, p 45.
94. O'malley B. 2005. Chapter 10 rats: in clinical anatomy and physiology of exotic speies. *Clinical anatomy and physiology of exotic species structure and function of mammals, birds, reptiles and amphibians*. Elsevier saunders, pp 199- 215.
95. Ogbuehi I.H., Ebong O.O., Obianime A.W. 2015. Oral acute toxicity (LD50) study of different solvent extracts of *Abrus precatorius* Linn leaves in wistar rats. *Eur. J. Exp. Biol.*, 5 (1): 18-25.
96. Olson H., Betton G., Robinson D., Thomas K., Monro A., Kolaja G., Lilly P., Sanders J., Sipes G., Bracken W., Dorato M., Van Deun K., Smith P., Berger B., Heller A. 2000. Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 32 (1): 56-67.

Références bibliographiques

- 97.** Ouarghidi A., Gary J.M., Abbad A. 2013. Botanical identification and ethno-medicinal uses of some underground part of medicinal plants collected and traded in Marrakech region. *J. Med. Plants. Res.*, 7 (29): 2165-2169.
- 98.** Paccola C.C., Resende C.G., Stumpp T., Miraglia S.M., Cipriano I. 2013. The rat estrous cycle revisited: a quantitative and qualitative analysis. *Anim. Reprod.*, 10 (4): 677-683.
- 99.** Parekh J., Chanda S.V. 2007. *In vitro* antimicrobial activity and phytochemical analysis of some Indian medicinal plant. *Turk. J. Biol.*, 31: 53-58.
- 100.** Patel C., Dadhaniya P., Hingorani L., Soni M.G. 2008. Safety assessment of pomegranate fruit extract: Acute and subchronic toxicity studies. *Food Chem. Toxicol.*, 46 (8): 2728-2735.
- 101.** Pollio A., De Natale A., Appetiti E., Aliotta G., Touwaide A. 2008. Continuity and change in the mediterranean medical tradition: *Ruta* spp. (rutaceae) in Hippocratic medicine and present practices. *J. Ethnopharmacol.*, 116 (3): 469-482.
- 102.** Qazan W.S. 2008. Effects of short and long term treatment of *Ballota undulate* on female albino rats fertility and pregnancy. *Pak. J. Biol. Sci.*, 11 (4): 638-642.
- 103.** Quezel P., Santa S. 1963. Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertique méridionales. CNRS, Paris.
- 104.** Raven P.H., Johnson G.B., Mason K.A, Losos J.B., Singer S.R. 2017. Animal development, chapter 53 in *Biology*, 11th edition. McGraw-Hill Education, pp.1107-1131.
- 105.** Rockett J.C., Narotsky M.G., Thompson K.E., Thillainadarajah I., Blystone C.R., Goetz A.K., Rena H., Best D.S., Murrell R.N., Nichols H.P., Schmid J.E., Wolf D.C., Dix D.J. 2006. Effect of conazole fungicides on reproductive development in the female rat. *Reprod. Toxicol.*, 22 (4): 647-658.
- 106.** Rugh R. 1994. Normal development of the mouse. In *the mouse: its reproduction and development*, Oxford University Press, Oxford, pp 7-43.
- 107.** Seak C. J., Lin C.C. 2007. *Ruta Graveolens* intoxication. *Clin. Toxicol.*, 45: 173-175.
- 108.** Sebastian M.M., Borjeson T.M. 2020. Embryology and teratology, chapter 23 in the laboratory rat, 3rd edition. Elsevier Inc.
- 109.** Seigler, D. S. 1998. *Plant secondary metabolism*. Springer science + business media, LLC
- 110.** Sharif H.B., Mukhtar M.D., Mustapha Y., Gabi B., Lawal A.O. 2015. Acute and subchronic toxicity profile of *Euphorbia pulcherrima* methanol extract on wistar albino rats. *Adv. Pharm.*, 2015: 1-9.

Références bibliographiques

- 111.** Sharmaa C.R., Vani V.b., Jayamma Y.C., Inamdar L.S. 2020. Estrous cycle in rodents: phases, characteristics and neuroendocrine regulation. *Karnatak University, J. Sci.*, 51: 40-53.
- 112.** Sofowora A. 2010. *Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique*. Edition Karthala, p 25.
- 113.** ST-Louis I. 2008. Régulation et rôle des prostaglandines au niveau des cellules endométriales chez la rate pendant le cycle oestral, la gestation et la pseudogestation. mémoire présenté à l'université du Québec à trois-rivières.
- 114.** Takhtajan A. 2009. *Flowering Plants*; 2nd Edition: Springer, p xli.
- 115.** Tédong L., Dzeufiet P.D.D., Dimo T., Asongalem A.E., Sokeng D.S., Flejou J.F., Callard P., Kamtchouing P. 2007. Acute and subchronic toxicity of *Anacardium occidentale* linn (anacardiaceae) leaves hexane extract in mice. *Afr. J. Trad. CAM.*, 4 (2): 140-147.
- 116.** Théis A.1810. *Glossaire de botanique ou Dictionnaire étymologique de tous les noms et termes relatifs à cette science*. Source gallica.bnf.fr / Bibliothèque nationale de France.
- 117.** Touati D., Rahmanb A., Ulubelen A. 2000. Alkaloids from *Ruta montana*. *Phytochemistry*, 53: 277-279.
- 118.** Ulubelen A. 1990. A new alkaloid, montanine, from *Ruta montana*. *J. Nat. Prod.*, 53 (1): 207-208.
- 119.** Ulubelena A., Öztürk M. 2006. Alkaloids and coumarins from *Ruta* Species. *Nat. Prod. Commun.*, 1 (10): 851-857.
- 120.** Usman M.M., Sule M.S., Gwarzo M.Y. 2014. Toxicological studies of aqueous root extract of *Euphorbia lateriflora* (Schum and Thonn) in rats. *J. Med. Plants. Stud.*, 2 (2): 58-62.
- 121.** Vaissaire J.P., Secchi J., Hunt A. 1977. *Sexualité et reproduction des mammifères domestiques et de laboratoire*. Maloine S.A. editeur Paris, pp 157-262.
- 122.** Waterman P.G. 1975. Alkaloids of the Rutaceae: their distribution and systematic significance. *Biochem. Syst. Ecol.* 3: 149-180.
- 123.** Wiart C. 2006. *Medicinal plants of the Asia-pacific: drugs for the future?*. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.
- 124.** Yaghmaei P., Parivar K., Jalalvand F. 2009. Effect of imatinib on the oogenesis and pituitary –ovary hormonal axis in female wistar rat. *Int. J. Fertil. Steril.*, 3 (1): 11-16.
- 125.** Zbinden G., Flury-Roversi M.1981. Significance of the LD₅₀-test for the toxicological evaluation of chemical substances. *Arch. Toxicol.*, 47 (2): 77-99.

Références bibliographiques

- 126.** Zellagui A., Belkassam A., Belaidi A., 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. *Adv. Environ. Biol.*, 6 (10): 2684-2688.
- 127.** Zenk H., Juenger M. 2007. Evolution and current status of the phytochemistry of nitrogenous compounds. *Phytochemistry*, 68: 2757-2772.

