

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère De L'enseignement Supérieur Et De La Recherche Scientifique Université De



Saida– Dr. Moulay Tahar

Faculté Des Sciences, Département De Biologie  
Laboratoire De Biotoxicologie, Pharmacognosie Et  
Valorisation



Biologique Des Plantes

## Thèse

Présentée pour obtenir le diplôme de

**Doctorat 3<sup>ème</sup> Cycle**

Spécialité : Biochimie Et Toxicologie Expérimentale

Filière : Sciences biologiques

Présentée par : M<sup>lle</sup> AOUAD Rima Farah

### Intitulé

**Exploration de l'effet prophylactique de  
l'administration d'un extrait de *Rosmarinus  
officinalis* chez les rats Wistar exposés à  
l'éthanol (étude histologique, biochimique et  
neurocomportementale**

Thèse soutenue devant le jury proposé composé de :

N°	Nom et prénom	Grade	Etablissement	Qualité
01	SLIMANI Miloud	Prof.	Université de Saida – Dr. Moulay Tahar	Président
02	BOUFADI Yasmina	Prof	Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem	Rapporteur
03	ADLI Djallal Eddine	MCA	Université de Saida – Dr. Moulay Tahar	Co-rapporteur
04	HACHEM Kadda	Prof	Université de Saida – Dr. Moulay Tahar	Examineur
05	KEDDARI Soumia	MCA	Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem	Examinatrice

Année Universitaire 2021-2022

## **Remerciements**

*Cette étude a été réalisée au sein du Laboratoire de Biotoxicologie, Pharmacognosie et Valorisation Biologique des Plantes (LBPVBP), Université de Saida, avec la collaboration du Laboratoire de Bioéconomie, Sécurité Alimentaire et Santé (LBSAS) de l'université de Mostaganem et le Laboratoire de Chimie Pharmaceutique, ULB, Belgique.*

*Ce modeste travail n'aurait pas vu le jour sans la collaboration, la participation, de plusieurs personnes à travers leur orientation, leur conseil et leur soutien moral et psychologique qu'ils m'ont apportés tout le long de cette recherche. L'intérêt qu'ils ont manifesté à ce travail m'a encouragé à persévérer d'avantage dans mon métier et faire de la recherche une vocation.*

*En premier lieu, je remercie sincèrement et très chaleureusement Pr. Mokhtaria Yasmina BOUFADI, Professeur à l'université de Mostaganem, ma directrice de thèse. Je vous dois énormément madame, merci d'avoir accepté d'encadrer ce travail, de m'avoir guidée tout au long de ces cinq ans de recherche, merci pour ses précieux conseils, sa patience, sa confiance accordée, pour son soutien et sa disponibilité, je n'oublierai jamais tout ce que vous avez fait pour moi, vous êtes et vous resterez toujours mon exemple.*

*Je tiens à remercier vivement Dr. Djallal Eddine Houari ADLI, Maitre de Conférences classe « A » à l'Université de Saida, pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de codiriger ma thèse. Son dynamisme, sa disponibilité, son aide, ses précieux conseils, ses connaissances scientifiques m'ont permis d'avancer plus loin dans mes recherches. Je le remercie, tout particulièrement, pour ses grandes qualités humaines et son soutien permanent, au long de ces années.*

*J'adresse toute ma reconnaissance au Pr. Miloud SLIMANI, de l'université de Saida, d'avoir accepté de présider mon jury de soutenance ; qu'il trouve ici l'expression de mes plus vifs remerciements.*

*Je tiens également à adresser mes vifs remerciements au Pr. Kada HACHEM, professeur à l'Université de Saida, d'avoir bien voulu examiner cette thèse et de faire partie de mon jury. Soyez assuré de ma sincère reconnaissance.*

*Je remercie également Dr. Soumia KEDDARI, maitre de conférences classe « A » à l'Université de Mostaganem, d'avoir aimablement accepté d'apporter ses critiques à ce travail.*

*J'adresse ma gratitude et ma reconnaissance au Pr. Khaled KAHLOULA, professeur et directeur du laboratoire à l'Université de Saida, pour m'avoir accueilli à bras ouverts au sein du LBPVBP, un grand merci.*

*Mes profonds remerciements vont également à toutes les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin, principalement à tous l'effectif du laboratoire LBPVBP.*

*Enfin, merci à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'aboutissement de ce travail.*

**Rima Farah AOUAD**

## **Résumé**

*Rosmarinus officinalis*, est une espèce d'arbrisseaux de la famille des Lamiacées, apprécié largement en raison de ses vertus nutritionnelles et ses propriétés médicinales. Cette étude a fait objet de déterminer la composition chimique par HPLC/UV, l'activité antioxydante (DPPH) et l'évaluation de l'effet hépatoprotecteur et neuroprotecteur de l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* (EER) contre l'alcoolisme induit par l'alcool éthylique.

Dans cette optique, l'étude a inclus vingt quatre rats mâles albinos Wistar qui ont été répartis en quatre groupes. Les rats ont été exposés pour une durée de quatre vingt dix jours à 5 mL d'alcool éthylique à raison de 20% (par voie orale) afin d'induire l'alcoolisme chronique et traités par 200 mg/kg d'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* (EER) en vue de restaurer les atteintes et les dommages délétères hépatiques et cérébrales.

L'identification chimique de l'extrait EER a révélé une gamme et une quantité importante de composés polyphénoliques ; l'acide rosmarinique, l'acide gallique, la quercétine, la lutéoline, la catéchine, etc. L'ingestion prolongée de l'alcool éthylique aux rats a provoqué un dysfonctionnement hépatique accompagné de perturbations neurologiques, se révélant par une augmentation hautement significative ( $P < 0.05$ ) du taux sérique des marqueurs biochimiques (glycémie, ASAT, ALAT, urée, créatinine, albumine, bilirubine,  $\gamma$ GT, cholestérol) et les biomarqueurs inflammatoires (TNF- $\alpha$  et PGE2) ainsi que les malondialdéhyde, et une diminution très significative ( $P < 0,05$ ) des enzymes antioxydantes érythrocytaires (catalase, superoxyde dismutase et glutathion peroxydase). Ces paramètres biochimiques ont confirmés les détriments lésionnels histologiques constatés au niveau hépatique et cérébral. Ces atteintes biochimiques et histologiques (foie et cerveau) ont été restaurées par une prise orale quotidienne de l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis*, permettant d'observer une diminution hautement significative ( $P < 0.05$ ) de ces marqueurs biochimiques et inflammatoires ainsi que le taux de malondialdéhyde et une augmentation davantage des enzymes du statut oxydatif avec réparation des dommages lésionnels d'organes.

Ces résultats montrent que l'extrait EER procure des activités ; hépatoprotectrice et neuroprotectrice qui sont attribuées aux molécules bioactives que confère cet extrait contre l'hépatotoxicité et la neurotoxicité induites par l'alcool éthylique chez les rats Wistar.

**Mots clés :** *Rosmarinus officinalis*, HPLC/UV, l'alcoolisme chronique, toxicité, biomarqueurs inflammatoires.

## **Abstract**

*Rosmarinus officinalis*, is a species of shrubs of the Lamiaceae family, appreciated widely because of its nutritional virtues and its medicinal properties. This study aimed to determine the chemical composition by HPLC/UV, the antioxidant activity (DPPH) and the evaluation of the hepatoprotective and neuroprotective effect of the ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* (EER) against alcoholism induced by ethyl alcohol.

With this in mind, the study included twenty-four male Wistar albino rats who were divided into four groups. The rats were exposed for a period of ninety days to 5 mL of 20% ethyl alcohol (by the oral route) in order to induce chronic alcoholism and treated with 200 mg/kg of ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* (EER) in order to restore damage and deleterious hepatic and cerebral damage.

The chemical identification of the EER extract revealed a significant range and amount of polyphenolic compounds; rosmarinic acid, gallic acid, quercetin, luteolin, catechin, etc. Prolonged ingestion of ethyl alcohol in rats caused hepatic dysfunction accompanied by neurological disturbances, revealed by a highly significant increase ( $P < 0.05$ ) in the serum level of biochemical markers (glycaemia, ASAT, ALAT, urea, creatinine, albumin, bilirubin,  $\gamma$ GT, cholesterol) and inflammatory biomarkers (TNF- $\alpha$  and PGE2) as well as malondialdehyde, and a very significant decrease ( $P < 0.05$ ) in erythrocyte antioxidant enzymes (catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase). These biochemical parameters confirmed the histological damage observed in the liver and brain. These biochemical and histological damage (liver and brain) were restored by a daily oral intake of the ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis*, making it possible to observe a highly significant reduction ( $P < 0.05$ ) of these biochemical and inflammatory markers as well as the rate malondialdehyde and a further increase in oxidative status enzymes with repair of organ damage.

These results show that the EER extract provides activities; hepatoprotective and neuroprotective which are attributed to the bioactive molecules conferred by this extract against hepatotoxicity and neurotoxicity induced by ethyl alcohol in Wistar rats.

**Keywords :** *Rosmarinus officinalis*, HPLC/UV, chronic alcoholism, toxicity, inflammatory biomarkers.

## الملخص

*Rosmarinus officinalis*، هو نوع من الشجيرات من عائلة Lamiaceae يحظى بتقدير كبير بسبب خصائصه الغذائية وخصائصه الطبية. هدفت هذه الدراسة إلى تحديد التركيب الكيميائي لـ HPLC / UV ، والنشاط المضاد للأكسدة (DPPH) وتقييم التأثير الوقائي والعصبي للمستخلص الإيثانولي لـ *Rosmarinus officinalis* (EER) ضد إدمان الكحول الناجم عن الكحول الإيثيلي.

مع وضع ذلك في الاعتبار ، شملت الدراسة أربعة وعشرين ذكورًا من جردان ويستار البيضاء الذين تم تقسيمهم إلى أربع مجموعات. تم تعريض الفئران لمدة تسعين يومًا إلى 5 مل من الكحول الإيثيلي بنسبة 20٪ (عن طريق الفم) من أجل إحداث إدمان مزمن للكحول وعولجت بـ 200 مجم / كجم من المستخلص الإيثانولي من *Rosmarinus officinalis* (EER) من أجل معالجة وتجنب الضرر الكبدي والدماغي .

كشفت التحديد الكيميائي لمستخلص EER عن نطاق وكمية كبيرة من مركبات البوليفينول ؛ حمض روزمارينيك ، حمض الغاليك ، كيرسيتين ، لوتولين ، كاتشين ، إلخ. تسبب تناول الكحول الإيثيلي لفترات طويلة في الفئران في حدوث خلل في وظائف الكبد مصحوبًا باضطرابات عصبية ، وكشفت عن زيادة ملحوظة للغاية ( $P < 0.05$ ) في مستوى المصل للواسمات الكيميائية الحيوية (سكر الدم ، ASAT ، ALAT ، اليوريا ، الكرياتينين ، الألبومين ، البيليروبين ،  $\gamma$ GT ، الكولسترول) والمؤشرات الحيوية الالتهابية ( $TNF-\alpha$ ) و ( $PGE2$  بالإضافة إلى مالونديالدهيد ، وانخفاض كبير جدًا ( $P < 0.05$ ) في إنزيمات مضادات الأكسدة في كريات الدم الحمراء (الكاتالاز ، ديسموتاز الفائق ، والجلوتاثيون بيروكسيداز). أكدت هذه الأدلة هذه المعلومات البيوكيميائية الضرر النسيجي الذي لوحظ في الكبد والدماغ، تمت معالجة هذه الاضرار الكيميائية الحيوية والنسجية (الكبد والدماغ) عن طريق تناول المستخلص الإيثانولي من *Rosmarinus officinalis* يوميًا عبر الفم، مما يجعل من الممكن ملاحظة انخفاض كبير للغاية ( $P < 0.05$ ) في هذه العلامات الكيميائية الحيوية والالتهابات وكذلك المعدل malondialdehyde وزيادة في الأنزيمات المضادة للأكسدة مع إصلاح تلف الأعضاء .

تظهر هذه النتائج أن مقتطف EER له دور وقائي ضد السمية الكبدية والعصبية التي يسببها الكحول الإيثيلي في فئران ويستار التي تنسب إلى الجزئيات النشطة بيولوجيًا التي يمنحها هذا المستخلص .

**الكلمات المفتاحية:** *Rosmarinus officinalis* ، HPLC / UV ، إدمان الكحول المزمن ، السمية ، المؤشرات الحيوية الالتهابية .

## Liste des abréviations

**µg** : microgramme.

**ADH** : alcool déshydrogénase

**ALAT** : alanine aminotransférase.

**ALDH** : aldéhyde déshydrogénase

**ASAT** : aspartate aminotransférase.

**BChE**: butyrylcholinesterase

**C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH** : alcool éthylique

**CAT**: catalase.

**CE<sub>50</sub>** : concentration effective.

**DPPH** : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle

**EAG** : équivalent d'acide gallique.

**EER** : extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis*

**EQ** : équivalent de quercétine.

**ERO**: espèces réactives de l'oxygène.

**GABA** : acide gamma-amino- butyrique

**GSH-Px** : glutathion peroxydase.

**HPLC** : Chromatographie en phase liquide à haute performance.

**IRM** : imagerie par résonance magnétique

**LDH** : lactate déshydrogénase.

**LDL** : lipoprotéines de basse densité.

**MDA** : malondialdéhyde.

**MEOS** : microsomal enzyme oxidizing system

**NAD** : nicotinamide adénine dinucléotide.

**NADH** : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Réduit.

**NADPH** : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.

**NMDA** : récepteur au N-méthyl-D-aspartate

**nmol**: nanomole.

**OF** : Open Field

**PAL**: phosphatases alcalines

**PGE2** : prostaglandine E2

**RSA** : activité anti-radicalaire

**SOD**: superoxyde dismutase.

**t/min** : tour /minute

**TBA** : acide thiobarbiturique.

**TFA**: acide trifluoroacétique.

**TG** : triglycérides.

**TIM**: temps d'immobilité

**TNF- $\alpha$** : Tumor necrosis factor.

**$\gamma$ GT** : gamma glutamyl-transpeptidase



## **Liste des tableaux et figures**

### **Partie bibliographique**

#### **Liste des tableaux**

	<b>Page</b>
<b>Tab. 1</b> Caractères physico-chimiques de l'éthanol (Merck, 2016).	5

#### **Liste des figures**

<b>Fig. 1</b> Structure de l'éthanol (Vogel, 2010).	12
<b>Fig. 2</b> Métabolisme de l'alcool éthylique (Preedy et al., 1997)	12
<b>Fig. 3</b> <i>Rosmarinus officinalis</i> (Anton et al., 2005)	19
<b>Fig. 4</b> Les différentes parties de la plante du <i>Rosmarinus officinalis</i> (Planzen et al., 1829).	21

### **Partie expérimentale**

#### **Liste des tableaux**

	<b>Page</b>
<b>Tab.2</b> Composition d'extrait éthanolique de <i>Rosmarinus officinalis</i> (EER) par HPLC/UV (mg/g).	50
<b>Tab. 3</b> Teneur en composés phénoliques et flavonoïques, et activité antioxydante de l'extrait éthanolique de <i>Rosmarinus officinalis</i> .	51
<b>Tab.4</b> Evaluation des paramètres pondéraux des rats.	56
<b>Tab. 5</b> Taux d'alcoolémie chez les différents groupes des rats.	75

## Liste des figures

<b>Fig. 5</b>	Les feuilles de <i>Rosmarinus officinalis</i>	<b>30</b>
<b>Fig. 6</b>	T Hewlett Packard 5730A chromatographe	<b>35</b>
<b>Fig.7</b>	Test d'open-field.	<b>35</b>
<b>Fig. 8</b>	Test de light/dark box.	<b>36</b>
<b>Fig. 9</b>	L'épreuve de la nage forcée (FST).	<b>37</b>
<b>Fig. 10</b>	Epreuve de labyrinthe surélevé.	<b>38</b>
<b>Fig. 11</b>	la piscine de Morris	<b>39</b>
<b>Fig. 12</b>	Chromatogrammes par analyse HPLC/UV d'extrait éthanolique de <i>Rosmarinus officinalis</i> à une longueur d'onde de 270 nm.	<b>49</b>
<b>Fig. 13</b>	Chromatogrammes par analyse HPLC/UV d'extrait éthanolique <i>Rosmarinus officinalis</i> à. une longueur d'onde de 320 nm	<b>49</b>
<b>Fig14</b>	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	<b>51</b>
<b>Fig15</b>	Courbe d'étalonnage de la quercétine.	<b>52</b>
<b>Fig. 16</b>	Pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique d'extrait éthanolique de <i>Rosmarinus officinalis</i> . Les valeurs représentent la moyenne (m) de 3 déterminations ± écart type (n = 3).	<b>52</b>
<b>Fig. 17</b>	Pouvoir anti-radicalaire (RSA%) des différentes concentrations (100, 250, 500, et 1000 µg/mL) d'extrait éthanolique de <i>Rosmarinus officinalis</i> . Les valeurs représentent la moyenne (m) de 3 déterminations ± écart type (n = 3).	<b>53</b>
<b>Fig. 18</b>	La comparaison des différents paramètres du test d'open-field chez les rats traités ou/non par l'extrait éthanolique de <i>Rosmarinus officinalis</i> (EER et/ou l'éthanol. G1 : Témoin ; G2 : 5 mL d'éthanol 20% (90 jours) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (90 jours) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL d'éthanol 20% (90 jours).	<b>57</b>
<b>Fig. 19</b>	Le temps passé dans le compartiment éclairé chez les rats traités ou/non par l'extrait éthanolique de <i>Rosmarinus officinalis</i> (EER et/ou l'éthanol. G1 : Témoin ; G2 : 5 mL d'éthanol 20% (90 jours) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (90 jours) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL d'éthanol 20% (90 jours).	<b>58</b>
<b>Fig. 20</b>	Le temps d'immobilité durant le test de la nage forcée chez les rats traités ou/non par l'extrait éthanolique de <i>Rosmarinus officinalis</i> (EER et/ou l'éthanol. G1 : Témoin ; G2 : 5 mL d'éthanol 20% (90 jours) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (90 jours) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL d'éthanol 20% (90 jours).	<b>59</b>

- Fig. 21** Le temps de séjour dans les Bras fermé durant le test du labyrinthe en croix surélevée chez les rats traités ou/non par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* (EER et/ou l'éthanol. G1 : Témoin ; G2 : 5 mL d'éthanol 20% (90 jours) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (90 jours) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL d'éthanol 20% (90 jours). **60**
- Fig. 22** Test de la piscine de Morris, le temps de latence durant la phase d'apprentissage (4 jours) chez les rats traités ou/non par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* (EER et/ou l'éthanol. G1 : Témoin ; G2 : 5 mL d'éthanol 20% (90 jours) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (90 jours) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL d'éthanol 20% (90 jours). G1 : témoin ; G2 : 34 mg/kg d'AlCl<sub>3</sub> ; G3 : 200 mg/kg d'EEC ; G4 : 200 mg/kg d'EEC et 34 mg/kg d'AlCl<sub>3</sub>. **61**
- Fig. 23** Le temps passé dans le cadrant (NO) durant le probe test chez les rats traités ou/non par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* (EER et/ou l'éthanol. G1 : Témoin ; G2 : 5 mL d'éthanol 20% (90 jours) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (90 jours) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL d'éthanol 20% (90 jours). **62**
- Fig. 24** Le temps de latence durant la plateforme visible chez les rats traités ou/non par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* (EER et/ou l'éthanol. G1 : Témoin ; G2 : 5 mL d'éthanol 20% (90 jours) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (90 jours) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL d'éthanol 20% (90 jours). **62**
- Fig. 25** Les teneurs sériques en malondialdéhyde (nmol/g tissu) chez les rats traités par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* et/ou l'éthanol. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations  $\pm$ SEM (n = 6). G1 : témoin ; G2 : 5 mL éthanol (trois mois) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (trois mois) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL éthanol au même temps (trois mois). **63**
- Fig. 26** Teneurs en superoxyde dismutase (SOD) chez les rats traités par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* et/ou l'éthanol. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations  $\pm$ SEM (n = 6). G1 : témoin ; G2 : 5 mL éthanol (trois mois) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (trois mois) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL éthanol au même temps (trois mois). **64**
- Fig. 27** Teneurs en catalase (CAT) chez les rats traités par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* et/ou l'éthanol. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations  $\pm$ SEM (n = 6). G1 : témoin ; G2 : 5 mL éthanol (trois mois) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (trois mois) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL éthanol au même temps (trois mois). **65**
- Fig. 28** Teneurs en glutathion peroxydase (GSH-Px) chez les rats traités par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* et/ou l'éthanol. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations  $\pm$ SEM (n = 6). G1 : témoin ; G2 : 5 mL éthanol (trois mois) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (trois mois) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL éthanol au même temps (trois mois). **66**
- Fig. 29** Coupes histologiques du cerveau du groupe : a (G1) : témoin ; b (G2) : 5 mL d'éthanol (90 jours) ; c (G3) : 200 mg/kg/j d'EER (90 jours) ; d (G4) : 200 mg/kg/j d'EER et 5 mL d'éthanol au même temps (90 jours). **67**
- Fig. 30** Glycémie (g/L) chez les rats traités ou/non par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* et/ou l'éthanol. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations  $\pm$ SEM (n = 6). G1 : témoin ; G2 : 5 mL éthanol (trois mois) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (trois mois) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL éthanol au même temps (trois mois). **75**

- Fig. 31** Teneur en protéine totale (g/L) chez les rats traités ou/non par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* et/ou l'éthanol. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations  $\pm$ SEM (n = 6). G1 : témoin ; G2 : 5 mL éthanol (90 j); G3 : 200 mg/kg d'EER (90 j) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL éthanol au même temps (90 j). **76**
- Fig. 32** Teneur en albumine (g/L) chez les rats traités ou/non par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* et/ou l'éthanol. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations  $\pm$ SEM (n = 6). G1 : témoin ; G2 : 5 mL éthanol (trois mois) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (trois mois) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL éthanol au même temps (trois mois). **77**
- Fig. 33** Teneur en bilirubine (mg/L) chez les rats traités ou/non par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* et/ou l'éthanol. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations  $\pm$ SEM (n = 6). G1 : témoin ; G2 : 5 mL éthanol (trois mois) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (trois mois) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL éthanol au même temps (trois mois). **78**
- Fig. 34** Teneurs sériques de l'alanine aminotransférase ALAT (UI/L) chez les rats traités par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* et/ou l'éthanol. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations  $\pm$ SEM (n = 6). G1 : témoin ; G2 : 5 mL éthanol (trois mois) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (trois mois) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL éthanol au même temps (trois mois). **79**
- Fig. 35** Teneurs sériques de l'aspartate aminotransférase ASAT (UI/L) chez les rats traités par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* et/ou l'éthanol. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations  $\pm$ SEM (n = 6). G1 : témoin ; G2 : 5 mL éthanol (trois mois) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (trois mois) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL éthanol au même temps (trois mois). **80**
- Fig. 36** Teneurs sériques en gamma glutamyl transférase (UI/L) chez les rats traités par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* et/ou l'éthanol. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations  $\pm$ SEM (n = 6). G1 : témoin ; G2 : 5 mL éthanol (trois mois); G3 : 200 mg/kg d'EER (trois mois) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL éthanol au même temps (trois mois). **81**
- Fig. 37** Teneurs sériques en phosphatase alcaline (UI/L) chez les rats traités par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* et/ou l'éthanol. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations  $\pm$ SEM (n = 6). G1 : témoin ; G2 : 5 mL éthanol (trois mois) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (trois mois) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL éthanol au même temps (trois mois). **82**
- Fig. 38** Concentrations sériques de l'urée (g/L) chez les rats traités par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* et/ou l'éthanol. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations  $\pm$ SEM (n = 6). G1 : témoin ; G2 : 5 mL éthanol (trois mois) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (trois mois) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL éthanol au même temps (trois mois). **83**
- Fig. 39** Concentrations sériques de la créatinine (mg/L) chez les rats traités par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* et/ou l'éthanol. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations  $\pm$ SEM (n = 6). G1 : témoin ; G2 : 5 mL éthanol (trois mois) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (trois mois) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL éthanol au même temps (trois mois). **84**
- Fig. 40** Concentrations sériques de l'acide urique (mg/dL) chez les rats traités par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* et/ou l'éthanol. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations  $\pm$ SEM (n = 6). G1 : témoin ; G2 : 5 mL éthanol (trois mois) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (trois mois) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL éthanol au même temps (trois mois). **85**

mois) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (trois mois) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL éthanol au même temps (trois mois).

- Fig. 41** Cholestérolémie (g/L) chez les rats traités par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* et/ou l'éthanol. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations  $\pm$ SEM (n = 6). G1 : témoin ; G2 : 5 mL éthanol (trois mois) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (trois mois) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL éthanol au même temps (trois mois). **86**
- Fig. 42** Triglycéridémie (g/L) chez les rats traités par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* et/ou l'éthanol. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations  $\pm$ SEM (n = 6). G1 : témoin ; G2 : 5 mL éthanol (trois mois) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (trois mois) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL éthanol au même temps (trois mois). **87**
- Fig. 43** Concentrations sériques de cortisol ( $\mu$ g/dL) chez les rats traités par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* et/ou l'éthanol. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations  $\pm$ SEM (n = 6). G1 : témoin ; G2 : 5 mL éthanol (trois mois) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (trois mois) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL éthanol au même temps (trois mois). **88**
- Fig. 44** Les teneurs sériques en chlore (mmol/L) chez les rats traités par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* et/ou l'éthanol. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations  $\pm$ SEM (n = 6). G1 : témoin ; G2 : 5 mL éthanol (trois mois) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (trois mois) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL éthanol au même temps (trois mois). **89**
- Fig. 45** Les teneurs sériques en potassium (mmol/L) chez les rats traités par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* et/ou l'éthanol. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations  $\pm$ SEM (n = 6). G1 : témoin ; G2 : 5 mL éthanol (trois mois) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (trois mois) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL éthanol au même temps (trois mois). **90**
- Fig. 46** Les teneurs sériques en sodium (mmol/L) chez les rats traités par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* et/ou l'éthanol. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations  $\pm$ SEM (n = 6). G1 : témoin ; G2 : 5 mL éthanol (trois mois) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (trois mois) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL éthanol au même temps (trois mois). **91**
- Fig. 47** Les teneurs sériques en malondialdéhyde (mmol/mg) chez les rats traités par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* et/ou l'éthanol. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations  $\pm$ SEM (n = 6). G1 : témoin ; G2 : 5 mL éthanol (trois mois) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (trois mois) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL éthanol au même temps (trois mois). **92**
- Fig. 48** Teneurs en superoxyde dismutase (SOD) chez les rats traités par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* et/ou l'éthanol. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations  $\pm$ SEM (n = 6). G1 : témoin ; G2 : 5 mL éthanol (trois mois) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (trois mois) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL éthanol au même temps (trois mois). **93**
- Fig. 49** Teneurs en catalase (CAT) chez les rats traités par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* et/ou l'éthanol. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations  $\pm$ SEM (n = 6). G1 : témoin ; G2 : 5 mL éthanol (trois mois) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (trois mois) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL éthanol au même temps (trois mois). **94**

- Fig. 50** Teneurs en glutathion peroxydase (GSH-Px) chez les rats traités par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* et/ou l'éthanol. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations  $\pm$ SEM (n = 6). G1 : témoin ; G2 : 5 mL éthanol (trois mois) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (trois mois) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL éthanol au même temps (trois mois). **94**
- Fig. 51** Teneurs en prostaglandine E2 dans exsudats péritonéaux (pg/mL) chez les rats traités par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* et/ou l'éthanol. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations  $\pm$ SEM (n = 6). G1 : témoin ; G2 : 5 mL éthanol (trois mois) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (trois mois) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL éthanol au même temps (trois mois). **95**
- Fig. 52** Teneurs en TNF- $\alpha$  dans le foie (pg/mL) chez les rats traités par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* et/ou l'éthanol. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations  $\pm$ SEM (n = 6). G1 : témoin ; G2 : 5 mL éthanol (trois mois) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (trois mois) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL éthanol au même temps (trois mois). **96**
- Fig. 53** Coupes histologiques de foie de rat du groupe : A (G1) : témoin ; B (G2) : 5 mL d'éthanol (90 jours) ; C (G3) : 200 mg/kg/j d'EER (90 jours) ; D (G4) : 200 mg/kg/j d'EER et 5 mL d'éthanol au même temps (90 jours). **98**

## **Table des matières**

« Exploration de l'effet prophylactique de l'administration d'un extrait de *Rosmarinus officinalis* chez les rats Wistar exposés à l'éthanol (étude histologique, biochimique et neurocomportementale) »

Remerciements

Résumé

ABSTRACT

Liste des abréviations

Liste des tableaux et figures

Table des matières

### **Partie bibliographique**

	<b>page</b>
Introduction	<b>01</b>
<b><u>Chapitre I : L'alcoolisme et le Romarin</u></b>	<b>04</b>
<b>I.1. Alcool éthylique</b>	<b>04</b>
<b>I. 2. Les classes de l'alcool</b>	<b>04</b>
<b>I. 3. Caractères physico-chimiques de l'alcool</b>	<b>04</b>
<b>I. 4. Définition de l'alcoolémie</b>	<b>06</b>
<b>I. 4.1. Courbes d'alcoolémie</b>	<b>06</b>
<b>I. 5. Utilisation de l'éthanol</b>	<b>06</b>
<b>I. 5.1. Usage industriel</b>	<b>06</b>
<b>I. 5.2. Usage thérapeutique</b>	<b>06</b>
<b>I. 5.3. Boissons alcoolisées</b>	<b>07</b>
<b>I. 6. Pharmacocinétique de l'éthanol</b>	<b>08</b>
<b>I.6.1. Voies d'administration</b>	<b>08</b>
<b>I.6.1.1. La voie digestive</b>	<b>08</b>
<b>I.6.1.2. La voie pulmonaire et la voie cutanée</b>	<b>08</b>
<b>I.6.2. Absorption</b>	<b>09</b>
<b>I.6.3. Distribution et diffusion de l'alcool dans l'organisme</b>	<b>09</b>
<b>I. 6.4. Métabolisme de l'alcool</b>	<b>10</b>

<i>R.F.AOUAD (2022). Effet de Rosmarinus officinalis sur l'alcoolisme. Doctorat LMD en BTE. Univ. Saida</i>	
<b>I. 6.4.1.</b> Voie de l'alcool déshydrogénase	<b>10</b>
<b>I.6.4.2.</b> Voie du MEOS cytochrome P450 dépendant	<b>11</b>
<b>I.6.4.3.</b> Voie de la catalase	<b>11</b>
<b>I.6.5.</b> L'élimination de l'éthanol	<b>12</b>
<b>I.7.</b> Neurobiologie de l'alcoolisme	<b>13</b>
<b>1.7.1.</b> Systèmes impliqués dans l'alcoololo-dépendances	<b>13</b>
<b>1.7.1.1.</b> Système GABAergique	<b>13</b>
<b>1.7.1.2.</b> Système glutamatergique	<b>14</b>
<b>I.8.</b> Conséquences physiopathologiques de l'intoxication alcoolique chronique sur l'organisme	<b>14</b>
<b>I. 8.1.</b> Symptômes et complications physiques	<b>14</b>
<b>I. 8.2.</b> Symptômes cutanéomuqueux	<b>14</b>
<b>I. 8.3.</b> Symptômes endocriniens et métaboliques	<b>14</b>
<b>I. 8.4.</b> Symptômes et complications neurologiques	<b>15</b>
<b>I.8.5.</b> Complications hépatiques	<b>15</b>
<b>I. 8.6.</b> Complications cardio-vasculaires	<b>15</b>
<b>I. 8.7.</b> Complications oncologiques	<b>15</b>
<b>I. 8.7. 1.</b> Carcinome hépatocellulaire ou hépatocarcinome	<b>15</b>
<b>I. 8.8.</b> Complications psychiatriques	<b>15</b>
<b>I. 8.8.1.</b> Anxiété	<b>15</b>
<b>I. 8.8.2.</b> Dépression	<b>16</b>
<b>I. 8.8.3.</b> Suicide	<b>16</b>
<b>II. <i>Rosmarinus officinalis</i></b>	<b>16</b>
<b>II.1.</b> Historique	<b>16</b>
<b>II .2.</b> Présentation de la plante	<b>18</b>
<b>II.3.</b> Distribution géographique	<b>19</b>
<b>II.4.</b> Récolte du Romarin	<b>20</b>
<b>II.5.</b> Description Botanique	<b>20</b>
<b>II.6.</b> Taxonomie Botanique	<b>21</b>
<b>II.7.</b> Composition phytochimique du romarin	<b>22</b>
<b>II.8.</b> Chémotypes de romarin	<b>23</b>
<b>II.8.1.</b> Le romarin officinal à camphre	<b>23</b>
<b>II.8.2.</b> II.8.2. Le romarin officinal à cinéole	<b>23</b>



<b>II.8.3. Le romarin officinal à verbénone</b>	<b>23</b>
<b>II.9. Intérêt de <i>Rosmarinus officinalis</i></b>	<b>24</b>
<b>II.9.1. Intérêt écologique</b>	<b>24</b>
<b>II.9.2. Intérêt médicinal</b>	<b>24</b>
<b>II.9.2.1. Utilisation interne</b>	<b>23</b>
<b>II.9.2.2. Utilisation externe</b>	<b>24</b>
<b>II.10. Usage du romarin</b>	<b>25</b>
<b>II.10.1. Utilisation en phytothérapie</b>	<b>25</b>
<b>II.10.1.1. Par voie externe</b>	<b>25</b>
<b>II.10.1.2. Par voie interne</b>	<b>25</b>
<b>II.10.2. Usage en parfumerie et en cosmétique</b>	<b>24</b>
<b>II.10.3. Utilisation dans les préparations culinaires et alimentaires</b>	<b>26</b>
<b>II.11. Propriétés pharmacologiques et thérapeutiques de <i>Rosmarinus officinalis</i></b>	<b>26</b>
<b>II.11.1. Action anti-inflammatoire</b>	<b>26</b>
<b>II.11.2. Action antidiabétique</b>	<b>26</b>
<b>II.11.3. Activité anti-oxydante</b>	<b>26</b>
<b>II.11.4. Action cholinergique</b>	<b>27</b>
<b>II.11.5. Activité antibactérienne</b>	<b>27</b>
<b>II.11.6. Effet antidépresseur</b>	<b>27</b>
<b>II.12. Toxicologie</b>	<b>28</b>

## **Partie expérimentale**

<b><u>Chapitre II : Matériel et méthodes</u></b>	<b>30</b>
<b>II.1. Matériel végétal</b>	<b>30</b>
<b>II.2. Préparation de l'extrait éthanolique de <i>Rosmarinus officinalis</i></b>	<b>29</b>
<b>II.3. Détermination du rendement</b>	<b>31</b>
<b>II.4. Composition chimique par HPLC/UV</b>	<b>31</b>
<b>II.5. Dosage des Polyphénols totaux</b>	<b>32</b>
<b>II.6. Dosage des flavonoïdes</b>	<b>32</b>
<b>II.7. La peroxydation lipidique</b>	<b>32</b>
<b>II.8. Mesure du pouvoir antioxydant par le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH)</b>	<b>33</b>
<b>II.9. Etude <i>in vivo</i></b>	<b>33</b>
<b>II.9.1. Animaux et conditions d'hébergement</b>	<b>33</b>
<b>II.9.2. Préparation de la solution alcoolique</b>	<b>34</b>

<b>II.9.3.</b> Protocole de traitement des animaux	<b>34</b>
<b>II.9.4.</b> Dosage de l'éthanol dans le sang	<b>34</b>
<b>II.9.5.</b> Etude neurocomportementale	<b>35</b>
<b>II.9.5.1.</b> Test d'open-field	<b>35</b>
<b>II.9.5.2.</b> Test de la boîte claire/obscur (light/dark box)	<b>36</b>
<b>II.9.5.3.</b> Test de la nage forcée =Forced Swimming Test (FST)	<b>37</b>
<b>II.9.5.4.</b> Test du labyrinthe en croix surélevée (Place Maze Test)	<b>37</b>
<b>II.9.5.5.</b> Le labyrinthe aquatique de Morris	<b>38</b>
<b>II.9.6.</b> Sacrifice des rats	<b>39</b>
<b>II.9.7.</b> Les paramètres biochimiques	<b>40</b>
<b>II.9.7.1.</b> Dosage du glucose	<b>40</b>
<b>II.9.7.2.</b> Dosage des protéines totales	<b>40</b>
<b>II.9.7.3.</b> Dosage de l'albumine	<b>41</b>
<b>II.9.7.4.</b> Dosage de la bilirubine totale	<b>41</b>
<b>II.9.7.5.</b> Dosage des transaminases ASAT et ALAT	<b>41</b>
<b>II.9.7.6.</b> Dosage de gamma-glutamyl transférase ( $\gamma$ -GT)	<b>41</b>
<b>II.9.7.7.</b> Dosage des phosphatases alcalines (PAL)	<b>42</b>
<b>II.9.7.8.</b> Dosage de l'urée sérique	<b>42</b>
<b>II.9.7.9.</b> Dosage de la créatinine	<b>42</b>
<b>II.9.7.10.</b> Dosage de l'acide urique	<b>43</b>
<b>II.9.7.11.</b> Dosage du cholestérol total	<b>43</b>
<b>II.9.7.12.</b> Dosage des triglycérides	<b>43</b>
<b>II.9.7.13.</b> Dosage du cortisol	<b>44</b>
<b>II.9.7.14.</b> Dosage des ions	<b>44</b>
<b>II.9.8.</b> Détermination du statut antioxydant	<b>44</b>
<b>II.9.8.1.</b> Dosage du malonaldéhyde (MDA)	<b>44</b>
<b>II.9.8.2.</b> Dosage de l'activité enzymatique de la catalase (CAT ; EC 1.11.1.6)	<b>45</b>
<b>II.9.8.3.</b> Dosage de l'activité enzymatique de la Superoxyde dismutase (SOD ; EC 1.15.1.1)	<b>45</b>
<b>II.9.8.4.</b> Dosage de l'activité de la Glutathion peroxydase	<b>46</b>
<b>II.9.9.</b> Etude histo-pathologique	<b>46</b>
<b>II.9.9.1.</b> Préparation des coupes histologiques	<b>47</b>
<b>II.9.9.2.</b> Déshydratation	<b>47</b>

<i>R.F.AOUAD (2022). Effet de Rosmarinus officinalis sur l'alcoolisme. Doctorat LMD en BTE. Univ. Saida</i>	
<b>II.9.9.3. Imprégnation</b>	<b>47</b>
<b>II.9.9.4. Inclusion</b>	<b>47</b>
<b>II.9.9.5. La microtomie</b>	<b>47</b>
<b>II.9.9.6. Réhydratation</b>	<b>47</b>
<b>II.9.9.7. Coloration</b>	<b>47</b>
<b>II.9.9.8. Montage et Observation microscopique</b>	<b>48</b>
<b>II.10. Analyses statistiques</b>	<b>48</b>
<b><u>Chapitre III : Résultats et discussion</u></b>	<b>49</b>
<b><u>Partie I : Composition chimique et activité antioxydante du romarin</u></b>	<b>49</b>
<b>I.1. Identification de la composition chimique de Rosmarinus officinalis par HPLC/UV</b>	<b>49</b>
<b>I.2. Le rendement</b>	<b>51</b>
<b>I.3. Teneur en polyphénols totaux de l'extrait du romarin</b>	<b>51</b>
<b>I.4. Teneur en flavonoïdes de l'extrait du romarin</b>	<b>51</b>
<b>I.5. L'inhibition de la lipoperoxydation</b>	<b>52</b>
<b>I.6. Piégeage du radical DPPH•</b>	<b>52</b>
<b><u>Partie II : Effet de l'éthanol sur le poids corporel et l'action neuroprotectrice de l'extrait du romarin</u></b>	<b>56</b>
<b>II.1. Effet de l'éthanol sur le poids corporel et le poids du cerveau</b>	<b>56</b>
<b>II.2. Tests neurocomportementaux</b>	<b>57</b>
<b>II.2.1. Open Field</b>	<b>57</b>
<b>II.2.2. Dark and Light Test</b>	<b>58</b>
<b>II.2.3. L'épreuve de la nage forcée (Forced Swimming Test)</b>	<b>58</b>
<b>II.2.4. Le labyrinthe en croix surélevé « Elevated plus maze »</b>	<b>59</b>
<b>II.2.5. Test de la piscine de Morris</b>	<b>60</b>
<b>II.3. Statut antioxydant</b>	<b>63</b>
<b>II.3.1. Taux du malondialdéhyde (MDA)</b>	<b>63</b>
<b>II.3.2. Taux du superoxyde dismutase (SOD)</b>	<b>64</b>
<b>II.3.3. Taux de catalase (CAT)</b>	<b>65</b>
<b>II.3.4. Taux du glutathion peroxydase (GSH-Px)</b>	<b>65</b>
<b>II.4. Histopathologie du cerveau</b>	<b>66</b>
<b><u>Partie III : Effet de l'éthanol sur la fonction métabolique et l'action hépatoprotectrice de l'extrait du romarin</u></b>	<b>74</b>

<b>III.1. Dosage de l'éthanol dans le sang total</b>	<b>74</b>
<b>III.2. Paramètres biochimiques</b>	<b>74</b>
<b>III.2.1. Glycémie</b>	<b>74</b>
<b>III.2.2. Protéines totales</b>	<b>74</b>
<b>III.2.3. Albumine</b>	<b>75</b>
<b>III.2.4. Bilirubine totale</b>	<b>76</b>
<b>III.2.5. L'alanine aminotransférase (ALAT)</b>	<b>77</b>
<b>III.2.6. L'aspartate aminotransférase (ASAT)</b>	<b>78</b>
<b>III.2.7. La gamma glutamyl transférase (<math>\gamma</math>-GT)</b>	<b>79</b>
<b>III.2.8. La phosphatase alcaline (PAL)</b>	<b>80</b>
<b>III.2.9. L'urémie</b>	<b>81</b>
<b>III.2.10. Créatinémie</b>	<b>82</b>
<b>III.2.11. Taux de l'acide urique</b>	<b>83</b>
<b>III.2.12. Cholestérolémie</b>	<b>84</b>
<b>III.2.13. Triglycéridémie</b>	<b>85</b>
<b>III.2.14. Taux de cortisol</b>	<b>86</b>
<b>III.2.15. Taux du chlore</b>	<b>87</b>
<b>III.2.16. Taux du potassium</b>	<b>88</b>
<b>III.2.17. Taux du sodium</b>	<b>89</b>
<b>III.3. Statut antioxydant au niveau du foie</b>	<b>91</b>
<b>III.3.1. Taux du malondialdéhyde (MDA)</b>	<b>91</b>
<b>III.3.2. Taux du superoxyde dismutase (SOD ; EC 1.15.1.1), de catalase (CAT ; EC 1.11.1.6) et de glutathion peroxydase (GSH-Px)</b>	<b>92</b>
<b>III.4. Biomarqueurs de l'inflammation</b>	<b>95</b>
<b>III.4.1. Taux de prostaglandine E2 (PGE2)</b>	<b>95</b>
<b>III.4.2. Détermination du Facteur de Nécrose Tumorale (TNF-<math>\alpha</math>)</b>	<b>96</b>
<b>III.5. Histologique du foie</b>	<b>97</b>
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b>	<b>106</b>
<b>Références bibliographiques</b>	<b>107</b>
<b>Publication</b>	

## **Introduction**

L'alcool est une boisson consommée dans le monde entier (Vasiljevik et al., 2013). Chaque année, l'abus d'alcool est responsable de près de 2,5 millions de décès (Rehm et al., 2013). Dans le corps humain, l'alcool est métabolisé dans le foie.

L'éthanol ou alcool éthylique est le principe actif des boissons alcoolisées obtenus par fermentation ou distillation des végétaux riches en glucides ; est une drogue psychotrope et source de nombreux dommages sur le plan sanitaire relationnelle et sociales, elle constitue un problème majeur de sante mondiale (Maillot et al., 2000).

L'ingestion régulière et excessive à long terme conduit à un état de dépendance caractérisé par une absence d'autocontrôle de consommation et une envie persistante de boire, et qui dépend de l'interaction complexe de facteurs génétiques et environnementaux ainsi qu'épigénétiques (Arvers et al., 2003).

Des preuves pathologiques ont révélé que la consommation excessive d'alcool est l'une des principales causes de la maladie hépatique, pulmonaire, cérébrale et de nombreuses autres maladies (Gao et Bataller, 2011 ; Edenberg et Foroud, 2013). Les atteintes liées à l'alcool deviennent ainsi la deuxième cause de morbidité sur la planète représentant un problème majeur de santé public (Guérin, 2013).

La lésion hépatique chronique induite par l'alcool passe par plusieurs étapes, se développe généralement de la stéatose alcoolique à l'hépatite alcoolique, et finalement se détériore en cirrhose alcoolique (Seth et al., 2008). Le système nerveux centrale SNC constitue aussi l'organe cible de la toxicité alcoolique chronique, cette substance neurotoxique induit des lésions fonctionnelles et structurales sur le tissu cérébral plus grave chez les jeunes que chez les adultes en impliquant des processus complexes (excitotoxicité, inflammation, stress radicalaire, altérations génomiques notamment épigénétiques).

La vulnérabilité du système nerveux aux effets direct et indirect de l'éthanol a été examinée depuis de nombreuses années sous différents angles épidémiologique, toxicologique et clinique ; ces atteintes neurologiques constituent aujourd'hui un enjeu scientifique majeur soulevant des inquiétudes considérables sur la santé humaine dont peu de traitements efficaces ont été développés à ce jour.

Cependant, des travaux récents et diverses autres études expérimentales ont fourni des preuves solides que le stress oxydatif joue un rôle clé dont l'éthanol affectant négativement

R.F.AOUAD (2022). Effet de *Rosmarinus officinalis* sur l'alcoolisme. Doctorat LMD en BTE. Univ. Saida  
différents organes, y compris le foie et le cerveau (Shirpoor et al., 2012; Shirpoor et al., 2015; Tian et al., 2016).

De plus, l'exposition à l'éthanol entraîne une dérégulation du métabolisme des acides gras et de l'accumulation de lipides et provoque le stress oxydatif (Logan-Garbisch et al., 2015). On sait que l'exposition à l'éthanol entraîne le développement d'un stress oxydatif en augmentant la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou en réduisant la défense antioxydante (Bayliak et al., 2016).

Bien que les causes cellulaires et biochimiques précises de la sensibilité induite par l'éthanol aux différentes lésions n'aient pas encore été définies, des preuves considérables indiquent que le stress oxydatif et inflammatoire induit par l'éthanol joue un rôle critique dans la sensibilité de l'éthanol aux dommages lésionnels (Shirpoor et al., 2009), et de nombreux effets indésirables induits par l'éthanol peuvent être prévenu ou atténué par des antioxydants (Shirpoor et al., 2013).

Alors que, les plantes médicinales peuvent potentiellement fournir de nouvelles classes de médicaments pour le soulagement de la douleur (Garg et al., 2012), contenant des substances qui ont la capacité de protéger et/ou de réduire les dommages causés par l'ingestion d'agents tels que l'éthanol sont très utiles (Nânci et al., 2012).

Les composés phénoliques trouvés dans les plantes ont reçu une attention particulière en tant qu'antioxydants naturels (Moon et al., 2009 ; Georgiev et al., 2014). Ces composés sont des antioxydants primaires qui agissent comme des terminaux pour les radicaux libres (Kurek-Gorecka et al., 2014). Dans ce contexte, plusieurs molécules antioxydantes ont été proposées comme protection contre la toxicité oxydante (Chen et al., 2017).

En médecine populaire, les feuilles de *Rosmarinus officinalis*. L appartenant à la famille des lamiacées, connues sous le nom de romarin, sont utilisées comme agent antispasmodique (Al-Sereiti et al., 1999 ; Ahmed et al., 2020) et sa macération dans l'éthanol comme agent topique se prescrit pour réduire les douleurs rhumatismales au Mexique. Certaines études scientifiques ont démontré l'usage ethno-pharmacologique et les activités biologiques de *Rosmarinus officinalis*, comme les antimicrobiens (Nieto et al., 2018 ; Jafari-Sales et al., 2020), anti-tumoraux, anti-mutagènes et anticancer (Fahim et al., 1999 ; Allegra et al., 2020), les antidépresseurs (Machado et al., 2013), antioxydante (Nieto et al., 2018), propriétés hypoglycémiques, hypolipidémiques, hypotensives et anti-athérosclérotiques (Hassani et al., 2016 ; Ali et al., 2020). Des expériences phytochimiques ont révélé que l'huile de cette plante contiennent des terpénoïdes, des flavonoïdes et des alcaloïdes (Ali et al., 2020). En outre, le

R.F.AOUAD (2022). Effet de *Rosmarinus officinalis* sur l'alcoolisme. Doctorat LMD en BTE. Univ. Saida  
*Rosmarinus officinalis* a produit des effets anti-nociceptifs et/ou anti-inflammatoires dans certains modèles expérimentaux de douleur, y compris les tests de contorsions induites par l'acide acétique et de formol chez la souris, ainsi que comme modèle de douleur arthritique chez le rat (Gonzalez-Trujano et al., 2007; Martínez et al., 2009).

Le caractère oxydatif de l'éthanol d'une part, et l'effet protecteur de la thérapie antioxydante, d'autre part, nous ont tenté de concevoir le travail actuel en considérant certains mécanismes moléculaires sous-jacents précis qui peuvent contribuer à ce que l'éthanol exerce ses effets néfastes sur le foie et le cerveau pendant son exposition à l'éthanol.

Par conséquent, l'objectif de ce travail, est cerné sur :

- La détermination de la composition chimique de l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* (EER) et son pouvoir anti-radicalaire ;
- Exploration de l'effet protecteur de l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* contre les dommages hépatiques et cérébraux causés par l'alcoolisme chronique.

## **Chapitre I : L'alcoolisme et le Romarin**

### **I.1. Alcool éthylique**

Le substantif alcool lui-même est issu d'un terme arabe, "al-kohl", qui signifie "antimoine pulvérisé". Les alchimistes reprendront le radical latin "alko" pour tout produit d'une distillation complète, désignant donc une substance solide ou liquide, volatile, odorante, se dissipant facilement dans l'atmosphère (Adelon, 1812). Le Dictionnaire des Sciences Médicales publié en 1812 indique que la découverte de l'extraction d'alcool à partir de boissons fermentées est attribuée à Arnauld de Villeneuve, alchimiste du XIV<sup>ème</sup> siècle. En 1849, un médecin suédois, Magnus Huss, introduit le terme "d'alcoolisme" qui désigne, en langage courant, tout état pathologique lié à une consommation d'éthanol dont la fréquence ou l'intensité est dangereuse pour le sujet. L'ivresse appartient donc désormais au domaine médical et l'alcoolisme apparaît en France en tant que concept en 1866 (Barbier, 1997).

### **I. 2. Les classes de l'alcool**

Tous les alcools possèdent des propriétés communes dues à la présence du groupe hydroxyle. Cet ensemble de propriétés communes définit la fonction alcool. Pour cette raison –OH est appelé aussi groupe fonctionnel alcool. Il est donc intéressant de classer les alcools en (Vogel, 2010):

- Alcools primaires qui contiennent dans leur molécule au moins 2 atomes reliés au carbone fonctionnel (exemple l'éthanol) ;
- Alcools secondaires qui contiennent dans leur molécule 1 atome H relié au carbone fonctionnel (exemple l'alcool isopropylique) ;
- Alcools tertiaires où il n'y a plus, dans leur molécule, d'atome H relié au carbone fonctionnel (exmple : le 2-méthylpropan-2-ol).

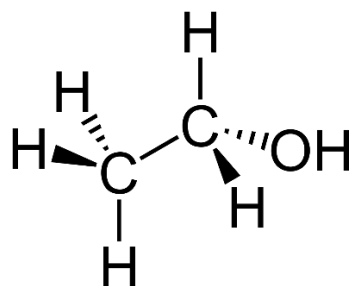
Il existe donc de nombreux composés appartenant à cette famille des alcools. C'est pourtant uniquement l'éthanol qui nous intéressera tout au long de cette étude.

### **I. 3. Caractères physico-chimiques de l'alcool**

Dans les molécules d'un alcool on rencontre toujours le groupe hydroxyle-OH. Ce groupe est relié à un atome de carbone appelé souvent carbone fonctionnel. Ce carbone



fonctionnel est à son tour relié par trois liaisons covalentes simples à 3 autres atomes H ou C (Figure 01).



**Figure 01 :** Structure de l'éthanol (Vogel, 2010)

L'éthanol ou alcool éthylique a été identifié au 19<sup>ème</sup> siècle. Il a pour numéro CAS 64-17-5. C'est un liquide, incolore, très mobile, volatil et inflammable, avec une odeur agréable caractéristique et une saveur brûlante. L'éthanol est un alcool primaire de formule brute  $C_2H_6O$ , dont voici-les principales caractéristiques physico-chimiques selon (Merck, 2016):

**Tableau 01 :** Caractères physico-chimiques de l'éthanol (Merck, 2016).

<b>Formule chimique</b>	$C_2H_5OH$
<b>Masse moléculaire</b>	46.07 g/mol
<b>Point d'ébullition</b>	78.3 °C (1013 hPa)
<b>Densité</b>	0.790 - 0.793 g/cm <sup>3</sup> (20 °C)
<b>Limite d'explosion</b>	3.5 - 15 % (V)
<b>Point d'éclair</b>	12 °C
<b>Température d'inflammation</b>	425 °C
<b>Point de fusion</b>	-114.5 °C
<b>Valeur de Ph</b>	7.0 (10 g/l, H <sub>2</sub> O, 20 °C)
<b>Pression de vapeur</b>	59 hPa (20 °C)
<b>Indice de réfraction</b>	1.36
<b>Solubilité</b>	L'éthanol est miscible à l'eau en toutes proportions

#### **I. 4. Définition de l'alcoolémie**

L'alcoolémie désigne la teneur en alcool du sang. Une fois ingéré, l'alcool diffuse en effet très rapidement dans l'organisme du sujet, passant de son appareil digestif (intestin) à son système circulatoire où il se retrouve véhiculé par le sang. Il existe un rapport direct entre le taux d'alcoolémie et la quantité d'alcool contenue dans l'air expiré : ainsi, une teneur en alcool de 0.25 milligrammes par litre d'air expiré équivaut à un taux d'alcoolémie de 0.5 g/L par exemple. C'est pourquoi l'alcoolémie d'une personne s'évalue :

- Soit par analyse de l'air expiré à l'aide d'un éthylomètre (mesure électronique / aspect quantitatif) ou d'un éthylotest (coloration d'un réactif chimique / aspect qualitatif et semi-quantitatif)
- Soit par dosage sanguin : la prise de sang.

##### **I. 4.1. Courbes d'alcoolémie**

Le maximum de l'alcoolémie est atteint très rapidement (entre 30 et 60 minutes selon l'absorption à lieu à jeun ou au cours d'un repas). Puis, l'alcool est progressivement éliminé pour une large part (plus de 95 %) par sa lente dégradation par le foie (de l'ordre de 0,10 à 0,15 gramme par litre et par heure) et, dans une moindre mesure (moins de 5 %), par les urines, la transpiration et la respiration.

#### **I. 5. Utilisation de l'éthanol**

##### **I. 5.1. Usage industriel**

L'éthanol est utilisé comme solvant dans des domaines variés tels que la parfumerie, la cosmétique, l'industrie pharmaceutique, mais aussi l'industrie des peintures, matières plastiques, ect. C'est aussi une matière première ou un intermédiaire de synthèse de nombreux composés organiques (acide acétique). Le bioéthanol, éthanol produit à partir de végétaux, est utilisé comme combustible pour des chauffages d'appoint. Il entre également dans la composition de carburants. Ainsi le super éthanol E85 commercialisé en France est composé à 85% (bioéthanol) et à 15% d'essence sans plomb (Barbier, 1997).

