



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

CENTRE DES SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

THESE

présentée pour obtenir le diplôme de
DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE METZ
Spécialité pharmacognosie

soutenue publiquement le 17 septembre 1994
par

Claire HOEFLER, née VIGNERON

**Contribution à l'étude pharmacologique des extraits de
Rosmarinus officinalis L., et notamment des jeunes pousses :
activités cholérétiques, anti-hépatotoxiques,
anti-inflammatoires et diurétiques**

Membres du jury :

M. J.M. PELT, Professeur (président)
M. J. FLEURENTIN, Maître de Conférence (directeur de thèse)
M. G. BALANSARD, Professeur (rapporteur)
M. F. MORTIER, Professeur (rapporteur)
M. C. YOUNOS, Professeur
M. P. DORFMAN, Directeur de Recherche des Laboratoires DOLISOS

CENTRE DES SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

THESE

présentée pour obtenir le diplôme de
DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE METZ
Spécialité pharmacognosie

soutenue publiquement le 17 septembre 1994
par

Claire HOEFLER, née VIGNERON

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ	
N° inv.	1994.1685
Cote	S/M3 94/56
Loc	Magasin

**Contribution à l'étude pharmacologique des extraits de
Rosmarinus officinalis L., et notamment des jeunes pousses :
activités cholérétiques, anti-hépatotoxiques,
anti-inflammatoires et diurétiques**

Membres du jury :

M. J.M. PELT, Professeur (président)
M. J. FLEURENTIN, Maître de Conférence (directeur de thèse)
M. G. BALANSARD, Professeur (rapporteur)
M. F. MORTIER, Professeur (rapporteur)
M. C. YOUNOS, Professeur
M. P. DORFMAN, Directeur de Recherche des Laboratoires DOLISOS

A Messieurs Les Membres du Jury :

Je tiens à remercier tout particulièrement Monsieur Le Professeur Jean-Marie PELT, de m'avoir accueillie dans son laboratoire, il y a déjà quelques années, et d'avoir suivi avec patience l'évolution de ce travail. J'ai pu puiser dans le rayonnement de votre savoir, l'énergie et la volonté nécessaire à la réalisation de ce mémoire. Vous me faites un grand honneur d'accepter la présidence de ce jury et je vous en remercie.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Monsieur Le Docteur Jacques FLEURENTIN pour m'avoir suivie et guidée dans l'élaboration de cette thèse. Vous avez su m'enseigner la pharmacologie, me faire partager votre passion pour la recherche, pour l'ethnopharmacologie. Je vous remercie pour votre disponibilité, votre compétence et votre enthousiasme.

Je tiens à remercier Monsieur Le Professeur Guy BALANSARD pour avoir accepté de faire partie de ce jury et d'en être l'un des rapporteurs. Je m'en remets à votre compétence et votre rigueur scientifique.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Monsieur Le Professeur François MORTIER, pour avoir apporté sa collaboration, sa compétence, et pour tous les conseils prodigués tout au long de ce travail. Je vous remercie d'avoir accepté de faire partie de ce jury et d'en être rapporteur.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Monsieur Le Professeur Chafique YOUNOS pour avoir accepté de juger ce travail, et pour avoir apporté son savoir, sa philosophie et sa sagesse dans l'élaboration progressive de cette thèse.

Je tiens à remercier Monsieur Le Docteur Pierre DORFMAN pour avoir accepté de juger ce travail, qui représente l'un des aboutissements d'une étroite collaboration avec les laboratoires DOLISOS, qui sont à l'origine de ces travaux.

Je tiens à remercier également Monsieur Joël GUILLEMAIN de l' Institut du Médicament de Tours, pour avoir été l'initiateur du programme de recherche des Laboratoires DOLISOS sur *Rosmarinus officinalis*, ainsi que Madame DOUILLIEZ pour avoir suivi une partie de ces travaux.

Je remercie Monsieur DIERCKXENS des Laboratoires DOLISOS de Bruxelles, ainsi que Monsieur CAPOLAGHI du Laboratoire d'Analyse Médicale de l'Hopital Bel-Air de Thionville pour leur collaboration au cours de ce travail.

Je remercie tous les collègues et amis du laboratoire de Pharmacognosie, du CEREPHA, de la Société Française d'Ethnopharmacologie, du Centre des Sciences de l'Environnement et de l'Institut Européen d'Ecologie, pour leur gentillesse, leur soutien, leur bonne humeur et sans qui ce travail n'aurait pas de sens.

L'étude de *Rosmarinus officinalis* a été réalisée au laboratoire de pharmacognosie du Centre des Sciences de l'Environnement de l'Université de Metz avec la collaboration des Laboratoires DOLISOS (PARIS).

Je dédie cette thèse

A mes parents

A Frédéric

A Charles et à Louis

A Ghislaine

A Paul

A mes beaux-parents

A mes beaux-frères et belles-soeurs

A ma Famille

A Isabelle

A mes Amis

INTRODUCTION	1
PREMIERE PARTIE	4
Chap. I : Etude botanique de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	5
I. Le romarin dans la classification des végétaux	8
1. La famille des Lamiacées	
1.1. Généralités	
1.2. Filiation avec d'autres familles	9
2. Description botanique du genre <i>Rosmarinus</i>	
3. Les différentes espèces du genre <i>Rosmarinus</i>	10
3.1. Anciennes dénominations	
3.2. Le genre <i>Rosmarinus</i> d'après Med-Checklist et Flora Europaea	12
II. Noms vernaculaires	14
III. Le romarin dans la pharmacopée	15
IV. Caractéristiques anatomiques	16
1. Différentes pièces florales - Diagramme floral	
2. La feuille	17
3. La tige	18
V. Répartition géographique - Phytosociologie - Culture	18
1. Répartition géographique	
2. Phytosociologie	19
3. Culture	
 Chap. II - Utilisation traditionnelle	 20
I. Historique	21
1. En Europe et dans le bassin méditerranéen	
1.1. De l'antiquité au Moyen-Age	
1.2. Du XIII ^e au XVIII ^e siècle	
2. Au Moyen-orient, en Afrique du Nord et en Asie	23
3. En Amérique Centrale	24
II. Utilisation en médecine traditionnelle	25
1. En usage interne	
1.1. Tonique - Stimulant	
1.2. Apéritif - Stomachique - Dépuratif	
1.3. Antitussif et antispasmodique	
1.4. Ocytocique - Emménagogue	26
1.5. Diurétique	
1.6. Cholagogue et cholérétique	
1.7. Autres utilisations	27
2. En usage externe	
2.1. Antiseptique et cicatrisant	
2.2. Emménagogue	
2.3. Anti-rhumatismal - Anti-inflammatoire	
2.4. Stimulant - Revitalisant du cuir chevelu	28
2.5. Anticonceptionnel	
2.6. Antiparasitaire	
III. Spécialités actuelles à base de romarin en Phytothérapie	28
1. Indications du Ministère de la Santé	
2. Spécialités du codex	29
IV. Précautions d'usage liée à la toxicité de l'huile essentielle de <i>R.officinalis</i>	29
1. Toxicité en usage externe	
2. Toxicité en usage interne	
V. Utilisation non pharmaceutique de <i>Rosmarinus officinalis</i>	30
1. En parfumerie	
2. En alimentation	

2. En alimentation	
3. Comme antioxydant	
4. Comme insecticide, antibactérien, antifongique	31
Chap. III - Composition chimique de <i>Rosmarinus officinalis</i>	32
I. Les acides-phénols	33
II. Les flavonoïdes	35
III. Les composés terpéniques	37
1. Monoterpènes et sesquiterpènes	
1.1. Identification et composition chimique de l'huile essentielle	
1.2. Variabilité de la composition chimique de l'huile essentielle	
2. Diterpènes : lactones diterpéniques et quinones terpéniques	43
2.1. Lactones diterpéniques	
2.2. Quinones terpéniques	45
3. Triterpènes et stérols	46
3.1. Triterpènes	
3.2. Stérols	48
IV. Acides gras hydroxyles	48
V. Acides organiques	49
VI. Autres composés chimiques	49
VII. Tableau récapitulatif	50
 DEUXIEME PARTIE	 52
Introduction	53
 Chap. I - Standardisation des matériels : animaux, extraits végétaux	 54
I. Conditions d'élevage des animaux de laboratoire	55
1. Espèces utilisées	
1.1. Souris	
1.2. Rats	
2. Conditions d'élevage	
II. Les extraits de jeunes pousses de <i>R.officinalis</i>	56
1. Récolte	
2. Méthodes de fabrication des différents extraits végétaux	58
2.1. Profil général	
2.2. Solvants et temps de macération spécifiques des extraits	
2.2.1. Extrait hydro-alcoolique	
2.2.2. Extrait glycéro-alcoolique	59
2.2.3. Extrait aqueux	
3. Préparation et conservation des formes solides utilisées pour les tests pharmacologiques	59
3.1. Déshydratation et lyophilisation	
3.2. Inventaire des différents extraits et codification du matériel végétal	60
 Chap. II - Carte d'identification chimique d'un extrait de jeunes pousses de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	 61
I. Introduction	62
II. Recherche de groupes chimiques	64
1. Les polyphénols	
1.1. Tanins	
1.1.1. Procédure expérimentale	
1.1.2. Résultats	65
1.2. Acides-phénols et composés flavoniques	65

1.2.1. Procédure expérimentale	65
1.2.2. Résultats	67
2. Les composés réducteurs	69
2.1. Procédure expérimentale	
2.2. Résultats	70
3. Recherche des sels minéraux	72
3.1. Procédure expérimentale	
3.2. Résultats	
4. Recherche des saponosides	72
4.1. Procédure expérimentale	
4.2. Résultats	73
5. Recherche des composés terpéniques	73
5.1. Procédure expérimentale	
5.2. Résultats	74
III. Conclusion	79
Chap. III - Etude toxicologique des jeunes pousses de <i>R.officinalis</i>	80
I. Evaluation de la dose léthale 50	81
1. Protocole expérimental	
2. Résultats	82
3. Conclusion	
Chap. IV - Recherche d'une activité cholérétique des jeunes pousses de <i>Rosmarinus officinalis</i>	83
I. Introduction	84
1. Utilisation en médecine traditionnelle et en phytothérapie	
2. Données bibliographiques sur l'activité cholérétique de <i>R.officinalis</i>	
3. Données bibliographiques sur l'activité antispasmodique et cholagogue de <i>R.officinalis</i>	85
II. Rappels sur le mécanisme de formation de la bile	86
1. Rôle de la bile	
2. Formation de la bile	
III. Mesure de l'activité cholérétique des jeunes pousses	88
1. Procédure expérimentale	
1.1. Matériel et Méthode	
1.2. Expression des résultats	90
1.3. Analyse statistique	
2. Résultats	91
2.1.. Profil général de l'excrétion biliaire chez le rat	
2.2. Activité cholérétique de la substance de référence : DHC	94
2.3. Activité cholérétique des jeunes pousses de <i>R.officinalis</i>	
3. Discussion	96
Chap. V - Recherche d'une activité anti-hépatotoxique des jeunes pousses de <i>Rosmarinus officinalis</i>	97
I. Introduction	98
1. La pathologie hépatique	
2. Données bibliographiques sur le pouvoir antioxydant du romarin	100
3. Choix des modèles pharmacologiques pour l'intoxication hépatique	
II. Activité hépatoprotectrice des jeunes pousses de <i>R.officinalis</i> vis à vis d'une intoxication au CCl ₄ chez le rat et la souris	101
1. Procédure expérimentale	
1.1. Matériel et méthode	
1.2. Expression des résultats	104
2. Résultats	
2.1. Extraits aqueux de jeunes pousses de <i>R.officinalis</i>	

2.2. Les substances de référence : nébulisat de graines de <i>S. marianum</i> , silymarine	106
2.3. Influence de la voie d'administration sur l'activité des jeunes pousses : voie orale chez la souris	107
3. Conclusion	107
3.1. Activité hépatoprotectrice	108
3.2. Substances de référence	
3.3. Influence du traitement (préventif ou curatif)	109
3.4. Influence de la voie d'administration	109
4. Discussion	109
Chap. VI - Recherche d'une activité anti-inflammatoire des jeunes pousses de <i>Rosmarinus officinalis</i>	111
I. Introduction	112
1. Rappel du processus anti-inflammatoire	
2. Choix du modèle expérimental	114
II. Influence de l'extrait aqueux de jeunes pousses de <i>R. officinalis</i> vis-à-vis de l'oedème induit par la carragénine sur la patte du rat	115
1. Procédure expérimentale	
1.1. Matériel et méthode	
1.2. Expression des résultats	117
2. Résultats	
2.1. Témoins	
2.2. Indométacine	120
2.3. Jeunes pousses de <i>R. officinalis</i>	120
3. Discussion	120
Chap. VII - Recherche de l'activité diurétique des jeunes pousses de <i>Rosmarinus officinalis</i>	122
I. Introduction	123
1. Rappels sur la fonction rénale	
2. Choix des protocoles	125
2.1. Test en surcharge hydrique	
2.2. Test en chronique	
II. Mesure de l'activité diurétique par le test en surcharge hydrique chez le rat	125
1. Procédure expérimentale	
1.1. Matériel et méthode	
1.2. Expression des résultats	126
1.3. Analyse statistique	127
2. Résultats	
2.1. Furosémide	
2.2. Hydrochlorothiazide	
2.3. Jeunes pousses de <i>R. officinalis</i>	129
3. Conclusion - Discussion	131
III. Mesure de l'activité diurétique par le test en chronique chez le rat	132
1. Procédure expérimentale	
Matériel et méthode	
2. Résultats	133
3. Discussion	
IV Conclusion	134
Chap. VIII - Etude comparative des jeunes pousses et des sommités fleuries de <i>Rosmarinus officinalis</i>	135
Introduction	136
I. Comparaison de l'activité pharmacologique des jeunes pousses et des sommités fleuries	137

1. Activité cholérétique	137
2. Activité hépatoprotectrice	139
3. Activité anti-inflammatoire	140
II. Conclusion	142
 Chap. IX - Relation : Structure / Activité	 143
 Chap. X - Conclusion	 146
 BIBLIOGRAPHIE	 I à XII

INTRODUCTION

La médecine traditionnelle et le monde végétal vivent en étroite communion, car elle y puise toute sa matière première pour confectionner ses remèdes. Seulement, pour que ces drogues entrent au sein de la médecine occidentale, elles doivent s'affranchir d'une expérimentation pharmacologique afin de vérifier leur activité et d'en garantir leur innocuité (bien que la toxicité d'une plante ne soit pas un facteur de sélection).

Parmi l'inventaire des plantes médicinales, nous avons choisi d'étudier *Rosmarinus officinalis* L. pour l'originalité de sa prescription actuelle, en gemmothérapie où les jeunes pousses sont utilisées en macérat glycéro-alcoolique.

Rosmarinus officinalis L., fait partie des plantes médicinales qui sont en usage depuis l'Antiquité et qui, au travers des siècles, a su garder une place dans l'inventaire des remèdes des tradipraticiens de tout le bassin méditerranéen. On la place dans la catégorie des plantes dépuratives pour son action sur le système digestif et urinaire, des plantes stimulantes pour son huile essentielle. Elle aurait également des vertus anti-rhumatismale et anti-oedémateuse.

C'est une plante qui a une destinée féminine puisqu'elle s'utilise dans les phases qui entourent la naissance (ocytocique, emménagogue). Les femmes s'en servent également comme épice pour la préparation des repas et la conservation des aliments (graisses, viandes).

Aujourd'hui, le romarin est entré dans la médecine moderne par le biais de spécialités de nature phytothérapique où il apparait souvent en association avec d'autres plantes, et par le biais de la gemmothérapie qui préconise l'usage des jeunes pousses dans les "insuffisances hépatiques".

Notre travail débutera par une étude bibliographique qui nous permettra d'identifier *R. officinalis* par ses caractères botaniques, par son utilisation en médecine traditionnelle, et par sa composition chimique. Puis il se poursuivra par une étude des propriétés pharmacologiques qui permettra d'infirmier ou de confirmer les nombreux usages traditionnels de *R. officinalis* à l'aide de tests pharmacologiques chez l'animal, en regard de ses fonctions "dépuratives et de drainage" et de son utilisation dans la conservation des

aliments. L'originalité de cette étude sera de mettre en avant l'usage des jeunes pousses . Les tests pharmacologiques permettront de rechercher l'existence d'effets hépatotropes, anti-inflammatoires et diurétiques des jeunes pousses.

Pour mettre en évidence une activité hépatotrope, nous nous sommes orientés sur deux domaines complémentaires : l'évolution de la cholérèse sur l'animal sain (rat) et l'activité hépatoprotectrice sur l'animal intoxiqué (rat et souris). L'intérêt thérapeutique d'une substance cholérétique n'étant pas suffisant actuellement, les modèles hépatoprotecteurs *in vivo* permettront d'apporter des précisions supplémentaires quant aux mécanismes d'actions des extraits. Le toxique utilisé pour ces modèles hépatoprotecteurs est le tétrachlorure de carbone qui induit une hépatite dont la phase nécrotique est évaluée par le dosage des transaminases plasmatiques.

La technique sélectionnée pour l'étude de l'activité anti-inflammatoire est un modèle d'inflammation aigüe de la patte du rat, induite par la carragénine. La mesure de l'oedème induit par la carragénine rend compte de la potentialité anti-inflammatoire de l'extrait.

Enfin, l'activité diurétique sera quantifiée par l'étude sur deux modèles pharmacologiques : l'un en aigü chez le rat en situation de surcharge hydrique , l'autre en chronique (sur 15 jours) chez le rat en situation normale. L'effet diurétique est apprécié par la mesure de l'excrétion urinaire.

Notre objectif final sera de comparer l'activité pharmacologiques des jeunes pousses et de la drogue (les sommités fleuries) et d'en dégager la supériorité de l'une ou l'autre de ces parties de la plante (HOEFLER et coll., 1987, FLEURENTIN et coll., 1987).

Première partie

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE DE *ROSMARINUS OFFICINALIS*

CHAPITRE I : Etude botanique

CHAPITRE II : Utilisation traditionnelle

CHAPITRE III : Composition chimique

CHAPITRE I

ETUDE BOTANIQUE DE *ROSMARINUS OFFICINALIS* L.



FIGURE 1 : Cliché *PLANTAE MEDICINALES* - *Rosmarinus officinalis* L. Ossicineller
 Pflanzen, Dr Th. SR. L. Nees von Eisenbeck, éd. Düsseldorf, 1829.

***ROSMARINUS OFFICINALIS* dans la classification des végétaux**

Embranchement : Spermaphytes

Sous-Embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Sous-Classe : Gamopétales

Ordre : Tubiflorales

Sous-Ordre : Lamiales

Famille : Lamiacées

Genre : *Rosmarinus*

Espèce : *officinalis*

I. LE ROMARIN DANS LA CLASSIFICATION DES VEGETAUX

1. La famille des Lamiacées

1.1 Généralités (BONNIER, 1934)

La famille des Lamiacées compte 2700 espèces réparties en 31 genres. D'après BOELENIS (1985), on compterait jusqu'à 200 genres et environ 3500 espèces. Les plantes de cette famille sont herbacées (ou plus ou moins ligneuses), à feuilles opposées sans stipule, à tige quadrangulaire et à fleurs irrégulières et gamopétales disposées en grappes (parfois d'apparence verticillée, en épis ou en capitule). La plante est couverte de poils glanduleux renfermant une huile essentielle.

Le calice persistant, à 5 divisions (rarement 3 à 12), est soit régulier, soit disposé en 2 lèvres.

La corolle est constituée de pétales soudés entre eux qui forment 2 lèvres :

- * la lèvre supérieure est entière ou échancrée
- * la lèvre inférieure comporte 3 lobes (rarement 5).

Les étamines au nombre de 4 (rarement 2), dont les 2 plus grandes sont soudées à la corolle, possèdent des anthères à 2 loges (rarement 1). Celles-ci s'ouvrent dans la largeur (rarement par une fente en arc).

L'ovaire a 2 carpelles divisés en 2 parties, d'où semble sortir le style. Celui-ci se termine par un stigmate divisé en 2 parties.

Le fruit est un tétrakène, se dissociant à maturité en 4 méricarpes indéhiscent renfermant chacun 1 graine sans albumen (ou très peu).

Ces caractères ainsi définis pour la famille des Lamiacées, présentent des variations en fonction des différents genres. Ces genres sont classés en 9 groupes suivant des détails anatomiques communs. Ainsi les genres *Rosmarinus* et *Salvia* forment un groupe et possèdent le caractère commun de n'avoir que "2 étamines" (les 2 autres étant stériles).

1.2. Filiation avec d'autres familles (BONNIER, 1934)

Les Lamiacées ont avec les Borraginacées des affinités liées au fruit et à la corolle. Leur fruit est un tétrakène et la corolle est gamopétale.

Les Lamiacées offrent aussi par la symétrie de la corolle, le nombre et la disposition des étamines, des ressemblances avec la famille des Scrophulariacées bien différente par la constitution du fruit.

2. Description botanique du genre *Rosmarinus*

(BONNIER, 1934 ; GARNIER et coll., 1961 ; FOURNIER, 1948)

* C'est un arbuste à feuilles persistantes pouvant atteindre 2 m de haut, à nombreux rameaux dressés ou quelquefois prostrés (variété *prostratus*).

* Les feuilles sessiles et opposées, sont étroites et coriaces, à bords enroulés en dessous, vertes à la face supérieure, velues et blanchâtres à la face inférieure.

* Les fleurs bleu lavande à blanches (variété *albiflorus*) sont disposées en courtes grappes à l'aisselle des feuilles, sur la partie supérieure des rameaux. Sous climat méditerranéen, la floraison a lieu presque toute l'année.

Le calice, d'aspect pulvérulent, présente un tube campanulé à 3 divisions dont la plus large est la lèvre supérieure.

La corolle : son tube, plus long que le calice, s'élargit sur 2 lèvres inégales :

- la lèvre supérieure à 2 lobes
- la lèvre inférieure à 3 lobes dont le médian est plus développé et concave.

L'androcée comporte 4 étamines dont 2 sont stériles et réduites à des crochets. Les 2 autres, saillantes, sont insérées sur la gorge par leur filet muni d'une petite dent. Ces 2 étamines ont des anthères allongées uniloculaires et déhiscentes par une seule fente.

Le gynécée se compose d'un style se terminant par un stigmate qui se développe souvent après les étamines. L'ovaire a 2 carpelles divisé en 2 parties.

Le fruit est un tétrakène brun dont chaque partie renferme un seul embryon sans albumen.

* L'huile essentielle : la plante dégage une agréable odeur rappelant l'Encens (d'où l'origine de l'un de ses noms vernaculaires "Encensier"), provenant de l'huile essentielle élaborée au niveau du calice et des feuilles par des poils sécréteurs glanduleux à tête

unicellulaire (face inférieure et supérieure) et à tête octocellulaire (face inférieure seulement).

* Le nectaire : la masse nectarifère est abondante, et les abeilles qui butinent les fleurs de romarin élaborent un miel parfumé appelé miel de Romarin ou "miel de Narbonne".

* Les racines sont ramifiées.

3. Les différentes espèces du genre *Rosmarinus*

3.1. Anciennes dénominations

La systématique du genre *Rosmarinus* n'a pas toujours été homogène, ce qui se traduit par de nombreux noms d'espèces cités par les auteurs et qui ne sont pas tous en usage actuellement.

*Des auteurs allemands et italiens (HEINZ A. HOPPE, 1975 ; FALCHI DELITALA et SOCCOLINI, 1980) mentionnent 4 espèces répertoriées surtout en Afrique du Nord :

Rosmarinus chilensis (Dumont, Bosc)

Rosmarinus laxiflorus

Rosmarinus lavandulaceus

Rosmarinus tournefortii (De Noe)

*Ces mêmes auteurs se basent actuellement sur la classification de TURRILL (1920) qui ne comprend qu'une seule espèce, mais plusieurs variétés et formes, répertoriées dans la région méditerranéenne :

Rosmarinus officinalis L.

variétés

genuina

formes *typica* Turrill

erectus Pascq.

humilis Ten.

albiflorus Beg.

rigidus Car. e S. Lag.

angustifolius Guss.

latifolius Beg.

pubescens Pamp.

typica Pamp.

roseus Pamp.

*La flore d'U.R.S.S. (KOMAROV, 1976) cite 4 espèces du genre *Rosmarinus* (sans autre précision), qui sont les suivantes :

Rosmarinus angustifolius Mill. Gard. Dict. edVIII (1758)

Rosmarinus latifolius Mill. l. c. (1758)

Rosmarinus officinalis vulgaris A lefel. Landwirt. FL ; (1860)

Rosmarinus officinalis variété *genuina* Turrill in Kew Bull (1920)

*KRÜSSMANN (1962), un auteur allemand, cite les 2 espèces suivantes :

Rosmarinus lavandulaceus De Noe ex Balansa

Rosmarinus officinalis L.

variétés	<i>albiflorus</i>
	<i>angustifolius</i>
	<i>erectus</i>
	<i>prostratus</i>
	Benenden (hybride)

*Dans le dictionnaire des plantes cultivées aux Etats-Unis et au Canada (Hortus third, BAILEY et BAILEY, 1976), une seule espèce est citée avec des variétés originales correspondant à des hybrides :

Rosmarinus officinalis

variétés	<i>albus</i>
	<i>prostratus</i>
	Collingwood Ingram (hybride)
	Lockwood de Forest (hybride)
	Tuscan blue (hybride)

*Un ouvrage italien (Piante aromatiche e medicinali, 1969) établit une liste de variétés hybrides de l'espèce :

Rosmarinus officinalis

variétés	<i>angustifolius</i> benenden blue
	<i>erectus albus</i>
	<i>prostratus</i>
	<i>pyramidalis</i>
	jessup's upright
	mountfort's form
	severn sea

*La flore BONNIER (1934) ne décrit qu'une seule espèce et deux variétés :

Rosmarinus officinalis variétés *tenuifolius* G.B.

synonyme : *R. tenuifolius* Jordan et Fourreau
latifolius G.B.

synonymes : *R. latifolius* Mill.

R. flexuosus Jordan et Fourreau

3.2. Le genre *Rosmarinus* d'après MED-CHECKLIST (1986) (GREUTER et coll., 1986) et FLORA EUROPAEA (1972) (TUTIN et coll., 1972)

Nous prendrons ces 2 ouvrages comme les références actuelles pour la flore méditerranéenne. Ils décrivent principalement 2 espèces :

Rosmarinus officinalis et *Rosmarinus eriocalix*

***Rosmarinus officinalis* L., Sp. Pl. : 23. (1753) :**

Plante aromatique pouvant atteindre 2 mètres de haut, à branches brunes dressées vers le haut ou rarement courbées vers le bas. Feuilles sessiles de 15 à 40 mm de long sur 1,2 à 3,5 mm de large, droites, coriaces, à bords enroulés, d'un vert brillant et rugueux sur la face supérieure, blanches et velues sur la face inférieure. Pédoncule velu ; calice de 3 à 4 mm, vert ou violacé et quelque fois velu lorsqu'il est jeune ; calice de 5 à 7 mm, glabre et veiné plus tardivement. Corolle de 10 à 12 mm, bleu pâle (rarement rose ou blanche). Fruits bruns.

Présent sur sol sec. D'origine méditerranéenne étendue au Portugal et au nord-ouest de l'Espagne ; cultivé dans d'autres pays pour l'ornement et pour son huile essentielle. Présent et indigène au Portugal, en Espagne, dans les îles Baléares, en France, en Corse, en Sardaigne, à Malte, en Sicile, en Italie, en ex-Yougoslavie, en Grèce, dans les îles de l'Egée orientale, en Turquie d'Asie, à Chypre, en Libye, en Tunisie, en Algérie et au Maroc. En culture en Albanie, aux Açores, en Bulgarie, en Suisse et ex-URSS (Crimée). Non détecté en Israël, en Jordanie, en Egypte et dans le Sinaï.

Deux synonymes :

Rosmarinus lavandulaceus De Noé in Balansa, Pl Algérie 1852: n°444. 1852[in sched].

Rosmarinus laxiflorus De Noé in Balansa, Pl. Agérie 1852: n°443. 1852 [in sched.]

Il existe également une sub-espèce (présente et indigène aux Baléares) :

Rosmarinus officinalis subsp. *palau* (O. Bolos et Molinier) Malagarriga,

Subsp. Var. Geogr. : 23. 1973

synonyme : *Rosmarinus officinalis* var. *palau* O. Bolos et Molinier in Colect.

Bot. (Barcelona) 5: 757. 1959 [basion].

***Rosmarinus eriocalix* Jordan et Fourr., Brev. Pl. Nov. 1 : 44. (1866)**

Plante aromatique pouvant atteindre 2 mètres de haut, à branches grises habituellement courbées vers le bas. Feuilles de 5 à 15 mm de long sur 1 à 2 mm de large, glabres et vertes, ou grisâtres et velues ; présence de poils sur le pédoncule, calices présentant à la fois des poils sécréteurs glanduleux unicellulaires et octocellulaires. Présent sur terrain calcaire et rocheux. Présent et indigène en Espagne, au Maroc et en Algérie.

Synonyme :

Rosmarinus tournefortii (Murb.) Jahandiez et Maire, Cat. Pl. Maroc: 620. 1934

Il existe également deux sub-espèces :

Rosmarinus eriocalix subsp. *eriocalix*

Rosmarinus eriocalix subsp. *tomentosus* (Huber-Morath et Maire) Fernandez Casas
in Cuad. Ci. Biol. 2 : 40. 1973

synonyme : *Rosmarinus tomentosus* (Huber-Morath et Maire)

in Bull. Soc. Hist. Nat. Afrique N. 31 : 79. 1940 [basion].

D'un point de vue pratique, on distinguera rapidement ces deux espèces : *R. officinalis*
R. eriocalix

par le port de la plante et la taille des feuilles, notamment :

l'une, *R. officinalis* a un port dressé, des feuilles longues de 40 mm et assez larges ; elle est largement répartie dans le bassin méditerranéen ;

l'autre, *R. eriocalix*, a un port courbé et des feuilles plus courtes (15 mm) et plus étroites, et sa répartition géographique est limitée à l'Espagne, au Maroc et à l'Algérie.

II. NOMS VERNACULAIRES (GARNIER et coll., 1961)

Rosmarinus du latin Rose de la mer. Cette étymologie est controversée : en fait "ros" viendrait d'un nom du latin dérivant de *rhus* "rhous=sumac" qui rappelle l'aspect d'arbrisseau de la plante (DELAVERGNE, 1987).

France	romarin, encensier, herbe aux couronnes, herbe aux troubadours en provence : roumaniéou en catalan : romari	
Allemagne	Rosmarin, Weihrauchkraut, Bodekraut	
Angleterre	rosemary, old man	
Espagne	romero	
Italie	rosmarino, taesmarino	
Belgique	rosmarijn (flamand)	
Grèce	dendrolibano	
Inde	rusmari	
Chine	mi tie hiang (ROI, 1955)	
Afrique du Nord (DUCROS, 1930)	iklil el jabal	Couronne de montagne
	Hashishat el Iklil	Plante de la couronne
	klil ou ikilil ou aklil	(LEMORDANT et coll., 1977)
	iazir ou azir ou yiazir	(dans le sud tunisien et algérien) (BOUCHAT, 1956)

III. LE ROMARIN DANS LA PHARMACOPEE

Monographies de *R. officinalis* L. de la pharmacopée française : (X^{ème} édition, 1989)

*la drogue :

La partie utilisée du romarin est constituée par la sommité fleurie séchée de *Rosmarinus officinalis* L. Le romarin contient au minimum 1,5 pour cent V/m d'huile essentielle.

CARACTÈRES

Le romarin possède une odeur caractéristique et une saveur fortement aromatique.

La tige ligneuse et les rameaux sont subcylindriques. Les feuilles persistantes, opposées, linéaires, sessiles sont coriaces, enroulées sur les bords ; la face supérieure de la feuille est glabre et chagrinée, de teinte vert sombre ; la face inférieure, blanche, tomenteuse, est parcourue par une nervure médiane saillante. L'inflorescence spiciforme porte en toute saison des fleurs subsessiles. Le calice, gamosépale, bilabié en forme de cloche, pubescent, possède seulement 3 lobes ; la corolle, gamopétale, longuement tubuleuse, est bilabiée ; elle présente une lèvre supérieure en forme de casque à 2 lobes et une lèvre inférieure à 3 lobes dont le médian est concave, très élargi ; elle est bleu pâle, blanc lilas ou blanchâtre, maculée de petites taches violettes à l'intérieur ; il n'y a que 2 étamines ; les anthères sont allongées à une seule loge, s'ouvrant par une seule fente.

Examinée au microscope, la coupe transversale de la feuille est constituée par un épiderme supérieur glabre, à cellules polygonales, aplaties, sans stomates, qui recouvre un tissu palissadique. Le mésophylle à cellules polygonales entoure des faisceaux libéro-ligneux, représentés par un cordon ligneux, arqué, recouvert à la partie inférieure par un liber et un péricycle fibreux. L'épiderme inférieur à cellules sinueuses est caractérisé par la présence de stomates, toujours accompagnés de 2 cellules annexes, de poils tecteurs, pluricellulaires, ramifiés et par des poils glanduleux, octocellulaires.

Examiné au microscope, le romarin pulvérisé (300), vert-jaune, se caractérise par la présence de plusieurs types de poils : des poils tecteurs, pluricellulaires, ramifiés, des poils sécréteurs à pied monocellulaire et à tête unicellulaire ou bicellulaire, et des poils sécréteurs, octocellulaires. Ces poils ou fragments de poils sont soit libres, soit fixés sur les fragments de l'épiderme inférieur caractérisés par des cellules sinueuses et des stomates accompagnés de 2 cellules annexes. Les grains de pollen sont ronds, à exine lisse.

IDENTIFICATION

- Le romarin présente les caractères macroscopiques des feuilles et des fleurs précédemment décrits.
- Examiné au microscope, le romarin pulvérisé (300) présente les caractères microscopiques précédemment décrits.

****R. officinalis* pour préparations homéopathiques : la drogue est constituée par les rameaux fleuris frais de *R. officinalis* L..**

Le romarin n'est pas répertorié dans la pharmacopée européenne.

ESSAI

Éléments étrangers (V.4.2). Le taux des éléments étrangers n'est pas supérieur à 2,0 pour cent.

Chromatographie. Opérez par chromatographie sur couche mince (V.6.20.2) en utilisant une plaque recouverte de gel de silice G R.

Solution à examiner. Dissolvez 20 µl d'huile essentielle obtenue au cours du dosage dans 1 ml d'hexane R.

Solution témoin. Dissolvez 5 mg de bornéol R, 5 mg d'acétate de bornyle R et 10 µl de cinéole R dans 1 ml d'hexane R.

Déposez séparément sur la plaque, en bandes de 20 mm sur 3 mm, 10 µl de chaque solution. Développez sur un parcours de 10 cm avec du chlorure de méthylène R. Laissez sécher la plaque à l'air. Effectuez un 2^e développement dans la même direction sur un parcours de 10 cm avec du chlorure de méthylène R. Laissez sécher la plaque à l'air pendant quelques minutes. Pulvérisez de la solution d'aldéhyde anisique R. Chauffez la plaque à 105-110 °C pendant 10 min à 15 min. Examinez à la lumière du jour. Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente 3 taches principales semblables quant à leurs positions et leurs colorations aux taches principales du chromatogramme obtenu avec la solution témoin correspondant respectivement, de bas en haut, au bornéol (gris-bleu), au cinéole (gris-brun) et à l'acétate de bornyle (gris-bleu). Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente, en outre, 3 taches : une, rouge brique, située en dessous du bornéol, une autre, rouge carmin, située entre le cinéole et l'acétate de bornyle et une autre, verte, située entre le bornéol et le cinéole.

Teneur en eau (V.6.10). Déterminée par entraînement, la teneur en eau du romarin pulvérisé n'est pas supérieure à 10,0 pour cent.

Cendres totales (V.3.2.16). Déterminé sur 1,00 g de romarin pulvérisé, le taux des cendres totales n'est pas supérieur à 12,0 pour cent.

DOSAGE

Effectuez le dosage des huiles essentielles dans les drogues végétales (V.4.5.8). Utilisez 25,0 g de romarin contusé, un ballon de 1 000 ml et 300 ml d'eau comme liquide d'entraînement. Distillez à un débit de 2 ml à 3 ml par minute pendant 3 h.

CONSERVATION

En récipient bien fermé, à l'abri de la lumière et de l'humidité.

IV. CARACTERISTIQUES ANATOMIQUES

1. Différentes pièces florales - Diagramme floral

Romarin officinal. 151.

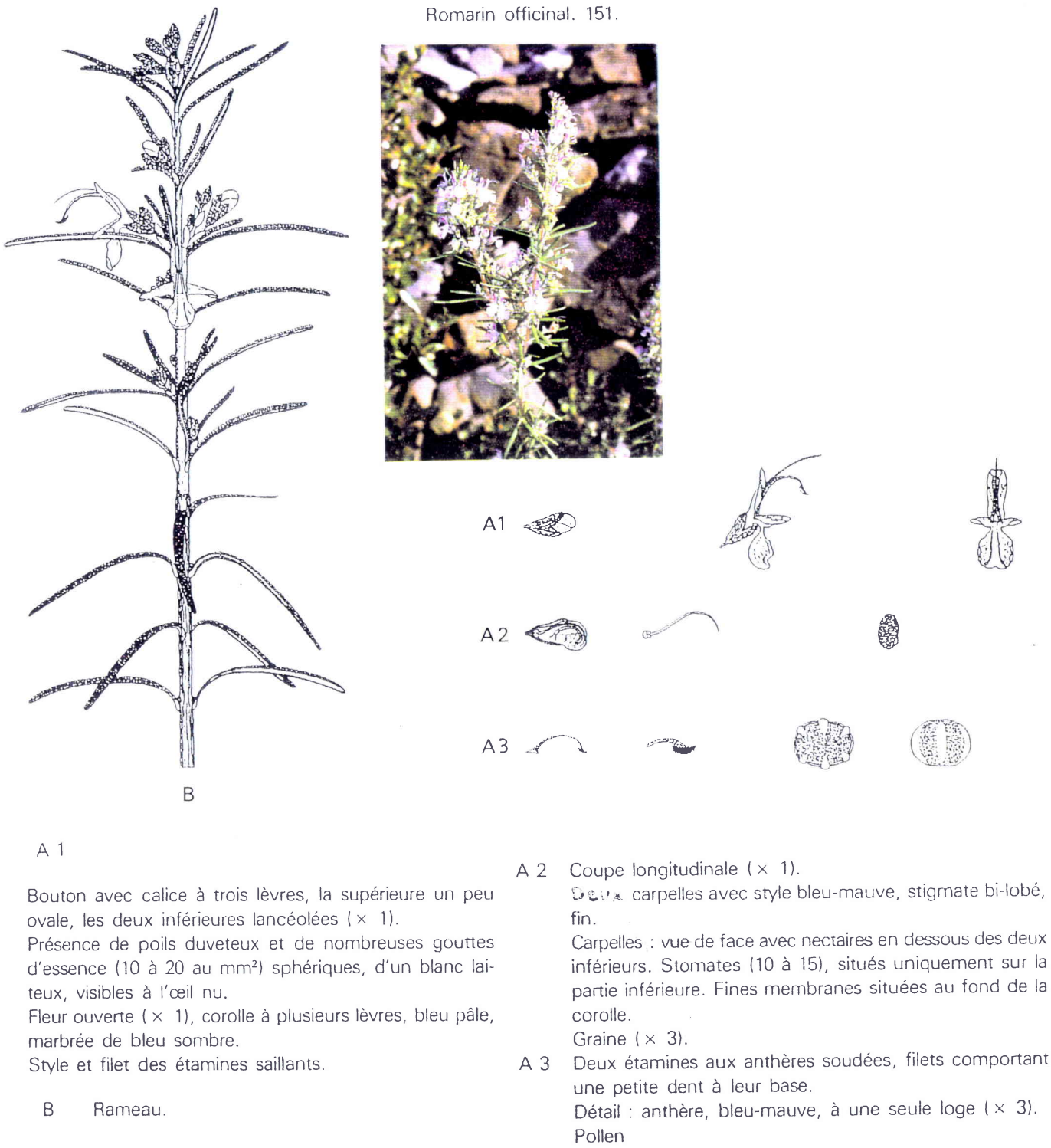


FIGURE 2 : Différentes pièces florales de *R. officinalis* d'après BARACETTI (1986)

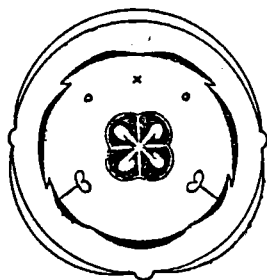


FIGURE 3 : Diagramme floral de
R. officinalis (d'après GARNIER
et coll., 1961)

La formule florale est la suivante : $5S + 5P + 2E + 2C$

2. La feuille

La structure de la feuille est adaptée à la sècheresse par sa cuticule épaisse sur la face supérieure et sa forme à bords enroulés vers l'intérieur. L'épiderme inférieur est peu cutinisé, et riche en stomates. La présence de poils tecteurs (de type "candélabre") sur la face inférieure limite la perte d'eau par évaporation (figure 4).

La feuille possède des poils sécréteurs glanduleux sur les 2 épidermes. Un hypoderme est présent sous l'épiderme supérieur. La nervure médiane est saillante sur la face inférieure.

