

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE
BIOLOGIE
ET PHYSIOLOGIE ANIMALES



UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCE

DEPARTMENT OF ANIMAL
BIOLOGY
AND PHYSIOLOGY

LABORATOIRE DE PHYSIOLOGIE ANIMALE

LABORATORY OF ANIMAL PHYSIOLOGY

Effets antiaddictifs de l'extrait hydro-méthanolique des fruits de *Citrus medica* L. (Rutaceae) sur un modèle d'addiction induit à l'éthanol chez le rat wistar

Mémoire

Rédigé en vue de l'obtention du diplôme de Master en Biologie des Organismes Animaux

Option : Physiologie Animale

Par

WAGA GASTON KESMON

Matricule : 20V2032

Licencié ès-Sciences

Sous la co-direction de :

KANDEDA KAVAYE Antoine

Maître de Conférences

DZEUFLET DJOMENI Paul Désiré

Professeur



Année : 2024



DEDICACE

*Je dédie ce travail
à la famille WAÏBE
particulièrement à mon père
KESMON WAÏBE et ma mère
GORFAUDA Irène.*

REMERCIEMENTS

La réalisation de ce présent travail a été un long chemin. Il semblait difficile pour moi d'y arriver, mais grâce à la participation de plusieurs personnes, ce travail fut aussi vite achevé. Mes remerciements vont à l'endroit de tous ceux qui ont participé pour la réalisation de ce travail. Pour cela, j'adresse mes sincères remerciements :

- au Professeur **DZEUFLET DJOMENI** Paul Désiré pour sa disponibilité, son accompagnement pour la réalisation de ce travail ;
- au Professeur **KANDEDA KAVAYE** Antoine pour son accueil, ses conseils, le partage de ses connaissances, son amour pour la recherche, ses aides multiformes à mon égard. J'en suis reconnaissant ;
- à tous les enseignants du Département de Biologie et Physiologie Animales de l'Université de Yaoundé I pour leur enseignement et leur encouragement qui m'ont édifié ;
- à tous mes aînés académiques : **NGANG NGUEMA** Franck-Emmanuel, **ATEUFACK** Livana Brinda, **PENDA** Marguerite, **KAHOU TADAH** Rivaldo, **FIFEN** Rodrigue, **TCHEUTCHOUA** Yannick, **DJIENTCHEU** Jean-Philippe, **KENGNE** Ségolène, **EDZOA** François, **WALBADET** Lucain, **SOFFO** Gildas, **AKONO** Harold, **MEKA'A ZANG** Luc, **NOUKATE** Junior, **TAYO** Gabriel, **TSAFACK** Loïc, **NTEP** Jordan, **OWONA** Pascal, **TOUTSOP** Chanelle, pour leur sens de collaboration et de soutien ;
- à tous mes camarades de promotion : **MEULADJE TAMEU** Ferdinand, **TONGOUE** corneille, **BINDJI** Georges Michel, **TALLA** Jude Ulrich, **FANGNWOU TCHADJIE** Grace Divine, **CHOUOLA TEDJOU** Cécile Ashley, **DONGMO** Wamba, **BOUGUEM YANDJA** Paule Cynthia, **SAMBA** Kong, **DONFOUET** alvine pour leur assistance dans l'accomplissement de ce travail ;
- à tous mes frères et sœurs : **TCHOBMON** Yves, **KAÏKARA** Victor, **MAÏ TAMRA** Odile, **NDEGA** Odette, **KODAÏDA** Angeline, **KESSARKAO** Kesmon, **CHEKATWA** Kesmon, **KOGA** Kidandi, **DOURRAWA** Israël, **GUIRA** Samuel, **GNOWE** Felix qui ont considéré ma réussite comme leur principal souci ;
- à tous mes oncles, tantes et grand-mères : **DOBA** Roger, **NDIKWE** Waibe, **MAI WAGA** Yinra, **MAI SASSOU** Waibe, **MAI MILLION** Waibe, **DELA** Yinra, **GLENE** Waibe pour leurs encouragements ;
- au tradithérapeute pour la plante donnée et pour la procédure de préparation ;
- à tous mes amis et connaissances qui n'ont jamais cessé de m'encourager.