##### **I. 5.2. Usage thérapeutique**

Un grand nombre d'études observent un risque moins élevé de maladies cardiovasculaires chez des buveurs modérés d'alcool comparés aux non buveurs. Même avec des petites

quantités (1 verre/semaine soit 12-15 g/semaine), l'alcool apparaît être protecteur. Cependant, à de telles doses, il semble peu probable que la cardioprotection induite par l'éthanol passe par une augmentation des HDL et une baisse de l'agrégation plaquettaire (Renaud et de Lorgeril, 1992; Rimm *et al.*, 1999). D'autres mécanismes sont probablement impliqués. Par exemple, de récentes études ont montré que l'alcool pourrait protéger des maladies coronaires à travers un effet anti-inflammatoire (Zairis *et al.*, 2004). En fait, beaucoup de scientifiques considèrent l'athérosclérose coronaire comme le résultat d'une inflammation des parois artérielles (Ross, 1999) et de nombreuses évidences cliniques et expérimentales indiquent que l'éthanol a un effet direct sur l'inflammation (Stewart *et al.*, 2002).

Depuis 1938, l'alcool est reconnu inhiber la fonction leucocytaire (Stewart *et al.*, 2002). En 1963, on a mis en évidence sur des donneurs de sang que la motilité leucocytaire diminuait en présence d'éthanol (Stewart *et al.*, 2002). Dans les années 70, un grand nombre de chercheurs a continué à étudier expérimentalement les effets de l'éthanol sur l'inflammation. Beaucoup d'études ont indiqué un effet inhibiteur de faibles doses d'éthanol sur les médiateurs de l'inflammation, incluant NF- $\kappa$ B et différentes cytokines. D'autres études ont également montré que l'association éthanol/régime riche en graisses insaturées pouvait mener à une augmentation de l'expression des médiateurs pro-inflammatoires (Tessedre *et al.*, 1996). Il a été aussi observé que les radicaux libres et les antioxydants pouvaient modifier les effets de l'éthanol sur ces médiateurs. Cependant, il est important de rappeler que dans la majorité de ces travaux, les investigateurs ont utilisé de fortes doses d'éthanol dans le but d'étudier les effets toxiques de l'éthanol et non les effets protecteurs de doses modérées d'éthanol (Ziegler *et al.*, 1995).

### **I. 5.3. Boissons alcoolisées**

L'éthanol entre dans la composition des boissons alcoolisées. En langage usuel, l'expression « boisson alcoolisée » désigne une boisson contenant de l'éthanol. Seul l'éthanol obtenu par fermentation de matières premières végétales est autorisé dans les boissons alcoolisées (Apfelbaum et Romon, 2009). A l'issue de la fermentation, le degré alcoolique est au maximum de 16°, car au-delà les levures sont détruites sous l'effet biocide de l'éthanol. La distillation est une méthode de séparation par chauffage et condensation de deux liquides, ayant des températures d'ébullition différentes. Il était alors utilisé pour préparer des parfums et des remèdes, puis également des boissons alcoolisées. La valeur énergétique d'un gramme d'éthanol est de 7.1 kilocalories (Gache, 2011). Selon le procédé de fabrication, les boissons

alcoolisées peuvent être classées en deux groupes selon les procédés de fabrication : les boissons fermentées non distillées et les spiritueux (Apfelbaum et Roman, 2009).

Les boissons fermentées non distillées ont pour la plupart un degré d'alcool inférieur à 16° (le vin et la bière).

Les spiritueux ont, d'après la réglementation européenne, un degré alcoolique minimum de 15° et sont obtenus :

- Soit directement par distillation de produits fermentés naturellement,
- Soit par mélange d'une boisson spiritueuse à d'autres boissons.

## **I. 6. Pharmacocinétique de l'éthanol**

La toxicité de l'éthanol pour le foie vient du fait que c'est le principal organe de détoxification de l'alcool de l'organisme.

### **I.6.1. Voies d'administration**

#### **I.6.1.1. La voie digestive**

L'alcool pénètre principalement dans l'organisme par la bouche. Contrairement aux aliments et aux boissons non alcoolisées, l'alcool ne subit aucune attaque des enzymes sécrétées par les glandes digestives ; il rejoindra donc le système sanguin sans aucune modification. Suite à la cavité buccale, la molécule d'éthanol parcourt l'œsophage, qui comporte quelques rétrécissements et une fermeture pour contrôler l'entrée de l'estomac (Goullé, 1999). Celui-ci, parfois, tente de refuser cette entrée. L'alcool peut, dans ce cas, stagner et attaquer la paroi œsophagienne. L'alcool ingurgité se retrouve ensuite dans l'estomac, passe le pyllore et descend dans le duodénum. Après environ une demi-heure (selon que l'on est à jeun ou non, car les aliments retardent le passage de l'alcool de l'estomac dans l'intestin grêle), l'alcool va traverser la paroi duodénale et se faire happer par un flux puissant et très actif : le flux sanguin (Goullé et al., 2015).

#### **I.6.1.2. La voie pulmonaire et la voie cutanée**

Il s'agit de voies mineures de pénétration de l'alcool dans l'organisme. Elles concernent les solvants qui pénètrent par voie respiratoire (évaporation, pulvérisation) et par voie cutanée

(même à travers la peau saine). La voie orale constitue la principale voie d'entrée de l'éthanol dans l'organisme, par ingestion de boissons alcoolisées. L'éthanol peut également être administré par injection localisée pour un usage thérapeutique, la voie parentérale restant expérimentale. La voie cutanée, en dehors de l'antisepsie, est le plus souvent accidentelle et rare, l'absorption transcutanée de l'éthanol étant très faible (moins de 1%). La voie respiratoire, par inhalation de vapeurs d'éthanol, est également accidentelle et peu fréquent (Gache, 2011 ; Goullé et Guerbet, 2015).

### **I.6.2. Absorption**

L'absorption d'éthanol par ingestion entraîne son passage par la cavité buccale, l'œsophage, l'estomac et le petit intestin. A chaque étape de son transit, l'éthanol peut être absorbé et passer dans la circulation sanguine. L'éthanol est une petite molécule absorbée par simple diffusion. Cette diffusion s'effectue au niveau gastrique et la majeure partie (70 % à 80 %) est absorbée au niveau de l'intestin grêle (Lands, 1998). Quand l'alcool est ingéré à jeûne, la concentration maximale plasmatique est atteinte rapidement, environ une demi-heure après l'ingestion. Cependant, l'absorption d'alcool fort (d'une concentration supérieure à 20%) entraîne un spasme pylorique qui retarde la vidange gastrique et donc ralentit l'absorption. L'ingestion de nourriture ralentit la vidange gastrique. En conséquence, l'ingestion de nourriture, en prolongeant le temps de séjour de l'éthanol dans l'estomac, va modifier la cinétique de l'absorption de l'éthanol (Jones et Jonsson, 1994).

### **I.6.3. Distribution et diffusion de l'alcool dans l'organisme**

L'alcool passe dans le sang, arrive au niveau de la veine porte et est emmené vers le foie. Selon la quantité de molécules d'éthanol, le foie va alors traiter une partie et laisser passer les autres qu'il traitera au prochain passage. On appelle cela le coefficient d'épuration hépatique. Environ 90 % de l'alcool seront dégradés par ce biais à raison de 0.1 g d'alcool par Kg de masse corporelle et par heure (Jones et Jonsson, 1994). Du foie, l'alcool non métabolisé passe dans la veine sus-hépatique, passe par le cœur droit, les poumons, le cœur gauche, puis atteint les membres jusqu'au bout des doigts et des orteils, les yeux, le nez, et même le cerveau. La molécule d'alcool a la possibilité de se glisser dans le moindre recoin d'eau ou de graisse (l'alcool est hydrosoluble et liposoluble). Elle va ainsi toucher les mécanismes les plus

déliçats et les plus sensibles de notre corps, comme les fentes synaptiques par exemple, qui sont les carrefours d'échanges d'informations nerveuses. La distribution de l'éthanol est très rapide (demi-vie de distribution de 7 à 8 minutes) aux organes très vascularisés comme le cerveau, les poumons et le foie. Les concentrations dans ces différents organes sont très rapidement équilibrées avec les concentrations sanguines. L'éthanol, petite molécule très diffusible, franchit la barrière placentaire, et les concentrations dans le liquide amniotique et chez le fœtus sont proches des concentrations plasmatiques de la mère (Jones et Jonsson, 1994).

#### **I. 6.4. Métabolisme de l'alcool**

Le foie est particulièrement sensible aux lésions induites par l'alcool, étant le site primaire de son métabolisme, avec plus de 90% de l'oxydation de l'éthanol en acétaldéhyde intervenant dans cet organe; seuls 5% de l'éthanol, non oxydé, sont excrétés dans l'haleine ou dans l'urine (Preedy et al., 1997). Les facteurs pouvant influencer la susceptibilité individuelle à l'alcool comprennent l'âge, le sexe, l'état de nutrition, la coexistence de certaines habitudes (tabagisme) ou pathologies (hépatite chronique virale B ou C) et l'origine ethnique (l'élimination de l'éthanol varierait d'un facteur 2 à 3 selon les populations considérées) (Delzenne et Verbeeck, 2001). L'hépatocyte contient 3 voies permettant le métabolisme de l'alcool (Goullé et Guerbet, 2015):

- La voie de l'alcool deshydrogénase (ADH).
- Le système microsomal (MEOS : microsomal enzyme oxidizing system), représenté vpar l'enzyme P4502E1 (CYP2E1).
- La voie de la catalase.

Toutes trois résultent en une production d'acétaldéhyde, métabolite hautement toxique.

##### **I. 6.4.1. Voie de l'alcool déshydrogénase**

Il s'agit de la principale voie d'oxydation de l'éthanol. Dans un premier temps, l'alcool est transformé en acétaldéhyde par l'enzyme alcool déshydrogénase (ADH). L'ADH est une enzyme cytosolique NAD-dépendante qui joue un rôle prépondérant dans le métabolisme de l'éthanol. Elle appartient à une famille polygénique dans laquelle on peut identifier 7 gènes (ADH1 à ADH7). L'acétaldéhyde est une substance très toxique, qui provoque des dégâts

dans l'ensemble de l'organisme. Il attaque les membranes cellulaires et cause des dommages indirects en inhibant le système des enzymes (Preedy et al., 1997; Jones, 2011).

Dans un deuxième temps, l'acétaldéhyde est métabolisé en acétate (acide acétique) par l'enzyme acétaldéhyde déshydrogénase (ALDH). Ensuite, les acétates sont transformées en acétylcoenzyme A. Cette coenzyme joue un rôle primordial dans le cycle des citrates, des acides gras et dans la synthèse du cholestérol. L'acétaldéhyde est oxydé en acétate par l'ALDH, enzyme NAD-dépendante qui appartient à une superfamille comprenant 16 gènes chez l'homme. Deux isoenzymes, l'ALDH1 et l'ALDH2, sont impliquées dans le métabolisme de l'alcool (Agarwal, 2001) : l'ALDH1, cytosolique, possède des variants responsables de différences de sensibilité individuelle à l'éthanol. L'ALDH2, mitochondriale, a une affinité pour l'acétaldéhyde beaucoup plus forte que l'ALDH1 et est responsable de la majeure partie de l'oxydation de l'acétaldéhyde en acétate. La consommation excessive d'alcool diminue l'activité de l'ALDH chez l'homme (Kang et al., 2009). En cas de consommation excessive d'alcool, une voie supplémentaire de dégradation est activée grâce au système microsomial d'oxydation de l'éthanol (MEOS).

#### **I.6.4.2. Voie du MEOS cytochrome P450 dépendant**

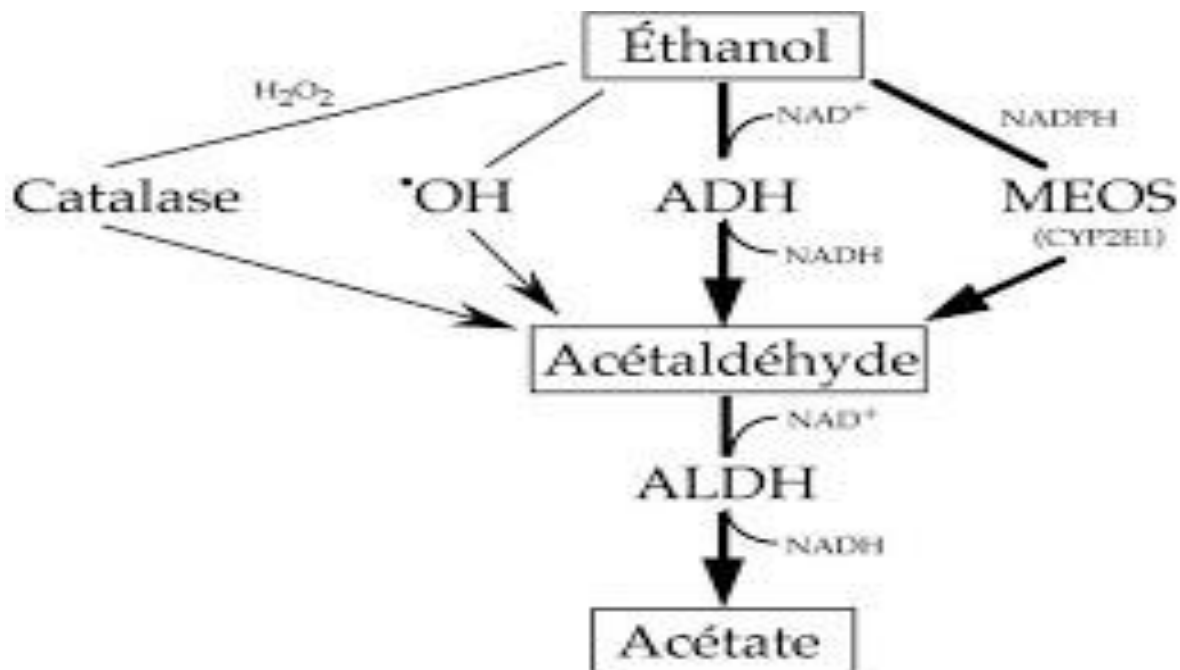
En présence de dioxygène, le système d'oxydation microsomial de l'éthanol (MEOS) oxyde l'éthanol en acétaldéhyde sous l'action catalytique du cytochrome P450, avec pour coenzyme le NADPH. Les cytochromes P450 intervenant dans cette voie sont les formes 1A2, 3A4 et 2E1, cette dernière étant prépondérante. Elles sont localisées dans le réticulum endoplasmique (microsomes) des hépatocytes (Jones, 2011 ; Agarwal, 2001).

#### **I.6.4.3. Voie de la catalase**

L'éthanol est oxydé en acétaldéhyde par la catalase en présence de peroxyde d'hydrogène. La catalase est une hémoprotéine localisée dans les peroxysomes de la plupart des tissus. La voie de la catalase est la plus nocive, elle est activée lors d'intoxications alcooliques prolongées (Thurman et Handler, 1989). Le métabolisme de l'alcool est l'un des déterminants biologiques qui peut significativement avoir une influence sur le comportement d'alcoolisation, sur le développement de l'alcoolisme et sur les dommages de l'alcool au niveau des organes (Larrey, 2001).

L'éthanol est en majeure partie éliminé grâce à son oxydation en acétaldéhyde puis en acétate, ces réactions étant catalysées principalement par l'alcool déshydrogénase (ADH) et

l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH). D'autres voies d'oxydation de l'éthanol, telles que la catalase et le système microsomal d'oxydation de l'éthanol (MEOS/CYP2E1), de même que la voie non oxydative qui produit des esters éthyliques d'acide gras, semblent jouer un rôle mineur. La plupart des enzymes du métabolisme de l'alcool présentent un polymorphisme génétique et une variation ethnique (Fig. 02) (Preedy *et al.*, 1997 ; Agarwal, 2001).



**Figure 02 :** Métabolisme de l'alcool éthylique (Preedy *et al.*, 1997)

### I.6.5. L'élimination de l'éthanol

Environ 95 % de l'éthanol sont métabolisés au niveau hépatique. Les 5 à 10 % restants sont éliminés tels quels par différentes voies. Une partie de l'alcool est éliminée par les poumons. A ce niveau, l'oxygène de l'air passe dans le sang tandis que le dioxyde de carbone et l'alcool sont expirés dans l'air, d'où la présence de l'alcool dans l'haleine d'une personne qui a bu des boissons alcooliques (Jones, 2011).

Les reins (urine) et la peau (transpiration par les glandes sudoripares) constituent deux autres voies d'élimination des molécules d'alcool (Preedy *et al.*, 1997).

L'éthanol est éliminé sous sa forme native par l'air expiré, les urines et la sueur, la contribution de ces différentes voies étant variable suivant les concentrations plasmatiques. L'estimation de l'éthanolémie à partir des concentrations dans l'air expiré repose ainsi sur l'élimination pulmonaire (Jones, 2011). La clairance pulmonaire est estimée à 0.16 L/h/70 kg. La clairance rénale est estimée 0.06 L/h/70 kg, et la clairance cutanée à 0.02 L/h/70 kg.



L'éthanol est présent dans le lait maternel à des concentrations environ 10 % plus élevées que les concentrations plasmatiques, en raison de la teneur en eau supérieure du lait. Environ 3 % à 5 % de la quantité totale d'éthanol absorbée serait éliminée sous forme inchangée par le rein (Preedy *et al.*, 1997).

## **1.7. Neurobiologie de l'alcoolisme**

L'alcool, comme certains anesthésiques, exerce un effet bi-phasique. A faible dose, il est euphorisant, voire stimulant des facultés intellectuelles, alors qu'au-delà d'un certain seuil, variable d'un individu à un autre, il produit un effet dépressif (Lediget Mandel, 1988). Le cerveau du patient addict ne fonctionne pas selon la norme. Une altération des mécanismes cérébraux explique la difficulté des personnes concernées à contrôler leur comportement de consommation.

### **1.7.1. Systèmes impliqués dans l'alcool-dépendances**

#### **1.7.1.1. Système GABAergique**

Dans le système nerveux central des mammifères, l'acide gamma-amino-butyrique (GABA) est le principal neurotransmetteur inhibiteur (Barnard *et al.*, 1998 ; Obata, 2013). Les neurones produisant et sécrétant le GABA sont principalement des inter-neurones. Le GABA peut se lier à deux types de récepteurs GABAergiques, des récepteurs ionotropiques perméables aux ions chlorures (GABA<sub>A</sub> et GABA<sub>C</sub>) et des récepteurs métabotropiques couplés à une protéine G (GABA<sub>B</sub>) (Chebib and Johnston, 1999). De nombreux composés peuvent se lier à ces récepteurs et ainsi moduler leur activité. Plus particulièrement, le récepteur GABA<sub>A</sub> (GABA<sub>AR</sub>) peut lier les benzodiazépines, les stéroïdes, les barbituriques ou encore l'éthanol sur des sites spécifiques (Ming *et al.*, 2006). Le GABA qui s'échappe de la fente synaptique peut également activer les récepteurs pré-synaptiques. Des études ont montré que l'éthanol pouvait agir sur la transmission GABAergique à la fois au niveau post- et pré-synaptique. De faibles concentrations en GABA au niveau extracellulaire provoquent une activation des GABA<sub>AR</sub> extra-synaptiques responsables de l'inhibition tonique (Farrant et Nusser, 2005). L'exposition chronique à l'éthanol induit des modifications de répartition de certaines sous-unités des GABA<sub>AR</sub> extra synaptiques et synaptiques qui seraient impliquées dans le développement de la tolérance à l'éthanol (Liang *et al.*, 2006).

### **1.7.1.2. Système glutamatergique**

Le glutamate est le neurotransmetteur excitateur le plus abondant dans le système nerveux central des mammifères. Comme le GABA, il peut se lier à des récepteurs ionotropiques (iGluR : AMPA et NMDA) et métabotropiques (mGluR) (Green et Nayeem, 2014 ; Yin et Niswender, 2014). L'inhibition des NMDARs par l'éthanol se traduit par une augmentation du nombre de récepteurs, et c'est cette adaptation qui serait alors responsable des symptômes de sevrage observés lors de l'arrêt d'une consommation chronique d'éthanol, symptômes liés à une augmentation de la transmission glutamatergique et donc à une hyperexcitabilité (Ferraguti et Shigemoto, 2006 ; Olive, 2009 ; Pomierny-Chamiolo *et al.*, 2014).

## **I.8. Conséquences physiopathologiques de l'intoxication alcoolique chronique sur l'organisme**

### **I. 8.1. Symptômes et complications physiques**

L'intoxication alcoolique chronique résulte d'une consommation excessive et prolongée, et les symptômes permettant de la détecter précocement sont peu spécifiques. Cependant d'innombrables signes apparaissent secondairement aux nombreuses complications de l'éthylisme chronique, très souvent irréversibles par toxicité lésionnelle, et touchant les différents systèmes. Dans un premier temps les patients présentent certains signes généraux : dysthymie, hypersudation malodorante, agitation, polyurie avec polydipsie, anorexie, troubles du sommeil, troubles de concentration et de l'attention, troubles de la mémoire (surtout la mémoire à court terme) (Rueff, 1996c). D'autres symptômes sont plus spécifiques, voyons lesquels :

### **I. 8.2. Symptômes cutané-muqueux**

Dans le cadre d'une cirrhose éthylique on peut retrouver des angiomes stellaires au niveau du thorax, une dépilation des creux axillaires et une circulation collatérale abdominale, ainsi que des leuconychies. Par ailleurs un prurit pourra être observé jusqu'à 2 ans avant l'apparition d'une cirrhose par accumulation de bilirubine dans les tissus, parfois avec ictère associé (Kiritzé-Topor *et al.*, 2001).

### **I. 8.3. Symptômes endocriniens et métaboliques**

On retrouve régulièrement des épisodes d'hypoglycémie chez les éthyliques chroniques : en effet après un jeûne suffisamment prolongé, la glycémie dépend en majeure partie de la

néoglucogénèse hépatique (synthèse de glucose à partir des molécules non glucidiques comme l'acide pyruvique, l'acide lactique ou le glycérol), or l'alcool inhibe cette néoglucogénèse ce qui aboutit à une réduction rapide de la glycémie et à une augmentation du taux plasmatique de corps cétoniques (Rueff, 1996c ; Kiritzé-Topor *et al.*, 2001).

#### **I. 8.4. Symptômes et complications neurologiques**

Une démarche maladroite avec ou sans élargissement du polygone de sustentation peut être le signe d'une forme modérée de dépendance physique vis-à-vis de l'alcool ou de neuropathie des membres inférieurs ou de syndrome cérébelleux (INSERM, 2001c). Certains patients présentent également un steppage. Des tremblements fins, réguliers, non intentionnels et permanents sont observés au niveau des extrémités. On les retrouve au niveau de la langue et de la bouche lors de l'ouverture modérée de celle-ci mais ces signes restent mineurs en comparaison avec les nombreuses complications neurologiques irréversibles (Brust, 2007).

#### **I.8.5. Complications hépatiques**

Les maladies hépatiques provoquées par une consommation excessive d'alcool comportent des atteintes de trois types : la stéatose, hépatite et la cirrhose alcoolique (Nodmann, 1983).

#### **I. 8.6. Complications cardio-vasculaires**

Les complications cardio-vasculaires sont dose-dépendantes, ainsi le risque de mortalité générale augmente à partir de 40 à 50 g par jour (INSERM, 2001b).

#### **I. 8.7. Complications oncologiques**

##### **I. 8.7.1. Carcinome hépatocellulaire ou hépatocarcinome**

Le carcinome hépatocellulaire se développe sur un foie cirrhotique (d'origine alcoolique mais aussi et surtout virale notamment VHC). Il peut être silencieux, ce qui nécessite une surveillance étroite des patients cirrhotiques (Marteau *et al.*, 2001b ; Nalpas, 2003a).

#### **I. 8.8. Complications psychiatriques**

##### **I. 8.8.1. Anxiété**

L'association alcoolisme/dépendance/anxiété est très fréquente et complexe. Dans la majorité des cas l'alcool pourra majorer des troubles anxieux préexistants, on parlera alors d'anxiété secondaire, puisque induite par la substance. A l'inverse, l'alcool pourra être utilisé à visée anxiolytique en « automédication » chez certains patients en cas d'anxiété primaire.

Cependant, l'alcool aura alors un effet paradoxal et renforcera le sentiment de culpabilité, de dévalorisation, et d'incapacité à affronter la situation phobogène (Levy-Soussan, 2000).

L'alcool a un rôle biphasique sur l'anxiété :

- Lors d'une consommation aigue : l'alcool se fixe sur les récepteurs GABA et induit une inhibition des circuits neuronaux de l'anxiété.
- Lors d'une consommation chronique : l'alcool diminue le nombre de récepteurs GABA et diminue la sensibilité des canaux chloriques ce qui induit une hyperexcitabilité neuronale (Farrant et Nusser, 2005).

### **I. 8.8.2. Dépression**

L'alcool dépendance induit plus de dépression que la dépression n'induit l'alcool dépendance, on parle donc de dépression secondaire (95% des cas). La survenue d'un syndrome dépressif chez l'alcoolique majore la gravité du pronostic et favorise le risque de passage à l'acte suicidaire (Craplet, 2003). L'intrication des deux troubles, alcoolisme et dépression, incite à proposer une prise en charge simultanée mais le premier temps du traitement consiste à proposer un sevrage alcoolique durant 2 semaines au minimum, après lesquelles un traitement antidépresseur sera introduit en cas de persistance des symptômes dépressifs. La persistance des troubles après le sevrage représente uniquement 10 à 15 % des cas (Lejoyeux et al., 1999).

### **I. 10.1.7.3. Suicide**

La mortalité par suicide chez les patients alcooliques est de 6 à 29%, tandis que la dépendance alcoolique chez les patients suicidant est de 20 à 60%. Ces chiffres reflètent deux problématiques : le patient alcoolique présente un potentiel suicidaire important, et les tentatives de suicide sont souvent accompagnées d'une consommation d'alcool (Craplet, 2003).

## ***II. Rosmarinus officinalis***

### **II.1. Historique**

Le Romarin est un arbrisseau qui doit son nom au latin ros, rosée et marinus, marin. En effet, d'après la légende, le Romarin est une plante que l'on retrouvera seulement dans les régions où s'étend la rosée venant de la mer, au petit jour. Dans d'autres régions, on le surnomme "la Rose de mer" en latin Rosa marina qui a

R.F.AOUAD (2022). Effet de *Rosmarinus officinalis* sur l'alcoolisme. Doctorat LMD en BTE. Univ. Saida  
donné son nom au genre (Escuder O. 2007).

Le Romarin était utilisé par les Egyptiens en fumigation comme encens lors des cérémonies religieuses et pour l'embaumement. Il était également utilisé pour un usage médical en décoction pour des lavements contre la diarrhée (Schneider A. 2002).

Dans les cérémonies Grecques et romaines (Labescat J. 2013, Gigon F. 2014) Les Romains connaissaient bien le Romarin, surtout pour ses pouvoirs merveilleux. Considéré comme une plante sacrée, il était censé assurer aux morts un séjour paisible dans l'au-delà, chasser les mauvais esprits et porter bonheur aux vivants. Le Romarin était un symbole d'amour inconditionnel, de prospérité, de fidélité et d'immortalité.

Le Romarin ornait les tables des banquets, le bouquet des mariées et était tressé dans les couronnes funéraires et dans celles des mariées afin de rendre l'esprit vif (Clot Havond . 2014). Les Grecs l'appelaient "dendrolivanon" qui équivaut à « arbre à encens » (Tessier A. 2003).

Dans les légendes chrétiennes Les chrétiens soutinrent que la Vierge Marie se reposa au pied d'un buisson de Romarin, étendit dessus les langes de Jésus-Christ pour les sécher, lors de sa fuite d'Egypte, et que depuis, ses fleurs apparaissent à Pâques et sont bleu-pâle et non blanches ( Labescat J.2013).

Depuis l'Antiquité, le Romarin est utilisé pour stimuler et améliorer la mémoire. Encore à l'heure actuelle, les étudiants grecs le boivent en tisane (Schneider A. 2002) ou en font brûler comme encens dans leur chambre en période de révision et d'examens. Le Romarin est reconnu pour ses propriétés tonique, revigorante, stimulante qui se reflètent dans sa saveur aromatique très particulière ainsi que dans son odeur (Larousse des plantes médicinales. 2013).

Au Moyen Age le Romarin est inclus dans de nombreux traités de botanique médicale. il avait sa place dans tous les carrés d'herbes médicinales et aromatiques des abbayes.

Le Romarin était brûlé pour désinfecter l'atmosphère et mis dans des petits sacs portés autour du cou pour se protéger Pendant les grandes épidémies, (Fournier P-V. 2010 , Gigon F.2014) .

Au XIIème siècle, le processus de distillation des plantes aromatiques, telles que le Romarin, a été rapporté de la culture arabe et les huiles essentielles obtenus ont été utilisé à but antiseptique et anti-infectieuse, notamment pour lutter contre la jaunisse (Labescat J. 2013)

Le Romarin était utilisé par les romanichels, les Tziganes du sud pendant les rituels pour

exorciser les mauvais sorts, les malheurs et les piqûres de serpent. En effet, ils croyaient que des bonnes fées protectrices étaient abritées dans les branches de Romarin (Schneider A. 2002). Le Romarin était placé dans les bibliothèques et les armoires à linge pour éloigner les insectes. Les cuisiniers s'en servaient pour conserver et parfumer les mets. Les médecins le conseillaient pour le traitement de divers maux : troubles du foie, rhumatismes, migraines, palpitations, nervosité, hémorroïdes, épilepsie, vertiges et oppression. Il était utilisé en lotions capillaires afin d'entretenir la chevelure et de traiter la calvitie ; pour préserver la santé et la jeunesse de la peau. C'était un symbole de renaissance pour beaucoup (Tessier A. 2003).

A l'Epoque moderne (Fournier, 2010) des expériences furent conduites sur les effets de l'essence de Romarin sur le système nerveux au XIXème siècle par Lesieur ; sur ceux de l'infusion sur le foie par Rousselle et Paturier en 1929.

Le romarin, chargé de symbole chez les Anciens qui en faisait des couronnes, a servi à l'élaboration de plusieurs remèdes célèbres dont un remède longtemps réputé, « l'Eau de la reine de Hongrie » qui en fait est un alcoolat : à l'aide de ce remède, la souveraine, âgée de 72 ans, guérit des rhumatismes (Botineau, 2010). Les médecins arabes utilisaient beaucoup le romarin et ce sont eux qui réussirent les premiers à en extraire l'huile essentielle (Fuinel, 2003).

Le vinaigre des quatre voleurs : inspiré des médecins qui au XVIIème siècle, lors de l'épidémie de peste portaient des masques remplis de feuilles de Romarin, d'Ail, de Lavande, de Sauge, d'Absinthe, de Coriandre et de Sarriette. Ce masque était censé filtrer l'air afin de le rendre respirable. C'est ainsi que les quatre voleurs firent une macération dans du vin aigre de ces mêmes plantes médicinales. Ils en appliquaient sur leurs mains et leur visage, cela les protégeait de la peste leur permettant d'approcher des cadavres sans être contaminés (Labescat J. 2013).

## **II .2. Présentation de la plante**

Le *Rosmarinus officinalis* (romarin) est un arbuste aromatique appartient à la famille des lamiacées (labiées) qui est connus depuis l'oligocène. C'est l'une des familles les plus répandues dans le bassin méditerranéen et spécialement en Algérie. Elle comprend plus de 3300 espèces et environ 200 genres (Bruneton, 1993). Il possède de nombreuses vertus phytothérapeutiques et est aussi une herbe condimentaire, ainsi qu'un produit utilisé en parfumerie (fig. 03) (Akroum, 2006).

*Rosmarinus officinalis* est l'une des plantes aromatiques les plus utilisées dans la médecine traditionnelle et les produits pharmaceutiques en Algérie en général. Elle est très



appréciée pour ses propriétés aromatiques, antioxydantes, antimicrobiennes, antispasmodiques, hépatoprotectrices, emménagogues et anti-tumorales (Athamena, 2009). Les feuilles fraîches et séchées du romarin ont été utilisées depuis longtemps pour leur arôme caractéristique dans les préparations culinaires ou sous forme d'une tisane, tandis que les extraits du romarin servent couramment d'un antioxydant naturel pour augmenter la durée de conservation des aliments périssables (Habtemariam, 2016).

Le nom latin Rosmarinus est interprété, comme dérivé "ros" de la rosée et "marinus" d'appartenir à la mer, bien qu'elle se développe loin de la mer (Heinrich et al., 2006).

Nom commun : Romarin (en Français), Rosemary (en Anglais), noms arabe : Iklil El-jabal, Klil, noms en Algérie : Eklil, Helhal, Yazir.



**Figure 03 :** *Rosmarinus officinalis* (Anton et al., 2005).

### II.3. Distribution géographique

Le romarin se trouve dans toutes les contrées mondiales de l'Europe, plus particulièrement sur le pourtour méditerranéen, le romarin spontané qui pousse sur le bassin méditerranéen, est souvent cultivé dans les jardins comme clôture, très exigeant en lumières et en chaleur, et résistant à la sécheresse. Le romarin est une plante des coteaux arides, garrigues et lieux rocheux de la région méditerranéenne et même un peu plus au sud jusqu'aux confins sahariens (Boullard, 2001). À l'état sauvage il se trouve sur des sols calcaires (Escuder, 2007).

## **II.4. Récolte du Romarin**

De manière générale, la récolte d'une plante est réalisée quand les principes actifs sont à leur maximum, afin de pouvoir compter sur des effets utiles et constants. Les feuilles et tiges herbacées sont récoltées lorsque la fleur commence à se développer, 12 à 18 mois après plantation (Reclu, 2004). Les feuilles se récoltent toute l'année mais sont plus parfumées au printemps. Il faut donc les cueillir à cette période. La récolte se fait par temps chaud et sec soit deux ou trois heures après le lever du soleil quand la rosée s'est dissipée (Reclu, 2004 ; Gilly, 2005 ; Harding, 2011).

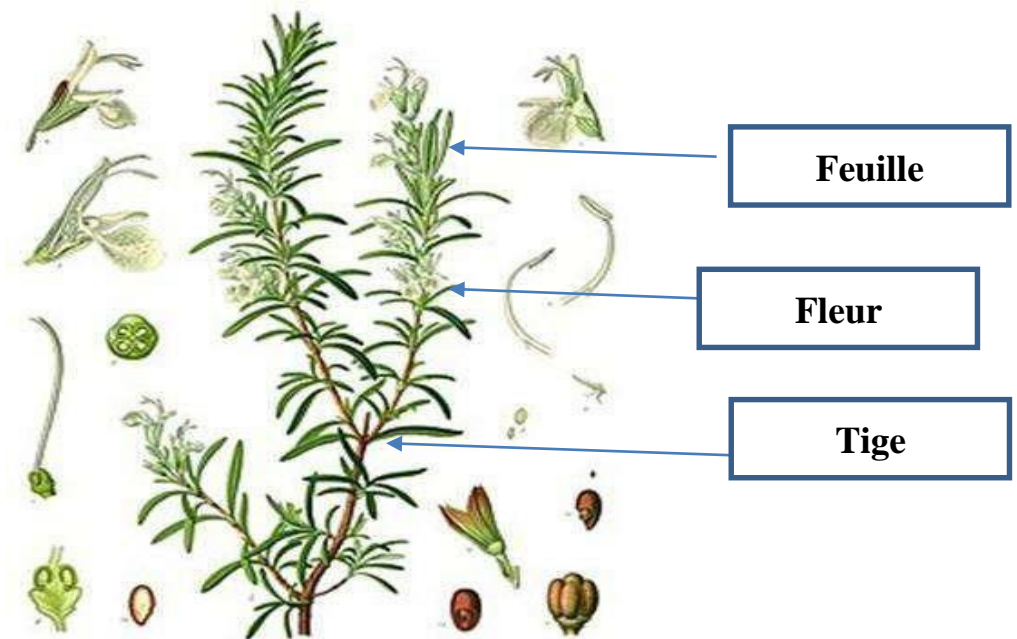
Quant aux fleurs et sommités fleuries (partie supérieure du végétal), elles sont récoltées au même moment de la journée que les feuilles quand les fleurs commencent à s'épanouir. L'odeur résidant principalement dans le calice, celui-ci doit être pris délicatement et séché. La récolte des sommités fleuries a lieu au mois de juillet (Reclu, 2004). Séchée est passée au crible afin de n'obtenir plus que des feuilles et des fleurs (Gilly, 2005). Afin de ne pas abîmer les plantes sauvages, les récoltes seront modestes (Scherf, 2012). Pour le séchage des feuilles et tiges herbacées : étalées sur des châssis de toile à larges mailles ou sur de la paille bien séchées, et sécher dans une pièce exposée aux rayons du soleil. Il faut les brasser régulièrement afin que l'air pénètre uniformément. A conserver dans une pièce non humide (Reclu, 2004). Les feuilles séchées sont ensuite séparées des tiges (Scherf, 2012). Fleurs et sommités fleuries : espacées sur des claies garnies de papier, remuées de temps en temps, dans une pièce ensoleillée ou à l'étuve (Reclu, 2004). Une fois sec, conserver le romarin dans des bocaux ou boîtes garnis de papier et bouchés enveloppés dans du papier et gardées au sec. Conservation : environ un an (Reclu, 2004).

## **II.5. Description Botanique**

Plante très connue, commune à l'état sauvage. Le romarin est un arbrisseau de la famille des labiées (Zeghad, 2009), de 50 cm à 1 mètre et plus, toujours vert, très aromatique, très rameux, très feuillé (Makhlofi, 2014). Les feuilles sont coriaces, persistantes, linéaires, entières, enroulées sur les bords, vertes et ponctuées dessus, blanches tomenteuses à la face inférieure (Rameau et Durné, 2008). Son écorce s'écaille sur les branches les plus âgées et son odeur est extrêmement odorante (Makhlofi, 2014). La floraison commence dès les mois de janvier/ février et se poursuit jusqu'en avril – mai (Zeghad, 2009). Les fleurs sont réunies au



sommet des rameaux, bleues pâles à blanchâtre, pratiquement sessiles, disposées en petites grappes axillaires et terminales, bractées tomenteuses lancéolées (Rameau,et Durné, 2008) . Le calice velu à dents bordées de blanc, elles portent deux étamines ayant une petite dent vers leur base comme pour la plupart des Lamiacées (Zeghad, 2009). Le fruit, ovoïde, est entouré par un calice persistant, sec est constitué de quatre akènes (tétrakène). Il attire les insectes (entomophiles) pour assurer la pollinisation (entomogame) (fig. 04) (Eloutasi, 2004).



**Figure 04 :** Les différentes parties de la plante du *Rosmarinus officinalis* (Planzen et al.,1829).

## II.6. Taxonomie Botanique

**Embranchement :** Spermaphytes

**Sous-embranchement :** Angiospermes

**Classe :** Dicotylédones

**Sous-classe :** Gamopétales

**Ordre :** Tubi florales

**Sous-ordre :** Lamiales

**Famille :** lamiacées

**Genre :** *Rosmarinus*

**Espèce :** *Rosmarinus officinalis* (Hoefler, 1994) reclassée, en 2017, dans le genre *Salvia* et reconnue sous le nom de « *Salvia rosmarinus* » (de Macedo et al., 2020).

**Saveur, arôme et valeur nutritive**

Le romarin possède une odeur légèrement camphrée et une saveur piquante et parfumé assez prononcée, il contient plusieurs éléments nutritifs (USDA, 2011).

## II.7. Composition phytochimique du romarin

*Rosmarinus officinalis* contient de 1 à 2% d'huile essentielle. Celle-ci renferme du l' $\alpha$ -pinène (7 à 80%), de la verbénone (1 à 37%), du camphre (1 à 38%), de l'eucalyptol (1 à 35%), du bornéol (4 à 19%), de l'acétate de bornyle (jusqu'à 10%) et du camphène (Bellakhdar, 1997). En plus de l'huile essentielle on trouve dans le Romarin: des flavonoïdes, des tannins, des diterpènes tricyclique, des triterpènes, et des acides phénols, dont l'acide rosmarinique (Debuigne et Couplan, 2009) et de la résine (Beloued, 1998).

Dans la feuille, les composés chimiques retrouvés sont, par famille :

**-Les composés phénoliques :**

- **Les hydroxy-dihydro caféique - flavonoïdes :** hétérosides du lutéolol, du diosmétol, et flavones méthoxylées: ils protègent les végétaux des rayonnements ultra-violets. Les différents flavonoïdes présentent tout un éventail de propriétés : modulateurs enzymatiques, anti-inflammatoires, antispasmodiques, hépatoprotecteurs, hypotenseurs, antimicrobiens, ou encore antioxydants lutéoline, quercétine, genkwanine, cirsimaritrine ériocitrine, hespéridine, diosmine, lutéoline, apigénine (Andrade et al., 2018).

**Les acides phénoliques ou dérivés caféiques :** acides caféique, Acide vanillique, acide caféique, acide p-coumarique . Acide rosmarinique, Rosmaricine [chlorogénique et rosmarinique. Ils sont retrouvés le plus souvent dans les tissus épidermiques des plantes et jouent un rôle de défense. Les phénols sont souvent de très bons antimicrobiens, fréquemment présents dans les huiles essentielles. Ils sont également capables de piéger les radicaux libres et sont donc excellents antioxydants (Andrade et al., 2018).

- **L'acide rosmarinique:** est un polyphénol, dérivé de l'acide hydroxycinnamique, un des principaux composés actifs du romarin. Cette molécule a été étudiée notamment pour ses effets antioxydants, antibactériens, anti-inflammatoires et antiviraux (Mandja-

### **-Les terpènes :**

- Diterpènes tricycliques : acide carnosique et carnosol principalement
- Triterpènes : acides ursolique et oléanique, et amyrine
- **Huile essentielle** 1,8 cinéole, alpha-pinène camphre de romarin camphène (Andrade et al., 2018).

## **II.8. Chémotypes de romarin**

Un chémotype, ou encore race chimique, désigne une entité chimique distincte au sein d'une même espèce. Certaines espèces de plantes, des champignons ou des microorganismes, présentent des variations chimiques de leur métabolite secondaire en fonction des influences de leurs écosystèmes (altitude, humidité, ensoleillement, etc.) (Nait Achour, 2012). Le chémotype d'un extrait est une référence précise qui indique le composant biochimique majoritaire ou distinctif présent dans l'extrait. Cette classification capitale permet de sélectionner les extraits. pour une utilisation plus précise, plus sûre et plus efficace. Le chémotype permettent de différencier les propriétés thérapeutiques de plusieurs cultivars ou variétés au nom identique comme dans le cas du romarin et qui se caractérisent par les mêmes formes de feuilles, de tiges, de fleurs, de couleur, et d'odeur (Bousbia, 2011).

### **II.8.1. Le romarin officinal à camphre**

Il est présent en Espagne et en Algérie, il est moins fortement antiseptique mais agissant d'avantage sur le système neuromusculaire. Le camphre se trouve relié au bornéol (Zerman, 2010).

### **II.8.2. Le romarin officinal à cinéole**

Il se trouve en Algérie, en Tunisie, au Maroc et en Italie. La biosynthèse dans ce type se dirige essentiellement vers la formation du 1,8- cinéole (Martini, 2011). Son action est prépondérante sur l'axe pulmonaire (Roux, 2008).

### **II.8.3. Le romarin officinal à verbénone**

Il est présent en Espagne, au Portugal et dans le sud-ouest ibérique. Il est particulièrement efficace pour les problèmes digestifs, neurotoxiques et abortifs à fortes doses. Le verbénone est relié au  $\alpha$ - pinène (Zerman, 2010).

## **II.9. Intérêt de *Rosmarinus officinalis***

### **II.9.1. Intérêt écologique**

Le romarin peut être retrouvé à l'état sauvage, comme peut être cultivé. C'est la plante la plus populaire dans le bassin méditerranéen (Emberger, 1960) ; en Algérie, nous la trouvons dans les jardins, les parcs en bordure odorante des sociétés, des écoles... Les fleurs s'épanouissent tout au long de l'année ce qui attire de nombreux insectes.

### **II.9.2. Intérêt médicinal**

Le romarin est une plante méditerranéenne ayant des qualités et propriétés stimulantes, antiseptiques et insecticides (Sedjelmassi, 1993). Le romarin a des usages multiples et est cultivé à des fins commerciales. Si l'on souffre d'hypotension, de dépression, de fatigue chronique, il est conseillé de mâcher des feuilles de romarin. Il est efficace aussi en cas de faibles de la mémoire. En règle générale, il doit néanmoins être utilisé avec précaution, car en cas surdosage il peut provoquer un empoisonnement (Kunkele et Lobmeyer, 2007).

#### **II.9.2.1. Utilisation interne**

Favorise la digestion, régule les lipides, améliore la circulation sanguine : cholagogue (aide à l'évacuation de la bile), antispasmodique. Diurétique : il réduit les risques de calculs rénaux ou de goutte et prévient les rhumatismes. Antistress, antifatigue : il prévient l'insomnie et permet de lutter contre le surmenage intellectuel (Escuder, 2007).

Effet antioxydant : contre le vieillissement cellulaire. La choline qu'il contient agit comme régulateur des lipides, au niveau du foie, et favorise la digestion. Ses vertus diurétiques facilitent l'activité rénale et participent à la prévention du rhumatisme. Ses propriétés antioxydantes ont un effet de stimulation sur l'activité cérébrale et améliorent la mémoire (Aherne et al., 2007). Le romarin convient également comme défatigant, pour stimuler les personnes qui souffrent d'asthénie, tout en agissant préventivement contre l'insomnie. Il possède des qualités antiseptiques qui en font un bon agent pour nettoyer la peau et les zones sensibles ou agir directement sur les plaies infectées (Erkan et al., 2008).

#### **II.9.2.2. Utilisation externe**

Contre les affections de la peau : infections, plaies, nettoyage de la peau et des zones génitales. Accélère la pousse des cheveux. Permet de lutter contre certains agents pathogènes : antimycosique et antibactérien (Chafai Elalaoui et al., 2014).

## **II.10. Usage du romarin**

### **II.10.1. Utilisation en phytothérapie**

Le romarin peut être utilisé en infusions, sous forme de poudre, d'extrait sec ou d'autres préparations galéniques par voie interne et/ou externe pour le soulagement ou le traitement de nombreuses pathologies (Bousbia, 2011).

#### **II.10.1.1. Par voie externe**

Comme traitement externe, les sommités du *R. officinalis* infusées dans l'alcool sont généralement employées pour le traitement des contusions, des torticolis, des ulcères, des plaies, et des dermatoses parasitaires. L'huile essentielle soulage les troubles rhumatismaux et de la circulation sanguine. Elle soigne également les blessures, soulage les maux de tête, améliore la mémoire et la concentration, fortifie les convalescents, combat les effets du stress et de la fatigue, et traite l'inflammation des voies respiratoires (Bousbia, 2011).

#### **II.10.1.2. Par voie interne**

Le romarin est un stimulant antispasmodique et cholagogue. Il est indiqué pour ses propriétés stimulantes dans le soulagement des dyspepsies atoniques, des fermentations intestinales, des asthénies, des états adynamiques des fièvres typhoïdes et de la grippe. En tant qu'antispasmodique, il est bénéfique contre la coqueluche et les vomissements nerveux. C'est un bon cholagogue utilisé dans les cholécystites chroniques, certaines ascites et cirrhoses et les ictères. En plus, il est considéré comme un emménagogue, un diurétique, un anti-VIH, et un anticancéreux (Bousbia, 2011).

### **II.10.2. Usage en parfumerie et en cosmétique**

Le romarin entre dans la composition des parfums, surtout masculins et l'eau de Cologne, ainsi que dans différentes pommades dermiques (Bousbia, 2011). Grâce à sa capacité de stimuler les terminaisons nerveuses, le romarin est employé comme tonique dans des bains moussants pour muscles fatigués à une dose de 1 à 2%. Il a des propriétés dermo-purifiantes ce qui permet son utilisation dans la préparation des déodorants. En lotion et dans les shampooings, l'extrait de romarin stimule le cuir chevelu à une dose de 0.5 à 1% (Martini, 2011).

### **II.10.3. Utilisation dans les préparations culinaires et alimentaires**

Le romarin est une épice ancienne parce qu'il est originaire de la méditerranée, il est extrêmement commun dans les cuisines méditerranéennes. Les extraits produits à partir des feuilles de romarin peuvent également être utilisés dans la production alimentaire pour empêcher les matériaux de se détériorer en raison de leurs propriétés antioxydants. Son efficacité dans la conservation des aliments peut être observée dans de nombreux types d'aliments, y compris le bœuf réfrigéré et les galettes de porc congelées (Lara et al., 2011).

## **II.11. Propriétés pharmacologiques et thérapeutiques de *Rosmarinus officinalis***

### **II.11.1. Action anti-inflammatoire**

Le romarin contient des concentrations élevées des composés biologiquement actifs qui sont les terpènes, tel que : l'acide carnosique, carnosol, acide ursolique et l'acide betulinique, et également l'acide rosmarinique, rosmanol, l'acide oleanolique, l'acide micrométrique, et l'acide micromérique ester de méthyle (Arranz et al., 2015). Des études ont aussi démontrées que tous ces composés ont des propriétés anti-inflammatoires importantes chez des souris présentant une pleurésie induite par la carrageenine qui imite une réponse inflammatoire de patients présentant un asthme bronchique, en inhibant l'apparition des médiateurs inflammatoires, y compris NOx, IL 1b et TNFa, de même qu'ils réduisent l'activation des leucocytes lors de la réponse inflammatoire induite par la carrageenine et inhibe l'activation des leucocytes en plus de leur influx au siège de l'inflammation. l'exsudation, la bêta interleukin-1 (IL 1b), le facteur de nécrose de la tumeur (alphaTNF), l'activité du myeloperoxydase (MPO), et la production d'oxyde nitrique/nitrate (NOx) (Rodriguez et al., 2015). L'oxyde nitrique, l'interleukine 1b (IL 1b), et le TNFa sont des médiateurs pro-inflammatoires importants impliqués dans l'exsudation, et/ou l'influx des leucocytes dans la réponse inflammatoire aiguë et chronique, qui sont des traits communs des maladies inflammatoires (Newall et al., 1996).

### **II.11.2. Action antidiabétique**

Il existe des rapports scientifiques sur l'effet antidiabétique de l'extrait de romarin qui démontrent que l'infusion de la plante a un effet hypoglycémiant. Le romarin (*Rosmarinus officinalis*), est largement utilisé dans la médecine traditionnelle pour le traitement d'hyperglycémie et pour sa haute activité antioxydante. Les actions possibles de l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* sur le métabolisme du glucose et sur son activité

antioxydante chez les lapins ont été évaluées. ces données révèlent que l'extrait éthanolique de romarin a un rôle déterminé dans la diminution du taux de glucose dans le sang chez des lapins normo glycémiques, glucose- hyperglycémiques et diabétiques alloxan - induits (Bakirel *et al.*, 2008).

### **II.11 .3. Activité anti-oxydante**

L'activité anti-oxydante du romarin est connue depuis environ 30 années. En raison de ses propriétés anti-oxydantes, le romarin est largement accepté en tant qu'une des épices qui a l'activité anti-oxydante la plus élevée.

Gladine *et al.*, (2007) ont concluent que les extraits des plantes riches en polyphénols choisis pour l'expérience, en particulier le romarin pourraient être des nouvelles sources d'antioxydants chez les animaux rendus extrêmement sensibles à la lipoperoxydation, par le biais d'un régime alimentaire riche en acides gras n-3 polyinsaturés et qu'aucune corrélation n'existe entre la capacité anti-oxydante in vitro et in vivo de ces extraits.

### **II.11 .4. Action cholinergique**

Des études ont démontré que l'huile essentielle et les extraits de romarin ont des activités inhibitrices sur l'acetylcholinesterase et la butyrylcholinesterase (BChE), dont l'acide rosmarinique issu de l'extrait méthanolique de Romarin a montré un effet inhibiteur remarquable contre butyrylcholinesterase (Mata *et al.*, 2007). Cineole et alpha-pinene, monoterpènes majeurs dans l'huile de romarin, ont une activité anticholinesterasique, cette activité dépend d'un mécanisme synergique entre les différents composants de l'huile deromarin, alors que l'acide rosmarinique paraît être responsable de l'activité anti BChE de l'extrait méthanolique du romarin (RO-MeOH) (Orhan *et al.*, 2007).

### **II.11 .5. Activité antibactérienne**

De nombreuses recherches ont été exécutées pour étudier l'activité antibiotique potentielle d'extraits du romarin le romarin contenait de nombreux composés actifs biologiquement et quelques-uns de ceux-ci ont fréquemment été utilisés dans la médecine traditionnelle pour leurs propriétés antibiotiques (Georgantelis *et al.*, 2007). L'activité antibiotique du romarin contre les bactéries testées pourrait être attribuée à la présence de flavonoïdes, acides phénoliques (acide caféique, acide chorogénique, et acide rosmarinique) et les huiles essentielles (camphre et cineole) et diterpenes (carnosol) par des effets bactériostatiques à des concentrations inférieures et bactéricides à plus haute concentration (Weckesser *et al.*, 2007). Bien que les effets de synergie résultant de la combinaison



d'antibiotiques avec les extraits a été documentée dans la littérature le mécanisme qui gouverne le joint action des composants de l'extrait du romarin et d'antibiotiques est encore inconnu. Ceci peut être dû au grand nombre de différents groupes de composés chimiques présents dans l'extrait de romarin. Les composants biologiquement actifs perturberaient la perméabilité de la membrane du cytoplasme et de cette façon facilitent l'afflux d'antibiotiques (Schelz *et al.*, 2006).

#### **II.11.6. Effet antidépresseur**

Le romarin a plusieurs utilisations thérapeutiques dans la médecine traditionnelle pour guérir les maladies, y compris la dépression. Dans cette étude l'effet de l'extrait hydroalcoolique des tiges et des feuilles de cette plante a été étudié sur un modèle de comportement : le test de la natation forcée (FST) chez les souris (Ferlemi *et al.*, 2015). L'extrait de romarin a produit un effet antidépresseur, du fait le traitement aigu des souris par voie orale par l'extrait a réduit le temps d'immobilité dans le FST (100 mg/kg) en comparaison à un groupe témoin. Les résultats suggèrent que l'action antidépressive de l'extrait de romarin passe par interaction avec le système monoaminergique et que cette plante doit être étudiée profondément comme une approche thérapeutique alternative pour le traitement de la dépression (Sasaki *et al.*, 2013).

#### **II.12. Toxicologie**

L'emploi culinaire de romarin, sous forme de feuilles ou d'huile essentielle ne présente à priori aucune toxicité aiguë ou chronique (Anton et Lobstein, 2005). Les feuilles ont une faible toxicité mais cependant non négligeable. Elles ont une action très tonique presque excitante, empêchant le sommeil. Il est préférable d'éviter l'usage du romarin de la fin de la journée au coucher (Escuder, 2007).

L'utilisation traditionnelle du romarin montre des effets possibles sur le développement de l'embryon ainsi que des épisodes abortifs (Gigon, 2014). C'est pourquoi pendant la grossesse et l'allaitement, il est recommandé par l'Agence européenne du médicament d'éviter de prendre des produits à base de romarin (hors usage alimentaire). Cette Agence recommande également que l'utilisation des feuilles séchées de romarin soit réservée aux enfants de plus de 12 ans et celle de son HE aux personnes de plus de 18 ans (Gagnon *et al.*, 2010).

L'emploi des feuilles et sommités fleuries de romarin est à éviter chez les personnes ayant des antécédents d'allergie ou d'hypersensibilité aux composés de la famille des Lamiacées,



R.F.AOUAD (2022). Effet de Rosmarinus officinalis sur l'alcoolisme. Doctorat LMD en BTE. Univ. Saida  
souffrant d'anémie par carence martiale. Elles sont à utiliser avec précaution chez les patients  
traités par anticoagulants, antiplaquettaires, diurétiques, hypotenseurs ou lithium en raison du  
risque d'interaction médicamenteuse (Gigon, 2014).

## **Chapitre II : Matériel et méthodes**

### **II.1. Matériel végétal**

La plante de *Rosmarinus officinalis* a été collectée au mois de février 2017 dans la région ouest de l'Algérie (Wilaya de Saida). L'identification botanique de l'espèce a été réalisée au niveau du département de Biologie, Université Moulay Tahar, Saida.

Les feuilles de la plante ont été nettoyées, séchées à température ambiante et à l'ombre pendant 3 semaines, puis broyées et stockées à l'abri de la lumière jusqu'à leur utilisation (fig. 05).