**Acute and Subchronic Toxicity Study of Methanol Extract of the Aerial Parts of *Ruta montana* L. on Adult Female Wistar Rats**

Ghedjati Nadra*, Mahdeb Nadia, Bouzidi A. El Ouahab

Department of Biochemistry, Faculty of natural sciences and life, University Ferhat Abbas 1, Setif, Algeria

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Article history:

Received 15 May 2022

Revised 27 July 2022

Accepted 22 August 2022

Published online 02 September 2022

Copyright: © 2022 Nadra *et al.* This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Ruta montana L. locally known as fidjel belongs to the rutaceae family. This plant is used in traditional medicine as an aphrodisiac, abortive and as hypoglycemic. The aim of this research is to evaluate the mean lethal dose (LD₅₀) and subchronic toxicity of methanol extract of *Ruta montana* L. on female rat. To determine the LD₅₀, 30 female rats were divided into 5 groups; each group received intraperitoneally, a single dose (800, 1000, 1200, 1400 and 1600 mg/kg bw) of the extract, toxicity symptoms and mortality were registered for 14 consecutive days. In subchronic toxicity (45 days), 14 female rats were divided into 2 groups; treated group received intraperitoneally 38,7149 mg/kg bw = 1/30 LD₅₀ of the extract and control group received physiological water. Body weight, relative organ masses, reproductive hormones, haematological, biochemical and histopathological parameters were evaluated. The LD₅₀ value was calculated to be 1161.4486 mg/kg by Litchfield and Wilcoxon method. In the subchronic study, there was a significant reduction in body weight in the 2nd and 7th week (P<0.05). Relative mass of the brain and ovaries registered a significant decrease and increase, respectively (P<0.05). Follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH) and biochemical parameters did not record significant difference. Haematological parameters presented significant increase and decrease in mean corpuscular haemoglobin (MCH) and red cell distribution width (RDW), respectively (P<0.05). The histopathology revealed no abnormalities in different studied tissues. The current study revealed that the methanol extract of *Ruta montana* at the tested dose had no toxic effect on subjected organs.

Keywords: *Ruta montana* L., Female rats, LD₅₀, Subchronic toxicity, Reproductive hormone.

Introduction

Medicinal plants are used for centuries as medications for human illnesses including fertility problems,¹ due to the therapeutic value of their constituents,² without the actual knowledge of their toxic potential. Among the problems of the medication by plants; are the imprecise prescribed doses, frequently resulted in overdose.³

Medicinal plants are used by more than 80% of people in the world (according to the WHO) for their health problems, where the traditional use, the natural source and the economic side are some reasons for this worldwide utilization.⁴ Among these plants we find *Ruta montana* L. *Ruta montana* L. (Rutaceae) is a plant of 20-40 cm,⁵ originating in Europe, particularly the mediterranean area, but it is widely distributed in all the moderate and tropical areas.⁶

Ruta montana L. locally known as fidjel,⁷ contains many compounds belonging to different chemical classes such as alkaloids, coumarins, flavonoids, essential oils, saponins, triterpenes, phenols and lignans.⁸ The richness of this plant by these compounds probably a reason for its large use in traditional medicine.⁹ This plant is not used almost any more in Europe; on the other hand it remains a plant appreciated by the tradipraticians in particular in the mediterranean basin and in South America,¹⁰

where it is used as an emmenagogue, an aphrodisiac, abortive,¹⁰⁻¹³ also as an antihelminthic,¹⁰ hypoglycemic,¹⁴ antirhematic,^{11,15} antipyretic,¹⁶ in the treatment of hepatic diseases,¹⁷ hypertension,¹⁸ and vitiligo.¹⁹ To our knowledge, no scientific investigations concerning the toxicological studies of *Ruta montana* L. on female rats (albinos wistar) such as the determination of the LD₅₀ value and the subchronic study. The purpose of this study is to determine the LD₅₀ value and the subchronic toxicity study of the methanol extract of the aerial parts of *R. montana* L. on adult albino wistar female rats.

Materials and Methods

Plant material

The fresh aerial parts of *R. montana* L. was collected in June 2020 from Beni Aziz, a place at North East of Setif (Algeria). Taxonomic identification was done by Dr. Nouiwa W. (Department of Plant Biology and Ecology, Faculty of Nature and Life Sciences, Sétif 1 University, Algeria) (Figure 1). The specimen with voucher number USBR 6-20 was deposited in the department of plant biology and ecology of the same Faculty.

The aerial parts were dried at room temperature in shade for fifteen days; it was manually purified from stems and all impurities and stored in paper bags in the refrigerator at - 4 °C until use.

Plant extraction

Leaves, flowers and fruits of *R. montana* L. was powdered using an electric grinder, the powder (100 g) was macerated with 500 mL of methanol (90%) at room temperature for a week, where the mixture was daily agitated for one hour. The filtrate was evaporated at 30°C at low pressure.²⁰

*Corresponding author. E mail: nadhratoxico@yahoo.com
Tel: 0698385563

Citation: Nadra G, Nadia M, El-Ouahab BA. Acute and Subchronic Toxicity Study of Methanol Extract of the Aerial Parts of *Ruta montana* L. on Adult Female Wistar Rats. Trop J Nat Prod Res. 2022; 6(8):1203-1209. doi.org/10.26538/tjnpr/v6i8.7



Figure 1: (A) The *Ruta montana* L. plant, (B) the fruit of the *Ruta montana* L.

Animals

Adult female rats (albinos wistar) obtained from the Pasteur institute (Algiers- Algeria) were used to evaluate the acute and subchronic toxicity. The ethical approval for the study was obtained from the scientific council of the faculty of Nature and Life Sciences, Sétif 1 university, Algeria). The rats were housed in metal grid cages (55x33x19 cm) and were fed with standard diet and tap water *ad libitum*, however the litter is renewed twice per week. The animals were acclimated to the conditions of the animal room of the faculty of Nature and Life Sciences, Sétif 1 University for two weeks prior to the experiments.

Acute toxicity study (Determination of LD₅₀)

Adult female rats weighing between 110-155 g were used in this study; the rats were divided into 5 groups each containing 6 rats. The animals were fasted overnight with free access to water prior to the treatment and they were weighed just before the injection. Each group received intraperitoneally a single dose (800, 1000, 1200, 1400 and 1600 mg/kg bw) of the methanol extract of *R. montana* dissolved in methanol and solubilized in physiological water, where each rat received a volume of 1 mL/ 200 g bw. The treated rats were observed every hour during the first 24 hours and daily for 14 days to note mortality, signs of toxicity and all changes in their behavior. The LD₅₀ and its confidence interval were calculated using the Litchfield and Wilcoxon method.²¹

Subchronic toxicity study

Adult female Wistar rats weighing between 150-190 g were divided into 2 groups each containing 7 rats; the treated group received daily for 45 days the dose of 38, 7149 mg/kg bw = 1/30 LD₅₀ of *R. montana* methanol extract by intra-peritoneal route, the control group received only physiological water with few drops of methanol. After 45 days of treatment, rats were fasted overnight with free access to tap water. On the morning of the 46th day, They were anaesthetized by inhalation of chloroform and blood samples were taken from the orbital vein using haematocrit tubes for the measurement of haematological parameters (EDTA tubes), biochemical parameters and the reproductive hormones (FSH and LH) (Heparin tubes). The organs (kidneys, liver, lungs, spleen, heart, brain and ovaries) were observed macroscopically *in situ*, and then removed, placed in physiological water, degreased, dried and weighed to calculate the relative mass, the kidneys, liver and ovaries were fixed in 10% formalin for histopathological study.²²

Blood analysis

The haematological parameters such as HGB (haemoglobin), RBC (red blood cells), HCT (haematocrit), MCH (mean corpuscular haemoglobin), RDW (red cell distribution width), MCHC (mean corpuscular haemoglobin concentration), MCV (mean corpuscular volume), WBC (white blood cells) and PLT (platelet) were analyzed with an automatic hematologic analyzer Sysmex coulter XN 350 (Kits- Sulfolyser, fluorocell, cellpack, lysercell, Germany). The

analysis of the biochemical parameters including UREA (urea), CREAT (creatinine), GPT (glutamate-pyruvate transaminase), GOT (glutamate-oxaloacetate transaminase) (Kits- biosystems sa costa brava 30 Barcelona, Spain), ALP (alkaline phosphatase) (Kits- Spinreact S.A.U, Spain) and bilirubin (Kits- Biolabo, France) were evaluated with Biosystem apparatus. For the hormonology; LH (luteinizing hormone) and FSH (follicle stimulating hormone) dosages were carried by automatic analyzer Vidas (Kits- Biomerieux, France).