Sommaire

DEDICACE.....	i
REMERCIEMENTS.....	ii
LISTE DES FIGURES.....	v
LISTE DES TABLEAUX	vi
LISTE DES ABREVIATIONS	vii
RESUME.....	viii
ABSTRACT	ix
INTRODUCTION.....	1
REVUE DE LA LITTERATURE.....	3
I.1 Organisation du système nerveux	3
I.1.1 Tissu nerveux	3
I.1.2 Communications entre neurones	4
I.1.3 Système de récompense	5
I.2 Addiction à l'alcool.....	6
I.2.1 Définition et prévalence	6
I.2.2 Sémiologie	7
I.2.3 Différentes formes d'addiction.....	7
I.2.4 Physiopathologie	8
I.2.5 Alcoolisme et le statut oxydant.....	9
I.2.6 Modèle animal de l'addiction à l'alcool	9
I.2.7 Traitement de l'addiction à l'alcool	10
I.3 Anxiété et l'alcoolisme	10
I.3.1 Définition et épidémiologie	10
I.3.2 Différents types de troubles anxieux.....	10
I.3.3 Liens physiopathologiques entre l'alcoolisme et l'anxiété	11
I.3.4 Traitement de l'anxiété	12
I.4 Etude ethnobotanique de <i>Citrus medica</i>	12
I.4.1 Description.....	12
I.4.2 Répartition géographique.....	13
I.4.3 Taxonomie	13
I.4.4 Usages traditionnelles et pharmacologiques	13
I.4.5 Etude phytochimique de <i>Citrus medica</i>	14
MATERIEL ET METHODES.....	15
II.1 Matériel.....	15
II.1.1 Matériel végétal	15
II.1.2 Matériel animal.....	15

II.1.3 Dispositifs comportementaux	15
II.2 Méthodes	16
II.2.1 Préparation de l'extrait hydro-méthanolique des fruits <i>Citrus medica</i>	16
II.2.2 Etude phytochimique de l'extrait hydro-méthanolique des fruits de <i>Citrus medica</i> ..	17
II.2.3 Préparation des solutions et tampons.....	20
II.2.4 Détermination de la dose à administrer aux animaux.....	20
II.2.5 Alcoolisation, répartition et traitement des animaux.....	21
II.2.4 Evaluation des paramètres comportementaux	22
II.2.5 Sacrifice et prélèvement de cerveaux	23
II.2.6 Dosages des marqueurs neurochimiques	24
II.2.7 Dosages des marqueurs du stress oxydant.....	26
II.2.8 Analyses histologiques	28
II.2.9 Analyses statistiques.....	29
RESULTATS ET DISCUSSION	30
III.1 Résultats	30
III.1.1 Phytochimie de l'extrait hydro-méthanolique de <i>Citrus medica</i>	30
III.1.2 Effets de l'extrait hydro-méthanolique des fruits de <i>Citrus medica</i> sur l'anxiété.....	30
III.1.3 Effets de l'extrait hydro-méthanolique des fruits de <i>Citrus medica</i> sur quelques paramètres neurochimiques du cortex préfrontal et l'hippocampe	32
III.1.4. Effets de l'extrait hydro-méthanolique des fruits de <i>Citrus medica</i> sur le stress oxydant dans le cortex préfrontal et l'hippocampe	35
III.1.5 Effets de l'extrait hydro-méthanolique des fruits de <i>Citrus medica</i> sur la microstructure du cortex préfrontal et l'hippocampe	38
III.1.6 Effets de l'extrait hydro-méthanolique des fruits de <i>Citrus medica</i> sur le nombre de neurones viables dans la zone CA1, CA3 et du gyrus denté de l'hippocampe ainsi que du cortex préfrontal	40
III.2 Discussion	41
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	42
REFERENCES	42