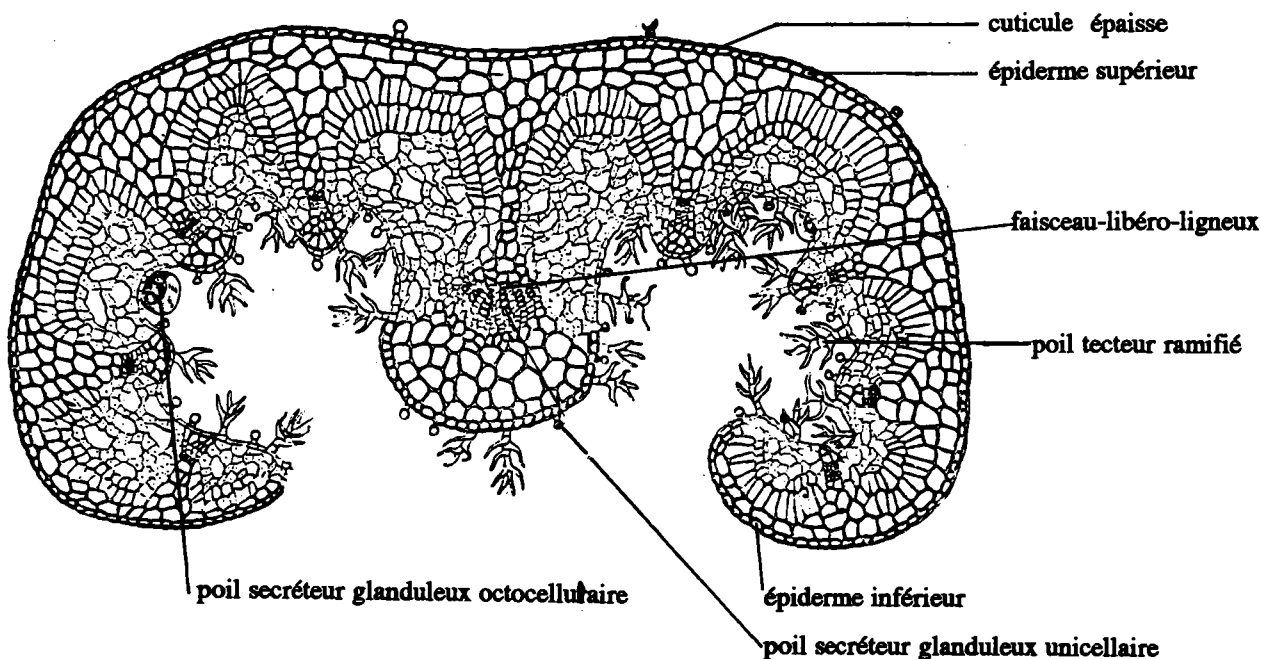


FIGURE 4 : Coupe transversale de la feuille de *R. officinalis* d'après BALANSARD (1953)

3. La tige

La tige est sub-cylindrique et présente quatre bosses peu marquées, remplies de collenchyme qui apparaît sous un épiderme net, muni d'une épaisse cuticule jaune verdâtre et de nombreux poils. Un peu plus en profondeur, des îlots de sclérenchyme constituent les fibres péricycliques. Un peu plus en profondeur, des îlots de sclérenchyme constituent les fibres péricycliques. Un peu plus en profondeur, des îlots de sclérenchyme constituent les fibres péricycliques. Un peu plus en profondeur, des îlots de sclérenchyme constituent les fibres péricycliques.

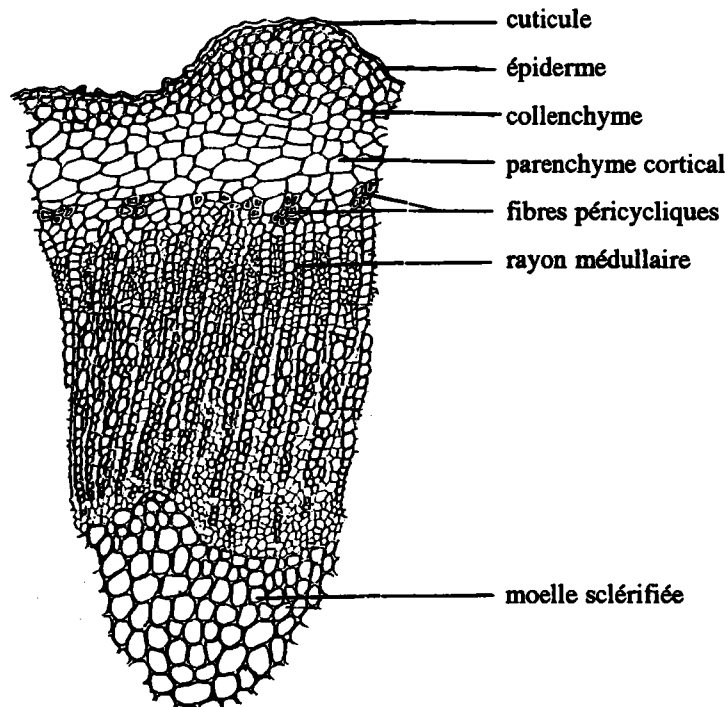


FIGURE 5 : Coupe transversale de la tige de *R. officinalis* : détail
(d'après BALANSARD, 1953)

V. REPARTITION GEOGRAPHIQUE - PHYTOSOCIOLOGIE - CULTURE

1. Répartition géographique

R. officinalis est une plante spontanée de tout le bassin méditerranéen et plus particulièrement du littoral qui demande un sol calcaire, de faible altitude, ensoleillé et modérément sec. De par ces exigences, elle est indigène des pays méditerranéens tels que, Italie, Espagne, Tunisie, Maroc, Algérie, Ex-Yougoslavie, Albanie, Egypte, Palestine, Grèce, Chypre et jusqu'en Asie mineure, au Portugal, au nord ouest de l'Espagne (Flora of

Turkey, 1982, (DAVIS, 1982) ; Flora Europaea, 1972 (TUTIN et coll., 1972) ; Med-Checklist, 1986 (GREUTER et coll., 1986)).

En France, elle est abondante dans les garrigues du Midi (Provence, Languedoc, Pyrénées orientales, Corse).

2. Phytosociologie (communication personnelle DEXHEIMER)

La garrigue à romarin (*Rosmarino ericion*) se développe sur des sols meubles où l'on trouve peu de plantes annuelles, alors qu'habituellement un sol meuble est favorable à celles-ci.

En effet, le romarin fait partie des espèces qui libèrent dans le sol une substance qui empêcherait le développement des thérophytes (plantes annuelles).

3. Culture

Il est fréquemment cultivé dans les jardins comme plante d'ornement ; les feuilles sont utilisées comme condiment. De par son utilisation en médecine traditionnelle, en parfumerie et comme épice, *R. officinalis* est cultivé dans les pays suivants qui l'utilisent pour la production d'huile essentielle : Algérie, France, Grèce, Italie, Maroc, Portugal, Russie, Espagne, Tunisie et Ex-Yougoslavie (PERROT, 1947 ; BOELEN, 1985). La production mondiale d'huile essentielle de romarin a été estimée à 5 millions de dollars pour l'année 1989 (VERLET, 1991). La culture nécessite des terrains bien ensoleillés et abrités des vents violents, sur une terre sèche et légère préparée par de profonds labours. La récolte de la plante se fait habituellement de Mai à Septembre pendant la floraison.

Son aire de répartition s'est étendue à d'autres pays et régions où la plante s'est acclimatée par le biais des cultures ; c'est pourquoi on trouve le romarin dans le sud californien comme plante de haie, le long de la côte pacifique et dans le Nord de la Basse Californie (péninsule) et le Mexique (WINKELMAN, 1986), ainsi qu'en Ex-U.R.S.S. (Crimée et Caucase) (KOMAROV, 1976) et en Inde (CHOPRA et coll., 1956) où le romarin est cultivé dans les jardins. On le trouve également au Paraguay, où il fait partie des plantes médicinales (ARISAWA et coll., 1987), et à Cuba.

Certaines variétés peuvent s'adapter à la taille du bonsaï, à l'agrément de jardins suspendus (DUKE et AYENSU, 1985).

CHAPITRE II

UTILISATION TRADITIONNELLE

I. HISTORIQUE (FOURNIER, 1948 ; DELAVEAU, 1987)

1. En Europe et dans le bassin méditerranéen

1.1. De l'antiquité au Moyen-Age

Déjà connu dans l'Antiquité, les Anciens attribuaient au romarin le symbole de l'amour, de la fidélité et du mariage. Il figurait également dans le culte des morts au même titre que le Cyprès. Il améliorait la mémoire et les jeunes gens s'en tressaient les cheveux.

Prosper Alpin (XVI^e siècle) a découvert des rameaux de romarin dans un tombeau de l'Egypte Ancienne (2000 ans av. J.C.). Le romarin apparaît parmi d'autres plantes alimentaires sur des papyrus et des peintures murales à Louxor (vers 1400 av.J.C.) (DELAVEAU, 1987).

En Grèce, Théophraste (IV^e siècle av. J.C.), philosophe et disciple d'Aristote, ne mentionne pas cette plante dans "l'Histoire des plantes". Le romarin apparaît dans la Rome antique vers le 1^{er} siècle de notre ère avec Pline l'Ancien (auteur d'"Histoire naturelle") et avec Dioscoride qui inventorie plus de 519 espèces de plantes. Archigènes en tire une huile par décoction.

On trouve des traces de la culture du romarin en Europe, dès les VI^e et VII^e siècles après J.C. ; il est effectivement mentionné dans le "*Capitulaire de Villis et curtis imperialibus*" (tables des lois des rois Mérovingiens et Carolingiens) où il fait partie des "88 plantes à cultiver dans les domaines impériaux". Il figure aussi sur le plan du monastère de Saint-Gall (VIII^e siècle après J.C), l'un des premiers centres intellectuels de l'Europe. Il servait à aromatiser les vins qui étaient alors fortement parfumés (anis, hysope, absinthe, romarin, myrthe).

Le romarin était cultivé en Angleterre avant la conquête des Normands (XI^e siècle), et son emploi est recommandé dans un herbier anglo-saxon de cette époque (GIRRE, 1985).

1.2. Du XIII^e au XVIII^e siècle

Arnauld de Villeneuve (fin du XIII^e siècle), médecin et alchimiste catalan qui étudia l'alcool obtint le premier l'essence de romarin en solution alcoolique ; l'huile essentielle fut distillée pour la 1^{ère} fois en 1330.

Un siècle plus tard, en 1370, apparaissait "l'Eau de la Reine de Hongrie" dont la composition est la suivante :

* 3 parties d'alcoolat de romarin pour une partie d'alcoolat de lavande (alcoolat : distillat de fleurs dans l'alcool) (FOURNIER, 1948). VALNET (1980) donne une autre composition tout à fait différente de la première qui est la suivante : distillat de cèdre, romarin et térébenthine.

Cette préparation aurait guéri la reine Isabelle de Hongrie âgée de 72 ans, de ses rhumatismes et de la goutte et lui aurait rendu ainsi "jeunesse et beauté".

Au XV^e siècle, John Philip de Liguamine (écrivain) reconnaît le romarin comme condiment ordinaire des viandes salées (GIRRE, 1985).

Au XVI^e siècle, le romarin était utilisé contre la jaunisse et il guérissait "la paralysie et toutes sortes de maladies cérébrales".

Guillaume de Busnel, poète et apothicaire de la Renaissance écrivit :

**"Manger souventes foyes"
"Du romarin qu' est tant courtoi"**

Ambroise Paré le reconnaît comme "fort propre à accouster les viandes et faire les sausses".

Sous Henri IV et Louis XIII, la mode fut aux gants parfumés de lavande et de romarin. Puis à cette époque naissait "l'Eau admirable", ancêtre de notre "Eau de Cologne" où le romarin était associé à la canelle et à la lavande.

Le romarin entre dans la formule de l'"Elixir de vie" de Mattioli (médecin siennois de la Renaissance), élixir qui ne contient pas moins de 22 plantes (le romarin y représente 5% de la teneur en plante) (DELAVEAU, 1987).

A la fin du XVI^e siècle, dans le théâtre de Shakespeare, c'est un rameau de romarin que Roméo jette sur le corps de Juliette et le romarin est cité dans les versets d'Ophélie comme l'herbe de la mémoire.

Au XVII^e siècle, le romarin est connu des poètes et des cuisiniers : il agrmente la cuisson des truffes selon Bonnefous (valet du roi Louis XIV), et dans le comte de Charles

Perrault "La Belle au Bois Dormant", c'est avec de "l'eau de la Reine de Hongrie" que l'on frotte les tempes de la princesse .

Au XVIII^e siècle, la Marquise de Sévigné s'"enivre" de cette eau de jouvence (Eau de la Reine de Hongrie) et la trouve "excellente contre la tristesse".

Au cours de l'épidémie de peste de 1720-1721 à Marseille, 4 hommes se protégèrent de la maladie en s'enduisant les mains et les tempes avec une mixture riche en épices et en drogues odorantes parmi lesquelles on trouve le romarin (formule encore inscrite au Codex 1884)

Le romarin est cité par de nombreux auteurs classiques dans des chansons et des ballades populaires :

"à l'entour de sa tombe, romarin l'on planta"
"sur la plus haute branche, le rossignol chanta"

2. Au Moyen-Orient, en Afrique du Nord et en Asie

Le romarin est cité en médecine islamique comme étant bon pour le mal de tête, les abcès, les piqûres de scorpions et l'épilepsie et pouvant expulser le pus des ulcères (d'après MUWAFQAQ-AL-DIN ABU MANSUR ALI AL-HERAWI, 971-987) et il posséderait également des propriétés anti-inflammatoire, emménagogue, abortive, et serait un antidote des poisons (d'après HAKIM MAYSERI, 991). Le romarin est cité aussi comme plante expectorante, bonne pour les coliques, et qui fait expulser le pus des ulcères (IBN AL-QUF MASIHI AMINE AL-DAWLA ABU FARAJ, 1233-1286), et comme une plante utile pour le mal de tête et diurétique (IBN ROSHD ABU AL-WALID MOHAMMED, 1198).

Le botaniste IBN AL BAYTAR (XIII^e siècle) décrit 1400 drogues utilisées en Afrique du Nord dans un "Traité des Simples", traduit en latin (*Corpus Simplicum Medicamentorum*) et en français par Leclerc (1877-1883). Dans cet ouvrage, il attribue au romarin "aklil" les propriétés suivantes :

- "il provoque l'écoulement de l'urine et des règles -
- il résout l'obstruction du foie et de la rate -
- il purifie les poumons -
- il est utile contre les palpitations, l'asthme, la toux, l'hydropisie, l'ascite -
- les chasseurs en mettent dans le ventre des animaux qu'ils ont tués, après en avoir retiré les entrailles, pour arrêter le développement de la putréfaction - "

Le romarin est plusieurs fois décrit comme étant **"la panacée de l'Afrique du Nord"**.

Le romarin est cité au XVII^e siècle par ABDERRAZZAQ EDDJEZAIRI (1874) en Algérie et, au XIX^e et XX^e siècle au Maroc par Renaud et Colin en 1934 (cités par FOURNIER, 1948), et BELLAKHDAR en 1978.

Le romarin est aussi symbole de "renaissance" : "après un dur voyage, les Touaregs se traitaient pendant 3 jours avec du romarin pour renaître à la vie (on retrouve ici le même symbole que celui de l'"eau de la reine de Hongrie").

En Inde, le romarin n'est pas répertorié (MAZARS, communication personnelle).

En Chine, il est cité dans le traité des plantes médicinales chinoises (ROI, 1955) pour son utilisation en parfumerie.

3. En Amérique Centrale

Le romarin fait partie d'une liste de 20 plantes les plus fréquemment utilisées en médecine traditionnelle en Basse Californie et au Mexique, ainsi qu'en Amérique latine (DUKE et AYENSU, 1985).

II. UTILISATION EN MEDECINE TRADITIONNELLE

Les indications thérapeutiques actuelles du romarin rassemblées ci-après font, pour la plupart, référence à son usage pratiqué en Afrique du Nord (Tunisie, Algérie, Maroc, Sahara Algérois). Nous classerons son utilisation en deux catégories : usage interne et usage externe. On tire plusieurs drogues de cette plante : huile essentielle, feuilles, sommités fleuries.

1. En usage interne

1.1. Tonique - Stimulant

L'huile essentielle s'emploie comme stimulant en cas de surmenage ou d'asthénie, ou pendant les convalescences (après une fièvre typhoïde), (FOURNIER, 1948).

Le romarin (partie de plante non précisée) s'emploie aussi contre la paralysie et l'épilepsie (DUCROS, 1930) et contre les phénomènes de "débilité de tous genres".

1.2. Apéritif - Stomachique - Dépuratif

Dans le sud tunisien, le romarin "iazir" se prend en infusion sucrée, comme apéritif, le matin et à jeun (REBOUL, 1953 ; MAIRE et SAVELLI, 1955 ; PASSAGER et DOREY, 1958 ; CHOPRA et coll., 1960). Cette même infusion aurait des vertus stomachiques (BOUCHAT, 1956 ; DUKE et AYENSU, 1985).

Il s'utilise aussi contre les maux d'estomac, les vomissements, les fermentations intestinales (BOUQUET, 1921) et contre les coliques, soit en infusion sucrée (BOUCHAT, 1956), soit pris avec du lait caillé ou dans une pâte faite de farine, de beurre et de citron (PRAX, 1850 cité par LE FLOC'H, 1983).

1.3. Antitussif et antispasmodique

Les feuilles de romarin en infusion ont une action calmante sur la toux (PASSAGER et DOREY, 1958 ; DOREAU, 1961) et s'emploient également dans d'autres affections bronchiques : l'asthme et la coqueluche (FOURNIER, 1948).

L'huile essentielle a également des vertus antispasmodiques. Son action s'exerce surtout au niveau des parois des vaisseaux, dans le cas de spasmes vasculaires, de la diminution des irrigations périphériques et de l'hypotension (ANTOINE, 1991).

1.4. Ocytocique - Emménagogue

Le romarin (sans autre précision) provoquerait des contractions utérines et de ce fait serait abortif (DUKE et AYENSU, 1985).

Les indications suivantes sont préconisées surtout dans le Sahara algérois et les détails d'utilisation varient d'une oasis à l'autre :

- * pendant l'accouchement, le romarin utilisé en décoction accélère le travail des parturientes (BOUCHAT, 1956) et, utilisé en infusion, il facilite l'accouchement et "purifie" le sang de la mère (PASSAGER et DOREY, 1958 ; DOREAU, 1961)

- * après l'accouchement, le romarin est utilisé seul en infusion à renouveler plusieurs fois ou, associé à *Ruta chalepensis* (abortif) en infusion de feuilles sèches (REBOUL, 1953) ou encore associé à du blé cuit à l'eau (PASSAGER et BARBANCON, 1956).

1.5. Diurétique

Le romarin est utilisé comme diurétique sous forme de vin diurétique dans les cas d'hydropisie et d'oedème.

Préparation du vin diurétique : macération d'une poignée de romarin dans un litre de vin blanc pendant 24 heures et à l'obscurité.

Posologie : 3 à 4 cuillérées à soupe matin et soir (FOURNIER, 1948).

1.6. Cholagogue et cholérétique

Les feuilles et les sommités fleuries en infusion à 5 %, ou en extrait fluide, sont indiquées dans le cas de cholécystites chroniques, d'ascites par hypertrophie du foie, d'ascites par "cirrhose de Laennec", d'ictères par hépatite ou par obstruction (Parturier et Rousselle, 1929 cités par FOURNIER, 1948 ; LE MORDANT et coll., 1977).

Composition de l'extrait fluide :

Romarin	10 g
Menthe pouliot	10 g
Polypode	15 g

Posologie : 30 à 40 gouttes avant les repas de midi et du soir.

Au Maroc, le romarin "azir" est vendu dans les boutiques de tradipraticiens ; il fait partie des drogues simples et des préparations, pour ses propriétés cholagogues et antiseptiques (CLAISSE, 1990).

1.7. Autres utilisations

On recense d'autres utilisations du romarin dans les problèmes de circulation sanguine, du coeur, du système nerveux (FOURNIER, 1948). Il est efficace aussi dans les cas de vertiges, de palpitations et de névralgies (sous forme de teintures). En Amérique Latine, l'infusion de romarin s'utilise pour améliorer la mémoire (propriété déjà reconnue dans l'Antiquité).

2. En usage externe

2.1. Antiseptique et cicatrisant

Les feuilles de romarin desséchées et mélangées à de l'huile ou réduite en poudre sont vulnérables pour des plaies récentes comme la circoncision (TROTTER, 1915 ; PASSAGER et BARBANCON, 1956 ; DORVAULT et WEITZ, 1945 ; BOUQUET, 1921).

Les feuilles en décoction sont préconisées dans le cas des leucorrhées, en injections vaginales, et dans le cas des amygdalites, en gargarisme (FOURNIER, 1948).

Le romarin s'emploie aussi en fumigation, pour traiter les affections respiratoires (FOURNIER, 1948).

2.2. Emmenagogue

Les bains aromatiques et les applications de compresses chaudes de romarin provoquent l'écoulement du flux menstruel (GATTEFOSSE, 1921 ; DUCROS, 1930 ; MAIRE et SAVELLI, 1955 ; DOREAU, 1961 ; WINDHOLZ et coll., 1976) (en Afrique du Nord et en Amérique du Sud).

2.3. Anti-rhumatismal - Anti-inflammatoire

Les feuilles de romarin cuites dans du vin ou en décoction dans l'eau sont utilisées comme compresses en application sur "les gonflements articulaires" et les oedèmes. (FOURNIER, 1948 ; WINKELMAN, 1986).

Le romarin cuit dans l'huile est indiqué pour les maux de gorge (LOUIS, 1979).

2.4. Stimulant - Revitalisant du cuir chevelu

L'huile essentielle de romarin entre dans la composition de bain tonifiant et fortifiant pour les enfants. Le romarin entre aussi dans la composition de shampoings.

2.5. Anticonceptionnel

En Amérique Centrale, le romarin fait partie d'une préparation (avec *Artemisia maritima*) qui pourrait produire une stérilité temporaire (DUKE, 1985).

2.6. Antiparasitaire

L'infusion de feuilles et de fleurs dans "l'esprit de vin" entre dans le traitement de la gale et de la pédiculose. Le romarin entre également dans la préparation d'un bain pour se débarrasser de *Phthirus pubis* (GARNIER et coll., 1961).

III. SPECIALITES ACTUELLES A BASE DE ROMARIN EN PHYTOTHERAPIE

1. Indications du Ministère de la Santé

Les indications retenues en 1990 par le Ministère de la Solidarité, de la Santé et de la Protection sociale (avis aux fabricants concernant les demandes d'Autorisation de Mise sur le Marché de Spécialités pharmaceutiques à base de plante, B.O. 90/22 bis) concernant les usages traditionnels des sommités fleuries et des feuilles de *R. officinalis* sont les suivantes :

Traditionnellement utilisé :

- * en bain de bouche, pour l'hygiène buccale
- * en cas de nez bouché, de rhume
- * pour faciliter la digestion et l'élimination de la bile
- * comme cholérétique ou cholagogue
- * pour faciliter les fonctions d'élimination rénales et digestives.

2. Spécialités du codex

Cod. 1837 : Vinaigre de romarin

Cod. 1866 : Alcoolat de romarin ou Alcoolat vulnéraire

Cod. 1884 : Teinture d'essence de romarin

Cod. 1908 : Baume Nerval -Onguent Nervin

Cod. 1937 : Eau de Cologne ou Teinture d'essence de citron composée

Cod. 1949 : Baume Opodeldoch

Cod. 1965 : Baume tranquille ou Huile de jusquiame composée

IV. PRECAUTIONS D'USAGE LIEES A LA TOXICITE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE *R.OFFICINALIS*

1. Toxicité en usage externe

L'huile essentielle utilisée dans le bain peut causer un érythème. Les eaux de toilette contenant de l'huile essentielle de romarin peuvent provoquer des dermatoses ou une hypersensibilité individuelle.

2. Toxicité en usage interne

L'huile essentielle employée à des doses supérieures à 2 à 3 gouttes/jour provoquerait des risques de néphrites et de gastro-entérites. Les feuilles et les sommités fleuries auraient le même effet à des doses excessives (FOURNIER, 1948).

D'après Cadéac et Meunier (1889) (cités par FOURNIER, 1948), l'huile essentielle administrée "en quantité exagérée" (60 mg/kg) serait épileptisante chez le chien.

Lewin (cité par GARNIER et coll., 1961) signale que, chez le lapin, la dose léthale est de l'ordre de 1,2 g/animal avec des symptômes de convulsion, de paralysie des centres respiratoires, d'une abolition de l'excitabilité réflexe et d'une hypotension. Un empoisonnement chronique provoquerait des hémorragies stomacales, une albuminurie, une cylindurie, une stéatose du foie et des reins (Schreiber, 1878 cité par GARNIER et coll., 1961).

Plus récemment, LAMOTHE (1984) a montré sur des tests de toxicité chez l'animal que l'huile essentielle de *R. officinalis* provoquerait des crises "électrocorticales" chez le rat à la dose de 1 ml/kg par voie intra-péritonéale. Les premières manifestations critiques apparaissent 15 minutes après l'injection et la crise généralisée dure environ 20 minutes. Une deuxième crise succède presque immédiatement à la première instaurant "un état de mal".

DELAVEAU(1987) précise que 3 prises d'infusé par jour pendant plusieurs semaines peut entraîner une hypertension.

V. UTILISATION NON PHARMACEUTIQUE DE *R.OFFICINALIS*

1. En parfumerie

L'huile essentielle de romarin entre dans la composition de nombreux parfums.

2. En alimentation

Le romarin est très utilisé en tant que condiment dans le bassin méditerranéen et en Angleterre pour aromatiser les viandes (poulet, canard, lapin, porc, veau, agneau), les poissons, les ragouts, les soupes et les légumes (pommes de terre, aubergines,...) (DUKE, 1985). Il existe du miel spécialement produit à partir du nectar des fleurs de romarin. Ce miel très parfumé est appelé "Miel de Narbonne" ou miel de romarin (BONNIER, 1934).

3. Comme antioxydant

Déjà au XIII^e siècle (IBN AL BAYTAR traduit par LECLERC, 1877), le romarin s'employait en Afrique de Nord "pour arrêter le développement de la putréfaction dans le ventre des animaux tués à la chasse". Dans ce cas, c'est à la fois son action antimicrobienne et antioxydante qui seraient mises à profit.

Toujours en Afrique du Nord, le romarin s'emploie pour éviter le rancissement du beurre fondu dans les outres (LOUIS, 1979). DELAVEAU (1987) rapporte que "les charcutiers ont coutume de traiter à chaud le saindoux, aussitôt après abattage du porc, par chauffage en son sein d'un bouquet de romarin où il agit à la fois comme antioxydant et comme conservateur, tandis que son essence pourrait jouer un rôle antibactérien modéré".

DELAVEAU cite également l'utilisation d'"huile de romarin" dans la rénovation des vieilles icônes. Est-ce aussi une action antioxygène qui serait exploitée?

4. Comme insecticide, antibactérien, antifongique

Le romarin est utilisé comme insecticide en Amérique Latine. C'est un anti-mite parfumé.

L'huile essentielle est bactéricide et fongicide (MARUZZELLA et HENRY, 1958; MARUZZELLA et LIGUORI, 1958 ; ROUSSEL et coll., 1973 ; FARAG et coll., 1986; STEINMETZ et coll., 1988).

CHAPITRE III

COMPOSITION CHIMIQUE DE *ROSMARINUS OFFICINALIS* L.

INTRODUCTION

Rosmarinus officinalis, très utilisé depuis plusieurs siècles, a suscité la curiosité de nombreux chimistes. Ainsi, nous en connaissons actuellement assez précisément sa composition chimique qui est la suivante.

I. LES ACIDES-PHENOLS

Comme dans de nombreuses gamopétales, on retrouve chez *R. officinalis* les acides caféique, chlorogénique et néochlorogénique (cité par HEGNAUER, 1966 ; BEZANGER-BEAUQUESNE et coll., 1980).

En 1958, SCARPATI et ORIENTE isolent l'acide rosmarinique des feuilles fraîches de *R. officinalis*. C'est un depside de l'éther de l'acide caféique et de l'acide hydroxycatéique.

Ces acides-phénols sont repris et identifiés par Chromatographie en Phase Gazeuse par RESCHKE en 1983 et par Chromatographie Liquide Haute Performance par VEROTTA en 1984 ainsi que GRACZA et RUFF en 1984. Par contre, il n'y aurait pas d'acide gallique, ni d'acide ellagique (HEGNAUER, 1966).

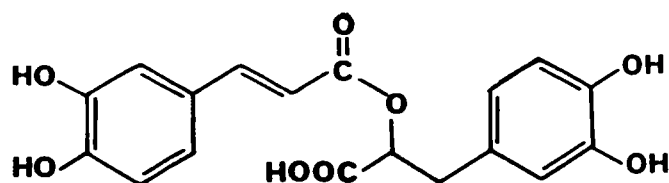
Le rendement d'extraction de l'acide rosmarinique est variable suivant les auteurs et la précision qu'ils en donnent :

SCARPATI et ORIENTE (1958) : 0,2 à 0,3 % à partir d'une décoction de feuilles fraîches de *R. officinalis*

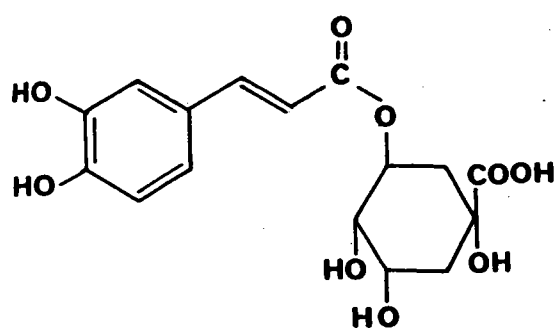
RESCHKE (1983) : 1 % à partir de poudre de plante de *R. officinalis*

VEROTTA (1984) : 0,35 % à partir de feuilles sèches de *R. officinalis*

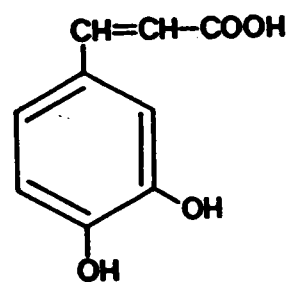
La structure chimique des acides-phénols est présentée dans la Figure 6, page suivante.



ACIDE ROSMARINIQUE



ACIDE CHLOROGENIQUE



ACIDE CAFEIQUE

FIGURE 6 : Structure chimique des acides phénols de *R. officinalis*

II. LES FLAVONOÏDES

Les flavonoïdes présents chez *R. officinalis* sont des dérivés de la flavone.

De nombreuses molécules ont été identifiées par SEMRAU (1958), BRIESKORN et DÖMLING (1967), BRIESKORN et MICHEL (1968), BRIESKORN et coll. (1973). BARBERAN (1986).

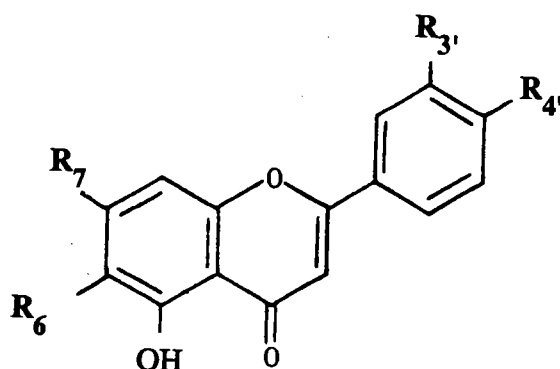
L'apigénine et la lutéoline ont été isolés par chromatographie sur colonne (SENDRA et coll., 1969). D'autres auteurs (LALLEMENT-GUILBERT et BEZANGER-BEAUQUESNE, 1970) confirment la présence de la genkwanine, de la lutéoline et de l'apigénine.

Certains de ces flavonoïdes ont été isolés sous leur forme hétérosidique (diosmoside, méthoxy-6-lutéoloside, apigénol-7-glucoside), dont treize ont été identifiées récemment (AESCHBACH et coll., 1986 ; ARISAWA et coll., 1987). La plupart de ces flavonoïdes glycosilés sont des dérivés méthylés.

Une molécule du type flavanone a été identifiée chez le romarin :

hespérétine ou 3',5-7, trihydroxy, 4'-méthoxyflavanone

La structure chimique des flavonoïdes est présentée dans le tableau 1 page suivante.

TABLEAU 1: Structures chimiques des principales flavones identifiées chez *R. officinalis*

	R ₇	R ₆	R _{3'}	R _{4'}
LUTEOLINE	OH	H	OH	OH
6-METHOXY-LUTEOLINE (eupafoline)	OH	OCH ₃	OH	OH
6-METHOXY-LUTEOLINE-7-METHYL ETHER	OCH ₃	OCH ₃	OH	OH
APIGENINE	OH	H	H	OH
DIOSMETINE	OH	H	OH	OCH ₃
HISPIDULINE	OH	OCH ₃	OH	H
SALVIGENINE	OCH ₃	OCH ₃	H	OCH ₃
GENKWANINE	OCH ₃	H	OH	H
6-METHOXY-GENKWANINE	OCH ₃	OCH ₃	OH	H
GENKWANINE-4'-METHYLETHER	OCH ₃	H	OH	OCH ₃
CIRSIMARITINE	OCH ₃	OCH ₃	H	OH
ACACETINE	OH	H	H	OCH ₃
5-HYDROXY-4'-7-DIMETHYL FLAVONE	OCH ₃	H	H	OCH ₃

III. LES COMPOSES TERPENIQUES

1. Monoterpènes et sesquiterpènes

1.1. Identification et composition chimique de l'huile essentielle

Ces composés sont présents dans l'huile essentielle obtenue par hydrodistillation de feuilles de *R. officinalis*. La quantité d'huile essentielle (1 à 2 %) et sa composition chimique varient en fonction de la variété botanique de la plante et de son chémotype, de son âge, du climat, mais aussi en fonction de la durée de distillation et de la méthode d'identification (de nombreux composés sont très oxydables).

L'identification des principales molécules a été obtenue par chromatographie en phase gazeuse, par les auteurs suivants : BRIESKORN et BECK, 1970 ; GRANGER et coll., 1970 ; CABO TORRES et coll., 1972 ; RASMUSSEN et coll., 1972 ; HARTMANN et coll., 1980 ; BOELEN, 1985 ; BASSANI et coll., 1990.

Le Tableau 2 de la page suivante donne la liste des composés les plus fréquemment répertoriés dans l'huile essentielle de *R. officinalis*. D'autres composés ont été isolés en très faible quantité, inférieure à 0,5 % comme, le copaène, le muurolène, le thuyène, le cadinène, le tricyclène, le caryophyllène oxyde (BOELEN et coll., 1985 ; LAWRENCE, 1986).

1.2. Variabilité de la composition chimique de l'huile essentielle

R. officinalis a une composition qualitative fixe dans ses huiles, mais les taux et la proportion relative des constituants peuvent varier considérablement (ROSUA et GARCIA-GRANADOS, 1987) (Tableau 3).

Les facteurs de variations sont les suivants :

facteurs directs : * origine géographique

- climat
- conditions climatiques au moment de la récolte
- âge végétatif des plantes

TABLEAU 2 : Composition chimique de l'huile essentielle de *R. officinalis*

Molécules	% / huile
MONOTERPENES	(45-50 %)
	acycliques
MYRCENE (+ Δ -3 CARENE)	(3-5 %)
β -OCIMENE	($\pm 0,1$ %)
	monocycliques
p-CYMENE	($\pm 1,6$ %)
α -PHELLANDRENE	($\pm 0,8$ %)
α -TERPINENE	($\pm 0,4$ %)
γ -TERPINENE	($\pm 0,7$ %)
TERPINOLENE	($\pm 0,4$ %)
LIMONENE	(0,5-10 %)
	bicycliques
α -PINENE	(10-26 %)
β -PINENE	(2-8 %)
CAMPHENE	(4-10 %)
autres monoterpènes	(3-5 %)
1,8-CINEOL (EUCALYPTOL)	(0,5-50 %)
ALCOOLS MONOTERPENIQUES	(4 à 6 %)
BORNEOL	(0,5-7 %)
α -TERPINEOL	(0,5-3 %)
δ -TERPINEOL	(0,5-3 %)
LINALOL	(1-2 %)
TERPINENE-4-OL	(1-2 %)
GERANIOL	(- de 1 %)
CETONES MONOTERPENIQUES	(1 à 30 %)
CAMPHE	(3-25 %)
VERBENONE	(0,5-29 %)
3 - OCTANONE	(2-3 %)
ESTER MONOTERPENIQUE	(1 à 4 %)
ACETATE DE BORNYL	(0,5-4 %)
SESQUITERPENES	(2 à 4 %)
β -CARYOPHYLLENE	(2-3 %)
α -HUMULENE ou (α -CARYOPHYLLENE)	(-1 %)
α -BISABOLENE	(-de 0,5 %)

facteurs indirects : * distillation

- durée
- solubilité des essences
- méthode de distillation

* conservation du matériel

- courte durée
- longue durée

TABLEAU 3 : Variation de la composition chimique de l'huile essentielle de romarin en fonction de l'origine géographique de la plante (BOELEN, 1985).

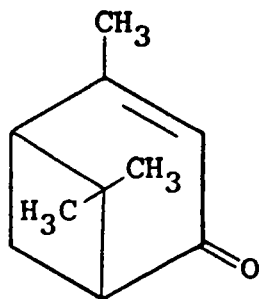
Origine (nb analyse)	Alpha- Pinène	Verbénone	Camphre	Bornéol	Eucalyptol (ou Cinéol)
France (17)	12,5	5,5	25	6,3	18,5
Italie (3)	10	trace	11	6,3	44
Maroc (1)	12	trace	15	5	40
Tunisie (3)	11	2	10	7,3	48
Espagne (6)	21	3	17,5	3	23
Portugal (1)	12	trace	9	trace	14
Algérie (1)	26	22	8	4	trace
Corse (3)	24	27	3	2	6
Yougosl (1)	22	trace	13	7	32
Grèce (1)	23	trace	7	trace	28

Les valeurs sont exprimées en % par rapport à l'huile essentielle.

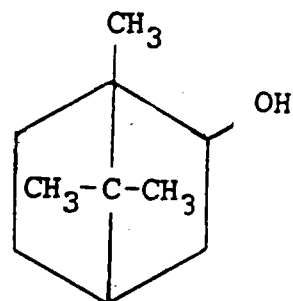
De ce fait, la grande variabilité de la composition chimique de l'huile essentielle a permis d'établir 3 chémotypes en regroupant les composés dominants et la localisation géographique (GRANGER et coll., 1973).

- type eucalyptol localisé en Italie, Maroc et Tunisie
- type camphre/bornéol localisé en Espagne et en France
- type α -pinène/verbénone localisé en Algérie et en Corse.

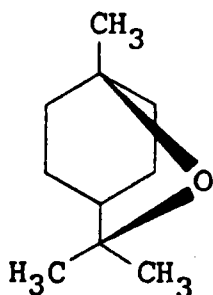
Les structures chimiques des principaux composés présents dans l'huile essentielle de *R. officinalis* sont présentées dans les Figures 7, 8 et 9 suivantes :



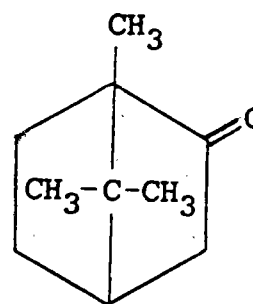
VERBENONE



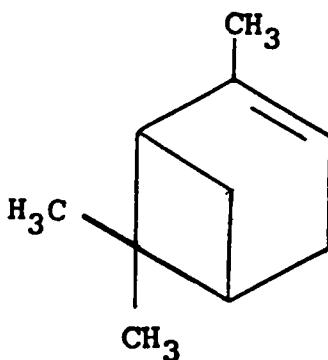
BORNEOL



CINEOL (ou EUCALYPTOL)

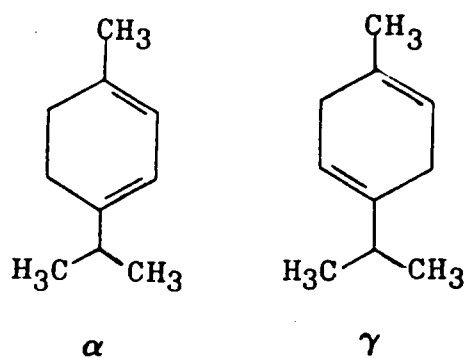


CAMPHRE

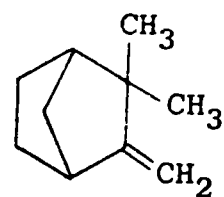


α -PINENE

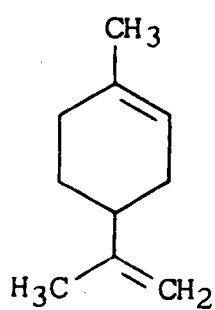
FIGURE 7 : Structure chimique des principaux composés de l'huile essentielle de *R. officinalis*



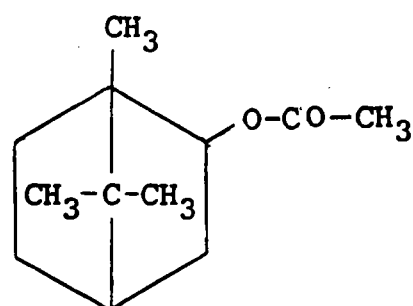
TERPINENE



CAMPHENE

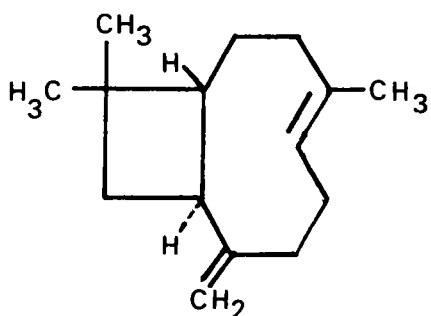


LIMONENE

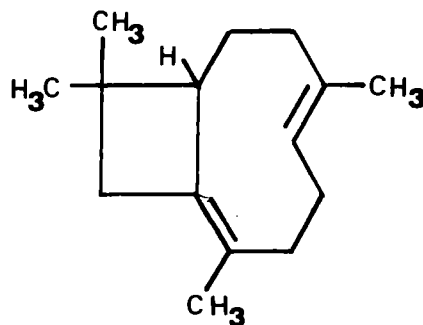
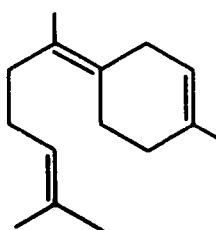


ACETATE DE BORNYL

FIGURE 8 : Structure chimique de certains composés de l'huile essentielle de *R. officinalis*



CARYOPHYLLENE

HUMULENE
(α -caryophyllene)

BISABOLENE

FIGURE 9 : Structure chimique des sesquiterpènes présents dans l'huile essentielle de *R. officinalis*

2. Diterpènes : lactones diterpéniques et quinones terpéniques

2.1. Lactones diterpéniques

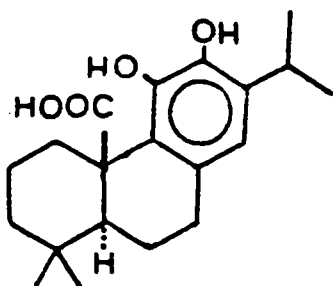
Des lactones diterpéniques sont isolées à partir des feuilles de *R. officinalis* notamment :

- le carnosol (ou picrosalvine) principe amer déjà connu chez *Salvia officinalis* (BRIESKORN et FUCHS, 1962 ; BRIESKORN et coll., 1964) ;
- l'acide carnosolique et deux de ses dérivés :
- le 7 α - et le 7 β -méthyl ether (BRIESKORN et DÖMLING, 1969).