Histopathological analysis

The kidneys, liver and ovaries fixed in 10 % formalin were dehydrated, embedded in paraffin, and after routine histological procedures, 4 μm sections were mounted on slides and stained with hematoxylin and eosin (H&E) for reading with an optical microscope.²²

Statistical analysis

The obtained results were statistically analyzed by Sigma Stat 3.5 software using the one-way ANOVA test followed by the Tukey test, where differences were considered significant at $p < 0.05$. The results were expressed as the mean value \pm standard deviation.

Results and Discussion

The most of new treatments were originally derived from ancient herbal traditions,² in the world, about 25% of modern drugs developed from plants.²³ Plants contain a diversity of metabolites, some of which may be useful or very toxic to humans,²⁴ mentioning that pharmaceutical drugs are therapeutic at one dose and toxic at another.²³ In order to ensure safety, toxicity tests are useful in obtaining information on the different biologic activities of a substance and understanding its mechanisms of action. In addition, the evolution of medicaments and the rise of their therapeutic potentiels are essentially based on the toxicological evaluation studies.²⁴

Ruta montana locally known as Fidjel,⁷ belongs to the rutaceae family.²⁵ This plant contains above the phytochemicals compounds such as alkaloids, flavonoids, essential oils, coumarins and phenols,^{19,26} which make it widely used in traditional medicine; especially as an emmenagogue, anaphrodisiac and abortive, but also it is known for its toxic properties where The most frequent intoxication cases by it are observed following abortion essay during which the plant is administered either in the form of drinkable decoction, or in the form of vaginal enemas.^{14,19} The extraction by maceration of the aerial parts of *R. montana* L. in methanol gave a crude extract in the form of a sticking paste of a green color with an extraction yield of 12.4258 %. The yield of total phytochemical content of a plant is significantly affected by the characteristics of extracting solvents, among this, the solvent polarity, which is an important parameter. So that the higher the polarity is the better the solubility of compounds.²⁷ Previous investigations show that the methanol extracts more phytoconstituents than another solvent. In this study methanol 90% gave a yield more than obtained by,²⁸ this difference is probably due to the environmental conditions where it grew, or the harvest period.²⁹

The LD₅₀ of a given substance is the quantity that induces mortality of 50% of a tested group of animals, habitually mice or rats, treated by a specific route. It is presented as the amount of administered substance (mg) per the body weight of the tested animal (100g of small animals and kg for greater subjects).³⁰ The simple tool, that's frequently used to get general information on the toxicity of a chemical substance; is the determination of the LD₅₀.³¹ The intra-peritoneal administration of the methanol extract of *R. montana* L., caused different symptoms including: Erect hairs, difficulty of walk (paralysis), regrouping in the corner of the cage, tachycardia, difficulty in breathing followed by cyanosis. Mortality was recorded from the first hour of treatment (after almost 15 minutes) up to the 24th hour. For the survived animals, the symptoms were regressed gradually, and after 24 hours, normal behavior was observed compared to that of the controls. The toxicity was observed to be a dose-dependent phenomenon (see Table 1, Figure 2).

Table 1: Dose-effect of the crude methanol extract of the aerial parts of *Ruta montana* in female rats treated intraperitoneally.

Dose mg/kg	No. of deaths / group	Log dose	Observed effect		Expected effect		% difference	χ^2
			%	Probit	%	Probit		
800	0/6	2.9030	0.5	2.42	1.4	2.8	0.9	0.006
1000	1/6	3	16.7	4.03	18.5	4.1	1.8	0.002
1200	4/6	3.0791	66.6	5.43	58.1	5.2	8.5	0.03
1400	5/6	3.1461	83.3	5.97	86.5	6.1	3.2	0.0085
1600	6/6	3.2041	98.6	7.20	95.8	6.73	2.8	0.018

Table 2: Relative organ masses of female rats controls and treated under the conditions of subchronic toxicity with 38.7149 mg/kg = 1/30 LD₅₀ of the crude methanol extract of the aerial parts of *Ruta montana* L.

	Liver	kidney	Heart	Spleen	Brain	Lung	Ovaries
Treated Group	0.0309 ± 2.01e ⁻³	0.00669 ± 4.41e ⁻⁴	0.00332 ± 3.09e ⁻⁴	0.00294 ± 7.52e ⁻⁴	0.00825* ± 4.05e ⁻⁴	0.007 ± 1.04e ⁻³	0.000819* ± 1.69e ⁻⁴
Control Group	0.0314 ± 3.54e ⁻³	0.00672 ± 5.09e ⁻⁴	0.00323 ± 2.07e ⁻⁴	0.00285 ± 5.02e ⁻⁴	0.00988 ± 5.95e ⁻⁴	0.00735 ± 8.33e ⁻⁴	0.000602 ± 4.86e ⁻⁵

The values are presented as mean ± SD. * significantly different for (P<0.05).

Table 3: The hematologic parameters values of female rats controls and treated under the subchronic toxicity conditions by the dose of 38.7149 mg/kg = 1/30 LD₅₀ of the crude methanol extract of the aerial parts of *Ruta Montana*.

	RBC 10 ¹² /l	HGB g/dl	HCT %	MCV fl	MCH pg	MCHC g/dl	RDW %	IDRa fl	PLT 10 ⁹ /l	PDW fl	MPV fl	WBC 10 ⁹ /l	P- LCR %
Control group	7.33 ± 0.19	13 ± 0.231	40.41 ± 0.51	55.14 ± 1.78	17.74 ± 0.54	32.19 ± 0.35	15.63 ± 0.76	35.3 ± 0.66	711 ± 90.30	8.74 ± 0.17	5.54 ± 0.13	4.66 ± 1.86	2.8 ± 0.54
Treated group	7.00 ± 0.42	12.84 ± 0.75	39.87 ± 2.77	56.96 ± 1.88	18.36* ± 0.55	32.24 ± 0.48	14.54* ± 0.44	35.57 ± 1.31	618 ± 67.19	8.83 ± 0.26	5.58 ± 0.22	4.84 ± 2.27	3.6 ± 1.30

The values are presented as mean ± SD. * significantly different for (P < 0.05).