**Figure 05 :** Les feuilles de *Rosmarinus officinalis*

### **II.2. Préparation de l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis***

L'extraction a été faite par la méthode de macération selon le protocole de [Ghasemzadeh et al. \(2016\)](#) avec quelques modifications, 10 g de feuilles séchées et broyées de *Rosmarinus officinalis* ont été dissous dans 100 mL d'éthanol à 99,8 %, à l'abri de la lumière et à température ambiante pendant trois jours sous sonification pendant 90 min chaque jour pour extraire l'actif ingrédients, puis une filtration a été réalisée sur papier Whatman N°1 avant évaporation du solvant sous pression réduite à une température de 55°C au rotavapor. La poudre obtenue représente l'extrait éthanolique sec de *Rosmarinus officinalis* (EER) et a été conservée à 4°C dans des flacons en verre teinté jusqu'à utilisation.

### **II.3. Détermination du rendement**

Le rendement désigne la masse de l'extrait déterminée après évaporation du solvant, il est exprimé en pourcentage par rapport à la masse initiale de la plante soumise à l'extraction.

Le rendement est calculé par la formule suivante :

$$R\% = M_1/M_0 \times 100$$

$M_0$  : Masse en gramme de l'extrait brut évaporé ;

$M_1$  : Masse en gramme de la matière végétale initiale sèche.

### **II.4. Composition chimique par HPLC/UV**

L'analyse chromatographique de l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* (EER) a été réalisée sur une chromatographie liquide haute performance (Agilent 1100). La séparation a été effectuée sur une colonne Agilent poroshell120EC (100 mm × 2,1 mm, 2,7 m), en utilisant des phases mobiles : eau/TFA/acide formique (99 : 0,25 : 0,75) (A) et acétonitrile (B). L'élution a été effectuée à un débit de 0.6 mL/min avec une aliquote de 10 µL et à une température de 55°C. En utilisant une méthode de gradient comme suit (t / min, % B) : (0, 0), (1, 10), (2, 12,5), (3, 15), (9, 80), (10, 100), (11, 100), (14, 0) avec post 5 min. Des chromatogrammes ont été enregistrés à 270 et 320 nm. L'échantillon a été préparé en diluant l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* (EER) avec du méthanol à 1 : 100 (p/v).

Les composants de l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* (EER) ont été identifiés en comparant leurs temps de rétention et leurs spectres UV avec différents standards phénoliques commerciaux (trans-cinnamique, acide gallique, acide benzoïque, acide férulique, acide m-coumarique, acide caféique, acide rosmarinique et acide ellagique), flavonoïdes (catéchine, hespéridine, thymol, galan-gin, tectochrysine, pinocembrine, acacétine, rutine, chryisine, apigénine, kaempférol et quercétine) et d'autres composés (acide ascorbique, menthol). Les étalons ont été dissous dans du méthanol pour donner des solutions mères à 1 mg/ml. La quantification des constituants a été déterminée à l'aide de courbes standard exprimées en mg pour 1 g de poudre de l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* (EER).

## **II.5. Dosage des Polyphénols totaux**

La quantification des polyphénols de l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* (EER) a été déterminée par la méthode décrite par Singleton *et al.* (1999) en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu.

40 µL d'extrait est mélangée avec 1.5 mL de réactif de Folin–Ciocalteu (10%) et 1.5 mL de carbonate de sodium (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) (7.5%). Ensuite complétée à 100 mL avec l'eau distillée. Laisser le milieu réactionnel se reposer pendant 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. La lecture est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre (UV mini-1240) à 760 nm. Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions en utilisant l'acide gallique à différentes concentrations. Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg GAE/g).

## **II.6. Dosage des flavonoïdes**

La teneur en flavonoïdes est déterminée selon la méthode du trichlorure d'aluminium AlCl<sub>3</sub> décrite par Woisky *et Salatino* (1998) qui consiste à mélanger 1 mL d'extrait du romarin avec 1 mL de solution d'AlCl<sub>3</sub> à 2% (P/V) qu'on laisse réagir 30 mn avant de lire l'absorbance contre un blanc à 430 nm.

Une courbe d'étalonnage réalisée avec la quercétine est établie dans les mêmes conditions réactionnelles que l'échantillon avec de l'eau distillée à la place de l'extrait. La teneur en flavonoïdes est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g d'extrait).

## **II.7. La peroxydation lipidique**

**Principe :** L'inhibition de la peroxydation lipidique a été mesurée selon le protocole de Yagi *et al.* (1997). Le principe de ce dosage repose sur la formation d'un pigment en couleur rose d'un milieu réactionnel entre l'acide thiobarbiturique (TBA) et le malondialdéhyde (MDA).

**Procédure :** Mélanger 100 µL de l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* (10, 25, 50 et 100 µg/mL) avec 0.8 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, après agitation, 100 µL de solution d'acide phosphotungstique (10% : P/V) sont ajoutés. 5 min après l'incubation à température ambiante et dans l'obscurité, centrifuger la solution résultante pendant 10 min à 1600 tours/min. Après élimination du surnageant, re-suspendre le culot dans 0.4 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et 60 µL d'acide phosphotungstique puis

R.F.AOUAD (2022). Effet de *Rosmarinus officinalis* sur l'alcoolisme. Doctorat LMD en BTE. Univ. Saida  
centrifugé de nouveau 10 min à 1600 tours/min. Le surnageant est éliminé et le culot résultant dissous dans 2 mL d'eau distillée et 0.5 mL de réactif TBA (335 mg d'acide thiobarbiturique dans 50 mL d'eau + 50 mL d'acide acétique 99%). Le mélange résultant a été chauffé au bain-marie à 95 °C pendant 60 min. La solution a été refroidie et extraite par 2,5 mL de butanol. La fluorescence de la phase butanolique a été mesurée avec une longueur d'onde d'excitation à 515 nm, une longueur d'onde d'émission à 553 nm, 10 nm étaient glissière avec lacoupure à 515 nm.

La quantité de la peroxydation lipidique a été exprimée en équivalent MDA à partir d'une courbe linéaire dessinée avec plusieurs concentrations de la tétraméthoxypropane (TMP) standard.

## **II.8. Mesure du pouvoir antioxydant par le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH)**

Le pouvoir anti radicalaire de l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* (EER) a été déterminé par la méthode colorimétrique en utilisant le complexe chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH). 200 µL d'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* à différentes concentrations 100, 250, 500 et 1000 µg/mL sont ajoutés à 2.8 ml de la solution du DPPH (60 µM). Après 30 min d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, la lecture de l'absorbance est faite à 515 nm (Blois, 1958 ; Brand-Williams et al., 1995).

L'activité de piégeage des radicaux libres de l'extrait a été calculée en pourcentage d'inhibition selon la formule suivante :

$$[\%RSA = (\text{Abs}_{\text{contrôle}} - \text{Abs}_E) / \text{Abs}_{\text{contrôle}} \times 100]$$

Abs<sub>C</sub> : Absorbance du contrôle.

Abs<sub>E</sub> : Absorbance de l'extrait.

L'activité antioxydante a été exprimée par IC<sub>50</sub>, définie comme la concentration de l'extrait provoquant une diminution de 50% de la concentration initiale de DPPH.

## **II.9. Etude *in vivo***

### **II.9.1. Animaux et conditions d'hébergement**

Vingt-quatre (24) rats mâles Wistar Albino (100 à 110 g) fournis par l'Institut Pasteur d'Alger (Algérie) ont été utilisés. Le protocole est conforme aux lignes directrices du National Institute of Health (NIH-USA).

Dès leur réception, les rats ont été répartis aléatoirement en 4 groupes expérimentaux

*R.F.AOUAD (2022). Effet de Rosmarinus officinalis sur l'alcoolisme. Doctorat LMD en BTE. Univ. Saida* renfermant chacun 6 rats, ils ont été soumis à une période d'adaptation de deux semaines à une température ambiante et une photopériode de 12 /12 h. Les rats ayant un accès libre à l'aliment et à l'eau.

### **II.9.2. Préparation de la solution alcoolique**

Les rats consomment le premier jour 5 mL de l'éthanol 15%, et chaque jour on augmente de 01% jusqu'à arriver à 20%, puis stabiliser à cette concentration.

### **II.9.3. Protocole de traitement des animaux**

- Le groupe G1 : Le premier groupe a été utilisé comme témoin;
- Le groupe G2 : les rats ont reçu 5 mL d'éthanol par voie orale pendant 90 jours ;
- Le groupe G3 : les rats ont reçu 200 mg/kg d'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* (EER) par voie orale durant 90 jours ;
- Le groupe G4 : les rats ont été administrés par 200 mg/kg/jour d'EER et 5 mL/jour d'éthanol au même temps pendant 90 jours.

### **II.9.4. Dosage de l'éthanol dans le sang**

Bien que les solutions alcooliques antiseptiques n'interfèrent pas avec le dosage, il est préférable de désinfecter avant le prélèvement avec une solution ne contenant ni alcool ni substance volatile, pour éviter toute contestation.

Durant la période d'alcoolisation (au 60<sup>ème</sup> jour d'expérimentation), et 1h après le gavage des doses journalières, des échantillons de sang sont réalisés par prélèvements au niveau du sinus rétro-orbital afin de mesurer l'alcoolémie. Les tubes utilisés lors du prélèvement contiennent une substance anticoagulante et stabilisatrice (héparine).

Le sang prélevé 60 minutes après le début d'accès à l'alcool a été recueilli dans des tubes recouverts d'héparine pré-réfrigérés et a été centrifugé à 3000 g pendant 10 minutes à 4°C. Le plasma a été extrait et congelé à 20° C pour la détermination du taux d'alcool dans le sang par chromatographie en phase gazeuse à l'aide d'un Hewlett Packard 5730A chromatographe et colonnes en verre de 6' x 1/4" OD x 2 mm ID remplies avec 1-1766 GP 60/80 Carbopack B, 15 % Carbowax (Supelco Inc. Bellefonte, PA). Le 2-Propanol (1.25 mg/mL) a été utilisé comme étalon interne mélangé avec l'alcool (1 :1). Les échantillons ont été exécutés sur chacune des deux colonnes et les valeurs ont été moyennées pour le taux d'alcoolémie moyen (Dilley et al., 2018).



**Figure 06 :** Hewlett Packard 5730A chromatographe

### **II.9.5. Etude neurocomportementale**

A la fin de l'expérimentation (90 jours après), nous avons étudié les tests neurocomportementaux afin d'évaluer les capacités motrices, cognitives et émotionnelles des rats des différents groupes.

#### **II.9.5.1. Test d'open-field**

Le test de l'Open Field (OF), initialement a été décrit et développé par [Hall \(1938\)](#) il est régulièrement employé dans de nombreuses études comme un test mesurant l'activité locomotrice et exploratoire et comme un révélateur de la réactivité émotionnelle chez les rongeurs, on considère que ces derniers préfèrent les espaces confinés, clos et peu éclairés et ils ont une tendance à éviter cet environnement stressant. =éclairée avec un fond sombre éparpillé par des lignes délimitant des carreaux (10 x 10 cm)) où la souris était initialement placée dans l'un des quatre coins de l'open-field, la tête orientée vers le coin ([fig. 06](#)) ([Dauge et al., 1989](#)).



**Figure 07:** Test d'open-field.

### II.9.5.2. Test de la boîte claire/obscur (light/dark box)

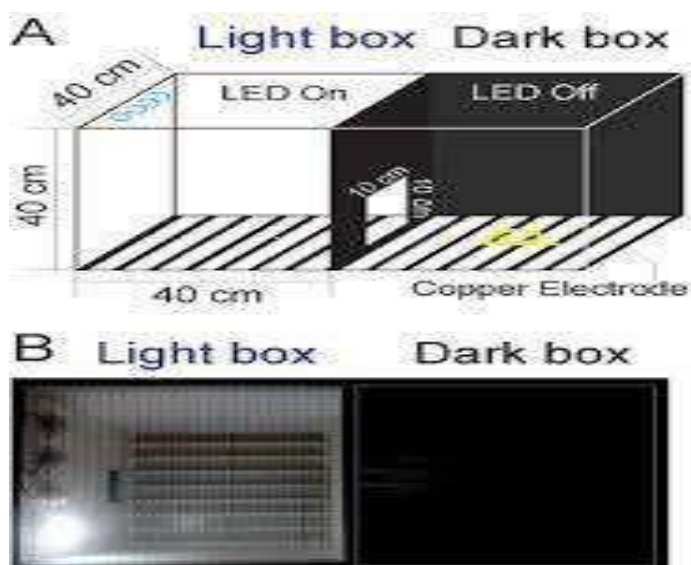
Le « Light/dark box » est constitué, comme son nom l'indique, d'une chambre sombre : « dark box », et d'une grande chambre claire : « light box » qui sont connectés par une ouverture qui permet au rat de passer librement d'une chambre à l'autre (fig. 07).

Chaque rat et de chaque lot d'exposition sont individuellement déposés dans la chambre claire (face à la porte), et il leur est permis de parcourir l'appareil durant 5 minutes. L'ordre aléatoire de passage des rats dans le test est déterminé auparavant afin de les répartir de manière homogène au cours de la

Journée. Chaque animal est introduit dans la salle de test 5 minutes avant le début de celui-ci, afin de permettre limiter le stress lié au nouvel environnement.

Dans cet appareil, le temps passé dans la chambre sombre donnera une évaluation de l'anxiété des animaux, où plus l'animal passe de temps dans la chambre sombre, plus son état d'anxiété est considéré élevé. Le nombre de transitions de l'animal d'une chambre à l'autre peut fournir également une estimation de l'anxiété chez les rats. Dans ce cas, le niveau d'anxiété sera inversement proportionnel au nombre de transitions réalisé par les rats (Bourin and Hascoet, 2003).

Une Webcam reliée à un ordinateur permet d'enregistrer chacune des sessions et d'analyser à posteriori le temps passé dans chacune des chambres.



**Figure 08 :** Test de light/dark box.



### **II.9.5.3. Test de la nage forcée =Forced Swimming Test (FST)**

Ce test permet d'évaluer l'état de résignation qui est un comportement dépressif chez le rongeur, il se traduit par une immobilité importante selon son premier fondateur (Porsolt, 1977). Le dispositif expérimental est un cylindre en plexiglas transparent de 20,7 cm de diamètre et de 39 cm de hauteur remplie en 3/4 d'eau à une température de  $22\pm 1^{\circ}\text{C}$  dans lequel les souris sont soumises successivement à cette épreuve de nage forcée pendant 3 minutes, les paramètres à mesurer sont :

- Le temps de mobilité où l'animale nage activement avec ses quatre pattes.
- Le temps d'immobilité durant laquelle l'animal flotte seulement (des mouvements à faible amplitude) ce qui reflète un désespoir comportemental (fig. 08).



**Figure 09 :** L'épreuve de la nage forcée (FST).

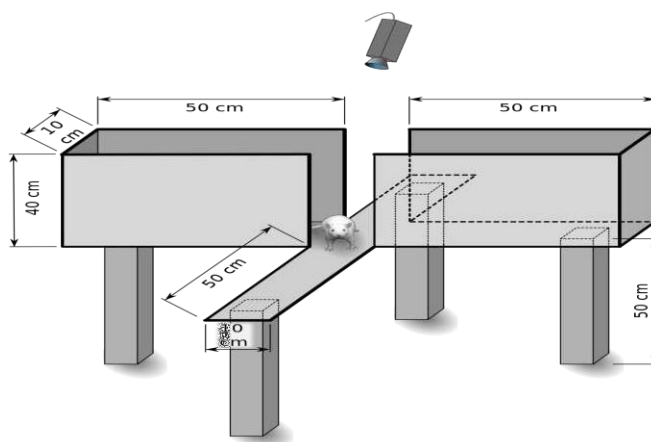
### **II.9.5.4. Test du labyrinthe en croix surélevée (Place Maze Test)**

Le labyrinthe en croix surélevée est un dispositif de mesure de l'anxiété chez les rongeurs. Le dispositif est constitué de 2 branches ouvertes (50 x 20 cm) perpendiculaires à 2 branches fermées (50 x 20 x 40 cm) et d'une zone centrale neutre à l'intersection des 4 branches. Le labyrinthe est surélevé à 85 cm du sol. Ainsi le principe du test repose sur le conflit d'approche/évitement des bras ouverts. Un animal qui explore les bras ouverts sera décrit comme étant « peu anxieux » et un animal qui reste confiné dans les bras fermés du dispositif, sera lui, décrit comme étant « anxieux » (fig. 09).

L'essai commence après la mise en place de l'animal dans la zone centrale, la tête dirigée vers une branche fermée qui est la même pour tous les rats. Les animaux sont filmés pendant 5 minutes sous lumière blanche atténuée. Le plancher du labyrinthe ainsi que les parois des branches fermées sont nettoyés avec une solution hydroalcoolique à 10 % et séchés après le passage de chaque animal.

Les variables mesurées sont le nombre d'entrées dans les branches ouvertes et dans les branches fermées ainsi que le temps passé dans les branches ouvertes, dans les branches fermées et dans la zone centrale neutre. A partir de ces variables, le nombre total d'entrées dans les branches qui renseigne sur l'activité locomotrice de l'animal ainsi que le pourcentage d'entrées en branches ouvertes reflétant le degré d'anxiété du rat sont calculés.

**[% entrées branches ouvertes = (nombre entrées branches ouvertes/ nombre total d'entrées) x 100]**



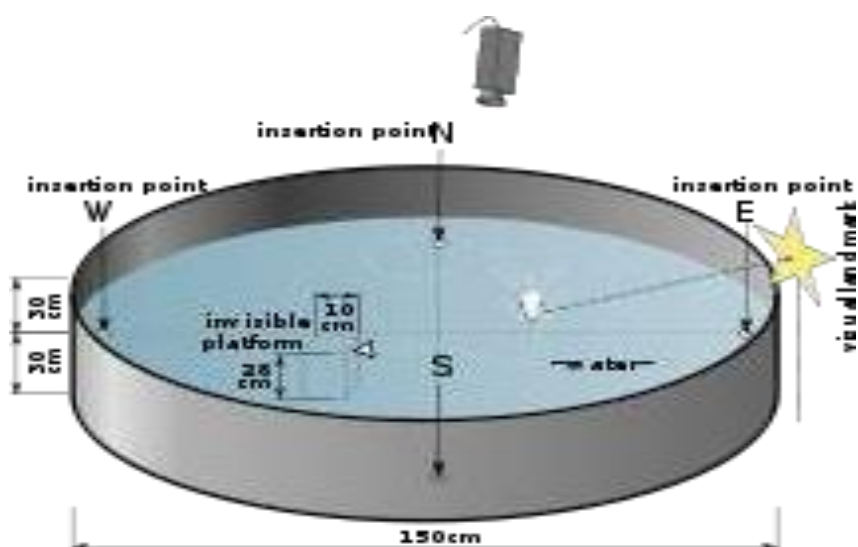
**Figure 10 :** Epreuve de labyrinthe surélevé.

#### **II.9.5.5. Le labyrinthe aquatique de Morris**

Le labyrinthe aquatique de Morris, est l'un des tests les plus utilisés pour évaluer l'apprentissage et la mémoire spatiale chez les rongeurs. Le but de ce test est d'évaluer les capacités à mémoriser et à gérer de l'information spatiale dans une situation peu agréable pour le rat. L'animal doit échapper à une situation aversive (l'eau froide) et d'être capable de s'orienter et de nager rapidement vers une plate-forme, rendue invisible après opacification de l'eau, en s'aidant de repères visuels (Morris, 1984).

Le dispositif expérimental est constitué d'un bassin circulaire en métal, de 150 cm de diamètre et de 50 cm de profondeur, rempli d'eau opaque à  $25 \pm 1$  °C, sur une hauteur de 30 cm. Le bassin est virtuellement divisé en 4 quadrants et la plate-forme métallique mesure 20 cm de diamètre, elle est immergée à 1.5 cm sous la surface de l'eau et placée au centre du quadrant nord-ouest. Des formes géométriques disposées autour du bassin (sud-est, nord-est, sud-ouest, nord-ouest) situées dans la pièce d'expérimentation constituent des repères visuels permettant à l'animal de se repérer et de mémoriser l'emplacement de la plate-forme (fig. 10).

Le test dure 4 jours, avec 5 sessions par jour pendant les 3 premiers jours. Le quatrième jour, les rats ont deux passages avec la plate-forme immergée et 3 passages réguliers sans plate-forme. Lors de chaque test, l'animal est placé dans l'eau à la périphérie dans des lieux différents et nage pour trouver la plate-forme. Il est ensuite sorti de l'eau. Les sessions sont enregistrées sur vidéo pendant 60 secondes et le temps passé dans le quadrant cible, le temps de latence est mesuré.



**Figure 11 :** la piscine de Morris.

### **II.9.6 .Sacrifice des rats**

A la fin de l'expérimentation, les rats sont mis à jeun pendant 12 h avant la collecte du sang. Afin d'éviter tout risque de changement des paramètres biochimiques par administration d'une anesthésie générale, les animaux ont été maintenus sous une légère anesthésie de chloroforme avant d'être euthanasiés juste avant la collecte des échantillons de sang.

Les échantillons de sérum ont été obtenus à partir des tubes secs ; alors que les échantillons de plasma ont été obtenus à partir des tubes héparinés ou EDTA.

Le foie et le cerveau ont été récupérés, rincés avec l'eau physiologique. Une partie du foie et cerveau a été fixée dans le formol pour l'étude histologique, la deuxième partie est mise dans un tampon PBS (10 mM PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>/300 mM NaCl, pH 7.4).

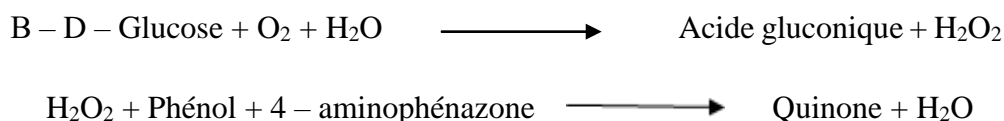
La préparation de l'homogénat de tissu hépatique et cérébral a été faite selon le protocole de [Tang et al. \(2012\)](#) cité par [Chaa et al. \(2019\)](#). Homogénéiser la deuxième partie des morceaux de foie et cerveau dans un tampon glacé (250 mM de saccharose, 10 mM de Tris – HCl, 0,5 mM d'EDTA et 0,5% d'albumine sérique de bovin, pH 7,4), récupérer le surnageant par centrifugation à 112 x g pendant 15 min à 4 °C. Répéter cette opération deux fois, afin de mettre le culot de mitochondries dans du tampon PBS (0,1 mL d'EDTA 10 mM, 0,1 mL d'azoture de sodium à 35%, pH 7.4), pour divers dosages.

## **II.9.7 .Les paramètres biochimiques**

### **II.9.7.1. Dosage du glucose**

La glycémie a été réalisée par la méthode enzymatique au glucose oxydase par un autoanalyseur de type (BIOLIS24j) en utilisant le Kit de réactif de glycémie ([Trinder, 1996](#)). Le glucose est transformé par le glucose oxydase (GOD) en acide gluconique et peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Ce dernier, en présence de peroxydase (POD), oxyde le chromogène incolore (4-aminophénazone) en un composé coloré en rouge-violet (quinoneimine). Les absorbances des échantillons, de l'étalon et du blanc sont lues à 505 nm.

La coloration finale est stable au moins 30 minutes. Selon les réactions suivantes :



### **II.9.7.2. Dosage des protéines totales**

Les protéines totales ont été déterminées suivant une méthode colorimétrique par un autoanalyseur de type (BIOLIS24j) en utilisant le Kit de réactif de protéine totale (TIETZ et

AMERSON, 1995). Les ions cuivriques, dans un milieu alcalin, interagissent avec les liaisons peptidiques des protéines formant un complexe bleu violet ou l'intensité de la couleur est proportionnelle à la quantité des protéines plasmatiques L'absorption est mesurée à 550 nm.

### **II.9.7.3. Dosage de l'albumine**

L'albumine est mesurée par une méthode colorimétrique (Kit Biolabo, France). L'albumine présente dans l'échantillon se fixe avec le vert de bromocrésol, et génère un complexe coloré quantifiable. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration d'albumine dans l'échantillon. La lecture se fait par spectrophotométrie à une longueur d'onde  $\lambda = 630$  nm.

### **II.9.7.4. Dosage de la bilirubine totale**

La bilirubine totale a été déterminée suivant la méthode d'acide sulfanilique, entre la bilirubine et l'acide sulfanilique diazoté qui conduit à un composé, l'azobilirubine, coloré en milieu très acide ou basique. Principe de Malloy-Evelyn modifié par [Walters et al. \(1970\)](#) : en solution aqueuse, seule la bilirubine directe réagit. Pour doser la bilirubine totale il est nécessaire de rompre la liaison entre la bilirubine indirecte et l'albumine. Cette étape est réalisée par l'addition de diméthyl sulfoxyde (DMSO). L'absorbance de l'azobilirubine ainsi produite est proportionnelle à la concentration en bilirubine et est mesurée à 550 nm (530-580) ([Walters et Gerarde, 1970](#)).

### **II.9.7.5. Dosage des transaminases ASAT et ALAT**

L'alanine aminotransférase (ALAT) est déterminée selon la méthode enzymatique colorimétrique de [Wróbleswski et La Due \(1956\)](#). L'aspartame aminotransférase (ASAT) est mesurée par la méthode de Karmen (1955) modifiée par [Bergmer et al. \(1977\)](#). L'intensité de la coloration développée par ces deux réactions est mesurée à 340 nm.

### **II.9.7.6. Dosage de gamma-glutamyl transférase ( $\gamma$ -GT)**

La gamma-glutamyl-transférase ( $\gamma$ -GT) catalyse le transfert d'un  $\gamma$ -glutamyl-p-nitroanilide au dipeptide accepteur  $\gamma$ -glutamyl de la  $\gamma$ -groupe glycylglycine d'après la réaction suivante :

L- $\gamma$ -Glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilide+Glycylglycine



l- $\gamma$ -Glutamylglycylglycine+ Acide 5-aminé-2-nitrobenzoïque.

La vitesse de formation de l'acide 5-aminé-2-nitrobenzoïque déterminé par photométrie est proportionnelle à la concentration catalytique de  $\gamma$ -GT dans l'échantillon testé (Djaber et Kherraz, 2016).

#### **II.9.7.7. Dosage des phosphatases alcalines (PAL)**

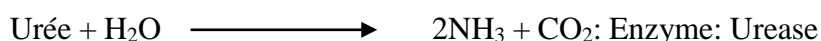
La phosphatase alcaline a été déterminée suivant une méthode cinétique par un Autoanalyseur de type (BIOLIS24j) en utilisant le Kit de réactif de phosphatase alcaline (Wenger, 1984). La phosphatase alcaline (PAL) catalyse le transfert du groupe phosphate depuis le p-nitrophénylphosphate (pNPP) vers le 2-amino-méthyle-1- propanol en libérant du p-nitrophénol et du phosphate, selon la réaction suivante :



La vitesse de formation du p-Nitrophénol, déterminée de manière photométrique est proportionnelle à la concentration catalytique de phosphatase alcaline dans l'échantillon.

#### **II.9.7.8. Dosage de l'urée sérique**

L'urée est déterminée par la méthode calorimétrique enzymatique (Kit Chronolab, System) (Berthelot, 1998) selon la réaction suivante :



L'urée présent dans l'échantillon donne en présence d'uréase et de nitroprussiate un composé coloré proportionnelle aux taux de l'urée et quantifiable par spectrophotométrie à 580 nm.

#### **II.9.7.9. Dosage de la créatinine**

La créatinine a été déterminée suivant une méthode colorimétrique par un autoanalyseur de type (BIOLIS24j) en utilisant le Kit de réactif de JAFFE (Murray, 1984), basé sur la réaction de la créatinine avec le picrate sodium : c'est la réaction de JAFFE. La créatinine réagit avec le

*R.F.AOUAD (2022). Effet de Rosmarinus officinalis sur l'alcoolisme. Doctorat LMD en BTE. Univ. Saida*  
picrate alcalin pour donner un complexe coloré l'intensité de la coloration est proportionnel à la concentration en créatinine de l'échantillon. La lecture se fait par spectrophotométrie à une longueur d'onde  $\lambda = 492$  nm.

#### II.9.7.10. Dosage de l'acide urique

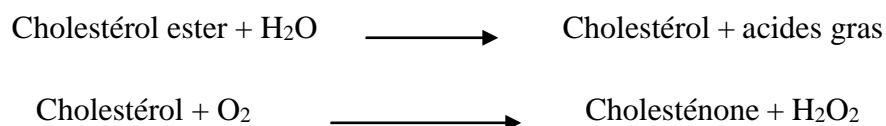
Le dosage de l'acide urique a été réalisé par la méthode enzymatique colorimétrique selon la fiche technique du Kit Biolabo (France).

**Principe :** l'acide urique est oxydé par l'uricase en allantoïne et peroxyde d'hydrogène ( $2 \text{H}_2\text{O}_2$ ) qui, sous l'influence de la peroxydase, du 4-aminophénazone (4-AP), et du 2-4 dichlorophénol-sulfonate (DCPS), forme un composé rouge de quinonéimine.

L'intensité de la coloration rouge formée est proportionnelle à la concentration de l'acide urique dans l'échantillon (Schultz, 1984).

#### II.9.7.11. Dosage du cholestérol total

Le cholestérol total a été déterminés suivant une méthode colorimétrique par un autoanalyseur de type (BIOLIS24j) en utilisant le Kit de réactif de cholestérol total (Meiattini et al., 1978). La réaction consiste à libérer le cholestérol de la liaison ester par la cholestérol-estérase, et d'oxyder le cholestérol libre non estérifié par la cholestérol-oxydase. L'indicateur est une quinoneimine formée à partir de peroxyde d'hydrogène, de la 4-aminophénazone, sous l'action catalytique de la peroxydase. La concentration en quinoneimine colorée est mesurée à 505 nm, elle est proportionnelle à la concentration encholestérol total.



#### II.9.7.12. Dosage des triglycérides

Il a été effectué suivant une méthode enzymatique colorimétrique (Kit Biocon, Germany) selon la libération du cholestérol



La quantité de NADH/H<sup>+</sup> ayant réagi est mesurée à 340 nm, elle est proportionnelle à la teneur de cholestérol libérée et à la quantité de triglycérides de l'échantillon.

### **II.9.7.13. Dosage du cortisol**

Le dosage du cortisol a été effectué par l'automate VIDAS. Le réactif VIDAS Cortisol S est un test automatisé sur le système VIDAS permettant la mesure quantitative directe du cortisol dans le sérum ou le plasma. L'automate VIDAS utilise le principe de dosage ELFA (The Enzyme-Linked Fluorescent Assay) associant la méthode ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) à une lecture finale en fluorescence bleue.

Premièrement, on utilise une cartouche « CORS » et un cône « CORS » pour chaque échantillon. Puis, on place les cartouches et les cônes nécessaires dans le premier compartiment du système. Ensuite, on prend le tube de l'échantillon et à l'aide d'une pipette à embout jetable, on aspire 100 µL de sérum puis on le met dans le puits réservé pour l'échantillon. À chaque fois, on met le sérum dans le puits, on identifie l'échantillon dans le système pour éviter l'erreur d'identification. Puis, on ferme le compartiment et on démarre l'automate et on le laisse pendant 38 min pour la lecture des résultats.

### **II.9.7.14. Dosage des ions**

Le sodium, le chlorure et le potassium ont été dosés simultanément par l'Analyseur d'électrolytes® 9180 fourni par les laboratoires Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Allemagne). Cet appareil permet de doser les électrolytes (Na, K, Cl) dans le sérum. Pour ce faire, 100 à 150 µL de sérum (spécimen) ont été prélevés dans un tube capillaire. La porte d'aspiration de l'analyseur a été relevée et l'aiguille d'aspiration est plongée dans le tube capillaire. Après fermeture de la porte, les résultats du spécimen sont affichés et imprimés.

## **II.9.8 .Détermination du statut antioxydant**

### **II.9.8.1. Dosage du malonaldéhyde (MDA)**

Le scavenging de la peroxydation lipidique a été réalisée sur le le tissu hépatique selon le protocole de [Yagi et al. \(1997\)](#) qui consiste à mélanger 20 µL de d'homogénat de cellule hépatique à 0.8 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Après agitation, 100 µL de solution d'acide phosphotungstique (10% : P/V) sont ajoutés. La solution résultante est laissée 5 min dans l'obscurité puis centrifugée 10 min à 1600 tours/min. Le surnageant est éliminé et le culot re-suspendu dans 0.4 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> additionnés de 60 µL d'acide phosphotungstique puis centrifugé de nouveau 10 min à 1600 tours/min. Le surnageant est éliminé et le culot résultant dissous dans 2 mL d'eau distillée et 0.5 mL de réactif TBA (335 mg d'acide thiobarbiturique dans 50 mL d'eau + 50 mL d'acide acétique 99%). Le mélange résultant a été chauffé au bain-marie à 95 ° C pendant 60 min. La solution a été refroidie et extraite par 2,5 mL de butanol. La fluorescence de la phase



*R.F.AOUAD (2022). Effet de Rosmarinus officinalis sur l'alcoolisme. Doctorat LMD en BTE. Univ. Saida* butanolique a été mesurée avec une longueur d'onde d'excitation à 515 nm, une longueur d'onde d'émission à 553 nm, 10 nm étaient glissière avec la coupure à 515 nm. La quantité de la peroxydation lipidique a été exprimé en équivalent MDA à partir d'une courbe linéaire dessinée avec plusieurs concentrations de la tétraméthoxypropane (TMP) standard.

### **II.9.8.2. Dosage de l'activité enzymatique de la catalase (CAT ; EC 1.11.1.6)**

L'activité enzymatique de la catalase est déterminée dans le tissu hépatique et cérébral selon la méthode de [Lück \(1965\)](#) qui consiste en une analyse spectrophotométrique du taux de décomposition du peroxyde d'hydrogène. En présence de la catalase, la décomposition du peroxyde d'hydrogène conduit à une diminution de l'absorbance de la solution de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en fonction du temps.

Le milieu réactionnel contient 1 mL d'érythrocytes, 1 mL d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1 mL de tampon phosphate (50 mMol/L, pH 7.4) et 2 mL de catalase (3 U/μL). Après incubation de 5 min, 1 mL du réactif sulfate d'oxyde de titanium (TiOSO<sub>4</sub>) (1,7 g dans 500 mL d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N) est ajouté. La lecture se fait à 240 nm. Les concentrations en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> restant sont déterminées à partir d'une gamme d'étalon de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> avec le tampon phosphate et le réactif TiOSO<sub>4</sub> de façon à obtenir dans le milieu réactionnel des concentrations de 0.5 à 2 mM/L.

Le calcul d'une unité d'activité enzymatique est :

$$A = \log A_1 - \log A_2.$$

A<sub>1</sub> : la concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de départ.

A<sub>2</sub> : la concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> après incubation (au bout de 5 min).

L'activité spécifique est exprimée en U/mg Hb.

### **II.9.8.3. Dosage de l'activité enzymatique de la Superoxyde dismutase (SOD ; EC 1.15.1.1)**

L'activité de cette enzyme est mesurée selon la méthode d'[Elstner et al. \(1983\)](#). Le principe est basé sur la réaction chimique qui génère l'ion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) à partir de l'oxygène moléculaire en présence d'EDTA, de MnCl<sub>2</sub> et de mercaptoéthanol.

L'oxydation du NADPH est liée à la disponibilité des ions superoxyde dans le milieu. Dès que la SOD est ajoutée dans le milieu réactionnel, elle entraîne l'inhibition de l'oxydation du NADPH.

Réactif 1 : 5mL de tampon phosphate (0,2M/L, pH 7,4), 1 mL d'hydroxylamine chlorure (0,69 mg/mL), 1 mL d'antraquinone (0,1332 mg/mL) et 1 mL de diaphorase (1 mg/mL d'une solution de 15 U/mL).

Réactif 2 : 6 mL de sulfanilamide à 10 mg/mL d'HCl à 25% et 6mL de naphylethylène diamine à 0,2 mg/mL. 400 µL du mélange éthanol/chloroforme (62.5/37.5 : V/V) sont ajoutés à 250 µL d'érythrocytes pour précipiter les protéines. Après centrifugation à 4000 t/min pendant 5 min, le surnageant est récupéré.

Le milieu réactionnel contient 5 µL de surnageant, 10 µL de tampon phosphate et 100 µL de réactif 1. Le mélange est ensuite incubé avec 10 µL de NADPH pendant 15 min à température ambiante. Puis 100 µL de réactif 2 sont ajoutés.

La lecture se fait à 540 nm, après incubation de 20 min. La gamme d'activité enzymatique est réalisée avec la SOD étalon. Les résultats sont exprimés en U/cg Hb.

#### **II.9.8.4. Dosage de l'activité de la Glutathion peroxydase**

L'activité de la glutathion peroxydase (GSH-PX) a été déterminée selon la méthode décrite par [Paglia et Valentine \(1967\)](#). Le principe du test est basé sur la conversion de la NADPH + H<sup>+</sup> en NADP<sup>+</sup> en tant que résultat d'une série de réactions.

La procédure consiste à mélanger 1 mL de PBS (0,2M/L, pH 7,4), 0.1 mL d'EDTA (10 mM), 0.1 mL de l'azide de sodium (35%, p/v), 0.1 mL de NADPH+ H<sup>+</sup> (0.6 mM), 0,1 mL de glutathion réduit (35 mM) et 0,2 mL de glutathion réductase solutions et les ajouter à 0,2 mL d'homogénat de cellule hépatique. Après 2 à 3 min d'incubation à 37 ° C, 0.2 mL de t-BOOH (t-butylhydroperoxyde) dans l'eau distillée ont été ajoutés, et la lecture d'absorbance est lue à 405 nm 1min après la réaction. Les résultats ont été calculés en U/g Hb.

#### **II.9.9. Etude histo-pathologique**

A la fin de l'expérimentation, tous les animaux utilisés dans l'étude ont fait l'objet d'une étude anatomohistologique pratiquée sur le foie et cerveau des rats conservées dans du formol 10% et les résultats sont comparés à ceux du groupe témoin qui n'ont consommé que de l'eau et de la nourriture afin de mettre en évidence des changements possible dans l'architecture du tissu hépatique et cérébrale. La méthode utilisée est la technique de l'inclusion à la paraffine ([Hould, 1984](#)).

### **II.9.9.1. Préparation des coupes histologiques**

Après prélèvement des organes, ils sont immédiatement immergés dans un grand volume de liquide fixateur le formol 10% afin de conserver des structures dans un état aussi proche que possible de leur état vivant.

### **II.9.9.2. Déshydratation**

Le but de cette étape est d'éliminer l'eau intracellulaire, pour pouvoir réaliser une coupe fine par la suite sans perdre la structure cellulaire initiale au moment de la rupture de la membrane plasmique (sortie d'eau brutale) Ceci par passage du prélèvement dans des bains d'alcool de concentrations croissantes (de l'alcool à dilué 50° jusqu'à l'alcool absolu à 100°).

### **II.9.9.3. Imprégnation**

Par le passage du prélèvement dans un liquide intermédiaire afin d'en éliminer les traces d'alcool absolu. On utilise dans cette étape d'imprégnation le xylène ou le toluène, solvant intermédiaire favorable aux échanges membranaires entre l'alcool/toluène d'une part et toluène/paraffine d'autre part.

### **II.9.9.4. Inclusion**

Le milieu d'inclusion utilisé est la paraffine. Le prélèvement baigne dans de la paraffine fondue (chauffée à 56° C) donc devenue liquide et qui infiltre alors toute la pièce à l'aide d'un automate (Leica, Allemagne), on place les cassettes dans des moules métalliques, puis on verse au-dessus de ces cassettes de la paraffine liquide qu'on laisse solidifier avant de congeler.

### **II.9.9.5. La microtomie**

Des coupes de 5 µm sont réalisées à l'aide d'un microtome (Leica, Allemagne) à partir des cassettes congelées que l'on étale sur des lames propres avant de les déparaffiner par 2 bains successifs de 10 min dans du xylène.

### **II.9.9.6. Réhydratation**

La réhydratation permet l'élimination de la paraffine intracellulaire, en immergeant les lames dans des bains d'alcool de degrés décroissant (de l'alcool à 100° jusqu'à l'alcool à 50°), puis dans de l'eau distillée.

### **II.9.9.7. Coloration**

La coloration utilisée dans notre étude est la Coloration à l'hématoxyline-éosine (HE) ou

R.F.AOUAD (2022). Effet de Rosmarinus officinalis sur l'alcoolisme. Doctorat LMD en BTE. Univ. Saida  
l'hématoxyline (substance basique) colore les noyaux en violet et l'éosine (substance acide) colore le cytoplasme en rose. En pratique, cette coloration se fait de la manière suivante :

- Hématoxyline : un bain de 15 min ;
- Rinçage à l'eau ;
- Eosine : un bain d'une minute ;
- Xylène : 2 bains successifs d'une minute chacun.

#### **II.9.9.8. Montage et Observation microscopique**

Les coupes colorées sont montées entre lame et lamelle avec une résine synthétique 'Baume de Canada' dont l'indice de réfraction est proche de celui du verre. On obtient, ainsi, une préparation histologique prête à être observée au microscope optique.

#### **II.10. Analyses statistiques**

Le logiciel SigmaStat (SPSS, 3.0, SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) a été utilisé pour l'analyse statistique. Les données sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type et ont été évalués par ANOVA, avec le test post-hoc de Dunnett's. L'expérience portant sur l'étude *in Vivo* a été indépendamment répétée 6 fois dans un dispositif en randomisation totale. Les expériences *in vitro* ont été indépendamment répétées 3 fois dans un dispositif en randomisation totale. La différence est considérée significative à  $P < 0.05$ .

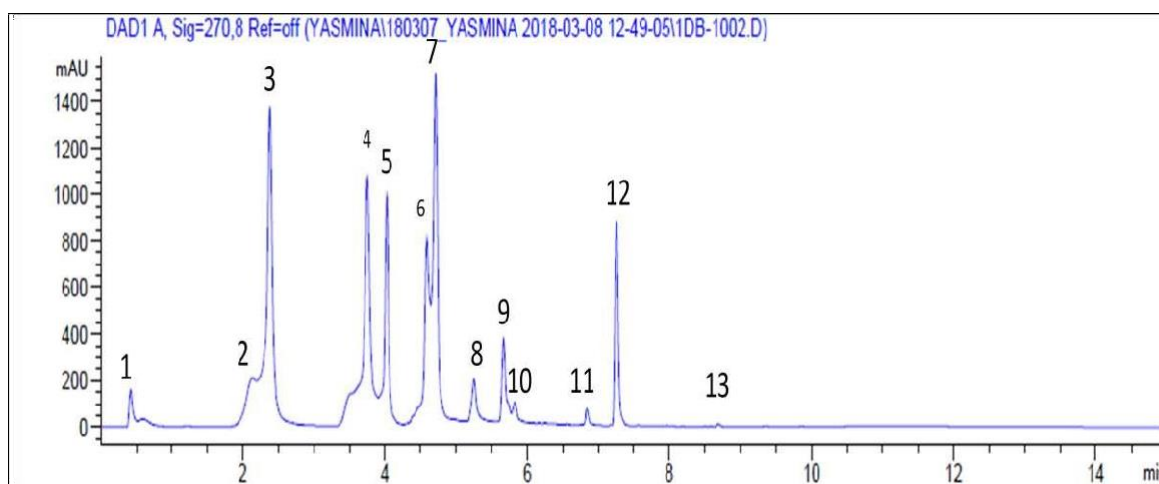
## Chapitre III : Résultats et discussion

### Parie I : Composition chimique et activité antioxydante du romarin

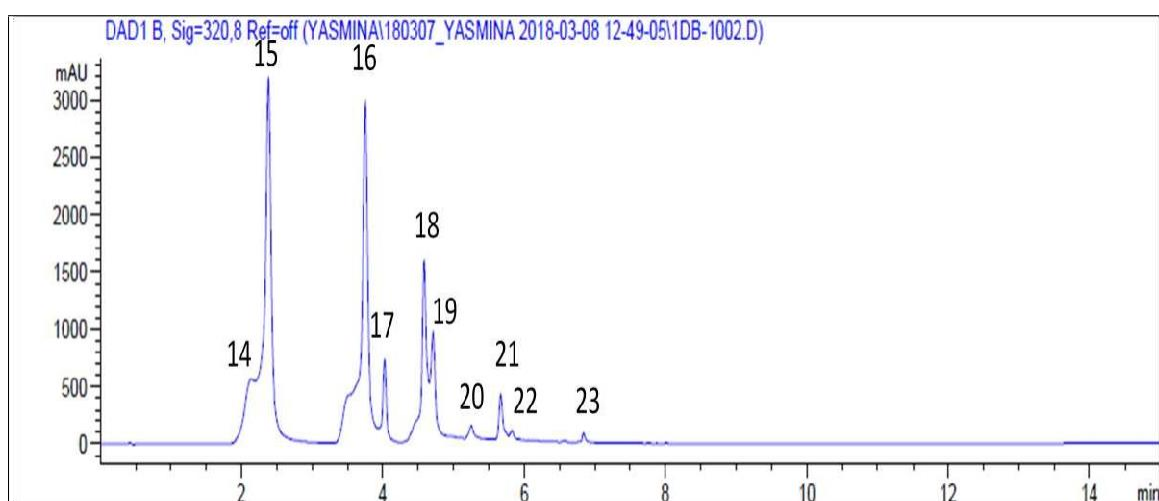
#### Résultats

##### **I.1. Identification de la composition chimique de *Rosmarinus officinalis* par HPLC/UV**

L'analyse chromatographique par HPLC/UV a été réalisée dans le but d'identifier et quantifier les acides phénoliques et les flavonoïdes de l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* (EER). L'extrait EER a été analysé sur deux longueurs d'ondes différentes à 270 nm pour l'identification des flavonoïdes (fig. 12) et 320 nm pour l'identification des acides phénoliques (fig. 13).



**Figure 12:** Chromatogrammes par analyse HPLC/UV d'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* à une longueur d'onde de 270 nm.



**Figure 13:** Chromatogrammes par analyse HPLC/UV d'extrait éthanolique *Rosmarinus officinalis* à une longueur d'onde de 320 nm.

La comparaison des temps de rétention de l'extrait éthanolique *Rosmarinus officinalis* avec ceux des différents standards a révélé la présence de 23 composés phénoliques comme le [tableau 02](#) en illustre.

**Tableau 02:** Composition d'extrait éthanolique d'*Elettaria cardamomum* (EER) par HPLC/UV (mg/ g).

Nombre du pic	Composé	Quantité (mg/g EER)	Temps de rétention (min)
1	Galangin	0.19	0.58
2	Epicatéchine	0.17	2.13
3	Catéchine	9.56	2.37
4	Lutéoline	7.34	3.74
5	Kaempferol	0.79	4.02
6	Quercetine bis méthylée	5.05	4.58
7	Quercetine	11.94	4.71
8	Pinocembrine	0.93	5.25
9	Carnosol	1.96	5.66
10	Myricétine	0.15	5.82
11	Menthol	0.11	6.84
12	Chrysine	6.33	7.25
13	Thymol	0.06	8.68
14	Acide syringique	1.32	2.13
15	Acide rosmarinique	11.85	2.37
16	Acide gallique	7.46	3.74
17	Trans cinnamique	1.80	4.02
18	Acide caféique	3.66	4.58
19	Acide carnosique	2.89	4.71
20	Acide ascorbique	0.22	5.25
21	Acide férulique	1.43	5.66
22	Acide tannique	0.15	5.82
23	Acide ellagique	0.09	6.84

Selon les résultats obtenus, treize flavonoïdes ont été identifiés; dix acides phénoliques et un acide organique.

Une prépondérance de la quercétine, la catéchine, la lutéoline et la chrysine est aperçue comme étant les flavonoïdes majeurs de l'extrait de *Rosmarinus officinalis*, avec un taux de 11.94, 9.56, 7.34 et 6.33 mg/g EER, ils ont été apparus à un temps de rétention de ( $R_t=4.71$ , 2.37, 3.74 et 7.25 min), respectivement. En outre, le taux en acide phénolique le plus élevé

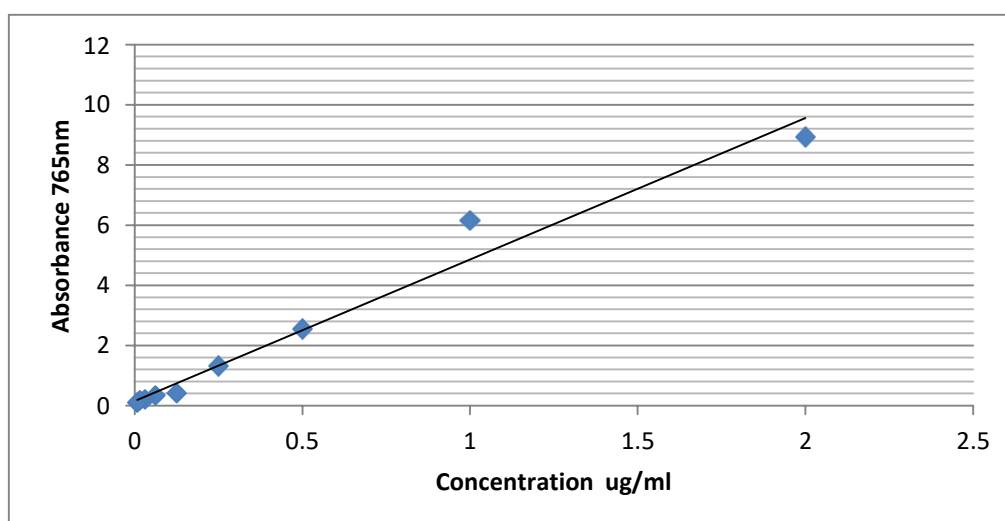
était celui d'acide rosmarinique (11.85 mg/g d'EER avec un  $R_t=2.37$  min) ainsi que celui de l'acide gallique (7.46 mg/gd'EER,  $R_t=3.74$  min).

## I.2. Le rendement

Le rendement de l'extraction éthanolique de *Rosmarinus officinalis* est de 8.5%.

## I.3. Teneur en polyphénols totaux de l'extrait du romarin

Les résultats de la teneur en polyphénols totaux de l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* sont consignés dans le [tableau 03](#), indiquant que l'extrait possède une proportion très élevée en polyphénols totaux, qu'est de 223.25 mg EAG/g.



**Figure 14 :** Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

## I.4. Teneur en flavonoïdes de l'extrait du romarin

Le dosage des flavonoïdes d'extrait du romarin a permis d'obtenir les résultats qui sont présentés ci-dessous dans le [tableau 03](#). Nos résultats montrent une teneur en flavonoïdes de l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* estimée de 83.7 mg EQ/g d'extrait sec d'EER.

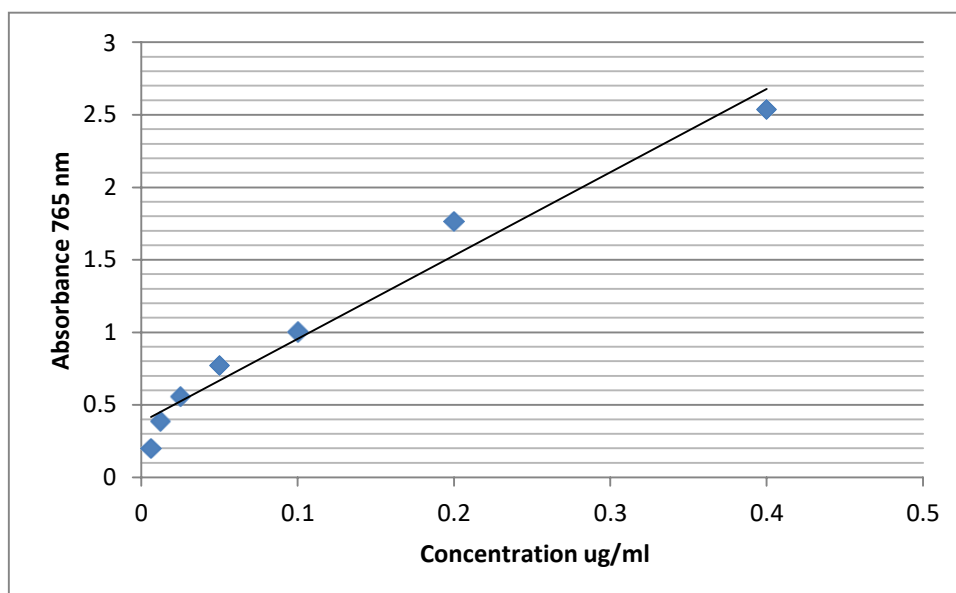


Figure 15 : Courbe d'étalonnage de la quercétine.

**Tableau 03 :** Teneur en composés phénoliques et flavonoïques, et activité antioxydante de l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis*.

Extrait éthanolique de <i>Rosmarinus officinalis</i>	Composés phénoliques		Activité antioxydante	
	Polyphenols (mg EAG/g d'EER)	Flavonoïdes (mg EQ/g d'EER)	CE <sub>50</sub> DPPH (µg/mL)	CE <sub>50</sub> lipoperoxydation (µg/mL)
	223.25 ± 4.03	83.7 ± 5.95	159.53 ± 9.67	29.03 ± 0.23

Les valeurs représentent la moyenne (m) de 3 déterminations ± écart type (n = 3).

### I.5. L'inhibition de la lipoperoxydation

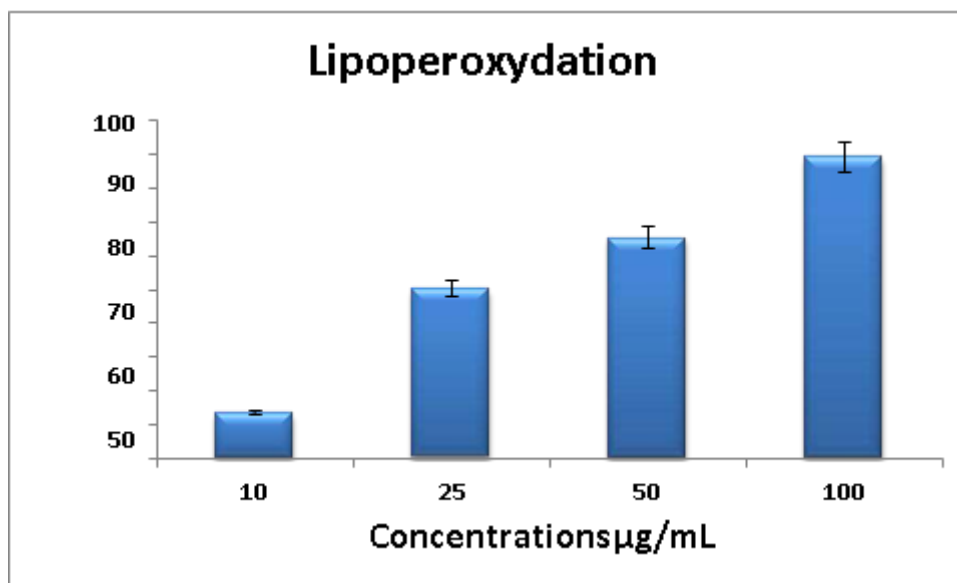
Le pouvoir inhibiteur de la peroxydation lipidique de l'extrait éthanolique EER est présenté dans la figure 16.

L'extrait éthanolique d'*Elettaria cardamomum*, présente des taux d'inhibition de la lipoperoxydation qui varie entre 13.34 à 89.19 %.

On remarque que les taux d'inhibition de l'extrait de *Rosmarinus officinalis* (EER) sont de l'ordre de 65.40 et 89.19 %, respectivement, pour les concentrations 50 et 100 µg/mL. Tandis qu'à des concentrations de 10 et 25 µg/mL, l'extrait EER a montré un effet inhibiteur relativement inférieur de 13.34 et 50.22 %, respectivement. Cette activité inhibitrice est significativement dose dépendante. La CE<sub>50</sub> de l'inhibition de la peroxydation lipidique est



de l'ordre de  $29.03 \pm 0.23 \mu\text{g/mL}$ .