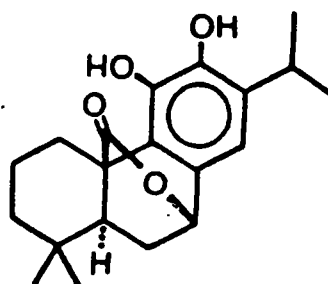
D'autres composés d'une importance pharmacologique comparable à celle du carnosol ont été identifiés:

- le rosmanol et ses dérivés méthoxylés (INATANI et coll., 1982 ; ARISAWA et coll., 1987; JOYEUX, 1993)
- le rosmadial (NAKATANI et INATANI, 1983 et 1984).

Les structures chimiques des lactones diterpéniques sont présentées dans les Figures 10 et 11 suivantes :

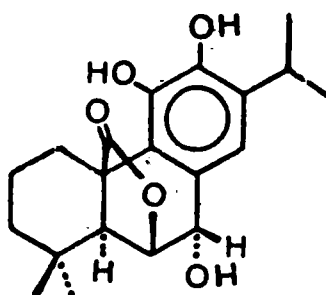


ACIDE CARNOSOLIQUE

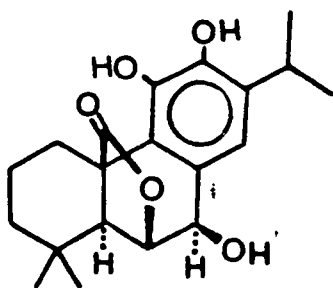


CARNOSOL (ou PICROSALVINE)

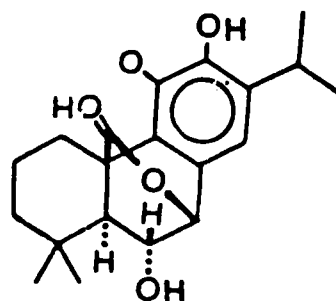
FIGURE 10 : Structure chimique des lactones diterpéniques



ROSMANOL



EPIROSMANOL



ISOROSMANOL

FIGURE 11 : Structure chimique du rosmanol et de ses isomères

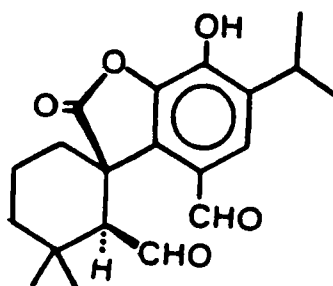


FIGURE 12 : Structure chimique du rosmadial

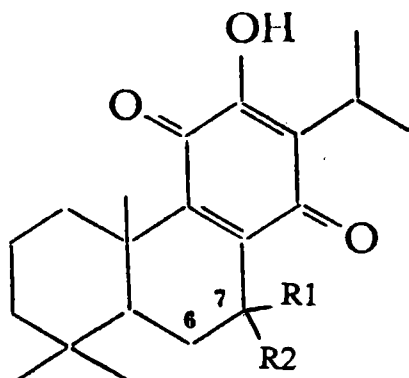
2.2. Quinones terpéniques

Des quinones terpéniques sont isolées à partir des racines de *R. officinalis* :

- le royleanone et ses dérivés ;
- 7 α -hydroxy- royleanone ;
- 7 α -acetoxy- royleanone ;
- 6-7-dehydro-royleanone (BRIESKORN et BUCHBERGER, 1973).

Les principales molécules sont présentées dans le Tableau 4 suivant :

TABLEAU 4 : Structures chimiques des quinones terpéniques présentes chez *R. officinalis*



	R1	R2
ROYLEANONE	H	H
6-7-DEHYDRO-ROYLEANONE	Δ 6-7	
7-HYDROXY-ROYLEANONE (HORMINONE)	H	OH
7-ACETOXY-ROYLEANONE	H	O-CO-CH ₃

3. Triterpènes et stérols

3.1. Triterpènes

Les triterpènes ont été isolés à partir de feuilles de *R. officinalis* par POURRAT et LEMEN (1953), BRIESKORN et coll. (1953) et BRIESKORN et ZWEYROHN (1970).

acide ursolique (2,8 %)

acide 13 α -hydroxyursolique

acide 2 β -hydroxyoléanolique

Plus tard, SENDRA et coll. (1969) confirment la présence des acides ursolique et oléanolique, après séparation sur colonne d'un extrait méthanolique de feuilles de *R. officinalis* et déterminent la présence de l' α -amyrine et de la β -amyrine.

Récemment, ARISAWA et coll.(1987) isolent pour la 1^{ère} fois, la bétuline, des parties aériennes de *R. officinalis*.

Les structures chimiques des principaux triterpènes présents chez *R. officinalis* sont présentées dans les Figures 13 et 14 suivantes.

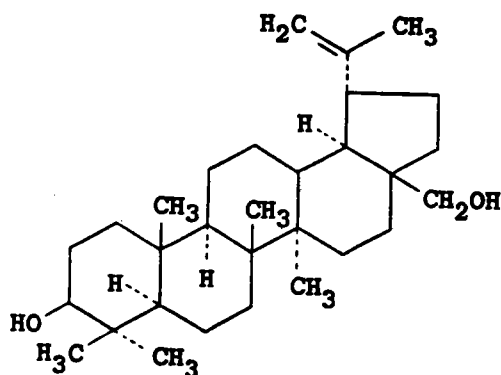
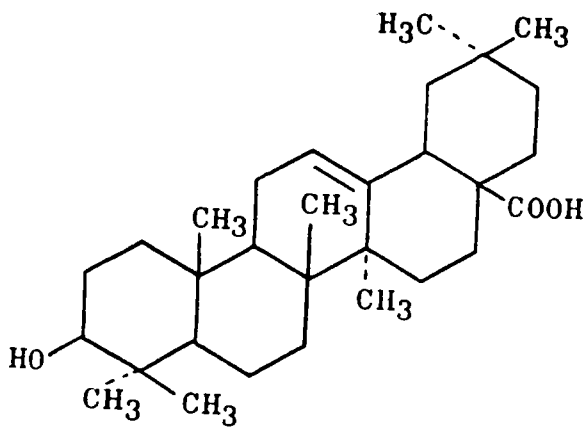
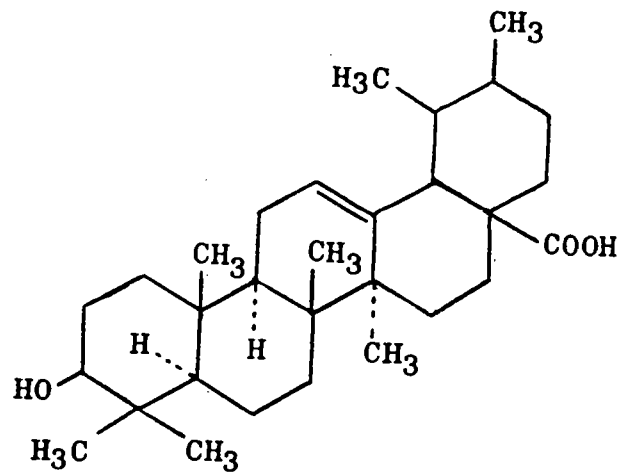


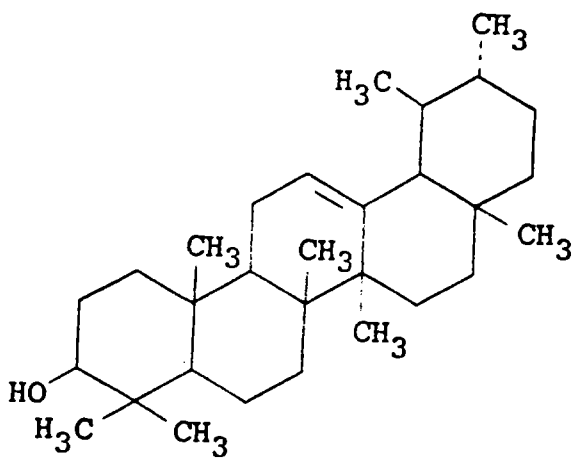
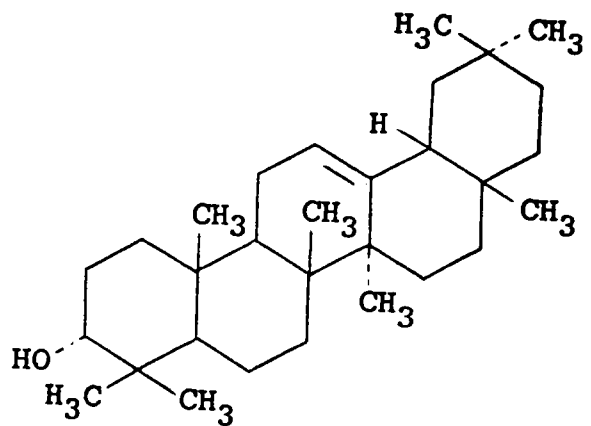
FIGURE 13 : Structure chimique de la bétuline



ACIDE OLEANOLIQUE



ACIDE URSOLIQUE

 α -AMYRINE β -AMYRINEFIGURE 14 : Structure chimique des principaux triterpènes présents chez *R. officinalis*

3.2. Stérols

SENDRA et coll. (1969) confirment la présence du β -sitostérol (Figure 15) et de l'acétate de germanicol après séparation d'un extrait méthanolique de feuilles de *R. officinalis*.

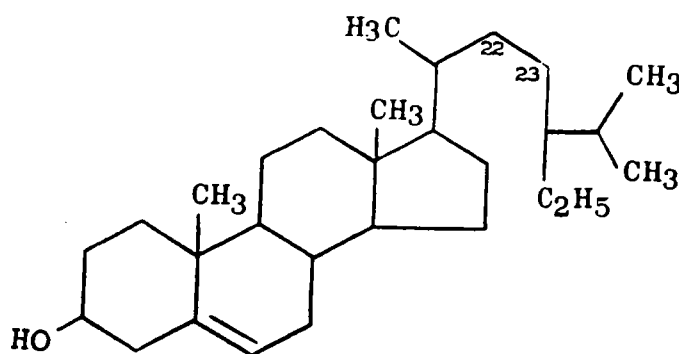


FIGURE 15 : Structure chimique du β -sitostérol

IV. ACIDES GRAS HYDROXYLES

La membrane cuticulaire des feuilles de *R. officinalis* contiendrait 15 acides gras hydroxylés dont 10 ont été identifiés (BRIESKORN et KABELITZ, 1971). Les constituants les plus importants sont :

- acide 10,16- dihydroxy-hexadécanoïque
- acide 6, 7,16-trihydroxy-hexadécanoïque
- acide 9,10,18-trihydroxy-octadécanoïque

V. ACIDES ORGANIQUES

Des acides ont été mis en évidence à partir des feuilles de *R. officinalis* :

- l'acide glycolique ;
- l'acide citrique ;
- l'acide glycérique (BALANSARD, 1953).

VI. AUTRES COMPOSES CHIMIQUES

R. officinalis contiendrait également les composés suivants, présents dans de nombreuses plantes supérieures (BALANSARD, 1953 ; ABED et BENMERABET, 1981) :

- présence de sels minéraux : Na^+ , K^+ , Ca^{++} , Mg^{++} , SiO_2 , Cl^- , PO_4^- , NO_3^- , SO_4^-
- présence de mucilages, de tanins (mais absence d'acide gallique et d'acide ellagique (cité par HEGNAUER, 1966)
- présence de choline (Figure 16)

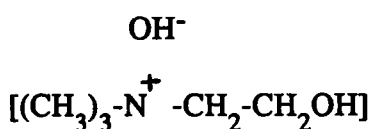


FIGURE 16 : Structure chimique de la choline

- présence de deux hétérosides : le romaroside et le romarinoside (BALANSARD, 1953)

VII. TABLEAU RECAPITULATIF

TABEAU 5 : Molécules chimiques identifiées par les différents auteurs chez *R. officinalis* et son huile essentielle

ACIDES PHENOLS

acide rosmarinique	acide caféique
acide chlorogénique et néochlorogénique	

FLAVONOIDES

lutéoline	6-méthoxy-lutéoline
6-méthoxy-lutéoline-7-méthyl éther	apigénine
diosmétine	salvigénine
hispiduline	genkwanine
6-méthoxy-4'-7-diméthyl flavone	cirsimaritine
eupafoline (ou népétine)	acacétine
et leurs formes hétérosidiques	hespérétine (flavanone)

MONOTERPENES (de l'huile essentielle)

acycliques	monocycliques
myrcène	p-cymène
β -ocimène	α -phellandrène
Δ -3 carène	α -terpinène
bicycliques	γ -terpinène
α -pinène	terpinolène
β -pinène	limonène
α -thujène	
camphène	1,8-cinéol (eucalyptol)
 alcools monoterpéniques	 cétones monoterpéniques
bornéol	camphre
α -terpinéol	verbénone
δ -terpinéol	3 - octanone
linalol	ester monoterpénique
terpinène-4-ol	acétate de bornyl
géraniol	

SESQUITERPENES

β -caryophyllène
 α -humulène

α -bisabolène

LACTONES DITERPENIQUES

carosol (ou pricosalvine)
 rosmanol (et ses dérivés)

acide carnosolique (et ses dérivés)
 rosmadial

QUINONES TERPENIQUES

royleanone
 7 α -hydroxy- royleanone

7 α -acétoxy- royleanone
 6-7-dehydro-royleanone

TRITERPENES

acide ursolique
 acide oléanolique
 bétuline

acide 13 α -hydroxyursolique
 acide 2 β -hydroxyoléanolique
 α et β -amyrine

STEROLS

β -sitostérol

acétate de germanicol

ACIDES GRAS HYDROXYLES

acide 10, 16 - dihydroxy-hexadécanoïque
 acide 6, 7, 16-trihydroxy-hexadécanoïque
 acide 9,10,18-trihydroxy-octadécanoïque

ACIDES ORGANIQUES

acide glycolique
 acide citrique

acide glycérique

HETEROSIDES

romaroside

romarinoside

AUTRES COMPOSES

Sels minéraux : Na^+ , K^+ , Ca^{++} , Mg^{++} , SiO_2 , Cl^- , PO_4^{--} , NO_3^- , SO_4^{--}
 choline, tanins, mucilage

Deuxième partie

ETUDE PHARMACOLOGIQUE DE *ROSMARINUS OFFICINALIS* L.

- CHAPITRE I** : Standardisation des matériels : animaux, extraits végétaux
- CHAPITRE II** : Carte d'identification chimique d'un extrait de jeunes pousses de *R.officinalis*
- CHAPITRE III** : Etude toxicologique des jeunes pousses de *R.officinalis*
- CHAPITRE IV** : Recherche d'une activité cholérétique des jeunes pousses de *R.officinalis*
- CHAPITRE V** : Recherche d'une activité anti-hépatotoxique des jeunes pousses de *R.officinalis*
- CHAPITRE VI** : Recherche d'une activité anti-inflammatoire des jeunes pousses de *R.officinalis*
- CHAPITRE VII** : Recherche d'une activité diurétique des jeunes pousses de *R.officinalis*
- CHAPITRE VIII** : Etude comparative des jeunes pousses et des sommités fleuries de *R.officinalis*
- CHAPITRE IX** : Discussion
- CHAPITRE X** : Conclusion

INTRODUCTION

Les connaissances actuelles de l'utilisation de *R. officinalis* en médecine traditionnelle en Afrique du Nord et en Europe, nous permettent d'entreprendre l'étude pharmacologique de la plante. Les expérimentations pharmacologiques auront pour but de vérifier son utilisation dans :

"la fonction d'élimination hépatique et rénale"

et de vérifier également son utilisation comme :

"antioxydant alimentaire et anti-inflammatoire".

L'importance actuelle de la gemmothérapie nous a conduit à orienter nos recherches vers l'étude des propriétés pharmacologiques des *jeunes pousses*. Celles-ci sont prescrites actuellement dans les cas d'insuffisance hépatique sous forme de macérat glycéro-alcoolique. Les tests pharmacologiques porteront sur l'évaluation des propriétés suivantes :

***Propriétés cholérétiques :** par mesure de la cholérèse chez le rat et suivi de l'évolution du flux biliaire.

***Propriétés hépatoprotectrices :** par la mesure de la variation des paramètres sanguins (ALAT plasmatiques chez le rat et chez la souris), marqueurs d'une intoxication hépatique induite par le tétrachlorure de carbone (CCl_4) *in vivo* ;

***Propriétés anti-inflammatoires :** par la mesure de l'oedème plantaire induit chez le rat par l'injection subplantaire de carragénine ;

***Propriétés diurétiques :** par la mesure de l'excrétion urinaire chez le rat, en condition normale et en condition de surcharge hydrique.

Les tests pharmacologiques seront effectués à partir d'extraits hydro-alcooliques, glycéro-alcooliques, et aqueux.

Précédemment à cette étude pharmacologique, nous rappellerons les conditions d'élevage des animaux de laboratoire et les protocoles de fabrication des différents extraits végétaux. Nous nous assurerons de la qualité de l'extrait aqueux de jeunes pousses par une caractérisation chimique simple et par une étude toxicologique (DL50).

En dernier lieu, il s'agira de comparer l'activité pharmacologique des jeunes pousses avec celle de la drogue habituellement prescrite, en l'occurrence les sommités fleuries, et de définir la supériorité de l'une ou l'autre des parties de la plante.

CHAPITRE I

STANDARDISATION DES MATERIELS : ANIMAUX, EXTRAITS VEGETAUX

I. CONDITIONS D'ELEVAGE DES ANIMAUX DE LABORATOIRE

1. Espèces utilisées

1.1. Souris

Les souris mâles hétérozygotes utilisées sont issues de la lignée Swiss et proviennent des centres d'élevage Césal (Montmédy-55) et Janvier (Le Genest-53).

1.2. Rats

Les rats mâles utilisés sont issus de la lignée OFA Sprague-Dawley (Iffa-Credo, L'Arbesle-69).

2. Conditions d'élevage

Dès leur réception, les animaux sont répartis au hasard dans des cages en Macrolon, par groupes de 5 pour les souris et de 10 pour les rats. Puis ils sont placés dans une animalerie soumise à un cycle jour/nuit de 12 heures d'éclairement et de 12 heures d'obscurité et maintenue à une température constante de $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

L'eau et la nourriture (Croquettes complètes et vitaminées M25, Extra-Labo, Provins (77)) sont fournies à volonté.

Le temps d'acclimatation des animaux dans leurs nouvelles conditions d'élevage est de 3 jours minimum.

II. LES EXTRAITS DE JEUNES POUSSES DE *R.OFFICINALIS*

Dans la thérapeutique actuelle, différents types de préparations de *R.officinalis* sont commercialisées :

- * plante réduite en poudre pour infusette, ou plante entière sèche : correspondant à un **extrait aqueux** puisqu'elle est prescrite en infusion ;
- * teinture mère : correspondant à un **extrait hydro-alcoolique** et servant de souche pour les dilutions homéopathiques ;
- * macérat glycéro-alcoolique : correspondant à un **extrait glycéro-alcoolique**

Nous retrouverons ces trois types d'extraits dans le déroulement des tests pharmacologiques.

1. Récolte

Les **jeunes pousses** récoltées correspondent à l'extrémité du rameau portant les feuilles de l'année. Ces feuilles sont d'un vert assez clair et d'une longueur comprise entre 1 et 3 cm. Les lieux de récolte sont déterminés par l'usine Dolisos de Montrichard et varient en fonction de l'année et de l'exigence de la quantité de plante nécessaire à l'usine et aux travaux de recherche (Tableau 6). Les facteurs climatiques annuels interviennent dans le choix des lieux de récolte.

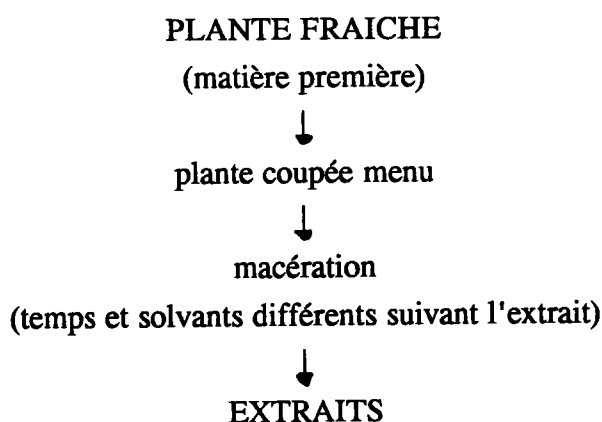
TABLEAU 6 : Lieux et dates de récolte des jeunes pousses de *Rosmarinus officinalis*

Dates de récolte	Lieux de récolte	Parties de la plante
août 1982	Briant Saône et Loire (71)	jeunes pousses
août 1982	Montrichard Loir et Cher (41)	jeunes pousses haie cultivée
juin 1984	Montrichard Loir et Cher (41)	jeunes pousses haie cultivée
mai 1985	Grabels/Montpellier Hérault (34)	jeunes pousses garrigue
juin 1987	St Arty/Caderonne Aude (11)	jeunes pousses garrigue
juin 1988	Saint-Martin des Puits Aude (11)	jeunes pousses garrigue

2. Méthodes de fabrication des différents extraits végétaux

2.1. Profil général

Le mode de fabrication des différentes formes d'extraits suit le profil général suivant :



qui seront :

- soit des extraits hydro-alcooliques (ou teintures mères)
- soit des extraits glycéro-alcooliques (ou macérats glycéro-alcooliques)
- soit des extraits aqueux

2.2. Solvants et temps de macération spécifiques des extraits

Les procédés de fabrication des extraits hydro-alcooliques (ou teintures mères ou TM) et des extraits glycéro-alcooliques (ou macérat glycéro-alcoolique ou MGA) sont ceux décrits par les laboratoires DOLISOS.

2.2.1. Extraits hydro-alcooliques (teintures mères, TM)

- *Solvant* : le solvant des teintures mères est un mélange eau/alcool, afin d'obtenir un degré alcoolique compris entre 60° et 70° et dont le rapport final sera de 1/10^e (plante sèche /teinture mère(m/m)).

- *Temps de macération* : 3 semaines à température ambiante.

Puis le macérat est filtré, les plantes sont exprimées et l'on obtient la teinture mère finale.

2.2.2. Extraits glycéro-alcooliques (macérats glycéro-alcooliques, MGA)

Ils sont réalisés par les Laboratoires Dolisos.

- *Solvant* : le solvant des macérats glycéro-alcooliques est un mélange eau/alcool/glycérine, afin d'obtenir un titre alcoolique compris entre 50° et 60°, et dont le rapport final sera de 1/20^e (plante sèche/macérat (m/m)).

- *Temps de macération* : 3 semaines à température ambiante.

Puis le macérat est filtré, les plantes sont exprimées et l'on obtient le macérat glycéro-alcoolique final.

2.2.3. Extraits aqueux

Ils sont réalisés exclusivement par notre laboratoire, suivant le procédé infusion/macération.

- *Solvant* : le solvant des macérats aqueux est de l'eau distillée portée à ébullition et versée sur la drogue, dans un rapport pondéral de 1/10^e (plante sèche/macérat (m/m)).

- *Temps de macération* : 24 heures à l'étuve à 37°C.

Puis le macérat est filtré, les plantes sont exprimées et l'on obtient l'extrait aqueux final.

3. Préparation et conservation des formes solides utilisées pour les tests pharmacologiques

3.1. Déshydratation et lyophilisation

Avant passage au lyophilisateur, les teintures mères doivent subir une évaporation sous pression réduite (Rotavapor, Büchi) afin d'éliminer l'alcool.

Puis les teintures mères sont lyophilisées, ainsi que les extraits aqueux (Lyophilisateur CD 52-1, Heto, Danemark). Cette opération permet d'obtenir des poudres brunes très odorantes, qui seront conservées à l'abri de la lumière dans des flacons bruns munis d'un bouchon dessiccateur. Les rendements d'extractions sont calculés et sont de l'ordre de 6 à 18 % (lyophilisat/plante sèche) suivant le matériel de départ (Tableau 8).

Les macérats glycéro-alcooliques sont utilisés tels quels, car il est difficile d'éliminer la glycérine.

3.2. Inventaire des différents extraits et codification du matériel végétal

Les extraits qui seront utilisés pour les tests pharmacologiques et chimiques sont présentés dans le Tableau 7 suivant.

TABLEAU 7 : Inventaire des extraits de jeunes pousses de *R.officinalis* utilisés dans les tests pharmacologiques et chimiques

Formes de préparation	Année de récolte	Rendement de lyophilisation	Références
Extrait hydro-alcoolique ou Teinture Mère (TM)	Aout 82	18,2	MCO7*
	Mai 85	15,1	B*
Extrait aqueux	Juin 84	14,3	D
	Mai 85	14,3	E
	Juin 87	16,2	I
	Juin 88	10,7	K
Extrait ou Macérat Glycéro-Alcoolique (MGA)	Aout 82		MC008*

* : fabrication Dolisos

Lors de tous les tests pharmacologiques, les doses administrées à l'animal sont toujours exprimées en mg de plante sèche/kg de poids corporel, quelque soit le protocole d'extraction utilisé.

CHAPITRE II

CARTE D'IDENTIFICATION CHIMIQUE D'UN EXTRAIT DE JEUNES POUSSES DE *ROSMARINUS OFFICINALIS*

I. INTRODUCTION

L'étude chimique suivante a pour objet de mettre en évidence des familles chimiques (acides-phénols, composés flavoniques, composés terpéniques) et de vérifier leur présence ou leur absence dans les jeunes pousses, par chromatographie sur couche mince (CCM) et par des réactions chimiques simples. Le choix de ces groupes chimiques est en rapport avec la composition chimique de *R.officinalis* et les données bibliographiques concernant l'activité pharmacologique de la plante. Les chromatogrammes permettront de dresser une empreinte chimique de l'extrait aqueux de jeunes pousses.

Pour cette étude, nous utiliserons le lyophilisat de l'extrait aqueux de jeunes pousses (réf. K).

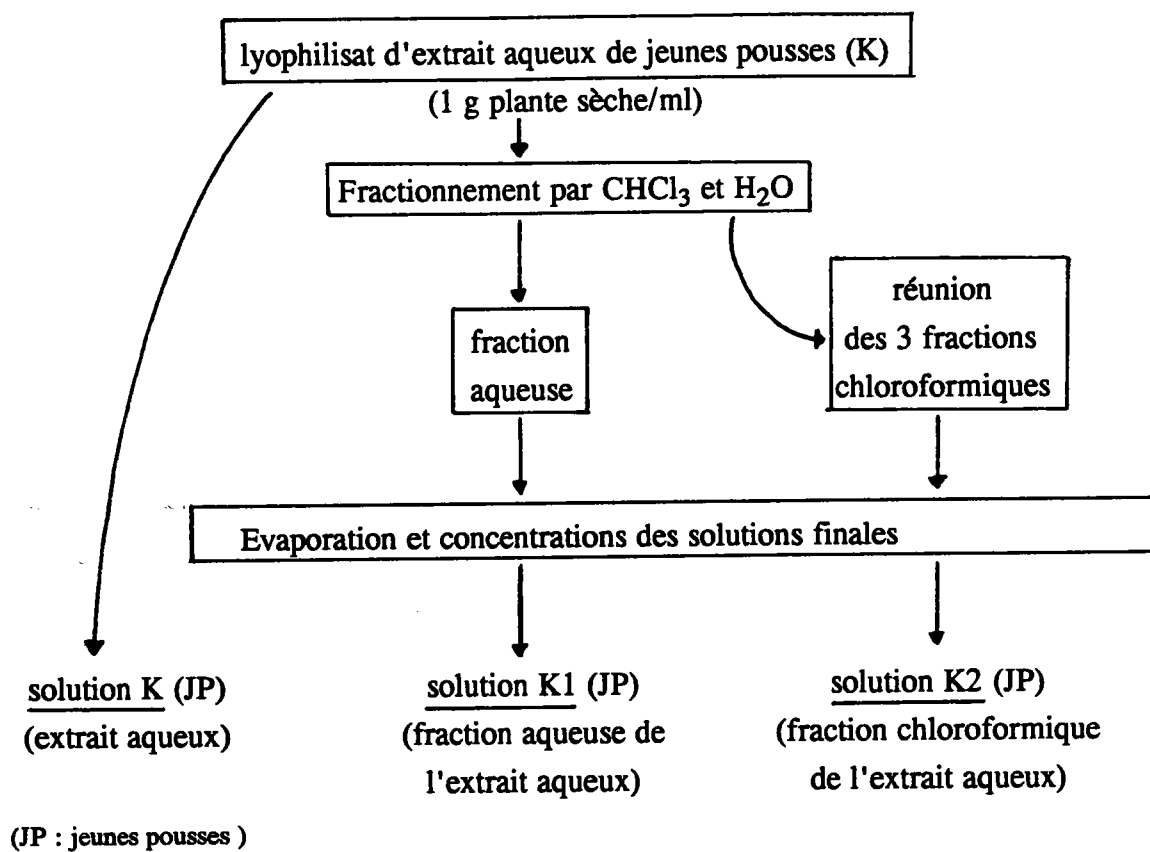
Lors de l'extraction aqueuse, les composés apolaires présents dans la plante fraîche sont faiblement solubles dans l'eau. Aussi, pour les mettre en évidence en CCM, nous avons effectué un fractionnement simple permettant leur concentration et leur isolement partiel du milieu chimique dominant constitué par des molécules polaires.

Le lyophilisat de jeunes pousses (à la dose de 1 g d'équivalent plante sèche/ml) est dissous dans 0,5 ml d'eau, auquel on ajoute 0,5 ml de chloroforme. Ce mélange est agité dans un tube à essais pendant quelques minutes, puis laissé au repos jusqu'à séparation des deux phases. Cette séparation est améliorée par centrifugation à faible vitesse. Trois phases sont ainsi obtenues :

- une phase aqueuse supérieure ;
- une phase intermédiaire d'aspect cireux ;
- une phase chloroformique inférieure.

La phase chloroformique inférieure est conservée et la phase aqueuse est reprise 2 fois par 1 ml de chloroforme. Les 3 fractions chloroformiques sont réunies, puis évaporées afin d'obtenir un volume final de 1 ml. Les phases intermédiaires d'aspect cireux ne sont pas utilisées pour les chromatographies sur couches minces. La phase aqueuse est ramenée à 1 ml.

Le processus de séparation est le suivant :



II. RECHERCHE DE GROUPES CHIMIQUES

1. Les polyphénols

1.1. Tanins

Les tanins sont des polyphénols présents dans les plantes sous forme complexée (tanoïdes) ou combinée à des sucres (tanosides).

Ils sont répartis en deux groupes :

- les tanins galliques (esters d'acides-phénols hydrolysables) ;
- les tanins catéchiques (tanins condensés non hydrolysables).

1.1.1. Procédure expérimentale

RECHERCHE DES TANINS PAR LE REACTIF AU CHLORURE FERRIQUE

A 5 ml d'une solution aqueuse de jeunes pousses (K) dosée à 5 % d'équivalent plante sèche, on ajoute 1 ml de solution aqueuse de chlorure ferrique (Fe Cl_3 , Merck) à 1 %. En présence de tanins, il se développe un précipité de coloration verdâtre ou bleu noirâtre.

RECHERCHE DES TANINS CATECHIQUES

* Réactif de Stiasny

A 30 ml d'une solution aqueuse de jeunes pousses (K) dosée à 5 % d'équivalent plante sèche, on ajoute 15 ml de réactif de Stiasny (formaldéhyde (Prolabo) à 30 % / acide chlorhydrique concentré (Merck) ; 2V/1V).

L'ensemble est chauffé au bain-marie à 90°C pendant 30 minutes. L'obtention de flocons roses montre la présence de tanins catéchiques.

RECHERCHE DES TANINS GALLIQUES

A la solution précédente, qui est filtrée pour éliminer les flocons roses, puis saturée par de l'acétate de sodium en poudre (Sigma), on ajoute quelques gouttes d'une solution de

chlorure ferrique à 1 % (Merck).

L'apparition d'un précipité bleu noir indique la présence de tanins galliques non précipités par le réactif de Stiasny.

1.1.2. Résultats

Le précipité bleu noir apparu après adjonction de la solution de chlorure ferrique indique la présence de tanins dans les jeunes pousses. Ces tanins ne sont pas de nature catéchique, car la réaction par le réactif de Stiasny n'entraîne pas la formation de précipités caractéristiques. Par contre, ils seraient de nature gallique.

Conclusion : Les jeunes pousses de *R. officinalis* contiennent des tanins galliques.

1.2. Acides-phénols et composés flavoniques

Les composés flavoniques sont caractérisés par la réaction à la cyanidine, et les acides-phénols et les composés flavoniques par chromatographie sur couche mince.

1.2.1. Procédure expérimentale

REACTION A LA CYANIDINE

A 5 ml d'une solution aqueuse de jeunes pousses (K) dosée à 5 % d'équivalent plante sèche, on ajoute 5 ml d'alcool chlorhydrique (éthanol 95°/eau distillée/acide chlorhydrique concentré (Merck) ; V/V) puis quelques copeaux de magnésium et 1 ml d'alcool isoamylique (Prolabo). L'apparition de différentes colorations dans la couche supérieure (alcool isoamylique) indique la présence de flavonoïdes libres ou de génines.

Colorations :	rose orangé	—————→	flavones
	rose violacé	—————→	flavanones
	rouge	—————→	flavonols, flavononols

CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

* *Support*

Plaque de silice Kieselgel G 60 (Merck)

* *Solvant*

Acétate d'éthyle (Prolabo) - acide formique (Prolabo) - acide acétique (Prolabo) - eau (100/11/11/27 ; V/V)

* *Révélateur*

Solution d'ester éthylamino-diphénylborique à 1 % dans le méthanol (réactif de NEU, Roth)

* *Solutions analysées*

Témoins : solutions à 5 mg/ml dans la pyridine (Merck) : acide caféique (Roth), acide rosmarinique (Roth), rutine (Sarsynthèse), quercétine (Sarsynthèse), kaempférol (Roth), solution à 5 mg/ml dans l'éthanol (95°) : acide chlorogénique (Roth)

Extraits : solution aqueuse de jeunes pousses (K) dosée à 200 mg/ml

solution aqueuse de la fraction aqueuse de jeunes pousses (K1) dosée à 1g/ml

* *Dépôts*

10 μ l de chaque solution sont déposés à 2 cm de la base de la plaque.

* *Migration*

Après migration du solvant sur 15 cm, la plaque est séchée.

* *Révélation*

Le réactif de NEU est pulvérisé, puis les chromatogrammes sont observés sous UV à 366 nm.

1.2.2. Résultats

REACTION A LA CYANIDINE

L'apparition d'une légère coloration jaune-rose met en évidence la présence de flavones dans les jeunes pousses.

CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE (Figure 17)

Après révélation par le réactif de NEU, l'observation du chromatogramme, sous UV à 366 nm, permet de visualiser un grand nombre de spots révélant la présence d'acides-phénols et de composés flavoniques dans l'extrait aqueux de jeunes pousses et dans sa fraction aqueuse.

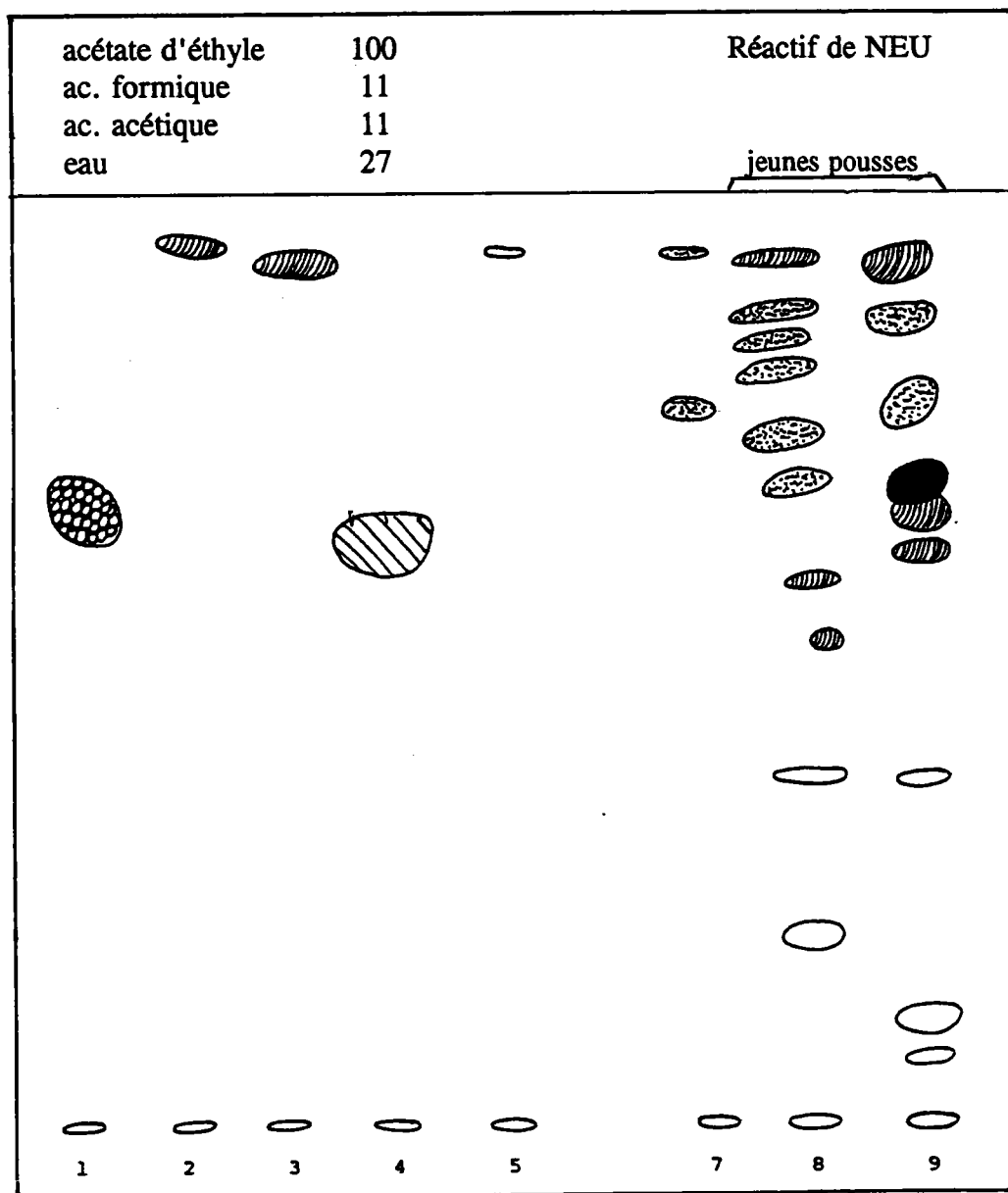


FIGURE 17 : Chromatogramme sur couche mince de l'extrait de jeunes pousses *R. officinalis* : Caractérisation des acides-phénols et des flavonoïdes.

1 : ac. chlorogénique ; 2 : ac. caféique ; 3 : ac. rosmarinique ; 4 : rutine ;
 5 : quercétine ; 7 : kaempférol ;
 8 : extrait aqueux de jeunes pousses (K) ; 9 : fraction aqueuse de l'extrait aqueux de
 jeunes pousses (K1) ;

Légende :  bleu vert  vert jaune  brun
 brun foncé  jaune  orange

2. Les composés réducteurs

Cette étude est réalisée par chromatographie sur couche mince, à l'aide d'un réactif général des composés réducteurs, à base d'anisaldéhyde et d'acide phosphomolybdique en milieu méthanolique.

2.1. Procédure expérimentale

** Support*

Plaque de silice Kieselgel G 60 (Merck)

** Solvant*

Acétate d'éthyle (Prolabo) - acide formique (Prolabo) - acide acétique (Prolabo) - eau (100/11/11/27 ; V/V)

** Révélateur*

0,11 ml anisaldéhyde (Merck)
0,50 ml acide phosphomolybdique (Prolabo) à 10% dans le méthanol
2,25 ml acide acétique (Prolabo)
1,25 ml acide sulfurique concentré (Prolabo)
21,00 ml méthanol (Merck)

** Solutions analysées*

Témoins : solutions à 5 mg/ml dans l'éthanol (95°) : acide chlorogénique (Roth), α et β amyryne (Koch-Light) ;

solution à 5 mg/ml dans la pyridine (Merck) : acide caféique

Extraits : solution aqueuse de jeunes pousses (K) dosée à 200 mg/ml

solution aqueuse de la fraction aqueuse de jeunes pousses (K1) dosée à 1 g/ml

solution chloroformique de la fraction chloroformique de jeunes pousses (K2)
dosée à 1 g/ml

** Dépôts*

10 μ l de chaque solution sont déposés à 2 cm de la base de la plaque.