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Différentes parties du cerveau humain sur une coupe médiosagittale.....	3
Figure 2 : Gliocytes du système nerveux central.....	4
Figure 3 : Schéma d'un neurone.....	4
Figure 5 : Feuilles, fleur, branches et fruits d'un citronnier.....	12
Figure 6: Photographie et représentation schématique du labyrinthe en croix surélevé.....	16
Figure 7 : Photographie de l'arène ouverte	16
Figure 8 : Protocole d'extraction des fruits de <i>Citrus medica</i>	17
Figure 9 : Courbe d'étalonnage des phénols.....	18
Figure 10 : Courbe d'étalonnage des flavonoïdes.....	19
Figure 11 : Courbe d'étalonnage des tannins.....	19
Figure 12 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental	22
Figure 13 : Courbe d'étalonnage du dosage de l'acide gamma aminobutyrique.	24
Figure 14 : Courbe d'étalonnage de la sérotonine.	25
Figure 15: Courbe d'étalonnage de la dopamine.	26
Figure 16 : Effets de l'extrait hydro-méthanolique des fruits de <i>Citrus medica</i> sur le nombre d'entrées et de temps passés dans les bras ouverts du labyrinthe en croix surélevé.	31
Figure 17 : Effets de l'extrait hydro-méthanolique des fruits de <i>Citrus medica</i> sur la concentration de GABA dans le cortex préfrontal et l'hippocampe.	33
Figure 18 : Effets de l'extrait hydro-méthanolique des fruits de <i>Citrus medica</i> sur la concentration de sérotonine dans le cortex préfrontal et l'hippocampe.....	34
Figure 19 : Effets de l'extrait hydro-méthanolique des fruits de <i>Citrus medica</i> sur la concentration de dopamine dans le cortex préfrontal et l'hippocampe.....	35
Figure 20 : Effets de l'extrait hydro-méthanolique des fruits de <i>Citrus medica</i> sur la concentration de MDA dans le cortex préfrontal et l'hippocampe	36
Figure 21 : Effets de l'extrait hydro-méthanolique des fruits de <i>Citrus medica</i> sur la concentration de GSH dans le cortex préfrontal et l'hippocampe.....	37
Figure 22 : Effets de l'extrait des fruits <i>Citrus medica</i> sur l'activité de SOD dans le cortex préfrontal et l'hippocampe	38
Figure 23: Micrographie de la zone CA1 et CA2 de l'hippocampe.....	39

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Classification systématique de <i>Citrus medica</i>	13
Tableau II : Composition de l'aliment pour un kilogramme	15
Tableau III : Phytochimie de l'extrait hydro-méthanolique des fruits de <i>Citrus medica</i>	30
Tableau IV : Effets de l'extrait des fruits de <i>Citrus medica</i> sur quelques paramètres de l'anxiété dans l'arène ouverte.	32
Tableau V : Effets de l'extrait de fruits de <i>Citrus medica</i> sur le nombre de neurones viables de la zone CA1, CA3 et du gyrus denté de l'hippocampe ainsi que du cortex préfrontal	40

LISTE DES ABREVIATIONS

5-HT	: 5-hydroxytryptamine, ou Sérotonine
AMPA	: α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionate
ATV	: Aire tegmentale v entrale
BDZ	: Benzodiazépines
D1R/D2R	: Récepteur de la dopamine de type 1/type 2
DA	: Dopamine
DSM	: Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux
GABA	: “ <i>Gamma amino-butyric acid</i> ”
GSH	: Glutathion Réduit
HHS	: Axe hypothalamo-hypophyso-surrénal
MDA	: Malondialdéhyde
MSN	: “ <i>Medium-sized spiny neurons</i> ”
NAc	: Noyau accumbens
NMDA	: N-méthyl-D-aspartate
OMS	: Organisation mondiale de la santé
PVN	: Noyau paraventriculaire
SERT	: Transporteur de sérotonine
SNC	: Système nerveux central
SNP	: Système nerveux périphérique
SOD	: Superoxyde dismutase
TAG	: Trouble anxieux généralisé
TAS	: Trouble d’anxiété sociale
TOC	: Trouble obsessionnel compulsif
TP	: Trouble panique