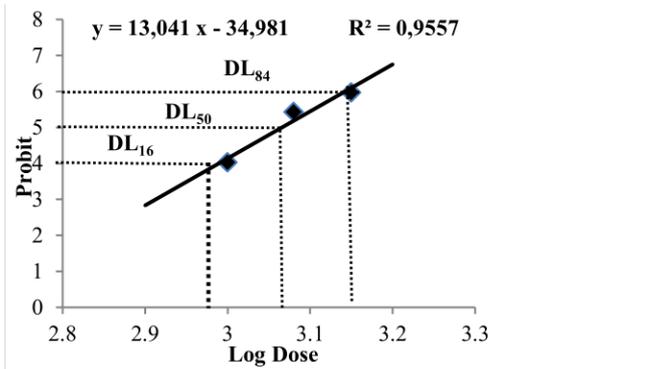


Figure 2: Straight line for determining the LD₅₀ in female rats treated intraperitoneally with the methanol extract of *Ruta montana* L. by the method of Litchfield and Wilcoxon (1949).

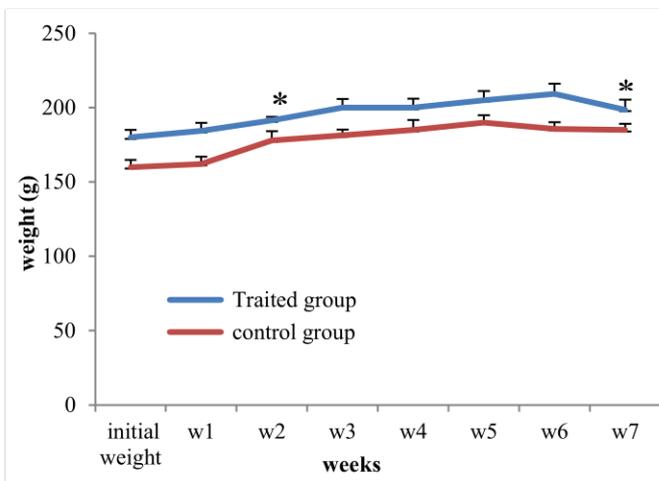


Figure 3: The body weight (g) evolution of female rats controls and treated under the subchronic toxicity conditions by the dose of 38.7149 mg/kg = 1/30 LD₅₀ of the crude methanol extract of the aerial parts of *Ruta montana*. The values are presented as mean ± SD. * significantly different for (P<0.05).

χ^2 of the right: $\Sigma \text{cont. } \chi^2.N / K = 0.0645.30 / 5 = 0.387$. (N / K: average number of animals per dose, N: total number of animals, K: total number of doses).

χ^2 theoretical: for the probability threshold $p = 0.05$ and for the number of degrees of freedom $n = 5-2$ (total number of doses-2) is 7.82. Therefore χ^2 experimental < χ^2 theoretical.

The LD₅₀ value of the extract was calculated to be 1161.4486 mg/kg, DL₁₆ = 977.2372 mg/kg and DL₈₄ = 1380.3842 mg/kg. In this experiment the value of the LD₅₀ of the extract was between 500 and 5000 mg/kg and according to,³¹ our extract is considered as moderately toxic substance, and as slightly toxic substance according to.³² Advanced subchronic toxicity studies in animal model can contribute in the prevision of the toxic effect of the plant extracts, from which, a possible interpolation of the response may be correlated with humans. Also, it can give an idea about the target organ.³³ The female albinos wistar rats treated with 38.7149 mg/kg = 1/30 LD₅₀ of the methanol extract of the *Ruta montana* plant under the subchronic conditions toxicity didn't show any sign of toxicity during 45 days of observation. Also the main aspect of toxicity investigation is formed by the rate of mortality.²⁴ In our work there was no mortality in subchronic treatment. The apparent marker of the harmful effects of chemical substances is the body weight changes.³⁴ The body weight evolution of the treated female rats recorded a significant reduction in the 2nd and the 7th week of 7.63 % and 7.34 % respectively in comparison with the control group, however the weeks leftovers knew a normal evolution. The control group presented a normal evolution in its weight, see figure 3. This reduction, was probably due to the administered extract; which may provoke an anorexia and disorders in the metabolism of carbohydrates, fat or proteins as proposed by,³⁵ or may be explained by the interaction between tannins (including ellagitannins) present in the methanol extract of the aerial parts of *R. montana*,^{28,36} and proteins. This interaction inhibits the digestion of endogenous protein, resulting in weight reduction.³⁷

Another important indicator of pathological and physiological states in animals is the organ weight.²⁷ Macroscopically, no abnormalities were found in the internal organs in all the rats, but statistically a significant reduction in the relative mass of the brain of 16.5% and a significant rise in the relative mass of the ovaries of 36.05% in treated rats in comparison with the control group see table 2. As reported by,³⁸ that the number of ovary corpora lutea or edema can affect the ovary weight. In our study, treated rats ovaries revealed the absence of edema or other histological abnormalities, so the increased relative mass of ovaries may be due to the number of corpora lutea in the ovary. The kidneys and liver are important organs in the waste excretion and in metabolism, respectively. To assess the toxicity of any compounds a biochemical analysis is carried out because it is the main tool to verify the state of these two essential organs.⁴ Cases of hepatic and renal toxicity were registered after administration of phytotherapeutic products.³⁹ The evaluation of the kidney function is generally based on the determination of the level of creatinine and urea in the blood.

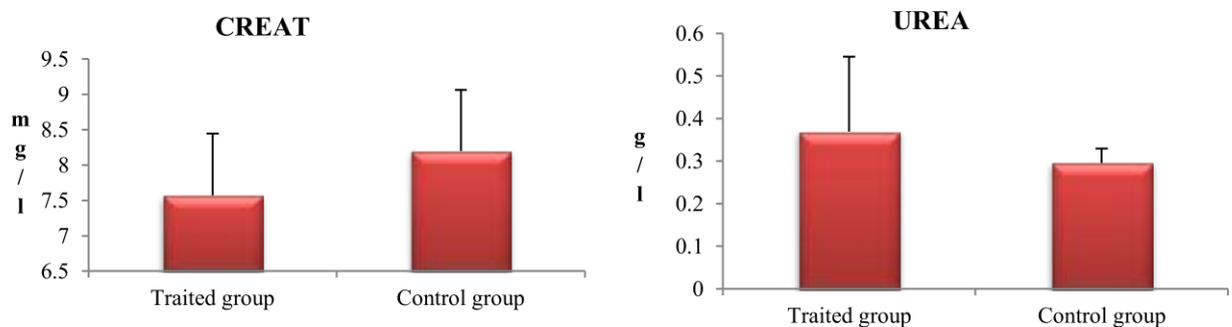


Figure 4: Effect of *Ruta montana* methanol extract on creatinine and urea in female rats in subchronic toxicity. The values are presented as mean ± SD.