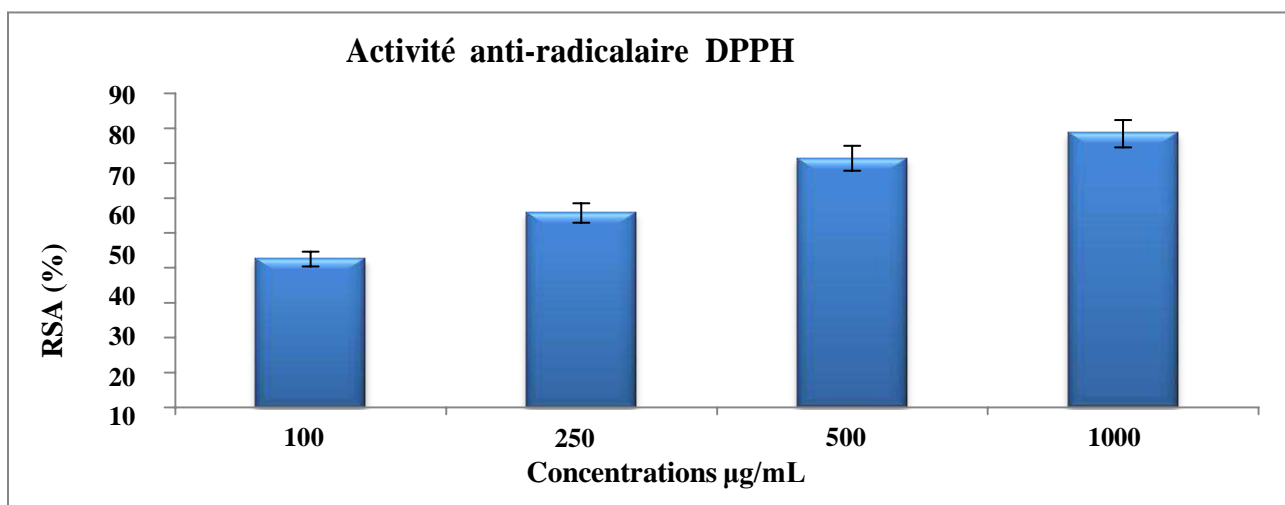


**Figure 16:** Pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique d'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis*. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 3 déterminations  $\pm$  écart type (n = 3).

#### I.6. Piégeage du radical DPPH•

L'activité anti-radicalaire de piégeage d'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée par le test de scavenging de ce radical (fig. 17).

Les résultats montrent que l'extrait de *Rosmarinus officinalis* (EER) a une activité anti-radicalaire très importante. L'extrait EER avaient une  $CE_{50} = 159.53 \mu\text{g/mL}$ .



**Figure 17:** Pouvoir anti-radicalaire (RSA%) des différentes concentrations (100, 250, 500, et 1000  $\mu\text{g/mL}$ ) d'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis*. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 3 déterminations  $\pm$  écart type (n = 3).

## **Discussion**

Zimmermann *et al.* (2011) ont identifié par HPLC/MS/MS, l'acide rosmarinique et la lutéoline-O-glucoside, alors que la sauge contient d'autres acides phénoliques tels que l'acide salvianolique, l'acide méthylhydrojasmonique, l'acide chlorogénique, l'acide caféique, syringique, rosmarin, salvianolique K et salvianolique I, et le rosmarinate de méthyle. La présence de lutéoline 3-glucuronide, ainsi que d'autres glycosides de flavones, dans la sauge a également été confirmée par Cvetkovikj *et al.* (2013).

Certains autres composés phénoliques ont également été trouvés dans l'extrait du romarin, tels que l'acide chlorogénique, l'isorhamnétine-lutéoline, l'apigénine-7-O-glucoside, l'acide caféique, l'homoplantagine et l'apigénine-acétylglucoside, qui représentaient 49,11% de la surface totale du pic, selon à l'étude de Li *et al.* (2017). Conformément aux rapports précédents, nos résultats montrent que le romarin varie considérablement en fonction de la composition du solvant et les résultats sont cohérents avec des études antérieures qui ont montré que la nature du solvant exerce un grand pouvoir sur les capacités d'extraction phénoliques chez de nombreuses espèces (Akowuah *et al.*, 2005 ; Turkmen *et al.*, 2006).

De plus, ce résultat était cohérent avec les rapports précédents suggérant qu'un système solvant binaire (éthanol/eau) est plus efficace qu'un système mono-solvant (eau ou éthanol pur) dans l'extraction des composés phénoliques en termes de leur polarité relative (Wang *et al.*, 2008 ; Zhang *et al.*, 2007).

Pendant les dernières années, le romarin et ses constituants (le carnosol, l'acide carnosique, l'acide ursolique, l'acide rosmarinique, l'acide caféique) sont intensivement étudié (Slamenova *et al.*, 2002). L'acide carnosique et le carnosol, sont responsables de 90% de l'activité antioxydante du romarin (Wei et Ho, 2006 ; Visanji *et al.*, 2006). D'autres composés, tels que la genkwanine, la cirsimaritrine (Ramirez *et al.*, 2007), l'acide chlorogénique, l'acide caféique (Peng *et al.* 2005), les caroténoïdes et  $\alpha$ - tocophérol sont également associés à l'activité anti-oxydante du romarin (Amin et Hamza, 2005). Des études ont montré que certains composés, comme le rosmanol, rosmariquinone, rosmaridiphénol et le carnosol, sont plus effectifs que le BHA et égale au BHT (Fernandez-Lopez *et al.*, 2005).

Nos résultats indiquent que notre extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* demeure riche en polyphénols. Maisuthisakul *et al.* (2008) ont constaté que la teneur totale des flavonoïdes des extraits éthanoliques de 28 plantes, est liée à la teneur des composés phénoliques totaux car les flavonoïdes constituent la classe polyphénolique la plus importante, avec plus de 5000 composés déjà décrits (Gomez-Caravaca *et al.*, 2006).

Cette différence peut être expliquée par la variation de la distribution et la teneur des métabolites secondaires pendant la croissance de la plante à cause des facteurs intrinsèques et extrinsèques (Falleh et al., 2008 ; Podsedek, 2007). Ceci peut être lié aux conditions climatiques et environnementales (la température élevée, exposition solaire, sécheresse, salinité), qui stimulent la biosynthèse des métabolites secondaires tels que les polyphénols et qui dépend aussi du moment de la récolte, localisation géographique, le solvant d'extraction, les conditions et durée de stockage (Karousou et al., 2005 ; Marotti et al., 1994 ; Park et Cha, 2003 ; Ozgiiven et Tansi, 1998).

Les résultats obtenus ont montré que l'extrait EER réduit d'une manière dose-dépendante le radical DPPH, c'est-à-dire le pourcentage de réduction (ou inhibition) du DPPH augmente avec l'augmentation des concentrations de l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis*, jusqu'à un seuil où le pourcentage d'inhibition se stabilise avec l'élévation de la concentration de l'extrait.

L'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* présente une activité antiradicalaire très importante, avec un  $IC_{50}$  de  $159.53 \pm 9.67 \mu\text{g/mL}$ . Cette activité est supérieure à celui qu'exerce l'acide ascorbique qui est de  $46,95 \pm 9.67 \mu\text{g/mL}$ . Le résultat obtenu est supérieur à celui de Naciye et al. (2008) qui ont montré une  $IC_{50} = 54 \mu\text{g/mL}$  et inférieur à celui de Aneta et al. (2007) où ils ont observé une  $IC_{50} = 513 \mu\text{g/mL}$ .

Dorman et al. (2003) ont montré que la capacité antioxydante des extraits des plantes examinés (origan, romarin, sauge et le thym) n'est nécessairement liée à un contenu élevé de composés phénoliques, mais vraisemblablement dépend fortement de l'acide rosmarinique, le composant phénolique principal actuel dans ce type d'extrait de Lamiaceae.

Il nous notons qu'il y a une corrélation entre la concentration des polyphénols et l'activité antioxydante, ce qui confirme que les polyphénols sont des antioxydants puissants capables d'inhiber la formation des radicaux libres et de s'opposer à l'oxydation des macromolécules. Ces résultats sont conformes à ceux de plusieurs auteurs qui ont rapporté une telle corrélation positive entre le contenu phénolique total et l'activité antioxydante. En effet l'activité antioxydante ne dépend pas seulement de la concentration des polyphénols, mais également de la nature et la structure des antioxydants dans l'extrait (Cosio et al., 2006).

## **Partie II: Effet de l'éthanol sur le poids corporel et l'action neuroprotectrice de l'extrait du romarin**

### **Résultats**

#### **II.1. Effet de l'éthanol sur le poids corporel et le poids du cerveau**

Le [tableau 04](#) montre la détermination du poids corporel et le poids du cerveau chez les rats intoxiqués par l'éthanol comparés aux rats témoins.

Les résultats du poids corporel montrent que les animaux exposés à l'éthanol (G2) présentent une diminution significative ( $P<0.05$ ) du poids corporel par rapport à ceux du groupe témoin (G1), ce qui peut être expliqué par une baisse dans la prise alimentaire (food intake).

En revanche, les animaux qui sont exposés à l'éthanol et traités par EER (G4) montrent une augmentation significative ( $P<0.05$ ) du poids corporel par rapport aux rats intoxiqués non traités (G2).

Les rats intoxiqués par l'éthanol (G2) révèlent une baisse significative ( $P<0.05$ ) dans le poids du cerveau par rapport aux témoins. Par contre, les animaux qui ont été traités par l'extrait de *Rosmarinus officinalis* (EER) présentent une augmentation significative ( $P<0.05$ ) du poids des cerveaux étudiés par rapport aux rats intoxiqués.

**Tableau 04** : Evaluation des paramètres pondéraux des rats

	<b>G1 : Témoin</b>	<b>G2 : Intoxiqué</b>	<b>G3 : Traité</b>	<b>G4 : Intoxiqué-traité</b>
<b>Poids corporel (g)</b>	274.33±2.21	217.33±5.88***	275.48±0.21	242.67±4.38***
<b>Cerveau (g)</b>	1.59±0.005	1.31±0.055***	1.59±0.008	1.52±0.013***

Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM (\*\*\*:  $P<0.05$ ).

## II.2. Tests neurocomportementaux

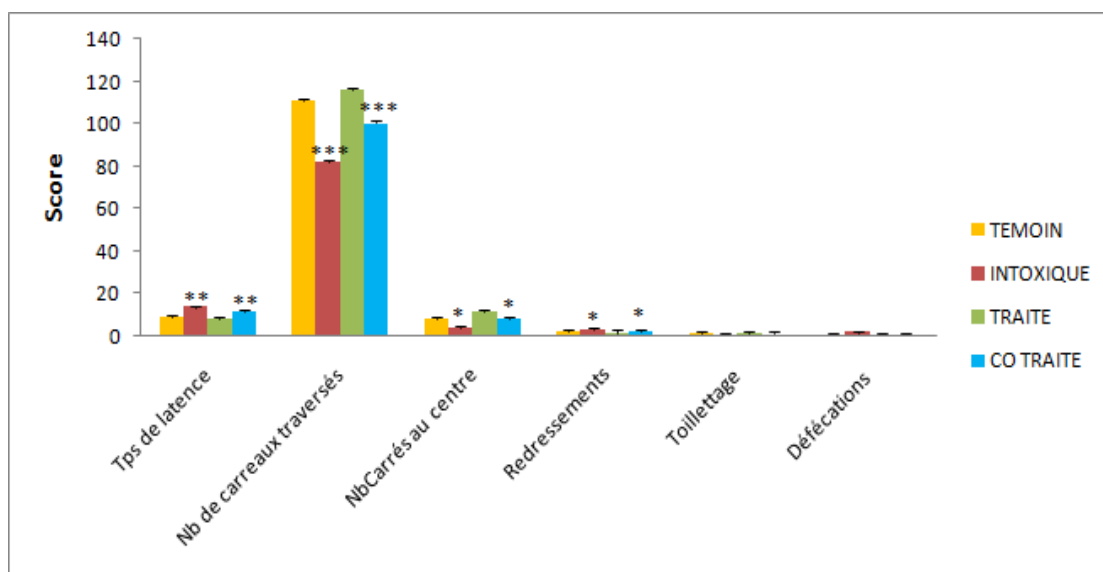
### II.2.1. Open Field

Ce test permet d'évaluer la réaction de l'animal vis-à-vis d'un environnement nouveau et spécial, ainsi que son désir à explorer les espaces.

Les rats qui ont été exposés à l'éthanol (G2) montrent une hypoactivité locomotrice (horizontale et verticale) qui est représentée par le nombre de carreaux traversés et le nombre de redressement par rapport aux rats du groupe témoin (G1).

En outre, nous avons remarqué l'installation d'un état d'anxiété chez le groupe intoxiqué par l'éthanol (G2), ce qui a été démontré par une baisse significative ( $p < 0.05$ ) de nombre de visites du centre en comparant aux rats témoins (G1). De plus, les rats intoxiqués et traités par EER (G4) présentent une augmentation significative ( $p < 0.05$ ) en terme de nombres de visites du centre (fig. 18).

De même, au cours de ce test, aucune différence significative ( $p > 0,05$ ) n'est observée en terme de nombre de défécations et du nombre de toilettage entre les différents groupes des rats.



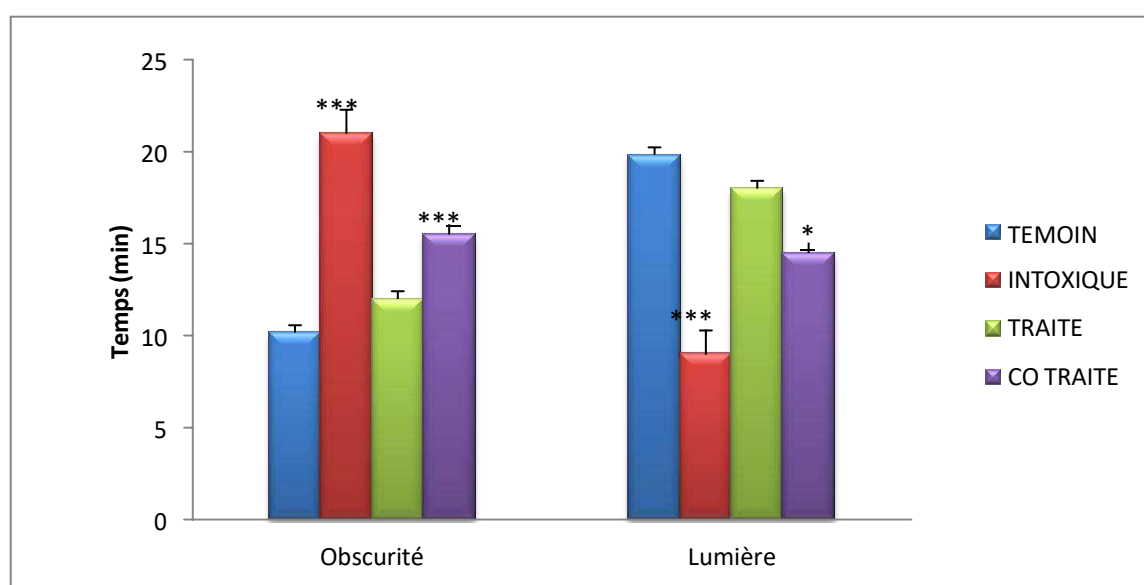
**Figure 18 :** La comparaison des différents paramètres du test d'open-field chez les rats traités ou/non par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* (EER et/ou l'éthanol).

G1 : Témoin ; G2 : 5 mL d'éthanol 20% (90 jours) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (90 jours) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL d'éthanol 20% (90 jours).

Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations  $\pm$ SEM (n = 6) ; intoxiqué vs T (\*\*\*: $p < 0.001$ ); intoxiqué- EER vs intoxiqué (\*\*\*: $p < 0.001$ ) ; intoxiqué- EER vs intoxiqué (\*\*\*: $p < 0.005$ ).

## II.2.2. Dark and Light Test

Les résultats obtenus ont révélés que les animaux intoxiqués par l'éthanol (G2) ont tendance de passer plus du temps dans le compartiment clair durant les 5 min du test par rapport aux animaux du groupe témoin (G1) ( $p < 0,001$ ), ce qui permet d'évaluer l'état d'anxiété des rats. En effet les rats intoxiqués et traités par la l'extrait de *Rosmarinus officinalis* (G4) passent un temps significativement inférieur ( $p < 0,005$ ) par rapport aux rats intoxiqués dans le compartiment éclairé. Chez les rats témoins (G1) et les rats traités par EER (G3) aucune différence significative n'a été remarquée (fig. 19).



**Figure 19 :** Le temps passé dans le compartiment éclairé chez les rats traités ou/non par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* (EER et/ou l'éthanol).

G1 : Témoin ; G2 : 5 mL d'éthanol 20% (90 jours) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (90 jours) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL d'éthanol 20% (90 jours).

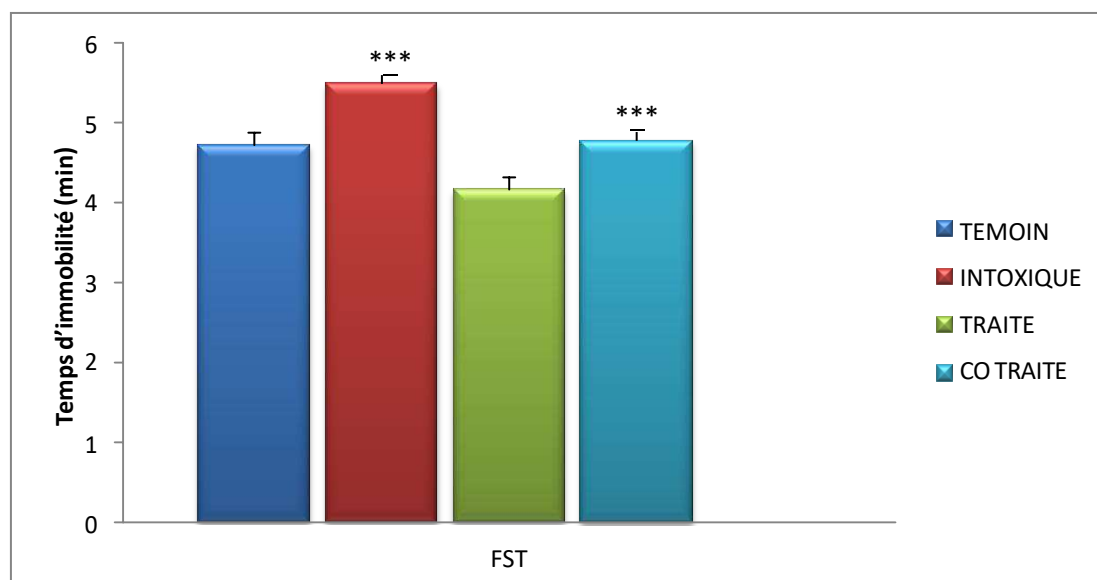
Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations  $\pm$ SEM (n = 6) ; intoxiqué vs T (\*\*\*: $p < 0.001$ ) ; intoxiqué- EER vs intoxiqué (\*\*\*: $p < 0.001$ ) ; intoxiqué- EER vs intoxiqué (\*\*\*: $p < 0.005$ ).

## II.2.3. L'épreuve de la nage forcée (Forced Swimming Test)

Les résultats relatifs au test de la nage forcée ont montrés un temps d'immobilité (TIM) significativement supérieur ( $p < 0.001$ ) chez les rats intoxiqués par l'éthanol (G2) comparé à celui des rats témoins (G1). Cette augmentation explique l'incapacité de l'animal à nager, ceci

est dû à une diminution du tonus musculaire et l'instauration d'un comportement de désespoir.

Dans le même contexte, l'administration de l'extrait de *Rosmarinus officinalis* (G3) a montré une diminution de TIM par rapport aux rats témoins. De plus nous avons observé une diminution significative ( $p < 0.001$ ) de TIM des rats intoxiqués et traités par EER (G4) à celui des rats intoxiqués (G2), ce qui pourrait s'expliquer par une réduction dans le comportement de désespoir (fig. 20).



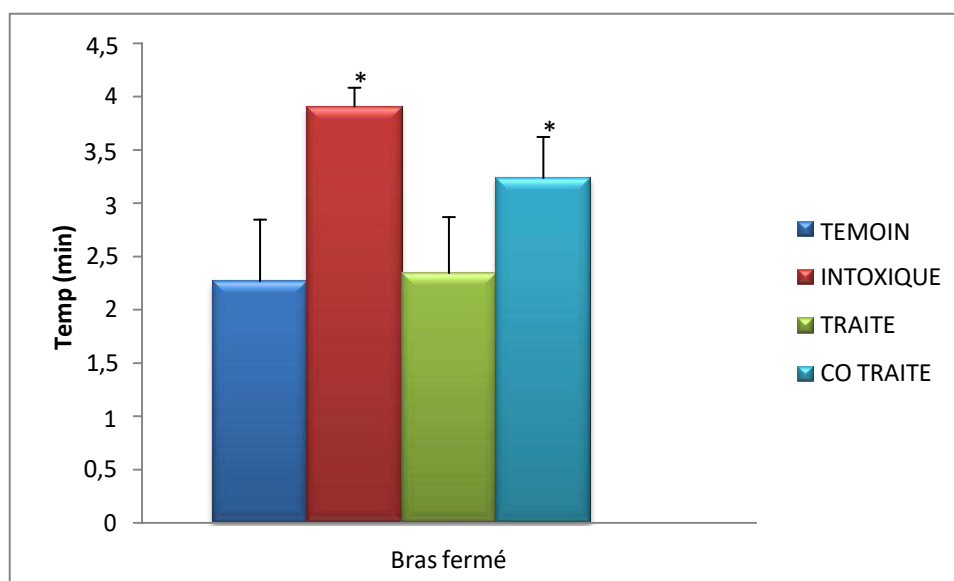
**Figure 20 :** Le temps d'immobilité durant le test de la nage forcée chez les rats traités ou/non par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* (EER et/ou l'éthanol).

G1 : Témoin ; G2 : 5 mL d'éthanol 20% (90 jours) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (90 jours) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL d'éthanol 20% (90 jours).

Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations  $\pm$ SEM (n = 6) ; intoxiqué vs T (\*\*\*: $p < 0.001$ ); intoxiqué- EER vs intoxiqué (\*\*\*: $p < 0.001$ ) ; intoxiqué- EER vs intoxiqué (\*\*\*: $p < 0.005$ ).

#### II.2.4. Le labyrinthe en croix surélevé « Elevated plus maze »

Les résultats indiquent que les rats du groupe 2 (intoxiqués par l'éthanol) ont montré une augmentation significative ( $p < 0.05$ ) de la durée de séjour dans les bras fermés par rapport aux bras ouverts, en comparant aux rats témoins (G1), sachant que ces rats ont une aversion naturelle pour les espaces ouverts. Cependant, l'administration de l'extrait du romarin aux rats intoxiqués (G4) améliore l'état en diminuant la durée de séjour dans bras fermés (fig. 21).



**Figure 21:** Le temps de séjour dans les Bras fermé durant le test du labyrinthe en croix surélevée chez les rats traités ou/non par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* (EER et/ou l'éthanol).

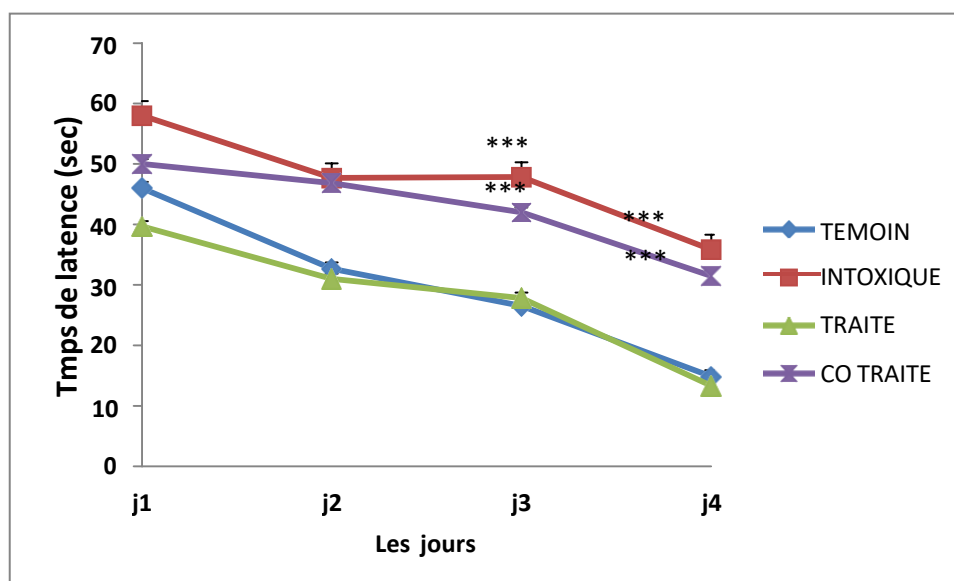
G1 : Témoin ; G2 : 5 mL d'éthanol 20% (90 jours) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (90 jours) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL d'éthanol 20% (90 jours).

Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations  $\pm$ SEM (n = 6) ; intoxiqué vs T (\*\*\*:p<0.001); intoxiqué- EER vs intoxiqué (\*\*\*:p<0.001) ; intoxiqué- EER vs intoxiqué (\*\*\*:p<0.005).

## II.2.5. Test de la piscine de Morris

Le labyrinthe aquatique permet d'évaluer les capacités exploratoires et l'apprentissage spatial chez les rats. Les résultats ne révèlent aucune différence significative dans le temps de latence pendant le 1<sup>er</sup> et le 2<sup>ème</sup> jour de la phase d'acquisition. Pendant le 3<sup>ème</sup> et le 4<sup>ème</sup> jour de la phase d'acquisition, les résultats illustrent que le temps de latence des rats intoxiqués par l'éthanol (G2) est significativement supérieur (p<0,001) à celui des rats témoins. De plus, nous avons remarqué que l'administration de l'extrait de *Rosmarinus officinalis* aux rats intoxiqués par l'éthanol (G4) diminue de manière significative (p<0.001) le temps de latence durant le 3<sup>ème</sup> et le 4<sup>ème</sup> jour de la phase d'acquisition en comparaison avec les rats intoxiqués par l'éthanol (G2) (fig. 22).





**Figure 22:** Test de la piscine de Morris, le temps de latence durant la phase d'apprentissage (4 jours) chez les rats traités ou/non par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* (EER et/ou l'éthanol).

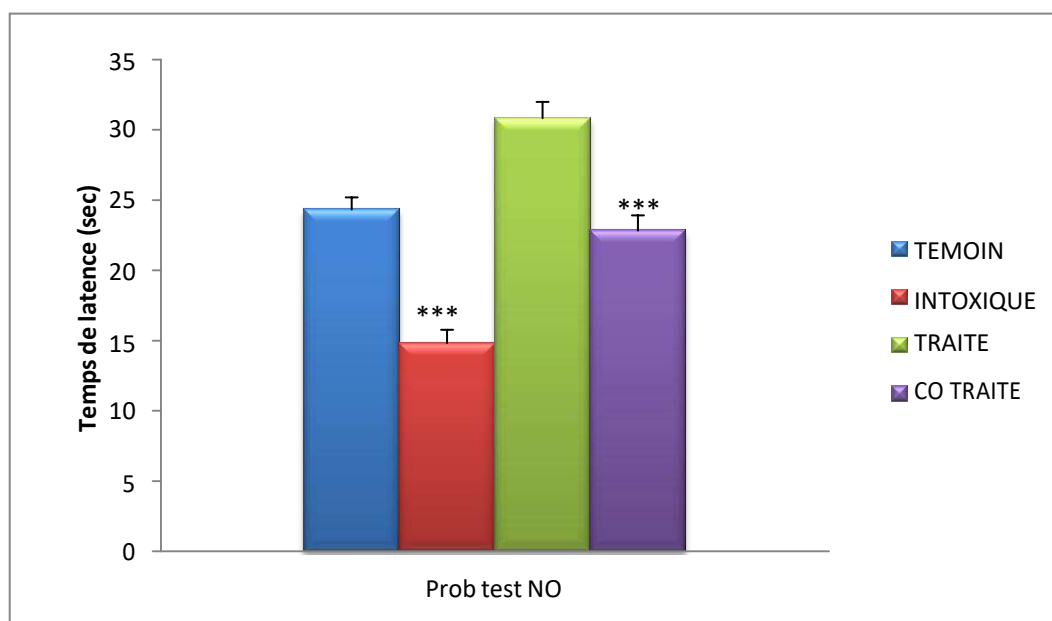
G1 : Témoin ; G2 : 5 mL d'éthanol 20% (90 jours) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (90 jours) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL d'éthanol 20% (90 jours).

Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations  $\pm$ SEM (n = 6) ; intoxiqué vs T (\*\*\*:p<0.001); intoxiqué- EER vs intoxiqué (\*\*\*:p<0.001) ; intoxiqué- EER vs intoxiqué (\*\*\*:p<0.005).

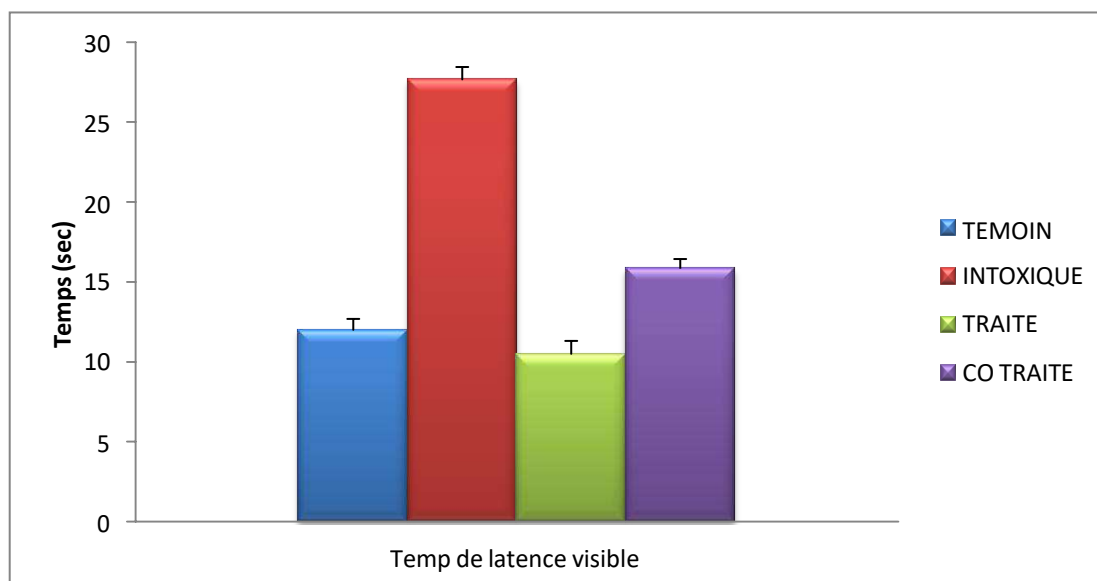
Le probe test a révélé une différence significative de temps de latence dans le quadrant NO (c'est le quadrant cible qui contient la plateforme) entre les rats témoins (G1) et les rats intoxiqués par l'éthanol (G2), ce dernier a un temps de latence significativement inférieur ( $p < 0,001$ ) par rapport à celui de témoin.

L'administration de l'extrait de *Rosmarinus officinalis* a considérablement augmentée le temps de latence dans le quadrant de la plate forme chez les rats intoxiqués et traités par le romarin (G4) par rapport aux rats intoxiqués par l'éthanol (G2) (fig. 23). Ces résultats suggèrent que l'EER améliore la mémoire des rats altérée par l'administration de l'éthanol.

Durant le test de la plateforme visible, les rats intoxiqués ne présentent aucune différence significative ( $p > 0,05$ ) en terme de temps de latence comparé à celui des rats témoins (fig. 24).



**Figure 23 :** Le temps passé dans le cadrant (NO) durant le probe test chez les rats traités ou/non par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* (EER et/ou l'éthanol).  
G1 : Témoin ; G2 : 5 mL d'éthanol 20% (90 jours) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (90 jours) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL d'éthanol 20% (90 jours).  
Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations  $\pm$ SEM (n = 6) ; intoxiqué vs T (\*\*\*:p<0.001); intoxiqué- EER vs intoxiqué (\*\*\*:p<0.001) ; intoxiqué- EER vs intoxiqué (\*\*\*:p<0.005).



**Figure 24 :** Le temps de latence durant la plateforme visible chez les rats traités ou/non par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* (EER et/ou l'éthanol).  
G1 : Témoin ; G2 : 5 mL d'éthanol 20% (90 jours) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (90 jours) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL d'éthanol 20% (90 jours).  
Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations  $\pm$ SEM (n = 6) ; intoxiqué vs T (\*\*\*:p<0.001); intoxiqué- EER vs intoxiqué (\*\*\*:p<0.001) ; intoxiqué- EER vs intoxiqué (\*\*\*:p<0.005).

## II.3. Statut antioxydant

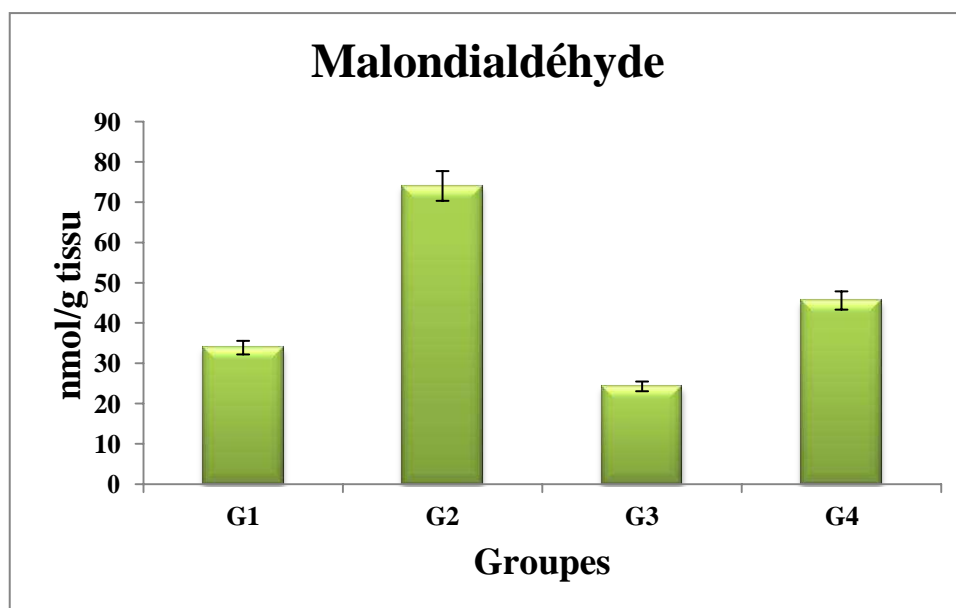
### II.3.1. Taux du malondialdéhyde (MDA)

Les résultats de l'effet de l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* et de l'éthanol sur la peroxydation lipidique du tissu cérébral sont illustrés dans la [figure 25](#).

Chez les rats du groupe G2, l'éthylisme induit par l'éthanol s'accompagne d'une augmentation significative ( $P < 0.05$ ) des teneurs en MDA cérébral. En effet, la valeur en MDA est de l'ordre de 2.18 fois plus comparée à celle notée chez les rats du groupe témoin (G1).

Ainsi, les résultats obtenues laissent déduire que les rats du G4 qui ont subi simultanément l'administration de l'extrait EER et l'éthanol au même temps présentent une réduction significative ( $P < 0.05$ ) des valeurs du MDA dans le tissu cérébral avec un taux de - 38.42 % comparativement au groupe 2.

Cependant, une légère réduction du MDA au niveau du cerveau était observée chez le groupes de rats ayant été administrés uniquement par l'extrait du romarin (G3), cette diminution est estimée de - 28.34 % en comparaison avec le groupe témoin.



**Figure 25:** Les teneurs sériques en malondialdéhyde (nmol/g tissu) chez les rats traités par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* et/ou l'éthanol. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations  $\pm$ SEM (n = 6).

G1 : témoin ; G2 : 5 mL éthanol (trois mois) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (trois mois) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL éthanol au même temps (trois mois).

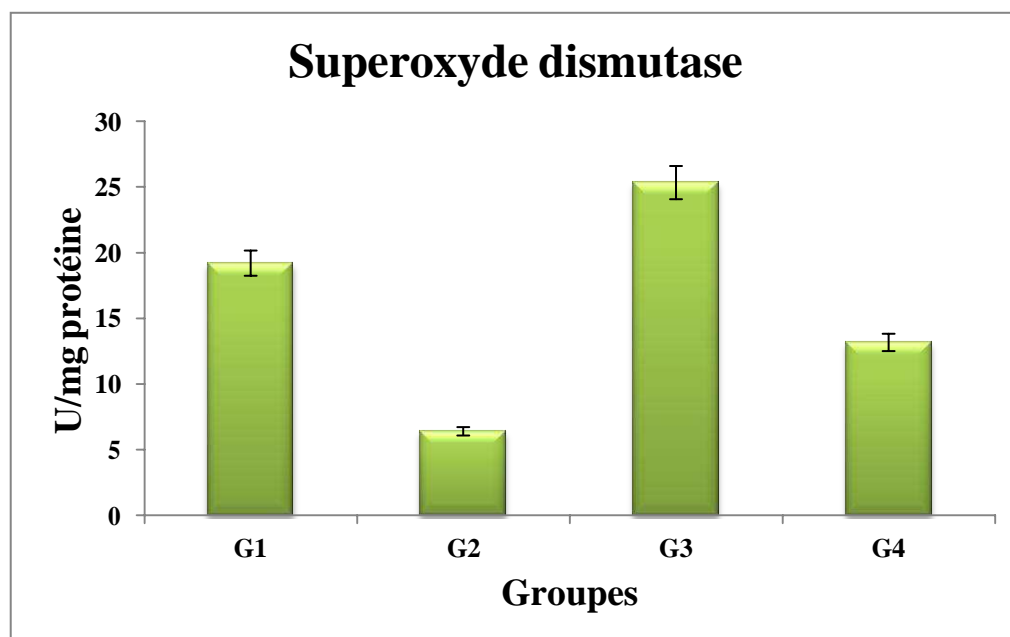
### II.3.2. Taux du superoxyde dismutase (SOD)

Les concentrations de l'enzyme antioxydante au niveau du cerveau ; superoxyde dismutase (SOD) sont consignées dans la [figure 26](#).

Chez les rats intoxiqués par l'alcool (G2), nous avons constaté une réduction hautement significative ( $P < 0.05$ ) de l'activité enzymatique du superoxyde dismutase cérébrale à un taux de -66.67 %, cela est due à l'éthylisme induit par l'éthanol qui a engendré une toxicité cérébrale chez les rats du G2 par rapport au groupe témoin (G1).

Toutefois, une augmentation très accrue de cette enzyme antioxydante a été observée chez les animaux du G3 (qui ont reçu uniquement 200 mg/kg/j d'EER pendant 90 jours) avec une amélioration de l'ordre de + 31.93 % par rapport aux rats du G1.

L'activité enzymatique a été corrigée et restaurée d'une manière significative ( $P < 0.05$ ) chez les rats ayant subi simultanément l'extrait du romarin et l'éthanol (G4) avec un écart d'augmentation estimé de 2.06 fois par rapport aux rats alcoolisés du G2.



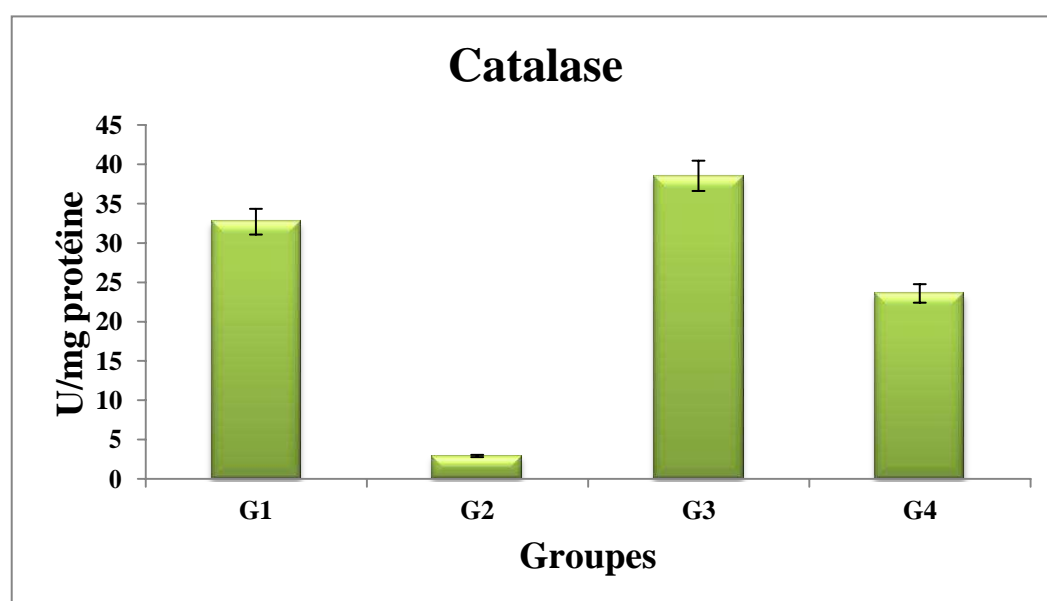
**Figure 26:** Teneurs en superoxyde dismutase (SOD) chez les rats traités par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* et/ou l'éthanol. Les valeurs représentent la moyenne ( $m$ ) de 6 déterminations  $\pm$ SEM ( $n = 6$ ).

G1 : témoin ; G2 : 5 mL éthanol (trois mois) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (trois mois) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL éthanol au même temps (trois mois).

### II.3.3. Taux de catalase (CAT)

Les résultats montrent que le taux de catalase au niveau du tissu cérébral sont significativement diminués ( $P < 0.05$ ) chez les rats alcooliques (G2) avec une proportion estimée de 2.9 U/mg protéine, en comparaison avec le groupe G1 (32.7 U/mg protéine) (fig. 27).

Néanmoins, l'administration de l'extrait éthanolique EER a atténué l'intoxication induite par l'éthanol (G4) à un écart soit de +87.70 %, comparativement au G2.



**Figure 27:** Teneurs en catalase (CAT) chez les rats traités par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* et/ou l'éthanol. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations  $\pm$ SEM (n = 6).

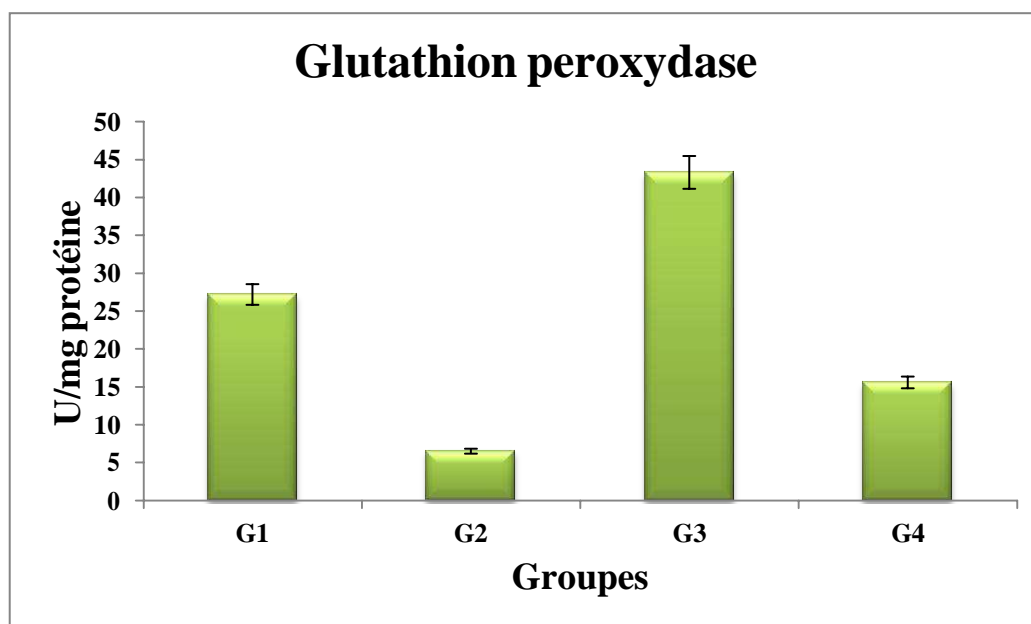
G1 : témoin ; G2 : 5 mL éthanol (trois mois) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (trois mois) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL éthanol au même temps (trois mois).

### III.3.4. Taux du glutathion peroxydase (GSH-Px)

Les rats alcoolisés du groupe G2 ayant reçu uniquement l'éthanol ont montré une diminution très significative ( $P < 0.05$ ) de l'enzyme antioxydante au niveau du cerveau; GSH-Px (6.5 U/mg protéine) par rapport au groupe témoin (G1) (fig. 28).

Comparativement aux rats du G2, l'extrait du romarin a augmenté significativement ( $P < 0.05$ ) le taux du glutathion peroxydase cérébrale chez les rats recevant le romarin et l'éthanol en même temps (G4) (15.57 contre 6.5 U/mg protéine).

Tandis, que le groupe G3 (qui a reçu uniquement 200 mg/kg/j d'EER pendant 90 jours) a montré une augmentation prépondérante de la concentration de cette enzyme antioxydante au niveau cérébrale avec un taux de l'ordre de +37.18 % en comparaison à celle observée chez les rats du groupe témoin (G1).



**Figure 28:** Teneurs en glutathion peroxydase (GSH-Px) chez les rats traités par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* et/ou l'éthanol. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations  $\pm$ SEM (n = 6).

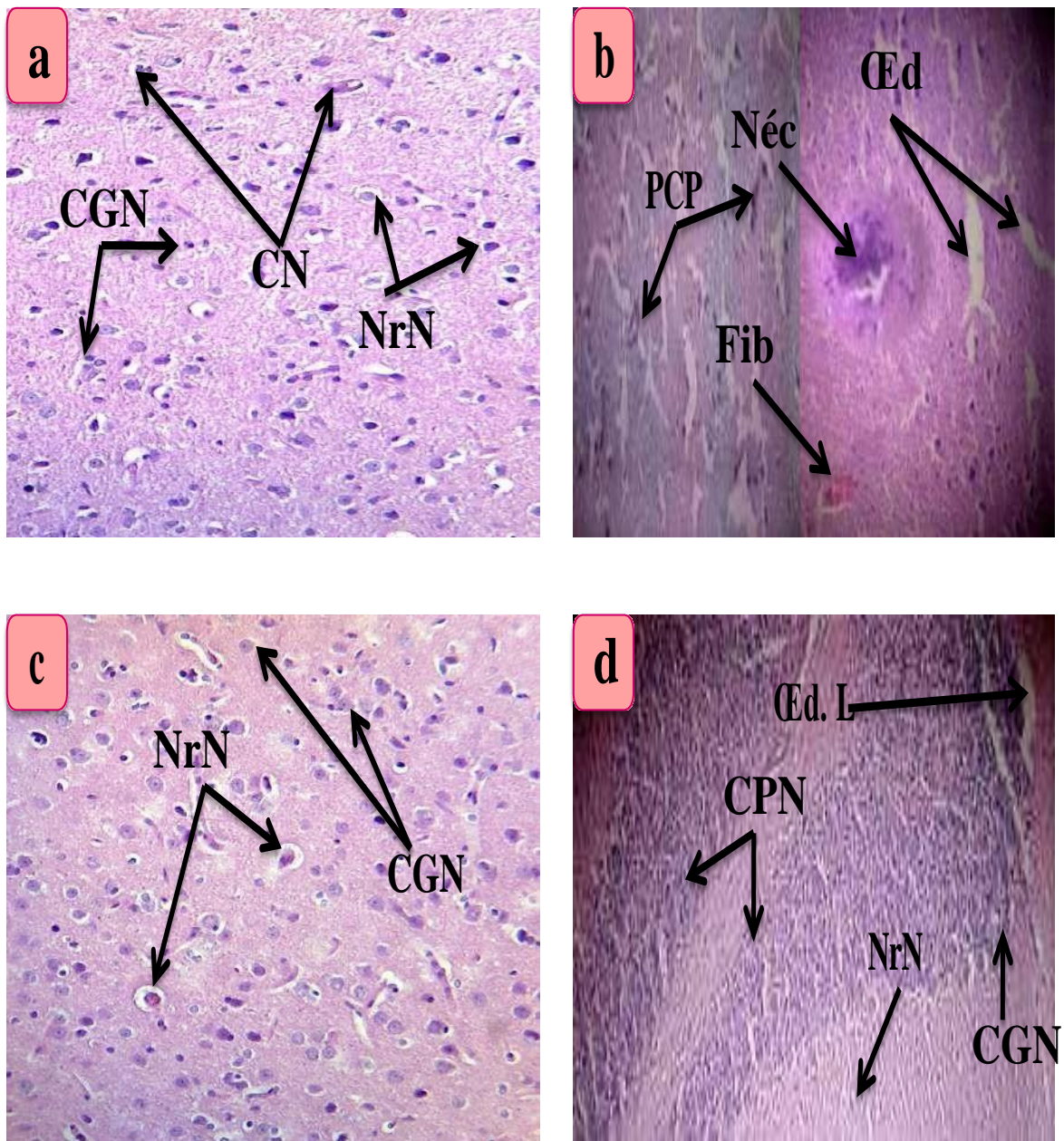
G1 : témoin ; G2 : 5 mL éthanol (trois mois) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (trois mois) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL éthanol au même temps (trois mois).

## II.4. Histopathologie du cerveau

### Histopathologie du cerveau

Les observations histologiques indiquent que le cerveau du groupe des rats intoxiqués avec l'alcool éthylique présente une fibrose dans les vaisseaux sanguins, de plus des cellules neuronales nécrosées accompagnées d'une pycnose des cellules de la couche pyramidale dans le foyer dégénéré, et un œdème a été également observé dû à la vacuolisation autour du neurone/espace-périneuronal ; spongieuse, ce qui justifie clairement la présence des espaces périnucléaires avec des noyaux perturbés (Figure 29b).





**Figure 29:** Coupes histologiques du cerveau du groupe : a (G1) : témoin ; b (G2) : 5 mL d'éthanol (90 jours) ; c (G3) : 200 mg/kg/j d'EER (90 jours) ; d (G4) : 200 mg/kg/j d'EER et 5 mL d'éthanol au même temps (90 jours).

CGN : cellule gliale normale, NrN : neurone normal, CN : cellule neuronale, Œd : œdème, Néc : nécrose, Fib : fibrose, PCP : pycnose de la couche pyramidale, CPN : couche pyramidale normale, Œd. L: œdème léger.

Par ailleurs, un aspect architectural montrant une normalisation des éléments microstructuraux du cerveau des rats qui ont reçu uniquement l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* (fig. 29c), avec des neurones normaux, un noyau et des astrocytes intacts (cellules gliales), aucune spongiose et neurones dégénérés n'ont pu être observés chez les rats de ce groupe (G3) comme quasiment celui du groupe témoin (G1) (fig. 29a).

De plus, l'association du romarin et l'éthanol chez les rats du G4 a montré un aspect microscopique d'une apparence cohérente des cellules gliales et de neurones normaux, abîmé subtilement au niveau de l'extrémité de la couche pyramidale. Cette irritation modérée est accompagnée par un œdème léger (fig. 29d). En outre, ces rats du G4 ont répondu positivement et efficacement au pré-traitement par l'extrait EER d'où leurs structures semblent être restaurées par rapport à celle retrouvée chez le G2 (fig. 29b) ; tout en réduisant la mort neuronale, l'absence de fibrose et de pycnose des cellules pyramidales.

## **Discussion**

D'après, [Del Bano et al. \(2003\)](#), des composés bioactifs d'origine naturelle sont susceptibles d'élaborer et d'améliorer le traitement des effets néfastes de l'éthylisme dont la thérapie demeure défectueuse à l'heure actuelle par le biais de la sélection de plantes médicinales utilisées empiriquement par l'homme tel que le *Rosmarinus officinalis* connu sous le nom de romarin qui est un arbuste aromatique appartenant à la famille des Lamiaceae. Des travaux de [Fahim et al. \(1999\)](#) et [Lo \(2002\)](#) ont montré scientifiquement que le *Rosmarinus officinalis* possède une activité antihépatotoxique et anti-inflammatoire ainsi qu'une activité antioxydante et neuroprotectrice.

Les résultats de [Maillot et al., 2001](#) montrent que l'administration chronique d'alcool entraîne une augmentation de la masse corporelle chez les rats intoxiqués par l'alcool éthylique par rapport au groupe témoin ; cela montre que l'alcool induit des altérations du métabolisme en diminuant l'oxydation lipidique et en augmentant le poids corporel. L'effet de l'ingestion chronique d'alcool sur le poids constitue une énigme ([Valenzuela et al., 1997](#) ; [Harper et al., 1998](#)) et exerce un effet biphasique sur la masse corporelle ([Beaunieux et al., 2014](#)).



Dans ce cadre, Mukherjee et al. (2008) ont montré que l'ingestion de petites quantités d'alcool semble avoir peu d'incidence alors qu'une consommation plus importante aurait tendance à augmenter le poids des sujets sains, en diminuant l'oxydation lipidique (Maier et al., 1999) et la consommation chronique d'une quantité excessive d'alcool induit à une perte pondérale, par augmentation de l'oxydation lipidique et de la dépense énergétique (Mukamal et al., 2001 ; Gonzales et al., 1997).

D'autre part, il y avait une régularisation de la prise de poids corporel par l'administration de l'extrait éthanolique du *Rosmarinus officinalis* (EER) chez des rats préalablement alcoolisés, ce qui pourrait mettre en évidence l'effet bénéfique de la plante. Nos résultats rejoignent ceux de Romo Vaquero et al. (2012) qui montrent que l'extrait éthanolique de romarin réduit le gain de poids chez les rats Zucker femelles obèses. (A Suter PM et al. 1992).ont dévoilé que la consommation excessive d'alcool à long terme est un facteur de risque non seulement pour de nombreuses maladies chroniques, en particulier les maladies du foie et le cancer, mais aussi pour les maladies vasculaires y compris l'hypertension et les accidents vasculaires cérébraux.

La consommation chronique de l'alcool induit à la perte de la matière grise et blanche ; une hypertrophie des ventricules et des dommages aux régions corticales comme l'hippocampe (Sullivan et Pfefferbaum, 2005 ; Beresford et al., 2006), le cervelet (Sullivan et al., 2010), les lobes frontaux (Kubota et al., 2001 ; Sullivan et Pfefferbaum, 2005), les régions importantes pour la régulation comportementale ainsi que la mémoire (Nixon et Crews, 2002 ; Obernier et al., 2002 ; Crews et Nixon, 2009).

En outre, la consommation excessive de l'alcool à long terme affecte les circuits cérébraux impliqués dans la récompense, l'émotion, l'attention et le contrôle exécutif (Durazzo et al., 2011; Müller-Oehring et al., 2013 ; Schulte et al., 2017). Les adaptations neuronales dans les systèmes mésencéphale-striatum et limbiques riches en dopamine et les systèmes de contrôle préfrontal sont étroitement liés aux gros consommateurs chroniques de l'alcool (Heinz et al., 2004 ; Müller Oehring et al., 2013; Schacht et al., 2013).

Selon Vabret et al. (2016), l'alcool est une substance toxique associée à une morbidité et une mortalité significatives. Son effet sur le système nerveux semble être provoqué par des facteurs complexes, multiples, variables selon les individus et pas tous élucidés. Certains de ces effets neurotoxiques peuvent survenir lors de consommation aiguë d'alcool ou lors d'absorption chronique. Toutes ces complications ont des répercussions socioprofessionnelles et économiques non négligeables. Le système nerveux centrale est un organe cible de la

toxicité alcoolique (Lidia et al., 2018). La consommation chronique de cette molécule a montré des effets neurologiques et des troubles neurocomportementaux.

Cependant, Sullivan et Pfefferbaum (2005), ont enregistré une perte de poids cérébrale chez le groupe intoxiqué mis en évidence post-mortem, ce qui est conforme aux études utilisant la technologie d'imagerie par résonance magnétique (IRM) qui indiquent un rétrécissement global du cerveau des alcooliques dans plusieurs domaines.

Cette atrophie cérébrale induite par la toxicité avec l'alcool est en rapport avec les changements de la substance blanche et diminution de la taille des neurones. Elle est corrélée avec la durée et la sévérité de l'alcoolisation mais elle peut être totalement ou partiellement réversible après sevrage en suivant une approche thérapeutique adéquate rapporté par Zahr et al. (2011).