RESUME

L'alcoolisme désigne l'addiction et la dépendance à l'alcool. L'usage nocif de l'alcool entraîne 3 millions de décès chaque année dans le monde, ce qui représente 5,3% de l'ensemble des décès. Le traitement de cette pathologie se base généralement sur la prise des médicaments anxiolytiques. Cependant, ces traitements palliatifs sont responsables des effets secondaires importants. La médecine traditionnelle constitue une alternative pour la découverte des médicaments efficaces et ayant des effets secondaires limités. *Citrus medica* est un petit arbre de la famille des Rutacées, dont le fruit est appelé citron. Il est utilisé en médecine traditionnelle pour le soin de la peau, contre l'addiction, l'anxiété et comme antiseptique. L'objectif de ce travail était d'évaluer les effets de l'extrait hydro-méthanolique des fruits de *Citrus medica* sur un modèle d'addiction induit à l'éthanol chez le rat. En effet, 57 rats ont été divisés en deux groupes ainsi qu'il suit : un groupe témoin normal (7 rats) recevait par voie *i.p* une solution hydrosaline (0,9% NaCl, 10 mL/kg) et un groupe alcool (50 rats) recevait par voie *i.p* 10 mL/kg de l'éthanol 20° (V/V). Chaque animal a reçu quotidiennement un traitement pendant 21 jours. Vingt-quatre heures après l'alcoolisation, 35 survivants addicts issus du groupe alcool ont été répartis en 5 groupes de 7 rats chacun et traités pendant 18 jours de la manière suivante : un groupe témoin négatif recevait de l'eau distillée (10 mL/kg, *p.o*) ; un témoin positif recevait du diazépam (3 mg/kg *p.o*) et trois groupes traités avec l'extrait aux doses de 112, 223 et de 446 mg/kg, *p.o*. Au 5 groupes susmentionnés, a été ajouté le témoin normal (7 rats) traité à l'eau distillée (10 mL/kg, *p.o*). A partir du seizième jour du traitement, tous les rats ont été soumis aux tests du labyrinthe en croix surélevé et de l'arène ouverte jusqu'au dix-huitième jour. Vingt-quatre heures après les tests comportementaux, les rats ont été sacrifiés pour quantifier quelques marqueurs neurochimiques (GABA, sérotonine et dopamine) et du stress oxydant (GSH, MDA et SOD) dans le cortex préfrontal et l'hippocampe. Ensuite, les coupes histologiques du cortex préfrontal et de l'hippocampe ont été réalisées. Les résultats révèlent que l'éthanol a entraîné l'addiction caractérisée par l'apparition de l'anxiété, une diminution ($p < 0,001$) de la concentration de GABA, de sérotonine et de la dopamine dans le cortex préfrontal et l'hippocampe. L'éthanol a induit un stress oxydant caractérisé par une augmentation ($p < 0,001$) du MDA couplée à une diminution de GSH. L'éthanol a aussi entraîné la perte des neurones. L'extrait a en revanche augmenté ($p < 0,001$) le nombre d'entrées et le temps passé dans les bras ouverts du labyrinthe en croix surélevé. Dans l'arène ouverte, l'extrait a augmenté ($p < 0,001$) le nombre de lignes traversées de même que le nombre d'entrées et le temps passé dans le carré central. L'analyse neurochimique indique que l'extrait a augmenté ($p < 0,001$) la concentration de GABA, de sérotonine et de dopamine. L'extrait a diminué ($p < 0,001$) la concentration du MDA et a augmenté ($p < 0,001$) celle de GSH. Enfin, l'extrait a diminué ($p < 0,001$) la perte des neurones dans le cortex préfrontal et l'hippocampe. Ces résultats suggèrent que l'extrait hydro-méthanolique des fruits de *Citrus medica* aurait des effets antiaddictifs médiés par des activités neuromodulatrices, antioxydantes et neuroprotectrices.

Mots-clés : addiction, anxiété, alcool, *Citrus medica*.