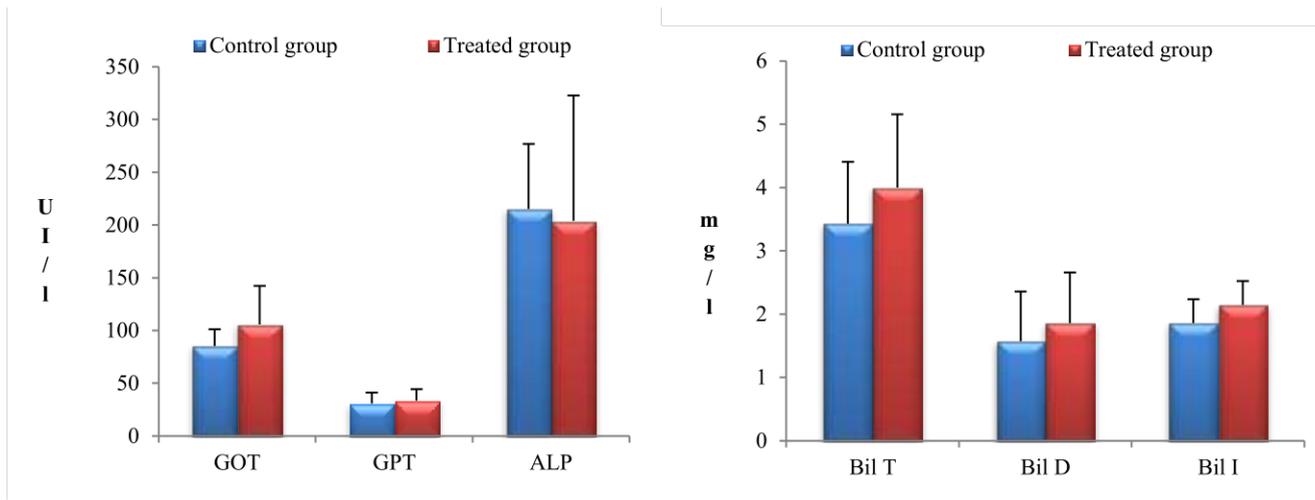


Figure 5: Effect of *Ruta montana* methanol extract on some biochemical parameters of the evaluation of the hepatic function in female rats in subchronic toxicity. The values are presented as mean \pm SD.

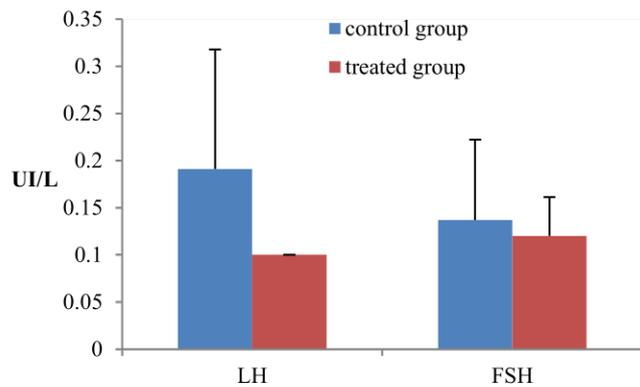


Figure 6: Serum rate of FSH and LH of female rats controls and treated under the subchronic toxicity conditions by the dose of 38.7149 mg/kg = 1/30 LD₅₀ of the crude methanol extract of the aerial parts of *Ruta montana*. The values are presented as mean \pm SD.

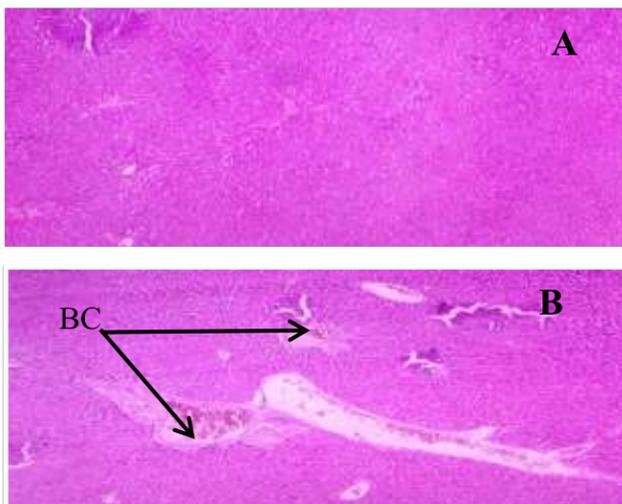


Figure 7: The histological sections of liver (x40) of female rats controls (A) and treated under the subchronic toxicity conditions by the dose of 38.7149 mg/kg = 1/30 LD₅₀ of the crude methanol extract of the aerial parts of *Ruta montana* (B). BC: blood congestion. (H & E stain).

These parameters, in cases of chronic or acute renal toxicity, are frequently increased to quadruple compared to the normal value of control animals.³⁹ The biochemical parameters of the evaluation of the renal function were presented in figure 4, no significant difference was found in the concentrations of urea and creatinine, so this extract didn't affect the kidney function and this was confirmed by the absence of abnormalities in the histological study except the presence of some blood congestions (Figure 7). These confirm the absence of renal toxicity. As show figure 5 biochemical parameters of the estimation of the liver function like ALP for the bile duct alterations, the GOT and GPT for the integrity of hepatocytes and bilirubin for the liver function,³⁷ did not show significant changes following administration of *R. montana* methanol extract. Moreover the absence of histopathological changes in the liver (except the presence of some blood congestions) (Figure 8) confirms that the extract has no hepatotoxic potential. LH and FSH are glycoprotein hormones released from anterior pituitary gland.⁴² They are important regulators of ovarian follicular growth and differentiation,⁴³ where the former controls the estradiol production in ovarian theca cells and the latter regulates the development and the maturation of the follicles in the ovaries, so the increased FSH concentration may elevate the number of the follicles and the weight of ovaries.⁴⁴ Reduction in the LH and FSH values in treated animals may be probably due to the inhibitory effect of the extract on the hypothalamus or the anterior pituitary.⁴⁵ The regulation of these two hormones liberation is primary realized by gonadotropin releasing hormone (GnRH) released from the hypothalamus,⁴⁵ and also by steroid hormones such as estrogens.⁴⁴ The values of FSH and LH (reproductive hormones) dosages did not show significant difference after subchronic treatment (see figure 6), so the *Ruta montana* methanol extract had no effect on the levels of FSH and LH. The histology of ovaries indicated a normal ovarian parenchyma (Figure 9), but regrettably, the determination of corpus luteum number was not possible. Based on the obtained results we suggest that the extract did not affect the hypothalamus-pituitary-ovary axis at this dose. The hematopoietic system is an essential indicator of pathological and physiological status in humans and animals also is a very sensitive target of poisonous compounds.⁴⁰ Haematological parameters are the pertinent indicators for the risk assessment.²³ The MCHC and the MCV are indices of RBC, which are used in anemia determination in most animals,⁴⁰ where the first one with MCH express the haemoglobin concentration while the second one reveals the RBCs size. The HGB and the packed cell volume (PCV) are other blood indices related with the RBCs total population. The haematocrit or the PCV designates the RBCs proportion in the blood and used in anemia diagnosis. The abnormal reduction or increase in the platelets rate causes hemorrhage or clotting respectively.²³ According to,⁴¹ modifications of the haematological system possess a great prediction importance for human toxicity when the data are extrapolated from animal studies.