** Migration*

Après migration du solvant sur 15 cm, la plaque est séchée.

** Révélation*

Le révélateur est pulvérisé, puis la plaque est placée à l'étuve à 105°C pendant 10 minutes ; les chromatogrammes sont ensuite observés dans le visible.

2.2. Résultats

CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE (Figure 18)

La figure 18 montre un grand nombre de spots traduisant la présence de nombreux composés réducteurs dans l'extrait aqueux de jeunes pousses. Ces composés réducteurs sont mieux visualisés dans la fraction aqueuse que dans l'extrait aqueux lui-même. La fraction chloroformique ne renferme que très peu de composés réducteurs (1 spot).

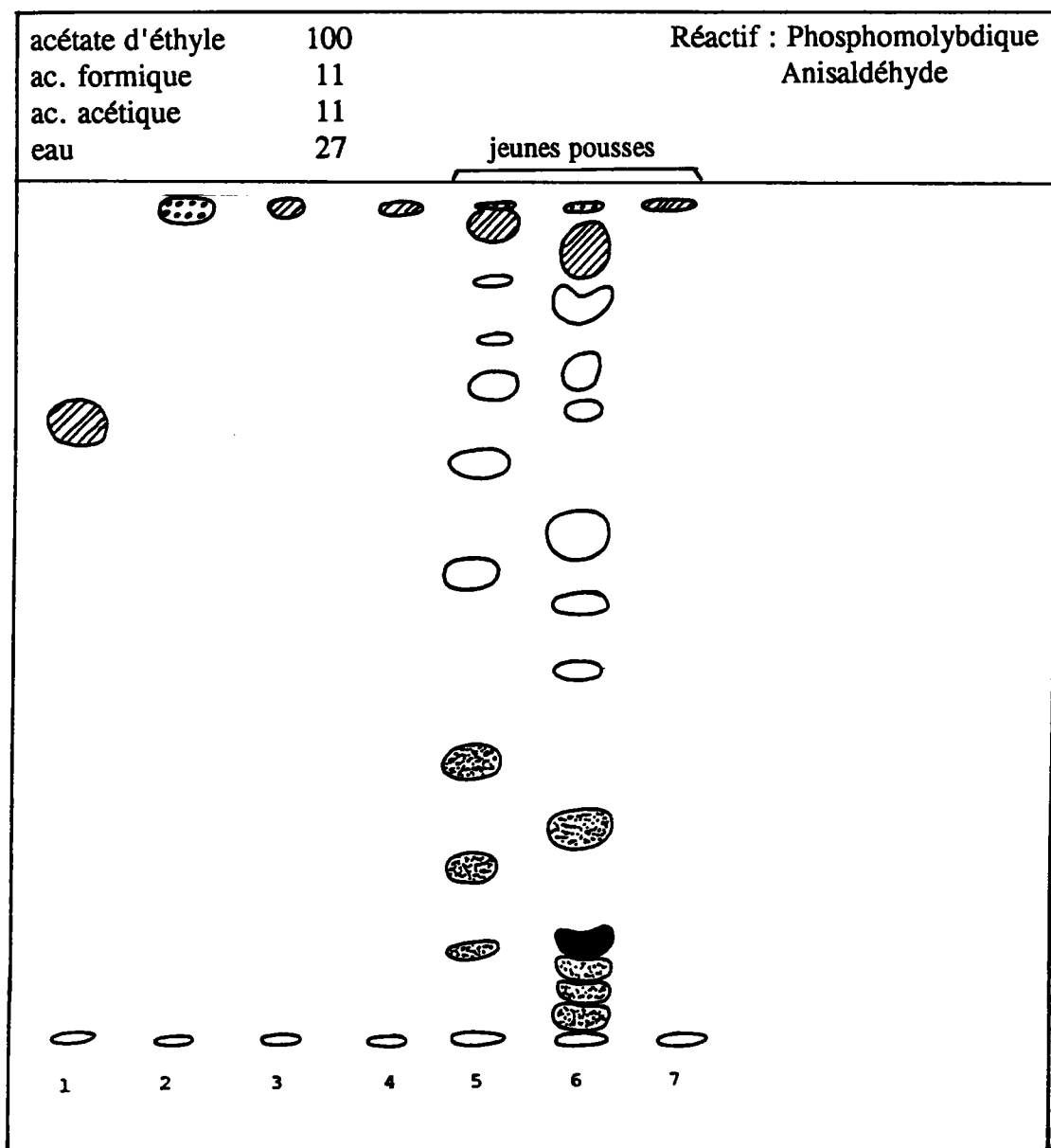


FIGURE 18 : Chromatogramme sur couche mince des extraits de jeunes pousses de *R. officinalis* : Caractérisation des composés réducteurs

1 : ac. chlorogénique ; 2 : ac. rosmarinique ; 3 : α -amyrine ; 4 : β -amyrine
 5 : extrait aqueux de jeunes pousses (K) ; 6 : fraction aqueuse de l'extrait aqueux de jeunes pousses (K1) ;
 7 : fraction chloroformique de l'extrait aqueux de jeunes pousses (K2)

Légende :  rose violet  violet orangé  jaune
  brun clair  brun foncé

3. Recherche des sels minéraux

Les sels minéraux sont recherchés par spectrophotométrie de flamme pour les ions Na^+ et K^+ et par colorimétrie pour les ions Cl^- et Ca^{++} .

3.1. Procédure expérimentale

On utilise une solution aqueuse d'extrait aqueux de jeunes pousses (K) dosée à 20 % d'équivalent plante sèche. La solution est filtrée avant le dosage par l'autoanalyseur (Automate R.A. 1000, Kontron).

3.2. Résultats

Les résultats sont consignés dans le Tableau 8 suivant.

TABLEAU 8 : Sels minéraux présents dans les jeunes pousses de *R.officinalis*

Sels minéraux	Jeunes pousses (K)
	g/100 g de plante sèche
Na^+	0,034
K^+	1,116
Cl^-	0,230
Ca^{++}	0,159

L'analyse montre que le potassium est présent en quantité importante (1%) dans l'extrait aqueux de jeunes pousses.

4. Recherche des saponosides

La recherche des saponosides est menée par évaluation de l'indice de mousse.

4.1. Procédure expérimentale

On utilise une solution aqueuse de jeunes pousses (K) dosée à 5 % d'équivalent plante

sèche, que l'on répartit successivement dans 1 série de 10 tubes à essais (160 x 16mm) à raison de 1, 2, ..., 10 ml. Chaque tube est complété à 10 ml avec de l'eau distillée, puis agité dans le sens de la longueur pendant 15 secondes, à raison de 2 agitations par seconde. Après 15 minutes de repos, on mesure la hauteur de mousse.

Le tube dans lequel la hauteur de mousse est de 1 cm indique la valeur de l'indice de mousse :

$$1000 / n^{\circ} \text{ tube}$$

4 .2. Résultats

L'indice de mousse est inférieur à 100.

5. Recherche des composés terpéniques

Les composés terpéniques sont caractérisés par chromatographie sur couche mince, à l'aide des réactifs au trichlorure d'antimoine et à l'anisaldéhyde en milieu acide.

5.1. Procédure expérimentale

* *Support*

Plaque de silice Kieselgel G 60 (Merck)

* *Solvants*

N°1 : Toluène (Prolabo) - acétate d'éthyle (Prolabo) (95/5 ; V/V) ;

N°2 : Chloroforme (Prolabo) - méthanol (Merck) (90/10 ; V/V).

* *Révélateurs*

N°1 Anisaldéhyde (Merck)	0,1 ml
Acide acétique glacial (Prolabo)	1,0 ml
Acide sulfurique concentré (Prolabo)	0,5 ml
Méthanol (Merck)	8,5 ml

N°2 Trichlorure d'antimoine (SbCl_3 , Prolabo) à 20 % dans le chloroforme (Prolabo) ou réactif de CARR et PRICE qui caractérise les hydrocarbures terpéniques (tel le cinéol)

*** Solutions analysées**

Témoins : solutions à 5 mg/ml dans le méthanol (Merck) : α et β amyrine (Koch-Light),
acide ursolique (Extrasynthèse) et acide oléanolique (Extrasynthèse)
solutions à 5 mg/ml dans l'éther (Prolabo) : cinéol et terpinéol

Extraits : solution aqueuse de jeunes pousses (K) dosée à 200 mg/ml ;
solution aqueuse de la fraction aqueuse de jeunes pousses (K1) dosée à 1 g/ml ;
solution chloroformique de la fraction chloroformique de jeunes pousses (K2)
dosée à 1 g/ml.

*** Dépôts**

10 μ l de chaque solution sont déposés à 2 cm de la base de la plaque.

*** Migration**

Après migration du solvant sur 15 cm, la plaque est séchée.

*** Révélation**

Le réactif est pulvérisé et la lecture s'effectue dans les conditions suivantes :

Révélateurs	Etuve à 105°C	Lecture
n°1 Anisaldéhyde	5 mn	visible
n°2 SbCl_3	20 mn	U.V. 366 nm

5.2. Résultats

Les résultats sont présentés dans les figures 19, 20, 21 et 22.

Le chromatogramme de la figure 19 montre que seuls les composés de la fraction chloroformique (K2) migrent dans le système de solvant toluène/acétate d'éthyle (95/5). Ce résultat nous a conduit à n'utiliser que cette fraction pour les chromatogrammes suivants.

Les chromatogrammes des figures suivantes montrent un grand nombre de spots qui reflètent la présence de nombreux composés terpéniques dans l'extrait aqueux de jeunes pousses.

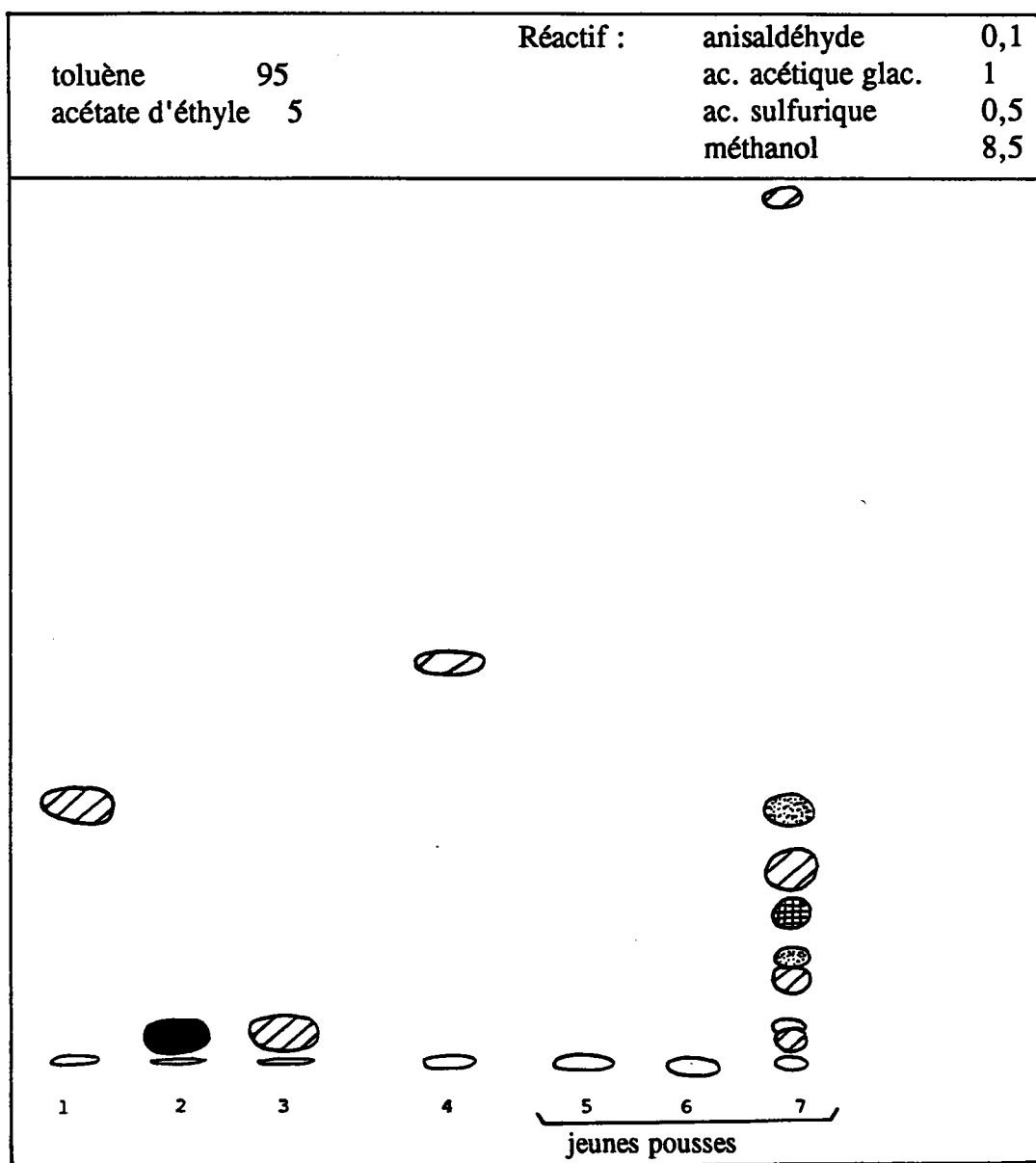


FIGURE 19 : Chromatogramme sur couche mince des extraits de jeunes pousses de *R.officinalis* : Caractérisation des triterpènes

1 : α -amyrine ; 2 : ac. ursolique ; 3: ac. oléanolique ; 4 : cinéol

5 : extrait aqueux de jeunes pousses (K) ; 6 : fraction aqueuse de l'extrait aqueux de jeunes pousses (K1);

7 : fraction chloroformique de l'extrait aqueux de jeunes pousses (K2)

Légende :

violet	rose	bleu
brun foncé	brun	

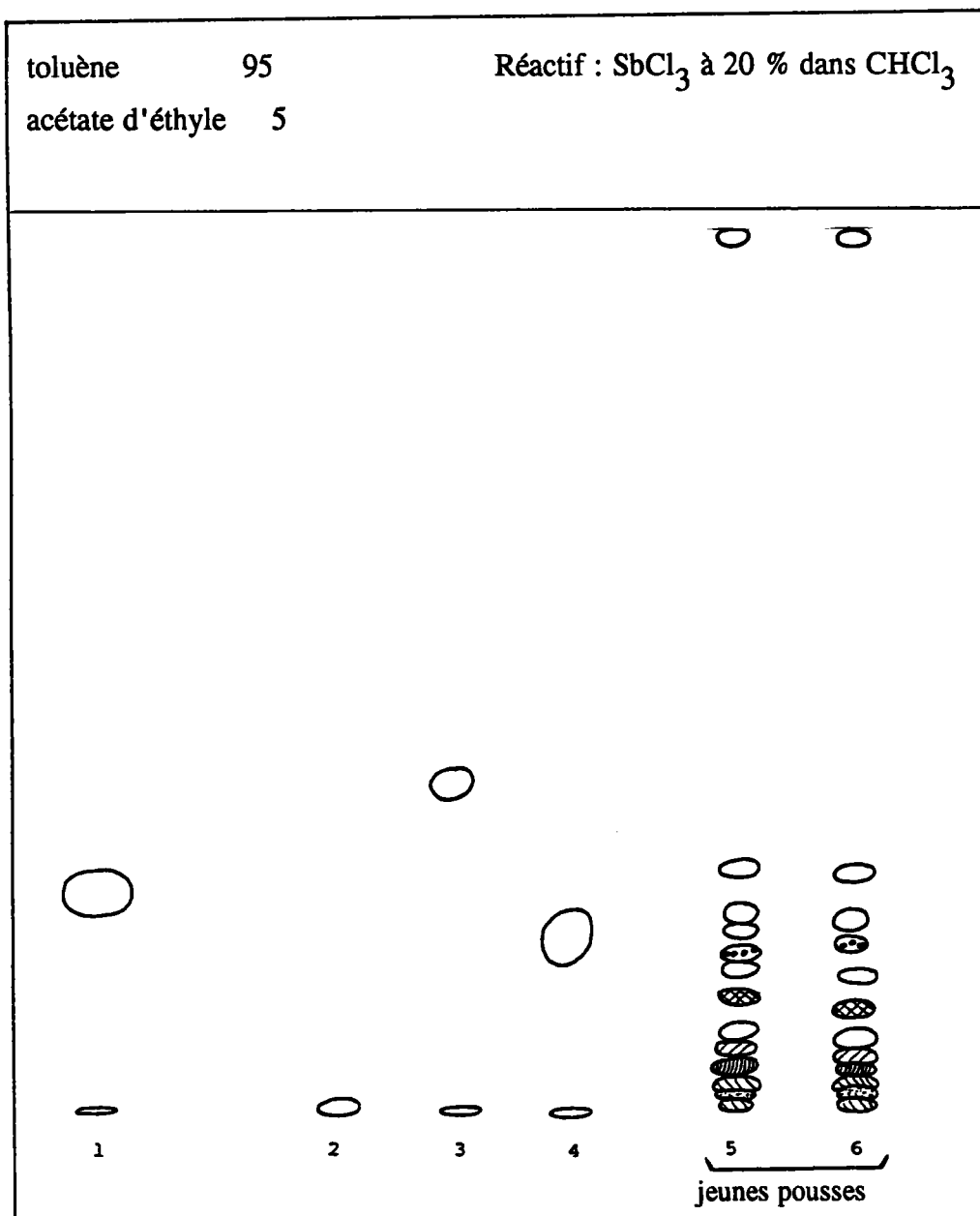


FIGURE 20 : Chromatogramme sur couche mince de l'extrait aqueux de jeunes pousses de *R. officinalis* : Caractérisation des triterpènes

1 : α -amyrine ; 2 : ac. oléanolique ; 3 : cinéol ; 4 : terpinéol

5 et 6 : fraction chloroformique de l'extrait aqueux de jeunes pousses (K2)

Légende :

○	jaune	○	jaune rose	○	bleu	○	rose
○	vert jaune	○	marron	○	orange		

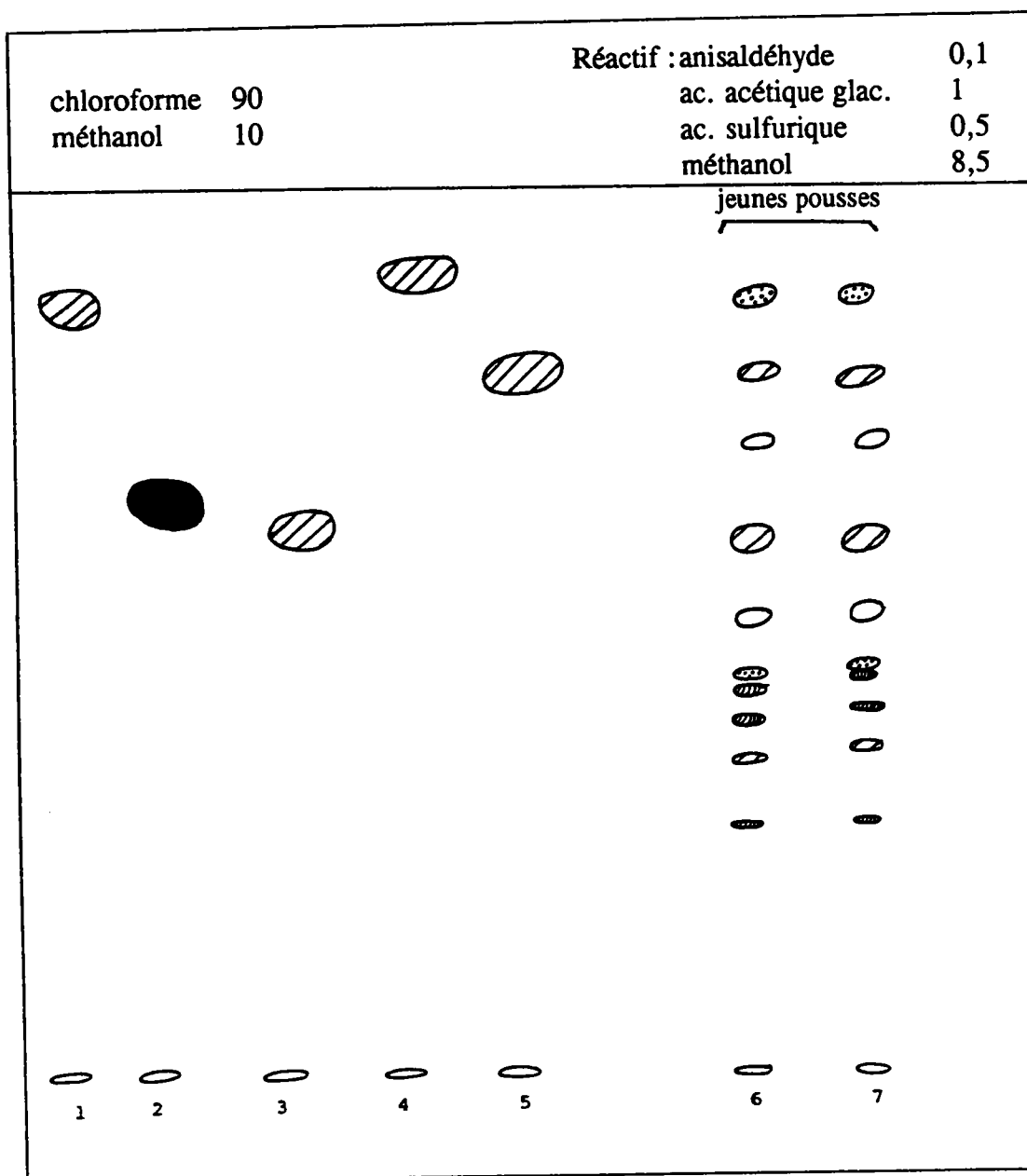


FIGURE 21 : Chromatogramme sur couche mince de l'extrait aqueux de jeunes pousses de *R. officinalis* : Caractérisation des triterpènes.

1 : α -amyrine ; 2 : ac. ursolique ; 3 : ac. oléanolique ; 4 : cinéol ; 5 : terpinéol
6 et 7 : fraction chloroformique de l'extrait aqueux de jeunes pousses (K2)

Légende :

violet	brun	orange
vert jaune	jaune	

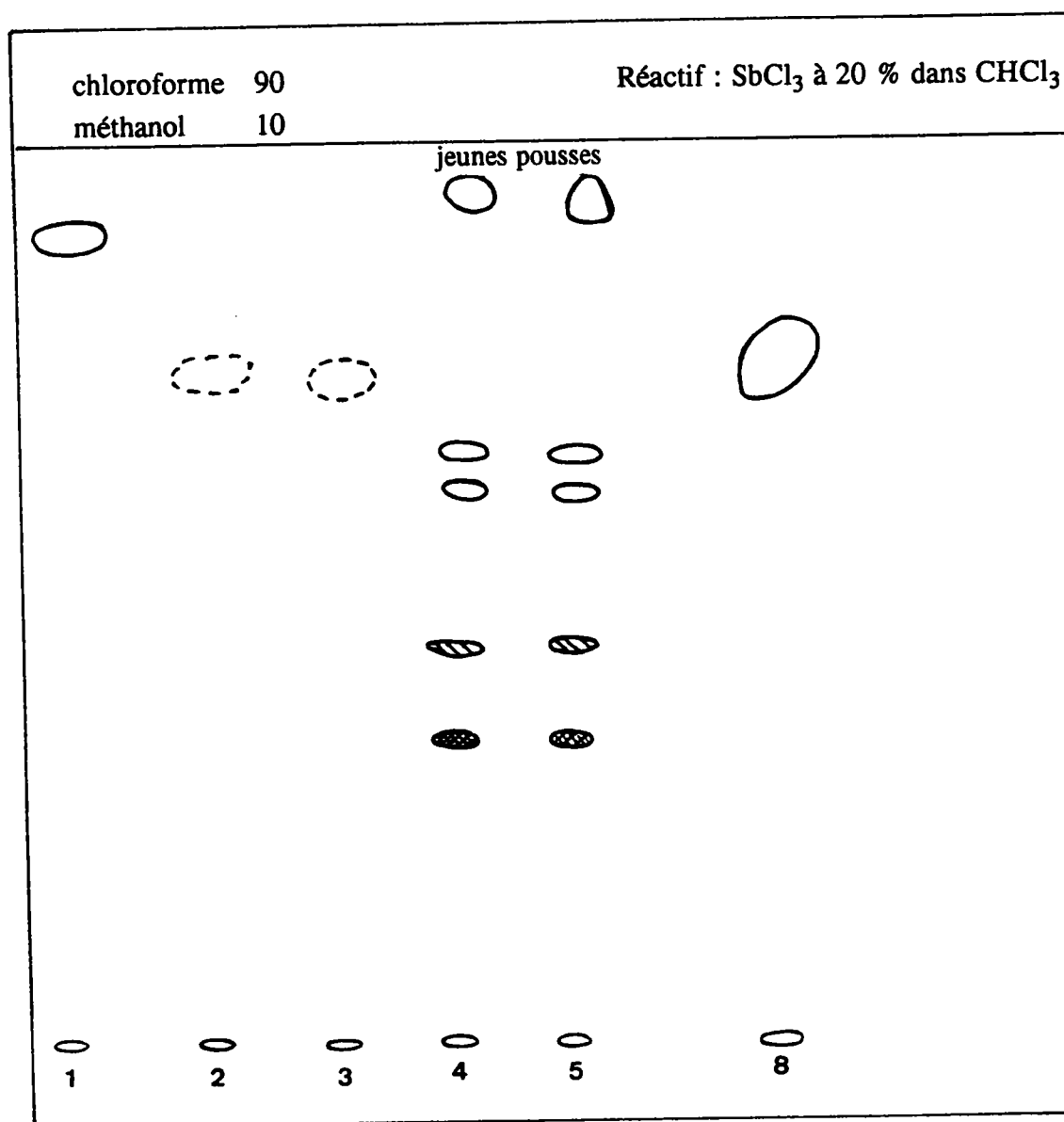


FIGURE 22 : Chromatogramme sur couche mince de l'extrait aqueux de jeunes pousses de *R.officinalis* : Caractérisation des triterpènes.

1 : α -amyrine ; 2 : ac.ursolique ; 3 : ac.oléanolique ; 8 : cinéol

4 et 5 : fraction chloroformique de l'extrait aqueux de jeunes pousses (K2)

Légende : jaune bleu orange
 jaune pâle

III. CONCLUSION

L'empreinte chimique réalisée à partir de l'extrait aqueux de jeunes pousses de *R. officinalis* a permis de vérifier la présence de tanins (type tanins galliques), de composés flavonosidiques, d'acides phénols, de nombreux composés réducteurs, de composés terpéniques (notamment terpinéol et acide oléanolique), ainsi que des sels minéraux tels que K^+ , Na^+ , Ca^{++} et Cl^- .

Une analyse par HPLC, réalisée en collaboration avec M. Y. DIERCKXSENS des laboratoires DOLISOS à BRUXELLES (JOYEUX et coll., 1988), a permis de quantifier précisément la présence d'acides rosmarinique, chlorogénique et caféique, ainsi que la présence de lutéoline-7-glucoside dans les extraits aqueux de jeunes pousses (ref.I et K du tableau 7). Parmi ces composés, c'est l'acide rosmarinique qui est en plus forte concentration dans les extraits.

La caractérisation chimique étant effectuée, nous aborderons l'étude pharmacologique des jeunes pousses par la mesure de la dose létale 50 chez la souris.

CHAPITRE III

ETUDE TOXICOLOGIQUE DES JEUNES POUSSES DE *ROSMARINUS OFFICINALIS* L.

Lorsqu'une plante médicinale fait l'objet d'une étude pharmacologique, il est indispensable d'évaluer la toxicité potentielle de cette plante et de ses extraits. Pour cela nous avons choisi d'effectuer un test de toxicité aigüe, en l'occurrence la détermination de la dose létale 50 (DL 50) chez la souris, sur un extrait aqueux de jeunes pousses de *R. officinalis* (l'extraction aqueuse étant la forme de préparation la plus usitée dans les tests pharmacologiques). La DL 50 permettra de connaître la plus petite dose qui, administrée en une seule fois, entraîne la mort de 50 % des animaux.

I. EVALUATION DE LA DOSE LETALE 50 (DL 50)

1. Protocole expérimental

La toxicité aigüe est étudiée sur des lots de 10 souris Swiss mâles (Césal, Montmédy) pesant de 20 à 22 g. Les animaux se trouvent dans les conditions décrites au Chapitre I précédent (2^{ème} partie).

L'extrait est injecté par voie intra-péritonéale. Cette voie donne des résultats rapides se rapprochant de ceux que fournirait la voie intra-veineuse, du fait de l'hyper-vascularisation du péritoine.

Les mortalités sont relevées à 1 h, 24 h, 48 h et 7 jours après l'injection de l'extrait.

L'extrait testé est l'extrait aqueux de jeunes pousses de *R. officinalis* (réf.D, Tableau 7). Les doses testées sont croissantes de 10 à 22 g/kg (plante sèche/poids corporel) et de raison 4.

****Généralement, les doses testées dans ce type de protocole expérimental sont inférieures à 5 g de matière végétale/kg ; toutefois, il nous a paru nécessaire d'effectuer les tests de toxicité aux doses supérieures à 5 g/kg.**

2. Résultats (Tableau 9)

Aucune mortalité n'a été observée jusqu'à 22 g/kg (plante sèche/poids corporel) (voie ip) pour l'extrait aqueux de jeunes pousses de *R. officinalis*.

TABLEAU 9 : Evaluation de la toxicité aigüe de l'extrait aqueux (D) de jeunes pousses de *R. officinalis* chez la souris (voie ip)

DOSES	N	MORTALITE AU TEMPS				%
		T =				
g/kg		1 h	24 h	48 h	7 jours	mortalité
10	10	0	0	0	0	0
14	10	0	0	0	0	0
18	10	0	0	0	0	0
22	10	0	0	0	0	0

N : nombre d'animaux par lot

3. Conclusion

Les résultats obtenus avec l'extrait aqueux de jeunes pousses ne montrent aucun effet toxique jusqu'à la dose intra-péritonéale de 22g/kg. Cette dose étant largement supérieure à la dose limite courante des tests de toxicité (5g/kg), il n'a pas été jugé utile de poursuivre l'investigation vers une étude symptomatologique sur 15 jours.

Les autres formes d'extraction de *R. officinalis* (hydro-alcoolique et glycéro-alcoolique) n'ont pas été soumises au test de toxicité en raison de la non-toxicité de l'extrait aqueux de jeunes pousses jusqu'à la dose de 22 g/kg.

Nous poursuivons ce travail par l'étude pharmacologique et en premier lieu par la recherche d'une activité cholérétique des jeunes pousses.

CHAPITRE IV

**RECHERCHE D'UNE ACTIVITE CHOLERETIQUE DES JEUNES
POUSSES DE *ROSMARINUS OFFICINALIS* L.**

I. INTRODUCTION

1. Utilisation en médecine traditionnelle et en phytothérapie

Comme nous l'avons vu précédemment dans le chapitre II (1^{ère} partie), les tradipraticiens du Maroc et de l'Afrique du Nord en général, prescrivent *R. officinalis* (drogue) pour ses vertus digestives et emménagogues. En France, le ministère chargé de la Santé et de la Famille (Avis 90/22 bis sur les médicaments à base de plante) retient comme indication celle de :

"faciliter les fonctions rénales et digestives"

et plus particulièrement :

"pour faciliter l'élimination de la bile et faciliter la digestion".

Nous avons donc choisi d'étudier l'activité cholérétique de cette plante, et notamment celle de ses jeunes pousses, qui sont préconisées en gemmothérapie (en macérat glycéro-alcoolique) dans le cas des insuffisances hépatiques, de dyskinésies biliaires (par hyper ou hypotrophie) et dans le cas de colites hépatiques.

2. Données bibliographiques sur l'activité cholérétique de *R.officinalis*

L'étude pharmacologique de *R.officinalis* a débuté dès 1929 par PARTURIER et ROUSSELLE (cités par FOURNIER, 1948) qui observent chez l'homme une sécrétion très accrue de la bile et une modification de la bile B (sels biliaires, bilirubine, hormones,...) après injection de *R. officinalis* (type d'extrait non précisé).

* Puis, l'étude pharmacologique s'est appliquée à l'expérimentation chez le chien. En 1932, CHABROL et ses collaborateurs, qui étudiaient les propriétés pharmacologiques de nombreuses Lamiacées et Astéracées, mettaient en évidence l'activité cholérétique d'un extrait aqueux de *R. officinalis*.

Une décoction de feuilles de romarin (100 ml de décoction à 5 %) injectée par voie intra-veineuse chez le chien avait pour effet de tripler le volume biliaire dans les trente minutes qui suivaient l'injection. Ils émettaient l'hypothèse que le principe actif du romarin était apparenté aux acides-phénols.

Dans les mêmes conditions expérimentales, l'essence de romarin n'avait aucun effet sur la cholérèse.

* Puis, BALANSARD (1953), confirmait que l'infusé de romarin avait une action cholérétique (+50 %) immédiate, mais fugace, lorsqu'il était administré chez le chien chloralosé, à la dose intra-veineuse de 500 mg/kg d'équivalent plante fraîche.

BALANSARD a isolé un hétéroside des feuilles de romarin, le romarinoside, qui aurait une action cholérétique de plus de 33 % à la dose de 20 mg/kg et de plus de 100 % à la dose de 40 mg/kg.

* Ces expériences ont été reprises par DELAS et LAGREU en 1954. Les auteurs ont confirmé que le décocté de romarin (dose non précisée) induisait une augmentation de 100% du flux biliaire, pendant les 30 à 45 premières minutes qui suivaient l'injection intra-veineuse chez le chien chloralosé.

* En 1970, LALLEMENT-GUILBERT et BEZANGER-BEAUQUESNE démontraient que l'injection intra-veineuse d'une solution d'extrait flavonique, correspondant à 1,7 g de feuilles sèches de romarin, induisait une augmentation de la cholérèse chez le rat. Ces auteurs ont confirmé également l'inactivité de l'huile essentielle sur la cholérèse (à raison de 35 mg d'huile essentielle par animal).

3. Données bibliographiques sur l'activité antispasmodique et cholagogue de *R.officinalis*

*En 1954, DELAS et LAGREU démontraient chez le chien, que le décocté de romarin abolissait les contractions vésiculaires et entraînait un relachement de la vésicule biliaire.

*En 1970, LALLEMENT-GUILBERT et BEZANGER-BEAUQUESNE démontraient l'activité antispasmodique de l'extrait flavonique de romarin sur l'iléon isolé de cobaye (activité de type musculotrope, car inhibée par le chlorhydrate de papavérine).

*En 1988, TADDEI et ses collaborateurs montraient que l'huile essentielle de romarin (en solution à 1 % dans le Tween) inhibait la contraction musculaire, induite électriquement sur l'iléon isolé de cobaye. La dose efficace 50 de l'huile essentielle de romarin était de 0,17 mg/ml. De plus, pour la dose la plus faible d'huile essentielle de romarin, l'activité antispasmodique était précédée par une augmentation initiale de la réponse de contraction sous stimuli électriques.

Cette double action antagoniste "spasmolytique et spasmogène" se produit également avec l'un des constituants majeurs de l'huile essentielle de romarin qui est le pinène.

Ces tests pharmacologiques nous renseignent sur l'activité cholérétique des extraits de romarin (décocté, infusé, extrait flavonique). Avant d'aborder l'étude de l'activité cholérétique de ses jeunes pousses, nous allons faire un bref rappel sur les mécanismes de formation de la bile.

II. RAPPELS SUR LE MECANISME DE FORMATION DE LA BILE

1. Rôle de la bile

La bile joue un rôle primordial dans la digestion, par la présence des acides biliaires qui entrent dans sa composition ; elle permet notamment l'absorption intestinale des graisses. Ces acides biliaires sont synthétisés dans le foie, à partir du cholestérol, et sont excrétés dans la bile, sous forme de sels alcalins conjugués à des acides aminés (la taurine et la glycine).

Dans l'intestin, la bile émulsionne les graisses, favorise leur saponification par la lipase pancréatique ; elle solubilise les acides gras libérés et aide à neutraliser le chyme acide, grâce à son ph alcalin (ph de 7,1 à 7,3).

Les substances excrétées dans la bile (acides biliaires, phospholipides biliaires, pigments biliaires) sont en partie réabsorbées à partir de l'intestin grêle et passent en partie dans la circulation entéro-hépatique.

La circulation entéro-hépatique des sels biliaires représente seulement 20 à 25 % du pool total des sels biliaires; ceux-ci sont réabsorbés jusqu'à l'iléon où ils regagnent le système porte, liés aux protéines plasmatiques, spécialement à l'albumine (EAKINS dans SLATER, 1978).

2. Formation de la bile

La bile est formée dans les hépatocytes et se déverse dans les canalicules biliaires formés par la membrane plasmique canaliculaire des hépatocytes. Les canalicules biliaires se rassemblent pour former des canaux biliaires, où la bile est susceptible de subir des

modifications (excrétion, réabsorption d'eau et de sels minéraux) sous l'influence d'hormones telles que la secrétine, la gastrine et la somatostatine. Finalement, la bile est déversée dans le canal cholédoque.

Les hépatocytes sont des cellules polaires, dans lesquelles le processus de transport est dirigé du captage des solutés à travers les membranes des sinusoides, vers leur sécrétion à travers la surface apicale de la lumière des canalicules biliaires (Figure 23). Les complexes de jonctions séparent ces deux zones de membranes apicales et forment une barrière entre la bile et l'espace intercellulaire.

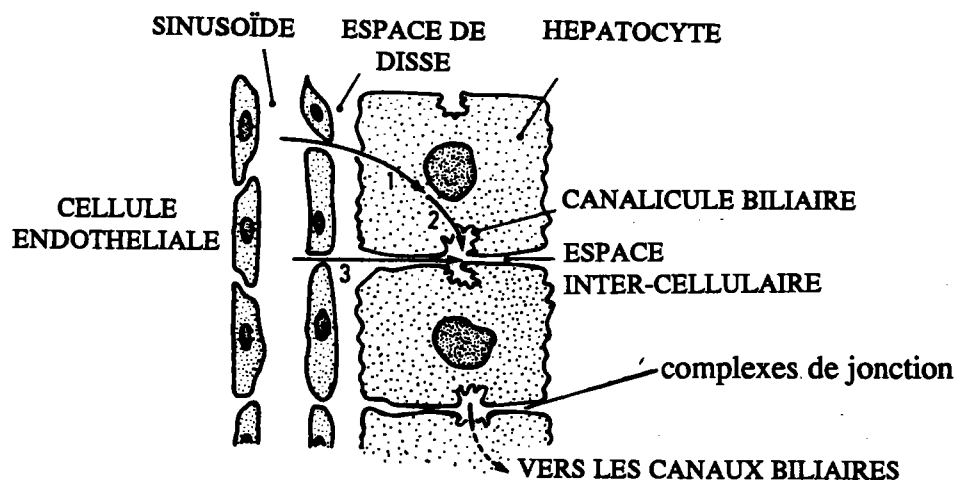


FIGURE 23 : Voies anatomiques pour l'entrée des solutés du sang vers la bile. Les solutés peuvent passer dans la bile par la voie transcellulaire, après avoir été pris en charge et transportés par l'hépatocyte (1) et excrétés par la membrane canaliculaire (2), ou par la voie paracellulaire (3) grâce aux jonctions intercellulaires. D'après ERLINGER dans THE LIVER : BIOLOGY AND PATHOLOGY, 1982)

III. MESURE DE L'ACTIVITE CHOLERETIQUE DES JEUNES POUSSES

La majeure partie des tests pharmacologiques mettant en évidence l'effet cholérétique d'une substance sont effectués *in vivo* chez le rat et nous choisirons ce modèle pour des raisons d'homogénéité de travail et de standardisation.

Le rat étant dépourvu de vésicule biliaire, l'activité cholagogue ne sera pas abordée.

Nous nous limiterons à l'étude des propriétés cholérétiques.

Le protocole expérimental choisi est celui décrit par CORBIC et coll. en 1982, et qui a pour particularité de rétablir artificiellement la circulation entéro-hépatique des sels biliaires, interrompue par le cathétérisme du canal cholédoque, en perfusant un sel biliaire de substitution (le taurocholate de sodium).

1. Procédure expérimentale

1.1. Matériel et méthode

* Animaux : les tests sont réalisés sur des rats mâles OFA pesant $300 \text{ g} \pm 50$ et soumis aux conditions d'élevage décrites précédemment (Chapitre I, II^{ème} partie).

* Anesthésie : les rats sont mis à la diète solide durant 18 heures avant l'expérimentation. Celle-ci débute par une anesthésie au pentobarbital sodique (Nembutal^R, Abbott, Paris, France) injecté par voie intra-péritonéale à la dose de 60 mg/kg. Cette anesthésie est contrôlée pendant toute la durée de l'expérimentation et supplémentée, si besoin est, par l'injection d'une dose faible de pentobarbital sodique (20 mg/kg par voie intra-péritonéale) au bout de 2 à 3 heures.

La température corporelle abdominale de l'animal est contrôlée régulièrement, à l'aide d'un thermomètre à mercure, et maintenue à $38^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ par l'intermédiaire de la table d'opération chauffante et d'un éclairage frontal.