L'analyse des résultats neurocomportementaux des différents groupes a révélé que l'exposition chronique des rats à l'alcool éthylique, engendre un dysfonctionnement cérébral très marqué par l'instauration d'un état dépressif et anxieux ainsi que les mécanismes de l'apprentissage et mémorisation spatiale qui sont conséquences aux effets neurobiologiques et les perturbations des circuits fonctionnels du cerveau induites par la prise répétée d'éthanol. Nos résultats sont en accord avec ceux des travaux précédents de Maynard et Leasure (2013), qui ont trouvé que dans le test de la nage forcée FST, le temps d'immobilité chez les animaux intoxiqués à l'alcool éthylique était significativement plus important que celui du groupe témoin, cette réduction dans la nage reflète l'installation d'un comportement dépressif résultant de la perturbation des systèmes monoaminergiques en particulier le système sérotoninergique dans différentes zones du cerveau, principalement le striatum, l'hippocampe et l'axe hypothalamo-hypophysaire qui participe à la physiopathologie de la dépression, suite à l'exposition à l'alcool, qui peut aggraver ou induire un état dépressif (Ji et al., 2012). Cette observation a été confirmée par West et al. (2019).

En ce qui concerne les résultats enregistrés pour le test du labyrinthe aquatique de Morris, nous avons constaté une augmentation du temps d'apprentissage des animaux intoxiqués par l'éthanol pendant la phase d'acquisition. Ce qui indique que les animaux alcoolisés ont des difficultés ou des troubles d'apprentissage. De même, le prob-test qui a révélé une latence importante dans la trame cible chez les rats alcoolisés, ce qui signifie que ces rats n'ont pas bien mémorisé l'emplacement de la plateforme en se référant aux repères spatiaux extérieurs.

Cette tendance a été aussi observée par Richardson et al. (2002) qui mettent en évidence une altération des performances dans la piscine de Morris et des performances moins élevées

dans cette tâche chez des rats ayant subi une exposition périnatale à l'éthanol, ces performances sont encore plus altérées chez les femelles (An *et al.*, 2013).

En outre, pour le test du labyrinthe surélevé, qui est un test pour évaluer le degré relatif d'anxiété, nous avons constaté que les rats alcoolisés avaient une préférence pour les espaces confinés et sombres et fuyaient les espaces ouverts et lumineux. Cela reflétait un niveau d'anxiété significativement élevé par rapport aux rats témoin, des études récentes ont aperçu à une augmentation des comportements anxieux suite à une exposition à l'alcool chez les rats (Dursun *et al.*, 2006 ; Cullen *et al.*, 2013 ; Baculis *et al.*, 2015).

Quoique, d'autres études n'ont montré aucun effet sur les réponses anxieuses chez les rats (Barbier *et al.*, 2008) ou même un effet anxiolytique (Ohta *et al.*, 2010). Ces différences peuvent être dues au type de consommation utilisée (modérée ou continue), à la période d'exposition, à la voie d'administration d'alcool et à la souche utilisée (Muñoz-Villegas *et al.*, 2017).

La sérotonine est un neuromodulateur qui contrôle les fonctions cognitives et l'état émotionnel (Goodman, 2008 ; Koob, 2009). Un dysfonctionnement de cette neurotransmission est retrouvé dans des symptômes d'anxiété et de dépression (LeMarquand *et al.*, 1994a), troubles cognitifs associés à la consommation éthylique chronique (Kushner *et al.* 2000 ; Jané-Llopis *et Matytsina*, 2006). D'après Silberman *et Winder* (2015), l'éthanol semble également réguler la neurotransmission du glutamate en augmentant l'excitabilité neuronale impliquée dans les comportements anxieux.

Lors du test visible, les rats intoxiqués avec l'alcool éthylique ont mis plus de temps afin d'atteindre la plateforme. Cela a prouvé que les animaux alcoolisés avaient des troubles de la vision, ce qui correspond aux travaux de Mura (1999). Les résultats de cet auteur ont révélé que l'éthanol administré proportionnellement à la dose, provoque un rétrécissement du champ visuel et induit des troubles de la vision.

Cependant, (Dematteis, M., & Pennel, L.2018).ont constaté que l'alcool est une cause majeure de la névrite optique rétrobulbaire (NORB) par toxicité directe et/ou carence vitaminique. La (NORB) se traduit par une baisse progressive et bilatérale de l'acuité visuelle, une dyschromatopsie, une réduction du champ visuel, un scotome central et une pâleur papillaire tardive. Des séquelles peuvent persister, malgré l'arrêt des consommations et une supplémentation vitaminique précoce.

De plus, lors des tests de sonde, les rats alcoolisés et traités par l'extrait éthanolique de

*Rosmarinus officinalis* EER ont un temps de latence plus élevé dans la zone cible comparé aux animaux intoxiqués par l'éthanol et prennent peu de temps pour trouver la plateforme dans le test visible. Par conséquent, l'extrait EER a amélioré d'une façon significative les performances d'apprentissage et de la mémoire spatiale. A cet égard, (Machado et al.,2009) confirment nos résultats en prouvant que le romarin procure des effets bénéfiques sur les troubles de la mémoire, la dépression, l'ischémie cérébrale et la maladie d'Alzheimer, indiqué par Abdelhalim et al. (2015).

Selon Kumar et al. (2009), l'ingestion chronique de l'éthanol entraîne une diminution de la neurotransmission du GABA. Qui serait attribuée à une diminution de l'expression du récepteur GABA dans le cerveau ; conséquence d'une altération de ses sous-unités spécifiques (Grobin et al. 1998 ; Weiner et Valenzuela, 2006). Les neurones sensibles au GABA possèdent des récepteurs au glutamate, permettant ainsi de moduler l'excitabilité neuronale.

(Marder et al., 2002) quant à eux, rapportent que, la protection de la membrane des cellules nerveuses contre la toxicité alcoolique ainsi que le maintien de l'homéostasie du système neurotransmetteur, est de traverser la barrière hémato-encéphalique, et agir comme des ligands de récepteurs du système nerveux central en augmentant l'effet du neurotransmetteur GABA sur son récepteur dans le neurone (Zendehdel et al 2011).

Ainsi, (Sasaki et al.,2013) observent que la diminution des dommages neuronaux dopaminergiques et sérotoninergiques et les symptômes dépressifs et anxieux, est associée à l'équilibre de la balance du stress oxydatif qui joue un rôle important dans les altérations cérébrales due à l'éthanol.

Chastain (2006) indique que l'alcool agit sur les récepteurs glutamatergiques de type N-méthyl-D-aspartate (NMDA), via un mécanisme d'inhibition non compétitif secondaire à la phosphorylation et l'internalisation des sous-unités NR2 (Fadda et Rossetti, 1998). De plus, Ward et al. (2009), ont rapporté que l'inhibition des récepteurs NMDA, impliqués dans de nombreuses fonctions cérébrales, telles que l'apprentissage et la mémorisation, perturberait la neurotransmission post-synaptique, entraînant ainsi une diminution de la libération du glutamate dans l'hippocampe, et conduit à des déficits d'apprentissage et de mémoire chez les rats (Riedel et al., 2003 ; Gass et Olive, 2008).

Au vu des résultats obtenus qui montrent une diminution significative dans la durée d'immobilité des rats alcoolisés et ayant reçu simultanément une supplémentation thérapeutique, le romarin, avaient présenté un état de dépression moins important que les rats

qui ont étaient seulement alcoolisés. En effet, ceci s'explique par l'action antidépressive de l'EER qui passe par interaction avec le système monoaminergique, rapporté dans les travaux de (Machado et al., 2009).

Ainsi qu'une augmentation significative de temps passé des rats dans le bras ouvert indiquant une diminution de leur stress. L'effet anxiolytique de l'EER sur le SNC peut être attribué à sa puissante capacité antioxydante. Grâce à cela, le cerveau peut être protégé par les différentes molécules actives de la plante contre les effets néfastes causés par l'éthanol et les radicaux libres générés par son métabolisme toxique induisant une réduction de stress oxydatif qui se traduisent par une protection des neurones sérotoninergiques et une réduction de l'anxiété.

Au regard des résultats obtenus, l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* confère une protection contre la neurotoxicité induite par l'éthylisme qui est due à l'un ou plusieurs substances bioactives, aux propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires ou anti-radicalaires de cette plante qui peuvent agir en synergie dans tout le système nerveux central.

Les résultats de la présente étude ont conclu que l'administration chronique d'alcool éthylique induit des effets neurotoxiques qui se traduisent par la présence d'un état dépressif, d'anxiété et d'une perturbation significative du processus d'apprentissage et de mémorisation spatiale, ce qui reflète un dysfonctionnement cérébral qui peut être améliorée par une thérapie avec l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* qui exerce un effet neuroprotecteur due à sa richesse aux molécules bioactives dotées de propriétés biologiques diverses. Une évaluation plus approfondie de l'utilisation de cet extrait et examinations de son mécanisme d'action ainsi que ses principes actifs dans le traitement des troubles neurologiques liés à l'alcool est recommandé.

## **Partie III : Effet de l'éthanol sur la fonction métabolique et l'action hépatoprotectrice de l'extrait du romarin**

### **Résultats**

#### **III.1. Dosage de l'éthanol dans le sang total**

Les résultats obtenus de dosage de l'éthanol dans le sang total des différents groupes expérimentaux, par la chromatographie en phase gazeuse (CPG), montrent une augmentation de l'alcoolémie au niveau sanguin chez les rats intoxiqués (G2) par rapport aux rats témoins (G1). Cependant, la co-administrasson de l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* (EER) par voie orale aux rats intoxiqués (G4), montrent une diminution significative ( $P < 0.05$ ) du taux de l'éthanol comparativement aux animaux alcooliques (tableau 05).

**Tableau 05 :** Taux d'alcoolémie chez les différents groupes des rats

<b>Groupes</b>	<b>G1</b>	<b>G2</b>	<b>G3</b>	<b>G4</b>
Taux d'alcoolémie (g/L)	0.00±0.00	1.2±0.05 ***	0.00±0.00	0.6±0.07***

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± Ecartype (\*\*\*:  $p < 0.05$ ).

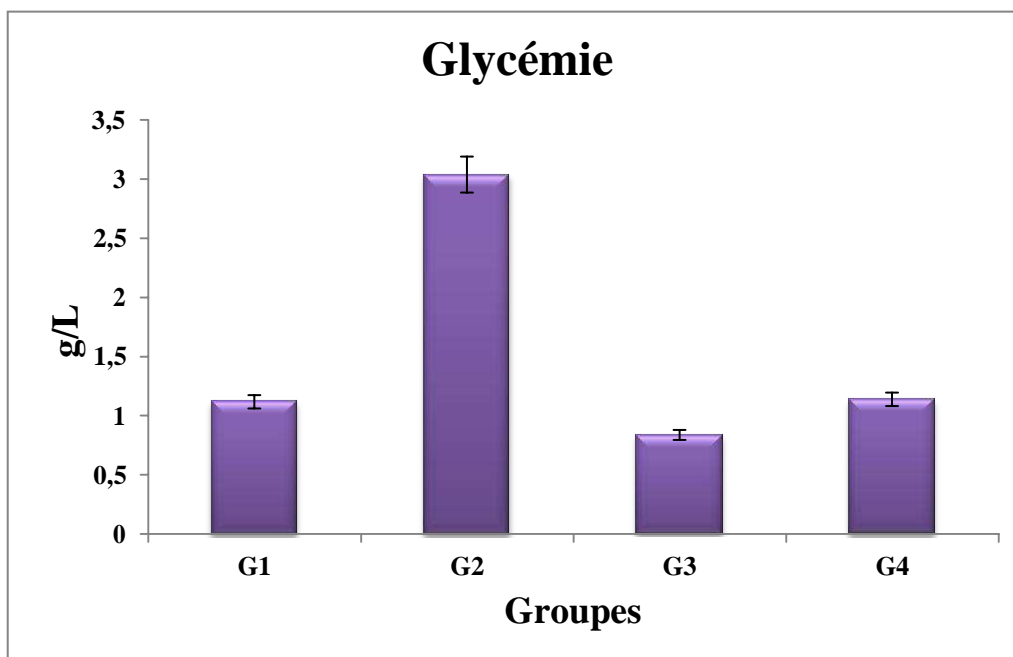
#### **III.2. Paramètres biochimiques**

##### **III.2.1. Glycémie**

L'administration de l'éthanol aux rats du groupe G2 pendant trois mois a engendré une augmentation très significative ( $P < 0.05$ ) de la glycémie (+1.91 g/L) en comparaison avec le groupe témoin G1.

En revanche, une diminution spectaculaire de l'ordre de 0.84 g/L est enregistrée chez les rats du groupe G3 qui ont reçu 200 mg/kg de l'EER.

En outre, les rats du G4 qui ont reçu une dose de 200 mg/kg d'EER et 5 mL éthanol au même temps pendant 90 jours ont montré une diminution significative ( $p < 0.05$ ) de -62% par rapport aux rats du groupe témoin (fig. 30).



**Figure 30:** Glycémie (g/L) chez les rats traités ou/non par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* et/ou l'éthanol. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations  $\pm$ SEM (n = 6).

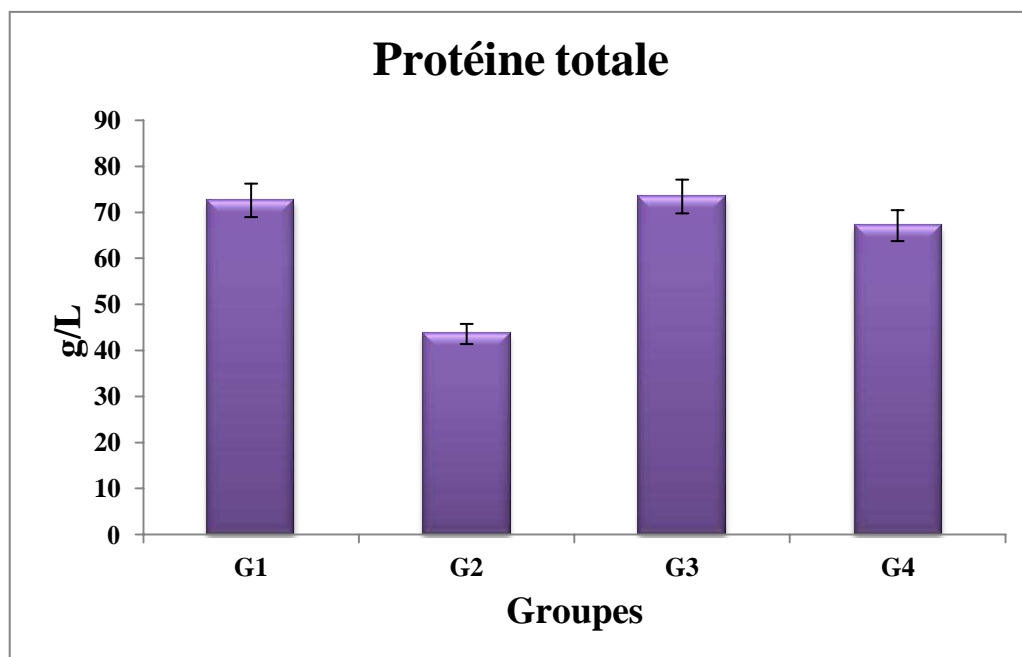
G1 : témoin ; G2 : 5 mL éthanol (trois mois) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (trois mois) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL éthanol au même temps (trois mois).

### III.2.2. Protéines totales

Les teneurs en protéines totales sériques des rats des différents groupes sont illustrés dans la fig. 31. Une diminution significative ( $p < 0.05$ ) de la concentration en protéines totales de 40 % a été observée dans le groupe ayant reçu de l'éthanol (G2) par rapport au groupe témoin (G1).

En revanche, les rats intoxiqués par l'éthanol et qui ont reçu l'extrait du romarin (G4) ont enregistré une augmentation de la concentration sérique de protéines totales ( $P < 0.05$ ) de 1.54 fois par rapport au groupe G2.

Les rats ayant reçu exclusivement l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* (G3) ont montré une concentration de protéines totales similaire à ceux du groupe témoin (G1).



**Figure 31:** Teneur en protéine totale (g/L) chez les rats traités ou/non par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* et/ou l'éthanol. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations  $\pm$ SEM (n = 6).

G1 : témoin ; G2 : 5 mL éthanol (90 j) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (90 j) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL éthanol au même temps (90 j).

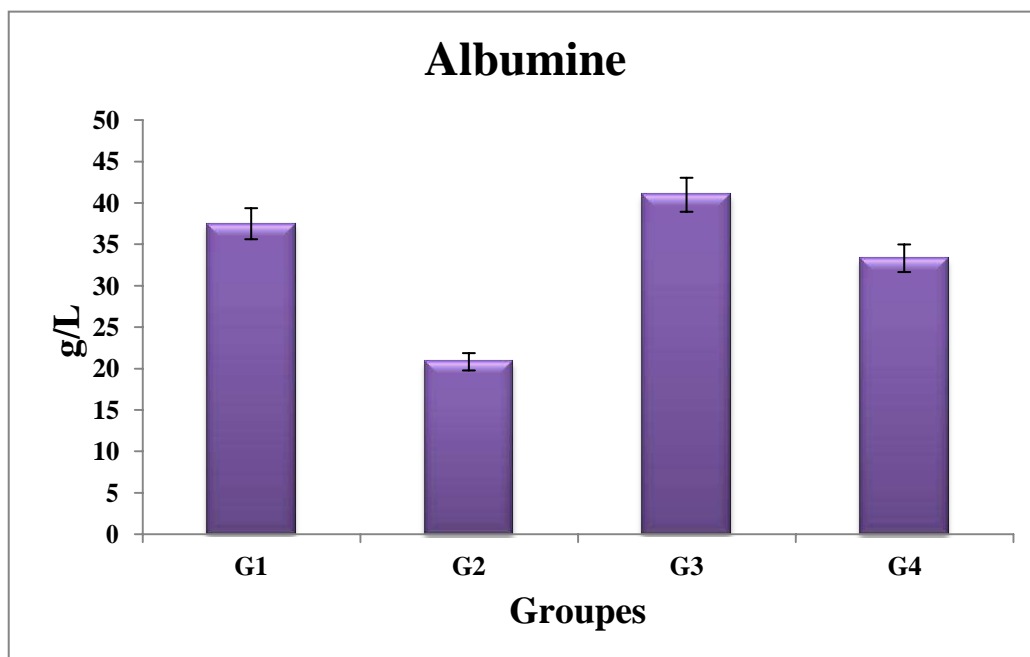
### III.2.3. Albumine

La comparaison des différentes concentrations en albumine analysées décèlent une différence significative ( $p < 0,05$ ) entre les quatre groupes (fig. 32).

Il ressort de façon évidente que la supplémentation en extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* aux rats (G3) a permis d'augmenter davantage la teneur en albumine avec un taux de 41 g/L par rapport aux rats du G2. En revanche, une baisse substantielle ( $P < 0,05$ ) a été observée chez les rats ayant subi l'éthylisme (G2), dont le niveau de l'albumine est estimé de l'ordre de 20.83 g/L comparé au groupe témoin (37.5 g/L).

Cependant, l'administration de l'extrait du romarin a rétabli l'albuminémie chez les rats soumis à l'éthylisme (G4), cela s'est retenti sur une augmentation significative ( $p < 0,05$ ) des niveaux de l'albumine (G4 : 33.33 vs G2 : 20.83 g/L).





**Figure 32:** Teneur en albumine (g/L) chez les rats traités ou/non par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* et/ou l'éthanol. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations  $\pm$ SEM (n = 6).

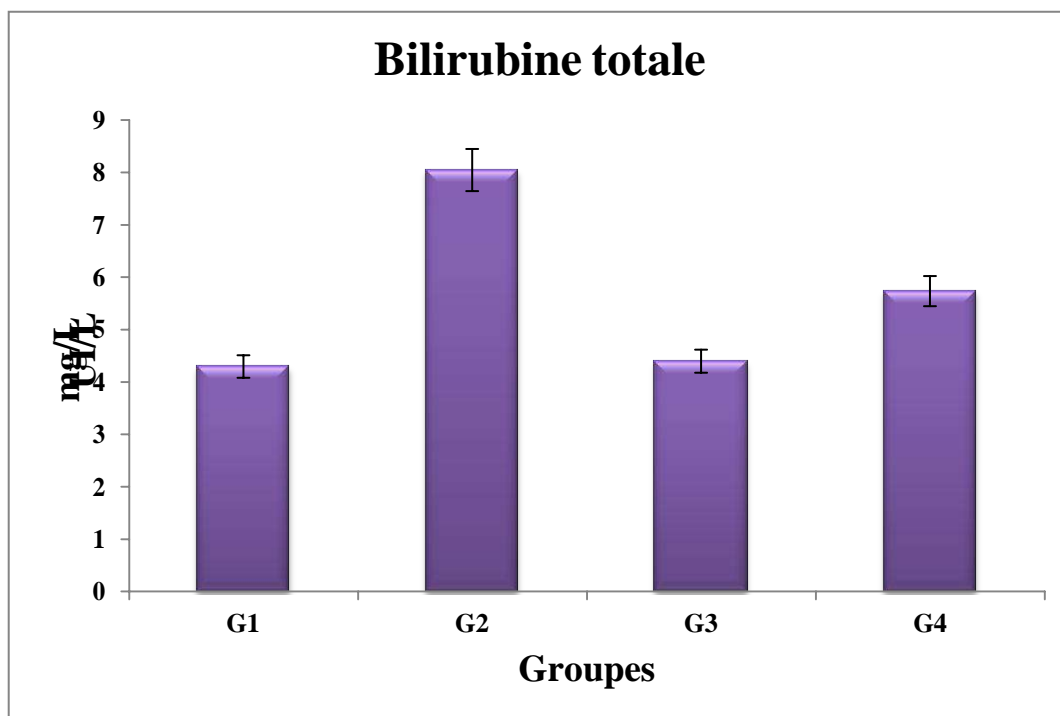
G1 : témoin ; G2 : 5 mL éthanol (trois mois) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (trois mois) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL éthanol au même temps (trois mois).

### III.2.4. Bilirubine totale

Selon les résultats obtenus illustrés dans la fig. 33, on constate que l'éthanol exerce un effet dépressif sur le taux de la bilirubine totale et engendre un accroissement très significatif ( $P < 0,05$ ) de + 3.75 mg/L chez le G2 comparativement au G1.

Par contre, les rats du G4 (qui ont reçu 200 mg/kg d'EER et 5 mL éthanol) ont montré une diminution de -2.31 mg/L par rapport au G2.

Tandis que, les rats du groupe 4 ont montré une similarité en valeur de bilirubine par rapport au groupe témoin (G1).



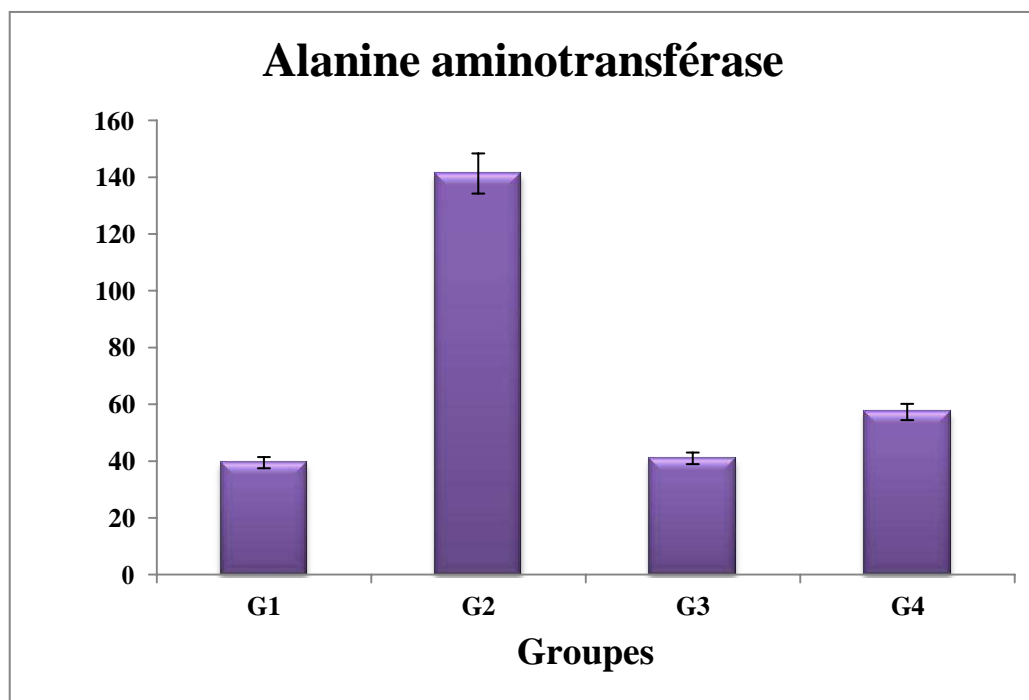
**Figure 33:** Teneur en bilirubine (mg/L) chez les rats traités ou/non par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* et/ou l'éthanol. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations  $\pm$ SEM (n = 6).

G1 : témoin ; G2 : 5 mL éthanol (trois mois) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (trois mois) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL éthanol au même temps (trois mois).

### III.2.5. L'alanine aminotransférase (ALAT)

Selon nos résultats, on observe une augmentation de 72 % du taux sérique de l'enzyme d'ALAT chez les rats du groupe 2 (qui ont reçu uniquement l'éthanol) par rapport au groupe témoin G1 (fig. 34).

L'administration de l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* a provoqué une diminution hautement significative ( $P < 0.05$ ) de 71 et 60 % de l'activité de cette enzyme (ALAT) chez les rats du G3 et G4, respectivement, par rapport à ceux du G2.



**Figure 34:** Teneurs sériques de l'alanine aminotransférase ALAT (UI/L) chez les rats traités par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* et/ou l'éthanol. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations  $\pm$ SEM (n = 6).

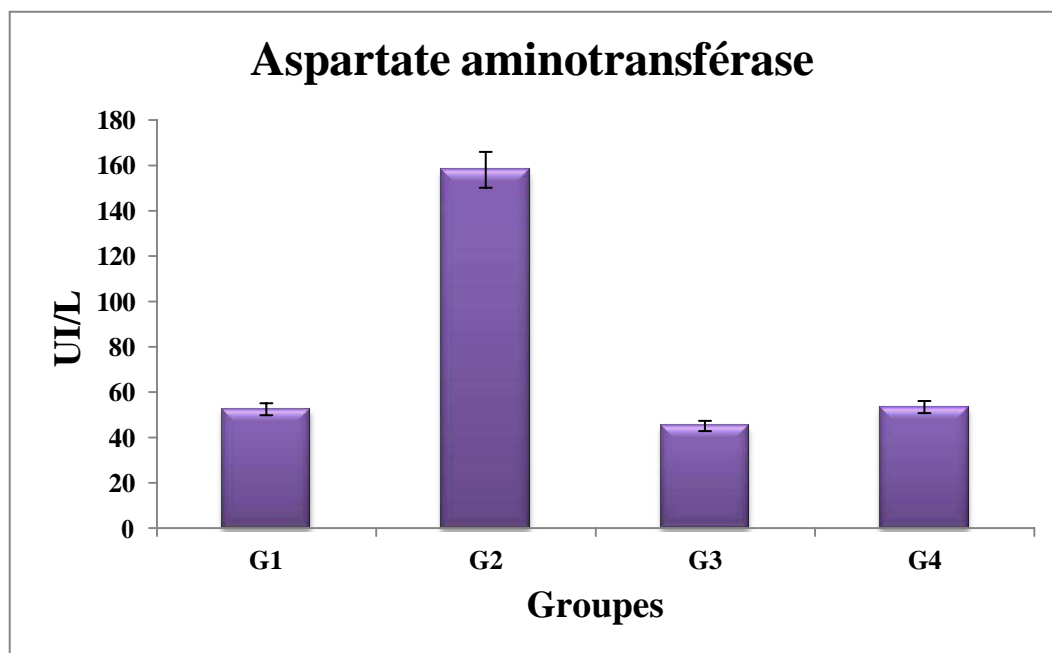
G1 : témoin ; G2 : 5 mL éthanol (trois mois) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (trois mois) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL éthanol au même temps (trois mois).

### III.2.6. L'aspartate aminotransférase (ASAT)

A la lumière de ces résultats, on remarque une augmentation significative ( $P < 0.05$ ) de +66.87 % du taux de l'aspartate aminotransférase chez les rats du G2 (ayant reçu que l'éthanol), tout en comparant aux rats du groupe témoin (G1).

En revanche, une diminution a été enregistrée de -66.17 % chez les rats du groupe 4 (ayant reçu 200 mg/kg de l'EER et 5 mL d'éthanol en même temps) par rapport aux rats du groupe 2 (qui ont reçu uniquement de l'éthanol).

Tandis que, les rats du groupe 3 (qui ont été administrés que par l'extrait EER) ont montré une forte diminution de -71.44 % du taux d'ASAT par rapport au G2 (fig. 35).



**Figure 35:** Teneurs sériques de l'aspartate aminotransférase ASAT (UI/L) chez les rats traités par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* et/ou l'éthanol. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations  $\pm$ SEM (n = 6).

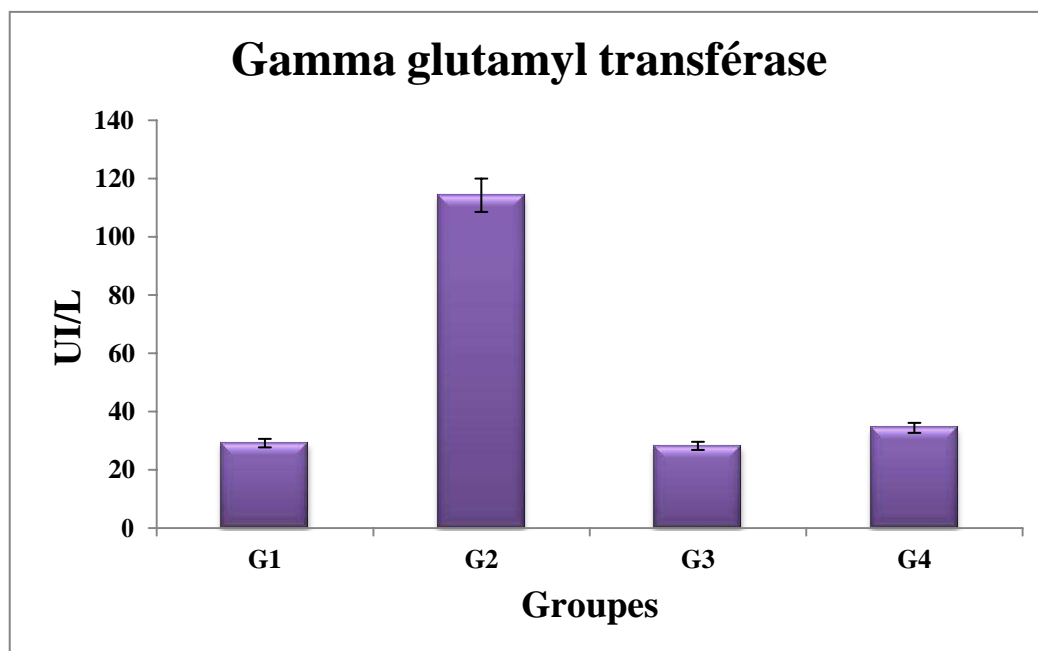
G1 : témoin ; G2 : 5 mL éthanol (trois mois) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (trois mois) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL éthanol au même temps (trois mois).

### III.2.7. La gamma glutamyl transférase ( $\gamma$ -GT)

Le dosage du taux sérique du gamma glutamyl transférase a montré une augmentation hautement significative ( $P < 0.05$ ) chez les rats qui ont reçu uniquement l'éthanol (G2) de l'ordre de 114.33 UI/L par rapport au groupe témoin G1 (29.18 UI/L).

En outre, on remarque une réduction de cette activité enzymatique de -79.94 UI/L chez les animaux du groupe G4 par rapport aux rats du groupe G2.

De même, le groupe des rats traités exclusivement par l'extrait EER (G3) a enregistré une similarité par rapport au G1 (fig. 36).



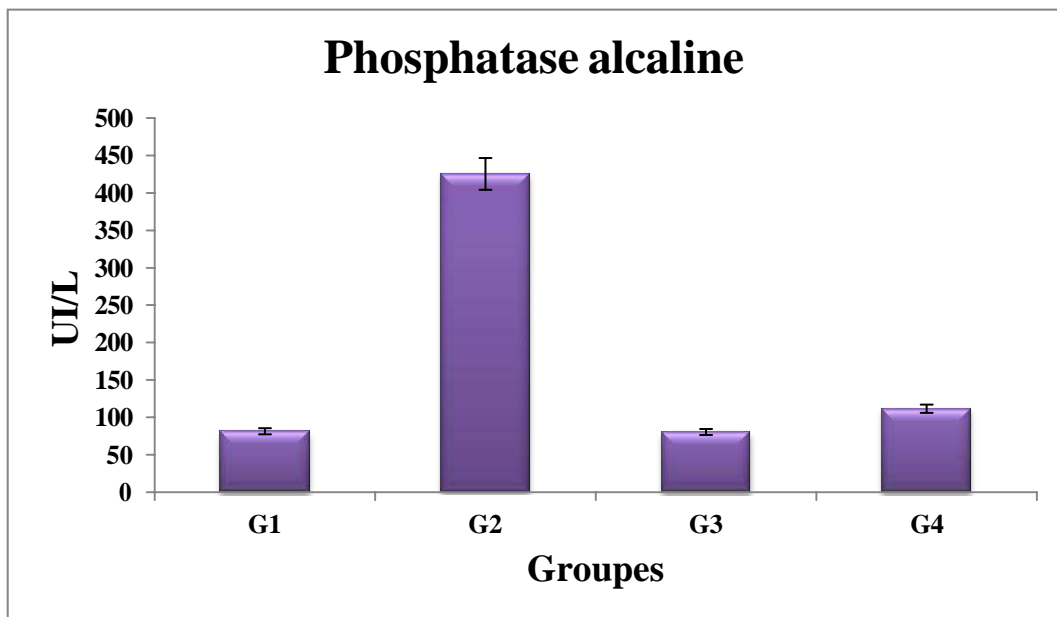
**Figure 36:** Teneurs sériques en gamma glutamyl transférase (UI/L) chez les rats traités par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* et/ou l'éthanol. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations  $\pm$ SEM (n = 6).

G1 : témoin ; G2 : 5 mL éthanol (trois mois) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (trois mois) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL éthanol au même temps (trois mois).

### III.2.8. La phosphatase alcaline (PAL)

Nos présents résultats montrent que l'éthanol (G2) a significativement ( $P < 0.05$ ) fait augmenter la concentration de la phosphatase alcaline qui est de l'ordre de 425.45 UI/L par rapport au groupe témoin (81.5 UI/L).

En revanche, cette enzyme (PAL) est réduite de -314 UI/L chez les rats du groupe 4 (ayant reçu 200 mg/kg d'EER et 5 mL éthanol au même temps) par rapport au groupe témoin (G2) (fig. 37).



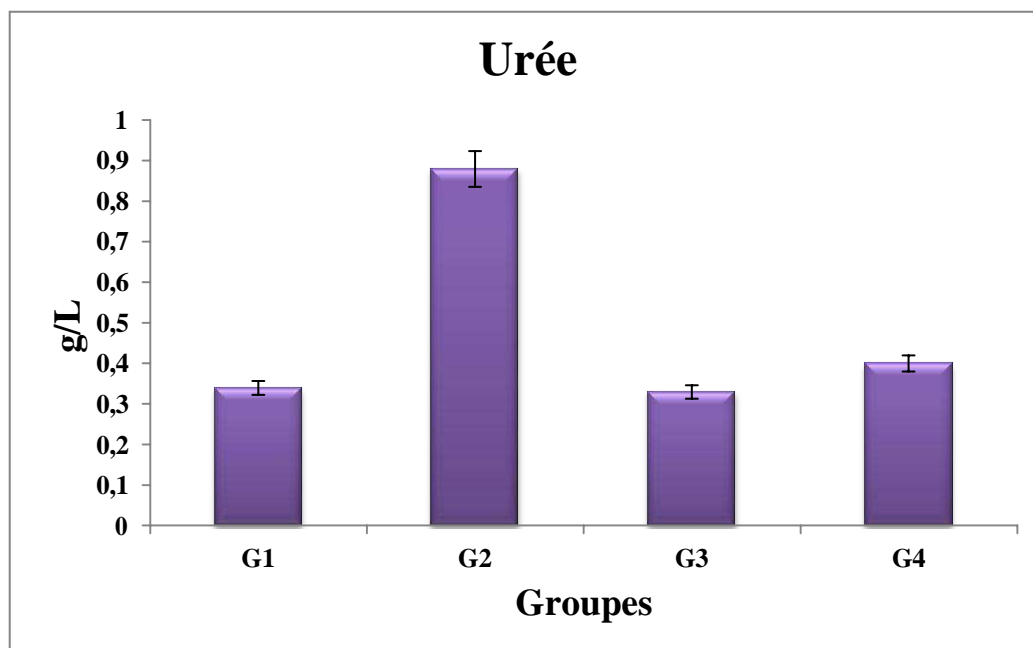
**Figure 37:** Teneurs sériques en phosphatase alcaline (UI/L) chez les rats traités par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* et/ou l'éthanol. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations  $\pm$ SEM (n = 6).

G1 : témoin ; G2 : 5 mL éthanol (trois mois) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (trois mois) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL éthanol au même temps (trois mois).

### III.2.9. L'urémie

Les concentrations plasmatiques de l'urée sont présentées dans la [fig. 38](#). En comparaison avec les rats du groupe témoin, l'éthanol a significativement ( $P < 0.05$ ) augmenté le taux plasmatique de l'urée de 42% chez les rats du G2.

Cependant, les rats recevant l'extrait du romarin et l'éthanol au même temps pendant trois mois, ont enregistré une diminution de la concentration plasmatique d'urée ( $P < 0.05$ ), environ 2.2 fois par rapport à ceux du groupe intoxiqué (G2).



**Figure 38:** Concentrations sériques de l'urée (g/L) chez les rats traités par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* et/ou l'éthanol. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations  $\pm$ SEM (n = 6).

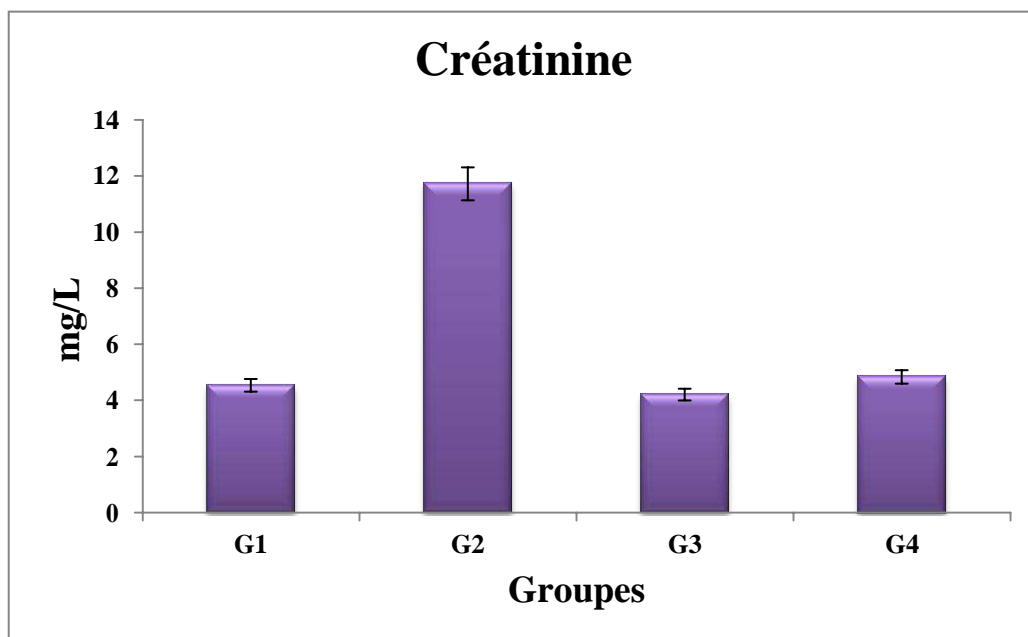
G1 : témoin ; G2 : 5 mL éthanol (trois mois) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (trois mois) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL éthanol au même temps (trois mois).

### III.2.10. Créatinémie

Les concentrations sériques de la créatinine de chaque groupe expérimental sont présentées dans la [fig. 39](#). Des différences significatives ( $P < 0,05$ ) entre les différents groupes sont observées.

L'éthanol (G2) a engendré une augmentation significative ( $P < 0,05$ ) de la teneur en créatinémie de l'ordre de +61.30 % par rapport au groupe témoin (G1).

Quoique, les rats du groupe G4, en consommant l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* et l'éthanol au même temps ont été affectés par la diminution du taux de la créatinine de -58.74 %. En effet, une créatinémie réduite a été observée ( $P < 0,05$ ) chez les rats traités exclusivement par l'extrait EER (G3) par rapport au témoin (4,1 vs 44 mg/L).



**Figure 39:** Concentrations sériques de la créatinine (mg/L) chez les rats traités par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* et/ou l'éthanol. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations  $\pm$ SEM (n = 6).

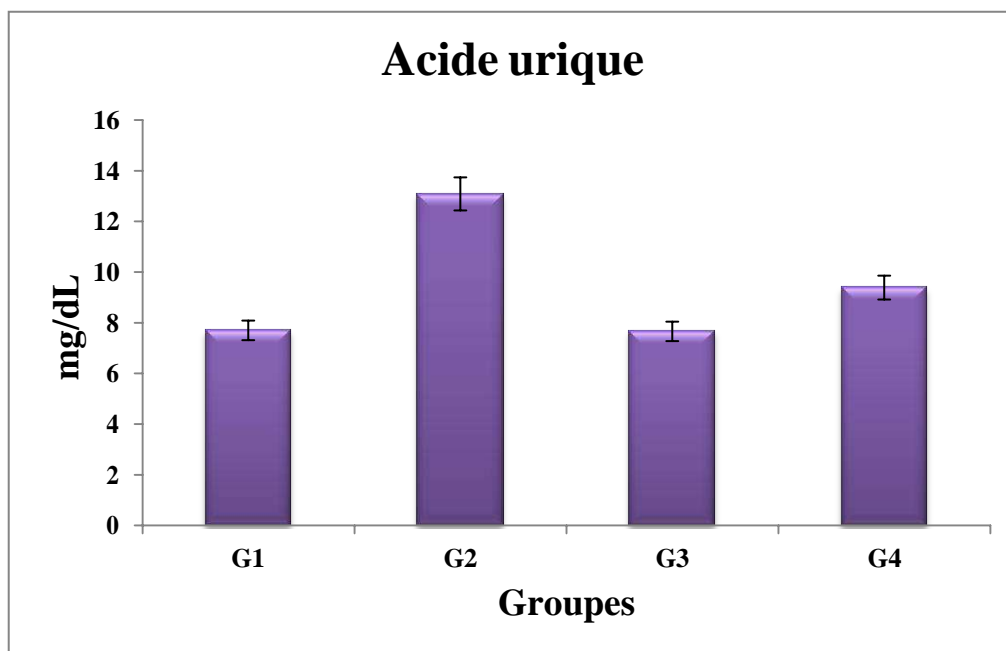
G1 : témoin ; G2 : 5 mL éthanol (trois mois) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (trois mois) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL éthanol au même temps (trois mois).

### III.2.11. Taux de l'acide urique

L'administration de l'éthanol aux rats du groupe 2 a engendré une augmentation très élevée du taux d'acide urique (59%) en comparant aux animaux du groupe témoin (G1) (fig. 40).

En revanche, l'administration de l'extrait EER, a réduit significativement ( $P < 0.05$ ) ce taux chez les rats du groupe G4 (9.4 mg/dL), en comparaison avec les rats du groupe G2 (qui ont reçu uniquement l'éthanol). Tandis que le traitement exclusif par l'extrait EER a montré une diminution significative (7.67 mg/dL) par rapport au G2.





**Figure 40:** Concentrations sériques de l'acide urique (mg/dL) chez les rats traités par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* et/ou l'éthanol. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations  $\pm$ SEM (n = 6).

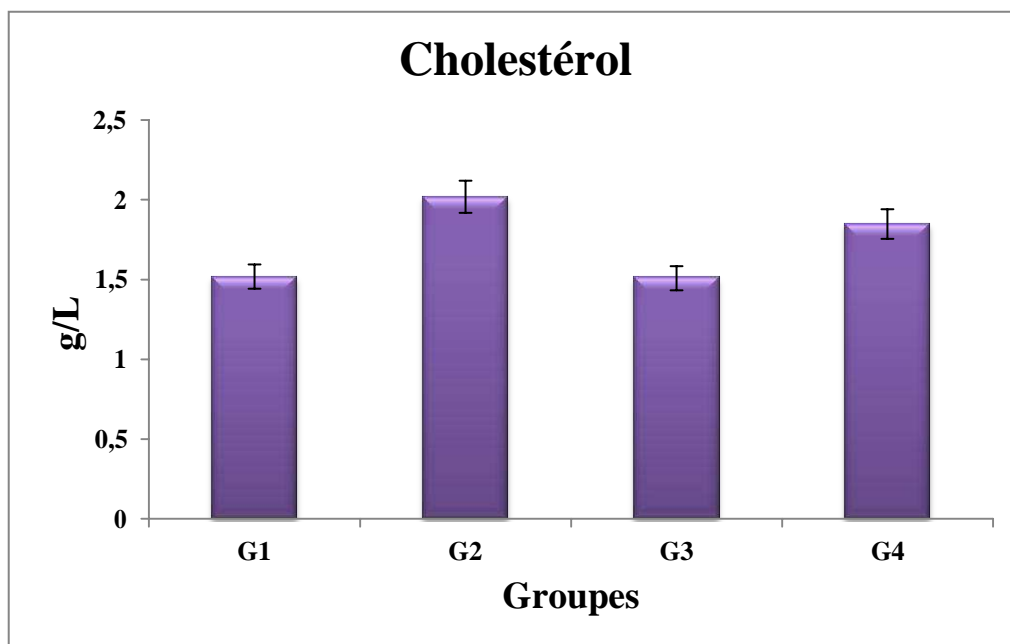
G1 : témoin ; G2 : 5 mL éthanol (trois mois) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (trois mois) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL éthanol au même temps (trois mois).

### III.2.12. Cholestérolémie

Les teneurs du cholestérol total, obtenues sur du sérum des animaux de chaque groupe sont présentées dans la [fig. 41](#).

Le dosage du taux lipidique du cholestérol a montré une augmentation très significative ( $P < 0.05$ ) chez les rats qui ont reçu uniquement de l'éthanol (G2) de l'ordre de 2.02 g/L par rapport au groupe témoin G1 (1.52 g/L).

En outre, on remarque une réduction de cette concentration sérique d'ordre respectif de 1.51 et 1.85 g/L, chez les rats du groupe G3 et G4, comparativement aux rats du groupe G2.



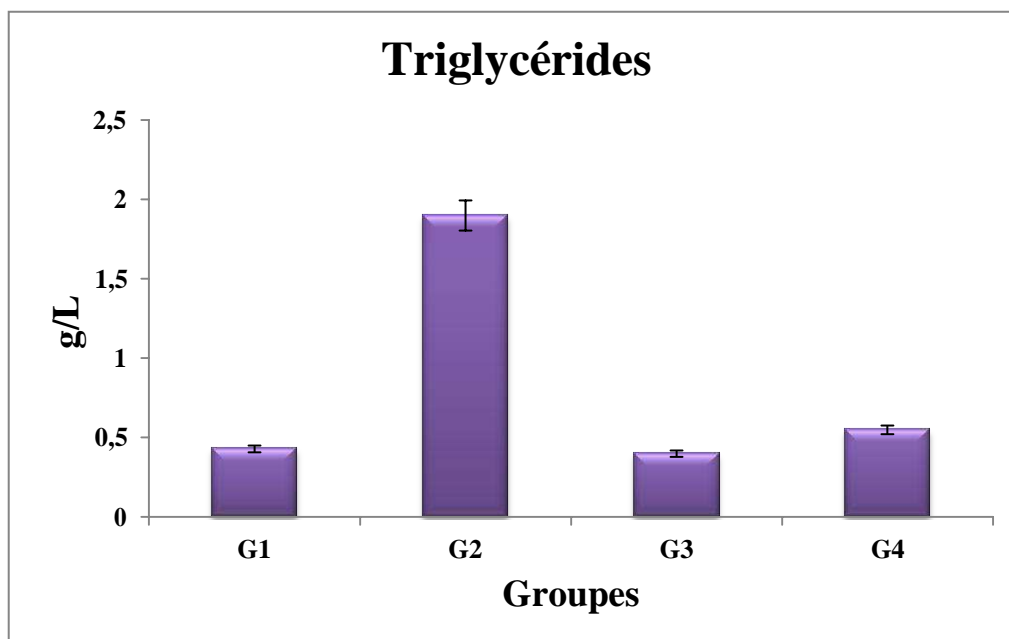
**Figure 41 :** Cholestérolémie (g/L) chez les rats traités par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* et/ou l'éthanol. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations  $\pm$ SEM (n = 6).

G1 : témoin ; G2 : 5 mL éthanol (trois mois) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (trois mois) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL éthanol au même temps (trois mois).

### III.2.13. Triglycéridémie

Selon les résultats illustrés dans la [fig. 42](#), les rats recevant l'éthanol (G2) ont enregistré une augmentation de la concentration sérique de triglycérides ( $P < 0,05$ ), de 1.9 g/L par rapport au groupe témoin (G1), alors que les concentrations de ce dernier chez les rats traités avec 200 mg/ Kg d'EEC était plus basse avec un taux de 0.4 g/ L.

De plus, comparé au groupe (G2), une différence significative importante ( $P < 0,05$ ); 0.55 g/L des concentrations de triglycérides a été observée chez les rats du groupe G4.



**Figure42 :** Triglycéridémie (g/L) chez les rats traités par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* et/ou l'éthanol. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations  $\pm$ SEM (n = 6).

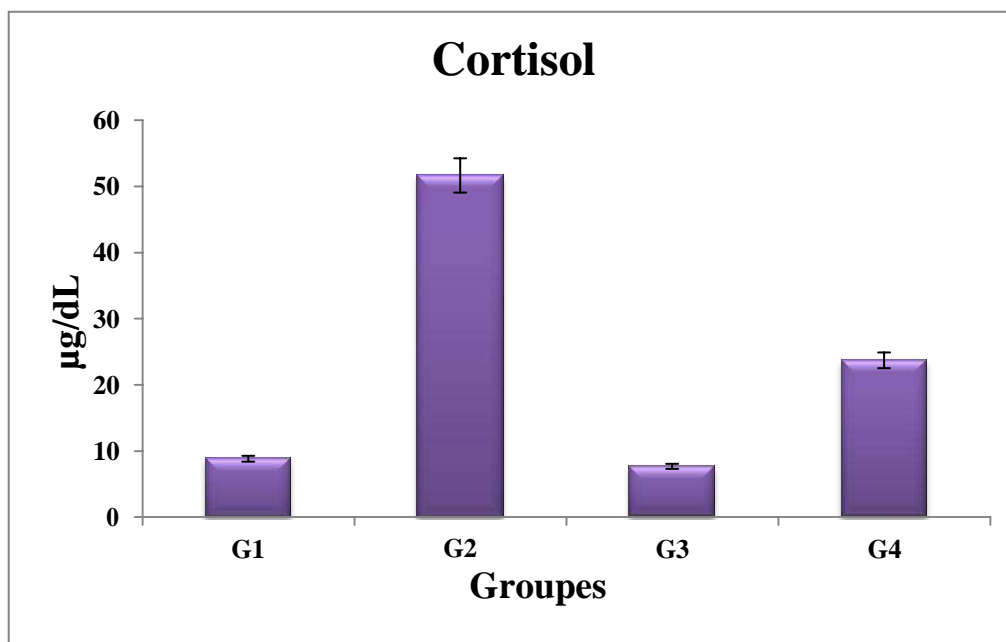
G1 : témoin ; G2 : 5 mL éthanol (trois mois) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (trois mois) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL éthanol au même temps (trois mois).

#### III.2.14. Taux de cortisol

La concentration de cortisol est significativement élevée ( $P < 0.05$ ) de 82.89 % (51.67  $\mu$ g/dL) chez les rats du G2 (reçus de l'éthanol) par rapport au groupe témoin G1 (8.84  $\mu$ g/dL).

Une diminution importante de 54.09 % a été observée chez les rats du G4 ; traités par 200 mg/kg d'EER et 5 mL de l'éthanol au même temps durant trois mois, par rapport au groupe G2.

Néanmoins, les rats ayant reçu seulement l'extrait EER, ont enregistré un taux infime devant celui des rats du G1, estimé de 13.12 % (fig. 43).



**Figure 43 :** Concentrations sériques de cortisol ( $\mu\text{g/dL}$ ) chez les rats traités par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* et/ou l'éthanol. Les valeurs représentent la moyenne ( $m$ ) de 6 déterminations  $\pm\text{SEM}$  ( $n = 6$ ).

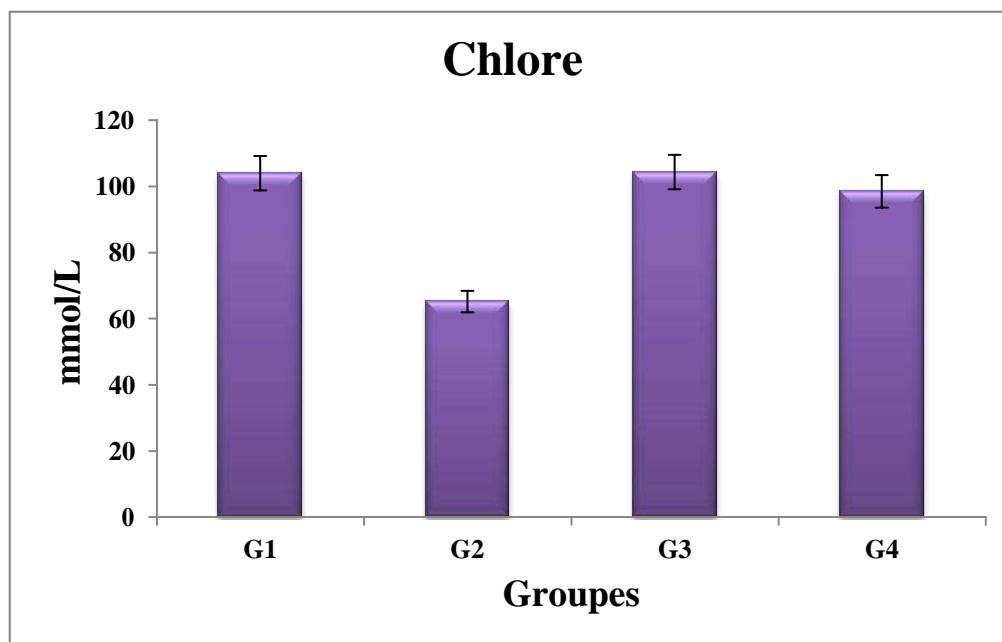
G1 : témoin ; G2 : 5 mL éthanol (trois mois) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (trois mois) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL éthanol au même temps (trois mois).

### III.2.15. Taux du chlore

D'après nos résultats illustrés dans la fig. 44, on constate qu'il y a une diminution significative ( $P < 0.05$ ) des teneurs en chlore chez les rats ayant subi l'éthylisme (G2) d'environ -37.34 % en comparaison avec le groupe témoin (G1).

Cependant, nous avons observé une augmentation très accrue de la teneur en chlore chez les rats du groupe ayant reçu l'extrait éthanolique du romarin (EER) en combinaison avec l'éthanol pendant trois mois (G4) comparativement aux rats du G2 ; toutefois, l'écart estimé est de +33.84 %.

En outre, aucune différence significative n'est observée pour la teneur en chlore mesurée suite à la supplémentation en extrait éthanolique du romarin pour les rats du G3 par rapport à ceux du groupe témoin (G1).



**Figure 44 :** Les teneurs sériques en chlore (mmol/L) chez les rats traités par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* et/ou l'éthanol. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations  $\pm$ SEM (n = 6).