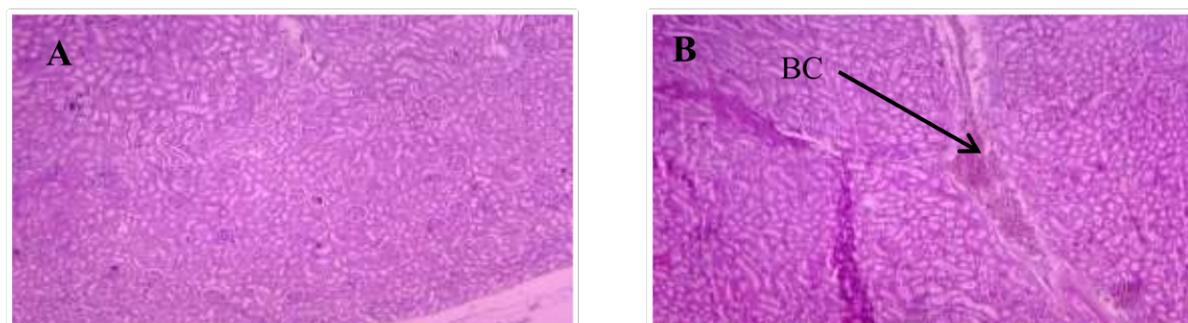


Figure 8: The histological sections of kidney (x40) of female rats controls (A) and treated under the subchronic toxicity conditions by the dose of 38.7149 mg/kg = 1/30 LD₅₀ of the crude methanol extract of the aerial parts of *Ruta montana* (B). BC: blood congestion. (H & E stain).

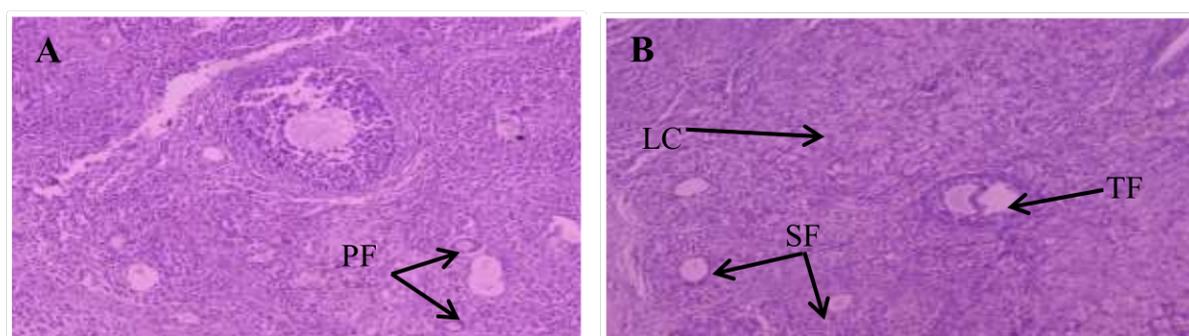


Figure 9: The histological sections of ovaries of female rats controls (A) (x40) and treated (x100) under the subchronic toxicity conditions by the dose of 38.7149 mg/kg = 1/30 LD₅₀ of the crude methanol extract of the aerial parts of *Ruta montana* (B). PF: Primary follicle; SF: Secondary follicle; TF: tertiary follicle; CL: Corpus luteum. (H & E stain).

The values of the different haematological parameters are mentioned in table 3. There was a significant increase in the value of MCH of 3.46 % and a significant decrease in the percentage of RDW of 6.95 % in treated rats in comparison with the control group. However the other parameters didn't mark significant difference. According to our results, the *Ruta montana* methanol extract, at this studied dose, probably will not provoke any abnormalities such as bone marrow suppression, anemia or hemorrhage in humans.

Conclusion

According to the results, it seems that the *R. montana* methanol extract according to its LD₅₀ in female rats is considered as moderately toxic. The subchronic study of this extract at the dose of 38.7149 mg/kg = 1/30 LD₅₀ in female rats had no marked effects on haematological parameters, ovogenesis and liver and kidney functions.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Authors' Declaration

The authors hereby declare that the work presented in this article is original and that any liability for claims relating to the content of this article will be borne by them.

References

- Almasad MM, Qazan WS, Daradka H. Reproductive toxic effects of Artemisia herba alba ingestion in female Spague-dawley rats. Pak J Biol Sci. 2007; 10(18):3158-3161.
- Qazan WS. Effects of short and long term treatment of *Ballota undulate* on female albino rats fertility and pregnancy. Pak J Biol Sci. 2008; 11(4):638-642.
- Usman MM, Sule MS, Gwarzo MY. Toxicological studies of aqueous root extract of *Euphorbia lateriflora*: (Schum and Thonn) in rats. J Med Plants Stud. 2014; 2(2):58-62.
- Kpemissi M, Metowogo K, Melilaa M, Veerapurc VP, Negru M, Taulescu M, Potarniche AV, Suhas DS, Puneeth TA, Vijayakumar S, Gadegbeku KE, Aklidikou K. Acute and subchronic oral toxicity assessments of *Combretum micranthum* (Combretaceae) in Wistar rats. Toxicol Rep. 2020; 7:162-168.
- Bonnier G and Douin R. The great flora in color by Gaston Bonnier. Bellin: Paris; 1990; 205p.
- Harsha SN and Latha BV. *In vitro* antioxidant and *in vitro* anti-inflammatory activity of *Ruta graveolens* methanol extract. Asian J Pharm Clin Res. 2011; 5(1):32-35.
- Bouzidi MA, Faraoun F, Meliani H, Boubekeur I, Kralifa M, Zattal Z. Characterization of the soil occupied by *Ruta* genus species in Tessala mountain (north-west of Algeria). Lab. Technol. 2012; 7(28):79-84.
- Zellagui A, Belkassam A, Belaidi A, Gherraf N. Environmental impact on the chemical composition and yield of essential oils of Algerian *Ruta montana* (Clus.) L and their antioxidant and antibacterial activities. Adv Environ Biol. 2012; 6(10):2684-2688.
- Kara Ali W, Ihoual S, Abidli N. Antioxidant and MDR reversal activity in resistant human ovarian cancer cells of methanolic extract from *Ruta montana* located in the North of Algeria. Der Pharma Chemica. 2016; 8(12):215-223.
- Masri W, Belwaer I, Khlifi F, Nouioui A, Ben salah D, Amira D, Hedhili A. Acute poisoning by *Ruta montana*: A case report. Phytothérapie. 2015; 13(1):36-38.