ABSTRACT

Alcoholism refers to addiction and dependence on alcohol. Harmful alcohol use causes 3 million deaths worldwide each year, accounting for 5.3% of all deaths. Treatment of this pathology is generally based on anxiolytic drugs. However, these palliative treatments are responsible for significant side-effects. Traditional medicine offers an alternative for finding effective drugs with limited side effects. *Citrus medica* is a small tree in the Rutaceae family, whose fruit is called lemon. It is used in traditional medicine for skin care, to combat addiction and anxiety, and as an antiseptic. The aim of this study was to evaluate the effects of the hydro-methanolic extract of *Citrus medica* fruit on a rat model of ethanol-induced addiction. 57 rats were divided into two groups as follows: a normal control group (7 rats) received i.p. hydrosaline solution (0.9% NaCl, 10 mL/kg) and an alcohol group (50 rats) received i.p. 10 mL/kg ethanol 20° (V/V). Each animal received daily treatment for 21 days. Twenty-four hours after alcoholization, 35 addicted survivors from the alcohol group were divided into 5 groups of 7 rats each and treated for 18 days as follows: a negative control group received distilled water (10 mL/kg, p.o.); a positive control received diazepam (3 mg/kg p.o.) and three groups treated with the extract at doses of 112, 223 and 446 mg/kg, p.o. To the 5 above-mentioned groups was added the normal control (7 rats) treated with distilled water (10 mL/kg, p.o.). From the sixteenth day of treatment, all rats were subjected to elevated cross maze and open arena tests until the eighteenth day. Twenty-four hours after the behavioral tests, the rats were sacrificed to quantify some neurochemical (GABA, serotonin and dopamine) and oxidative stress (GSH, MDA and SOD) markers in the prefrontal cortex and hippocampus. Histological sections of the prefrontal cortex and hippocampus were then taken. The results reveal that ethanol induced addiction characterized by the onset of anxiety, a decrease ($p < 0.001$) in the concentration of GABA, serotonin and dopamine in the prefrontal cortex and hippocampus. Ethanol induced oxidative stress characterized by an increase ($p < 0.001$) in MDA coupled with a decrease in GSH. Ethanol also induced neuronal loss. The extract, on the other hand, increased ($p < 0.001$) the number of entries and time spent in the open arms of the elevated cross maze. In the open arena, extract increased ($p < 0.001$) the number of lines crossed, as well as the number of entries and time spent in the central square. Neurochemical analysis indicates that the extract increased ($p < 0.001$) the concentration of GABA, serotonin and dopamine. The extract decreased ($p < 0.001$) the concentration of MDA and increased ($p < 0.001$) that of GSH. Finally, the extract decreased ($p < 0.001$) the loss of neurons in the prefrontal cortex and hippocampus. These results suggest that the hydro-methanolic extract of *Citrus medica* fruit has anti-addictive effects mediated by neuromodulatory, antioxidant and neuroprotective activities.

Keywords: addiction, anxiety, alcohol, *Citrus medica*.

INTRODUCTION

L'addiction est un trouble caractérisé par des comportements compulsifs de recherche et de consommation de drogues en dépit des conséquences néfastes de la consommation pour l'individu. (Pascoli *et al.*, 2016). L'alcoolisme désigne l'addiction et la dépendance à l'alcool (Pascoli *et al.*, 2016). Le premier pays le plus grand consommateur au monde était représenté par la Moldavie, en tête de ce classement avec une consommation moyenne de 18,22 litres d'alcool pur par an et par habitant de plus de 15 ans. Ce pays était suivi par la République tchèque (16,45 litres) et la Hongrie (16,27 litres) (OMS, 2020). En Afrique, le Cameroun occupait la deuxième place après le Gabon avec une consommation moyenne de 9 litres d'alcool pur par an et par habitant de plus de 15 ans, suivi par le Nigeria (8,9 litres) (OMS, 2020). L'usage nocif de l'alcool entraîne 3 millions de décès chaque année dans le monde, ce qui représente 5,3 % de l'ensemble des décès (OMS, 2022).

L'alcoolisme entraîne l'anxiété ainsi que des troubles cognitifs (Richa *et al.*, 2008). Ces troubles résultent des altérations et des adaptations au niveau du système nerveux central (Breese *et al.*, 2011). Il est le résultat d'un déséquilibre entre les systèmes glutamatergiques, sérotoninergiques, GABAergiques, dopaminergiques et noradrénergiques (Marquenie *et al.*, 2007). Plusieurs médicaments sont utilisés contre l'addiction à l'alcool. Ces médicaments sont entre autres le disulfirame, l'acamprosate, la naltrexone, le nalméfène et le baclofène (Bordet et Danel, 2004). La majorité de ces médicaments sont des agonistes GABAergiques (acamprosate, baclofène) et des antagonistes opioïdiques (naltrexone et nalméfène) (Mohamed, 2016). La prise à long terme de ces médicaments entraîne malheureusement la dépendance. De même, ces médicaments ont des effets secondaires considérables (Bordet et Danel, 2004). La médecine traditionnelle constitue par conséquent une alternative pour la découverte des médicaments efficaces et ayant des effets secondaires limités.