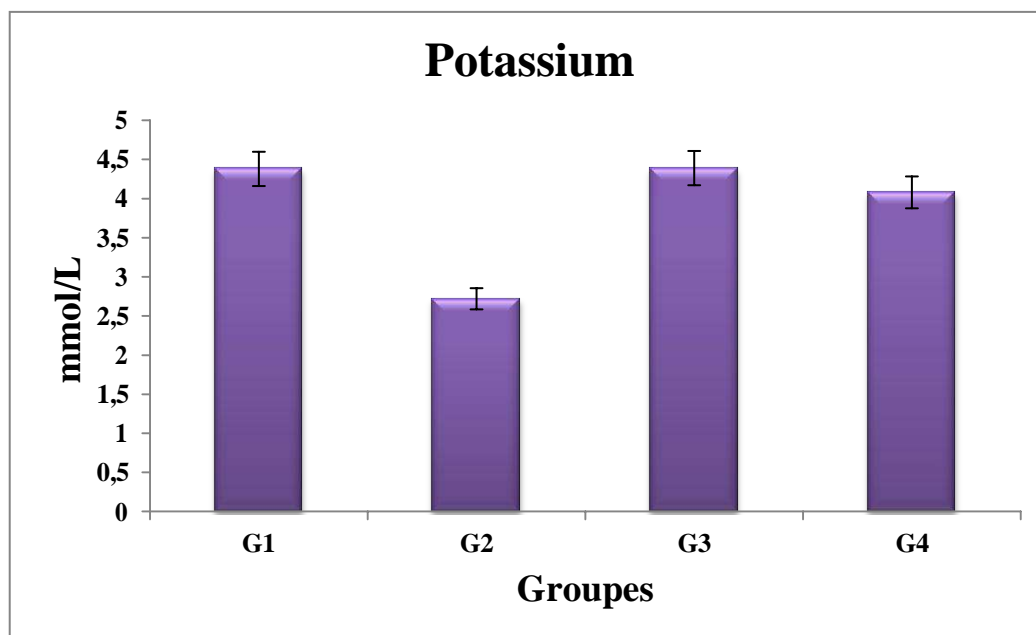
G1 : témoin ; G2 : 5 mL éthanol (trois mois) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (trois mois) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL éthanol au même temps (trois mois).

### III.2.16. Taux du potassium

Les résultats illustrés dans la fig. 45 indiquent que l'administration de l'éthanol d'une durée de trois mois présente un effet négatif sur les teneurs en potassium pour les rats du groupe G2, cette teneur est significativement ( $P < 0.05$ ) estimée de -37.90 % par rapport aux rats du groupe témoin.

Tandis que, l'administration 200 mg/kg de l'extrait du romarin et 5 mL d'éthanol au même temps aux rats et pendant trois mois (G4) a rétabli les teneurs en potassium de 1.5 fois en comparaison avec les animaux du G2.

Une similarité des teneurs en potassium a été observée entre le groupe d'animaux traités seulement par l'extrait EER (G3) et ceux du groupe témoin (G1).



**Figure 45 :** Les teneurs sériques en potassium (mmol/L) chez les rats traités par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* et/ou l'éthanol. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations  $\pm$ SEM (n = 6).

G1 : témoin ; G2 : 5 mL éthanol (trois mois) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (trois mois) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL éthanol au même temps (trois mois).

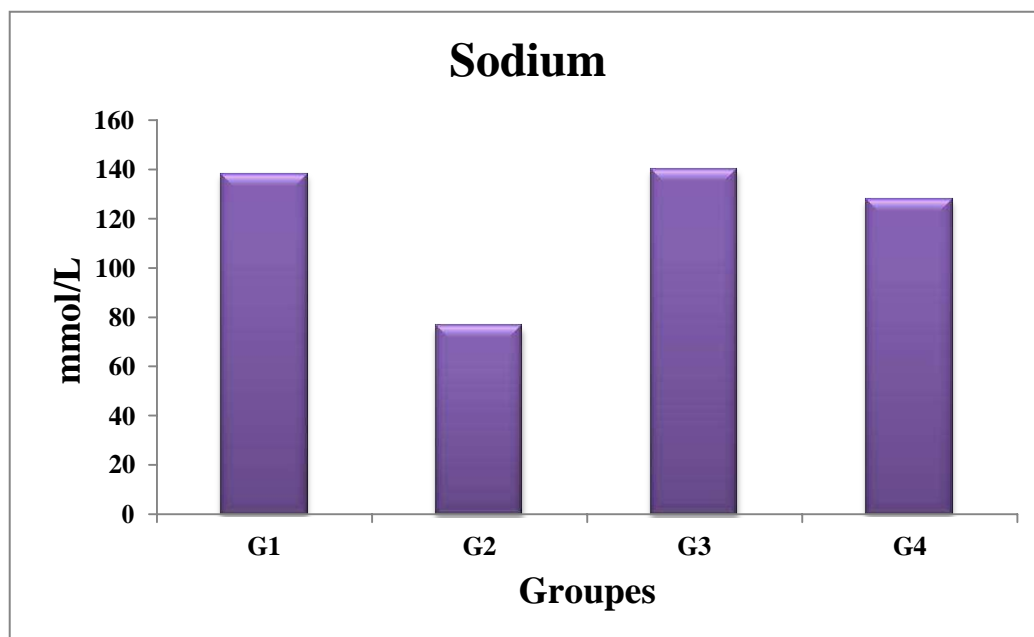
### III.2.17. Taux du sodium

Les résultats indiquent que la comparaison des différentes teneurs en sodium analysées décèlent une différence significative ( $p < 0,05$ ) entre les quatre groupes (fig. 46).

L'éthylisme chez les rats du groupe 2 entraîne une baisse significative ( $p < 0,05$ ) des teneurs en sodium, cette diminution est estimée de l'ordre 77.33 mmol/L par rapport au groupe témoin (G1) 138.25 mmol/L.

Cette tendance est inversée en comparaison avec les rats du G2, il ressort de façon évidente que la supplémentation de l'extrait du romarin et l'éthanol pendant trois mois en même temps chez les rats du G4, a permis d'augmenter significativement ( $p < 0,05$ ) la teneur en sodium avec une proportion de +40.29 %.

L'extrait éthanolique du romarin (EER) n'affecte pas d'une manière significative les teneurs en sodium, celles-ci sont presque similaires pour les groupes (G1 et G3) étudiés et variables de 138.25 à 140 mmol/L, respectivement.



**Figure 46:** Les teneurs sériques en sodium (mmol/L) chez les rats traités par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* et/ou l'éthanol. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations  $\pm$ SEM (n = 6).

G1 : témoin ; G2 : 5 mL éthanol (trois mois) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (trois mois) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL éthanol au même temps (trois mois).

### III.3. Statut antioxydant au niveau du foie

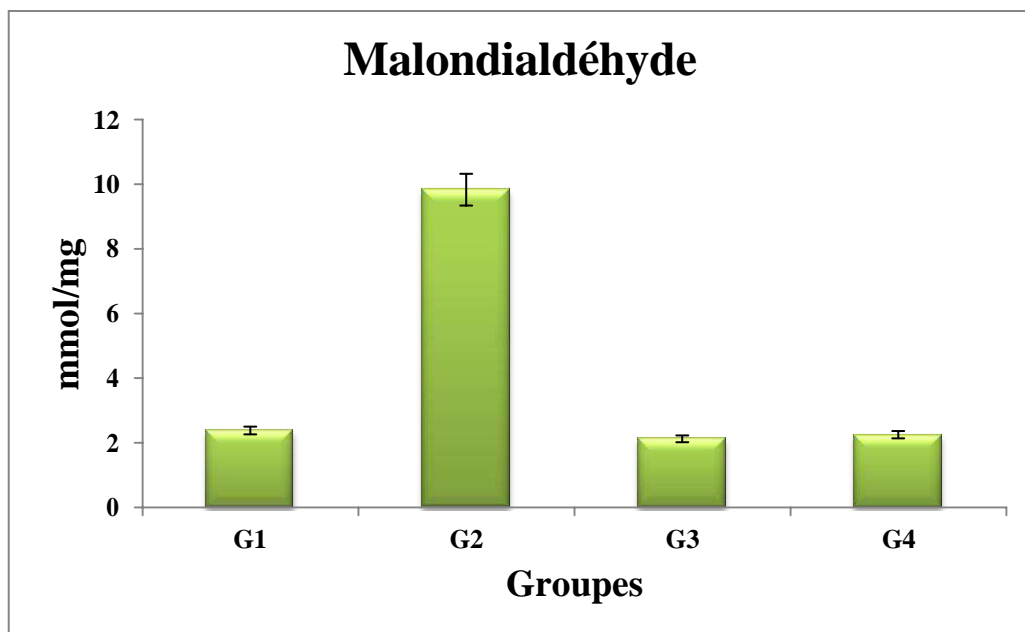
#### III.3.1. Taux du malondialdéhyde (MDA)

Les résultats des effets de l'éthanol et de la supplémentation en extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* (EER) sur les concentrations du MDA chez les rats des quatre groupes sont consignés dans la [fig. 47](#).

Les concentrations du MDA tendent à être significativement ( $p < 0.05$ ) plus élevées chez les rats du groupe 2 ; soumis à l'éthylisme (9.83 mmol/mg) comparativement à ceux du groupe témoin (2.38 mmol/mg).

Comparé au groupe 2, l'apport conjoint de 200 mg/kg d'EER et de 5 mL d'éthanol pendant trois mois (G4) diminue significativement ( $p < 0.05$ ) le taux du MDA, soit un écart estimé à environ de +77.11 %.

Cependant, nos résultats montrent que l'administration exclusive de 200 mg/kg de l'extrait du romarin EER a permis de réduire de -1.13 fois ( $p < 0.05$ ) le taux du MDA par rapport au groupe témoin (G1).



**Figure 47 :** Les teneurs sériques en malondialdéhyde (mmol/mg) chez les rats traités par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* et/ou l'éthanol. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations  $\pm$ SEM (n = 6).

G1 : témoin ; G2 : 5 mL éthanol (trois mois) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (trois mois) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL éthanol au même temps (trois mois).

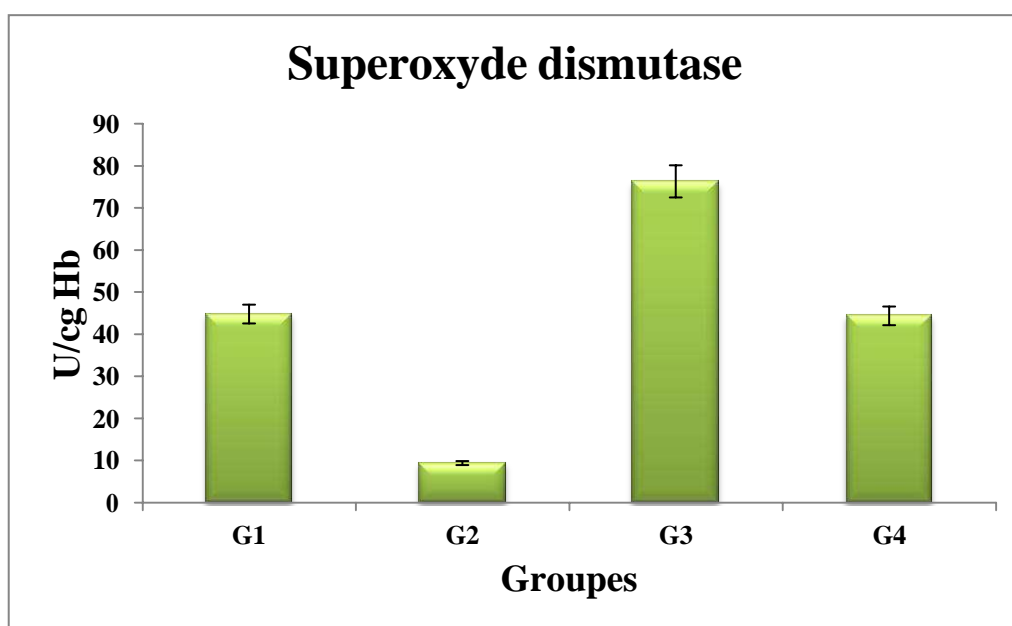
### III.3.2. Taux du superoxyde dismutase (SOD ; EC 1.15.1.1), de catalase (CAT ; EC 1.11.1.6) et de glutathion peroxydase (GSH-Px)

Les résultats décèlent en conséquence que l'administration de l'éthanol seul à raison de 5 mL et pendant 90 jours aux rats du groupe G2 a diminué significativement ( $P < 0.05$ ) les enzymes antioxydantes hépatiques (SOD, CAT et GSH-Px) avec des proportions respectives de -79.04, -77.47 et -89.69 % par rapport au rats du groupe témoin (G1) (figures 48, 49 et 50).



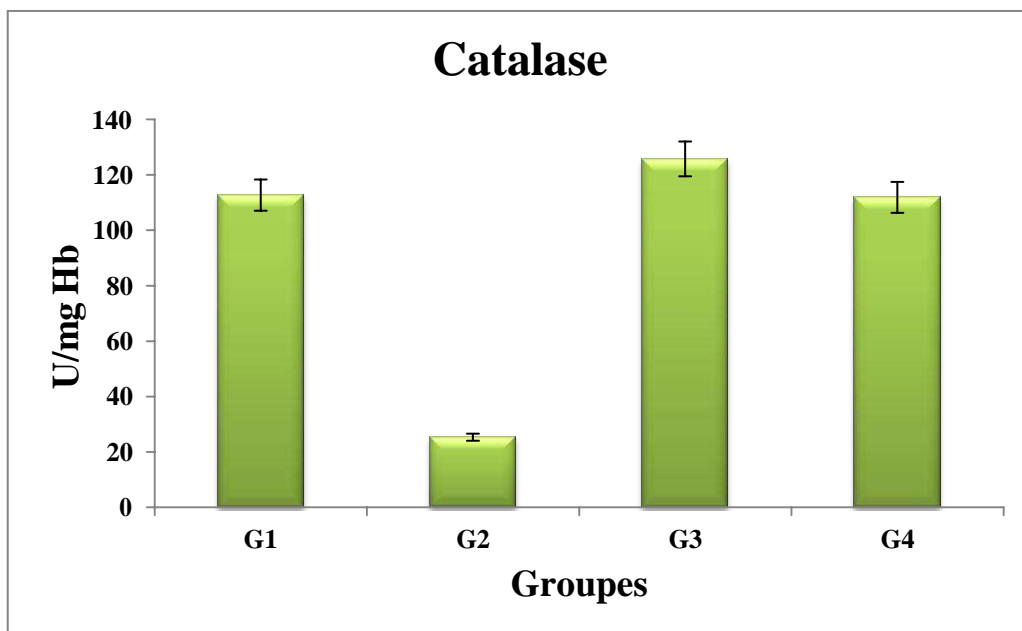
En revanche, l'activité de ces enzymes antioxydantes hépatiques a été améliorée significativement ( $P < 0.05$ ) chez les rats administrés par 200 mg/kg de l'extrait éthanolique du romarin EER notamment les rats du G4 (ayant reçu 200 mg/kg d'EER et 5 mL d'éthanol), d'où on a enregistré une augmentation de la SOD (44.36 U/cg Hb), de la catalase (111.88 U/mg Hb) et de la GSH-Px (121.25 U/g Hb) par rapport aux rats alcoolisés (G2).

En effet, aucun changement de ces activités n'a été observé chez les rats n'ayant reçu que l'extrait éthanolique du romarin (G3) en comparaison avec ceux du G1.



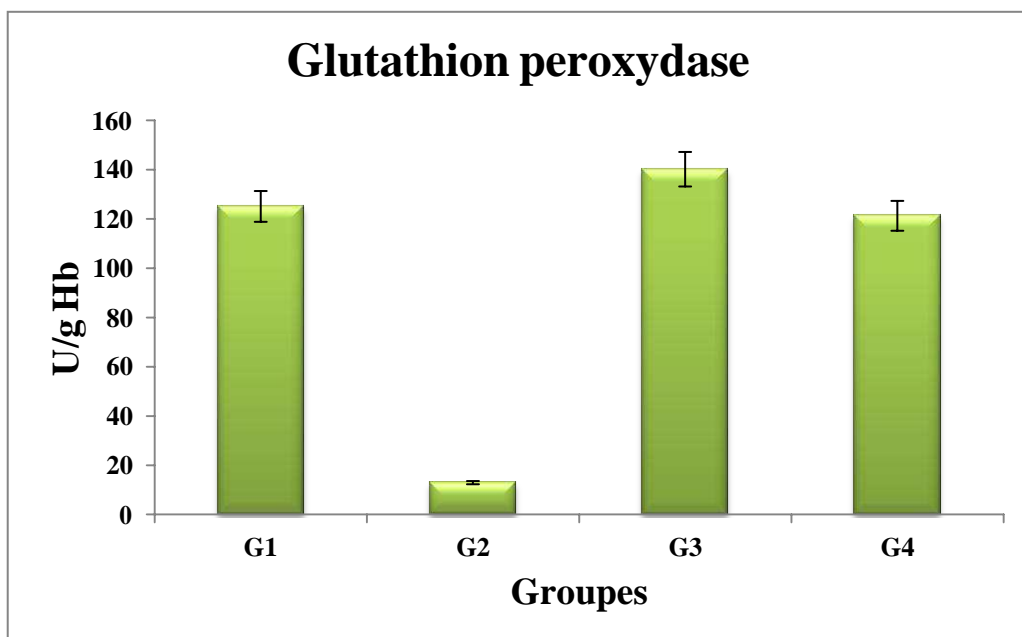
**Figure 48 :** Teneurs en superoxyde dismutase (SOD) chez les rats traités par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* et/ou l'éthanol. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations  $\pm$ SEM (n = 6).

G1 : témoin ; G2 : 5 mL éthanol (trois mois) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (trois mois) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL éthanol au même temps (trois mois).



**Figure 49 :** Teneurs en catalase (CAT) chez les rats traités par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* et/ou l'éthanol. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations  $\pm$ SEM (n = 6).

G1 : témoin ; G2 : 5 mL éthanol (trois mois) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (trois mois) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL éthanol au même temps (trois mois).



**Figure 50 :** Teneurs en glutathion peroxydase (GSH-Px) chez les rats traités par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* et/ou l'éthanol. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations  $\pm$ SEM (n = 6).

G1 : témoin ; G2 : 5 mL éthanol (trois mois) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (trois mois) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL éthanol au même temps (trois mois).

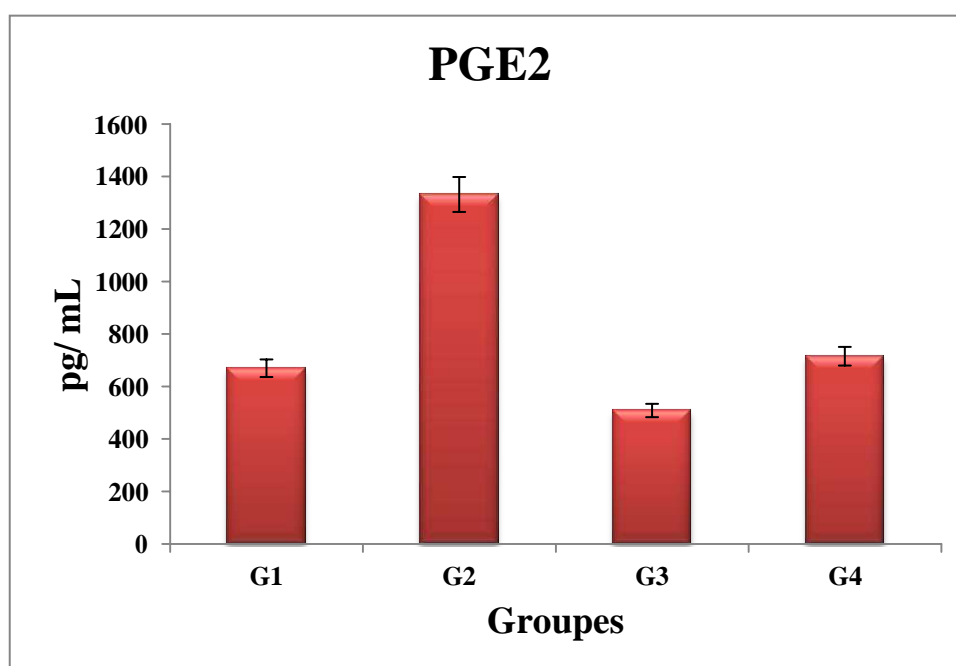
### III.4. Biomarqueurs de l'inflammation

#### III.4.1. Taux de prostaglandine E2 (PGE2)

D'après nos résultats rapportés dans la [fig.51](#), l'intoxication induite par l'éthanol est accompagnée par une augmentation hautement significative ( $P < 0.05$ ) du taux de prostaglandine E2 (PGE2) chez les animaux du G2 (1332 pg/mL) en comparaison avec ceux du groupe témoin G1 (670 pg/mL).

Bien que, le taux de PGE2 a été réduit significativement ( $P < 0.05$ ) de -1.86 fois chez les rats du groupe G4 (qui ont reçu conjointement 200 mg/kg d'EER et 5 mL d'éthanol durant trois mois) par rapport aux rats alcoolisés du G2.

Quoique, les animaux recevant seulement 200 mg/kg d'EER (G3) ont présenté un taux de PGE2 de -1.32 fois par rapport à ceux du groupe témoin (G1).



**Figure 51 :** Teneurs en prostaglandine E2 dans exsudats péritonéaux (pg/mL) chez les rats traités par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* et/ou l'éthanol. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations  $\pm$ SEM (n = 6).

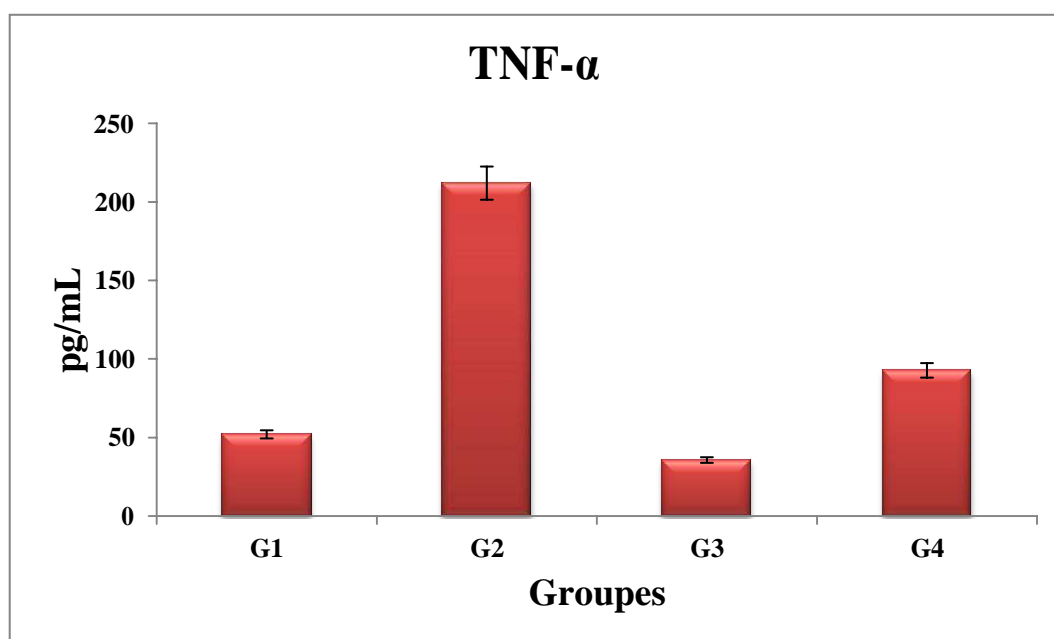
G1 : témoin ; G2 : 5 mL éthanol (trois mois) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (trois mois) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL éthanol au même temps (trois mois).

### III.4.2. Détermination du Facteur de Nécrose Tumorale (TNF- $\alpha$ )

Une forte production du TNF- $\alpha$  est observée dans les homogénats hépatiques des rats n'ayant pas reçu l'extrait du romarin et ayant subi l'éthylisme (G2), avec une moyenne de 211.87 pg/mL par rapport au G1 (51.97 pg/mL) (fig. 52).

Le romarin diminue de manière significative ( $P < 0.05$ ) la production du TNF- $\alpha$  chez le groupe des rats recevant l'extrait éthanolique du romarin et intoxiqués par la l'éthanol (G4), cette diminution atteint -56.24 % par rapport aux rats du groupe alcoolisé (G2).

Dans cet ordre, la teneur en TNF- $\alpha$  apparaît être en relation avec l'addition de l'extrait EER. On enregistre à ce propos une concentration plus basse chez les groupe recevant exclusivement l'extrait éthanolique du romarin, par rapport au groupe ne l'ayant pas reçu (G1) ; (35.6 vs 51.97 pg/mL).



**Figure 52 :** Teneurs en TNF- $\alpha$  dans le foie (pg/mL) chez les rats traités par l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* et/ou l'éthanol. Les valeurs représentent la moyenne (m) de 6 déterminations  $\pm$ SEM (n = 6).

G1 : témoin ; G2 : 5 mL éthanol (trois mois) ; G3 : 200 mg/kg d'EER (trois mois) ; G4 : 200 mg/kg d'EER et 5 mL éthanol au même temps (trois mois).

### **III.5. Histologique du foie**

L'étude histologique du foie des rats du groupe témoin (G1) montre une architecture normale du parenchyme hépatique, avec des sinusoides et une veine centro-lobulaire qui sont essentiellement normales (fig. 53A). La structure histologique (fig. 53C) du foie des rats traités exclusivement avec l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* (G3) a révélé une architecture similaire à celle observée dans le groupe témoin (G1).

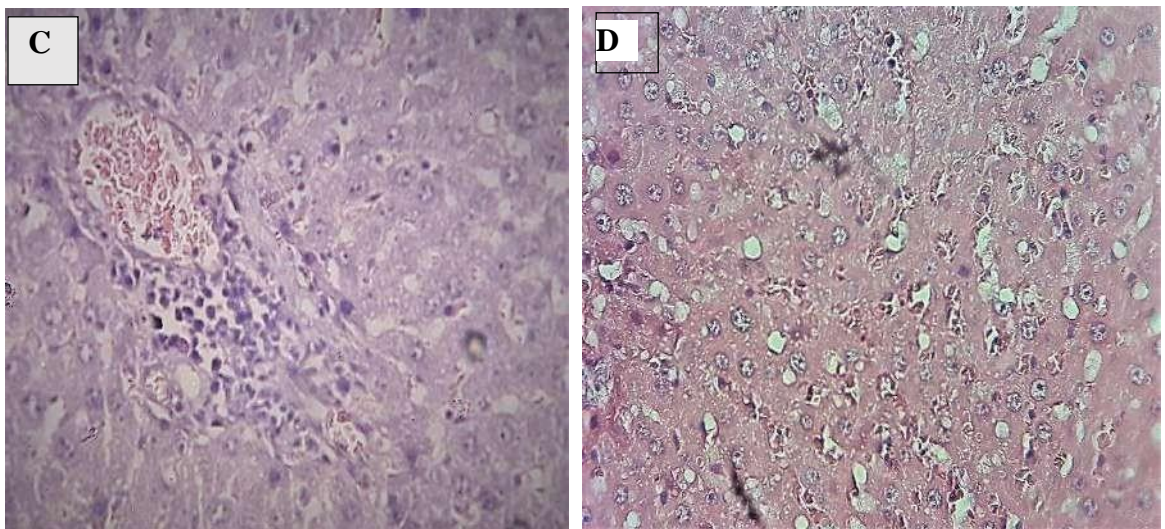
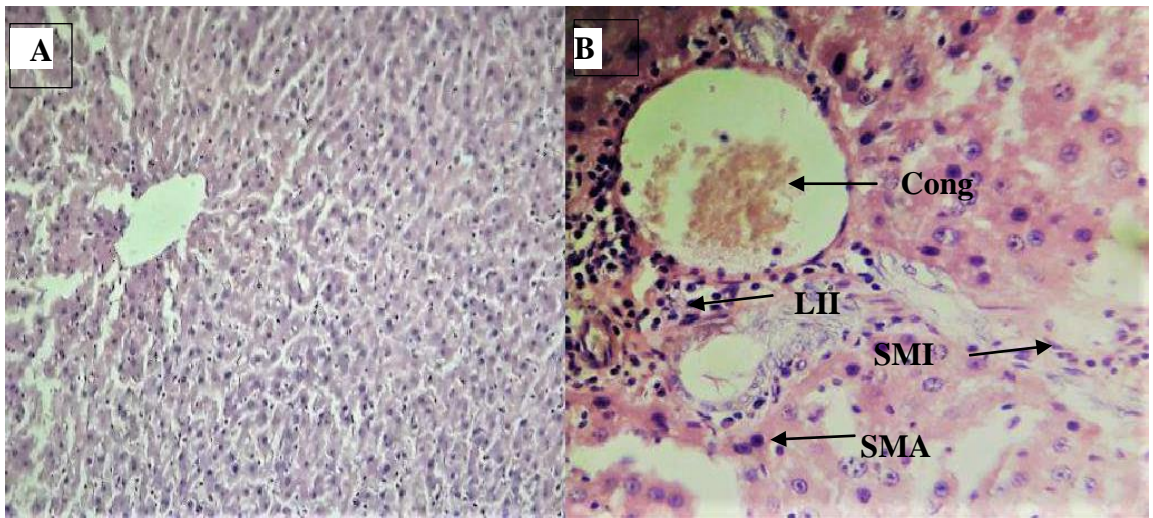
En revanche, la coupe histologique de la fig. 53B se référant à G2 (rats intoxiqués avec l'alcool éthylique), a montré une variété des lésions hépatiques majeures, une stéatose sévère mixte (micro et macro vacuolaire), congestion des veines portes et des capillaires sinusoides, réaction inflammatoire portale et au niveau des capillaires sinusoides de type lymphocytaire et une nécrose hépatocytaire.

Les rats du groupe 4 (ayant reçu 200 mg/kg/j d'extrait éthanolique de *Rosmainus officinalis* et 5 mL d'éthanol au même temps) montre un foie présentant une architecture normale avec un foyer discret de stéatose mixte, une congestion discrète sinusoidale avec la présence de quelques éléments inflammatoires au niveau des capillaires sinusoidaux (fig. 53D).

### **Discussion**

La voie orale constitue la principale voie d'entrée de l'éthanol dans l'organisme, par ingestion de boissons alcoolisées, et les milieux biologiques les plus couramment utilisés pour le dosage de l'éthanol sont le sang total et l'air alvéolaire expiré (Silvain et Chagneau-Derode, 2006). L'intérêt de dosage d'alcool chez les différents groupes est de déterminer la gravité d'une intoxication éthylique aigue ou chronique.

La mesure de l'alcoolémie chez les rats du groupe intoxiqué (G2) a montré un taux élevé d'éthanol au niveau sanguin par rapport au groupe témoin suite à une consommation chronique d'une solution alcoolique à 20 % pendant 90 jours successifs montrant la biodisponibilité de la substance toxique dans le milieu antérieure.



**Figure 53 :** Coupes histologiques de foie de rat du groupe : A (G1) : témoin ; B (G2) : 5 mL d'éthanol (90 jours) ; C (G3) : 200 mg/kg/j d'EER (90 jours) ; D (G4) : 200 mg/kg/j d'EER et 5 mL d'éthanol au même temps (90 jours).

**Cong:** congestion, **LII:** infiltrat inflammatoire lymphocytaire, **SMA:** stéatose macro vacuolaire, **SMI:** stéatose microvasculaire.



L'éthanol est absorbé par diffusion transmembranaire libre au niveau de l'estomac (10 %) et surtout au niveau du duodénum et du jéjunum proximale (70 à 80 %). L'éthanol atteint ensuite le foie par la veine porte, puis la circulation générale. Le pic sérique est atteint en 45 à 60 minutes en moyenne (Jones, 2005).

L'éthanol circule sous forme libre, il n'est pas lié aux protéines plasmatiques. Les organes et tissus richement vascularisés (cerveau, foie, poumons) sont atteints rapidement : la demi-vie de distribution est de 7 à 8 minutes (Berr et al., 2001). Sa répartition dans les différents compartiments de l'organisme dépend de leur contenu hydrique. L'éthanol étant peu liposoluble, seul 4% est retenu dans le tissu adipeux.

La co-administration de l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* aux rats intoxiqués par l'alcool montre une diminution significative du taux d'éthanol sanguin comparé au lot intoxiqué seulement, suggérant que la pharmacocinétique de l'éthanol peut être influencée par la prise concomitante de l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis*.

Ainsi, l'absorption est modifiée par les phytoconstituants bioactifs du romarin qui peuvent agir au niveau de la motilité gastrique ou comme des substances inductrices de l'activité enzymatique de l'ADH, l'ALDH et cytochrome P450 tout en favorisant ainsi son métabolisme et élimination.

Un autre mécanisme d'action est possible, est que l'extrait EER peut être capable d'adsorber les molécules d'éthanol tel une éponge. Il serait ensuite éliminé par les voies naturelles basses ce qui permet de réduire l'absorption de l'éthanol.

L'analyse sérique a révélé un dysfonctionnement des paramètres hépatiques suite à l'exposition chronique des rats à l'éthanol durant trois mois chez les rats.

Selon nos résultats obtenus, une diminution du taux de l'albumine chez les rats alcoolisés par rapport au groupe témoin, ceci peut être expliqué par Belier et Michaux (2007), qui ont constaté une atteinte hépatique qui est due à une diminution de libération des protéines hépatiques par une anomalie du système microlobulaires des hépatocytes suite à une intoxication alcoolique chronique, étant donné que le foie participe en grande partie à maintenir l'homéostasie de l'organisme, en s'occupant de la majorité des synthèses des protéines plasmatiques de l'organisme.

D'après nos résultats du bilan protéique, les rats du G2 qui se sont traités uniquement par l'alcool éthylique présentent une diminution significative de la concentration de protéine totale par rapport au groupe témoin négatif, cette variation physiologique peut indiquer une hépatopathie chronique selon les résultats trouvés par [Dietz et Wiesner \(1984\)](#).

En revanche, chez les rats du groupe G4 qui ont reçu un traitement de 200 mg/kg/jour d'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* au cours de l'éthylisme, on constate une augmentation significative du taux de protéines totales par rapport aux rats alcoolisés du G2. Nos résultats sont en désaccord avec ceux [Durdane et al. \(2001\)](#), qui ont remarqué une augmentation du taux des protéines totales chez les rats intoxiqués par l'alcool.

Les concentrations de bilirubine issue de la dégradation de l'hémoglobine, dont la bile, ont été utilisées pour évaluer les lésions hépatiques induites chimiquement chez les rats traités uniquement par l'alcool éthylique, d'où une augmentation significative du taux de la bilirubine totale a été observée, comparé au groupe témoin ([Plaa et Hewitt, 1982](#)). Cette exacerbation des valeurs dans le sérum, indique une altération de la fonction excrétrice du foie suite à un défaut d'élimination par l'hépatocyte signe d'une atteinte hépatique causé par une intoxication éthylique chronique car il est montré que les toxiques nécrosants génèrent des lésions du parenchyme hépatique induisant une élévation de la concentration en bilirubine dans le sérum ([I.P.C.S., 1999](#)).

Une augmentation est enregistrée de l'urémie et de l'acide urique chez les rats alcoolisés, ceci est expliquée par ([Das Kumar et al. 2008](#)), qui ont indiqué que la relation entre la consommation d'alcool et l'insuffisance rénale chronique a cependant fait l'objet de peu de recherches.

L'hypertriglycémie et l'hypercholestérolémie chez le groupe G2 recevant l'alcool éthylique sont dues à une consommation chronique d'alcool éthylique qui engendre des perturbations métaboliques lipidiques dont l'augmentation de synthèse du cholestérol hépatique par l'alcool ([Lieber, 1975 ; Bergheim et al., 2006](#)) et des taux sanguins de triglycéride, en parallèle avec la quantité d'alcool ingérée et le mode de consommation, ceci est en accord avec une étude menée chez le singe rhésus où l'ingestion d'éthanol pendant trois mois a entraîné une accumulation de triglycérides, de cholestérol et de phospholipides dans le sérum et le foie, rapporté par [Vasdev et al. \(1975\)](#).

L'hépatotoxicité éthylique est traduite par une accumulation du cholestérol dans le foie et une augmentation très accrue des LDL et HDL plasmatiques ([Longo et al., 2001](#)), alors que, l'amélioration significative des taux de cholestérol totale et triglycéride sérique chez les rats



du G4 (qui ont reçu le romarin et l'éthanol au même temps) révèle une action hépatoprotectrice de cet extrait vis-à-vis les altérations hépatiques induites par l'éthylisme.

De plus, la principale voie pour le métabolisme de l'alcool implique l'enzyme alcool déshydrogénase (ADH) (Maher, 1997 ; Pronkro et al., 2001). L'ADH métabolise l'alcool en toxique l'acétaldéhyde, dont l'interaction avec les protéines cellulaires et les lipides peuvent entraîner la génération de radicaux libres et lésions hépatocellulaires.

Nos résultats montrent que la consommation de l'alcool éthylique chez les rats ; a engendré une augmentation significative ( $P < 0.05$ ) des enzymes hépatiques (ALAT, ASAT,  $\gamma$ GT et PAL) par rapport au groupe témoin (G1). En effet, les résultats sont conformes aux observations d'Uzun et al. (2005) qui ont signalé une augmentation significative de l'activité d'ALAT et d'ASAT sériques chez le rat, après une intoxication éthylique chronique.

L'augmentation du taux sérique de ces enzymes hépatiques peut être attribuée à l'intégrité structurale endommagée du foie par l'altération des membranes extra cellulaires et intra cellulaires des hépatocytes traduisant une nécrose cellulaire induite par le métabolisme toxique d'alcool éthylique, ce qui entraîne la fuite de ces enzymes du cytosol dans le sang. Cette observation est en harmonie avec les résultats de Vermaulen et al. (1992) qui ont observé que les transaminases sont normalement situées dans le cytoplasme et libérées dans la circulation sanguine après endommagement des cellules hépatiques ce qui conduit à l'augmentation de leurs taux dans le sérum.

Superoxyde dismutase, catalase et glutathion peroxydase sont les principales enzymes antioxydantes présentes dans les peroxysomes de presque toutes les cellules aérobies et qui sont en première ligne de défense contre les dommages oxydatifs. Ces antioxydants jouent un rôle clé dans l'élimination des ROS, réduction du peroxyde d'hydrogène et maintien des équilibres redox dans le système biologique ce qui aide à protéger les cellules contre les blessures d'oxydation (Wu et Cederbaum, 2003).

Selon Albano et al. (1998) et Wu et Cederbaum (2003), les cellules amplifient les activités enzymatiques antioxydantes contre l'augmentation soudaine des métabolites de l'oxygène, afin de maintenir l'intégrité des membranes cellulaires qui est indispensable pour le fonctionnement cellulaire normale. Une étude faite par Kayani et al. (2010) a montré que la dégradation oxydative de l'éthanol par voie enzymatique et non-enzymatique génère des produits toxiques tels que l'acétaldéhyde pour le corps humain qui joue un rôle important dans la genèse du stress oxydatif.

Nos résultats ont montré une diminution significative des activités enzymatiques (SOD, CAT et GSH-Px) dans le foie des rats alcoolisés, ce qui provoque un stress oxydatif qui est caractérisé par la génération d'acétaldéhyde toxique et d'autres molécules réactives dans la cellule, reflétant l'effet pathologique du métabolisme de l'éthanol sur le statut antioxydant. Ces résultats corroborent avec ceux de l'étude de [De level et al. \(1996\)](#) qui ont montré que, la consommation chronique d'alcool modifie les niveaux à la fois enzymatiques et les systèmes antioxydants endogènes non enzymatiques. Il en résulte un stress oxydatif avec une cascade d'effets, affectant ainsi l'intégrité fonctionnelle et structurelle des membranes cellulaires et organites.

Ces changements ont été nettement inversés dans notre étude, par l'administration de l'extrait éthanolique du *Rosmarinus officinalis* résultant, l'augmentation du taux de SOD, CAT et GSH-Px chez les rats alcoolisés et traités par le romarin. Cette amélioration des activités enzymatiques confirme l'hypothèse que l'extrait EER a un effet réparateur dans l'induction du statut antioxydant chez les rats intoxiqués par l'éthanol et permet de protéger le foie contre l'effet délétère du stress oxydatif généré par l'éthanol responsable de sa toxicité. Des observations analogues ont été rapportées par [Jaiswal \(1994\)](#) et [Primiano et al. \(1997\)](#) qui ont remarqué que ces changements sont probablement dus aux effets protecteurs combinés des composants chimiques bioactifs de l'extrait du romarin et par l'augmentation de la transcription du gène codant pour les enzymes, car il a été rapporté que les gènes codants pour les enzymes de phase II sont fortement induits par les composés antioxydants.

D'après [Arouma \(1998\)](#), la peroxydation lipidique ; un indice de stress oxydatif *in vivo*, processus au cours duquel les acides gras polyinsaturés constitutifs des phospholipides membranaires sont convertis en lipoperoxydes. Il en résulte une altération considérable de la structure et des fonctions des membranes cellulaires et subcellulaires ; elle est souvent caractérisée par une forte concentration du malondialdéhyde (MDA).

Les résultats de notre étude ont montré une augmentation très importante de la concentration en malondialdéhyde hépatique chez les rats ayant reçu de l'éthanol pendant trois mois par rapport aux rats du groupe témoin G1. [Uchiyama et Mihara \(1978\)](#), indiquent que le MDA dans l'homogénat du foie a été déterminée par réaction avec le TBA et utilisé comme indice de lipide Peroxydation. De même, [Maher \(1997\)](#) a dévoilé qu'un nombre de systèmes qui génèrent des espèces aldéhydiques réactives et les espèces réactives de l'oxygène sont activées par une consommation chronique d'alcool.

Le métabolisme de l'alcool qui se produit principalement dans le foie se caractérise par la génération de radicaux libres et espèces réactives de l'oxygène. Le taux élevé observé de MDA dans le foie pourrait provoquer la génération de radicaux libres entraînant la peroxydation des lipides membranaires impliquée dans la pathogénie des atteintes hépatiques dues à une intoxication alcoolique par l'altération de la structure et des fonctions des membrane cellulaires et subcellulaires, rapporté par [Emerit et al. \(1987\)](#).

Le blocage de la peroxydation lipidique par le *Rosmarinus officinalis* peut être dû à l'ensemble de composés bioactifs antioxydants présents dans un extrait de plante selon les rapports de [Kumar et Kutan \(2004\)](#) et [Khatoon et al. \(2005\)](#).

Des résultats similaires ont été obtenus par [Sotelo-Félix et al. \(2002\)](#), qui ont montré que le *Rosmarinus officinalis* a partiellement limité l'inflammation et la nécrose induites par le tétrachlorure de carbone CCl<sub>4</sub> chez le rat, de plus, d'autres recherches ont montré également, que les extraits méthanoliques du romarin pourrait ainsi inhiber la peroxydation des lipides dans le foie des rats traités au CCl<sub>4</sub> avec des extraits de *Rosmarinus officinalis* qui confèrent des effets antioxydants à travers l'inhibition de la lipoperoxydation ([Albu et al., 2004](#) ; [Bragagnolo et al., 2005](#)).

Le rôle d'un stress oxydant dans l'hépatotoxicité alcoolique a donné lieu à de nombreuses controverses ; plusieurs études ont dévoilé le rôle du stress oxydant dans les alcoolopathies dont la plupart montrent une association entre les marqueurs biologiques du stress oxydant et les atteintes hépatiques secondaires à l'alcoolisation ([Aleynik et al., 1998](#) ; [Yang et al., 2012](#)).

Il est donc probable que le stress oxydant représente un facteur pathogénique essentiel dans les alcoolopathies. Il s'accompagne d'une augmentation de la peroxydation lipidique, de l'oxydation des protéines et la production des radicaux libres. Ces altérations oxydatives agissent en synergie et déterminent une cytotoxicité (Lieber et DeCarli, 1989 ; Yang et al., 2012).

L'administration de l'extrait éthanolique du romarin procure d'une activité ; voire le piégeage des radicaux libres, déterminé par le test DPPH. Nos résultats rejoignent ceux de Debersac et al. (2001) qui ont exhibé que le *Rosmarinus officinalis* exerce des effets bénéfiques sur le traitement de l'hépatotoxicité induite par l'éthanol chez le rat Wistar en modulant l'état oxydatif hépatique par le piégeage des radicaux libres nocifs, mais aussi par l'activation et l'induction des mécanismes enzymatiques de défense physiologiques et stimulation immunitaire ce qui permet de limiter l'étendue de la peroxydation lipidique et donc la préservation des membranes cellulaires ou/et intracellulaire des hépatocytaires dans le tissu hépatique des animaux ou peut agir directement sur le processus de transformation de l'éthanol en métabolites secondaires dans l'organisme de l'animal par l'augmentation de sa clairance qui peut être un autre mécanisme d'action possible (Hur et al., 2004).

D'après nos résultats biochimiques et histopathologiques, l'intoxication alcoolique chronique a conduit à la réduction de la capacité antioxydant par la production excessive des espèces réactives oxygénées et déplétion du système de défense antiradicalaire suite à son métabolisme dans le foie, en générant une lipoperoxydation induisant à la détérioration du tissu hépatique, la présence de ces lésions engendre la destruction des hépatocytaires.

Nanci et al. (2012) ont rapporté que l'alcool éthylique (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) est le major composant toxique des boissons alcooliques, son ingestion à long terme évoque des multiples variations dans les fonctions cellulaires et le système oxydant/antioxydant (Das et al., 2005) affectant plusieurs organes tel que : le foie, le cerveau, les reins et le pancréas (Sentihil et al., 2003), il est absorbé au niveau gastrique et intestinale (Guidot et Hart, 2005 ; Nieto, 2012).

Les résultats de Cederbaum et al. (2009) et Shukla et Aroor (2006) ont signalé que le métabolisme et l'élimination de l'alcool éthylique s'effectuent principalement dans le foie, qui est l'organe cible des effets nocives de ce composant et qui causent plusieurs pathologies diverses consécutives regroupant la stéatose, hépatite alcoolique, fibrose et son stade final de la cirrhose, ainsi que le carcinome hépatocellulaire, caractérisées par des lésions très différentes dont l'étendue est variable suivant la dose et le mode d'administration.

Le romarin est riche en présence de composés chimiques bioactifs tels que les polyphénols et les flavonoïdes comme une partie de ses métabolites secondaires (Ighodaro et al. 2009), qui pourraient jouer un rôle important dans le système de défense car ils sont reconnus comme d'excellents anti-oxydants. Ce qui pourrait expliquer la propriété antioxydante de l'EER qui lui a permis de protéger le foie contre les désastres ; effets des radicaux libres et des espèces réactives de l'oxygène (ERO) générés par le métabolisme alcoolique, cité par Bruneton (1999). En outre, les métabolites du *Rosmarinus officinalis* sont connus pour d'autres propriétés biologiques diverses qui peuvent jouer un rôle dans la protection contre les dommages hépatiques induit par l'éthylisme, rapporté par Drissa et al. (2004).

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif de l'étude développée dans la présente thèse est de déterminer l'effet hépatoprotecteur et neuroprotecteur de l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* contre la toxicité chronique induite par l'éthanol chez le rat Wistar. L'étude est mise en œuvre par des tests *in vivo* et d'autres *in vitro*. Dans une première étape, nous avons procédé à l'extraction à partir des feuilles de *Rosmarinus officinalis*, puis à son fractionnement sur une colonne de chromatographie pour l'identification des composants bioactifs ainsi que leur quantification. Ensuite, l'étude de l'activité antioxydante *in vitro* de l'extrait a été entreprise en ciblant différents mécanismes ; la capacité de piéger les radicaux libres, l'aptitude à inhiber la peroxydation lipidique.

Les résultats montrent un effet antioxydant majeur. L'étude *in vivo* est effectuée en induisant l'hépatotoxicité alcoolique, suivie par la thérapie. Les résultats montrent une amélioration considérable de l'activité des enzymes hépatiques (ASAT, ALAT et PAL) et le statut des enzymes et molécules antioxydants (SOD, CATA, GSH, MDA) au niveau tissulaire. Une amélioration du tissu hépatique a été, également, observée.

Il est important de signaler que l'étude de la toxicité réalisée *in vivo* dans les conditions expérimentales, en termes de quantités administrées et de durée du test, utilisés dans ce travail montre que l'extrait est dépourvu de toxicité hépatique. Au vu des effets obtenus chez l'animal, les perspectives médicinales de l'extrait de *Rosmarinus officinalis* sont donc très prometteuses mais les essais cliniques manquent. Cette étude pourrait être complétée par d'autres essais afin de développer des approches appropriées dans le but d'une éventuelle application chez l'homme.

## **Références bibliographiques**

1. Abdelhalim, A., Karim, N., Chebib, M., Aburjai, T., Khan, I., Johnston, G. A., & Hanrahan, J. (2015). Antidepressant, anxiolytic and antinociceptive activities of constituents from *Rosmarinus officinalis*. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 18(4), 448-459.
2. Adams T.F., Wongchai C., Chaidee A. et al. "Singing in the Tube"—audiovisual assay of plant oil repellent activity against mosquitoes (*Culex pipiens*). *Parasitology Research*, 2016 ; 115 (1) ; 225-39
3. Adelon N, P. Dictionnaire des Sciences Médicales, Pancoucke CLF, 1812, Paris. Library of Congress R125 D5, R125
4. Agarwal DP. Genetic polymorphisms of alcohol metabolizing enzymes. *Pathol Biol*.2001; 49(9):703-9.
5. Aherne S.A., Kerry J.P. and O'Brien N.M. Effects of plant extracts on antioxidant status and oxidant-induced stress in Caco-2 cells. *British Journal of Nutrition*, 2007 ; 97 ; 321-8
6. Ali A, Oon CC, Chua BL, Figiel A, Chong CH, Wojdylo A, Turkiewics IP, Szumny A, Lyczko J. Volatile and polyphenol composition, anti-oxidant, anti-diabetic and anti-aging properties, and drying kinetics as affected by convective and hybrid vacuum microwave drying of *Rosmarinus officinalis* L. *Industrial Crops and Products*. 2020; 151: 112463.
7. Almeida F.I., Denny C., Benso B. et al. Antibacterial activity of essential oils and their isolated constituents against cariogenic bacteria: a systematic review. *Molecules*, 2015 ; 20 ; 7329-58
8. Alnahdi, H.S. (2012) Effect of *Rosmarinus officinalis* Extract on Some Cardiac Enzymes of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Journal of Health Sciences*, 2, 33-37. <http://dx.doi.org/10.5923/j.health.20120204.03> [Citation Time(s):2]
9. Amin A., Hamza A.A. Hepatoprotective effects of Hibiscus, *Rosmarinus* and *Salvia* on azathioprine-induced toxicity in rats. *Life Sciences*, 2005 ; 77 ; 266-78
10. Andrade, Joana M., et al. "*Rosmarinus officinalis* L.: an update review of its phytochemistry and biological activity." *Future science OA* 4.4 (2018): FSO283.
11. Anton R., Lobstein A. *Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments, et huiles essentielles*. Paris et Cachan : Tec&Doc, 2005, 522p.
12. Aouadi D., Luciano G., Vasta V. et al. The antioxidant status and oxidative stability of muscle from lambs receiving oral administration of *A. alba* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Meat Science*, 2014 ; 97 ; 237-43
13. Arranz E., Jaime L., García-Risco M.R. *et al.* Anti-inflammatory activity of rosemary extracts obtained by supercritical carbon dioxide enriched in carnosic acid and carnosol. *International Journal of Food Science and Technology*, 2015 ; 50 ; 674-81.
14. Arranz E., Jaime L., García-Risco M.R. *et al.* Anti-inflammatory activity of rosemary extracts obtained by supercritical carbon dioxide enriched in carnosic acid and carnosol. *International Journal of Food Science and Technology*, 2015 ; 50 ; 674-81-213
15. Baculis, B. C., Diaz, M. R., & Valenzuela, C. F. (2015). Third trimester-equivalent ethanol exposure

- increases anxiety-like behavior and glutamatergic transmission in the basolateral amygdala. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 137, 78-85.
16. Bakirel, T., Bakirel, U., Ustuner Keles, O., Gunes Ulgen, S., Yardibi, H. (2008) *In vivo* assessment of antidiabetic and antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in alloxan-diabetic rabbits. *J Ethnopharmacol.* 116: 64-73.
  17. Barnard EA, Skolnick P, Olsen RW, Mohler H, Sieghart W, Biggio G, Braestrup C, Bateson AN, Langer SZ (1998) International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol Rev* 50:291-313.
  18. Beaunieux, H., Eustache, F., & Pitel, A. L. (2014). The relation of alcohol-induced brain changes to cognitive function. In *Alcohol and the adult brain* (pp. 136-155). Psychology Press.
  19. Benincá, J. P., Dalmarco, J. B., Pizzolatti, M. G., & Fröde, T. S. (2011). Analysis of the anti-inflammatory properties of *Rosmarinus officinalis* L. in mice. *Food chemistry*, 124(2), 468-475.
  20. Bensebia O., Barth D., Bensebia B., Dahmani A., 2009. Supercritical CO2 extraction of rosemary: Effect of extraction parameters and modelling. *The Journal of supercritical fluids*, vol. 49, p.p.161–166.
  21. Beresford, T. P., Arciniegas, D. B., Alfors, J., Clapp, L., Martin, B., Du, Y., & Davatzikos, C. (2006). Hippocampus volume loss due to chronic heavy drinking. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 30(11), 1866-1870.
  22. Bernardes W.A., Lucarini R., Tozatti M.G. et al. Antibacterial activity of the essential oil from *Rosmarinus officinalis* and its major components against oral pathogens. *Zeitschrift für Naturforschung C., Journal of biosciences*, 2010;65c:588-93
  23. Boelens M.H., 1985. The essential oil from *rosmarinus officinalis* L. *Perfumes Flavours*, Vol. 5, N°. 10, p.p.21–37.
  24. Bozin B., Mimica-Dukic N., Samojlik I. et al. Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007 ; 55 ; 7879-85
  25. Brinker F. *Herbal contraindications and drug interactions plus herbal adjuncts with medicines*. 4<sup>e</sup> édition. Sandy, OR : Eclectic Medical Publications, 2010, 598p.
  26. Bruneton J. *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. 4<sup>e</sup> édition revue et augmentée. Paris : Éd. Tec & doc, 2009, 1269p.
  27. Brust J. C.M. Aspects neurologiques de l'addiction. In: *Aspects neurologiques de l'addiction*. Edition: Elsevier Masson, septembre 2007, pp 411-429.
  28. Chevalier, C, Nguyen, A, Nougier, I, Villéger, P. "Comprendre le phénomène de l'addiction," *Actualités Pharmaceutiques*, vol. 54, pp. 1-5, 2015.
  29. Cattaneo L., Cicconi R., Mignogna G. et al. Anti-proliferative effect of *Rosmarinus officinalis* L. extract on human melanoma A375 cells. *PLoS One*, 2015 ; 10(7)
  30. Ch, V. N. (2007). Effect of *Emblica officinalis* against alcohol-induced biochemical changes in plasma and red blood cells of rats. *African Journal of Biochemistry Research*, 1(6), 101-105.
  31. Chافتar N., Girardot M., Quellard N. et al. Activity of six essential oils extracted from Tunisian plants against *Legionella pneumophila*. *Chemistry & Biodiversity*, 2015 ; 12 ; 1565-74
  32. Chastain, G. (2006). Alcohol, neurotransmitter systems, and behavior. *The Journal of general psychology*, 133(4), 329-335.