* Cathétérisme du canal cholédoque : le canal cholédoque est cathétérisé après laparotomie médiane, avec un cathéter en polyéthylène (n°1, Biotrol, Paris, France). La bile est ainsi recueillie toutes les 10 minutes dans des microtubes plastiques de 0,5 ml, par l'intermédiaire d'un collecteur de fractions (GILSON France, modèle 201).

* Perfusion : une solution de taurocholate de sodium (Sigma Chemicals Co., St Louis MO, U.S.A.) est perfusée par l'intermédiaire du cathétérisme de la veine jugulaire, à débit constant ($7,5 \mu\text{l}/\text{min}$; $0,2 \mu\text{M}$ de taurocholate de sodium/ $\text{min}/100\text{g}$ dissout dans une solution physiologique à $0,9 \%$ de NaCl). La perfusion prend effet à partir de l'instant où le canal cholédoque est cathétérisé, afin de palier à la déplétion en acides biliaires induite par l'interruption du canal cholédoque.

* Injection d'extrait : au bout de 60 minutes d'excrétion, lorsque le flux biliaire basal s'est stabilisé, l'extrait dissout dans la solution de perfusion est injecté par voie intra-veineuse, au même débit que la perfusion.

* Mesures : la bile est recueillie durant les 210 minutes de l'expérimentation et le flux biliaire est apprécié par des mesures gravimétriques.

* Extrait : on utilisera un extrait hydro-alcoolique de jeunes pousses de *R.officinalis* (ref. MCO7) aux doses de 500, 1000 et 2000 mg/kg (plante sèche/poids corporel).

* Substance de référence : Déhydrocholate de sodium (DHC) ; nous avons choisi une substance cholérétique de synthèse, connue pour son efficacité d'action, le déhydrocholate de sodium (DHC) (Dycholium^R, Théraplix S.A., Paris, France), utilisé à la dose intra-veineuse de 10 mg/kg.

* Témoins : les témoins de contrôle sont des animaux ne recevant que la solution de perfusion durant les 210 minutes de l'expérimentation. Ceci permet d'évaluer l'évolution du flux biliaire au cours du temps.

D'autre part, chaque animal est pris comme son propre témoin, puisque les variations du flux biliaire après l'injection de l'extrait sont rapportées au flux biliaire de base qui correspond aux 60 premières minutes d'excrétion de la bile.

Nous utiliserons des lots de 4 à 6 rats, pour chaque dose testée.

1.2. Expression des résultats

* Pour chaque animal, les mesures du flux biliaire sont exprimées en mg de bile excrétée pendant 10 minutes pour 100 g de poids corporel :

$$\text{mg/10min/100g}$$

* Pour chaque animal, le flux basal est déterminé en calculant l'excrétion moyenne de bile durant les 60 premières minutes de l'expérimentation rapporté à une période de 30 minutes :

$$\text{Flux basal (Fo) : mg/30min/100g}$$

* Pour chaque animal, le flux biliaire est déterminé en mesurant l'excrétion de bile après l'injection des extraits sur des périodes de 30 minutes :

$$\text{Flux biliaire (Fn) : mg/30min/100g}$$

n : 30 min, 60 min, 90 min, 120 min et 150 min après l'injection de l'extrait

* Pour chaque animal, l'importance et l'évolution du flux biliaire sont estimées en déterminant des pourcentages de variation du flux biliaire, calculés suivant la formule :

$$\% \text{ Flux biliaire/Flux basal : } [(Fn - Fo)/Fo] \times 100$$

n : 30 min, 60 min, 90 min, 120 min et 150 min après l'injection de l'extrait

1.3. Analyse statistique

Après vérification de l'homogénéité des variances par le test de Bartlett, les comparaisons statistiques entre les différents lots témoins et traités sont effectuées à l'aide du test t de Student, sur les pourcentages de variation du flux biliaire après l'injection des extraits :

$$[(Fn - Fo)/Fo] \times 100$$

2. RESULTATS

Les résultats des tests de cholérèse sont présentés dans les tableaux 10 et 11, ainsi que les figures 24 à 27.

2.1. Profil général de l'excrétion biliaire chez le rat

Les résultats sont présentés dans les figures 24 et 25.

L'excrétion biliaire est suivie pendant 210 minutes, dont les 60 premières correspondent au flux basal et servent à stabiliser le débit biliaire après la mise en place de la perfusion de taurocholate de sodium. Puis, à partir de l'injection iv au temps $T = 60$ min, le flux biliaire est soumis aux variations induites par la substance injectée.

* Profil témoin (Fig. 24)

La courbe du témoin montre une diminution lente et progressive du flux biliaire (d'environ 1 % toutes les 10 minutes) pendant toute la durée de l'expérimentation.

* Extrait hydro-alcoolique de jeunes pousses 1000 mg/kg (Fig. 25)

L'extrait hydro-alcoolique de jeunes pousses, administré à la dose de 1000 mg/kg, entraîne une augmentation du flux biliaire, dans les 10 premières minutes qui suivent l'injection. Le maximum de débit biliaire est atteint 20 minutes après l'injection (+22 %), puis il diminue progressivement pour rejoindre le flux basal au bout de 120 minutes.

TABLEAU 10 : Influence de l'extrait hydro-alcoolique de jeunes pousses de *R. officinalis* (iv) sur la cholérèse chez le rat

Lots	N	Flux biliaire moyen (mg/ 30min/ 100 g) m $\pm$ s.e.					
		Base	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min
Témoins	5	259 $\pm$ 10	250 $\pm$ 8	243 $\pm$ 8	237 $\pm$ 8	227 $\pm$ 6	220 $\pm$ 8
Jeunes pousses 500 mg/kg	5	257 $\pm$ 11	280 $\pm$ 10	258 $\pm$ 11	246 $\pm$ 11	239 $\pm$ 9	229 $\pm$ 11
Jeunes pousses 1000 mg/kg	6	211 $\pm$ 9	257 $\pm$ 9	232 $\pm$ 8	218 $\pm$ 8	208 $\pm$ 7	205 $\pm$ 5
Jeunes pousses 2000 mg/kg	6	190 $\pm$ 10	233 $\pm$ 11	224 $\pm$ 8	198 $\pm$ 6	185 $\pm$ 5	177 $\pm$ 5
D.H.C. 10 mg/kg	6	240 $\pm$ 7	323 $\pm$ 24	251 $\pm$ 9	233 $\pm$ 8	237 $\pm$ 6	233 $\pm$ 11

N : nombre d'animaux par lot

TABLEAU 11 : Activité cholérétique de l'extrait hydro-alcoolique de jeunes pousses de *R. officinalis*, (iv), chez le rat

Lots	N	Pourcentage de variation du flux biliaire (%) m $\pm$ s.e.					
		Base	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min
Témoins	5	0	-3,5 $\pm$ 1,4	-6,2 $\pm$ 1,3	-8,2 $\pm$ 1,2	-12,1 $\pm$ 1,4	-15,0 $\pm$ 1,0
Jeunes pousses 500 mg/kg	5	0	9,0*** $\pm$ 1,9	0,5* $\pm$ 2,0	-4,3* $\pm$ 0,7	-6,8* $\pm$ 1,7	-10,6 ^a $\pm$ 1,3
Jeunes pousses 1000 mg/kg	6	0	22,4*** $\pm$ 2,0	10,3*** $\pm$ 1,6	3,5** $\pm$ 2,0	-0,9** $\pm$ 2,5	-2,2** $\pm$ 2,5
Jeunes pousses 2000 mg/kg	6	0	22,4*** $\pm$ 1,2	18,5*** $\pm$ 3,5	4,7* $\pm$ 3,6	-1,9* $\pm$ 3,3	-6,2* $\pm$ 3,3
D.H.C. 10 mg/kg	6	0	34,2*** $\pm$ 6,9	4,6*** $\pm$ 2,6	-2,8 ^a $\pm$ 2,6	-1,2* $\pm$ 1,9	-2,9** $\pm$ 2,5

Différence significative par rapport aux témoins : *** : $p \leq 0,001$; ** : $p \leq 0,01$; * : $p \leq 0,05$

^a : non significatif ; N : nombre d'animaux par lot

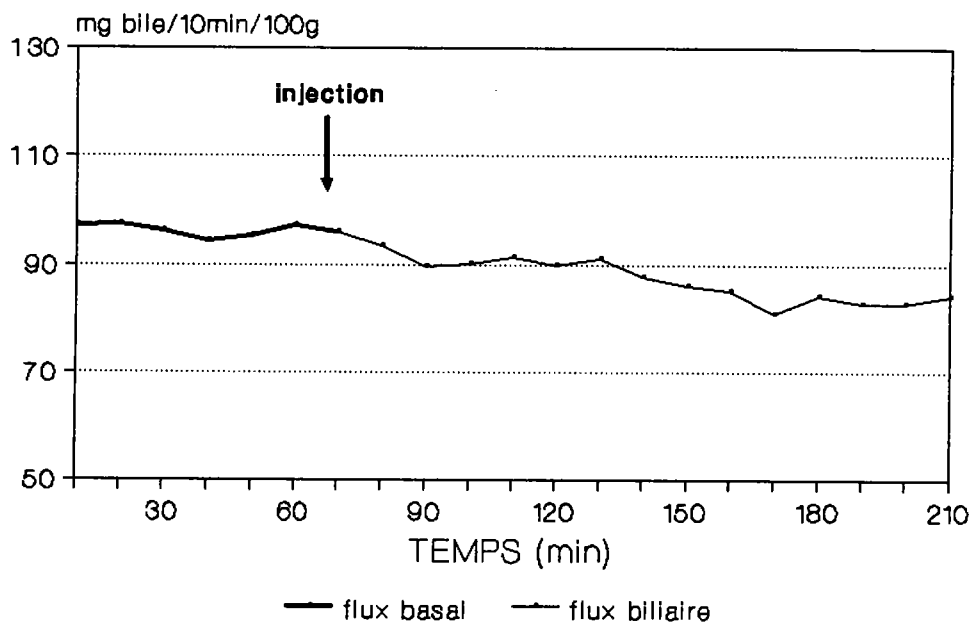


FIGURE 24 : Profil de la cholérèse chez un rat témoin

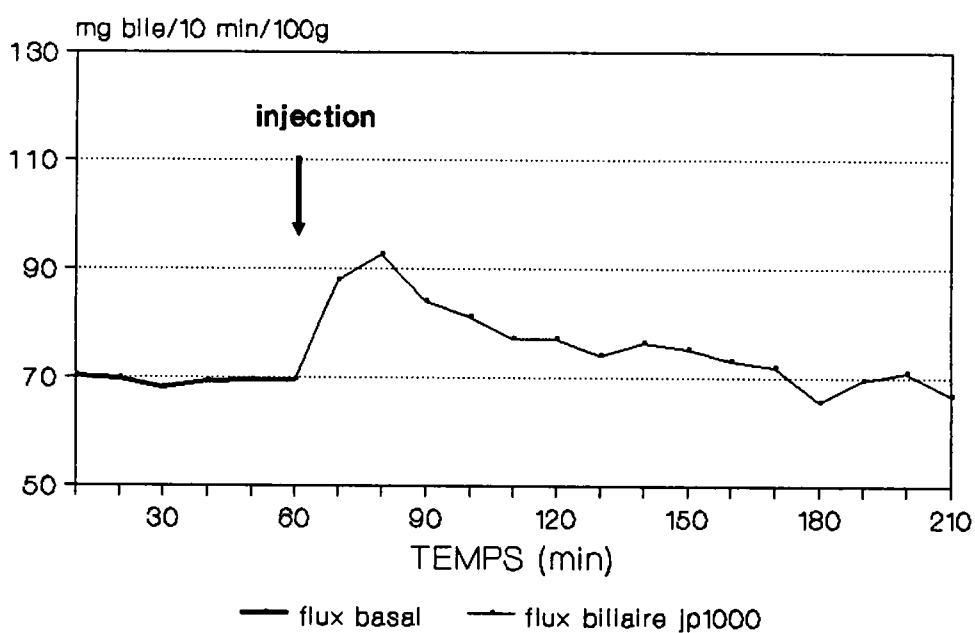


FIGURE 25 : Profil de la cholérèse chez le rat, induite par l'injection iv d'un extrait hydro-alcoolique de jeunes pousses de *R.officinalis* à 1000 mg/kg.

2.2. Activité cholérétique de la substance de référence : DHC

Les résultats sont présentés dans les tableaux 10 et 11, et la figure 26.

A la dose de 10 mg/kg, le DHC entraîne une augmentation très importante du flux biliaire, dès les 30 premières minutes qui suivent l'injection (34,2 % ; $p \leq 0,001$). Cependant, cette hypercholérèse est fugace, et chute à 4,6 % ($p \leq 0,001$) 60 minutes après l'injection, pour rejoindre le flux basal au bout de 90 minutes.

Les résultats obtenus avec le DHC sont conformes à la littérature et permettent de valider l'expérimentation, pour l'étude des propriétés cholérétiques d'une substance.

2.3. Activité cholérétique des jeunes pousses de *R.officinalis*

Les résultats sont présentés dans les tableaux 10 et 11 et sur la figure 27.

L'extrait hydro-alcoolique de jeunes pousses provoque une hypercholérèse chez le rat, à partir de la dose de 500 mg/kg. Celle-ci se traduit par une augmentation significative du flux biliaire dès les premières minutes qui suivent l'injection de l'extrait. L'augmentation est de 9 % ($p \leq 0,001$) pour la dose de 500 mg/kg et de 22,4 % ($p \leq 0,001$) pour les doses de 1000 et 2000 mg/kg.

A la dose de 500 mg/kg, le flux biliaire diminue progressivement pour rejoindre le flux de base au bout de 60 minutes (0,5 % ; $p \leq 0,05$).

A la dose de 1000 mg/kg, le flux biliaire diminue progressivement jusqu'à 10,3 % ($p \leq 0,001$) à 60 minutes, puis jusqu'à 3,5 % ($p \leq 0,01$) à 90 minutes.

Pour la dose de 2000 mg/kg le flux biliaire reste significativement élevé pendant 60 minutes (18,5 % ; $p \leq 0,001$), puis rejoint le flux basal au bout de 120 minutes (-1,9 %).

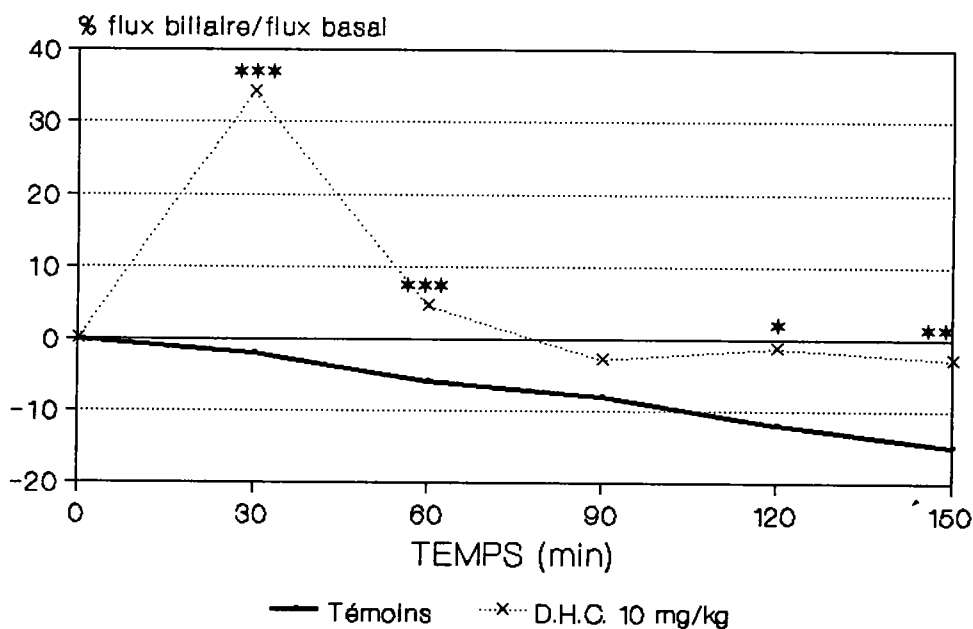


FIGURE 26 : Profil de la cholérèse chez le rat, induite par le DHC à 10 mg/kg (iv).

Significativité : * : $p \leq 0,05$; ** : $p \leq 0,01$; *** : $p \leq 0,001$

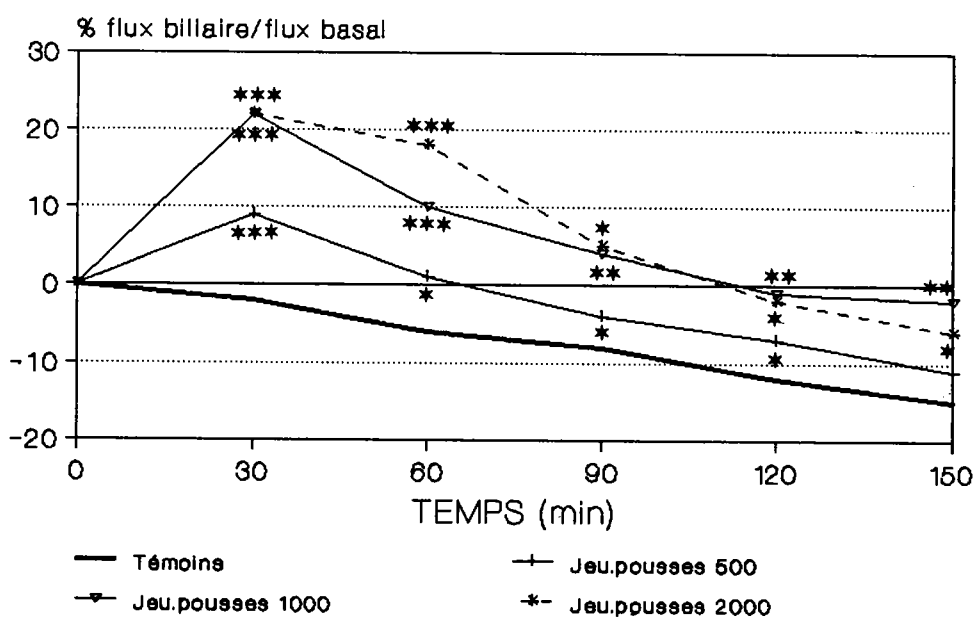


FIGURE 27 : Activité cholérétique chez le rat, induite par l'extrait hydro-alcoolique de jeunes pousses de *R. officinalis* (iv)

Significativité : * : $p \leq 0,05$; ** : $p \leq 0,01$; *** : $p \leq 0,001$

3. Discussion

D'une manière générale, les extraits hydro-alcooliques de jeunes pousses de *R.officinalis* ont montré une activité cholérétique mesurable sur le modèle d'étude de la cholérèse chez le rat. Nous avons ainsi confirmé que la tradition, attribuée à la drogue (sommités fleuries), s'appliquait aussi aux jeunes pousses.

Les résultats nous permettent d'élaborer une relation Dose/Effet qui montre une corrélation positive entre la dose de l'extrait et son activité cholérétique (Figure 27). Les jeunes pousses montrent une activité cholérétique mesurable et significative dès la dose de 500 mg/kg, qui augmente en amplitude et en durée d'action jusqu'à 2000 mg/kg. L'hypercholérèse instantanée (à 30 min) augmente en fonction de la dose jusqu'à se stabiliser à 1000 mg/kg avec 22 % d'augmentation du flux biliaire. Pour une dose supérieure, l'activité cholérétique est prolongée dans le temps.

Nous retiendrons comme dose efficace et suffisante pour l'extrait hydro-alcoolique de jeunes pousses de *R.officinalis* : 1000 mg/kg (voie iv).

Nous venons de démontrer dans ce test pharmacologique que les extraits de jeunes pousses de *R.officinalis* induisaient un processus hépatique qui se traduit par une augmentation de l'excrétion biliaire. Cette augmentation est exploitée en thérapeutique puisqu'elle "facilite la digestion" des graisses notamment. Cette augmentation peut provenir d'une stimulation réelle de l'hépatocyte et de la production de bile, mais elle peut provenir également d'une réponse à l'élimination de l'extrait par l'organisme, par l'intermédiaire de processus de détoxification qui agissent en favorisant l'élimination du toxique ou de ses métabolites, en augmentant l'excrétion biliaire.

C'est pour cela que nous avons choisi de cerner un autre domaine d'activité de la sphère hépatique, par l'étude des propriétés anti-hépatotoxique des jeunes pousses de *R.officinalis*.

CHAPITRE V

RECHERCHE D'UNE ACTIVITE ANTIHEPATOTOXIQUE DES JEUNES POUSSES DE *ROSMARINUS OFFICINALIS*

I. INTRODUCTION

1. La pathologie hépatique

Les "maladies du foie" constituent actuellement un problème médical majeur à l'échelon mondial. En Afrique et en Asie, les pathologies sont d'origine virale et parasitaire. En Europe, en Amérique du Nord et dans tous les pays développés en général, la pathologie hépatique est d'origine virale (hépatites), mais aussi d'origine chimique par la pollution industrielle, la toxicomanie, l'alcoolisme, l'abus alimentaire, certains traitements médicamenteux (médicaments du système nerveux central, antibiotiques, certains analgésiques, médicaments de la chimiothérapie (HIKINO et coll., 1984)).

Ainsi, la découverte de composés actifs susceptibles d'améliorer le traitement des affections hépatiques et des phénomènes toxiques en particulier constitue actuellement un domaine de recherche important.

Quel que soit le facteur causal, la réaction du foie se traduit par une série d'événements qui peuvent être analysés aux niveaux moléculaire, cellulaire et tissulaire.

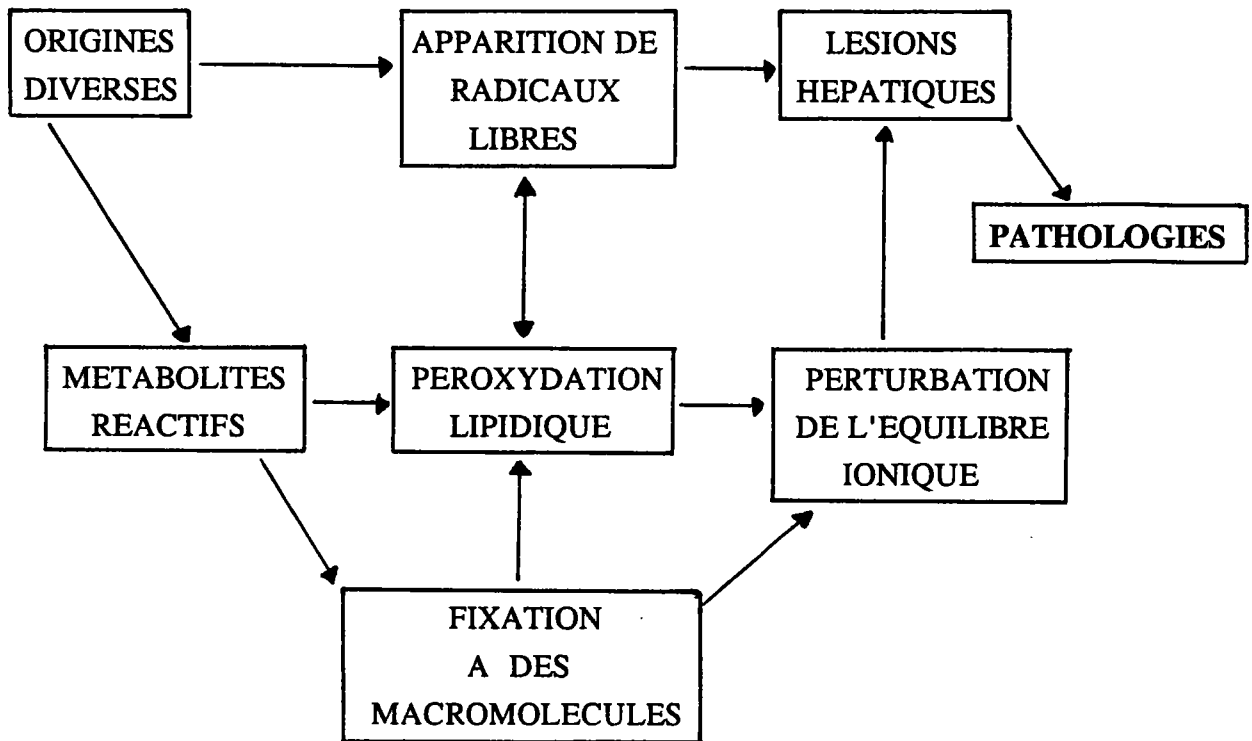
Les causes étant diversifiées, l'atteinte hépatique peut être de différente nature :

hépatite aigüe : —→ nécrose —→ stéatose —→ inflammation

hépatite chronique : —→ nécrose —→ inflammation —→ fibrose —→ cirrhose

mais dans tous les cas elles entraînent l'altération des fonctions essentielles du foie et, à leur terme ultime, un processus morbide.

Au niveau moléculaire et quel que soit l'agent toxique, l'initialisation du processus hépatotoxique est le suivant :



Les protections contre ces agressions peuvent avoir deux origines :

- * l'une, intrinsèque à la cellule, représentée par le matériel d'auto protection cellulaire, c'est-à-dire le glutathion intra-cellulaire, les enzymes intervenant dans la synthèse du glutathion, les processus de conjugaison (acétylation, sulfonation, méthylation) et les antioxydants naturels tels que les vitamines C et E.

- * l'autre, extrinsèque à la cellule, représentée par des agents hépatoprotecteurs qui réduisent la production de métabolites réactifs. Ils peuvent intervenir également comme co-substrats d'enzymes impliqués dans la détoxification des radicaux libres (par ex. : glutathion et son précurseur la cystéine) ou pour stabiliser les membranes cellulaires ou subcellulaires (en augmentant la résistance membranaire) (GUILLOUZO et coll., 1989).

2. Données bibliographiques sur le pouvoir antioxydant du romarin

Dans la tradition, le romarin est employé pour ses propriétés antioxydantes dans la conservation des aliments et des graisses. A partir de 1952 et jusqu'en 1956, CHIPAULT et ses collaborateurs entreprirent l'étude de différentes épices (dont le romarin) sur des modèles expérimentaux de conservation des graisses et de charcuteries. La méthode d'évaluation de l'indice d'antioxydation était basée sur le dosage des peroxydes. Ces auteurs ont montré que le romarin (l'extrait utilisé n'est pas précisé) possédait une bonne activité antioxydante. Depuis lors, ces résultats ont été confirmés par HERRMANN en 1962, puis par HARTMANN et ses collaborateurs en 1980 sur d'autres tests d'antioxydation.

3. Choix des modèles pharmacologiques pour l'intoxication hépatique

Compte-tenu des propriétés antioxydantes du romarin et donc de son action sur les peroxydes, nous avons choisi d'évaluer le pouvoir antihépatotoxique des jeunes pousses à partir d'un modèle d'intoxication hépatique induisant des phénomènes d'oxydation. Il s'agit du modèle d'intoxication *in vivo* chez le rat par le tétrachlorure de carbone (CCl_4), modèle sur lequel de nombreux travaux ont été réalisés (FLEURENTIN, 1983). Ce toxique peut induire différents niveaux de toxicité hépatique suivant la dose et le mode d'administration. Son administration unique, à une dose suffisante, induit une nécrose hépatique qui se développe préférentiellement dans les zones centrilobulaires, et dont les lésions sont quantifiables et mesurables par différents paramètres. Le CCl_4 entraîne une détérioration des composants structurels du foie par une lipoperoxydation. Cette lipoperoxydation est induite par une succession de plusieurs phases :

- * la pénétration du CCl_4 dans le foie et plus particulièrement au niveau du réticulum endoplasmique ;
- * la biotransformation du CCl_4 par les enzymes microsomaux en un métabolite toxique actif, le radical trichlorométhyl ($\cdot\text{CCl}_3$). Cette biotransformation fait intervenir le cytochrome P_{450} qui est contenu en grande quantité dans le réticulum endoplasmique ;
- * le radical se lie de façon irréversible aux phospholipides membranaires pour engendrer une lipoperoxydation et provoque rapidement la destruction des membranes du réticulum endoplasmique ;
- * les dommages atteignent ensuite les autres organites cellulaires jusqu'à la nécrose cellulaire. Les lésions engendrées par la nécrose du tissu hépatique sont quantifiables par la mesure de l'élévation des transaminases sériques (aspartate amino transférase (ASAT),

alanine amino transférase (ALAT)) qui débute 2 heures après l'administration du CCl_4 .

Dans le modèle pharmacologique choisi, la dose de CCl_4 (0,3 ml/kg, en ip chez le rat) permet d'induire une augmentation des enzymes plasmatiques qui atteint un maximum 12 à 48 heures après l'intoxication (TESCHKE et coll., 1983). Le contrôle au niveau de l'intoxication se fait par dosage des ALAT plasmatiques. Ils rendent compte de l'intégrité cellulaire, car ce sont des enzymes microsomaux, spécifiques du réticulum endoplasmique des hépatocytes, où se passent les biotransformations du CCl_4 en radical actif ($\cdot\text{CCl}_3$).

D'après les travaux réalisés par LEXA-ROBIN (1988) qui ont permis de mettre au point un protocole similaire appliqué à la souris, nous avons choisi d'utiliser ce modèle afin de conforter nos résultats. Toutefois, les doses de CCl_4 administrées chez la souris sont beaucoup plus faibles ($7 \cdot 10^{-3}$ et $9 \cdot 10^{-3}$ ml/kg) que celles administrées chez le rat ; effectivement, pour une même dose, la nécrose du foie induite par le CCl_4 est plus intense chez la souris (GOMEZ et coll., 1975).

II. ACTIVITE HEPATOPROTECTRICE DES JEUNES POUSSES DE *R.OFFICINALIS* VIS-A-VIS D'UNE INTOXICATION AU CCl_4 CHEZ LE RAT ET LA SOURIS

1. Procédure expérimentale

1.1. Matériel et méthode

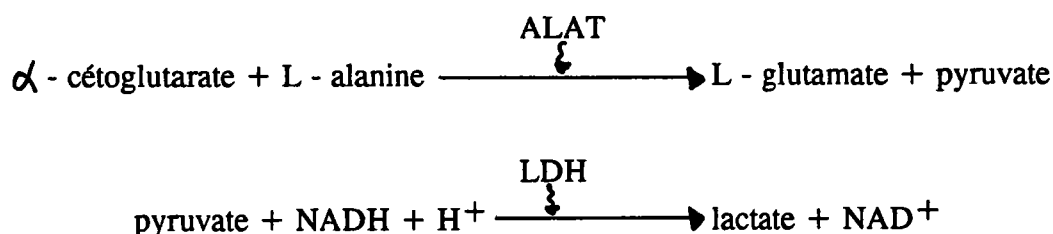
* Animaux : les tests sont réalisés sur des rats mâles OFA pesant 300 ± 50 g et des souris mâles Swiss pesant 35 ± 5 g, soumis aux conditions d'élevage décrites précédemment (Chap.I, II^{ème} partie).

* Injection : le toxique, le tétrachlorure de carbone (CCl_4 Rectapur, Prolabo, France) dissous dans l'huile d'olive vierge, est injecté à l'animal par voie ip aux doses indiquées dans le Tableau 12 suivant. Les extraits de plante, ou les substances de référence sont injectés par voie ip ou *per os*, soit 30 min avant (traitement préventif), soit 30 min après (traitement curatif) l'injection du toxique. Les substances sont dissoutes dans de l'eau physiologique.

* Prélèvements : les rats sont mis à la diète solide juste après l'intoxication et jusqu'au moment du prélèvement sanguin soit 24 heures après l'intoxication. Le prélèvement sanguin se fait après anesthésie légère. Le sang est prélevé dans le sinus rétro-orbital, à l'aide d'un micro-capillaire (Microcaps, Assistant, RFA), et est recueilli dans des microtubes plastiques préalablement héparinés (Héparine, Fournier).

* Dosages : le plasma est obtenu après centrifugation du sang hépariné, à 3000 t/min pendant 10 minutes. L'activité enzymatique des ALAT plasmatiques est mesurée selon la méthode de Wroblewski et La Due (1956), sur spectrophotomètre (Uvikon 810, Kontron), à l'aide de kits de dosage (Boehringer, Mannheim, Ref.161071).

La mesure est basée sur l'extinction du NADH en NAD⁺, suivant les réactions ci-dessous :



* Extrait : on utilisera les extraits aqueux de jeunes pousses (ref. D (chez le rat) et ref. K (chez la souris)) aux doses de 250, 500, 1000, 1500 et 2000 mg/kg.

* Substances de référence : un nébulisat de graines de *Silybum marianum* L. Gaertn. (Extre-norm, Villejuif, France), et la silymarine (Lab. Bellon, Neuilly-sur-Seine, France), principe actif de la graine de *S. marianum* (rendement d'extraction de 10%) seront utilisés comme référence pour ces tests, aux doses respectives de 1000 et 100 mg/kg.

* Témoins : -un lot contrôle de 5 animaux (témoins non intoxiqués) permet d'évaluer le niveau des ALAT plasmatiques des rats sains qui ne reçoivent que les excipients ;

-des lots placebo de 5 animaux minimum (témoins intoxiqués) qui reçoivent uniquement l'excipient de l'extrait végétal et le toxique.

* Modes de traitement : les produits testés seront injectés soit préventivement, soit curativement.

* Voies d'administration : nous utiliserons la voie intra-péritonéale qui est la plus usitée dans les tests pharmacologiques. Une injection intra-péritonéale se rapproche de l'injection intra-veineuse, du fait de l'hypervascularisation du péritoine. La voie orale est utilisée afin de se rapprocher du mode d'administration de la plante en médecine traditionnelle.

* Divergence des techniques : Le protocole utilisant les rats a été mis au point par FLEURENTIN (1983). Le protocole utilisant les souris a été mis au point par TIENTUNG, et coll. en 1977, puis modifié par LEXA-ROBIN (1988). Le tableau 12 suivant montre les exigences précises des 2 protocoles.

TABLEAU 12 : Protocole des tests d'hépatoprotection *in vivo* chez le rat et la souris :
Similitudes et divergences.

	RAT	SOURIS
Sexe Souche	mâle OFA	mâle swiss
Poids	300 $\pm$ 50 g	35 $\pm$ 5 g
CCl ₄ doses (ip)	3.10 ⁻¹ ml/kg	7 ou 9.10 ⁻³ ml/kg
excipient du CCl ₄ dose	huile d'olive vierge 5 ml/kg	huile d'olive vierge 10 ml/kg
traitement préventif	30 min avant ip	30 min avant ip 60 min avant po
traitement curatif	30 min après ip	30 min après ip
diète solide pendant 24 heures		
anesthésie avant prélèvement	100 mg/kg kétamine sous-cutanée	60 mg/kg pentobarbital ip
quantité de sang recueillie	0,5 à 1 ml	0,5 à 1 ml
dosage des ALAT		

1.2. Expression des résultats

Le taux des ALAT plasmatiques est exprimé en U.I./l.. Les moyennes et les écarts réduits sont calculés pour chaque lot. Après s'être assuré de l'homogénéité des variances, le test t de Student est effectué pour comparer 2 à 2 les lots placebo et les lots traités.

Les pourcentages de protection sont calculés selon la formule suivante :

$$\frac{\text{ALAT}_{\text{placebo}} - \text{ALAT}_{\text{traité}}}{\text{ALAT}_{\text{placebo}} - \text{ALAT}_{\text{contrôle}}} \times 100$$

Légende de la formule :

ALAT : valeur moyenne du lot
 Traité : lot traité par un extrait ou une substance de référence
 Placebo : lot témoin intoxiqué
 Contrôle : lot témoin non intoxiqué
 (valeur égale à 18 U.I./l chez le rat)
 (valeur égale à 26 U.I./l chez la souris)
 Ces valeurs ont été obtenues par le calcul de la valeur moyenne des ALAT d'un lot d'au moins 10 animaux non intoxiqués.

2. Résultats

2.1. Extraits aqueux de jeunes pousses de *R.officinalis*

* Chez le rat : les résultats sont présentés dans le tableau 13. Aux doses de 1000, 1500 et 2000 mg/kg, les jeunes pousses réduisent l'augmentation des ALAT plasmatiques, (traitement préventif), avec les pourcentages moyens de protection étant respectivement de 74, 73 et 62 % (significativement à 1500 mg/kg ; $p \leq 0,01$). En traitement curatif et à 1500 mg/kg, les jeunes pousses n'induisent qu'une faible protection de 32 % non significative.

* Chez la souris : les résultats sont présentés dans le tableau 14. Aux doses de 1000, 1500 et 2000 mg/kg, les jeunes pousses réduisent l'augmentation des ALAT plasmatiques, (traitement préventif), avec les pourcentages moyens de protection étant respectivement de 69, 49 et 68 % [significativement aux doses de 1000 mg/kg ($p \leq 0,001$) et 2000 mg/kg ($p \leq 0,05$)]. En traitement curatif et à 1000 mg/kg, les jeunes pousses n'empêchent pas l'augmentation des ALAT plasmatiques.

TABLEAU 13 : Influence d'un traitement préventif et d'un traitement curatif par l'extrait aqueux de jeunes pousses de *R.officinalis* (voie ip) vis à vis d'une intoxication au CCl₄ (0,3 ml/kg) sur le taux des ALAT plasmatiques chez le rat.

Produits	Doses mg/kg	N	ALAT (24h) U.I./l.	Protection %
PREVENTIF				
Contrôle	0	5	18 ± 1	
Placebo	0	18	84 ± 15	
Jeunes pousses	500	7	109 ^a ± 33	/
Jeunes pousses	1000	5	35 ^a ± 8	+74
Jeunes pousses	1500	13	36 ^{**} ± 4	+73
Jeunes pousses	2000	5	43 ^a ± 8	+62
CURATIF				
Placebo	0	10	210 ± 49	
Jeunes pousses	1500	10	149 ^a ± 38	+32

Différence significative par rapport au placebo : ** : $p \leq 0,01$; a : non significatif

N : nombre d'animaux par lot

TABLEAU 14 : Influence d'un traitement préventif et d'un traitement curatif par l'extrait aqueux de jeunes pousses de *R.officinalis* (voie ip) vis à vis d'une intoxication au CCl₄ ($7 \cdot 10^{-3}$ ml/kg) sur le taux des ALAT plasmatiques chez la souris.

Produits	Doses mg/kg	N	ALAT (24h) U.I./l.	Protection %
PREVENTIF				
Placebo	0	10	80 ± 16	
Jeunes pousses	250	5	79 ^a ± 18	/
Jeunes pousses	500	10	80 ^a ± 12	/
Placebo	0	9	140 ± 14	
Jeunes pousses	1000	8	61 ^{***} ± 11	+69
Placebo	0	9	152 ± 30	
Jeunes pousses	1500	9	90 ^a ± 14	+49
Placebo	0	5	122 ± 41	
Jeunes pousses	2000	5	57 [*] ± 13	+68
CURATIF				
Placebo	0	6	216 ± 25	
Jeunes pousses	1000	5	241 ^a ± 12	/

Différence significative par rapport au placebo : *** : $p \leq 0,001$; * : $p \leq 0,05$;

^a : non significatif ; N : nombre d'animaux par lot

2.2. Les substances de références : nébulisat de graines de *S.marianum* , silymarine.

* Chez le rat : les résultats sont présentés dans le tableau 15. En traitement préventif, le nébulisat de graines de *S. marianum* et la silymarine entraînent une diminution significative ($p \leq 0,05$) du taux des ALAT plasmatiques aux doses respectives de 1000 et 100 mg/kg , vis à vis de l'intoxication au CCl_4 . Le pourcentage d'hépatoprotection est de 64 % pour la silymarine et de 67 % pour l'extrait de *S. marianum*. En traitement curatif, ces substances de référence n'induisent pas de diminution significative du taux des ALAT plasmatiques.

TABLEAU 15 : Influence d'un traitement préventif et d'un traitement curatif par les substances de référence (voie ip) vis à vis d'une intoxication au CCl_4 (0,3 ml/kg) sur le taux des ALAT plasmatiques chez le rat.

Produits	Doses mg/kg	N	ALAT (24h) U.I./l.	Protection %
PREVENTIF				
Placebo	0	10	995 ± 244	+64
Silymarine	100	9	370 * ± 131	
Placebo	0	6	315 ± 63	+67
<i>S.marianum</i>	1000	5	116 * ± 31	
CURATIF				
Placebo	0	10	76 ± 13	/
Silymarine	100	10	102 a ± 36	
Placebo	0	10	445 ± 98	+16
<i>S.marianum</i>	1000	10	366 a ± 95	

Différence significative par rapport au placebo : * : $p \leq 0,05$; a : non significatif ;

N : nombre d'animaux par lot

* Chez la souris : en traitement préventif, la silymarine réduit significativement ($p \leq 0,001$) la fuite des ALAT plasmatiques de 80% (Tableau 16). Ces résultats permettent de valider nos tests pharmacologiques.

TABLEAU 16 : Influence d'un traitement préventif par la silymarine (voie ip) vis à vis d'une intoxication au CCl_4 (7.10^{-3} ml/kg) sur le taux des ALAT plasmatiques chez la souris.

Produits	Doses mg/kg	N	ALAT (24h) U.I./l.	Protection %
Placebo	0	15	172 $\pm$ 27	
Silymarine	100	10	48*** $\pm$ 12	+ 80

Différence significative par rapport au placebo : ***: $p \leq 0,001$; ^a : non significatif ;
N : nombre d'animaux par lot

2.3. Influence de la voie d'administration sur l'activité des jeunes pousses : voie orale chez la souris

L'administration par voie orale (Tableau 17) ne permet pas à l'extrait aqueux de jeunes pousses d'enrayer l'augmentation des ALAT plasmatiques pour une dose supérieure ou égale aux doses actives par voie ip.

TABLEAU 17 : Influence d'un traitement préventif par voie orale de l'extrait aqueux de jeunes pousses de *R.officinalis* vis à vis d'une intoxication au CCl_4 (9.10^{-3} ml/kg) sur le taux des ALAT plasmatiques chez la souris.