Citrus medica L. (Rutaceae) est un petit arbre de la famille des Rutacées, dont le fruit est appelé citron (Navnidhi *et al.*, 2018). Le citron est utilisé de manière traditionnelle comme antiaddictif, anxiolytique, antimicrobien, diurétique, fébrifuge et colique (Bardeau, 2009 ; Navnidhi *et al.*, 2018). Les études pharmacologiques montrent que les extraits hydroalcooliques de *Citrus medica* possèderait des propriétés antibactériennes, antioxydantes et antiprolifératives. Le citron est très riche en composés naturels importants, notamment l'acide citrique, l'acide ascorbique, les minéraux, les acides phénoliques les flavonoïdes, tanins et les huiles essentielles (Ramful *et al.*, 2010).

Malgré la large utilisation de cette plante, peu d'études pharmacologiques ont été réalisées sur les troubles du système nerveux ; d'où l'objectif principal de notre étude était, d'évaluer les

effets de l'extrait hydro-méthanolique des fruits de *Citrus medica* sur un modèle d'addiction à l'éthanol chez le rat. Il s'agissait plus spécifiquement de :

- ◆ déterminer les effets de l'extrait hydro-méthanolique des fruits de *Citrus medica* sur l'anxiété induite par l'administration chronique de l'éthanol ;
- ◆ rechercher les effets de l'extrait hydro-méthanolique des fruits de *Citrus medica* sur quelques marqueurs neurochimiques (GABA, sérotonine et dopamine) et ceux du statut oxydant (MDA, GSH et SOD) dans le cortex préfrontal et l'hippocampe ;
- ◆ apprécier les effets de l'extrait hydro-méthanolique des fruits de *Citrus medica* sur les altérations histologiques du cortex préfrontal et l'hippocampe induites par l'administration chronique de l'éthanol.

REVUE DE LA LITTERATURE

I.1 Organisation du système nerveux

Le système nerveux est responsable de la perception sensorielle, de l'élaboration de la pensée et de la régulation des fonctions de l'organisme (Marieb et Hoehn, 2015). Le système nerveux fonctionne en recueillant des informations provenant des récepteurs sensorielles (Kandel *et al.*, 2012). Ces informations sont ensuite acheminées à la moelle épinière et à l'encéphale qui peuvent immédiatement émettre des ordres moteurs au muscles ou aux viscères dont l'activité sera alors modifiée (Marieb et Hoehn, 2015). Les deux grandes divisions structurales du système nerveux sont le système nerveux central (SNC) (Figure 1) et le système nerveux périphérique (SNP) (Jean-François *et al.*, 2011). Le SNC ou névraxe, comprend l'encéphale et la moelle spinale, logés respectivement dans la boîte crânienne et le canal vertébral. Le SNP est composé par les douze paires de nerfs crâniens qui sortent de l'encéphale et les trente et une paires de nerfs spinaux (ou nerfs rachidiens) qui sortent de la moelle spinale (Jean-François *et al.*, 2011).

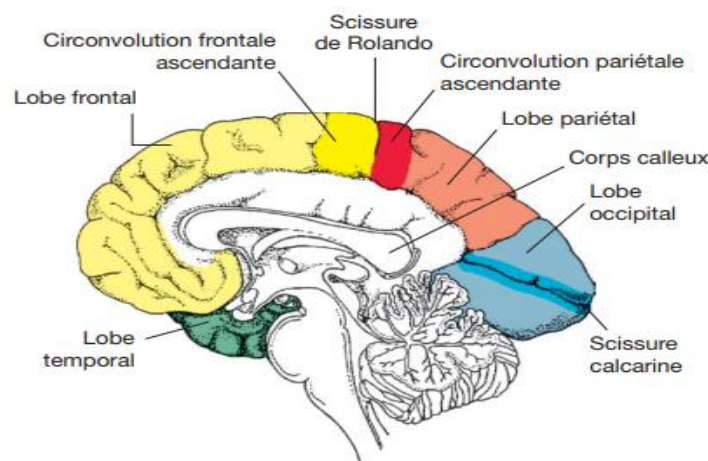


Figure 1 : Différentes parties du cerveau humain sur une coupe médiosagittale (Crossman et Neary, 2004)

I.1.1 Tissu nerveux

Le tissu nerveux est formé essentiellement de deux types de cellules à savoir les cellules gliales et les neurones (Marieb et Hoehn, 2015). Les cellules gliales ont un rôle de soutien des neurones et favorisent leur fonctionnement. Les neurones sont des cellules hautement spécialisées dans la conduction d'influx appelés potentiels d'action (Marieb et Hoehn, 2015).