33. Chebib M, Johnston GA (1999) The 'ABC' of GABA receptors: a brief review. Clin Exp Pharmacol Physiol 26:937-940.
34. Chun K.S., Kundu J., Chae I.G. et al. Carnosol A Phenolic Diterpene With Cancer Chemopreventive Potential. Journal of Cancer Prevention, 2014 ; 19(2) ; 103-110.
35. Craplet M., Mésusage d'alcool et comorbidités psychiatriques. In: Les conduites d'alcoolisation: du repérage précoce au réseau de prise en charge. Edition: John Libbey Eurotext, octobre 2003, pp72-73.
36. Crawley, J., & Goodwin, F. K. (1980). Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 13(2), 167-170.
37. Escuder O. Plantes médicinales mode d'emploi. Paris : Ulmer, 2007, 255p.
38. Fournier P-V. Dictionnaire des plantes médicinales et vénéneuses de France. Paris :Omnibus (un département de place des éditeurs), 2010, 1047p.
39. Tessier A. Les plantes médicinales de Provence suivi de L'origine des noms végétaux.Paris : Ed. Médicis, 2003, 365p.
40. Schneider A. Arbres et arbustes thérapeutiques : les connaître, les protéger, les utiliser. Montréal : Ed. de l'Homme, 2002, 384p.
41. Labescat J. Ces plantes qui écrivent l'Histoire. Sucy-en-Brie : Editions Anfortas, 2013,159p.
42. Gigon F. 50 plantes efficaces pour vous soigner. Paris : Editions de l'Opportun,2014 ?, 380p.
43. Clot Havond N. Plantes médicinales de Provence et d'ailleurs. Saint-Rémy-deProvence : Ed. Edisud,2014, 203p.
44. Larousse des plantes médicinales. Paris : Larousse, 2013, 335p.
45. Crews, F. T., & Nixon, K. (2009). Mechanisms of neurodegeneration and regeneration in alcoholism. Alcohol & Alcoholism, 44(2), 115-127.
46. Cullen, C. L., Burne, T. H., Lavidis, N. A., & Moritz, K. M. (2013). Low dose prenatal ethanol exposure induces anxiety-like behaviour and alters dendritic morphology in the basolateral amygdala of rat offspring. PloS one, 8(1), e54924.
47. Da Rosa J.S., Facchin B.M., Bastos J. et al. Systematic administration of Rosmarinus officinalis attenuates the inflammatory response induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. Planta Medica, 2013 ; 79 ; 1605-14
48. Daher C.F., Kashour B.M. Rosmarinus officinalis leaves water extract a possible anti-inflammatory and anti-ulcerogenic remedy. Planta Medica, 2008 ; 74 ; 203
49. Dauge V, ROSSIGNOL P, ROQUES BP. (1989) Comparison of the behavioural effects induced by administration in rat nucleus accumbens or nucleus caudatus of selective mu and delta opioid peptides or kelatorphan, an inhibitor of enkephalinmetabolism. Psychopharmacology, 96, 343-352.
50. Das Kumar, Subir, and D. M. Vasudevan. "Alcohol induced effects on kidney." Indian Journal of Clinical Biochemistry 23.1 (2008): 4-9
51. De Azerêdo G.A., De Figueiredo R.C.B.Q., De Souza E.L. et al. Changes in Listeriamonocytogenes induced by Origanum vulgare L. and Rosmarinus officinalis L. essential oils alone and combined at subinhibitory amounts. Journal of Food Safety, 2012 ; 32 ; 226-35
52. DE FLINES, J., Scheen, A., & Paquot, N. (2019). Complications métaboliques et carences nutritionnelles liées à une consommation excessive d'alcool. Revue médicale de Liege, 74(5-6), 304-309.
53. de Macedo, Lucas Malvezzi, et al. "Rosemary (Rosmarinus officinalis L., syn Salvia rosmarinus

- Spenn.) and its topical applications: a review." *Plants* 9.5 (2020): 651.
54. Delzenne NM, Verbeeck RK. Interactions of food and drug metabolism. *J Pharm Belg.* 2001;56(2):33-7.
  55. Dematteis, M., & Pennel, L. (2018). Alcool et neurologie. *La Presse Médicale*, 47(7-8), 643-654.
  56. Durazzo, T. C., Tosun, D., Buckley, S., Gazdzinski, S., Mon, A., Fryer, S. L., & Meyerhoff, D. J. (2011). Cortical thickness, surface area, and volume of the brain reward system in alcohol dependence: relationships to relapse and extended abstinence. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 35(6), 1187-1200.
  57. Dursun, I., Jakubowska-Doğru, E., & Uzbay, T. (2006). Effects of prenatal exposure to alcohol on activity, anxiety, motor coordination, and memory in young adult Wistar rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 85(2), 345-355.
  58. El-Demerdash F.M., Abbady E.A., Baghdadi H.H. Oxidative stress modulation by *Rosmarinus officinalis* in creosote-induced hepatotoxicity. *Environmental Toxicology*, 2016 ; 31(1) ; 85-92
  59. Erkan N., Ayranci G., Ayranci E. Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chemistry*, 2008; 110 ; 76-82.
  60. Erkan N., Ayranci G., Ayranci E. Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chemistry*, 2008 ; 110 ; 76-82
  61. Escuder O. *Plantes médicinales mode d'emploi*. Paris : Ulmer, 2007, 255p.
  62. Fadda, F., & Rossetti, Z. L. (1998). Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration. *Progress in neurobiology*, 56(4), 385-431.
  63. Farahani M.S., Bahramsoltani R., Farzaei M.H. et al. Plant-derived natural medicines for the management of depression: an overview of mechanisms of action. *Review in the Neurosciences*, 2015 ; 26(3) ; 305-21
  64. Farrant M, Nusser Z (2005) Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nat Rev Neurosci* 6:215-229.
  65. Faucon M. *Traité d'aromathérapie scientifique et médicale : fondements & aide à laprescription : monographies : huiles essentielles, huiles végétales, hydrolats aromatiques*. Paris : Sang de la Terre et Médical, 2012, 879p.
  66. Felšöciová S., Kačániová M., Horská E. et al. Antifungal activity of essential oils against selected terverticillate penicillia. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 2015 ; 22(1) ; 38-42
  67. Ferlemi A-V., Katsikoudi A., Kontogianni V.G. et al. Rosemary tea consumption results to anxiolytic- and anti-depressant-like behavior of adult male mice and inhibits all cerebral area and liver cholinesterase activity. *Chemico-Biological Interactions*, 2015 ; 237 ; 47-57
  68. Fernández L.F., Palomino O.M., Frutos G. Effectiveness of *Rosmarinus officinalis* essential oil as antihypotensive agent in primary hypotensive patients and its influence on health-related quality of life. *Journal of Ethnopharmacology*, 2014 ; 151 ; 509-16
  69. Fernandez X., Chemat F., Do T.K.T. *Les huiles essentielles : vertus et applications*.
  70. Ferraguti F, Shigemoto R (2006) Metabotropic glutamate receptors. *Cell Tissue Res* 326:483-504.
  71. Furtado R.A., De Araujo F.R., Resende F.A. et al. Protective effect of rosmarinic acid on V79 cells

- evaluated by the micronucleus and comet assays. *Journal of Applied Technology*, 2010 ; 30 ; 254-9
72. Gachkar L., Yadegari D., Bagher Rezaei M. al. Chemical and biological characteristics of Cuminum cyminum and Rosmarinus officinalis essential oils. *Food Chemistry*, 2007 ; 102 ; 898-904
  73. Gagnon A-C., Groleau P., Korsia-Meffre S. et al. *Le guide des plantes qui soignent*. Issy-les-Moulineaux : Vidal, 2010, 465p.
  74. Gass, J. T., & Olive, M. F. (2008). Glutamatergic substrates of drug addiction and alcoholism. *Biochemical pharmacology*, 75(1), 218-265.
  75. Georgantelis, D., Ambrosiadis, I., Katikou, P., Blekas, G., Georgakis, S A. (2007) Effect of rosemary extract, chitosan and  $\alpha$ -tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4 °C. *Meat Science*. 76: 172-181.
  76. Ghasemzadeh MR, Amin B, Mehri S, Mirnajafi-Zadeh SJ, Hosseinzadeh H. Effect of alcoholic extract of aerial parts of Rosmarinus officinalis L. on pain, inflammation and apoptosis induced by chronic constriction injury (CCI) model of neuropathic pain in rats.
  77. Gigon F. 50 plantes efficaces pour vous soigner. Paris : Editions de l'Opportun, 2014, 380p.
  78. Gilly G., 2005. Les plantes aromatiques et huiles essentielles à Grasse: botanique, culture, chimie, production et marché. Ed. L'Harmattan, Paris, 405 p.
  79. Gladine, C., Morand, C., Rock, E., Bauchart, D., Durand, D. (2007) Plant extracts rich in polyphenols (PERP) are efficient antioxidants to prevent lipoperoxidation in plasma lipids from animals fed n-3 PUFA supplemented diets. *Animal Feed Science and Technology*. 136: 281-296.
  80. Gonzales, R. A., & Jaworski, J. N. (1997). Alcohol and glutamate. *Alcohol health and research world*, 21(2), 120.
  81. González M., Venter G.J., López S. et al. Laboratory and field evaluations of chemical and plant-derived potential repellents against Culicoides biting midges in northern Spain. *Medical and Veterinary Entomology*, 2014 ; 28 ; 421-31
  82. González-Vallinas M., Molina S., Vicente G. et al. Expression of MicroRNA-15b and the glycosyltransferase GCNT3 correlates with antitumor efficacy of rosemary diterpenes in colon and pancreatic cancer. *PLoS One*, 2014 ; 9(6)
  83. González-Vallinas M., Molina S., Vicente G. et al. Modulation of estrogen and epidermal growth factor receptors by rosemary extract in breast cancer cells. *Electrophoresis*, 2014 ; 35 ; 1719-27
  84. Goodman, A., 2008. Neurobiology of addiction. An integrative review. *Biochemical Pharmacology*, 75(1), p.266-322.
  85. Goullé J-P, Guerbet M. Éthanol : pharmacocinétique, métabolisme et méthodes analytiques. *Ann Pharm Fr* (2015).
  86. Goullé JP. Alcoolémie : aspects médico-légaux. Journée scientifique « alcools et glycols » de la société française de toxicologie analytique, Paris, 8 décembre 1999. *Ann Toxicol Anal* 1999;54—66.
  87. Green T, Nayeem N (2014) The multifaceted subunit interfaces of ionotropic glutamate receptors. *J Physiol Jun 6*. [Epub ahead of print].
  88. Grobin, A. C., Matthews, D. B., Devaud, L. L., & Morrow, A. L. (1998). The role of GABAA receptors in the acute and chronic effects of ethanol. *Psychopharmacology*, 139(1), 2-19.
  89. H. Malandain, J. Bourdon, Y. Cano, B. Capolaghi, P. David, G. Lachatre, et al., "Étude multicentrique du dosage automatisé de l'éthanolémie par méthode enzymatique," *Toxicorama*, vol. 9, pp. 157-69, 1997.

90. Harach T., Aprikian O., Monnard I. et al. Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) leaf extract limits weight gain and liver steatosis in mice fed a high-fat diet. *Planta Medica*, 2010 ; 76 ; 566-71
91. Harding J. *Bienfaits des herbes & des plantes : un guide pour la culture et l'utilisation des herbes aromatiques et des plantes médicinales*. Bath : Parragon, 2011, 256p.
92. Harper, C. (1998). The neuropathology of alcohol-specific brain damage, or does alcohol damage the brain?. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 57(2), 101-110.
93. Hasaballah A.I. Toxicity of some plant extracts against vector of lymphatic filariasis, *Culex pipiens*. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 2015 ; 45(1) ; 183-92
94. Hosseinzadeh H., Nourbakhsh M. Effect of *Rosmarinus officinalis* L. aerial parts extract on morphine withdrawal syndrome in mice. *Phytotherapy Research*, 2003 ; 17 ; 938-41
95. Ibarra A., He K., Bily A. et al. Rosemary extract enriched in carnosic acid shows anti-obesity and anti-diabetic effects on in vitro and in vivo models. *Planta Medica*, 2010 ; 76 ; 565
96. Imuro, Y., Gallucci, R. M., Luster, M. I., Kono, H., & Thurman, R. G. (1997). Antibodies to tumor necrosis factor alpha attenuate hepatic necrosis and inflammation caused by chronic exposure to ethanol in the rat. *Hepatology*, 26(6), 1530-1537.
97. Il-Suk K., Mi-Ra Y., Ok-Hwan L. et al. Antioxidant Activities of Hot Water Extracts from Various Spices. *International Journal of Molecular Sciences*, 2011 ; 12 ; 4120-31
98. INSERM, Effets de l'alcool sur le système cardiovasculaire. In: *Alcool, Effets sur la santé*. Edition INSERM. Dépôt légal : septembre 2001b, pp 175-192.
99. INSERM, Effets de l'alcool sur le système nerveux. In: *Alcool, Effets sur la santé*. Edition : INSERM, septembre 2001c, pp 101-107.
100. J.-P. Goullé and M. Guerbet, "Éthanol: pharmacocinétique, métabolisme et méthodes analytiques," in *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 2015, pp. 313-322.
101. Jane-Llopis, E. V. A., & Matysina, I. (2006). Mental health and alcohol, drugs and tobacco: a review of the comorbidity between mental disorders and the use of alcohol, tobacco and illicit drugs. *Drug and alcohol review*, 25(6), 515-536.
102. Ji, L., Lili, S., Jing, W., Yanyan, H., Min, W., Juan, X., & Hongmei, S. (2012). Appearance concern and depression in adolescent girls with systemic lupus erythematosus. *Clinical rheumatology*, 31(12), 1671-1675
103. Jiang Y., Wu N., Fu Y-J. et al.. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. *Environmental Toxicology And Pharmacology*, 2011 ;32;63-8
104. Jones AW, Jonsson KA. Between subject and within subject variations in the pharmacokinetics of ethanol. *Br J Clin Pharmacol*. 1994; 37: 443-427.
105. Jones D.J (2011). Alcoolisme et violence : dangerosité et relation médecin-malade. *Rev Med Suisse*, 7 : 1455-7.
106. Jones, AW and Andersson, L. "Variability of the blood/breath alcohol ratio in drinking drivers," *Journal of Forensic Science*, vol. 41, pp. 916-921, 1996.
107. Jung K.J., Min K.J., Bae J.H. et al. Carnosic acid sensitized TRAIL-mediated apoptosis through down-regulation of c-FLIP and Bcl-2 expression at the post translational levels and CHOP-dependent up-regulation of DR5, Bim, and PUMA expression in human carcinoma caki cells. *Oncotarget*, 2015 ; 6(3) ; 1556-68
108. Kang TS, Woo SW, Park HJ, Lee Y, Roh J. Comparison of genetic polymorphisms of CYP2E1, ADH2, and ALDH2 genes involved in alcohol metabolism in Koreans and four other ethnic groups. *J Clin*

R.F.AOUAD (2022). Effet de Rosmarinus officinalis sur l'alcoolisme. Doctorat LMD en BTE. Univ. Saida  
Pharm Ther. 2009; 34(2):225-230.

109. Kapoor S. Carnosic acid and its inhibitory effect on tumor growth in systemic malignancies. Oral Diseases, 2013 ; 19 ; 427

110. Karthikeyan A., Rameshkumar R., Sivakumar N. et al. Antibiofilm activity of *Dendrophthoe falcata* against different bacterial pathogens. *Planta Medica*, 2012; 78 ; 1918-26
111. Khan I. A., Abourashed E. A. 2010. Leung's encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs, and cosmetics. John Wiley & Sons, Inc P. 536- 537.
112. Kiritzé-Topor P., Benard J-Y. Repérage médical. In: *Le Malade Alcoolique*. Edition: Masson Edition, octobre 2001b, pp 50-57.
113. Koga, K., Shibata, H., Yoshino, K. and Nomoto, K. (2006) Effects of 50% Ethanol Extract from Rosemary on AlphaGlucosidase Inhibitory Activity and the Elevation of Plasma Glucose Level in Rats, and Its Active Compound. *Journal of Food Science*, 2, 179-218. [Citation Time(s):1]
114. Koob, G.F. & Le Moal, M., 2008b. Review. Neurobiological mechanisms for opponent motivational processes in addiction. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 363(1507), p.3113-3123.
115. Kubota, M., Nakazaki, S., Hirai, S., Saeki, N., Yamaura, A., & Kusaka, T. (2001). Alcohol consumption and frontal lobe shrinkage: study of 1432 non-alcoholic subjects. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 71(1), 104-106.
116. Kushner, M. G., Abrams, K., & Borchardt, C. (2000). The relationship between anxiety disorders and alcohol use disorders: a review of major perspectives and findings. *Clinical psychology review*, 20(2), 149-171.
117. Lands W.A review of alcohol clearance in humans. *Alcohol*. 1998, 15: 147-160.
118. Larrey D . Pathologies hépatiques mitochondriales. *Gastroentérologie Clinique et Biologique*. 2001; 25: 117-122.
119. Laszczyk M.N. Pentacyclic triterpenes of the lupane, oleanane and ursane group as tools in cancer therapy. *Planta Medica*, 2009 ; 75 ; 1549-60
120. Le Marquand, D., Pihl, R.O. & Benkelfat, C., 1994a. Serotonin and alcohol intake, abuse, and dependence: clinical evidence. *Biological Psychiatry*, 36(5), p.326-337.
121. Le Marquand, D., Pihl, R.O. & Benkelfat, C., 1994b. Serotonin and alcohol intake, abuse, and dependence: findings of animal studies. *Biological Psychiatry*, 36(6), p.395-421.
122. Lee J.J., Jin Y.R., Lee J.H. et al. Antiplatelet activity of carnosic acid, a phenolic diterpene from *Rosmarinus officinalis*. *Planta Medica*, 2007 ; 73 ; 121-7
123. Lee J.W., Asai M., Jeon S.K. et al. Rosmarinic acid exerts an antiosteoporotic effect in the RANKL-induced mouse model of bone loss by promotion of osteoblastic differentiation and inhibition of osteoclastic differentiation. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2015 ; 59 ; 386-400
124. Lejoyeux M., Adès J. Dépression et Psychiatrie. In: Bailly D, Venisse JL. *Addictions et Psychiatrie*. Edition Masson, octobre 1999, pp 53-56.
125. León-Ruiz V., González-Porto A., Al-Habsi N. et al. Antioxidant, antibacterial and ACE-inhibitory activity of four monofloral honeys in relation to their chemical composition. *Food & Function*, 2013 ; 4 ; 1617-24
126. Levy-Soussan P. Conduites alcooliques. In: *Psychiatrie*. Edition: Collection Med-Line, octobre 2000, pp 231-233.

127. Lhermitte, M., Klein, A., & Danel, T. (2002). Les marqueurs biologiques de la consommation d'alcool. In *Annales de Toxicologie Analytique* (Vol. 14, No. 1, pp. 58-63). EDP Sciences.
128. Liang J, Zhang N, Cagetti E, Houser CR, Olsen RW, Spigelman I (2006) Chronic intermittent ethanol-induced switch of ethanol actions from extrasynaptic to synaptic hippocampal GABAA receptors. *J Neurosci* 26:1749-1758.
129. Lin C.Y., Wu C.R., Chang S.W. et al. Induction of the pi class of glutathione S-transferase by carnosic acid in rat Clone 9 cells via the p38-Nrf2 pathway. *Food & Function*, 2015 ; 6 ; 1936-43
130. Loetscher Y., Kreuzer M. and Messikommer R.E. Oxidative stability of the meat of broilers supplemented with rosemary leaves, rosehip fruits, chokeberry pomace, and entire nettle, and effects on performance and meat quality. *Poultry Science Association Inc.*, 2013 ; 92 ; 2938-48
131. M. Deveaux, "L'alcool," Mura P (coordonateur). *Alcool, médicaments, stupéfiants et conduite automobile*. Paris: Elsevier, pp. 3-19, 1999.
132. M. Ledig and P. Mandel, "Alcool et neurochimie," 1988.
133. M. Reynaud, "Traité d'addictologie: quelques éléments pour une approche commune des addictions," 2006. M.E.M. (2007) Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as
134. Machado, D. G., Bettio, L. E., Cunha, M. P., Capra, J. C., Dalmarco, J. B., Pizzolatti, M. G., & Rodrigues, A. L. S. (2009). Antidepressant-like effect of the extract of *Rosmarinus officinalis* in mice: involvement of the monoaminergic system. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 33(4), 642-650 .
135. Mahady G.B., Pendland S.L., Stoia A. et al. In vitro susceptibility of *Helicobacter pylori* to botanical extracts used traditionally for the treatment of gastrointestinal disorders. *Phytotherapy Research*, 2005 ; 19 ; 988-91
136. Maier, S. E., Miller, J. A., Blackwell, J. M., & West, J. R. (1999). Fetal alcohol exposure and temporal vulnerability: regional differences in cell loss as a function of the timing of binge-like alcohol exposure during brain development. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 23(4), 726-734.
137. Maillot, F., Farad, S., & Lamisse, F. (2001). Alcool et nutrition. *Pathologie Biologie*, 49(9), 683-688.
126. Manzoor A.S., Sowriappan J.D.B., Shabir A.M. Plant extracts as natural antioxidants in meat and meat products. *Meat Science*, 2014 ; 98 ; 21-33
127. Marrelli M., Cristaldi B., Menichini F. et al. Inhibitory effects of wild dietary plants on lipid peroxidation and on the proliferation of human cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, 2015 ; 86 ; 16-24
128. Marrelli M., Cristaldi B., Menichini F. et al. Inhibitory effects of wild dietary plants on lipid peroxidation and on the proliferation of human cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, 2015 ; 86 ; 16-24
129. Marsik P., Landa P., Pribylova M. et al. Carvacrol as the inhibitor of cyclooxygenase-1 and -2, the key enzymes of prostaglandin biosynthesis in vitro assays. *Planta Medica*, 2006 ; 72 ; 88
130. Marteau Ph, Pol S, Lavergne-Slove A. Tumeurs du foie. In: Jian R et Coll. *Hépatogastro-entérologie*. Edition: Ellipses, Janvier 2001b, pp 386-388.

131. Martínez A.L., González-Trujano M.E., Pellicer F. et al. Antinociceptive effect and GC MS analysis of Rosmarinus officinalis essential oil from its aerial parts. *Planta Medica*, 2009 ; 75 ; 508-11
132. Marder, Mariel, and Alejandro C. Paladini. "GABA (A)-receptor ligands of flavonoid structure." *Current topics in medicinal chemistry* 2.8 (2002): 853-867
133. Mata, A.T., Proenc, C., Ferreira, A.R., Serralheiro, M.L.M., Nogueira, J.M.F., Araujo,
134. McCue, P.P. and Shetty, K. (2004) Inhibitory Effects of Rosmarinic Acid Extracts on Porcine Pancreatic Amylase in Vitro. *Asia Pacific Journal*, 13, 101-106. [Citation Time(s):1]
135. Meng P., Yoshida H., Tanji K. et al. Carnosic acid attenuates apoptosis induced by amyloid- $\beta$  1-42 or 1-43 in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Neuroscience Research*, 2015 ; 94 ; 1-9
136. Minaiyan M., Ghannadi A.R., Afsharipour M. et al. Effects of extract and essential oil of Rosmarinus officinalis L. on TNBS-induced colitis in rats. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 2011 ; 6(1) ; 13-21
- 136.Ming Z, Criswell HE, Yu G, Breese GR (2006) Competing presynaptic and postsynaptic effects of ethanol on cerebellar purkinje neurons. *Alcohol Clin Exp Res* 30:1400-1407.
137. Misslin, R., Belzung, C., & Vogel, E. (1989). Behavioural validation of a light/dark choice procedure for testing anti-anxiety agents. *Behavioural processes*, 18(1-3), 119-132.
138. Moretti M.D., Sanna-Passino G., Demontis S. et al. Essential oil formulations useful as a new tool for insect pest control. *AAPS PharmSciTech*, 2002 ; 3(2):E13
139. Morris, R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of neuroscience methods*, 11(1), 47-60.
140. Muhaisem H.M., Ab-Mous M.M., Ddeeb F.A. et al. Antimicrobial agents from selected medicinal plants in Libya. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 2015;1-8
141. Mukamal, K. J., Longstreth Jr, W. T., Mittleman, M. A., Crum, R. M., & Siscovick, D. S. (2001). Alcohol consumption and subclinical findings on magnetic resonance imaging of the brain in older adults: the cardiovascular health study. *Stroke*, 32(9), 1939-1946.
142. Mukherjee, S., Das, S. K., Vaidyanathan, K., & Vasudevan, D. M. (2008). Consequences of alcohol consumption on neurotransmitters-an overview. *Current neurovascular research*, 5(4), 266-272.
143. Müller-Oehring, E. M., Jung, Y. C., Sullivan, E. V., Hawkes, W. C., Pfefferbaum, A., & Schulte, T. (2013). Midbrain-driven emotion and reward processing in alcoholism. *Neuropsychopharmacology*, 38(10), 1844-1853.
144. Muñoz-Villegas, P., Rodríguez, V. M., Giordano, M., & Juárez, J. (2017). Risk-taking, locomotor activity and dopamine levels in the nucleus accumbens and medial prefrontal cortex in male rats treated prenatally with alcohol. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 153, 88-96.
145. Mura, P., Kintz, P., Ludes, B., Gaulier, J. M., Marquet, P., Martin-Dupont, S., ... & Pourrat, O. (2003). Comparison of the prevalence of alcohol, cannabis and other drugs between 900 injured drivers and 900 control subjects: results of a French collaborative study. *Forensic science international*, 133(1-2), 79-85.
146. Murata K., Noguchi K., Kondo M. et al. Promotion of hair growth by Rosmarinus officinalis leaf extract. *Phytotherapy Research*, 2013 ; 27 ; 212-7
147. Mushtaq N., Schmatz R., Pereira L.B. et al. Rosmarinic acid prevents lipid peroxidation and increase in acetylcholinesterase activity in brain of streptozotocin-induced diabetic rats. *Cell Biochemistry and Function*, 2014 ; 32 ; 287-93



148. Nabekura T., Yamaki T., Hiroi T. et al. Inhibition of anticancer drug efflux transporter P-glycoprotein by rosemary phytochemicals. *Pharmacological Research*, 2010 ; 61 ; 259-63
149. Nalpas B. L'alcoolisation et ses dommages induits. Réduction des risques. In: Les conduites d'alcoolisation: du repérage au réseau de prise en charge. Edition: John Libbey Eurotext, octobre 2003a, pp 49-51.
150. Nazem F., Farhangi N., Neshat-Gharamaleki M. Beneficial effects of endurance exercise with *Rosmarinus officinalis* on blood antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Canadian Journal of Diabetes*, 2015 ; 39(3) ; 229-34
151. Newall, C.A; Anderson, L.A. and phillipson, J.D (1996)- *Herbal Medicin-A Guide for Health-care Professionals*, The Pharmaceutical Press, London.
152. Ngo S.N., Williams D.B., Head R.J. Rosemary and cancer prevention: preclinical perspectives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2011 ; 51(10) ; 946-54
153. Nixon, K., & Crews, F. T. (2002). Binge ethanol exposure decreases neurogenesis in adult rat hippocampus. *Journal of neurochemistry*, 83(5), 1087-1093.
154. Nolkemper S., Reichling J., Stintzing F.C. et al. Antiviral effect of aqueous extracts from species of the Lamiaceae family against Herpes simplex Virus type 1 and type 2 in vitro. *Planta Medica*, 2006 ; 72 ; 1378-82
155. Obata K (2013) Synaptic inhibition and gamma-aminobutyric acid in the mammalian central nervous system. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 89:139-156.
156. Obernier, J. A., White, A. M., Swartzwelder, H. S., & Crews, F. T. (2002). Cognitive deficits and CNS damage after a 4-day binge ethanol exposure in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 72(3), 521-532.
157. Ojaghian M.R., Chen Y., Chen S. et al. Antifungal and enzymatic evaluation of plant crude extracts derived from cinnamon and rosemary against *Sclerotinia carrot rot*. *Annals of Applied Biology*, 2014 ; 164 ; 415-29
158. Olive MF (2009) Metabotropic glutamate receptor ligands as potential therapeutics for addiction. *Curr Drug Abuse Rev* 2:83-98.
159. Oluwatuyi M., Kaatz G.W., Gibbons S. Antibacterial and resistance modifying activity of *Rosmarinus officinalis*. *Phytochemistry*, 2004 ; 65 ; 3249-54
160. Orhan, I., Aslan, S., Kartal, M., Sener, B., Husnu Can Baser, K. (2008) Inhibitory effect of Turkish *Rosmarinus officinalis*L. on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase enzymes. *Food Chem.*108: 663-668.
161. Ortuño J., Serrano R., Jordán M.J. et al. Shelf life of meat from lambs given essential oil-free rosemary extract containing carnosic acid plus carnosol at 200 or 400 mg kg<sup>-1</sup>. *Meat Science*, 2014 ; 96 ; 1452-9
162. Ouraïni D., Agoumi A., Alaoui M.I. et al. Approche thérapeutique des dermatophyties par les huiles essentielles de plantes aromatiques marocaines. *Phytothérapie*, 2005 ; 1 ; 3-12

163. Ouraini D., Agoumi A., Alaoui M.I. et al. Etude de l'activité des HE de plantes aromatiques à propriétés antifongiques sur les différentes étapes du développement des dermatophytes. *Phytothérapie*, 2005 ; 4 ; 147-57
164. Paris : Vuibert, 2012, 159p.
165. Park M.Y., Sung M.K. Carnosic acid attenuates obesity-induced glucose intolerance and hepatic fat accumulation by modulating genes of lipid metabolism in C57BL/6Job/ob mice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2015; 95 ;828 -35
166. Pelikan J., 1986. Matière première du règne végétal. Ed. Masson Et Cie, Tome 2, paris, 2343 p.
167. Pellow, S., Chopin, P., File, S. E., & Briley, M. (1985). Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of neuroscience methods*, 14(3), 149-167.
168. Petiwala S.M., Johnson J.J. Diterpenes from rosemary (*Rosmarinus officinalis*): defining their potential for anti-cancer activity. *Cancer Letters*, 2015 ; 367 ; 93-102
169. Petretto G.L., Cossu M. and Alamanni M.C. Phenolic content, antioxidant and physico-chemical properties of Sardinian monofloral honeys. *International Journal of Food Science and Technology*, 2015 ; 50 ; 482-91
170. Planzen O, Dr .Th.Sr .L.Neveon Eisenbeck DÜSSELDORF (1829). *Rosmarinus officinalis L. PLANTAE MEDICINALES*. Ed DÜSSELDORF.
171. Pohlit A.M., Lopes N.P., Gama R.A. et al. Patent literature on mosquito repellent inventions which contain plant essential oils - a review. *Planta Medica*, 2011;77; 598-617
172. Pohlit A.M., Rezende A.R., Baldin Edson L.L. et al. Plant extracts, isolated phytochemicals, and plant-derived agents which are lethal to arthropod vectors of human tropical diseases - a review. *Planta Medica*, 2011 ; 77 ; 618-30
173. Pomierny-Chamiolo L, Rup K, Pomierny B, Niedzielska E, Kalivas PW, Filip M (2014) Metabotropic glutamatergic receptors and their ligands in drug addiction. *Pharmacol Ther* 142:281-305.
174. Porsolt, R. D., Le Pichon, M., & Jalfre, M. L. (1977). Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, 266(5604), 730-732.
- Portuguese food spices. *Food Chem*. 103: 778-786.
175. Posadas S.J., Caz V., Largo C. et al. Protective effect of supercritical fluid rosemary extract, *Rosmarinus officinalis*, on antioxidants of major organs of aged rats. *Experimental Gerontology*, 2009 ; 44 ; 383-9
176. Preedy VR, Peters TJ, Why H. Metabolic consequences of alcohol dependency. *Adverse Drug React Toxicol Rev*. 1997; 16:235-256.
177. Quezel.p., et Santa s, 1963 -Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales Tome II. C.N.R.Sc. Paris.781-783-793p.
178. R. BIBLIOGRAPHIQUES, "C-Neurobiologie de l'alcoolisme 1-Les systèmes impliqués dans l'alcoolodépendance a-Le système GABAergique," *Ethanol et épigénétique: Conséquences neuroplastiques et fonctionnelles*, p. 29, 2014.

179. Ramachandran C., Quirin K.W., Escalon E. et al. Improved neuroprotective effects by combining Bacopa monnieri and Rosmarinus officinalis supercritical CO<sub>2</sub> extracts. Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine, 2014 ; 19(2) ; 119-27
180. Rašković A., Milanović I., Pavlović N. et al. Antioxidant activity of rosemary (Rosmarinus officinalis L.) essential oil and its hepatoprotective potential. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2014 ; 14 ; 225-33
181. Rasooli I., Fakoor M.H., Yadegarinia D. et al. Antimycotoxigenic characteristics of Rosmarinus officinalis and Trachyspermum copticum L. essential oils. International Journal of Food Microbiology, 2008 ; 122 ; 135-9
182. Rasooli I., Shayegh S., Taghizadeh M. et al. Phytotherapeutic prevention of dental biofilm formation. Phytotherapy Research, 2008 ; 22 ; 1162-67
183. Rau O., Wurglics M., Paulke A. et al. Carnosic acid and carnosol, phenolic diterpene compounds of the labiate herbs rosemary and sage, are activators of the human Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma. Planta Medica, 2006 ; 72; 881-7
184. Reclu M. Manuel de l'herboriste : comprenant la culture, la récolte, la conservation, les propriétés médicinales des plantes du commerce, et un dictionnaire des maladies et des remèdes. Nîmes : C. Lacour, 2004, 160p.
185. Riedel, G., Platt, B., & Micheau, J. (2003). Glutamate receptor function in learning and memory. Behavioural brain research, 140(1-2), 1-47.
186. Rocha J., Eduardo-Figueira M., Barateiro A. et al. Anti-inflammatory effect of rosmarinic acid and an extract of Rosmarinus officinalis in rat models of local and systemic inflammation. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 2015;116(5) ; 398-413
187. Rodriguez J.O., Ucelli S.P., Lima G.D. et al. Evaluation of *in vitro* anti-inflammatory effects of crude ginger and rosemary extracts obtained through supercritical CO<sub>2</sub> extraction on macrophage and tumor cell line the influence of vehicle type. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2015 ; 15 ; 390-405 .
188. Rodriguez J.O., Ucelli S.P., Lima G.D. et al. Evaluation of *in vitro* antiinflammatory effects of crude ginger and rosemary extracts obtained through supercritical CO<sub>2</sub> extraction on macrophage and tumor cell line the influence of vehicle type. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2015 ; 15 ; 390-405
189. Romano C.S., Abadi K., Repetto V. et al. Synergistic antioxidant and antibacterial activity of rosemary plus butylated derivatives. Food Chemistry, 2009 ; 115 ; 456-61
190. Rombi M., Robert D., Guédon D., Rosier-Sala C., Renzacci E. 120 plantes médicinales : composition, mode d'action et intérêt thérapeutique : ... de l'ail à la vigne rouge. Monaco : Éd. Alpen, 2007, 527p.
191. Romo Vaquero, M., Yáñez-Gascón, M. J., Garcia Villalba, R., Larrosa, M., Fromentin, E., Ibarra, A., ... & García-Conesa, M. T. (2012). Inhibition of gastric lipase as a mechanism for body weight and plasma lipids reduction in Zucker rats fed a rosemary extract rich in carnosic acid. PloS one, 7(6), e39773.
192. Romo-Vaquero M., Larrosa M., Yáñez-Gasón M.J. et al. A rosemary extract enriched in carnosic acid improves circulating adipocytokines and modulates key metabolic sensors in lean Zucker rats: critical

- and contrasting differences in the obese genotype. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2014 ; 58 ; 942-53
193. Romo-Vaquero M., Selma M.V., Larrosa M. et al. A Rosemary extract rich in carnosic acid selectively modulates caecum microbiota and inhibits beta-glucosidase activity, altering fiber and short chain fatty acids fecal excretion in lean and obese female rats. *PLoS ONE*, 2014 ; 9(4) ; 1-11
194. Rueff B. Pour aider au diagnostic. In: *Les malades de l'alcool*. Edition: John Libbey Eurotext, mai 1996c, pp 137-145
195. Rung A., Halbert S.E., Ziesk D.C. et al. A leafhopper pest of plants in the mint
196. Ryu S., Park H., Seol G.H. et al. 1,8-Cineole ameliorates oxygen-glucose deprivation-reoxygenation-induced ischaemic injury by reducing oxidative stress in rat cortical neuron-glia. *Royal Pharmaceutical, Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2014 ; 66 ; 1818-26
197. Sancheti G., Goyal P.K. Effect of *Rosmarinus officinalis* in modulating 7,12-dimethylbenz(a)anthracene induced skin tumorigenesis in mice. *Phytotherapy Research*, 2006 ; 20 ; 981-6
198. Sanchez Chopa C., Descamps L.R. Composition and biological activity of essential oils against *Metopolophium dirhodum* (Hemiptera: Aphididae) cereal crop pest. *Pest Management Science*, 2012 ; 68 ; 1492-1500
199. Sasaki K., El Omri A., Kondo S. et al. *Rosmarinus officinalis* polyphenols produce anti-depressant like effect through monoaminergic and cholinergic functions modulation. *Behavioural Brain Research*, 2013 ; 238 ; 86-94.
200. Sasaki K., El Omri A., Kondo S. et al. *Rosmarinus officinalis* polyphenols produce anti-depressant like effect through monoaminergic and cholinergic functions modulation. *Behavioural Brain Research*, 2013 ; 238 ; 86-94
201. Sasaki, K., El Omri, A., Kondo, S., Han, J., &Isoda, H. (2013). *Rosmarinus officinalis* polyphenols produce anti-depressant like effect through monoaminergic and cholinergic functions modulation. *Behavioural Brain Research*, 238, 86-94.
202. Schelz Z., Molnar J, Hohmann J. (2006) Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. *Fitoterapia*. 77: 279-285.
203. Scherf G. *La culture et les vertus des plantes médicinales*. Aartselaar (Belgique) :Chantecler, 2012, 95p.
- 204.Schulte, M. T., & Hser, Y. I. (2013). Substance use and associated health conditions throughout the lifespan. *Public health reviews*, 35(2), 3.
205. Schulte, T., Jung, Y. C., Sullivan, E. V., Pfefferbaum, A., Serventi, M., & Müller-Oehring, E. M. (2017). The neural correlates of priming emotion and reward systems for conflict processing in alcoholics. *Brain imaging and behavior*, 11(6), 1751-1768.
206. Shin H-B., Choi M-S., Ryu B. et al. Antiviral activity of carnosic acid against respiratory syncytial virus. *Virology Journal*, 2013 ; 10:303
207. Shin S. Anti-Aspergillus activities of plant essential oils and their combination effects with ketoconazole or amphotericin B. *Archives of Pharmacal Research*, 2003;26(5) ;389-93
208. Silberman, Y., & Winder, D. G. (2015). Ethanol and corticotropin releasing factor receptor modulation of central amygdala neurocircuitry: an update and future directions. *Alcohol*, 49(3), 179-184.

209. Silva A.M., Machado I.D., Santin J.R. et al. Aqueous extract of Rosmarinus officinalis L. inhibits neutrophil influx and cytokine secretion. *Phytotherapy Research*, 2015 ; 29 ; 125-33
210. Soares I.H., Loreto É.S., Rossato L. et al. In vitro activity of essential oils extracted from condiments against fluconazole-resistant and -sensitive *Candida glabrata*. *Journal de Mycologie Médicale*, 2015 ; 25 ; 213-7
211. Stefanon B., Pomari E., Colitti M. Effects of Rosmarinus officinalis extract on human primary omental preadipocytes and adipocytes. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, NJ)*, 2015 ; 240 ; 884-95
212. Sullivan, E. V., &Pfefferbaum, A. (2005). Neurocircuitry in alcoholism: a substrate of disruption and repair. *Psychopharmacology*, 180(4), 583-594.
213. Sullivan, E. V., Harris, R. A., &Pfefferbaum, A. (2010). Alcohol's effects on brain and behavior. *Alcohol Research & Health*.
214. Sullivan, E. V., Rohlfing, T., & Pfefferbaum, A. (2010). Pontocerebellar volume deficits and ataxia in alcoholic men and women: no evidence for "telescoping". *Psychopharmacology*, 208(2), 279-290.
215. Tai J., Cheung S., Wu M. et al. Antiproliferation effect of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) on human ovarian cancer cells in vitro. *Phytomedicine*, 2012 ; 19 ; 436-43
216. Tak J-H., Jovel E., Isman M.B. Comparative and synergistic activity of Rosmarinus officinalis L. essential oil constituents against the larvae and an ovarian cell line of the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Management Science*, 2016 ; 72 (3) ; 474-80
217. Takarada K., Kimizuka R., Takahashi N. et al. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. *Oral Microbiology and Immunology*, 2004 ; 19 ; 61-4
218. Tamaki Y., Tabuchi T., Takahashi T. et al. Activated glutathione metabolism participates in protective effects of carnosic acid against oxidative stress in neuronal HT22 cells. *Planta Medica*, 2010 ; 76 ; 683-8
219. Theoduloz C., Pertino M.W., Rodríguez J.A. et al. Gastroprotective effect and cytotoxicity of carnosic acid derivatives. *Planta Medica*, 2011 ; 77 ; 882-7
220. Thurman RG, Handler JA. New perspectives in catalase-dependent ethanol metabolism. *Drug MetabRev.* 1989; 20(2-4):679-88.
221. USDA, 2011. National Nutrient Database for Standard Reference, 2011.
222. Vabret, F., Lannuzel, C., Cabe, N., Ritz, L., Boudehent, C., Eustache, F., ... & Beaunieux, H. (2016). Troubles cognitifs liés à l'alcool: nature, impact et dépistage. *La Presse Médicale*, 45(12), 1124-1132.
223. Valenzuela, C. F. (1997). Alcohol and neurotransmitter interactions. *Alcohol health and research world*, 21(2), 144.
224. Van Vuuren S., Viljoen A. Plant-based antimicrobial studies-methods and approaches to study the interaction between natural products. *Planta Medica*, 2011 ; 77;1168-82
225. Van Vuuren S.F., Suliman S., Viljoen A.M.. The antimicrobial activity of four commercial essential oils in combination with conventional antimicrobials. *Letters in Applied Microbiology*, 2009 ; 48(4) ; 440-6

226. Vanithadevi, B. and Anuradha, C.V. (2008) Effect of Rosmarinic Acid on Insulin Sensitivity, Glyoxalase System and Oxidative Events in Liver of Fructose-Fed Mice. *International Journal of Diabetes and Metabolism*, 16, 35-44. [Citation Time(s):1]
227. Vogel P. *Chimie organique. Méthodes et modèles*. De Boeck, Paris.2010 .Pp65-67.
228. Wang W., Wu N., Zu Y.G. et al. Antioxidative activity of Rosmarinus officinalis L.essential oil compared to its main components. *Food Chemistry*, 2008 ; 108 ; 1019-22
229. Ward, C. P., McCoy, J. G., McKenna, J. T., Connolly, N. P., McCarley, R. W., & Strecker, R. E. (2009). Spatial learning and memory deficits following exposure to 24 h of sleep fragmentation or intermittent hypoxia in a rat model of obstructive sleep apnea. *Brain research*, 1294, 128-137.
230. Weckesser, S., Engel, K., Simon-Haarhaus, B., Wittmer, A., Pelz, K., Schempp C.M. (2007). Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance. *Phytomedicine*. (in press).
231. Weerakkody N.S., Caffin N., Lambert L.K. et al. Synergistic antimicrobial activity of galangal (*Alpinia galanga*), rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and lemon iron bark (*Eucalyptus staigerana*) extracts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2011;91 ; 461-8
232. West, R. K., Wooden, J. I., Barton, E. A., &Leasure, J. L. (2019). Recurrent binge ethanol is associated with significant loss of dentate gyrus granule neurons in female rats despite concomitant increase in neurogenesis. *Neuropharmacology*, 148, 272-283.
233. Wu C.R., Tsai C.W., Chang S.W. et al. Carnosic acid protects against 6- hydroxydopamine-induced neurotoxicity in in vivo and in vitro model of Parkinson's disease: involvement of antioxidative enzymes induction. *Chemico-Biological Interactions*, 2015 ; 225 ; 40-6
234. Yanishlieva N.V., Marinova E. and Pokorný J. Natural antioxidants from herbs and spices. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2006 ; 108 ; 776-93
235. Yesil Celiktas O., Hames Kocabas E.E., Bedir E. et al. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of Rosmarinus officinalis, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry*, 2007 ; 100 ; 553-9
236. Yin S, Niswender CM (2014) Progress toward advanced understanding of metabotropic glutamate receptors: structure, signaling and therapeutic indications. *Cell Signal* May 2. pii: S0898-6568(14)00157-0. doi: 10.1016/j.cellsig.2014.04.022. [Epub ahead of print].
237. Zahr, N. M., &Pfefferbaum, A. (2017). Alcohol's effects on the brain: neuroimaging results in humans and animal models. *Alcohol research: current reviews*.
238. Zermane A. 2010.Etude de l'extraction supercritique Application aux systèmes agroalimentaires. Thèse de doctorat, université de Mentouri., Constantine, 120 p.
239. Zhang Y., Chen X., Yang L. et al. Effects of rosmarinic acid on liver and kidney antioxidant enzymes, lipid peroxidation and tissue ultrastructure in aging mice. *Food function*, 2015 ; 6 ; 927-31
240. Zhang Z., Bian L., Sun X. et al. Electrophysiological and behavioural responses of the tea geometrid *Ectropis obliqua* (Lepidoptera: Geometridae) to volatiles from a non-host plant, rosemary, *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae). *Pest Management Science*, 2015 ; 71 ; 96-104
241. Zendehtdel, M., Beizae, S., Taati, M., & Bashiri, A. (2011). Antinociceptive mechanisms of *Rosmarinus officinalis* extract in mice using writhing test.
242. Zihlif M., Afifi F., Muhtaseb R. et al. Screening the antiangiogenic activity of medicinal plants grown and sold in Jordan. *Planta Medica*, 2012 ; 78 ; 297-301

# Chemical Composition and Protective Effect of *Rosmarinus officinalis* on Alcohol-Induced Serum Hepatic Changes and Liver Injury in Male Rats

Rima Farah AOUAD<sup>1</sup>, Mokhtaria Yasmina BOUFADI<sup>2,3,\*</sup>, Djallal Eddine Houari ADLI<sup>1</sup>, Faiza Moulai-Hacene<sup>2</sup>, Khaled KAHLOULA<sup>1</sup>, Miloud SLIMANI<sup>1</sup>

Rima Farah AOUAD<sup>1</sup>, Mokhtaria Yasmina BOUFADI<sup>2,3,\*</sup>, Djallal Eddine Houari ADLI<sup>1</sup>, Faiza Moulai-Hacene<sup>2</sup>, Khaled KAHLOULA<sup>1</sup>, Miloud SLIMANI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Biototoxicology, Pharmacognosy and Biological Valorisation of plants (LBPVBP), Department of Biology, Faculty of Natural and Life Sciences, Moulay Tahar University, Saida, ALGERIA.

<sup>2</sup>Laboratory of Bioeconomics, Food Safety and Health, Faculty of Natural Sciences and Life, Université de Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem, ALGERIA.

<sup>3</sup>Laboratory of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Université Libre de Bruxelles, Brussels, BELGIUM.

## Correspondence

Mokhtaria Yasmina BOUFADI

Faculty of Natural Sciences and Life  
Faculty of Natural Sciences and Life  
Abdelhamid Ibn Badis University,  
Mostaganem, ALGERIA.

E-mail: yasmina.boufadi@univ-mosta.dz

## History

- Submission Date: 09-04-2021;
- Review completed: 21-06-2021;
- Accepted Date: 28-06-2021.

DOI : 10.5530/pj.2021.13.154

Article Available online

<http://www.phcogj.com/v13/i5>

## Copyright

© 2021 Phcogj.Com. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.

## ABSTRACT

**Background:** Is a pleasant-smelling perennial shrub that grows in many parts of the world, *Rosmarinus officinalis* a well known valuable herbal medicine which is widely used in pharmaceuticals and traditional medicine as a digestive, tonic, astringent, diuretic, diaphoretic and useful for urinary ailments. **Objective:** The objective of this study has, on the one hand, focused on the changes in hepatotoxicity induced by the chronic administration of ethyl alcohol according to a biochemical and histological experimental approach and, on the other hand, on the chemical composition which was determined. As well as, the hepato-protective effect of the ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* (EER), whether to restore or not the harmful alterations due to ethylism was evaluated. **Method:** The study included twenty-four male Wistar albino rats which were divided into four groups. The rats received ethanolic extraction of *Rosmarinus officinalis* orally at a dose of 200 mg/kg. Hepatotoxicity was induced orally with a daily dose of 05 mL of 20% alcoholic solution for 90 days. **Results:** The chemical characterization of the ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* (EER) by HPLC/UV shows the presence of polyphenolic compounds and numerous flavonoids, the main constituent of which is rosmarinic acid. It was noticed that the Ethanol caused an increase in liver function parameters (aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, alkaline phosphatase, triglyceride and cholesterol, total bilirubin) compared to the control and oxidative stress through a significant decrease in antioxidant liver enzymes Superoxidase dismutase (9.39 U/mg), glutathione peroxidase (12.89 U/mg) and catalase (25.39 U/mg) and increased malondialdehyde levels. The histological study showed significant lesions in the liver. **Conclusion:** The disturbances in liver function, antioxidant status and structural damage to the liver caused by ethanol have been restored by the administration of the ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* which strongly justifies its therapeutic effect. **Key words:** *Rosmarinus officinalis*, HPLC/UV, Ethylism, Hepatotoxicity, Liver stress oxidatives.

## INTRODUCTION

It is a well-known fact that alcohol is a drink consumed worldwide.<sup>1</sup> Every year, alcohol abuse is responsible for almost 2.5 million deaths<sup>2</sup> as it is metabolized by the liver of the human body. Pathological evidence has shown that excessive alcohol consumption is one of the main causes of liver disease and as many as other diseases.<sup>3,4</sup> Alcohol-induced chronic liver injury passes through several stages, generally develops from alcoholic steatosis to alcoholic hepatitis, and finally deteriorates into alcoholic cirrhosis.<sup>5</sup>

Cirrhosis of the liver is a pathological condition that occurs when chronic liver damage causes scarring of the tissue, preventing blood from flowing freely through the scar tissue.<sup>6</sup>

However, recent work and various other experimental studies have provided strong evidence that oxidative stress plays a key role in ethanol negatively affecting various organs, including the liver.<sup>7,8,9</sup>

The mechanisms leading to cirrhosis are alcohol abuse and chronic liver damage as a result of hepatitis B or C infection. We also know that tissue damage resulting from oxidative stress is an important factor in liver failure.<sup>10</sup>

In addition, exposure to ethanol leads to deregulation of fatty acid metabolism and lipid accumulation and causes oxidative stress.<sup>11</sup> Exposure to ethanol is known to lead to the development of oxidative stress by increasing the production of reactive oxygen species (ROS) or reducing antioxidant defense.<sup>12</sup>

The development of oxidative stress has been proposed as the most important mechanism underlying the lethality and developmental delay associated with ethanol exposure.<sup>13</sup> At the same time, antioxidant gene expression often increases due to increased production of ROS.<sup>14,11,15</sup>

The oxidative and non-oxidative metabolism of ethanol leads to a considerable increase in the formation of reactive oxygen species (ROS), the NADH/NAD<sup>+</sup> ratio and an accumulation of acetaldehyde inducing the genesis of oxidative stress<sup>16</sup>, which is the cause of several oxidative damages. As well as the formation of fatty acid ethyl esters which are potentially toxic.<sup>17</sup>

Although the precise cellular and biochemical causes of ethanol-induced susceptibility to different lesions have not yet been defined, there is considerable evidence that ethanol-induced oxidative and inflammatory stress plays a critical role in the susceptibility of ethanol to injury<sup>18</sup>, and many ethanol-induced adverse effects can be prevented or

Cite this article: AOUAD RF, BOUFADI MY, ADLI DEH, MOULAI-HACENE F, KAHLOULA K, SLIMANI M. Chemical Composition and Protective Effect of *Rosmarinus officinalis* on Alcohol-Induced Serum Hepatic Changes and Liver Injury in Male Rats. *Pharmacogn J.* 2021;13(5): 1205-1215.

mitigated by antioxidants.<sup>19</sup>

However, medicinal plants can potentially provide new classes of drugs for pain relief<sup>20</sup>, containing substances that have the ability to protect and/or reduce the damage caused by the ingestion of agents such as ethanol are very useful.<sup>21</sup>

Phenolic compounds found in plants have received particular attention as natural antioxidants.<sup>22,23</sup> Phenolic compounds are primary antioxidants that act as terminals for free radicals.<sup>24</sup> In this context, several antioxidant molecules have been proposed as protection against oxidative toxicity.<sup>25</sup>

In folk medicine, the leaves of *Rosmarinus officinalis* which belong to the Lamiaceae family, known as rosemary, are used as an antispasmodic agent<sup>26,27</sup> and its maceration in ethanol as a topical agent is prescribed to reduce rheumatic pain in Mexico. Some scientific studies have demonstrated that the ethno-pharmacological use and biological activities of *Rosmarinus officinalis*, such as antimicrobial<sup>28,29</sup>, anti-tumor, anti-mutagenic and anti-cancer<sup>30,31</sup>, antidepressants<sup>32</sup>, antioxidants<sup>28</sup>, hypoglycemic, hypolipidemic, hypotensive and anti-atherosclerotic properties<sup>33,34</sup> are quite beneficial. Besides, phytochemical experiments have revealed that the oil of this plant contains terpenoids, flavonoids and alkaloids.<sup>34</sup> It can be added that *Rosmarinus officinalis* has produced anti-nociceptive and/or anti-inflammatory effects in some experimental models of pain, including tests of acetic acid-induced contortions and formalin in mice, as well as a model of arthritic pain in rats.<sup>35,36</sup>

The oxidative nature of ethanol, on the one hand, and the protective effect of antioxidant therapy, on the other hand have attempted to design the current work by considering specific underlying molecular mechanisms that may contribute to the adverse effects of ethanol on the liver during ethanol exposure.

Therefore, the objective of this work is focused on the study of the chemical composition of the ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* (EER) and the evaluation of the in vivo antioxidant power against the effect of ethanol consumption on the liver in male Wistar rats.

## MATERIALS AND METHODS

### Vegetable material

The leaves of *Rosmarinus officinalis* were harvested in June 2017 during the flowering period, in the north-western region of Algeria (Saida), then dried at room temperature and protected from light, crushed and stored in a glass bottle in the dark.

### Preparation of Ethanolic Extract of *Rosmarinus officinalis* (EER)

The extraction was done by the maceration method, 10 g of dried and crushed leaves of *Rosmarinus officinalis* were dissolved in 100 mL of 99.8% ethanol, protected from light and at room temperature for three days under sonication for 90 min each day to extract the active ingredients, then filtration was carried out on Whatman N°1 paper before evaporation of the solvent under reduced pressure at a temperature of 55°C by a rotavapor. The powder obtained represents the dry ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* (EER) and was stored at 4°C in tinted glass vials until use.

### Chemical composition by HPLC/UV

The chromatographic analysis of the ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* (EER) was performed on a high performance liquid chromatography (Agilent 1100). Separation was performed on an Agilent poroshell120EC column (100 mm × 2.1 mm, 2.7 μm), using mobile phases: water /TFA/ formic acid (99: 0.25: 0.75) (A) and

acetonitrile (B). Elution was performed at a flow rate of 0.6 mL/min with an aliquot of 10 μL and at a temperature of 55°C. Using a gradient method as follows (t / min, % B) : (0, 0), (1, 10), (2, 12.5), (3, 15), (9, 80), (10, 100), (11, 100), (14, 0) with post 5 min. Chromatograms were recorded at 270 and 320 nm. The sample was prepared by diluting the ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* (EER) with methanol at 1:100 (w / v). The components of the ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* (EER) were identified by comparing their retention times and UV spectra with different commercial phenolic standards (trans-cinnamic, gallic acid, benzoic acid, ferulic acid), m-coumaric acid, caffeic acid, rosmarinic acid and ellagic acid), flavonoids (catechin, hesperidin, thymol, galan-gin, tectochrysin, pinocembrin, acetone, rutin, chrysin, apigenin, kaempferol and quercetin) and other compounds (ascorbic acid, menthol). The standards were dissolved in methanol to give stock solutions at 1 mg/mL. The quantification of the constituents was determined using standard curves expressed in mg per 1 g of powder of ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* (EER).

### Dosing of Total Polyphenols and Flavonoids

The quantification of polyphenols in the ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* (EER) was determined by the colorimetric method of Folin-Ciocalteu.<sup>37</sup>

40 μL extract is mixed with 1.5 mL Folin-Ciocalteu reagent (10%) and 1.5 mL sodium carbonate (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) (7.5%). Then add up 100 mL with

distilled water. Allow the reaction medium to stand for 30 minutes at room temperature and protect it from light. Reading is performed with a spectrophotometer (UV mini-1240) at 760 nm. A calibration curve is performed in parallel under the same conditions using gallic acid at different concentrations. The results are expressed in milligram equivalent of gallic acid per gram of extract (mg GAE/g).

The flavonoid content is determined according to the AlCl<sub>3</sub> aluminum trichloride method described by Woisky and Salatino<sup>38</sup>, which consists of mixing 1 mL of extract with 1 mL of 2% (W/V) AlCl<sub>3</sub> solution and allowing it to react for 30 min before reading the absorbance against a blank at 430 nm.