Produits	Doses mg/kg	N	ALAT (24h) U.I./l.	Protection %
Placebo	0	11	117 $\pm$ 15	
Jeunes pousses	1500	10	100 ^a $\pm$ 20	/

Différence significative par rapport au placebo : ^a : non significatif; N : nombre d'animaux par lot

3. Conclusion

Les résultats expérimentaux obtenus au cours de ces tests permettent de vérifier que le tétrachlorure de carbone, injecté par voie intra-péritonéale chez le rat et chez la souris, induit une atteinte hépatique suffisante, et mesurable par l'augmentation du taux des ALAT plasmatiques, 24 heures après l'intoxication.

3.1. Activité hépatoprotectrice

* Les extraits aqueux de jeunes pousses de *R.officinalis* testés dans ces 2 protocoles révèlent leur activité hépatoprotectrice chez le rat et la souris, par une baisse significative du taux des ALAT plasmatiques par rapport aux témoins intoxiqués, et ceci pour des doses supérieures ou égales à 1000 mg/kg (en traitement préventif).

Le pourcentage moyen de protection est proche de 70 % chez les deux types de rongeurs, quel que soit le niveau d'intoxication qui, par ailleurs, est très variable d'un essai à l'autre.

En effet, l'augmentation moyenne des ALAT plasmatiques induite par le CCl₄ chez les animaux témoins intoxiqués (placebo) n'est pas toujours de même intensité. Le CCl₄ est un toxique qui a l'inconvénient d'induire une nécrose dont l'étendue est très variable (FLEURENTIN et JOYEUX, 1990), se traduisant par une importante variation du niveau d'intoxication au cours des différents tests.

Nous avons atténué cet inconvénient en utilisant les deux protocoles menés en parallèle (essais sur rat et souris) qui permettent de vérifier la reproductibilité de nos résultats.

Lors de ces tests, l'effet maximum d'hépatoprotection des extraits de jeunes pousses de romarin est obtenu à 1000 mg/kg. Il y aurait un phénomène de tout ou rien entre les doses de 1000 et 500 mg/kg et un effet limitant à des doses supérieures (nous n'avons jamais obtenu de protection supérieure à 75 %).

Le taux des ALAT plasmatiques mesurées rend compte de la fuite enzymatique induite par l'altération des membranes cellulaires et intra-cellulaires des cellules hépatiques : c'est à dire de la nécrose cellulaire des hépatocytes induite par le tétrachlorure de carbone. On peut supposer alors, que l'un des sites d'action des jeunes pousses de *R.officinalis* se situerait au niveau des membranes cellulaires et/ou intra-cellulaires des hépatocytes en les protégeant de la lipoperoxydation induite par le toxique, ce qui limiterait la fuite des ALAT plasmatiques. L'extrait pourrait également agir directement sur le processus de transformation du CCl₄ en métabolite réactif (*CCl₃).

3.2. Substances de référence

La silymarine et le nébulisat de graine de *S. marianum* montrent une bonne hépatoprotection (tableaux 15 et 16), d'intensité similaire à celle des jeunes pousses. Dans ce modèle, les jeunes pousses de *R.officinalis* seraient aussi performantes que les graines de *S. marianum*.

3.3. Influence du traitement (préventif ou curatif)

Dans le cas d'un traitement curatif, ni les substances de référence, ni l'extrait aqueux de jeunes pousses n'interfèrent significativement sur l'élévation du taux des ALAT plasmatiques.

Cette réponse négative nous renseigne surtout sur le rôle protecteur de ces extraits végétaux.

3.4. Influence de la voie d'administration

Dans le cas d'un traitement oral préventif, nous n'avons pas obtenu de protection avec l'extrait aqueux de jeunes pousses de *R. officinalis* pour une dose active par voie intra-péritonéale. Du reste, il est difficile de passer de la voie intra-péritonéale à la voie orale. Des transformations interviennent sur les substances actives (dégradations enzymatiques, hydrolyses acides puis alcalines...) avant leur passage dans le sang. Alors que l'injection intra-péritonéale est pratiquement comparable à une injection intra-veineuse, du fait de l'hypervascularisation du péritoine.

4. Discussion

Il a été intéressant d'observer une continuité entre les résultats obtenus chez le rat et ceux obtenus chez la souris. La reproductibilité des résultats a été confirmée également par un test effectué à partir d'un autre extrait aqueux de jeunes pousses (1500 mg/kg, voie ip) qui induisait 63 % d'hépatoprotection chez le rat ($P \leq 0,05$) (HOEFLER et coll., 1987). D'autre part nous sommes en accord avec la tradition du romarin et l'utilisation actuelle des jeunes pousses en gemmothérapie dans les cas d'atteinte hépatique.

Les expérimentations *in vivo*, indispensables lors de la conduite de l'étude pharmacologique d'une plante médicinale, ont permis de vérifier la tradition ; par contre si nous voulons tenter d'appréhender les mécanismes d'action des jeunes pousses dans le phénomène d'hépatoprotection, des techniques *in vitro* sont alors plus adaptées.

Des travaux complémentaires aux nôtres, effectués par JOYEUX (1993), ont permis d'apporter des précisions sur le pouvoir hépatoprotecteur des jeunes pousses de *R. officinalis*. Cet auteur a mis en évidence plus particulièrement l'activité antiradicalaire et les activités antilipoperoxydante et anticytotoxique d'extraits aqueux de jeunes pousses. L'activité

antiradicalaire a été appréciée par le test d'inhibition du radical diphényl-picrylhydrazyl (DPPH), et a montré que les jeunes pousses induisaient une inhibition de plus de 50 % de la coloration du DPPH à la concentration de 0,125 mg/ml (équivalent plante sèche/milieu). Ces résultats rentrent dans un screening de vingt plantes réputées actives sur la sphère hépato-rénale, et permet de classer les jeunes pousses de romarin parmi les plantes les plus performantes dans l'activité antiradicalaire.

Les activités antilipoperoxydante et anticytotoxique ont été appréciées par un test sur hépatocytes (de rat) en suspension, intoxiqués par le ter-butylhydroperoxyde (tBH). La mesure de la malonaldéhyde formée (MAD : produit terminal de la lipoperoxydation) montre un pouvoir antilipoperoxydant significatif de l'extrait aqueux de jeunes pousses pour les concentrations de 0,5 et 1 mg/ml (équivalent plante sèche/milieu). Sur ce même test, les mesures de lactate deshydrogénase et d'aspartate amino-transférase (respectivement LDH et ASAT : révélateurs de la nécrose cellulaire) permettent d'apprécier les lésions hépatocytaires, et montrent un effet hépatoprotecteur significatif des jeunes pousses, pour des concentrations supérieures ou égales à 0,125 mg/ml (équivalent plante sèche/milieu).

Ces résultats décrits dans les tests *in vitro* par JOYEUX (1993), confirment l'activité antihépatotoxique des jeunes pousses de *R. officinalis* démontrée dans les tests *in vivo* (vis-à-vis du CCl₄). Ils confirment également l'utilisation des jeunes pousses en gemmothérapie, dans le cas des insuffisances hépatiques, et l'utilisation du romarin comme antioxydant dans la conservation de certains aliments.

En accord avec les processus de toxicité hépatique qui peuvent induire une inflammation et l'utilisation traditionnelle du romarin qui s'applique aussi à des cas d'inflammation de type rhumatismal, nous allons poursuivre notre investigation pharmacologique par la recherche d'effets anti-inflammatoires.

CHAPITRE VI

RECHERCHE D'UNE ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE DES JEUNES POUSSES DE *ROSMARINUS OFFICINALIS*

I. INTRODUCTION

Parmi les vertus traditionnelles attribuées au romarin, certaines font référence à ses propriétés anti-inflammatoires. En Afrique du nord, au XIII^e siècle, selon IBN AL BAYTAR (traduit par LECLERC, 1877-1883), "le romarin était utile contre l'hydropisie et l'ascite", dont on peut suspecter une origine inflammatoire. En médecine islamique, "il est utile pour les abcès" (MUWAFQAQ AL-DIN ABU MANSUR 'ALI AL-HERAWI, 971-987) et "il posséderait des propriétés anti-inflammatoires" (HAKIM MAYSERI, 991). En Europe, les feuilles de romarin sont appliquées en compresse pour réduire les gonflements articulaires et les oedèmes ; l'huile essentielle est aussi utilisée contre les douleurs rhumatismales (VALNET, 1980 ; FOURNIER, 1948 ; WINKELMAN, 1986).

Ces indications traditionnelles, ainsi que les résultats obtenus lors des tests pharmacologiques précédents (activités anti-radicalaire, anti-lipoperoxydante et anti-cytotoxiques) sur les jeunes pousses de *R. officinalis*, nous amènent à tester les extraits de jeunes pousses sur un modèle pharmacologique adapté à l'étude des propriétés anti-inflammatoires.

1. Rappel du processus inflammatoire

(SCHORDERET et DAYER, 1988)

Le processus inflammatoire qui atteint un tissu comprend une cascade d'événements qui sont liés les uns aux autres et qui ont pour but final d'éliminer l'agent inflammatoire au bout d'un certain temps par des processus de réparations, ou de modifier les tissus environnants dans le cas de l'inflammation chronique. La persistance anormale du processus inflammatoire aura des conséquences indésirables sur les fonctions des organes touchés et sur tout l'organisme. C'est dans ces types de pathologies (rhumatismes, oedème articulaire) que l'on retrouve des prescriptions à base de romarin.

Le processus inflammatoire débute le plus souvent par une phase vasculaire presque immédiatement après contact avec l'agent phlogistique et, caractérisé par l'augmentation de la perméabilité vasculaire entraînant une vasodilatation prolongée (rougeur et gonflement). Cette vasodilatation est à la fois initiée et entretenue par des médiateurs chimiques comme l'histamine ou la sérotonine, libérés par des mastocytes et des polynucléaires.

Cette vasodilatation est maintenue par des substances à action plus lente ou plus prolongée comme les kinines, et certaines fractions du complément.

Le complément, et plus particulièrement le facteur C_3 , va interagir dans l'enchaînement des processus inflammatoires. L'activation du complément libère des anaphylatoxines, qui provoquent à leur tour la libération de substances inflammatoires (histamine) par les cellules qui les contiennent.

Les mastocytes participent à l'entretien du processus inflammatoire en synthétisant d'autres médiateurs de l'inflammation, à partir d'un constituant normal des membranes cellulaires : l'acide arachidonique. Pour cette synthèse, deux voies enzymatiques "oxydatives" sont possibles :

- la voie cycloxygénasique qui synthétise
 - * les prostaglandines
 - * les thromboxanes
- la voie lipoxygénasique qui synthétise
 - * les leucotriènes (surtout responsables de l'inflammation chronique).

Ces médiateurs chimiques ont pour rôle d'attirer différentes cellules par chimiotactisme (polynucléaires, macrophages, phagocytes), sur les lieux de l'inflammation où elles libèrent elles aussi des médiateurs chimiques (histamine, leucotriène, PAF acéther). Ces cellules sont capables d'accroître les défenses locales par phagocytose des matières étrangères (toxines, bactéries,...) ou des matières résultant de la dégradation locale des tissus de l'organisme.

Lors de la phagocytose, les polynucléaires neutrophiles libèrent des enzymes et des radicaux libres qui sont bactéricides (dans le cas d'une attaque bactérienne), mais qui entraînent aussi des lésions tissulaires par les réactions en chaînes qu'ils génèrent.

La production de radicaux libres intervient également lors de la synthèse des prostaglandines à partir de l'acide arachidonique, par l'intervention d'enzymes comme la peroxydase. Or les membranes cellulaires, riches en lipides insaturés, vont être une cible de choix pour les radicaux libres oxygénés. Une cascade de réactions oxydatives (Figure 28) conduira à la désorganisation de la membrane avec libération d'hydroperoxydes lipidiques $ROOH^\bullet$ et de radicaux alcoperoxy $RO_2^\bullet$.

Cette atteinte membranaire se traduira par une perte de la perméabilité sélective. Le phénomène de peroxydation permet d'expliquer la fuite plasmatique.

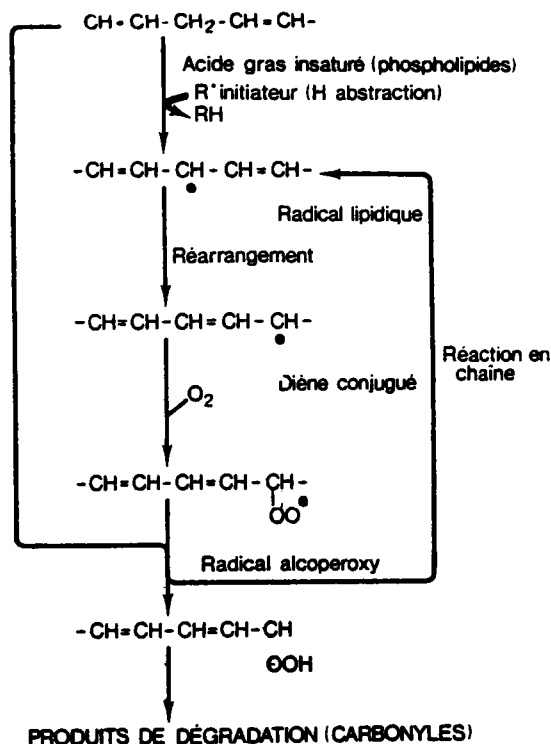


FIGURE 28 : Les réactions de la peroxydation lipidique (BRAQUET et BRAQUET, 1982)

Lorsque les macrophages ont phagocyté les matières étrangères, et lorsque les réactions inflammatoires ont permis d'anéantir l'agent inflammatoire, le processus de restauration s'installe avec réorganisation d'un tissu de remplacement, sauf dans le cas des inflammations chroniques.

2. Choix du modèle expérimental

Nous avons choisi comme protocole expérimental, un modèle d'inflammation aigüe, le test de l'oedème plantaire à la carragénine. Ce modèle consiste en l'induction d'un oedème localisé mesurable par un appareillage simple. L'agent phlogistique sélectionné est la carragénine, qui est injectée dans la région sub-plantaire d'une des deux pattes postérieures du rat.

Selon OTTERNESS et GANS (1988), dans ce modèle expérimental, la distribution et le mécanisme d'action des anti-inflammatoires seraient proches des phénomènes observés chez l'Homme. L'oedème de la patte du rat, induit par la carragénine, est du à la libération initiale d'histamine et de sérotonine, suite à une augmentation de la perméabilité vasculaire. Après la première heure, les kinines agissent de manière continue et après 6 heures, les prostaglandines se montrent d'importants médiateurs (BLOTMAN et coll., 1983). Cette libération de prostaglandines est associée à la migration leucocytaire vers la zone enflammée.

L'oedème à la carragénine est une des méthodes les plus utilisées pour l'étude des potentialités anti-inflammatoires de substances supposées actives. De plus, il existe une proportionnalité entre les résultats obtenus et les doses utilisées en clinique. Cette corrélation n'existe pas toujours dans d'autres tests pharmacologiques utilisés pour l'évaluation de cette activité (MARIN PARES, 1990).

Cette technique a été sélectionnée également en raison de sa simplicité d'exécution, de sa rapidité d'apparition des effets (développement de l'oedème dans les trente minutes qui suivent l'injection, avec un effet maximal au bout de 3 ou 4 heures) et aussi en raison de sa reproductibilité.

L'utilisation antérieure de ce test dans notre laboratoire, pour d'autres plantes et extraits végétaux, permet d'avoir des références pratiques et techniques sur la reproductibilité du type d'inflammation et de son intensité.

Ce test sera validé par l'utilisation d'un Anti-Inflammatoire Non Stéroïdien (AINS), l'indométacine, qui permet d'entraver l'évolution de l'oedème induit par la carragénine (GYIRES et coll., 1985 ; TSURUMI et coll., 1986).

II. INFLUENCE DE L'EXTRAIT AQUEUX DE JEUNES POUSSSES DE *ROSMARINUS OFFICINALIS* VIS-A-VIS DE L'OEDEME INDUIT PAR LA CARRAGENINE SUR LA PATTE DU RAT

1. Procédure expérimentale

1.1. Matériel et méthode

* Animaux : le test est réalisé sur des rats mâles OFA pesant $220 \text{ g} \pm 15$ et soumis aux conditions d'élevage décrites précédemment (chap. I, 2^{ème} partie).

* Pléthysmomètre : le dispositif expérimental consiste en un pléthysmomètre électrique (pléthysmomètre 7150, Ugo Basile, Apelex, Bagneux (92)) et permet de mesurer le volume de la patte du rat, lorsque celle-ci est plongée dans une cellule en plexiglas de 18 mm de diamètre, contenant une solution d'eau distillée additionnée de NaCl (0,4 g/l) et d'un agent mouillant (Imbibente BBC97, Ornano, Milan), à raison de 5 ml/l.

Cette cellule est elle-même en communication avec un tube en plexiglas, contenant un transducteur qui permet de déterminer la conductance entre deux électrodes "platine-iridium", dites électrodes de niveau, logées dans la partie supérieure du tube.

La conductance est linéairement proportionnelle au niveau de l'eau, mais elle est également influencée par sa conductivité ; aussi, deux électrodes dites de compensation,

sensibles uniquement à ce dernier paramètre, sont en permanence immergées dans la solution mouillante.

Un circuit électronique génère un signal proportionnel au niveau de la solution et donc au volume déplacé par la patte du rat.

La technique utilisée est inspirée de la méthode décrite par WINTER et coll. (1962) et adaptée par LANHERS (1988).

* Mesure du volume de la patte : avant le test proprement dit, le volume de la patte postérieure droite de chaque animal est mesuré, par immersion dans la cellule contenant la solution mouillante, jusqu'au niveau de la malléole latérale. Chaque mesure est répliquée 3 ou 4 fois au minimum, de façon à obtenir 3 ou 4 valeurs ne différant pas de plus de 4% (précision de l'appareillage) et permettant ainsi de calculer un volume moyen pour chaque animal (V_0 : volume moyen mesuré avant l'injection de la carragénine).

* Injections : les extraits de plante et la substance de référence sont injectées par voie intra-péritonéale. Trente minutes après l'injection de l'extrait ou de la substance de référence, chaque animal reçoit, dans la patte postérieure droite, une injection subplantaire d'une suspension de carragénine à 1% dans le NaCl (0,9 %), à raison de 0,05 ml/rat (Carragénine \, type IV, lab. Sigma, St Louis, U.S.A.).

* Extrait : on utilise l'extrait aqueux de jeunes pousses de *R. officinalis* (réf. K), à la dose de 1500 mg/kg (équivalent plante fraîche/kg de poids corporel).

* Substance de référence : on utilise l'indométacine (Indocid ^R, laboratoires Merck Sharp et Dohme-Chibret, Paris), aux doses de 2,5 et 5 mg/kg.

* Témoin : les témoins ne reçoivent que le solvant NaCl (0,9 %), dans les mêmes conditions que les extraits.

* Mesures : le volume de la patte postérieure droite est mesuré avant toute injection, puis 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 24 heures après l'injection de l'agent inflammatoire. La mesure est également répliquée 3 ou 4 fois, afin d'obtenir un volume moyen pour chaque animal et à chaque relevé.

(V_n : volume moyen mesuré aux heures de relevé $n=1$ à 6 et 24 heures après l'injection de la carragénine).

1.2. Expression des résultats

* Les variations individuelles du volume de la patte après injection de la carragénine serviront aux tests statistiques :

$$V_n - V_o$$

* L'importance et l'évolution de l'oedème peuvent être estimées par détermination des pourcentages moyens de variation, calculés suivant la formule :

$$\% \text{ d'oedeme} : [(V_n - V_o) / V_o] \times 100$$

* L'activité anti-inflammatoire des produits testés et son évolution peuvent être estimées par détermination des pourcentages moyens d'inhibition de l'oedème, calculés suivant la formule :

$$\% \text{ d'inhibition} : [[(V_n - V_o)_{\text{témoins}} - (V_n - V_o)_{\text{traités}}] / (V_n - V_o)_{\text{témoins}}] \times 100$$

* **Calculs statistiques** : après vérification de l'homogénéité des variances par le test de Bartlett, les comparaisons statistiques entre les différents lots témoins et traités sont effectuées à l'aide du test t de Student, sur les variations individuelles des volumes avant et après l'injection de carragénine ($V_n - V_o$).

Une analyse de variance, réalisée sur les volumes individuels mesurés avant traitement (V_o), démontre l'absence de différences significatives entre les différents lots témoins et traités.

2. Résultats

2.1. Témoins

Les résultats sont présentés dans les figures 29 et 30, et le tableau 18. L'injection de 0,05 ml de carragénine à 1%, dans la patte postérieure droite du rat, provoque une inflammation visible dans l'heure qui suit cette injection (pourcentages d'oedème des deux lots témoins 31 et 23 %), (respectivement dans les figures 29 et 30). L'oedème augmente progressivement et atteint une intensité maximale respectivement au bout de quatre et trois heures (pourcentages d'oedème des deux lots témoins 67 et 68 %). L'oedème régresse ensuite, mais ne disparaît pas totalement, 24 heures après l'administration de l'agent inflammatoire (pourcentages d'oedème des deux lots témoins 22 et 16 %).

TABLEAU 18 : Influence de *R.officinalis* (extrait aqueux de jeunes pousses) et de l'indométacine sur l'oedème induit par la carragénine au niveau de la patte postérieure droite du rat.

Lots	Volumes moyens (ml) obtenus aux relevés suivants							
	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T24
Témoins N = 13	1,34 ±0,02	1,76 ±0,05	1,92 ±0,05	2,16 ±0,07	2,24 ±0,04	2,17 ±0,05	2,08 ±0,05	1,63 ±0,03
Indométacine 5 mg/kg N = 10	1,35 ±0,02	1,61 ±0,04	1,68 ±0,05	1,78 ±0,06	1,82 ±0,08	1,81 ±0,06	1,78 ±0,06	1,50 ±0,04
Indométacine 2,5 mg/kg N = 10	1,33 ±0,02	1,63 ±0,04	1,72 ±0,05	1,91 ±0,06	1,97 ±0,06	1,89 ±0,06	1,85 ±0,05	1,52 ±0,03
Témoins N = 10	1,33 ±0,02	1,63 ±0,08	2,04 ±0,10	2,24 ±0,09	2,13 ±0,06	2,05 ±0,06	1,95 ±0,06	1,54 ±0,03
Jeunes pousses 1500 mg/kg N = 11	1,31 ±0,07	1,59 ±0,04	1,87 ±0,07	1,92 ±0,05	1,88 ±0,04	1,85 ±0,03	1,80 ±0,03	1,50 ±0,02

N : nombre d'animaux par lot ; T0 :relevé avant injection de carragénine ;

T1 à T24 : relevés après injection de carragénine

TABLEAU 19 : Activité inhibitrice de *R.officinalis* (extrait aqueux de jeunes pousses) et de l'indométacine sur l'oedème induit par la carragénine au niveau de la patte postérieure droite du rat

Lots	Pourcentages d'inhibition (%) obtenus aux relevés suivants						
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T24
Indométacine 5mg/kg N = 10	38 *	43 ***	48 ***	48 ***	45 ***	42 ***	48 **
Indométacine 2,5mg/kg N = 10	29	33 **	29 **	29 ***	32 ***	30 **	34 **
Jeunes pousses 1500mg/kg N = 11	7	20	33 **	29 **	25 **	21 *	10

N : nombre d'animaux par lot ; T1 à T24 : heures de relevés ;

* : $p \leq 0,05$; ** : $p \leq 0,01$; *** : $p \leq 0,5$

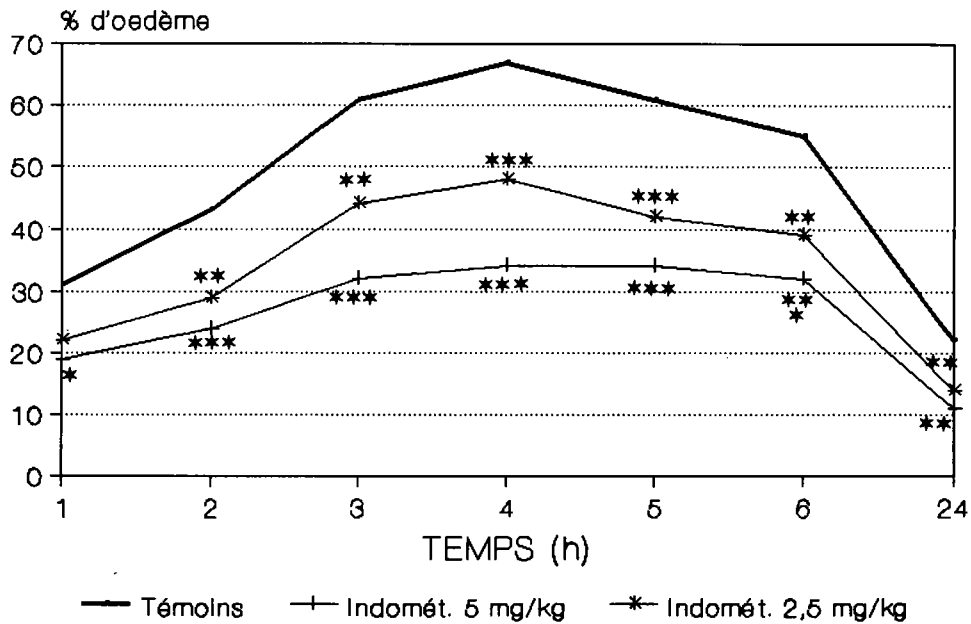


FIGURE 29 : Influence de l'indométacine (5 et 2,5 mg/kg, ip) sur l'œdème induit par la carragénine chez le rat.

Significativité : * : $p \leq 0,05$; ** : $p \leq 0,01$; *** : $p \leq 0,001$

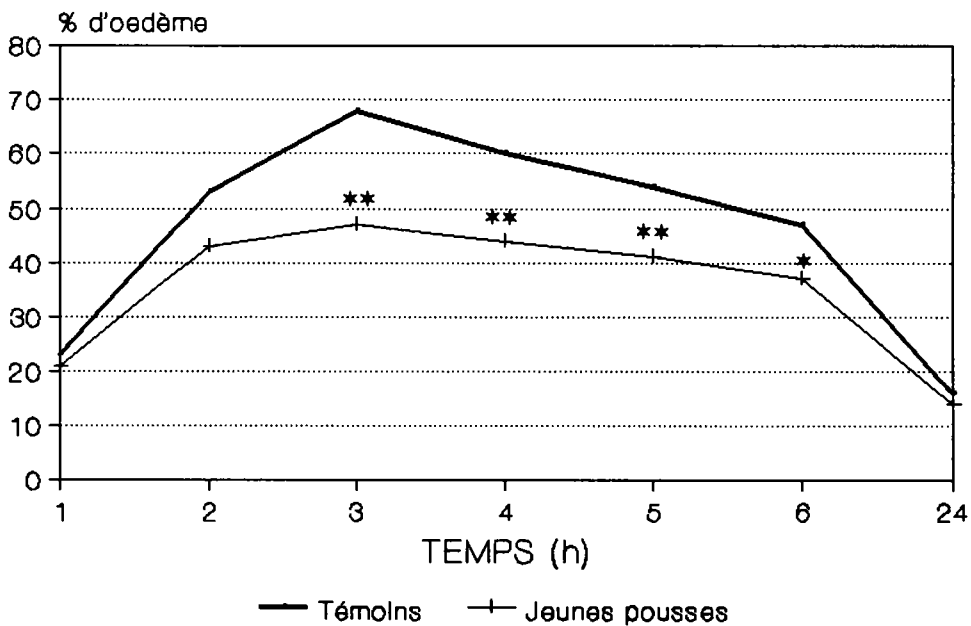


FIGURE 30 : Influence de l'extrait aqueux de jeunes pousses de *R. officinalis* (1500 mg/kg, ip) sur l'œdème induit par la carragénine chez le rat. Significativité : * : $p \leq 0,05$; ** : $p \leq 0,01$

2.2. Indométacine

Les résultats sont présentés dans la figure 29 et les tableaux 18 et 19. Administré préventivement, l'indométacine réduit l'oedème de façon progressive ; l'effet inflammatoire maximal, observé à 4 heures, est significativement diminué par rapport aux témoins (pourcentages d'oedème de 35 et 48 %, respectivement pour les lots traités par les doses d'indométacine de 5 et 2,5 mg/kg et de 66 % pour les témoins).

Vingt-quatre heures après l'injection de la carragénine, il subsiste une légère inflammation (pourcentages d'oedème obtenus respectivement avec les doses de 5 et 2,5 mg/kg : 11 % et 14 %).

Cet effet inhibiteur de l'indométacine se manifeste dès la première heure qui suit l'injection de carragénine pour la dose de 5 mg/kg et dès la deuxième heure pour la dose de 2,5 mg/kg ; l'inhibition est maintenue presque même niveau durant 24 heures, avec des pourcentages moyens d'inhibition de 45 % (5 mg/kg) et 30 % (2,5 mg/kg).

Les résultats obtenus avec l'indométacine nous permettent de valider ce test pour l'étude de l'extrait de *R. officinalis*.

2.3. Jeunes pousses de *R. officinalis*

Les résultats sont présentés dans la figure 30 et les tableaux 18 et 19. Les jeunes pousses réduisent l'oedème de façon progressive ; l'effet inflammatoire maximal de 68 % pour les témoins, observé à 3 heures, est significativement diminué à 47 % avec les jeunes pousses. Puis l'oedème régresse lentement dans les heures qui suivent ; 24 heures après l'injection de carragénine, les lots témoins et traités ne diffèrent plus significativement (respectivement 16 % et 14 % d'oedème).

Le pourcentage maximum d'inhibition de l'inflammation se situe à 3 heures (33%).

3. Discussion

Les résultats obtenus avec l'indométacine, sur ce modèle expérimental d'inflammation aiguë induite par la carragénine, nous permettent de valider ce test pour l'étude des propriétés anti-inflammatoires des jeunes pousses de *R. officinalis*.

L'injection préventive par voie ip de l'extrait aqueux de jeunes pousses de *R. officinalis* entraîne une inhibition significative de 33 % du développement de l'oedème induit par la carragénine, au moment de la phase maximale de l'inflammation qui se situe sur une

période allant de la 3^{ème} heure à la 5^{ème} heure. Cette inhibition significative se poursuit jusqu'à la 6^{ème} heure.

Ce test a permis de déceler une activité anti-inflammatoire des jeunes pousses de *R.officinalis* et de valider ses indications traditionnelles concernant les affections rhumatismales et les oedèmes articulaires.

**** Hypothèse d'action de l'extrait sur le processus inflammatoire :** dans ce protocole expérimental, la carragénine est à l'origine d'une inflammation aigüe caractérisée par les 3 phases du processus inflammatoire (vasculaire, cellulaire, de réparation) et durant lequel il y aurait une importante libération de prostaglandines (BLOTMAN et coll., 1983).

Or, la formation des prostaglandines à partir de l'acide arachidonique fait intervenir de nombreuses réactions oxydatives (par le biais de la cyclo-oxygénase). Les produits résultants de l'action de ces enzymes sont des hydroperoxydes instables qui entraînent la libération de radicaux libres. D'autres radicaux libres sont produits également au moment de la phagocytose, par les macrophages et les polynucléaires. L'intervention de peroxydases ou de capteurs de radicaux libres à ces niveaux permettrait de limiter l'inflammation.

Les résultats du précédent chapitre montrant les propriétés anti-radicalaire , anti-lipoperoxydante et antioxydante des jeunes pousses de romarin , nous permettent d'émettre une hypothèse quant au mode d'action de l'extrait sur la diminution de l'état inflammatoire dans le test à la carragénine. Les principes actifs présents dans les jeunes pousses de *R.officinalis*, de par leur pouvoir piègeur de radicaux libres, réduiraient l'action cytolytique et diminueraient ainsi l'inflammation.

CHAPITRE VII

RECHERCHE DE L'ACTIVITE DIURETIQUE DES JEUNES POUSSES DE *ROSMARINUS OFFICINALIS*

I. INTRODUCTION

En médecine arabe classique et en médecine traditionnelle actuelle, le romarin est utilisé comme plante diurétique ("traditionnellement utilisé pour faciliter les fonctions d'élimination rénale et digestive"; avis 90/22 bis). La fonction d'élimination digestive (cholérétique/cholagogue) et la fonction d'élimination rénale sont souvent associées. Le romarin fait partie des plantes dépuratives et fait donc intervenir ces 2 processus d'élimination. C'est une plante à visée hépatorénale.

1. Rappels sur la fonction rénale

Le rein a 3 fonctions :

- *excrétion / épuration de l'organisme ;
- *régulation de la composition du milieu intérieur (pression osmotique/composition électrolytique) ;
- *fonction endocrine d'élaboration de la rénine et de l'érythropoïétine et de synthèse métabolique.

Pour assurer ces 3 fonctions, le rein des mammifères est composé de 2 zones distinctes :

*zone corticale ;

*zone médullaire ;

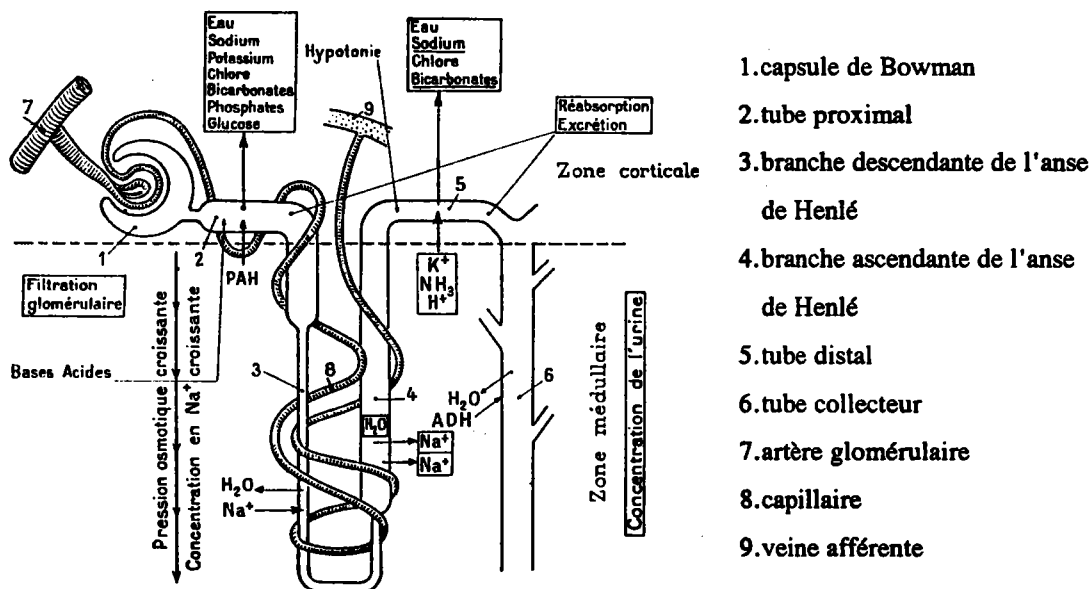


Figure 31 : Le néphron et ses activités (d'après SCHMITT, 1973)

L'unité fonctionnelle du rein est le néphron, composé d'un glomérule et d'un tubule.

* glomérule (z.corticale) : formé d'un peloton de capillaires artériels enveloppé par la capsule de Bowman. Entre ces deux éléments s'ouvre l'espace de Bowman où s'écoule l'ultrafiltrat glomérulaire ; ceci est le pôle urinaire du glomérule en continuité avec le tube proximal contourné. A l'opposé se situe le pôle vasculaire ; c'est le lieu de la filtration qui donne naissance à l'urine primitive ou ultrafiltrat glomérulaire.

* tubule formé de trois segments :

-le tube proximal contourné (z. corticale)

-l'anse de Henlé (z.médullaire)

-le tube distal qui fait suite à l'anse de Henlé et débouche dans le canal collecteur.

C'est dans le tubule que se passe le contrôle de l'équilibre hydro-électrolytique de l'organisme. Il agit essentiellement sur les ions Na^+ , K^+ , H^+ et Cl^- , et sur la réabsorption de l'eau.

-le sodium conditionne l'équilibre hydrique de l'organisme. Le sodium est entièrement filtré par le glomérule, puis réabsorbé au niveau du tube proximal (mécanisme actif), au niveau de la branche ascendante de l'anse de Henlé (mécanisme passif) et au niveau du tube distal (sous contrôle hormonal) ;

-le chlorure est réabsorbé dans le tube proximal (mécanisme passif) ;

-l'eau est absorbée secondairement au sodium dans le tube proximal (mécanisme passif); sa réabsorption varie ensuite, dans la branche ascendante de Henlé, suivant des mécanismes de concentration et de dilution en fonction de la pression osmotique du tissu rénal et de la lumière du tube ;

- le potassium est totalement filtré par le glomérule. Sa réabsorption est importante dans le tube proximal (mécanisme actif). Il est excrété dans le tube distal en fonction du sodium absorbé. Son excrétion dans le tube distal est corrélée à la réabsorption du sodium, et contrôlée par l'aldostérone.

Le rein contribue à assurer l'équilibre acido-basique de l'organisme par le jeu de l'excrétion/réabsorption du bicarbonate, sous la dépendance d'un enzyme : l'anhydrase carbonique.

Le rein élimine des composés azotés dont les principaux sont l'urée, la créatinine et l'acide urique.

2. Choix des protocoles

2.1. Test en surcharge hydrique

D'après l'analyse bibliographique réalisée par BEAUX (1991), nous avons choisi la technique de PETKOV et MARKOVSKA (1981). Ce test pharmacologique utilise le rat, auquel on administre une surcharge hypotonique (0,45 % de chlorure de sodium) par voie intra-péritonéale. Le débit urinaire est suivi pendant 24 heures. Cette technique reproduit, de façon aigüe et subite, une situation d'oedème pathologique chez l'animal, afin de mesurer la capacité de l'extrait à favoriser l'élimination d'une surcharge hydrique temporaire.

2.2. Test en chronique

Un autre protocole a été retenu et se rapproche plus de la tradition, car il s'agit d'un traitement chronique oral sur 15 jours, chez le rat placé en situation normale. L'excrétion urinaire est mesurée ponctuellement toutes les 24 heures.

Lors de ces deux tests nous avons choisi d'administrer *R.officinalis* à une dose beaucoup plus faible que les précédentes afin de se rapprocher de la posologie traditionnelle (une poignée de feuille en infusion).

II. MESURE DE L'ACTIVITE DIURETIQUE PAR LE TEST EN SURCHARGE HYDRIQUE CHEZ LE RAT

1. Procédure expérimentale

1.1. Matériel et méthode

* Animaux : on utilise des rats mâles OFA pesant 300 g (± 50) et soumis aux conditions d'élevage décrites précédemment (chap. I, II^{ème} partie).

* Cages à métabolisme : les cages à métabolismes individuelles (réf.:BA41-René Pajon; Fleurey-les-Aubrais, FRANCE), possèdent un système en verre pour séparer les fèces des urines.

* Surcharge hydrique : solution d'eau distillée à 0,45 % de chlorure de sodium.

* Extraits de plante :

-Macérat glycéro-alcoolique (MGA) de jeunes pousses de *R.officinalis* (Lab.DOLISOS, réf.:MCOO8, tableau 9) à la dose de 50 mg/kg ;

-Extrait aqueux de jeunes pousses de *R.officinalis* (réf. E) à la dose de 50 mg/kg.

* Substances de référence :

-Furosémide (LASILIX^R, Lab.Hoecht, Paris, France), forme injectable utilisée à la dose de 10 mg/kg ;

-Hydrochlorothiazide (ESIDREX^R, Lab.Ciba-Geigy, Lyon, France) en poudre utilisée à la dose de 10 mg/kg.

* Témoins : chaque lot témoin reçoit le solvant neutre de l'extrait ou de la substance de référence (solvant neutre glycéro-alcoolique, solvant aqueux).

* Méthode : les rats sont placés individuellement dans les cages à métabolisme pendant une période d'adaptation de 3 jours durant laquelle ils sont nourris et abreuvés *ad libitum*. Au temps To de l'expérimentation : les rats sont mis à la diète totale. Ils reçoivent par voie intra-péritonéale la surcharge hydrique, hypotonique de NaCl à 0,45 %, sous un volume de 50 ml/kg. Dans le cas du macérat glycéro-alcoolique et du furosémide, les solutions sont diluées à la surcharge hydrique, afin d'obtenir la dose requise. Dans le cas de l'extrait aqueux de jeunes pousses et de l'hydrochlorothiazide, les produits sont simplement dissous dans la surcharge hydrique.

* Mesure des paramètres : les volumes urinaires sont mesurés toutes les heures jusqu'à 8 heures, et à 24 heures.

1.2. Expression des résultats

Les volumes urinaires cumulés sont exprimés en ml/100g de poids corporel de rat.

La vitesse d'élimination est évaluée par la détermination graphique des :

TE₅₀ : Temps d'élimination de la moitié de la surcharge (2,5 ml/100g)

TE₁₀₀ : Temps d'élimination de la totalité de la surcharge (5 ml/100g)

Pour chaque lot traité, les pourcentages de variation des TE₅₀ et TE₁₀₀ par rapport aux témoins sont exprimés de la manière suivante :

$$[(TE_{50} \text{ témoin} - TE_{50} \text{ traité}) / (TE_{50} \text{ témoin})] \times 100 = \% \text{ de variation de TE}_{50}$$

$$[(TE_{100} \text{ témoin} - TE_{100} \text{ traité}) / (TE_{100} \text{ témoin})] \times 100 = \% \text{ de variation de TE}_{100}$$

1.3. Analyse statistique

Les comparaisons statistiques entre les différents lots témoins et traités sont effectués à l'aide du test t de Student, sur les volumes urinaires cumulés exprimés en ml/100g, et à chaque heure de relevé.

2. Résultats

2.1. Furosémide

Les résultats sont présentés sur la figure 32 et dans le tableau 20. A 10 mg/kg, le furosémide entraîne une augmentation significative de l'excrétion urinaire de la première à la huitième heure ($P \leq 0,001$).