◆ Gliocytes

Tous les neurones sont associés à des gliocytes, il existe six types dont quatre se trouvent dans le SNC et forment la névroglie ou colle nerveuse ce sont : les astrocytes, les

oligodendrocytes, les épendymocytes et les microglies (Figure 2). Les gliocytes du SNP sont les cellules de Schwann et les cellules ganglionnaires (Kandel *et al.*, 2012).

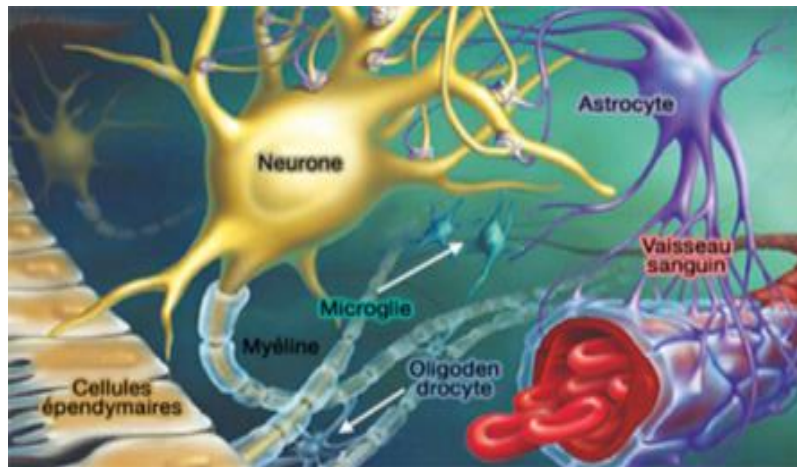


Figure 2 : Gliocytes du système nerveux central (Kandel *et al.*, 2012).

◆ Neurone

Un neurone est l'unité structurale fonctionnelle du système nerveux. La cellule nerveuse est hautement spécialisée dans l'acheminement des messages sous forme d'influx nerveux entre les différentes parties du corps (Marieb et Hoehn, 2015). Un neurone est constitué de trois parties essentielles (Figure 3) : un corps cellulaire, des dendrites et un axone. Le corps cellulaire est constitué d'un gros noyau sphérique au cytoplasme bien défini et d'un noyau granuleux (Kandel *et al.*, 2012). Les dendrites sont des prolongements courts et effilés aux ramifications diffuses. L'axone est issu d'une région conique du corps cellulaire appelée cône d'implantation (Kandel *et al.*, 2012).

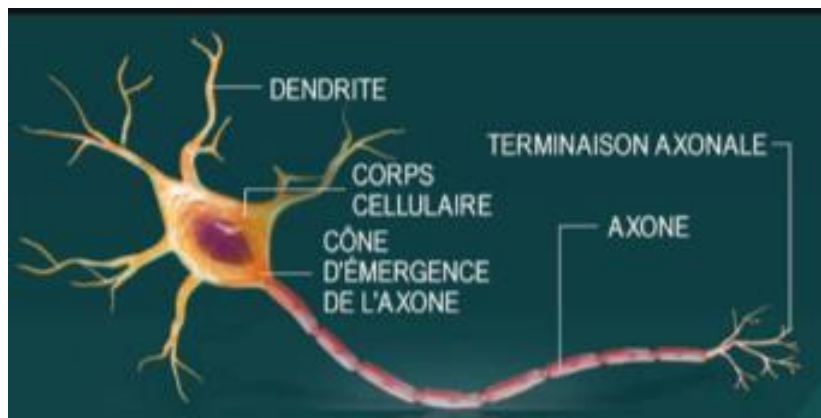


Figure 3 : Schéma d'un neurone (Kandel *et al.*, 2012).