A calibration curve with quercetin is established under the same reaction conditions as the sample with distilled water instead of the extract. The flavonoid content is expressed in milligram quercetin equivalent per gram extract (mg EQ/g extract).

### Evaluation of the antioxidant activity by the method of reduction of the free radical of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

The anti-radical power of the ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* (EER) was determined by the colorimetric method using the chemical complex 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). 200 μL of ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* at different concentrations 100, 250, 500 and 1000 μg/mL are added to 2.8 ml of the DPPH solution (60 μM). After 30 min incubation in the dark and at room temperature, the absorbance reading is taken at 515 nm.

The free radical scavenging activity of the extract was calculated as a percentage inhibition according to the following formula:

$$[\%RSA = (Abs C - Abs E) / Abs C \times 100].$$

Abs C: Absorbance of control.

Abs E: Absorbance of the extract.

The antioxidant activity was expressed by the IC<sub>50</sub>, defined as the concentration of the extract causing a 50% decrease in the initial concentration of DPPH.



## Animals and accommodation conditions

Twenty-four (24) male Wistar Albino rats (100 to 110 g) supplied by the Pasteur Institute of Algiers (Algeria) were used. The protocol is in accordance with the guidelines of the National Institute of Health (NIH-USA).

Upon receipt, the rats were randomly divided into 4 experimental groups, each containing 6 rats, and were subjected to a two-week adaptation period at room temperature and a 12/12 h photoperiod. The rats were given free access to food and water.

## Experimental protocol

The first group was used as a negative control (G1); (G2) Group 2 rats received 5 mL of ethanol orally for 90 days, G3 received 200 mg/kg of ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* (EER) orally for 90 days; G4 was administered 200 mg/kg/day of EER and 5 mL/day of ethanol at the same time for 90 days.

At the end of the experiment, the rats are fasted for 12 hours before blood collection. In order to avoid any risk of changing biochemical parameters by administering general anesthesia, the animals were kept under a light chloroform anesthesia before being euthanized just before the blood samples were collected. Serum samples were obtained from the dry tubes, while plasma samples were obtained from the heparinized tubes.

The liver was recovered and rinsed with physiological water. Part of the liver was fixed in formalin for the histological study, the second part was placed in PBS buffer (10 mM PO4<sup>3-</sup>/300 mM NaCl, pH 7.4). The preparation of the liver tissue homogenate was done according to the protocol of Tang<sup>39</sup> cited by Chaa<sup>40</sup>. Homogenize the second part of the liver pieces in ice buffer (250 mM sucrose, 10 mM Tris - HCl, 0.5 mM EDTA and 0.5% bovine serum albumin, pH 7.4), recover the supernatant by centrifugation at 112 x g for 15 min at 4°C. Repeat this procedure twice, in order to place the mitochondrial pellet in PBS buffer (0.1 mL 10 mM EDTA, 0.1 mL 35% sodium azide, pH 7.4), for various assays.

## Determination of biochemical parameters of liver function

The assay of the activity of aspartate aminotransferase (AST, EC 2.6.1.1) and alanine aminotransferase (ALT, EC 2.6.1.2) was determined using bio-Merieux kits (bioMerieux SA France). The activity of alkaline phosphatase (ALP, EC 3.1.3.1) and gamma-glutamyl transferase ( $\gamma$ -GT; EC 2.3.2.2) was performed with kits from Spinreact (Spinreact, Spain). The total bilirubin assay was performed with the BIOLABO kit (BIOLABO SA, France). The lipid balance (triglyceride and cholesterol) was performed with the Human kits (Human, Germany).

## Measurement of antioxidant markers in the liver

The determination of superoxide dismutase activity in liver tissue was carried out by the protocol of Elster.<sup>41</sup> The determination of the enzymatic activity of catalase in liver homogenate was carried out by the method of Lück<sup>42</sup> and Aebi.<sup>43</sup> GPx activity was measured by the method of Paglia and Valentine.<sup>44</sup> Malondialdehyde (MDA) was measured according to the method described by Yagi.<sup>45</sup>

## Anatomopathological study of the liver

Blocks of liver portions preserved in 10% formalin were put in kerosene which were then cut with a rotating microtome (Leica, Germany) at 5  $\mu$ m thick. The resulting sections were spread on microscope slides and stained with hematoxylin and eosin, and observed with an optical microscope.<sup>46</sup>

## Statistical analyses

Sigma Stat software (SPSS, 3.0, SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) was used for the statistical analysis. The data are presented as mean  $\pm$  standard deviation and were evaluated by ANOVA, using Dunnett's post-hoc test. The in Vivo study experiment was independently repeated 6 times in a fully randomized design. The in vitro experiments were independently repeated 3 times in a fully randomized device. The difference is considered significant at P<0.05.

## RESULTS

### Chemical composition of the EER extract

The extraction of the ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* (EER) by maceration with ethanol (99.8%) from the powder of the leaves of the plant reveals that the ethanolic extract (EER) contains a yield of 18.5%.

The chromatograms obtained by HPLC/UV at 270 and 320 nm of the ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* (EER) are shown in Figures 1A and B, respectively. We were able to identify 23 phenolic compounds, of which the main flavonoids of the ethanolic extract of EER are; quercetin, catechin, luteolin and chrysin, with a content of 11.94, 9.56, 7.34, and 6.33 mg/g EER, respectively. In addition, the highest phenolic acid content was recorded in rosmarinic acid and gallic acid (11.85 and 7.46 mg/g EER, respectively). Ellagic acid and tannic acid were found at low concentrations (Table 1).

### Phenolic compound content of *Rosmarinus officinalis*

The results summarized in Table 2 show that the phenolic content of the EER ethanolic extract is 223.25 mg EAG/g EER while the flavonoid content is 83.7 mg EQ/g EER.

Evaluation of the anti-radical power and the lipoperoxidation inhibition activity of the EER extract

The scavenging results of the DPPH free radical and the lipid peroxidation inhibitory power of the EER ethanolic extract are presented in Table 2.

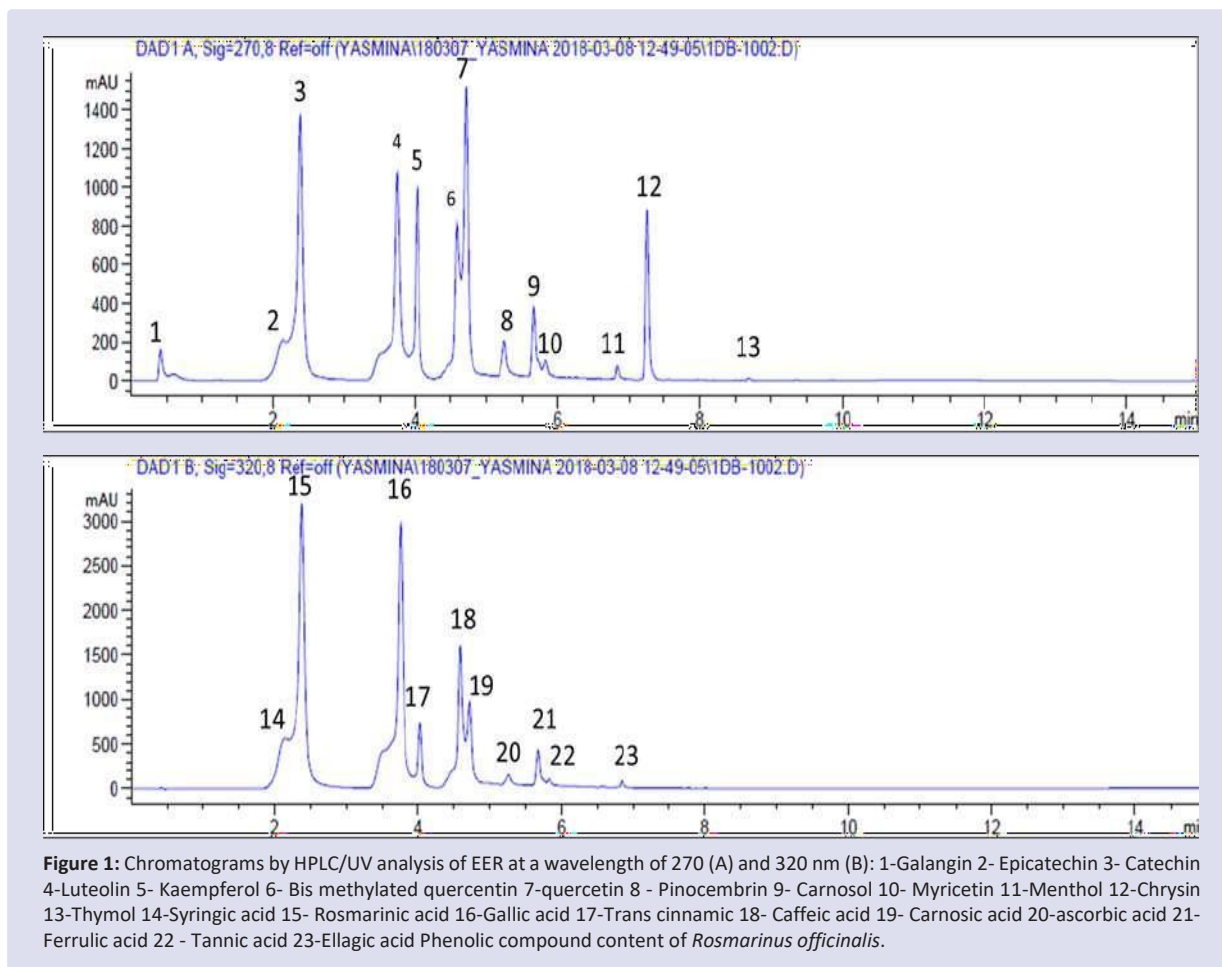
The results show that the extract of *Rosmarinus officinalis* has a very important anti-free radical activity. The EER ethanolic extract had an IC<sub>50</sub> = 159.53  $\mu$ g/mL whereas, the IC<sub>50</sub> for the inhibition of lipid peroxidation is of the order of 29.03  $\pm$  0.23  $\mu$ g/mL.

### Evaluation of biochemical parameters of liver function

Several hepatic parameters were measured to evaluate the therapeutic effect of the ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* on hepatotoxicity induced by chronic ethylism. Table 3 shows these hepatic parameters.

Compared to rats in the negative control group, ethanol increased serum levels of liver function namely; aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, total bilirubin, total protein and albumin in G2 rats. There was a significant (P<0.05) decrease in these parameters in Group G3 and G4 rats who received 200 mg/kg/day of EER and 200 mg/kg/day of EER followed by 5 mL of ethanol for 90 days, respectively, compared to Group G1 rats.

In addition, rats receiving ethanol (G2) showed increased serum concentrations of triglycerides, cholesterol, gamma glutamyl transferase and alkaline phosphatase, (P <0.05) compared to the G1 group, while the concentrations of the latter in rats treated with 200 mg/kg/day of EER were reduced. Administration of EER in combination with ethanol in group G4 showed a very significant (P <0.05) decrease in these liver parameters compared to group G2.



**Table 1:** Composition of *Rosmarinus officinalis* ethanolic extract (EER) by HPLC/UV (mg/g).

Peak number	Compound	Retention time (min)	Amount (mg/ g EER)
1	Galangin	0.19	0.58
2	Epicatechin	0.17	2.13
3	Catechin	9.56	2.37
4	Luteolin	7.34	3.74
5	Kaempferol	0.79	4.02
6	Bis-methylated quercetin	5.05	4.58
7	Quercetin	11.94	4.71
8	Pinoembrin	0.93	5.25
9	Carnosol	1.96	5.66
10	Myricetin	0.15	5.82
11	Menthol	0.11	6.84
12	Chrysin	6.33	7.25
13	Thymol	0.06	8.68
14	Syringic acid	1.32	2.13
15	Rosmarinic acid	11.85	2.37
16	Gallic acid	7.46	3.74
17	Trans cinnamic	1.80	4.02
18	Caffeic acid	3.66	4.58
19	Carnosic acid	2.89	4.71
20	Ascorbic acid	0.22	5.25
21	Ferrulic acid	1.43	5.66
22	Tannic acid	0.15	5.82
23	Ellagic acid	0.09	6.84

**Table 2: Concentrations of total polyphenols and flavonoids, inhibition of lipoperoxidation and anti-radical activity, of the ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* (EER).**

Fraction	Total Polyphenols (mg EAG/g of EER)	Flavonoids (mg EQ/g of EER)	Anti-radical IC <sub>50</sub> (µg/ mL)	Inhibition of lipoperoxidation IC <sub>50</sub> (µg/ mL)
Extract (EER)	223.25 ± 4.03	83.7 ± 5.95	159.53 ± 9.67	29.03 ± 0.23

The values are expressed as mean ± SD (n=3).

**Table 3: Effect of ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* (EER) on hepatic function parameter values of Wistar rats exposed to ethanol.**

Parameter	G1	G2	G3	G4
ALAT (UI/l)	39.48 ± 0.98	141.33 ± 3.72	40.98 ± 0.88	53.5 ± 4.59
ASAT (UI/l)	52.56 ± 1.69	158.16 ± 5.98	45.16 ± 4.16	53.5 ± 4.59
Bil T (mg/l)	4.3 ± 0.42	8.05 ± 0.34	4.40 ± 0.34	5.73 ± 0.36
Prot T (g/l)	72.63 ± 2.38	43.60 ± 5.16	73.45 ± 2.91	67.15 ± 2.48
ALB (g/l)	37.5 ± 2.25	20.83 ± 2.40	41 ± 2.44	33.33 ± 1.63
TG (g/l)	0.43 ± 0.13	1.9 ± 0.16	0.4 ± 0.11	0.55 ± 0.66
CH (g/l)	1.52 ± 0.18	2.01 ± 0.04	1.50 ± 0.05	1.84 ± 0.08
γ-GT (UI/l)	29.18 ± 1.09	114.33 ± 6.47	28.19 ± 0.181	34.38 ± 0.08
PAL (UI/l)	81.50 ± 1.64	425.45 ± 04.28	80.51 ± 02.33	111.5 ± 08.78

The values are expressed as mean ± SD (n=6).

\*Significant difference from the control group ( $p < 0.05$ ). \*\*Significant difference from the ETH hepatotoxicity group ( $p < 0.05$ ).

**Table 4: Effect of ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* (EER) on malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px), in the liver of Wistar rats exposed to ethanol.**

Parameter	G1	G2	G3	G4
MDA liver (nmol/ml)	2.38 ± 0.05	9.835 ± 0.35	2.11 ± 0.0	2.25 ± 0.09
SOD liver (U/cg Hb)	44.78 ± 1.87	9.39 ± 1.21	76.31 ± 1.42	44.36 ± 1.55
CAT liver (U/mg Hb)	112.71 ± 3.58	25.39 ± 1.80	125.77 ± 1.99	111.88 ± 3.58
GSH-Px liver (U/g Hb)	125.03 ± 1.73	12.89 ± 0.68	508.83 ± 22.49	121.24 ± 1.68

The values are expressed as mean ± SD (n=6).

\*Significant difference from the control group ( $p < 0.05$ ). \*\*Significant difference from the ETH hepatotoxicity group ( $p < 0.05$ ).

## Assessment of oxidative status in the liver

Table 4 shows the level of malondialdehyde (MDA) and enzymes (superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase) related to oxidative stress status in the liver tissues of the different groups. These results indicate that ethanol (G2) decreased antioxidant enzyme activities (SOD, CAT and GPx) at levels of -73, -70 and -88% respectively in the liver. In addition, the level of lipid peroxidation in the liver was significantly increased (9.83 nmol/mL) in the group that received only ethanol (G2) compared to the G1 group (2.38 nmol/mL). In contrast, rats in G3 (treated with 200 mg/kg/day of EER) and G4 (treated with 200 mg/kg of EER and 5 mL/kg/day of ethanol) showed an increase in liver antioxidant status parameters (SOD, CAT and GPx) and a reduction in MDA levels.

## Anatomopathological study of liver tissue

The histological study of the liver of rats in the negative control group (G1) shows a normal architecture of the hepatic parenchyma, with sinusoids and a centrolobular vein that are essentially normal (Fig. 2A).

The histological structure (Fig. 2D) of the liver of rats treated exclusively with the ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* (EER) (G3) revealed a similar architecture to that observed in the control group (G1).

Nevertheless, since the histological section of figure 2 (B,C) refers to G2, (rats intoxicated with ethanol), the biopsy showed a variety of major hepatic lesions, severe mixed (micro and macro vacuolar) steatosis, congestion of portal veins and sinusoid capillaries, portal and

lymphocytic type inflammatory reaction in the sinusoid capillaries and hepatocytic necrosis.

Treatment of rats with 200 mg/kg/day of ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* (EER) showed a liver with normal architecture with a discrete focus of mixed steatosis, discrete sinusoidal congestion with the presence of some inflammatory elements in the sinus capillaries (Fig. 2E,F).

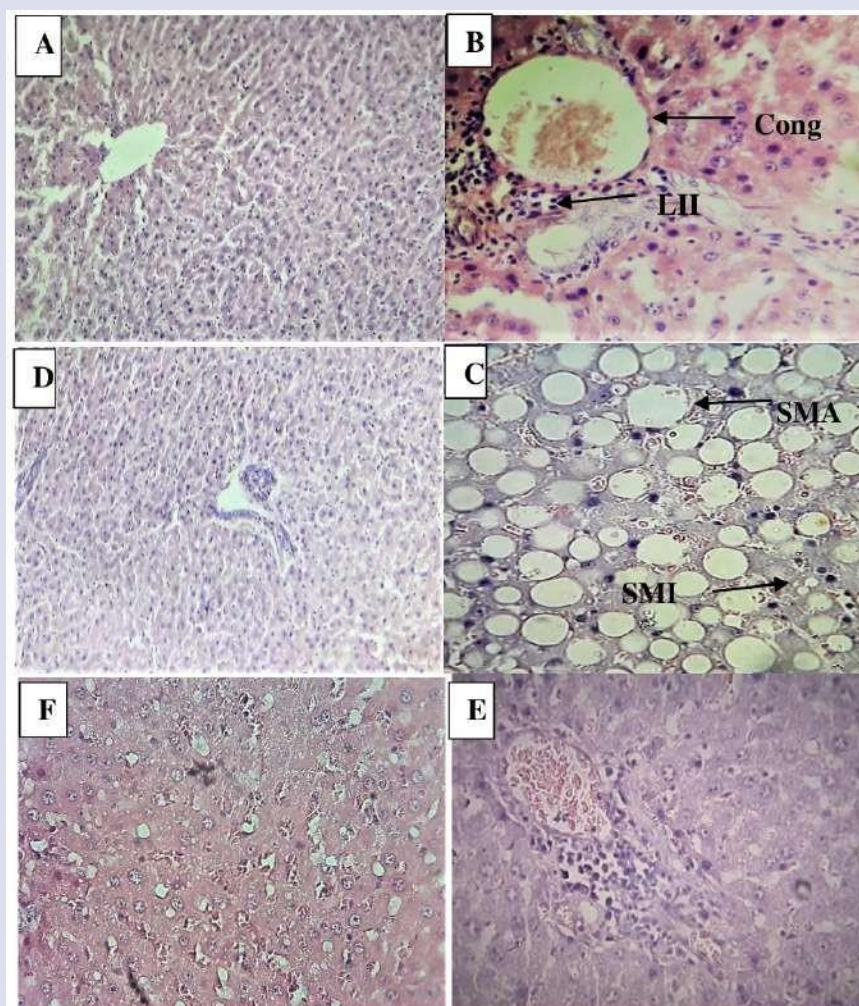
## DISCUSSION

The phytochemical profile established by HPLC/UV of ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* has led to the identification and quantification of numerous bioactive components with various pharmacological properties, belonging to different classes of constituents, the majority of which are mainly rosmarinic acid.

The chemical composition of our extract differs qualitatively and quantitatively from that previously analyzed by Amaral<sup>47</sup>, which revealed the presence of chlorogenic acid (12.2 mg/g), caffeic acid (7.63 mg/g), rutin (3.07 mg/g), rosmarinic acid (38.5 mg/g), quercetin (5.10 mg / g), kaempferol (2.53 mg / kg) and carnosic acid (26.4 mg / g). However, rosmarinic acid and carnosic acid are the main majority constituents found in our extract and the one analyzed by Amaral.<sup>47</sup>

The results obtained show that EER extract is rich in polyphenols and flavonoids. These results are eminent to those obtained by Menaceur<sup>48</sup>, whose polyphenol content of the ethanolic extract of EER is 195.24 mg EAG/g<sup>49</sup>, 128.97 mg EAG/g<sup>50</sup>, 04.99 mg EAG/g<sup>51</sup>, and 162 mg EAG/g reported by Ho.<sup>52</sup> The flavonoid concentration of 20.1 mg EQ/g





**Figure 2:** Histological cuts of rat's liver of groups: G1 (A); G2 (B,C); G3 (D); G4 (E,F). Abbreviations: Cong: congestion, LII: lymphocytic inflammatory infiltrate SMA: macrovacuolar steatosis, SMI: microvacuolar steatosis.

remains lower than that found in our extract, on the other hand, the one reported by Tsai<sup>53</sup> is close to 60.7 mg EQ/g EER.

The contents of phenolic compounds vary qualitatively and quantitatively within the same plant as well as from one plant to another, this can be explained by the variation in the distribution and content of secondary metabolites during plant growth due to intrinsic and extrinsic factors.<sup>54,55</sup>

In addition, many factors discovered by Wang<sup>56</sup>, Koşar<sup>57</sup>, Durling<sup>58</sup> related to climatic and environmental conditions (high temperature, solar exposure, drought, salinity), which stimulate the biosynthesis of secondary metabolites such as polyphenols, also depend on the time of harvest, geographical location, extraction solvent, its polarity<sup>59,60</sup>, storage conditions and duration.<sup>61,58</sup>

We have noted that there is a correlation between the concentration of polyphenols and antioxidant activity, indicating that the ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* has a high antioxidant activity capable of inhibiting the formation of free radicals and opposing the oxidation of macromolecules<sup>62</sup>, due to its richness in phenolic compounds mainly rosmaric acid<sup>63</sup>, which is the current major phenolic component in rosmaric extract.<sup>64,65</sup>

Rosemary extract is rich in phenolic compounds mainly rosmaric acid and flavonoids, which could play an important role in the defense system as they are recognized as excellent antioxidants.<sup>66</sup> This could

explain the antioxidant property of EER, which has enabled the protection of the liver against disasters generated by alcohol metabolism.

However, it is rather difficult to attribute the therapeutic effect of an extract to one or a few active ingredients, as extracts always contain a mixture of different bioactive chemical constituents.<sup>67,68</sup> What's more, the main constituents, minor compounds can make a significant contribution to the pharmacological activity of extracts.

According to Erkan<sup>51</sup>; scavenging of the DPPH radical revealed a very eminent antiradical power of the ethanolic extract of rosemary, presenting an IC<sub>50</sub> of 54 µg/mL, which is three times less than that shown in our study. In addition, results reported by other researchers have also shown that this parameter is variable in the antiradical activity of rosemary, Wojdyło<sup>69</sup> found an IC<sub>50</sub> of around 513 µg/mL.

With regard to the improvement of the various biomarkers of liver function and the maintenance of liver structural integrity following the administration of ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* in intoxicated rats, EER extract has a free radical scavenging activity as determined by the DPPH test and peroxidation inhibition.

Serum analysis revealed a dysfunction of liver parameters following chronic exposure to ethanol for 90 days in rats.

Hypertriglyceridemia and hypercholesterolemia was observed in G2 intoxicated rats, which is consistent with the study in rhesus monkeys

which revealed that ingestion of ethanol for 3 months resulted in an accumulation of triglycerides, cholesterol and phospholipids in serum and liver.<sup>70</sup> These results show that ethyl alcohol is the cause of lipid metabolic disturbances, a consequence of the oxidation of ethanol is the increase in the NADH/NAD<sup>+</sup> ratio which leads to a disturbance of carbohydrate and lipid metabolism<sup>71</sup>, which explains the observation of cholesterol accumulation in the liver and an increase in plasma LDL and HDL in alcoholic liver disease.<sup>72</sup>

The ethanolic extract of EER provides a hepatoprotective effect, which is consistent with the work of Sotelo-Félix<sup>73</sup> who showed that *Rosmarinus officinalis* partially limited the inflammation and necrosis induced by CCl<sub>4</sub> carbon tetrachloride in rats and other research has shown that methanolic extracts of rosemary could also inhibit lipid peroxidation in the liver of CCl<sub>4</sub>-treated rats. The extract of *Rosmarinus officinalis* has an antioxidant effect via the inhibition of lipoperoxidation.<sup>74,75</sup>

Rosemary exerts beneficial effects on the treatment of alcoholic hepatotoxicity by modulating the hepatic oxidative state through the trapping of harmful free radicals, but also through the activation and induction of the enzymatic mechanisms of physiological defense<sup>76</sup> and immune stimulation<sup>77</sup> which limits the extent of lipid peroxidation and thus the preservation of cell membranes and/or intracellular hepatocyte membranes in the liver tissue of animals, or may act directly on the process of transformation of ethanol into secondary metabolites in the animal organism by increasing its clearance, which may be another possible mechanism of action. This has been shown to inhibit and slow the onset of alcoholic liver disease.

The metabolism of alcohol, which damages mainly the liver, is characterized by the generation of free radicals and reactive oxygen species. In addition, the main pathway for the metabolism of alcohol involves the enzyme alcohol dehydrogenase (ADH).

The increase in serum liver enzymes can be attributed to hepato cytolysis of the structural integrity of the liver by alteration of the extracellular and intracellular membranes of hepatocytes reflecting cellular necrosis induced by the toxic metabolism of ethyl alcohol, leading to elevated levels in plasma.<sup>78,79</sup>

Rats exposed to ethyl alcohol showed a significant increase in bilirubin levels compared to control rats (G2). This increase in the bilirubin level is in favour of an alteration in the excretory function of the liver following a defect in elimination by the hepatocyte, which is a sign of liver damage caused by chronic ethyl alcohol intoxication. Studies have shown that necrotizing toxicants generate lesions of the hepatic parenchyma inducing an increase in the concentration of bilirubin in the serum.<sup>80</sup>

Studies have shown that chronic alcohol consumption alters both enzyme levels and non-enzymatic endogenous antioxidant systems. The result is oxidative stress with a cascade of effects, affecting the functional and structural integrity of cell membranes and organelles responsible for the genesis of different forms of alcohol-induced liver disease.<sup>14</sup>

In our study, exposure to ethanol for 90 days significantly reduced antioxidant enzymes in the liver. This reduction is promoted by the production of oxidative stress which is characterized by the generation of toxic acetaldehyde and other reactive molecules in the cell, reflecting the pathological effect of ethanol metabolism on antioxidant status compared to the control group. The reduction in the activities of these antioxidant enzymes may be due to inhibition of their synthesis or could also result from the oxidation of enzyme proteins by the generation of reactive oxygen species during ethanol metabolism.

The induction of oxidative stress by alcohol metabolism was clearly reversed by therapy with ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* at a dose of 200 mg/kg/day with the observation of increased reduced levels

of SOD, CAT and GSH-PX in rats in the group treated with ethanol and EER extract compared to the group receiving ethanol alone.

The improvement in the activities of defense enzymes in the liver of alcoholic rats receiving a diet of EER extract, confirms the hypothesis that EER has a restorative effect in the antioxidant status in alcoholic rats and protected the liver from the deleterious effect of oxidative stress generated by ethanol responsible for its toxicity.

These changes are probably due to the combined protective effects of the bioactive chemical components of the EER extract and an increase in the transcription of the enzyme-encoding gene, as it has been reported that genes encoding phase II enzymes are strongly induced by antioxidant compounds.<sup>81,82</sup>

The ethanolic extract of EER, which showed strong lipoperoxidation inhibition activity with a 50% enzyme activity inhibition concentration (IC<sub>50</sub>) of 29.03 µg/mL at an administered dose of 200 mg/kg/day, caused a very marked reduction in hepatic MDA levels in treated rats compared to alcohol intoxicated rats.

The blockage of lipid peroxidation by *Rosmarinus officinalis* may be due to According to the established reports of Kumar and Kutan<sup>83</sup> and Khatoun<sup>84</sup> to the set of antioxidant bioactive compounds present in the plant extract that inhibit the oxidation of macromolecules.

This protection generated by the ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* is probably due to its antioxidant and anti-lipoperoxidant effect without excluding the possible intervention of other pharmacological properties of the various metabolites contained in the ethanolic extract of EER.

Lipid peroxidation, an index of oxidative stress originating from free radicals in vivo, is a process during which the polyunsaturated fatty acids constituting membrane phospholipids are converted into lipoperoxides. This results in a considerable alteration of the structure and functions of cellular and subcellular membranes; it is often characterized by a high concentration of malondialdehyde (MDA).<sup>85</sup>

MDA in liver homogenate was determined as lipid Peroxidation Index.<sup>86</sup> The observed high level of MDA in the liver could cause the generation of free radicals leading to membrane lipid peroxidation involved in the pathogenesis of liver damage due to chronic alcohol intoxication by altering the structure and functions of cellular and subcellular membranes.<sup>87</sup>

Ethyl alcohol is the most toxic component of alcoholic beverages; its long-term ingestion evokes multiple variations in cellular functions and the oxidant/antioxidant system affecting several organs such as: liver, brain, kidney, and pancreas. It is absorbed in the stomach and intestine.<sup>21,88</sup>

These changes observed in the various liver biomarkers are indicative of the presence of tissue damage; this was confirmed by the histological study of the liver of rats exposed to ethyl alcohol, which revealed an intense distortion of the liver architecture. Hepatic cells, intra-lobular veins and endothelium were found to be damaged with a variety of major hepatic lesions including severe mixed steatosis (micro and macro vacuolar), congestion of portal veins and sinusoid capillaries, portal and lymphocytic type inflammatory reaction in the sinusoid capillaries and hepatocytic necrosis.

These tissues and cellular alterations revealed a toxic hepatopathyresul which resulted from long-term treatment with ethyl alcohol, whose hepatic lesions are the result of a complex process involving multiple mechanisms initiated by the toxicity of its metabolite acetaldehyde and other reactive species generated by the induction of CYP2E1. This was at the origin of the genesis of hepatocyte oxidative stress, which is responsible for lipid peroxidation, thus participating in the architectural disorganization of cell membranes.



The results obtained showed that chronic alcohol intoxication leads to a reduction in antioxidant capacity through the excessive production of reactive oxygen species and depletion of the anti-radical defence system following its metabolism in the liver, generating lipoperoxidation leading to the deterioration of liver tissue, the presence of these lesions leads to the destruction of hepatocytes by necrosis or apoptosis, which being destructured, the liver can no longer perform its functions normally, which explains the physiological disturbances of liver and serum biomarkers in the interior environment.<sup>89</sup>

The oral administration of 200 mg/kg/day of ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* (EER) for 90 days in ethanol intoxicated Wistar male rats (G4) restored the alcohol-related physiological disorder and significantly reduced liver parameters compared to the ethanol intoxicated batch (G2).

These results reveal a hepato-protective action of this extract against the hepatic functional alterations that were induced by ethylism.

Then the stabilization and preservation of the integrated intra- and extracellular membranes of hepatocytes revealed by the anatomopathological examination showed negligible tissue damage in rats treated with the ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* (EER) which are characterized by a slight degree of steatosis and a discrete inflammation infiltrate, showing signs of improvement and preservation of liver tissue against alcohol toxicity manifested by fatty degeneration, inflammation and necrosis. Thus, revealing that rosemary has been able to protect structural integrity and restore structural disorders caused by alcohol by limiting histological changes in liver damage.

## CONCLUSION

All in all, the ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* (EER) considerably inhibits the hepatic dysfunction induced by the harmful metabolism of ethyl alcohol as well as the oxidative damage resulting from its toxicity and confers a hepatocurative and hepatoprotective effect probably due to its richness in bioactive chemical compounds. Such as polyphenolics mainly rosmarinic acid and flavonoids contains an increased antioxidant activity and inhibition of lipid peroxidation.

Furthermore, these metabolites are known for other diverse biological properties that may play a paramount role in protecting the liver damaged particularly by alcohol. Contributing to provide an environment conducive to the mechanisms of liver regeneration at optimal levels allowing the recovery of liver mass to correct deficits in liver function by enhancing the total cellular antioxidant capacity and reducing the oxidation of macromolecules (lipids and protein) and the level of free radicals and reactive oxygen species (ROS) of malondialdehyde (MDA) in the liver tissue, thus preserving the liver tissue architecture and function.

It would be legitimate to deduce, as shown in our results, that the hepato-protective effect of the ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* against the complex hepatic toxicity induced by ethyl alcohol results originates from the synergy of its bioactive phyto-components endowed with multiple and diverse pharmacological properties that confer an optimal therapeutic intake for physiological and tissue lesions of the liver and slows down its evolution.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was sponsored with the Abdelhamid Ibn Badis University (a research project PRFU D00L01UN270120190001), Moulay Tahar University and University ULB Bruxelles.

## CONFLICTS OF INTEREST

We wish to confirm that there are no known conflicts of interest associated with this publication.

## ABBREVIATIONS

CAT: Catalase; DPPH: 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl; IC<sub>50</sub>: Inhibitory Concentration 50; EAG: Gallic Acid Equivalent; GSH-Px: glutathione peroxidase; HPLC/UV: High Performance Liquid Chromatography/ Ultraviolet; MDA: Malondialdehyde; EQ: Quercetin Equivalent; SOD: Superoxide dismutase.

## REFERENCES

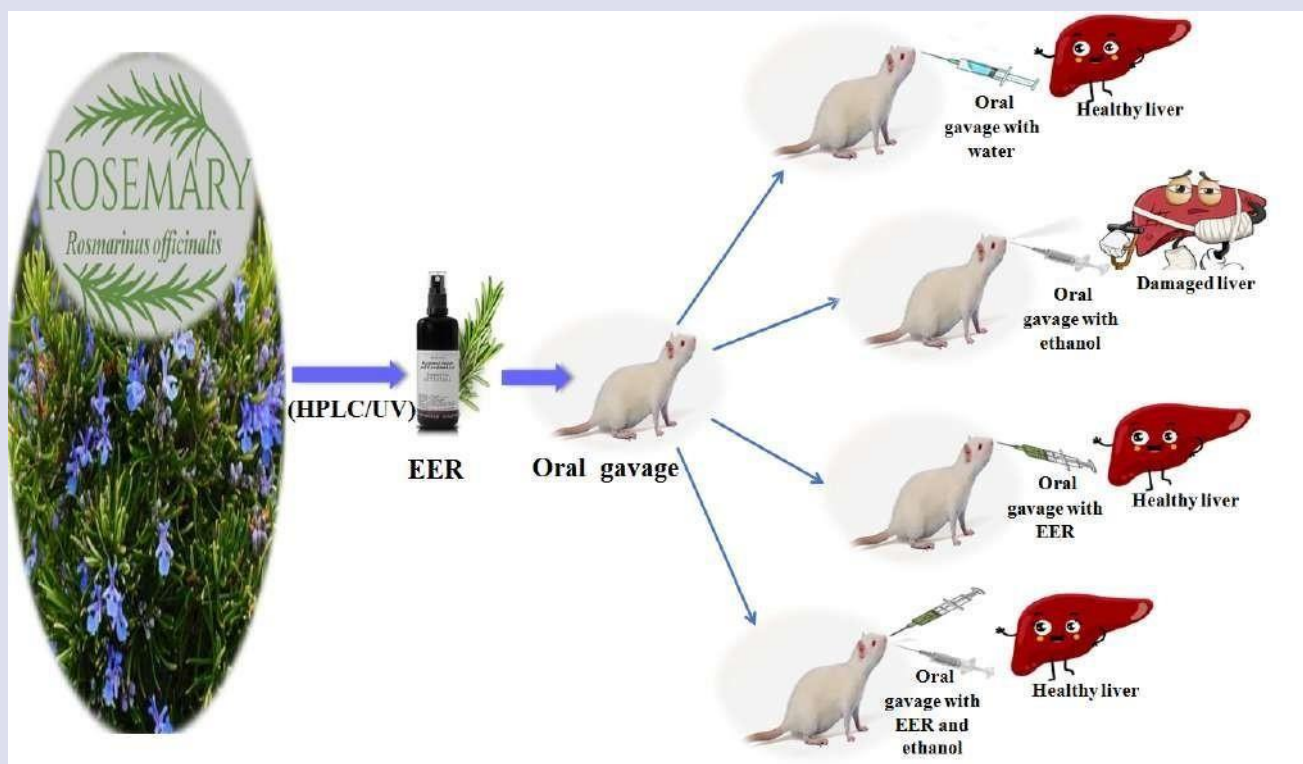
- Vasiljevic T, Franks LN, Ford BM, Douglas JT, Prather PL, Fantegrossi WE, Prisinzano TE. Design, synthesis, and biological evaluation of aminoalkylindole derivatives as cannabinoid receptor ligands with potential for treatment of alcohol abuse. *J Med Chem.* 2013; 56(11): 4537-4550.
- Rehm J, Samokhvalov AV, Shield KD. Global burden of alcoholic liver diseases. *J Hepatol.* 2013; 59 (1): 160-168.
- Edenberg HJ, Foroud T. Genetics and alcoholism. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2013; 10 (8): 487-494.
- Gao B, Bataller R. Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets. *Gastroenterology.* 2011; 141 (5): 1572-1585.
- Seth D, Hogg PJ, Gorrell MD, McCaughan GW, Haber PS. Direct effects of alcohol on hepatic fibrinolytic balance: implications for alcoholic liver disease. *J Hepatol.* 2008; 48 (4): 614-627.
- Fregozoa CS, Beltránb MLM, Sotoc MEF, Vegaa MIP, Zárate CB, Ruiz LH. Expression of NMDA receptor subunits in rat prefrontal cortex with CCL4-induced hepatic damage after a treatment with *Rosmarinus officinalis* L. *Neurologia.* 2012; 27 (5): 261-267.
- Shirpoor A, Salami S, Khadem-Ansari MH, Heshmatian B. Ilkhanizadeh, Long term ethanol consumption initiates atherosclerosis in rat aorta through inflammatory stress and endothelial dysfunction. *Vascul Pharmacol.* 2012; 57(2-4): 72-77.
- Shirpoor A, Nemati S, Ansari MH, Ilkhanizadeh B. The protective effect of vitamin E against prenatal and early postnatal ethanol treatment-induced heart abnormality in rats: a 3-month follow-up study. *Int Immunopharmacol.* 2015; 26(1): 72-79.
- Tian H, Ye X, Hou X, Yang X, Yang J, Wu C. SVCT2, a potential therapeutic target, protects against oxidative stress during ethanol-induced neurotoxicity via JNK/p38 MAPKs, NF-κB and miRNA125a-5p. *Free Radic. Biol Med.* 2016; 96: 362-373.
- Görg B, Qvartskhava N, Bidmon HJ, Palomero-Gallagher N, Kircheis G, Zilles K, Haussinger D. Oxidative stress markers in the brain of patients with cirrhosis and hepatic encephalopathy. *Hepatology.* 2010; 52(1): 256-265.
- Logan-Garbisch T, Bortolazzo A, Luu P, Ford A, Do D, Khodabakhshi P, French RL. Developmental ethanol exposure leads to dysregulation of lipid metabolism and oxidative stress in *Drosophila*. *G3: Genes, Genomes, Genetics.* 2015; 5(1): 49-59.
- Bayliak MM, Shmihel HV, Lylyk MP, Storey KB, Lushchak VI. Alpha-ketoglutarate reduces ethanol toxicity in *Drosophila melanogaster* by enhancing alcohol dehydrogenase activity and antioxidant capacity. *Alcohol.* 2016; 55: 23-33.
- Miller-Pinsler L, Wells PG. Embryonic catalase protects against ethanol embryopathies in acatalasemic mice and transgenic human catalase-expressing mice in embryo culture. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2015; 15; 287(3): 232-9.
- Cederbaum AI, Lu Y, Wu D. Role of oxidative stress in alcohol-induced liver injury. *Archives of toxicology.* 2009; 83(6): 519-548.

15. Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-biological interactions*. 2014 ; 224 : 164-175.
16. Teixeira-Clerc F. Effets hépatiques de l'alcool Hepatic effects of alcohol. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*. 2015; 50 (2): 94-102.
17. Attignon E, Rouach H. Molecular bases of ethanol toxicity. Etienne Blanc. *Cahiers de nutrition et de diététique, biochimie*. 2015; 50: 84-93.
18. Shirpoor A, Salami S, Khadem-Ansari MH, Minassian S, Yegiazarian M. Protective effect of vitamin E against ethanol-induced hyperhomocysteinemia, DNA damage, and atrophy in the developing male rat brain. *Alcohol Clin Exp Res*. 2009; 33(7): 1181-6.
19. Shirpoor A, Norouzi L, Khadem Ansari MH, Ilkhanizadeh B, Gharaaghaji R. Vasoprotective effect of vitamin E: Rescue of ethanol-induced atherosclerosis and inflammatory stress in rat vascular wall. *International Immunopharmacology*. 2013; 16(4): 498-504.
20. Garg G, Adams JD. Treatment of neuropathic pain with plant medicines. *Chin J Integr Med*. 2012; 18(8): 565-570.
21. Nânci CD, Oliveira D, Sarmiento MS, Nunes EA, Porto CM, Rosa DP, Bona SR, Rodrigues G, Marroni NP, Pereira P, Picada JN, Ferraz ABF, Thiesen FV, Silva JD. Rosmarinic acid as a protective agent against genotoxicity of ethanol in mice. *Food and Chemical Toxicology*. 2012; 50: 1208-1214.
22. Moon JK, Shibamoto T. Antioxidant assays for plant and food components. *J Agric Food Chem*. 2009; 57(5): 1655-1666.
23. Georgiev V, Ananga A, Tsoleva V. Recent advances and uses of grape flavonoids as nutraceuticals. *Nutrients*. 2014; 6(1): 391-415.
24. Kurek-Gorecka A, Rzepecka-Stojko A, Gorecki M, Stojko J, Sosada M, Swierczek-Zieba G. Structure and Antioxidant Activity of Polyphenols Derived from Propolis. *Molecules*. 2014; 19(1): 78-101.
25. Chen HL, Lan XZ, Wu YY, Ou YW, Chen TC, Wu WT. The antioxidant activity and nitric oxide production of extracts obtained from the leaves of *Chenopodium quinoa* Willd. *Biomedicine (Taipei)*. 2017; 7(4): 24.
26. Al-Sereiti MR, Abu-Amer KM, Sen P. Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn) and its therapeutic potentials. *Indian J Exp Biol*. 1999; 37(2): 124-130.
27. Ahmed HM, Babakir-Mina M. Investigation of rosemary herbal extracts (*Rosmarinus officinalis*) and their potential effects on immunity. *Phytotherapy Research*. 2020; 34(8): 1829-1837.
28. Nieto G, Ros G, Castillo J. Antioxidant and Antimicrobial Properties of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*, L.). A Review, *Medicines*. 2018; 5(3): 98.
29. Jafari-Sales A, Pashazadeh M. Study of chemical composition and antimicrobial properties of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oil on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in vitro. *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*. 2020; 3(1): 62 - 69.
30. Fahim FA, Esmat AY, Fadel HM, Hassan KF. Allied studies on the effect of *Rosmarinus officinalis* L. on experimental hepatotoxicity and mutagenesis. *Int J Food Sci Nutr*. 1999; 50(6): 413-427.
31. Allegra A, Tonacci A, Pioggia G, Musolino C, Gangemi S. Anticancer Activity of *Rosmarinus officinalis* L.: Mechanisms of Action and Therapeutic Potentials. *Nutrients*. 2020; 12(6): 1739.
32. Machado DG, Cunha VB, Neis GO, Balen A, Colla LE, Bettio A, Oliveira FL, Pazini FL, Dalmarco JB, Simionatto EL, Pizzolatti MG, Rodrigues ALS. Antidepressant-like effects of fractions, essential oil, carnosol and betulinic acid isolated from *Rosmarinus officinalis* L. *Food Chem*. 2013; 136(2): 999-1005.
33. Hassani FV, Shirani K, Hosseinzadeh H. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) as a potential therapeutic plant in metabolic syndrome: a review. *Naunyn Schmiede Arch Pharm*. 2016; 389(9):931-41.
34. Ali A, Oon CC, Chua BL, Figiel A, Chong CH, Wojdylo A, Turkiewicz IP, Szumny A, Lyczko J. Volatile and polyphenol composition, anti-oxidant, anti-diabetic and anti-aging properties, and drying kinetics as affected by convective and hybrid vacuum microwave drying of *Rosmarinus officinalis* L. *Industrial Crops and Products*. 2020; 151: 112463.
35. Gonzalez-Trujano ME, Pena EI, Martinez AL, Moreno J, Guevara-Fefer P, Deciga-Campos M, Lopez-Munoz FJ. Evaluation of the antinociceptive effect of *Rosmarinus officinalis* L. using three different experimental models in rodents. *J Ethnopharmacol*. 2007; 111(3): 476-482.
36. Martínez AL, González-Trujano ME, Pellicer F, López-Muñoz FJ, Navarrete A. Antinociceptive effect and GC/MS analysis of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil from its aerial parts. *Planta Med*. 2009; 75(5): 508-511.
37. Abdel-Hameed ES. Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian *Ficus* species leaf samples. *Food Chem*. 2009; 114(4):1271-1277.
38. Woisky RG, Salatino A. Analysis of Propolis: Some Parameters and Procedures for Chemical Quality Control. *Journal of Apicultural Research*. 1998; 37(2): 99-105.
39. Tang CC, Huang HP, Lee YJ, Tang YH, Wang CJ. Hepatoprotective effect of mulberry water extracts on ethanol-induced liver injury via anti-inflammation and inhibition of lipogenesis in C57BL/6J mice. *Food and Chemical Toxicology*. 2013; 62: 786-796.
40. Chaa S, Boufadi YM, Keddari S, Benchaib AH, Soubhye J, Van Antwerpen P, Riazi A. Chemical composition of propolis extract and its effects on epirubicin-induced hepatotoxicity in rats. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2019; 29(3): 294-300.
41. Elstner EF, Youngman RJ, Obwald W. Superoxyde dismutase in methods of enzymatic analysis. 3rd Ed. Bergmeyer H, Editor. *Method of Enzymatic analysis*. Weinheim: Verlag Chemie. GmbH; 1983.
42. Lück H. Catalase. 2nd Ed. In: Bergmeyer HU, Editor. *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, London; 1965.
43. Aebi H. Catalase. 2nd Ed. In: Bergmeyer HU, Gawehn, K, Editors. *Methods of enzymatic analysis V2*: Verlag Chemie: Academic Press, Weinheim; 1974.
44. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J of Laboratory and Clin Med*. 1967; 70: 158-169.
45. Yagi K. A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem Med*. 1976; 15 (2): 212-216.
46. Drury RA, Wallington EA. *Carleton's Histological Techniques*, 5th Ed. Oxford University Press, New York, 1967, pp. 195.
47. Amaral GP, De Carvalho NR, Barcelos RP, Dobrachinski F, Portella RDL, Da Silva MH, Lugokenski TH, Dias GRM, Da Luz SCA, Boligon AA, Athayde ML, Villetti MA, Antunes Soares FA, Fachinatto R. Protective action of ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* L. in gastric ulcer prevention induced by ethanol in rats. *Food Chem Toxicol*. 2013; 55: 48-55.
48. Menaceur F. Composition chimique et activité biologique des huiles essentielles et extraits du romarin. Diplôme de magister. École nationale supérieur agronomique El-Harrach Alger. 2011
49. Stephanovits Banyai E, Tulok MH, Hegedus A, Renner C, Szololosi Varga L. Antioxidant effect of various Rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) clones. *Acta Biologica Szegediensis*. 2003; 47(1-4): 111-113.
50. Tavassoli S, Djomeh E. Total Phenols, Antioxidant Potential and Antimicrobial Activity of Methanol Extract of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*L.). *Global Veterinaria*. 2011; 338(4):337-341.
51. Erkan N, Ayranci G, Ayranci E. Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.). Extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chem*. 2008; 110(1): 76-82.

52. Ho SC, Tsai TH, Tsai PJ, Lin CC. Protective capacities of certain spices against peroxy-nitrite-mediated biomolecular damage. *Food and Chemical Toxicology*. 2008; 46(3):920-928.
53. Tsai P, Tsai T, Ho S. In vitro inhibitory effects of rosemary extracts on growth and glucosyltransferase activity of *Streptococcus sobrinus*. *Food Chem*. 2007; 105: 311-316.
54. Falleh H, Ksouri R, Chaieb K, Karray-Bouraoui N, Trabelsi N, Boulaaba M, Abdelly C. Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *C. R. Biologies*. 2008; 331: 372-379.
55. Podsedek A. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT Food Sci Technol*. 2007; 40:1-11.
56. Wang H, Provan GJ, Helliwell K. Determination of rosmarinic acid and caffeic acid in aromatic herbs by HPLC. *Food Chemistry*. 2004; 87(2): 307-311.
57. Koşar M, Dorman HJD, Hiltunen R. Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristics of extracts from selected Lamiaceae species. *Food chemistry*. 2005; 91(3): 525-533.
58. Durling NE, Catchpole OJ, Grey JB, Webby RF, Mitchell KA, Foo LY, Perry NB. Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol-water mixtures. *Food chemistry*. 2007; 101(4): 1417-1424.
59. Djeridane A, Yous M, Nadjemi B, Boutassouna D, Stocker P, Vidal N. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem*. 2006; 97: 654-660.
60. Dent M, Dragović-Uzelac V, Penić M, Bosiljkov T, Levaj B. The effect of extraction solvents, temperature and time on the composition and mass fraction of polyphenols in Dalmatian wild sage (*Salvia officinalis* L.) extracts. *Food technology and biotechnology*. 2013; 51(1): 84-91.
61. Tura D, Robards K. Sample handling strategies for the determination of biophenols in food and plants. *Journal of chromatography A*. 2002; 975(1): 71-93.
62. Peng Y, Yuan J, Liu F, Ye J. Determination of active components in rosemary by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *J Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2005; 39(3-4): 431-437.
63. Almela L, Sanchez-Munoz B, Fernandez-Lopez JA, Roca MJ, Rabe V. Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. *J Chromatography A*. 2006; 1120(1-2): 221-229.
64. Dorman HJD, Peltoketo A, Hiltunen R, Tikkanen MJ. Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. *Food Chem*. 2003; 83(2): 255-262.
65. Cosio MS, Buratti S, Mannino S, Benedetti S. Use of an electrochemical method to evaluate the antioxidant activity of herb extracts from the Labiatae family. *Food chemistry*. 2006; 97(4): 725-731.
66. Bruneton J. *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. 3ème Ed, Lavoisier, Paris; 1999.
67. Caillet S, Shareck F, Lacroix M. Effect of gamma radiation and oregano essential oil on murein and ATP concentration of *Escherichia coli* O157: H7. *J food protection*. 2005; 68(12): 2571-2579.
68. Caillet S, Salmiéri S, Lacroix M. Evaluation of free radical-scavenging properties of commercial grape phenol extracts by a fast colorimetric method. *Food Chemistry*. 2006; 95(1): 1-8.
69. Wojdyło A, Oszmian'ski J, Czemerys R. Antioxidant activity and phenolic compound in 32 selected herbs. *Food Chemistry*. 2007; 105(945): 940-949.
70. Vasdev SC, Subrahmany D, Charkravarti RN, Wahi PL. Effect of chronic ethanol-feeding on the major lipids of red blood cells, liver heart of rhesus monkey. 1974; 369(3): 323-330.
71. Bergheim I, Guo L, Davis MA, Lambert JC, Beier JJ, Duveau I, Luyendyk JP, Roth RA, Arteel GE. Metformin prevents alcohol-induced liver injury in the mouse: critical role of plasminogen activator inhibitor-1. *Gastroenterology*. 2006; 130(7): 2099-2112.
72. Longo MC, Lokan RJ, White JM. The relationship between blood benzodiazepine concentration and vehicle crash culpability. *J Traffic Med*. 2001; 29(1-2): 36-43.
73. Sotelo-Félix JJ, Martínez-Fong D, Muriel P, Santillán RL, Castillo D, Yahuaca P. Evaluation of the effectiveness of *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) in the alleviation of carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in the rat. *Journal of Ethnopharmacology*. 2002; 81(2): 145-154.
74. Bragagnolo N, Danielsen B, Skibsted LH. Rosemary as antioxidant in pressure processed chicken during subsequent cooking as evaluated by electron spin resonance spectroscopy. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2007; 8: 24-29.
75. Albu S, Joyce E, Paniwnyk L, Lorimer JP, Mason TJ. Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2004; 11(3-4): 261-265.
76. Debersac P, Heydel JM, Amiot MJ, Goudonnet H, Artur Y, Suschetet M, Siess MH. Induction of cytochrome P450 and/or detoxication enzymes by various extracts of rosemary: description of specific patterns. *Food and Chemical Toxicology*. 2001; 39(9): 907-918.
77. Hur YG, Yun Y, Won J. Rosmarinic acid induces p53-dependent apoptosis in Jurkat and peripheral T cells via mitochondrial pathway independent from Fas/Fas ligand interaction. *J. Immunol*. 2004; 172(1): 79-87.
78. Vermeulen NPE, Bessems JGM, Van de Streat R. Molecular aspects of paracetamol induced hepatotoxicity and its mechanism-based prevention. *Drug Metab. Rev*. 1992; 24(3): 367-407.
79. Uzun H, Simsek G, Aydin S, Unal E, Karter Y, Yelmen NK, Kaya S. Potential effects of L-NAME on alcohol-induced oxidative stress. *World Journal of Gastroenterology*. 2005; 11(4): 600-604.
80. I.P.C.S., The International Programme on Chemical Safety. Environmental health criteria (208). Carbon tetrachloride. World Health Organization, Geneva; 1999.
81. Jaiswal AK. Antioxidant response element. *Biochemical Pharmacology*. 1994; 48(3): 439-444.
82. Primiano T, Sutter T, Kensler TW. Antioxidant-inducible genes. *Advances in Pharmacology*. 1997; 38: 293-328.
83. Kumar KB, Kuttan R. Chemoprotective activity of an extract of *Phyllanthus amarus* against cyclophosphamide induced toxicity in mice. *Phytomedicine*. 2005; 12(6-7): 494-500.
84. Khatoun S, Imran M. Studies on the plant biodiversity of Hub river estuary [Pakistan]. *International Journal of Biology and Biotechnology (Pakistan)*. 2006; 2(4): 853-861.
85. Aruoma OI. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American oil chemists' society*. 1998; 75(2): 199-212.
86. Uchiyama M, Mihara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical biochemistry*. 1978; 86(1): 271-278.
87. Emerit J, Braquet M, Congy F, Clavei JP. Superoxyde dismutase erythrocytaire chez l'alcicole chronique avec lésions hépatiques. *Presse Med*. 1987; 13:1277-1278.
88. Nieto N. A systems biology approach for understanding the collagen regulatory network in alcoholic liver disease. *Liver International*. 2012; 32(2): 189-198.
89. Sha L, Hor-Yue T, Ning W, Zhang-Jin Z, Lixing L, Chi-Woon W and Yibin F. The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. *Int J Mol Sci*. 2015; 16(11): 26087-26124.



## GRAPHICAL ABSTRACT



## ABOUT AUTHORS

Pr Mokhtaria Yasmina BOUFADI, head of the research team "Biomolecules and toxicity", at the Laboratory of Bioeconomics, Food Safety and Health LBFSH (University of Mostaganem, Algeria), born on June 20th, 1982, in Saida (Algeria). A doctorate in Human Nutrition in 2014 from the Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem University (Algeria). In 2009, Dr Boufadi joined the Abdelhamid Ibn Badis University as well as a research-teacher, she joined the administration as well as head of Research-Training at the Ministry of Higher Education and Scientific Research (MESRS, Algeria).

His research team has developed research on natural substances and their applications in many consumer products.

**Cite this article:** AOUAD RF, BOUFADI MY, ADLI DEH, MOULAI-HACENE F, KAHOULA K, SLIMANI M. Chemical Composition and Protective Effect of *Rosmarinus officinalis* on Alcohol-Induced Serum Hepatic Changes and Liver Injury in Male Rats. *Pharmacogn J.* 2021;13(5): 1205-1215.