Les pourcentages de variation des TE₅₀ et TE₁₀₀ sont respectivement de 86 et 87 % par rapport aux témoins, ce qui révèle une très forte activité diurétique du furosémide.

2.2. Hydrochlorothiazide

Les résultats sont présentés dans la figure 33 et le tableau 20. A 10 mg/kg, l'hydrochlorothiazide entraîne une augmentation significative de l'excrétion urinaire de la deuxième à la huitième heure avec un maximum d'action à la sixième et septième heure ($P \leq 0,001$).

Les pourcentages de variation des TE₅₀ et TE₁₀₀ sont respectivement de 63 et 64 % par rapport aux témoins, ce qui révèle une forte activité diurétique de l'hydrochlorothiazide.

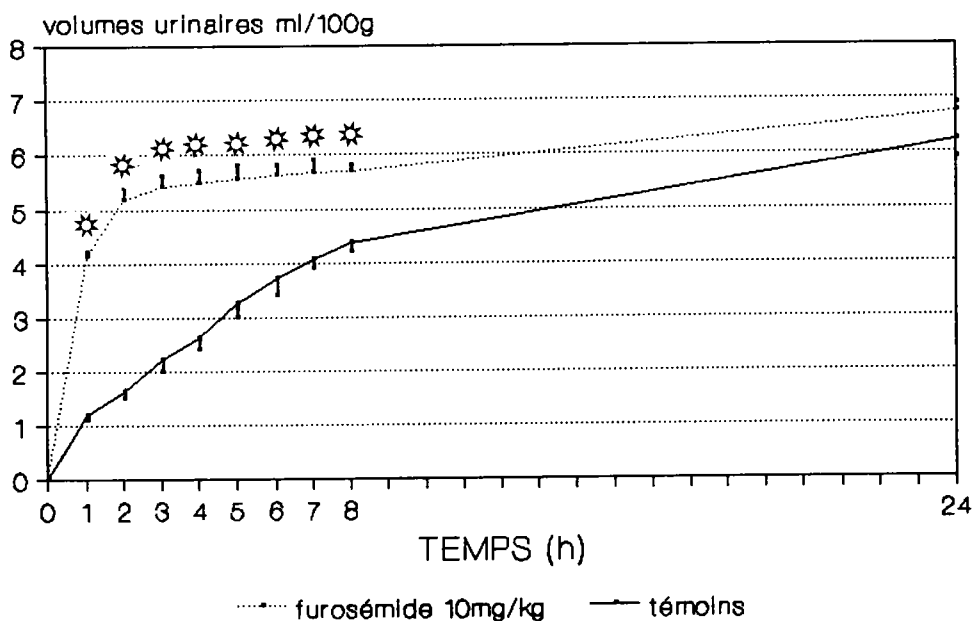


FIGURE 32 : Influence du furosémide (10 mg/kg, ip) sur la diurèse chez le rat, après administration d'une surcharge hydrique (5ml/100g). furosémide : n=15 ; témoins : n=15 ; $m \pm s.e.$; $\star : p \leq 0,001$

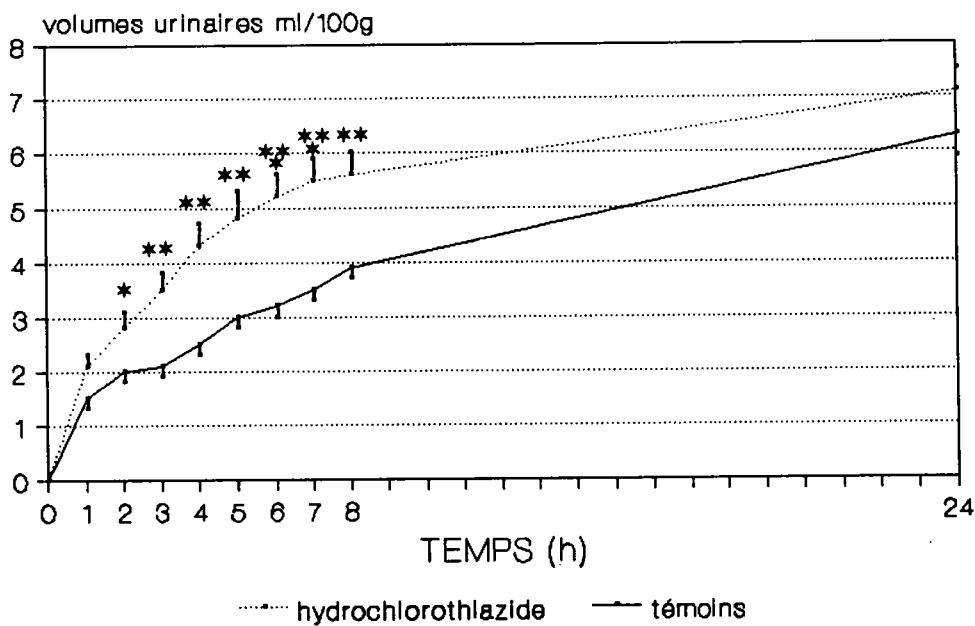


FIGURE 33 : Influence de l'hydrochlorothiazide (10 mg/kg, ip) sur la diurèse chez le rat, après administration d'une surcharge hydrique (5ml/100g). hydrochlorothiazide : n=10 ; témoins : n=10 ; $m \pm s.e.$; * : $p \leq 0,001$; ** : $p \leq 0,01$; * : $p \leq 0,05$**

2.3. Jeunes pousses de *R.officinalis*

* Macérat glycéro-alcoolique (MGA) : les résultats sont présentés dans la figure 34 et le tableau 20. Le MGA de jeunes pousses entraîne une augmentation significative de l'excrétion urinaire dès la première heure et ce jusqu'à la huitième heure ($P \leq 0,001$). Cette différence avec les témoins reste significative 24 h après l'injection.

Les pourcentages de variation des TE_{50} et TE_{100} sont respectivement de 35 et 64 % par rapport aux témoins, ce qui révèle une activité diurétique moyenne du MGA de jeunes pousses.

* Extrait aqueux : les résultats sont présentés dans la figure 35 et le tableau 20. L'extrait aqueux de jeunes pousses entraîne une faible augmentation de la diurèse à la première et à la deuxième heure ($p \leq 0,01$). Puis, la diurèse observée chez les traités reste légèrement supérieure à celle des témoins durant les 24 heures, mais cette différence n'est plus significative.

Les pourcentages de variation des TE_{50} et TE_{100} sont respectivement de 24 % et 27 %, ce qui révèle une très faible activité diurétique de l'extrait aqueux de jeunes pousses.

TABLEAU 20 : Influence des jeunes pousses de *R.officinalis* et des substances de référence sur les pourcentages de variation des temps d'élimination (TE_{50} et TE_{100}) de la surcharge hydrique administrée chez le rat.

Lots	% de variation des	
	TE_{50}	TE_{100}
Témoin	0 %	0 %
MGA de jeunes pousse 50 mg/kg	35 %	64 %
Extrait aqueux de jeunes pousses 50 mg/kg	24 %	27 %
Furosémide 10 mg/kg	86 %	87 %
Hydrochlorothiazide 10 mg/kg	63 %	64 %

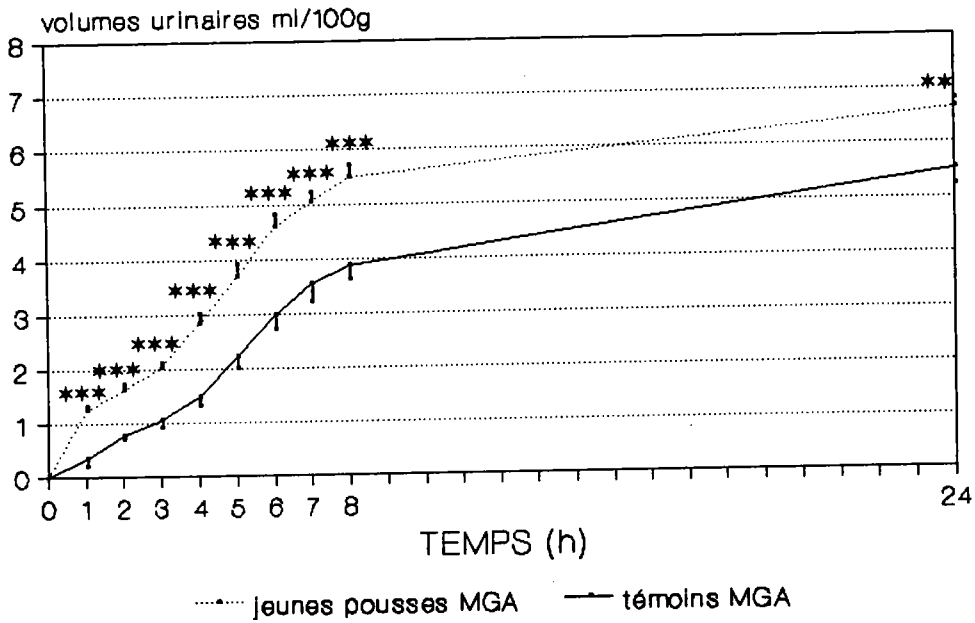


FIGURE 34 : Influence du MGA de jeunes pousses de *R. officinalis* (50 mg/kg, ip) sur la diurèse chez le rat, après administration d'une surcharge hydrique (5ml/100g) ; MGA jeunes pousses : n=14 ; témoins : n=14 ; $m \pm s.e.$; *** : $p \leq 0,001$;

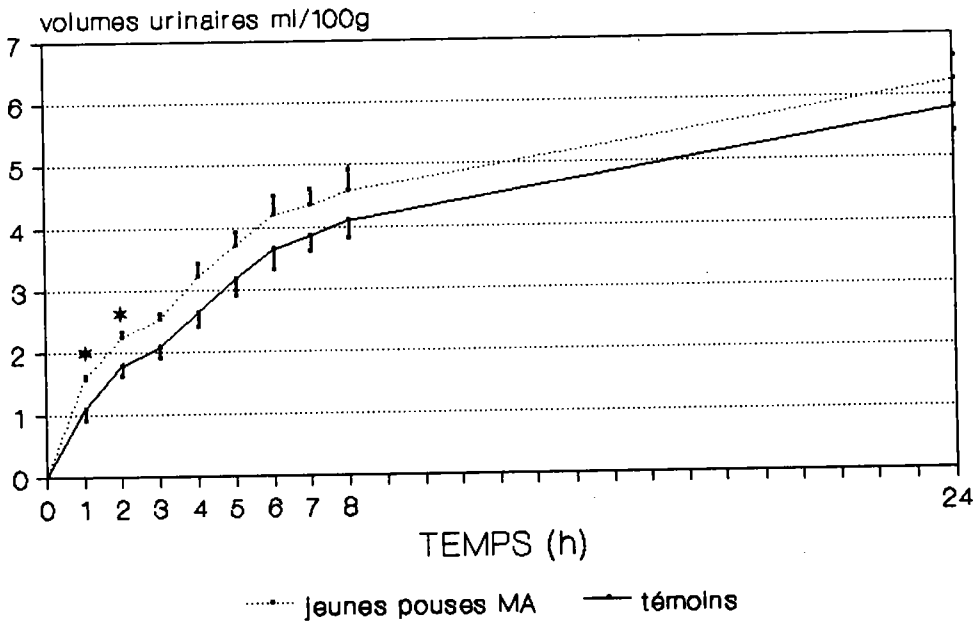


FIGURE 35 : Influence de l'extrait aqueux de jeunes pousses de *R. officinalis* (50 mg/kg, ip) sur la diurèse chez le rat, après administration d'une surcharge hydrique (5ml/100g) ; jeunes pousses : n=10 ; témoins : n=10 ; $m \pm s.e.$; * : $p \leq 0,05$

3. Conclusion - Discussion

Les résultats obtenus avec les substances de référence, furosémide (10 mg/kg, voie ip) et hydrochlorothiazide (10 mg/kg, voie ip), permettent de valider la technique d'étude de la diurèse en situation de surcharge hydrique. Ils montrent l'importance et la rapidité de l'action diurétique du furosémide, et une activité plus modérée et plus tardive pour l'hydrochlorothiazide (BARRET et coll., 1959).

Quant aux jeunes pousses de romarin (administrées à la dose de 50 mg/kg, voie ip)), seul le macérat glycéro-alcoolique (MGA) provoque une augmentation significative et durable de l'excrétion urinaire, caractérisée par une augmentation de la vitesse d'excrétion dès le début de l'expérimentation. L'extrait aqueux ne montre qu'une très faible augmentation de la diurèse par rapport aux témoins.

La différence d'activité diurétique entre ces deux préparations peut être liée aux protocoles d'extractions qui divergent par la nature du solvant (aqueux et glycéro-hydro-alcoolique) et par le temps de macération (respectivement 24 heures et 15 jours). Le macérat glycéro-alcoolique permettrait d'extraire une plus grande quantité et un plus large spectre de principes actifs que l'extrait aqueux.

La nature du solvant peut avoir un effet sur les mécanismes d'excrétion, car on remarque que les valeurs des TE_{50} et TE_{100} des témoins solvants aqueux sont nettement inférieures à celles des témoins solvants MGA :

TE_{50}	: 5 heures 30min	pour le solvant témoin MGA (fig 34)
	: 4 heures	pour le solvant témoin aqueux (fig 35)
TE_{100}	: 19 heures	pour le solvant témoin MGA (fig 34)
	: 16 heures 50 min	pour le solvant aqueux (fig 35)

Le solvant glycéro-alcoolique pourrait induire un processus de rétention d'eau qui serait levé par le MGA de jeunes pousses, et ce phénomène expliquerait l'hyperdiurèse induite par les jeunes pousses en MGA par rapport à la faible augmentation induite par les jeunes pousses en extrait aqueux.

L'importance du solvant d'extraction a été démontrée (BEAUX, 1991), notamment sur un solvant hydro-alcoolique (14°) qui augmenterait le niveau de diurèse des témoins par rapport à un solvant aqueux. Dans notre cas, nous avons un solvant glycéro-alcoolique dont le degré alcoolique est compris entre 50° et 60°, et contenant de la glycérine, ces deux facteurs pouvant intervenir sur le débit urinaire des témoins.

III. MESURE DE L'ACTIVITE DIURETIQUE PAR LE TEST EN CHRONIQUE CHEZ LE RAT

La technique utilisée se rapproche plus spécifiquement des protocoles de traitement en thérapeutique et plus particulièrement en phytothérapie, car les extraits sont administrés quotidiennement par voie orale et pendant 15 jours. Dans cette expérimentation, seule l'augmentation de la fonction d'élimination rénale est évaluée.

1. Procédure expérimentale

1.1. Matériel et méthode

* Animaux : on utilise des rats mâles OFA pesant de 300 (± 50 g) et soumis aux conditions d'élevage décrites précédemment (chap.I, II^{ème} partie) et placés dans des cages à métabolisme individuelles décrites précédemment.

* Alimentation : l'eau est distribuée *ad libitum*, alors que la nourriture est préparée journellement. Les aliments en poudre (EXTRA-LABO, PROVINS) sont homogénéisés avec le solvant témoin ou l'extrait afin d'obtenir une pâte. La quantité de nourriture est de 20 g de poudre par animal.

* Extraits :

-Macérat glycéro-alcoolique (MGA) de jeunes pousses de *R.officinalis* (Lab.DOLISOS, réf.MC008, Tableau 7) à la dose de 50 mg/kg ;

-Solvant neutre glycéro-alcoolique servant de témoin.

* Méthode : après une acclimatation de 2 jours dans les cages à métabolisme, les rats reçoivent journellement leur ration de nourriture dans laquelle se trouve la substance à étudier. Chaque lot comprend 5 rats. Vingt-quatre heures après le début de l'expérimentation, on recueille les urines et on mesure les volumes urinaires. Les cages sont nettoyées. Et ceci est répété journellement pendant 15 jours.

* Expression des résultats : les volumes urinaires sont exprimés en ml/24h/100g de poids corporel. Des tests d'homogénéité de variance sont effectués sur les deux lots de rats et pour chaque jour.

2. Résultats

Les résultats sont présentés dans la figure 36 ci-dessous. Ces courbes montrent de nombreuses variations de l'excrétion urinaire journalière sur les 2 lots de rats. Il n'a pas été possible d'analyser statistiquement ces résultats, car l'homogénéité des variances n'est pas respectée pour chaque lot durant les 15 jours de mesures. Nous ne pouvons qu'apprécier ponctuellement chaque différence entre les lots traités par le macérat glycéro-alcoolique (MGA) de jeunes pousses et le lot témoin. La diurèse journalière des animaux traités par le MGA reste supérieure à celle des témoins, jusqu'au 10^{ème} jour du traitement oral ; par la suite, traités et témoins ont des effets similaires.

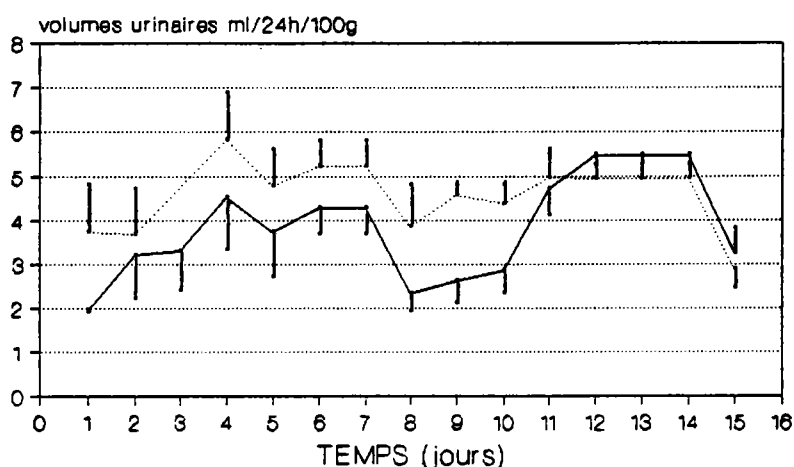


FIGURE 36 : Influence du MGA de jeunes pousses de *R.officinalis* (50 mg/kg/jour) sur la diurèse journalière du rat. MGA jeunes pousses : n=5 ; témoins : n=5 ; my $\pm$ s.e..

3. Discussion

Cette expérimentation en chronique met en évidence d'importantes variations individuelles pour un temps donné (écarts-type importants), pour un même lot d'animaux (traités ou témoins). Une augmentation du nombre d'animaux par lot (n=20) pourrait permettre de minimiser ces variations.

Si la technique dite chronique qui s'effectue par administration orale quotidienne

pendant 15 jours se rapproche plus des protocoles thérapeutiques de clinique, le travail, l'immobilisation du matériel et le coût de l'expérimentation nous conduisent à recommander la technique par surcharge hydrique. En effet, sa réalisation s'effectue en une journée, le nombre de rats peut facilement être augmenté, et la surcharge hypotonique induit une rétention d'eau se rapprochant ainsi de la pathologie oedémateuse.

Néanmoins, les résultats obtenus avec ce test en chronique confortent les résultats obtenus avec le test en surcharge hydrique, et indique que le macérat glycéro-alcoolique de jeunes pousses de romarin est actif par voie orale à 50 mg/kg.

IV. CONCLUSION

Le bilan global de l'activité diurétique nous permet de dire que le macérat glycéro-alcoolique de jeunes pousses de *R.officinalis* (50 mg/kg et voie intra-péritonéale) induit une augmentation significative de la diurèse par rapport aux témoins, dès la première heure qui suit l'injection et ceci durant 24 heures, chez le rat en situation de surcharge hydrique.

Le test de diurèse chez le rat, en traitement oral sur 15 jours permet de conforter les résultats précédents.

CHAPITRE VIII

ETUDE COMPARATIVE DES JEUNES POUSSES ET DES SOMMITES FLEURIES DE *ROSMARINUS OFFICINALIS*

INTRODUCTION

Nous venons de démontrer l'activité cholérétique, antihépatotoxique, antioxydante, anti-inflammatoire et diurétique des jeunes pousses de romarin. Ceci justifie leur emploi en phytothérapie. Il reste maintenant à comparer l'activité pharmacologique des extraits de jeunes pousses à l'une des drogues utilisée en thérapeutique traditionnelle, c'est-à-dire :

les sommités fleuries

Les sommités fleuries correspondent aux extrémités des rameaux de la plante portant à la fois des feuilles des années précédentes, des jeunes pousses et des fleurs.

Notre comparaison se portera sur les activités cholérétiques, antihépatotoxiques et anti-inflammatoires. Les extraits végétaux utilisés sont référencés dans le tableau 21 et proviennent de plantes fraîches récoltées dans un même biotope afin de limiter tout facteur de variation. Seule, la comparaison de l'activité cholérétique des jeunes pousses et des sommités fleuries sera réalisée à partir de deux extraits dont les plantes sont d'origines différentes.

TABLEAU 21 : Inventaire des extraits de *R. officinalis* utilisés dans la comparaison pharmacologique

Formes de préparation	Partie de la plante	Année de récolte	Rendement de lyophilisation	Références	Lieu de récolte
Extraits hydro-alcooliques (TM)	Jeunes pousses	Aout 1982	18,2	MC07	Montrichard(41)
	Sommités fleuries	Avril 1982	10,5	MC9	Eyguière (13)
Extraits aqueux	Jeunes pousses	Juin 1987	16,2	I	St Arty/C. (11)
		Juin 1988	10,7	K	St Martin (11)
	Sommités fleuries	Juin 1987	12,3	J	St Arty/C. (11)
		Juin 1988	8,0	L	St Martin (11)

St Arty/C. : St Arty/Caderonne dans l'Aude (garrigue)

St Martin : St Martin des Puits dans l'Aude (garrigue)

I. COMPARAISON DE L'ACTIVITE PHARMACOLOGIQUE DES JEUNES POUSSES ET DES SOMMITES FLEURIES

Les protocoles utilisés sont ceux décrits dans les chapitres précédents de la II^e partie.

1. Activité cholérétique

Nous utiliserons les extraits hydro-alcooliques de jeunes pousses et de sommités fleuries de références respectives MC07 et MC9 (Tab.21), aux doses iv de 1000 et 2000 mg/kg (équivalent plante sèche/kg de poids corporel) chez le rat.

Les résultats sont présentés dans le tableau 22 et dans les figures 37 et 38.

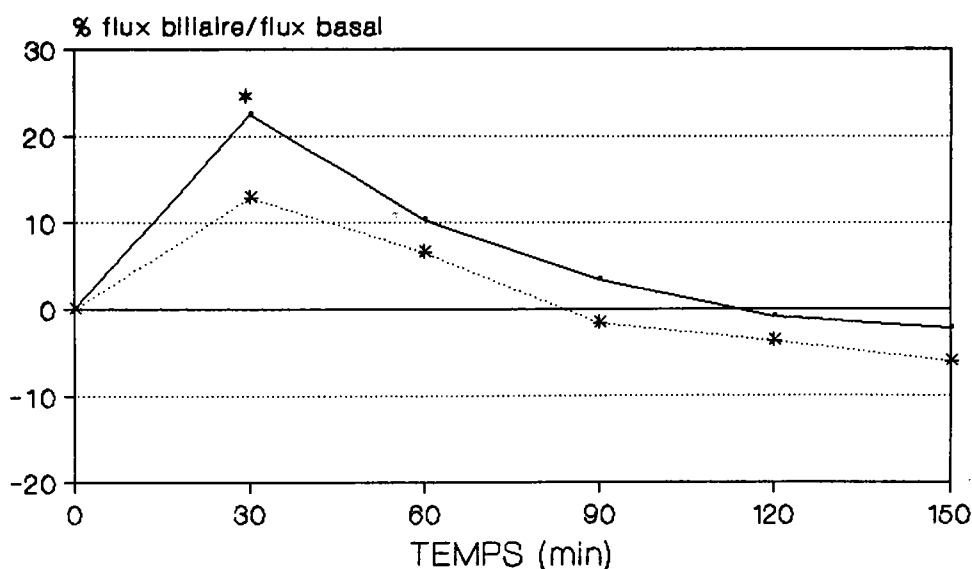
Les deux extraits provoquent une hypercholérèse significative ($p \leq 0,001$) pendant les 60 premières minutes. Seulement, l'amplitude des résultats est pratiquement deux fois plus importante pour les jeunes pousses (augmentation maximale du flux de 22,4 %), que pour les sommités fleuries (augmentation maximale du flux de 12,8 %), (Tab.22).

TABLEAU 22 : Influence des extraits hydro-alcooliques de jeunes pousses et de sommités fleuries de *R. officinalis* sur la cholérèse chez le rat (iv)

Lots	N	Pourcentages de variation du flux biliaire ; m $\pm$ s.e.					
		Base	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min
Témoins		0	-3,5 $\pm 1,4$	-6,2 $\pm 1,3$	-8,2 $\pm 1,2$	-12,1 $\pm 1,4$	-15,0 $\pm 1,0$
Jeunes pousses 1000 mg/kg	6	0	22,4*** $\pm 2,0$	10,3*** $\pm 1,6$	3,5** $\pm 2,0$	-0,9** $\pm 2,5$	-2,2** $\pm 2,5$
Jeunes pousses 2000 mg/kg	6	0	22,4*** $\pm 1,2$	18,5*** $\pm 3,5$	4,7* $\pm 3,6$	-1,9* $\pm 3,3$	-6,2* $\pm 3,3$
Sommités fleuries 1000 mg/kg	5	0	12,8*** $\pm 1,1$	6,6*** $\pm 1,6$	-1,6** $\pm 1,3$	-3,7** $\pm 0,8$	-6,0* $\pm 2,0$
Sommités fleuries 2000 mg/kg	5	0	10,3*** $\pm 2,0$	8,4*** $\pm 1,2$	-2,4 ^a $\pm 2,3$	-6,8 ^a $\pm 3,2$	-11,4 ^a $\pm 2,0$

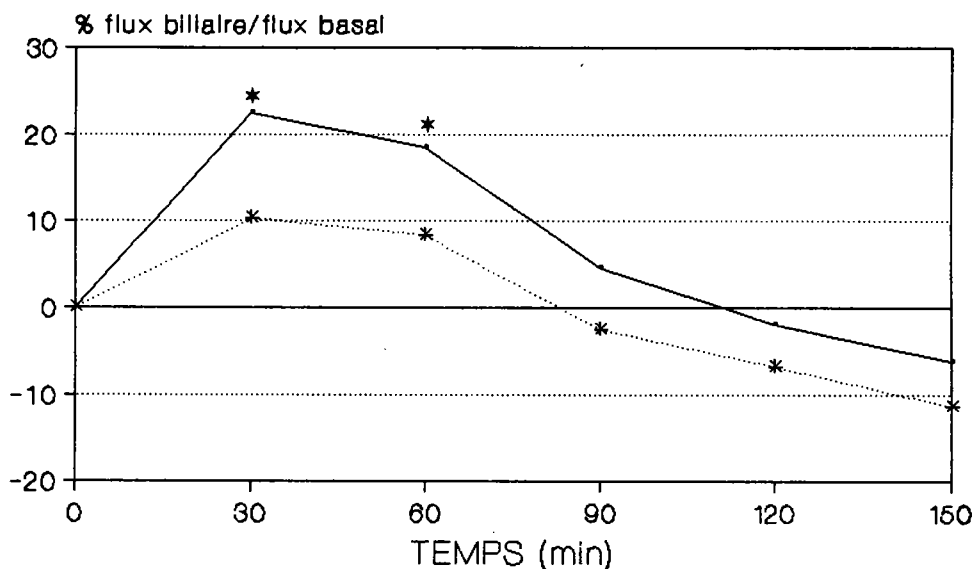
Différences significatives par rapport au témoin : *** : $p \leq 0,001$; ** : $p \leq 0,01$;

* : $p \leq 0,05$; ^a : non significatif. N : nombre d'animaux par lot



— Jeunes pousses *... Sommités fleuries
FIGURE 37 : Activité cholérétique comparée des extraits hydro-alcooliques de jeunes pousses et de sommités fleuries de *R.officinalis* à 1000 mg/kg , en iv chez le rat.

Significativité entre les extraits : * : $p \leq 0,05$



— Jeunes pousses *... Sommités fleuries
FIGURE 38 : Activité cholérétique comparée des extraits hydro-alcooliques de jeunes pousses et de sommités fleuries de *R.officinalis* à 2000 mg/kg , en iv chez le rat.

Significativité entre les extraits : * : $p \leq 0,05$

La différence est significative ($p \leq 0,05$) entre les jeunes pousses et les sommités fleuries durant les 30 premières minutes à la dose de 1000 mg/kg et durant les 60 premières minutes à la dose de 2000 mg/kg (Figs 37 et 38). Nous observons une tendance à la supériorité d'action des jeunes pousses par rapport aux sommités fleuries, dans ce test de la cholérèse chez le rat.

2. Activité hépatoprotectrice

Nous utiliserons les extraits aqueux de jeunes pousses et de sommités fleuries (références K et L du tableau 21) aux doses ip de 500, 1000 et 1500 mg/kg (équivalent plante sèche/kg de poids corporel) en traitement préventif chez la souris. Le toxique, CCl_4 est administré à la dose de 7.10^{-3} ml/kg par voie ip.

Les résultats sont présentés dans le tableau 23.

A 500 mg/kg, les extraits aqueux de jeunes pousses et de sommités fleuries n'induisent pas de diminution du taux des ALAT plasmatiques par rapport au placebo. Cependant, à partir de 1000 mg/kg, seul l'extrait de jeunes pousses réduit significativement le taux des ALAT plasmatiques. Le pourcentage d'hépatoprotection est de 69 % à la dose de 1000 mg/kg. L'activité protectrice des sommités fleuries semblerait débiter à partir de la dose de 1500 mg/kg avec un pourcentage de protection presque équivalent à celui des jeunes pousses (42 % et 49 % respectivement).

Dans ce test les jeunes pousses montrent une activité antihépatotoxique supérieure à celle des sommités fleuries, pour la dose de 1000 mg/kg (ip).

TABLEAU 23 : Influence d'un pré-traitement par les extraits aqueux de jeunes pousses et de sommités fleuries de *R. officinalis* (voie ip) vis-à-vis d'une intoxication par le CCl_4 (7.10^{-3} ml/kg) sur le taux des ALAT plasmatiques, chez la souris.

Produits	Doses mg/kg	N	ALAT (24h) U.I./l.	Protection %
Placebo	0	10	80 ± 16	
Jeunes pousses	500	10	80 ^a ± 12	/
Sommités fleuries	500	10	87 ^a ± 13	/
Placebo	0	9	140 ± 14	
Jeunes pousses	1000	8	61 ^{***} ± 11	+69
Sommités fleuries	1000	7	131 ^a ± 29	/
Placebo	0	9	152 ± 30	
Jeunes pousses	1500	9	90 ^a ± 14	+49
Sommités fleuries	1500	8	99 ^a ± 22	+42

Différence significative par rapport aux placebo : *** : $p \leq 0,001$; ^a : non significatif ;

N : nombre d'animaux par lot

Des travaux complémentaires aux nôtres, effectués par JOYEUX (1988), ont permis d'apporter des précisions sur l'activité hépatoprotectrice de *R. officinalis*. Des tests *in vitro* ont mis en évidence les activités antiradicalaire (sur radical DPPH), antilipoperoxydante et anticytotoxique (sur hépatocytes en suspension intoxiqués par le tBH) des extraits aqueux de jeunes pousses (ref.I, Tab.21) et de sommités fleuries (ref.J, Tab.21).

Dans le cas de l'activité antiradicalaire, les sommités fleuries induisent une inhibition de plus de 50 % de la coloration du DPPH à la concentration de 0,250 mg/ml (équivalent plante sèche/milieu), alors que les jeunes pousses sont actives dès la concentration de 0,125 mg/ml. Dans le cas de l'activité antilipoperoxydante, les sommités fleuries réduisent la quantité de MAD formée à partir de la concentration de 1 mg/ml, alors que les jeunes pousses sont actives dès 0,5 mg/ml. L'activité anticytotoxique, appréciée par le dosage d'ASAT et de LDH, est significative pour les jeunes pousses et les sommités fleuries à partir de la concentration de 0,5 mg/ml, avec une légère supériorité des jeunes pousses.

Nous pouvons dire que les deux extraits diminuent la lipoperoxydation et la cytotoxicité induite par le tBH sur les hépatocytes en suspension, mais la supériorité d'action reste toujours en faveur des jeunes pousses. De même, l'activité antiradicalaire des jeunes pousses est supérieure à celle des sommités fleuries, ce qui confirme les résultats obtenus sur la lipoperoxydation.

3. Activité anti-inflammatoire

Nous utiliserons les extraits aqueux de jeunes pousses et de sommités fleuries (réf. K et L, Tab.21) à la dose ip de 1500 mg/kg chez le rat. L'agent inflammatoire (carragénine) est injecté dans la patte du rat (injection sub-plantaire) à la dose de 0,05 ml/rat d'une suspension à 1 % (dans NaCl à 0,9%).

Les résultats sont présentés dans la figure 39 et le tableau 24.

Les jeunes pousses et les sommités fleuries réduisent l'oedème induit par l'injection de carragénine avec un maximum d'action à la troisième heure. L'inflammation est maximale à la troisième heure pour les jeunes pousses (47 % d'oedème), et à la quatrième et cinquième heure pour les sommités fleuries (41 % d'oedème), (témoins : 68 % d'oedème à la troisième heure). Puis l'oedème régresse lentement jusqu'à un pourcentage d'inflammation similaire à celui des témoins qui, au bout des 24 heures est de 14 % pour les deux extraits et de 16 % pour les témoins.

Les jeunes pousses et les sommités fleuries entraînent une inhibition maximale de

l'oedème, significative à la troisième heure (respectivement 33 et 36 %). Cette inhibition reste significative jusqu'à la cinquième heure pour les jeunes pousses et de la deuxième à la quatrième heure pour les sommités fleuries.

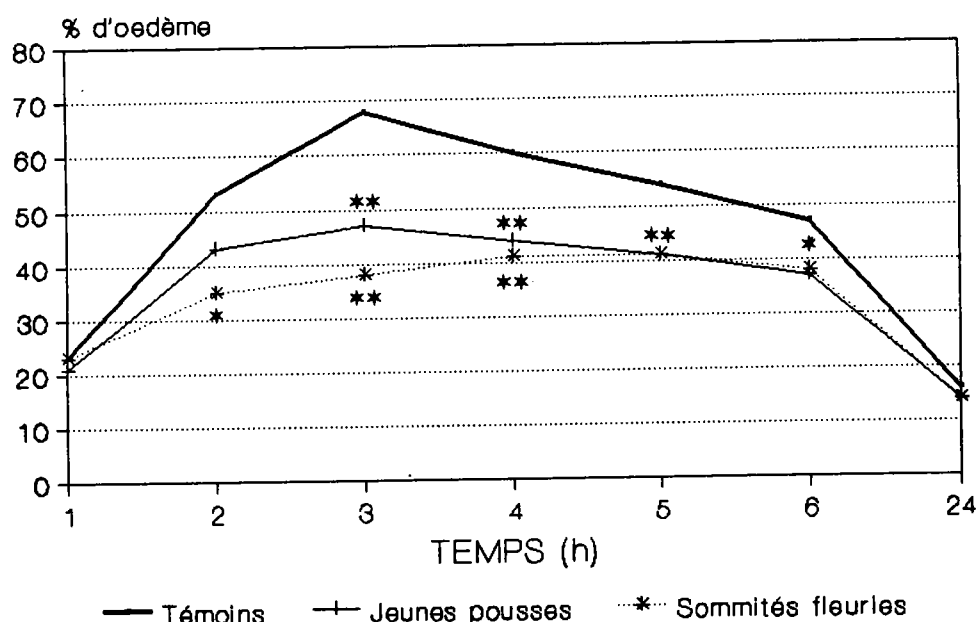


FIGURE 39 : Influence de *R. officinalis* (1500mg/kg, ip) sur l'oedème induit par la carragénine chez le rat : Comparaison jeunes pousses/sommités fleuries; * : $p \leq 0,05$; ** : $p \leq 0,01$;

TABLEAU 24 : Activité anti-inflammatoire des extraits aqueux de jeunes pousses et de sommités fleuries de *R. officinalis*, sur l'oedème induit par une injection de carragénine au niveau de la patte postérieure droite du rat

Lots	Pourcentages d'inhibition (%) obtenus aux relevés suivants						
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T24
Jeunes pousses 1500 mg/kg N = 11	7 ^a	20 ^a	33 ^{**}	29 ^{**}	25 ^{**}	21 [*]	10 ^a
Sommités fleuries 1500 mg/kg N = 11	3 ^a	34 [*]	36 ^{**}	30 ^{**}	29 ^a	18 ^a	10 ^a

Différence significative par rapport au témoin : ** : $p \leq 0,005$; * : $p \leq 0,05$; ^a : non significatif ;

N : nombre d'animaux par lot

Les jeunes pousses et les sommités fleuries induisent une activité anti-inflammatoire similaire et significative sur le test à la carragénine chez le rat.

II. CONCLUSION

Les jeunes pousses et les sommités fleuries montrent une activité pharmacologique positive, de moyenne amplitude, et significative par rapport aux témoins, pour les fonctions cholérétique , anti-hépatotoxique (tests *in vivo* et *in vitro*) et anti-inflammatoire. A dose égale, les jeunes pousses sont plus performantes que les sommités fleuries pour l'activité cholérétique, l'activité antihépatotoxique *in vivo* chez la souris, ainsi que l'activité antiradicalaire, antilipoperoxydante et anticytotoxique *in vitro*. Seul, le test de l'activité anti-inflammatoire donne une performance identique pour les jeunes pousses et les sommités fleuries.

CHAPITRE IX

RELATION STRUCTURE/ACTIVITE

I. RELATION STRUCTURE/ACTIVITE

La connaissance de la composition chimique de *R. officinalis* ainsi que les connaissances en matière médicale et pharmacologie, nous permettent d'élucider certains effets pharmacologiques de *R. officinalis* notamment les effets cholérétique, anti-hépatotoxique, anti-radicalaire et anti-inflammatoire. L'activité cholérétique de *R. officinalis* est attribuée à la présence de composés phénoliques (ac. rosmarinique, caféique et chlorogénique) qui sont actifs par leurs groupements hydroxyles, facilement convertibles en glucuronides. Ceux-ci étant excrétés activement par le système hépatique (canaux biliaires) sous forme d'anions organiques couplés au sodium et au potassium, ils provoquent une hypercholérèse. Les composés phénoliques sont actifs également par la présence de double liaison ($-\text{CH}=\text{CH}-$) et de groupement méthoxy ($-\text{CH}_3$) (SHARMA et coll., 1973 ; TAKEDA et ABURADA, 1981). Les composés terpéniques (notamment les terpènes cycliques comme le bornéol et le menthol) sont également impliqués dans l'activité cholérétique de part leur fonction alcool (YOUNOS, 1971; YAMAHARA^{a,b,c} et coll., 1985). A ces composés, s'ajoutent les flavonoïdes qui sont bien représentés chez *R. officinalis* et qui sont aussi responsables de l'activité cholérétique (LALLEMENT-GUILBERT et BEZANGER-BEAUQUESNE, 1970).

Toujours dans la sphère hépatique, les molécules présentes dans les jeunes pousses de *R. officinalis* et susceptibles d'interférer dans les processus de toxicité hépatique seraient en partie des composés ayant des propriétés anti-oxydantes (ou anti-radicalaires), c'est à dire intervenant dans la phase oxydative du toxique. Certains de ces composés ont été isolés comme étant les diterpènes suivants : le carnosol d'après BRACCO (1981) et WU (1982), le rosmadial d'après NAKATANI et INATANI (1984), ainsi que le rosmanol et ses dérivés méthoxylés identifiés par JOYEUX (1993) comme étant responsables de l'activité antihépatotoxique sur hépatocytes isolés. Le β -sitostérol (LIN et TOME, 1988) et l'acide ursolique (LIN et coll., 1988) seraient doués d'une activité hépatoprotectrice vis à vis du tétrachlorure de carbone sur le modèle *in vivo* chez la souris. Mais les acides ursolique et oléanolique ainsi que l' α et la β amyrine ne seraient pas actifs sur le modèle *in vitro* sur hépatocytes isolés (JOYEUX, 1993). Les flavonoïdes qui possèdent des propriétés de type vitamine P (augmentation de la résistance membranaire et diminution de la perméabilité des capillaires), pourraient participer à la protection cellulaire contre l'agression d'un toxique. Parmi eux, la lutéoline a effectivement une activité hépatoprotectrice (JOYEUX, 1993) sur modèle *in vitro* d'hépatocytes en suspension.

Pour l'interprétation de l'activité anti-inflammatoire de *R. officinalis*, les composés précédemment cités comme antioxydants ou anti-radicalaires seraient susceptibles d'agir également lors des processus anti-inflammatoires en limitant la phase oxydative de

l'inflammation. Un acide-phénol, l'acide rosmarinique, présent dans les jeunes pousses en quantité plus importante que dans les sommités fleuries, jouerait un rôle important dans le processus anti-inflammatoire (PARNHAM et KESSELRING, 1985 ; BULT et coll., 1985 ; ENGELBERGER et coll., 1988). C'est un inhibiteur de la C_3 convertase et cette fraction du complément intervient dans certaines phases de l'inflammation. Certains flavonoïdes, la lutéoline et l'apigénine, sont le support d'une activité anti-inflammatoire démontrée sur le test à la carragénine par ALCARAZ et JIMENEZ (1988). Enfin, HUANG et coll.(1992) confirment nos résultats en rapportant qu'un extrait de romarin a un fort effet inhibiteur sur certains processus induisant une inflammation.

CHAPITRE X

CONCLUSION

ACTIVITES PHARMACOLOGIQUES DE *R. OFFICINALIS*

Les travaux entrepris pour l'étude de *R. officinalis* confirment ses usages en phytothérapie comme "cholérétique", et "facilitant les fonctions d'éliminations rénales et digestives". Ils confirment aussi son action anti-rhumatismale ainsi que l'action des jeunes pousses dans les insuffisances hépatiques.