11. Bellakhdar J, Claisse R, Fleurentin J, Younos C. Reportory of standard herbal drugs in the Moroccan pharmacopoeia. *J Ethnopharmacol.* 1991; 35(2):123-143.
12. Kambouche N, Merah B, Bellahouel S, Bouayed J, Dicko A, Derdour A, Younos C, Soulimani R. Chemical composition and antioxidant potential of *Ruta montana* L. Essential oil from Algeria. *J Med Food.* 2008; 11(3):593-595.
13. Pollio A, De Natale A, Appetiti E, Aliotta G, Touwaide A. Continuity and change in the mediterranean medical tradition: *Ruta* spp. (rutaceae) in Hippocratic medicine and present practices. *J Ethnopharmacol.* 2008; 116(3):469-482.
14. Benkhniqne O, Ben Akka F, Salhi S, Fadli M, Douira A, Zidane L. Catalog of medicinal plants used in the treatment of diabetes in the region of Al Haouz-Rhamna (Morocco). *J Anim Plant Sci.* 2014; 23(1):3539-3568.
15. Ouarghidi A, Gary JM, Abbad A. Botanical identification and ethno-medicinal uses of some underground part of medicinal plants collected and traded in Marrakech region. *J Med Plants Res.* 2013; 7(29):2165-2169.
16. Bnouham M, Mekhfi H, Legssyer A, Ziyat A. Medicinal plants used in the treatment of diabetes in Morocco. *Int J Diabetes Metab.* 2002; 10(1):33-50.
17. Lakhdar L. Evaluation of the antibacterial activity of Moroccan essential oils on aggregatibacter actinomycetemcomitans: in vitro study. Mohamed V University of Rabat. 2015; 18p.
18. Eddouks M, Maghrani M, Lemhadri A, Ouahidi ML, Jouad H. Ethnopharmacological survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes mellitus, hypertension and cardiac diseases in the south-east region of Morocco (Tafilalet). *J Ethnopharmacol.* 2002; 82(2-3):97-103.
19. Daoudi A, Hrouk H, Belaidi R, Slimani I, Ibjibijien J, Nassiri L. Valorization of *Ruta montana* and *Ruta chalepensis*: Ethnobotanical study, phytochemical screening and Antibacterial activity. *J Mater Environ Sci.* 2016; 7(3):926-935.
20. Sofowora A. Medicinal plants and traditional medicine of Africa. Karthala; 2010; 25p.
21. Litchfield JRJT, Wilcoxon f. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J Pharmacol Exp Ther.* 1949; 96 (2):99-113.
22. Alturkistani HA, Tashkandi FM, Mohammedsaleh ZM. Histological Stains: A literature review and case study. *Glob J Health Sci.* 2015; 8(3):72-79.
23. Alelign T, Chalchisa D, Fekadu N, Solomon D, Sisay T, Debella A, Petros B. Evaluation of acute and sub-acute toxicity of selected traditional antiulcerogenic medicinal plant extracts in wistar albino rats. *Toxicol Rep.* 2020; 7:1356-1365.
24. Kale OE, Awodele O, Akindele AJ. Subacute and subchronic oral toxicity assessments of *Acridocarpus smeathmannii* (DC.) Guill. & Perr. root in wistar rats. *Toxicol Rep.* 2019; 6:161-175.
25. Takhtajan A. Flowering Plants. (2nd ed). Springer: Russia; 2009; xli p.
26. Hammiche V, Merad R, Azzouz M. Poisonous plants for medicinal use around the Mediterranean. Springer: Paris; 2013; 212p.
27. Ogbuehi IH, Ebong OO, Obianime AW. Oral acute toxicity (LD₅₀) study of different solvent extracts of *Abrus precatorius* Linn leaves in wistar rats. *Eur J Exp Biol.* 2015; 5(1):18-25.
28. Allouni R. Study of the morphological, phytochemical and pharmacotoxicological aspects of the *Ruta montana* plant. Farhet Abbas, Setif University. 2018; 60p.
29. Chollet S, Papet Y, Mura P, Brunet B. Determination of atropine and scopolamine contents in wild and ornamental varieties of *Datura*. *Ann Anal Toxicol.* 2010; 22 (4):173-179.
30. Gadanya AM, Sule MS, Atiku MK. Acute toxicity study of "gadagi" tea on rats. *Bayero J Pure Appl Sci.* 2011; 4 (2):147-149.
31. Zbinden G and Flury-Roversi M. Significance of the LD₅₀ test for the toxicological evaluation of chemical substances. *Arch Toxicol.* 1981; 47(2):77-99.
32. Loomis TA and Hayes WA. Loomis's Essentials of Toxicology. (4th ed). Academic Press: London; 1996; 25p.
33. Sharif HB, Mukhtar MD, Mustapha Y, Gabi B, Lawal AO. Acute and Subchronic Toxicity Profile of *Euphorbia pulcherrima* methanol extract on wistar Albino rats. *Adv Pharm.* 2015; 2015:1-9.
34. Tédong L, Dzeufiet PDD, Dimo T, Asongalem AE, Sokeng DS, Flejou JF, Callard P, Kamtchouing P. Acute and subchronic toxicity of *Anacardium occidentale* linn (anacardiaceae) leaves hexane extract in mice. *Afr J Trad CAM.* 2007; 4 (2):140-147.
35. Ghelani H, Chapala M, Jadav P. Diuretic and antiulcerogenic activities of an ethanolic extract of *Acorus calamus* L. rhizome in experimental animal models. *J Trad Compl Med.* 2016; 6(4):431-436.
36. Benziane MM. Phytochemical screening of the *Ruta montana* plant. Extraction of essential oil and rutin. Antioxidant activity of the plant. Es-Senia University of Oran. 2007; 48p.
37. Patel C, Dadhaniya P, Hingorani L, Soni MG. Safety assessment of pomegranate fruit extract: Acute and subchronic toxicity studies. *Food Chem Toxicol.* 2008; 46 (8):2728-2735.
38. Rockett JC, Narotsky MG, Thompson KE, Thillainadarajah I, Blystone CR, Goetz AK, Rena H, Best DS, Murrell RN, Nichols HP, Schmid JE, Wolf DC, Dix D J. Effect of conazole fungicides on reproductive development in the female rat. *Reprod Toxicol.* 2006; 22(4):647-658.
39. Arsad SS, Esa NM, Hamzah H, Othman F. Evaluation of acute, subacute and subchronic oral toxicity of *Rhaphidophora decursiva* (Roxb.) Schott extract in male Sprague Dawley rats. *J Med Plant Res.* 2013; 7(41):3030-3040.
40. Amna FO, Nooraain H, Noriham A, Azizah AH, Husna NR. Acute and oral subacute toxicity study of ethanolic extract of *Cosmos caudatus* leaf in sprague dawley rats. *Int J Biosci Biochem Bioinforma.* 2013; 3(4):301-305.
41. Olson H, Betton G, Robinson D, Thomas K, Monro A, Kolaja G, Lilly P, Sanders J, Sipes G, Bracken W, Dorato M, Van Deun K, Smith P, Berger B, Heller A. Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2000; 32(1):56-67.
42. Jashni HK, Jahromi HK, Ranjbari AG, Jahromi ZK, Kherameh ZK. Effects of aqueous extract from *Asparagus officinalis* L. roots on hypothalamic-pituitary-gonadal axis hormone levels and the number of ovarian follicles in adult rats. *Int J Reprod BioMed.* 2016; 14(2):75-80.
43. Yaghmaei P, Parivar K, Jalalvand F. Effect of Imatinib on the oogenesis and pituitary-ovary hormonal axis in female Wistar rat. *Int J Fertil Steril.* 2009; 3(1):11-16.
44. Monsees TK and Opuwari CS. Effect of rooibos (*Aspalathus linearis*) on the female rat reproductive tract and liver and kidney functions *in vivo*. *S Afr J Bot.* 2017; 110:208-215.
45. Lilaram and Raichur AN. Effect of ethanolic seed extract of *Caesalpinia bonducella* on female reproductive system of albino rat: a focus on antifertility efficacy. *Asian Pac J Trop Dis.* 2012; 2:S957-S962.