Les tests pharmacologiques entrepris sur les jeunes pousses de *R. officinalis* ont montré que :

- *les jeunes pousses induisent une hypercholérèse rapide et prolongée, chez le rat, pour une dose efficace et suffisante de 1000 mg/kg (plante sèche / kg de poids corporel) par voie iv ;

- *les jeunes pousses réduisent l'augmentation du taux des ALAT plasmatiques (hépatoprotection de 65 % en moyenne), induite par une intoxication par le tétrachlorure de carbone (chez le rat et la souris, voie ip) pour des doses supérieures ou égales à 1000 mg/kg (en traitement préventif). Cette hépatoprotection a été confirmée par JOYEUX (1993) sur des tests *in vitro*, sur hépatocytes en suspension intoxiqués au ter-butylhydroperoxyde (tBH), et sur radical chimique oxydant diphényl-picrylhydrazyl (DPPH), qui révèlent les propriétés antiradicalaire, antilipoperoxydante et anticytotoxique des jeunes pousses ;

- *les jeunes pousses induisent une diminution de l'oedème provoquée par une injection sub-plantaire de carragénine chez le rat. L'activité anti-inflammatoire est maximale de 3 à 5 heures après l'injection de l'agent phlogistique à la dose de 1500 mg/kg (voie ip) ;

- *l'extrait glycéro-alcoolique de jeunes pousses à 50 mg/kg (voie ip) provoque une augmentation de la diurèse chez le rat en situation de surcharge hydrique. Cet effet diurétique débute une heure après l'injection de l'extrait et se maintient pendant 24 heures. Dans les mêmes conditions, l'extrait aqueux de jeunes pousses a un effet diurétique faible pendant les deux premières heures qui suivent l'injection de l'extrait.

Connaissant ainsi le niveau d'activité des jeunes pousses sur les différents tests pharmacologiques, nous avons comparé leur activité à celle des sommités fleuries, drogue utilisée dans la pharmacopée française. Cette comparaison a été établie sur l'activité cholérétique, anti-hépatotoxique et anti-inflammatoire. Sur le test de la cholérèse, les sommités fleuries augmentent le débit biliaire, mais dans une proportion deux fois moins importante que les jeunes pousses. Le test d'hépatoprotection *in vivo* chez la souris intoxiquée au tétrachlorure de carbone ne permet pas de dégager une activité protectrice significative des sommités fleuries (à 1000 mg/kg, dose active des jeunes pousses). Seule la

dose de 1500 mg/kg induit une protection de 42 %, mais non significative. Sur le test anti-inflammatoire les deux extraits montrent une activité significative similaire, à la dose de 1500 mg/kg. Les travaux complémentaires effectués par JOYEUX(1988) montrent que les sommités fleuries sont moins performantes que les jeunes pousses sur les tests d'activité antiradicalaire, antilipoperoxydante et anticytotoxique sur les tests *in vitro* sur hépatocytes en suspension et sur radical chimique oxydant.

Ces résultats nous permettent de conclure à la supériorité d'action des jeunes pousses par rapport aux sommités fleuries dans les domaines d'activité cholérétique et hépatoprotectrice.

Les travaux de plusieurs auteurs ont confirmé nos résultats, sur l'activité cholérétique, antiradicalaire et antihépatotoxique. L'équipe de SERRANO et MONGOLD (SERRANO et coll., 1990 ; MONGOLD et coll., 1991) a montré l'activité cholérétique et cholagogue chez le cobaye d'un extrait de "*Rosmarinus MDE*" (100 mg/kg d'extrait, voie iv). LAMAISON et ses collaborateurs (1988 et 1991) ont montré une bonne activité antiradicalaire des extraits hydro-alcooliques de sommités fleuries de *R. officinalis* sur radical DPPH.

NAVARRO et ses collaborateurs (1993) montrent qu'un extrait hydro-alcoolique des parties aériennes de *Rosmarinus tomentosus*, autre espèce dénommée également *Rosmarinus eriocalix* provoque une diminution de la toxicité induite par le tétrachlorure de carbone, visible sur les marqueurs cellulaires (ALAT, bilirubine et MAD).

Nous venons par ce travail, de confirmer l'utilisation traditionnelle de *R. officinalis* et plus particulièrement l'usage des jeunes pousses pour les indications qui lui sont propres et pour celles appliquées à la drogue. Il serait intéressant de développer l'investigation sur l'effet anti-inflammatoire de l'extrait aqueux de jeunes pousses. Cette activité ne semble pas négligeable en comparaison des résultats obtenus par d'autres extraits de plantes (LANHERS et coll., 1991^a et ^b et 1992) étudiés dans notre laboratoire.

BIBLIOGRAPHIE

ABDERRAZZAQ EDDJEZAIRI, 1874, *Kachef er-roumouz-(Révélation des énigmes ou Traité de matière médicale arabe)*, (traduit par LECLERC), PARIS : Ed Leroux, 381p.

ABED, L., BENMERABET, K., 1981, *Intérêt de l'apport en potassium et sodium des infusions de plantes médicinales*, PI Méd Phyt, 15, 92-98.

AESCHBACH, R., PHILIPPOSIAN, G., RICHLI, U., 1986, *Flavonoïdes glycosylés du romarin : leur séparation, isolation et identification*, Bull Liaison, groupe polyphénols, 13, 56-58.

ALCARAZ, M.J., JIMENEZ, M.J., 1988, *Flavonoïds as anti-inflammatory agents*, Fitoterapia, 59, (1), 25-38.

ANTOINE, Ph., 1991, *Affections neuropsychiatriques*, Encycl Méd Nat (PARIS, France), Phytothérapie, Aromathérapie, D-8, 9, 40p.

ARISAWA, M., HAYASHI, T., OHMURA, K., NAGAYAMA, K., SHIMIZU, M., MORITA, N., 1987, *Chemical and pharmaceutical studies on medicinal plants in Paraguay : studies on "romero", part 2*, J Nat Prod, 50, 6, 1164-1166.

BAILEY, L.H., BAILEY, E.Z., 1976, *HORTUS THIRD, a concise dictionary of plants cultivated in the United States and Canada*, NEW-YORK, LONDRES : Ed Mac Millan, p983.

BALANSARD, S., 1953, *Contribution à l'étude du Romarin (Rosmarinus officinalis L. Labiées)*, Thèse Pharm., Marseille, 35p.

BARACETTI, M., 1986, *Flore méditerranéenne*, planche n°151, MILLAS : Ed Millas Impression.

BARBERAN, F.A.T., 1986, *The flavonoïd compounds from the Labiatae*, Fitoterapia, 62, (2), 67-95.

BARRETT, W.E., RUTLEDGE, R.A., SHEPPARD, H., PLUMMER, A.J., 1959, *The pharmacology of hydrochlorothiazide (Esidrix^R) A new orally effective sulfonamide diuretic*, Toxicol Appl Pharmacol, 1, (4), 333-349.

BASSANI, V., CASADEBAIG, J., JACOB, M., MENUT, C., LECHAT, I., LAMATY, G., 1990, *Preparation of a low alcohol extract of Rosmarinus officinalis using a reverse osmosis membrane*, Int J Pharm, 63, (1), 57-65.

BEAUX, D., 1991, *Etude pharmacologique des propriétés diurétiques d'extraits d'Orthosiphon, de Piloselle, de Sureau noir, de Fenouil doux et de Busserole chez le rat*, Thèse de Doctorat de l'Université de Metz, Spécialités pharmacognosie, METZ; 231p.

BELLAKHDAR, J., 1978, *Médecine traditionnelle et toxicologie ouest-sahariennes; Contribution à l'étude de la pharmacopée marocaine*, RABAT : Ed Techniques Nord-Africaines, 358p.

BEZANGER-BEAUQUESNE, L., PINKAS, M., TORCK, M., 1975, Les plantes dans la thérapeutique moderne, PARIS : Ed Maloine, 419-421.

BEZANGER-BEAUQUESNE, L., PINKAS, M., TORCK, M., TROTIN, F., 1980, Plantes médicinales des régions tempérées, PARIS : Ed Maloine, 235p.

BLOTMAN, F., POUBELLE, P., CHAINTREUIL, J., DAMON, M., 1983, *Icosanoïdes, inflammation articulaire et polyarthrite rhumatoïde*, in *Biochimie de l'inflammation : l'acide arachidonique et ses dérivés*, 134-173, BLOTMAN, F., CRASTES DE PAULET, A., SIMON, L., PARIS : Ed Masson.

BOELENS, M.H., 1985, *The Essential Oil from Rosmarinus officinalis L.*, Perfumer and Flavorist, 10, 21-37.

BONNIER, G., 1934, *Flore complète de France, Suisse et Belgique*, PARIS : Arlhac, 8, p.119, 9, p.39.

BOUCHAT, J., 1956, *BeniOunif (Sud Oranais) Etude géographique, historique et médicale*, Arch Inst Pasteur, ALGER, 34, (4), 575-671.

BOUQUET, 1921, *Matière médicale indigène de l'Afrique du Nord*, Trav Off Nat Matières Premières Végétales, Notice 8, 1-29.

BRACCO, U., LÖLIGER, J., VIRET, J.L., 1981, *Production and use of natural antioxidants*, J A O C S, 58, 686-690.

BRAQUET, P., BRAQUET, M., 1982, in *Biochimie de l'inflammation : l'acide arachidonique et ses dérivés*, 89-90, BLOTMAN, F., CRASTES DE PAULET, A., SIMON, L., PARIS : Ed Masson.

BRIESKORN, C.H., BECK, K., 1970, *Hydrocarbons in the leaf wax of Rosmarinus officinalis*, Phytochem, 9, (7), 1633-1640.

BRIESKORN, C.H., BRINER, M., SCHLUMPRECHT, L., EBERHARDT, K.H., 1953, *Vergleichende quantitative Bestimmungen der Ursolsäure und des ätherischen Ols in Pharmazeutisch- und lebensmittelchemisch-wichtigen Labiaten*, Arch Pharm, 285, 290-296.

BRIESKORN, C.H., BUCHBERGER, L., 1973, *Diterpene quinones from Labiatae roots*, Planta med, 24, (2), 190-195.

BRIESKORN, C.H., DÖMLING, H.J., 1967, *Occurrence of 5-hydroxy-4', 7-dimethoxyflavone in Rosmarinus officinalis leaves*, Arch Pharm, 300, 1042-1044.

BRIESKORN, C.H., DÖMLING, H.J., 1969, *Natürliche und synthetische Derivate der Carnosolsäure*, Arch Pharm, 302, 641-649.

BRIESKORN, C.H., FUCHS, A., 1962, *Die Structure des Pikrosalvins, eines Diterpen-diphenol-lactons aus dem Salbleiblatt*, Chem Ber, 95, 3034-3041.

BRIESKORN, C.H., FUCHS, A., BREDENBERG, J.B.-son, Mc CHESNEY, J.D., WENKERT, E., 1964, *The structure of carnosol*, J Org Chem, 29, 2293-2298.

- BRIESKORN, C.H., KABELITZ, L., 1971, *Hydroxy fatty acids from leaf cutin of Rosmarinus officinalis*, Phytochem, 10, (12), 3194-3204.
- BRIESKORN, C.H., MICHEL, H., 1968, *Flavones from Rosmarinus officinalis leaves*, Tetrah Lett, 3447-3448.
- BRIESKORN, C.H., MICHEL, H., BIECHELE, W., 1973, *Flavones of rosemary leaves*, Deut Lebensm Rundsch, 69, (7), 245-246.
- BRIESKORN, C.H., ZWEYROHN, G., 1970, *Zum Vorkommen von drei weiteren Triterpensäuren im Blatt von Rosmarinus officinalis*, Pharmazie, 25, (8), 488-490.
- BULLETIN OFFICIEL, 1990, *Avis aux fabricants concernant la Mise Sur Le Marché de Spécialités pharmaceutiques à Base de Plantes*, B.O. 90/22bis.
- BULT, H., HERMAN, A.G., RAMPART, M., 1985, *Modification of endotoxine-induced haemodynamic and haematological changes in the rabbit by methylprednisolone, F (ab')₂ fragments and rosmarinic acid*, Br J Pharmac, 84, 317-327.
- CABO TORRES, J., MALDONADO, R., JIMENEZ, J., VILLAR DEL FRESNO, A., BRAVO, L., 1972, *Estudio cromatographico de las esencias de romero espanol*, Boll Chim Farm, 111, 573-578.
- CHABROL, E., CHARONNAT, R., MAXIMIN, M., BUSSON, A., 1932, *L'action cholérétique des Labiées*, C R Soc Biol, 109, 275-276.
- CHIPAULT, J.R., MIZUNO, G.R., HAWKINS, J.M., LUNDBERG, W.O., 1952, *The antioxidant properties of natural spices*, Food Research, 17, 46-55.
- CHIPAULT, J.R., MIZUNO, G.R., LUNDBERG, W.O., 1955, *Antioxidant properties of spices in oil-in-water emulsions*, Food Research, 20, 443-448.
- CHIPAULT, J.R., MIZUNO, G.R., LUNDBERG, W.O., 1956, *The antioxidant properties of spices in foods*, Food Research, 10, 209-211.
- CHOPRA, I.C., ABROL, B.K., HANDA, K.L., 1960, *Les plantes médicinales des régions arides, considérées surtout du point de vue botanique*, 11-56, Ed UNESCO.
- CHOPRA, R.N., NAYAR, S.L., CHOPRA, I.C., 1956, *Glossary of Indian Medicinal Plants*, NEW DELHI : Ed Council of Scientific and Industrial Research, 215p..
- CLAISSE, R., 1990, *Pharmacopée traditionnelle du Maroc, Marché populaire de Yacoub el mansour* in 1^{er} colloque européen d'ethnopharmacologie, Sources, Méthodes, Objectifs, FLEURENTIN, J., CABALION, P., MAZARS, G., DOS SANTOS, J., YOUNOS, C., 23 au 25 mars 1990, Metz, PARIS METZ : ORSTOM SFE, 448-449.
- CORBIC, M., DUMONT, M., DE COUET, G., ERLINGER, S., 1982, *Choleretic and diuretic properties of dihydroxydibutyl ether in the rat*, J Pharmacol Exp Ther, 221, (3), 769-774.

CUNIN, C., CHATRON, M., BENOIT, M., DE FOUCAULT, R., MERVEAU, P., 1976-1977, *Le livre vert de l'officine; Médicaments spécialisés humains et vétérinaires*, PARIS : Ed Office Commercial pharmaceutique.

DAVIS, P.H., 1982, *Flora of Turkey and the East Aegan Islands*, 7, EDINBURGH : Ed Edinburgh University Press, 75-76.

DELAS, R., LAGREU, R., 1954, *Sur l'action pharmacodynamique du Romarin*, Société de Pharmacie de Montpellier, 240-242.

DELAVEAU, P., 1987, *Les épices, Histoire, description et usage des différents épices, aromates et condiments*, PARIS : Ed Albin Michel, 371p.

DOREAU, M., 1961, *Considérations actuelles sur l'alimentation, ainsi que sur la pharmacopée et la thérapeutique traditionnelle au Sahara*, Thèse Pharm., STRASBOURG, 108p.

DORVAULT, F., WEITZ, R., 1945, *Le dispensaire pharmaceutique*, in *L'Officine Répertoire général de pharmacie pratique*, tome2, PARIS : Eds Vigot Frères, 2345p.

DUCROS, A.H., 1930, *Essais sur le droguier populaire arabe de l'inspectorat des pharmacies du Caire*, Mem Inst d'Egypte, 15, 166p. + 9 planches.

DUKE, J., 1985, *Handbook of Medicinal Herbs*, Ed C R C Press, Boca Raton, FL.

DUKE, J., AYENSU, E., 1985, *Medicinal plants of China*, 2 volumes, Alganac, MI.

EAKINS, M.N., 1978, *Bile secretion and cholestasis*, in SLATER, T.F., *Biochemical mechanism of liver injury*, 559-589, C R C Press, LONDON NEW-YORK : Ed Academic Press.

ENGELBERGER, W., HADDING, U., ETSCHENBERG, E., GRAF, E., LEYCK, S., WINKELMAN, J., PARNHAM, M.J., 1988, *Rosmarinic acid : a new inhibitor of complement C³-convertase with anti-inflammatory activity*, Int J Immunopharmac, 10, (6), 729-737.

ERLINGER, S., 1982, *Bile flow*, in *The liver : Biology and pathobiology*, 407-427, ARIAS, I., POPPER, H., SCHACHTER, D., SHAFRITZ, D.A., NEW YORK : Ed Raven Press.

FALCHI DELITALA, L., SOCCOLINI, F., 1980, *Ricerche sul Rosmarinus officinalis Linnaeus di Sardegna*, Rivista Italiana E P P O S, 62, (4), 195-201.

FARAG, R.S., SALEM, H., BADEI, AZMA, HASSANEIN, D.E., 1986, *Biochemical studies on the essential oils of some medicinal plants*, Fette Seifen Anstrichmittel, 88 (2), 69-72.

FLEURENTIN, J., 1983, *Répertoire des pharmacopée traditionnelles du Yemen et étude pharmacologique des deux espèces à propriétés hépatorénales : Crépis rueppellii et Anisotes trisulcus*, Thèse de Doctorat d'état es-sciences pharmaceutiques, NANCY, 689p.

FLEURENTIN, J., HOEFLER, C., MORTIER, F., PELT, J.M., 1987, *Pharmacologie des extraits de jeunes pousses et de plante entière de Rosmarinus officinalis L.*, *Phytotherapy*, 20, 19-30.

FLEURENTIN, J., JOYEUX, M., 1990, *Les tests in vivo et in vitro dans l'évaluation des propriétés anti-hépatotoxiques de substances d'origine naturelle*, in *1^{er} colloque européen d'ethnopharmacologie, Sources, Méthodes, Objectifs*, FLEURENTIN, J., CABALION, P., MAZARS, G., DOS SANTOS, J., YOUNOS, C., 23 au 25 mars 1990, Metz, PARIS METZ : ORSTOM SFE, 248-269.

FOURNIER, P., 1948, *Livre des plantes médicinales et vénéneuses de France*, Tome 2, 334-337, PARIS : Ed Lechevalier.

GARNIER, G., BEZANGER-BEAUQUESNE, L., DEBRAUX, G., 1961, *Ressources médicinales de la flore française*, 2, PARIS : Ed Vigot Frères, 1211-1214.

GATTEFOSSE, J., 1921, *Les plantes dans la thérapeutique indigène du Maroc, Rapport de la mission Perrot-Gentil*, notice n°10, 73-123, in *Sur les productions végétales du Maroc*, Off Nat des Matières Premières Végétales, PARIS : Ed Larose.

GIRRE, L., 1985, *Nouveau guide des vieux remèdes naturels*, RENNES : Ed ouest-France, 314p.

GRACZA, L., RUFF, P., 1984, *Rosmarinsäure in Arzneibuchdrogen und ihre HPLC-Bestimmung*, *Arch Pharm*, 317, 339-345.

GOMEZ DIAZ, M.I., DE CASTRO, C.R., D'ACOSTA, N., DE FENOS, O.M., DE FERREYRA, E.C., CASTRO, J.A., 1975, *Species differences in carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity : the role of CCl₄ activation and of lipid peroxidation*, *Toxicol Appl Pharmacol*, 34, 102-113.

GRANGER, R., PASSET, J., ARBOUSSET, G., GIRARD, J.P., 1970, *Relations biogénétiques entre la verbénone et l' α -pinène dans Rosmarinus officinalis*, *C R Acad Sc PARIS*, 270, 209-212.

GRANGER, R., PASSET, J., ARBOUSSET, G., 1973, *L'essence de Rosmarinus officinalis L.*, *Parf Cosm Sav France*, 3, (6), 307-312.

GREUTER, W., BURDET, H.M., LONG, G., 1986, *Med-Checklist, Inventaire critique des plantes vasculaires des pays circumméditerranéens, Dicotyledones (Convolvulaceae-Labiatae)*, 3, GENEVE : Ed Conservatoire et jardin botanique de la ville de Genève, 313p.

GUILLOUZO, A., CLERC, C., MALLEDANT, Y., CHESNE, C., RATANASAVANH, D., GUGUEN-GUILLOUZO, C., 1989, *Modèles d'étude de la cytoprotection hépatique*, *Gastroenterol Clin Biol*, 13, 725-730.

GYIRES, K., FURST, S., MIKLYA, I., BUDAVARI, I., KNOLL, J., 1985, *Analysis of the analgesic and anti-inflammatory effects of rimazolium, a pyrido-pyrimidine derivative, compared with that of prostaglandine synthesis inhibitors and morphine*, *Drugs Exptl Clin Res*, 11, (8), 493-500.

HAKIM MAYSERI, 1987, *DANESHNAMA*, (370 de l'Hégire 991), en persan, TEHERAN : Ed DANESHGAH TEHERAN, 325p.

HARTMANN, V.E., RACINE, P., GARNERO, J., TOLLARD D'AUDIFFRET, Y., 1980, *Les extraits de romarin (Rosmarinus officinalis Linnaeus) antioxygènes naturels utilisables dans la protection des huiles essentielles*, Parfums Cosmétiques Arômes, 36, 33-40.

HEINZ, A. HOPPE, 1975, 1, *Drogen Kunde, Band 1 'Angiospermen'*, BERLIN NEW-YORK : Ed Walter de GRUYTER, (8), 942-943.

HEGNAUER, R., 1966, *Chimiotaxonomie der Planzen*, BALE-STUTTGART : Ed Birkhäuser Verlag, Tome IV, 289-346.

HERRMANN, K., 1962, *Über die antioxydative Wirkung der Labiatendrogen und der in ihnen enthaltenen Labiatensäure ("Labiatergerstoff")*, Z Lebensmittel Unders U Forschung, 116, 224-228.

HIKINO, H., KISO, Y., AMAGAYA, S., OGIHARA, Y., 1984, *Antihepatotoxic actions of papyriogenins and papyriosides, triterpenoids of Tetrapanax papyriferum leaves*, J Ethnopharmacol, 12, 231-235.

HOEFLER, C., FLEURENTIN, J., MORTIER, F., PELT, J.M., GUILLEMAIN, J., 1987, *Comparative choleretic and hepatoprotective properties of young sprouts and total plant extracts of Rosmarinus officinalis in rats*, J Ethnopharmacol, 19, 133-143.

HUANG, M.T., HO, C.T., FERRARO, T., WANG, Z.Y., STAUBER, K., GEORIGIADIS, C., LASKIN, J.D., LONNEY, A.H., 1992, *Proc Ann Assoc Cancer Res*, 33, 165.

IBN AL BAYTAR, traduit par LECLERC, L., 1877-1883, *Traité des Simples*, PARIS Imprimerie Nationale, 1, 478p., 2, 492p., 3, 483p.

IBN AL-QUF MASIHI AMINE AL-DAWLA ABU FARAJ , 1986, *KITAB AL-UMDA FI AL-JARAHAT* (630-685 de l'Hégire, 1233-1286, traduction urdu), NEW-DEHLI : Ed Central Council for Research in Unani Medicine, en indou, 298p.

IBN ROSHD ABU AL-WALID MOHAMMED, 1987, *KITB AL KOLLIAT* (595 de l'Hégire 1198), NEW-DELHI : Ed Central Council for research in Unani Medecine (Ministry of Health) and F.W.Crovt. of India, INDIA, 2^{ième} ed., (en indou), 456p.

INATANI, R., NAKATANI, N., FUWA, H., SETO, H., 1982, *Structure of a new antioxidative phenolic diterpene isolated from Rosemary (Rosmarinus officinalis L.)*, Agric Biol Chem, 46, (6), 1661-1666.

JOYEUX, M., 1993, *Mise au point in vitro, sur hépatocytes isolés, adapté à l'étude des propriétés antihépatotoxiques d'extraits végétaux : application à la recherche des principes antiradicalaires de Rosmarinus officinalis L.*, Thèse de Doctorat de l'Université, Mention Pharmacognosie, Metz, 274p.

JOYEUX, M., HOEFLER, C., DORFMAN, P., FLEURENTIN, J., DIERCKXSENS, Y., TETAU, M., MORTIER, F., PELT, J.M., 1988, *Mise en évidence des propriétés hépatotropes des jeunes pousses de Rosmarinus officinalis par des techniques "in vivo" et "in vitro"*, Cahier de Biothérapie, 99 suppl., 63-74.

KOMAROV, 1976, *Flora of the U.S.S.R.*, Ed SHISHKIN B.K. and YUZEPCHECK S.V. traduit du russe, vol.20, 48-49.

KRÜSSMAN, G., 1962, *Handbuch der Lanbgehölze*, BERLIN HAMBOURG : Ed Paul Parey Tome 2, 430p.

LALLEMENT-GUILBERT, N., BEZANGER-BEAUQUESNE, L., 1970, *Recherche sur les flavonoïdes de quelques Labiées médicinales*, PI Med Phyt, 4, (2), 92-107.

LAMAISSON, J.L., PETITJEAN-FREYTET, C., CARNAT, A., 1991, *Lamiacées médicinales à propriétés antioxydantes, sources potentielles d'acide rosmarinique*, Pharm Acta Helv, 66, (7), 185-188.

LAMAISSON, J.L., PETITJEAN-FREYTET, C., CARNAT, A.P., CARNAT, A., 1988, *Activités antiradicalaires in vitro d'huiles essentielles*, PI Méd Phyt, 22, (4), 231-234.

LAMOTHE, P., 1984, *Contribution à l'étude chimique et toxicologique de trois huiles essentielles de Labiées*, Thèse de Doct. Pharm., MARSEILLE.

LANHERS, M.C., 1988, *Contribution à l'étude ethnopharmacologique d'Euphorbia hirta L.: Propriétés psychotropes, analgésiques, anti-pyrétiques et anti-inflammatoires*, 598 p., Thèse de Doctorat d'Université, mention Sciences Pharmacognosie, METZ, 598p.

LANHERS^a, M.C., JOYEUX, M., SOULIMANI, R., FLEURENTIN, J., SAYAG, M., MORTIER, F., YOUNOS, C., PELT, J.M., 1991, *Hepatoprotective and anti-inflammatory effects of a traditionnal medicinal plant of Chile, Peumus boldus*, Planta Med, 57, 110-115.

LANHERS^b, M.C., FLEURENTIN, J., DORFMAN, P., MORTIER, F., PELT, J.M., 1991, *Analgesic, antipyretic and anti-inflammatory properties of Euphorbia hirta*, Planta Med, 57, 225-231.

LANHERS, M.C., FLEURENTIN, J., MORTIER, F., VINCHE, A., YOUNOS, C., 1992, *Anti-inflammatory and analgesic effects of an aqueous extract of Harpagophytum procumbens*, Planta Med, 58, (2), 117-123.

LAWRENCE, B.M., R.R.J., 1986, *Progress in essential oils*, Perf Flav, 11, (2), 75-81.

LECLERC, L., 1877-1883, *Traité des Simples* (traduction de IBN AL BAYTAR), PARIS : Imprimerie Nationale, 1, 478 p., 2, 492 p., 3, 483 p.

LE FLOC'H, E., 1983, *Contribution à une étude ethnobotanique de la flore tunisienne*, Publications Scientifiques Tunisiennes Programme flore et végétation tunisienne, 2ème partie, 206-208.

LEMORDANT, D., BOUKEF, K., BENSALAM, M., 1977, *Plantes utiles et toxiques de Tunisie*, Fitoterapia, 48, (5), 191-214.

LEXA-ROBIN, A., 1988, *Propriétés cholérétiques, antihépatotoxiques et diurétiques d'Eupatorium cannabinum L.: approche ethnopharmacologique*, Thèse de Doctorat d'Université, mention sciences pharmacognosie, METZ, 257p.

LIN, C.N., CHUNG, M.I., GAN, K.H., 1988, *Novel antihepatotoxic principles of Solanum incanum*, *Planta Medica*, 3, 222.

LIN, C.N., TOME, W.P., 1988, *Antihepatotoxic principles of Sambucus formosana*, *Planta Medica*, 3, 223-224.

LOUIS, A., 1979, *Nomades d'hier et d'aujourd'hui dans le sud tunisien*, GAP : Edisud Mondes méditerranéens Imprimerie Louis Jean, 334p.

MAIRE, A., SAVELLI, A., 1955, *In Salah et le Tidikelt oriental :Etude historique, géographique et médicinale*, Arch Inst Pasteur, ALGER, 33, (4), 367-432.

MARIN PARES, E., 1990, *Recherche de l'activité anti-inflammatoire de substances d'origine naturelle*, in 1er colloque européen d'ethnopharmacologie, Sources, Méthodes, Objectifs, FLEURENTIN, J., CABALION, P., MAZARS, G., DOS SANTOS, J., YOUNOS, C., 23 au 25 mars 1990, PARIS METZ : ORSTOM SFE, 270-278.

MARUZZELLA, J.C., HENRY, P.A., 1958, *The "in vitro" antibacterail activity of essential oils and oil combinations*, J Amer Pharm Assoc, 47, (4), 294-296.

MARUZZELLA, J.C., LIGUORI, L., 1958, *The "in vitro" antifungal activity of essential oils*, J Amer Pharm Assoc, 47, (4), 250-254.

MONGOLD, J.J., CAMILLIERI, S., SUSPLUGAS, P., TAILLADE, C., MASSE, J.P., SERRANO, J.J., 1991, *Activité cholagogue/cholérétique d'un extrait lyophilisé de Rosmarinus officinalis L.*, Pl Méd Phyt, 25, (1), 6-11.

MORTIER, F., 1972, *De l'intérêt thérapeutique de certains acides organiques aliphatiques constituants de diverses drogues à réputation hépatorénale et en particulier de Cynara scolimus L.*, Thèse de Doctorat en Pharmacie, NANCY, 200p.

MUWAFQA AL-DIN ABU MANSUR'ALI AL-HERAWI, 1967/1968, en persan, *AL ABNIYA 'AN 'HAQÂ'ÎQ AL ADWIYA* (350-360 de l'Hégire, 971-987), TEHERAN : Ed ENTESHARAT DANESHGAH, 446p.

NAKATANI, N., INATANI, R., 1983, *A new diterpene lacton : rosmadial, from Rosemary (Rosmarinus officinalis L.)*, Agric Biol Chem, 47, (2), 353-358.

NAKATANI, N., INATANI, R., 1984, *Two antioxidative diterpenes from Rosemary (Rosmarinus officinalis) and a revised structure for rosmanol*, Agric Biol Chem, 48, (8), 2081-2085.

NAVARRO, M.C., MONTILLA, M.P., MARTIN, A., JIMENEZ, J., UTRILLA, M.P., 1993, *Free Radical Scavenger and Antihepatotoxic Activity of Rosmarinus tomentosus*, *Planta Med*, 59, 312-314.

OTTERNESS, I.G., GANS, D.J., 1988, *Nonstéroïdal anti-inflammatory drugs : an analysis of the relationship between laboratory animal and clinical doses, including species scaling*, J Pharm Sci, 77, (9), 790-795.

PARNHAM, M.J., KESSELRING, K., 1985, *Rosmarinic acid*, *Drugs Future*, 10, (9), 756-757.

PASSAGER, P., BARBANCON, S., 1956, *Taghit (Sahara oranais). Etude historique, géographique et médicale*, Arch Inst Pasteur ALGER, 34, (3), 404-475.

PASSAGER, P., DOREY, R., 1958, *El Goléa (Sahara algérois). Etude historique, géographique et médicale*, Arch Inst Pasteur ALGER, 36, (1), 74-152.

PERROT, E., 1947, *La culture des plantes médicinales*, PARIS : Ed Presse universitaire de France, 318-319.

PETKOV, V., MARKOVSKA, V., 1981, *L'effet diurétique de Sambucus ebulus L. (Caprifoliacées)*, Pl Med Phyt, 15, (3), 172-182.

PHARMACOPEE FRANCAISE, *Monographies de souches pour préparations homéopathiques*, 1989, *Rosmarinus officinalis pour préparations homéopathiques*, 6ème supplément, 10ème édition, PARIS : ADRAPHARM.

Piante aromatische e medicinali, 1969, COMO : Ed Taroni Agricola, 76-79.

PLANTAE MEDICINALES, 1829, *Rosmarinus officinalis L.*, Ossicineller Planzen, Dr.Th.Sr.L.Nee von Eisenbeck, DÜSSELDORF : Ed DÜSSELDORF.

POURRAT, H., LE MEN, J., 1953, *Répartition de l'acide ursolique chez les Labiées : acide ursolique (deuxième mémoire)*, Ann Pharm Franç, 2, 190-192.

PRAX, P., 1850, *Plantes de Constantine, de Batna, de Biskra, du Soirg et de Touggourt (plantes pharmaceutiques)*, Rev. de l'Orient, de l'Algérie et des Colonies, 277-285.

RASMUSSEN, K.E., RASMUSSEN, S., BAERHEIM SVENDSEN, A., 1972, *Quantitative determination of the various compounds of the volatile oil in small amounts of plant material by means of gas liquid chromatography. Terpenes and related compounds XVIII*, Pharm Weekblad, 107, 277-284.

REBOUL, E., 1953, *Le Gourasa. Etude historique, géographique et médicale*, Arch Inst Pasteur ALGER, 31, (2), 164-246.

RESCHKE, A., 1983, *Capillargaschromatographische Bestimmung der Rosmarinsäure in Blattgewürzen*, Z Lebensm Unters Forsch, 16, 116-119.

ROI, J., 1955, *Traité des plantes médicinales chinoises, Encyclopédie biologique XLVII*, PARIS : Ed Paul Lechevalier, 484p.

ROSUA, J.L., GARCIA-GRANADOS, A., 1987, *Analyse des huiles essentielles d'espèces du genre Rosmarinus L. et leur intérêt en tant que caractère taxonomique*, Plant Med Phyt, 21, (2), 138-143.

ROUSSEL, J.L., PELLECUER, J., ANDARY, C., 1973, *Propriétés antifongiques comparées des essences de trois Labiées méditerranéennes : romarin, sarriette et thyn*, Trav Soc Pharm de Montpellier, 33, (4), 587-592.

SCARPATI, M.L., ORIENTE, G., 1958, *Isolamento e costituzione dell'acido rosmarinico (dal Rosmarinus officinalis)*, Ricerca Sci, 28, 2329-2333.

SCHORDERET, M., DAYER, J.M., 1988, *Analgésiques, antipyrétiques, anti-inflammatoires et substances apparentées*, in *Pharmacologie, des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques*, 534-556, SCHORDERET, M., GENEVE : Ed SLATKINE.

SCHMITT, H., 1973, *Eléments de pharmacologie*, PARIS : Ed Flammarion Médecine-Sciences, 5è édition, 335-347.

SEMRAU, R., 1958, *Über die Flavone in der Familie der Labiaten*, Inaug Dissert, Münsche, 71.

SENDRA, J., SEIDL, O., MIEDZOBRODZKA, J., ZIEBA, J., 1969, *Chromatographic analysis of flavonoids and triterpenes in folium Rosmarini*, Dissert Pharm Pharmacol, 21, (2), 185-191.

SERRANO, J.J., MONGOLD, J.J., SUSPLUGAS, P., 1990, *MDE Rosmarinus : Etude de la modification de la fonction biliaire (chez le cobaye : technique de la fistule biliaire)*, Rev Phyt Prat, 90/2, (5), 15-16 et 27.

SHARMA, R.C., GUPTA, S.K., ARORA, R.B., 1973, *Structure activity relationship of some organic hydroxy acids with reference to their choleretic activity*, Short communication in Indian J Exp Biol, 11, 572-573.

STEINMETZ, M.D., MOULIN-TRAFFORT, J., REGLI, P., 1988, *Transmission and scanning electromicroscopy study of the action of sage and rosemary essential oils and eucalyptol on Candida albicans*, Mycoses, 31, (1), 40-51.

TADDEI, I., GIACHETTI, D., TADDEI, E., MANTOVANI, P., 1988, *Spasmolytic activity of peppermint, sage and rosemary essences and their major constituents*, Fitoterapia, 59, (6), .

TAKEDA, S., ABURADA, M., 1981, *The choleretic mechanism of coumarin compounds and phenolic compounds*, J Pharm Dyn, 4, 724-734.

TESCHKE, R., VIEKE, W., GOLDREMAN, L., 1983, *CCl₄ levels and serum activities of liver enzymes following acute CCl₄ intoxication*, Toxicol Lett, 17, 175-180.

TIEN TUNG, P., KUEI-FANG, H., KENG-TAO, L., LING-YUN, C., CHENCHUA, C., CHEN-YU, S., 1977, *Protective action of schizandrin B on hepatic injury in mice*, Chinese Med J, 3, (3), 173-180.

TROTTER, A., 1915, *Flora economica della Libia*, Publiciti a cura del Minestro delle colonie Roma, 127fig.,145 tableaux, 375p.

TSURUMI, K., KYUKI, K., NIWA, M., MIBU, H., FUJIMURA, H., 1986, *Pharmacological investigations of the new anti-inflammatory agent 2-(10,11-dihydro-10-oxodibenzo b, f thiepin-2-yl) propionic acid.II.Inhibitory effects on acute inflammation and prostaglandin-related reactions*, Arzneim Forsch /Drug Res, 36, (III), 12,1801-1805.

TURRILL, W., 1920, *The genus Rosmarinus*, Kew Bull, 105-108.

TUTIN, T.G., HEYWOOD, V.H., BURGESS, N.A., MOORE, D.M., VALENTINE, D.H., WALTERS, S.M., WEBB, D.A., 1972, *Flora Europaea, Diapensiaceae to Myoporaceae*, vol.3, CAMBRIDGE : Ed University press, p.187.

VALNET, J., 1980, *Aromathérapie*, PARIS : Ed Maloine S.A., 249-252.

VALNET, J., 1991, *Pathologie gastro-intestinale*, Encycl Méd Nat, (PARIS, France), Phytothérapie, Aromathérapie, D-7, 9, 8p.

VERLET, N., 1991, *Huiles essentielles : production mondiale, échanges internationaux et évolution des prix*, in 10^{èmes} journées internationales des huiles essentielles, 5, 6 et 7 septembre 1991, DIGNE-LES-BAINS, MILAN : ISTITUTO TETRAHEDRON, Rivista Italiana E P P O S, 384-399.

VEROTTA, L., 1984, *Isolation and determination of the active principles of Rosmarinus officinalis et Gentiana luteola*, Fitoterapia, 56, (1), 25-29.

WINDHOLZ, M., BUDAVARI, S., STROUMTSOS, L., TERTIG, M., 1976, *The Merck Index, an encyclopedia of chemicals and drugs*, Ed Merck and Co. Rahway

WINKELMAN, M., 1986, *Frequently used medicinal plants in Baja California Norte*, J Ethnopharmacol, 18, 109-131.

WINTER, C.A., RISLEY, E.A., NUSS, G.W., 1962, *Carrageenin induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs*, Proc Soc Exp Biol, 111, 544-547.

WROBLESKI, F, LADUE, I.S., 1956, *Serum glutamic pyruvic transaminase in cardiac and hepatic disease*, Proc Soc Exp Biol Med, 91, 569 p.

WU, J.W., LEE, M.H., HO, C.T., CHANG, S.S., 1982, *Elucidation of the chemical structures of natural antioxidants isolated from rosemary*, J A O C S, 59, (8), 339-345.

YAMAHARA^a, J., KIMURA, H., KOBAYASHI, M., OKAMOTO, T., SAWADA, T., FUJIMURA, H., CHISAKA, T., 1985, *Cholagogic action and characteristics of (+)- α -terpineol- β -D-O-glucopyranoside, a new monoterpenoid glucoside*, Chem Pharm Bull, 33, (4), 1669-1675.

YAMAHARA^b, J., MIKI, K., CHISAKA, T., SAWADA, T., FUJIMURA, H., TOMIMATSU, T., NAKANO, K., NOHARA, T., 1985, *A cholagogic effect of ginger and its active constituents*, J Ethnopharmacol, 13, 217-225.

YAMAHARA^c, J., MIKI, K., SAWADA, T., FUJIMURA, H., KONISHI, T., 1985, *Biologically active principles of crude drugs; Cholagogic substances in Mentha herba*, Soyakugaku Zasshi, 39, (1), 93-98.

YOUNOS, C., 1971, *Etude des essences de quelques espèces de Labiées d'Afghanistan*, Thèse de Doctorat en Pharmacie, NANCY, 200p.

L'étude pharmacologique de *R.officinalis* L., Lamiacée originaire du bassin méditerranéen, nous a permis de confirmer son utilisation traditionnelle notamment dans les affections de la sphère hépato-rénale et les affections rhumatismales et oedémateuses. L'originalité des travaux a été de réaliser les tests pharmacologiques à partir des jeunes pousses de *R.officinalis*. Celles-ci induisent une hypercholérèse chez le rat à partir de la dose de 500 mg/kg (iv). Les jeunes pousses ont une activité hépatoprotectrice à partir de la dose de 1000 mg/kg (ip), car elles réduisent l'augmentation des ALAT plasmatiques induite par une intoxication au tétrachlorure de carbone, chez le rat et chez la souris. Les jeunes pousses agissent comme anti-inflammatoire à la dose de 1500 mg/kg (ip), car elles réduisent l'oedème plantaire chez le rat, provoqué par une injection sub-plantaire de carragénine. Les jeunes pousses, en macérat glycéro-alcoolique, augmentent la diurèse chez le rat en situation de surcharge hydrique, à la dose de 50 mg/kg (ip). Puis, la réponse pharmacologique des jeunes pousses a été comparée à celle des sommités fleuries : les tests de cholérèse et d'hépatoprotection font apparaître une supériorité d'action des jeunes pousses, alors que l'activité anti-inflammatoire est d'égale intensité pour les deux parties de la plante.