الملخص

تستخدم نبتة السذاب الجبلي (سذابيات) المعروفة محلياً باسم فيجل في الطب التقليدي كمنشط جنسي و مجهض و مخفض للسكر في الدم. تمثل الهدف من هذا البحث في دراسة السمية الحادة عن طريق تحديد الجرعة المميتة المتوسطة (DL₅₀) لمستخلصات الأجزاء الهوائية من النبات في كلا الجنسين لتصنيف السمية المحتملة، و في السمية شبه المزمنة لتقييم تأثير المستخلص الميثانولي على الأعضاء الرئيسية مثل الكبد و الكلى و المبيض و مكونات الدم و على تكاثر الجرذان الإناث. تمت دراسة السمية شبه المزمنة (45 يوماً)، باستخدام 14 جرذان أناث مقسمة إلى مجموعتين؛ تلقت المجموعة المعالجة بالمسلك الصفافي جرعة 38.7149 مغ/كغ = DL₅₀ 30/1 من المستخلص الميثانولي و تلقت المجموعة الشاهدة الماء الفسيولوجي. حيث قيمت التأثيرات على الأعضاء الرئيسية (الكبد و الكلى و المبيض و الدم). تم تحديد تأثير المستخلص الميثانولي لهذا النبات على تكاثر جرذان إناث بتزاوج 12 جرذان إناث متبقية من سمية شبه مزمنة (7 تمت معالجتها بمستخلص النبات و 5 شاهدة) بجرذان ذكور بالغة سليمة (غير معالجة). حيث تم أيضاً تقييم الوسائط السابقة. قدرت قيمة DL₅₀ المحسوبة بطريقة Litchfield و Wilcoxon بـ 524.8075 مغ/كغ (الجرذان الذكور) و 398.1071 مغ/كغ (الجرذان الإناث) للمستخلص القلويدي و 1071.5193 مغ/كغ (الجرذان الذكور) و 1161.4486 مغ/كغ (الجرذان الإناث) للمستخلص الميثانولي. لوحظ في الدراسة شبه المزمنة، انخفاض معنوي في الوزن الجسمي للجرذان المعالجة في الأسبوعين الثاني و السابع (P < 0.05). سجلت الكتلة النسبية للدماغ و المبايض انخفاضاً و زيادة معنوية على التوالي (P < 0.05). لم يسجل الهرمون المنبه للحريبات (FSH) و الهرمون اللوتيني (LH) و الوسائط البيوكيميائية أي فرق معنوي. أظهرت المتغيرات الدموية زيادة و انخفاضاً معنوياً في TCMH و IDR على التوالي (P < 0.05). لم يكشف التشريح المرضي للأنسجة عن أي تشوهات في الأنسجة التي تمت دراستها. لم يسجل في دراسة تأثير المستخلص الميثانولي على تكاثر الجرذان الإناث أي شذوذ في عدد و وزن الأجنة و المعايير الأخرى المدروسة. أوضحت هذه الدراسة أن المستخلص الميثانولي للسذاب الجبلي بالجرعة المختبرة ليس له تأثير سام على تكوين البويضات و تكوين الجنين و الأعضاء المدروسة.

الكلمات المفتاحية: السذاب الجبلي، الجرذان، السمية الحادة وشبه المزمنة، الكبد، الكلى، المبايض، الأجنة.

Résumé

Ruta montana L. (rutaceae) localement connue sous le nom de fidjel est utilisée en médecine traditionnelle comme anaphrodisiaque, abortif et comme hypoglycémiant. Le but de ce travail est d'étudier la toxicité aiguë par la détermination de la dose létale moyenne (DL₅₀) des extraits de la partie aérienne de la plante chez les deux sexes pour une éventuelle classification toxicologique, et la toxicité sub-chronique pour évaluer l'effet de l'extrait méthanolique sur les principaux organes tels que le foie, le rein les ovaires, les constituants du sang et sur la reproduction des rats femelles. Pour la toxicité sub-chronique (45 jours), 14 rats femelles sont divisées en 2 groupes; groupe traité reçu par voie intra-péritonéale 38,7149 mg/kg = 1/30 DL₅₀ de l'extrait méthanolique et groupe témoin reçu de l'eau physiologique. Les effets sur les principaux organes (foie, rein, ovaire et sang) sont évalués. Pour déterminer l'effet de l'extrait méthanolique de cette plante sur la reproduction des rats femelles, 12 rattes restantes de la toxicité sub-chronique (7 traitées par l'extrait de la plante et 5 témoins) sont couplées par des rats mâles adultes sains (non traités) où les précédents paramètres sont aussi évalués. La valeur de la DL₅₀ calculée par la méthode de Litchfield et Wilcoxon a été 524.8075 mg/kg (rats mâles), 398.1071 mg/kg (les femelles) pour l'extrait alcaloïdique et 1071.5193 mg/kg (rats mâles), 1161.4486 mg/kg (les femelles) pour l'extrait méthanolique. Dans l'étude sub-chronique, une diminution significative a été notée dans le poids corporel dans la 2^{ème} et la 7^{ème} semaine (P<0.05). La masse relative du cerveau et des ovaires a enregistré une diminution et une augmentation significatives, respectivement (P < 0,05). La FSH (Follicle Stimulating Hormone) et la LH (Luteinizing Hormone) et les paramètres biochimiques n'ont pas enregistré de différence significative. Les paramètres hématologiques ont présenté une augmentation et une diminution significative dans TCMH (Teneur Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine) et IDR (Indice de Distribution des globules Rouges) respectivement (P<0.05). L'histopathologie n'a révélé aucune anomalie dans les différents tissus étudiés. Dans l'effet de l'extrait méthanolique sur la reproduction des rattes, aucune anomalie n'a été enregistrée dans le nombre et le poids des embryons et les autres paramètres étudiés. Cette étude a révélé que l'extrait méthanolique de *Ruta montana* à la dose testée n'a aucun effet toxique sur l'ovogénèse, l'embryogénèse et les organes étudiés.

Mots clés: *Ruta montana* L., rats, toxicité aiguë et sub-chronique, foie, rein, ovaires, embryons.

Summary

Ruta montana L. (rutaceae) locally known as fidjel is used in traditional medicine as an aphrodisiac, abortive and as hypoglycemic. The aim of this work is to study the acute toxicity by the determination of the mean lethal dose (LD₅₀) of the extracts of the aerial parts of the plant in both sexes for a possible toxicological classification, and the sub-chronic toxicity to evaluate the effect of the methanol extract on the main organs such as liver, kidney, ovaries, blood constituents and on reproduction of female rats. In sub-chronic toxicity (45 days), 14 female rats were divided into 2 groups; treated group received intraperitoneally 38.7149 mg/kg = 1/30 LD₅₀ of the methanol extract and control group received physiological water. Effects on main organs (liver, kidney, ovary and blood) were evaluated. To determine the effect of the methanol extract of this plant on female rat's reproduction, 12 rats remaining from sub-chronic toxicity (7 treated with the extract of the plant and 5 controls) were coupled with healthy adult male rats (no treated) where the previous parameters were also evaluated. The LD₅₀ value calculated by the Litchfield and Wilcoxon method was 524.8075 mg/kg (male rats), 398.1071 mg/kg (females) for the alkaloid extract and 1071.5193 mg/kg (male rats), 1161.4486 mg/kg (females) for the methanol extract. In sub-chronic study, there was a significant reduction in body weight in the 2nd and 7th week (P<0.05). Relative mass of the brain and ovaries registered a significant decrease and increase, respectively (P<0.05). Follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH) and biochemical parameters did not record significant difference. Haematological parameters presented significant increase and decrease in mean corpuscular haemoglobin (MCH) and red cell distribution width (RDW), respectively (P<0.05). The histopathology revealed no abnormalities in different studied tissues. In the effect of methanol extract on female rat's reproduction, no abnormalities were registered in fetus's number and weight and the other studied parameters. The current study revealed that the methanol extract of *Ruta montana* at the tested dose had no toxic effect on ovogenesis, embryogenesis and subjected organs.

Key words: *Ruta montana* L., rats, acute and sub-chronic toxicity, liver, kidney, ovaries, embryos.