I.1.2 Communications entre neurones

Les neurones sont organisés en de grands ensembles ou circuits qui traitent des informations spécifiques. La formation de ces circuits est rendue possible grâce à l'existence des synapses. Une synapse est la région d'interaction entre deux cellules nerveuses et qui

permettent le passage de l'influx nerveux d'un neurone à un autre ou à une cellule effectrice (Marieb et Hoehn, 2015). Ainsi, selon le mode de transmission, on distingue les synapses électriques et chimiques.

◆ **Synapses électriques**

Les synapses électriques se caractérisent par la formation de jonction communicante entre les membranes des deux cellules ; de sorte que les ions peuvent passer directement d'une cellule à l'autre, sans l'intervention d'un neurotransmetteur. Dans le SNC des mammifères, ces synapses se trouvent principalement dans des zones spécialisées où un fonctionnement normal exige que l'activité des neurones voisins soit très synchronisée (Bennett, 2000). La transmission synaptique électrique est bidirectionnelle (Lodish *et al.*, 2005).

◆ **Synapses chimiques**

Les synapses chimiques sont plus nombreuses comparativement aux synapses électriques. Dans ce type, les neurones communiquent en libérant en réponse à l'activité électrique une grande variété de substances chimiques (Jean-François *et al.*, 2011). En effet, l'arrivée du potentiel d'action au niveau de l'élément présynaptique déclenche l'exocytose des granules de stockage des neurotransmetteurs. Ces derniers diffusent dans la fente synaptique et vont se fixer sur leurs récepteurs situés sur l'élément postsynaptique (Jean-François *et al.*, 2011). Une synapse peut également être soit excitatrice ou inhibitrice en fonction de l'effet qu'elle induit.

I.1.3 Système de récompense

Il existe certains circuits cérébraux particuliers en matière de comportement, appelés circuits de la récompense ou encore système de récompense. Il a pour but premier d'assurer la survie de l'espèce en attribuant une composante motivationnelle à certains comportements comme manger, boire ou encore se reproduire (Dupont et Naassila, 2016). Ce circuit est également la cible de nombreuses substances d'abus (Dupont et Naassila, 2016). Les régions impliquées dans le système de récompense sont respectivement :

➤ l'aire tegmentale ventrale (ATV) : reçoit des informations des aires sensorielles activées par le stimulus récompensateur ainsi que d'autres régions qui l'informent du niveau de satisfaction des besoins fondamentaux de l'organisme (Kesner et Churchwell, 2011) ;

➤ le noyau accumbens (NAc) : groupe de neurones situés dans le cerveau antérieur. C'est la connexion dopaminergique entre l'ATV et le NAc qui va attribuer une certaine valeur motivationnelle inconsciente à un stimulus récompensateur. Le NAc contient également des hotspots hédoniques, responsables du plaisir inconscient généré par certains stimuli récompensateurs (Kesner et Churchwell, 2011) ;

- l'amygdale : noyau faisant partie du système limbique et qui joue un rôle central dans le processus émotionnel et permet les apprentissages associatifs (Kesner et Churchwell, 2011) ;
- l'hypothalamus : a pour fonction principale de gérer la constance de notre environnement interne, aussi appelée homéostasie (Kesner et Churchwell, 2011) ;
- le cortex préfrontal (PFC) : intègre des informations provenant d'autres régions corticales et sous-corticales pour contribuer de manière fonctionnelle à la mémoire de travail, à la régulation des émotions et au contrôle du comportement (Wilson *et al.*, 2010 ; Kesner et Churchwell, 2011).

Il existe trois composantes de la récompense, notamment :

- liking : est la composante hédonique de la récompense. C'est la sensation agréable qui est attribuée à certains stimuli sensoriels (Berridge *et al.*, 2008) ;
- wanting : est la composante motivationnelle de la récompense. C'est ce qui rend le stimulus attractif, ce qui poussera l'individu à entrer en contact avec le stimulus et obtenir la récompense que ça soit de manière consciente ou inconsciente. La composante motivationnelle consciente est générée notamment par le cortex orbitofrontal et le cortex insulaire (Berridge et Kent, 2004) ;
- Learning : est la composante d'apprentissage de la récompense. C'est-à-dire tout ce qui est associations, représentations ou prédictions au sujet de la future récompense basée sur des expériences passées.

I.2 Addiction à l'alcool

I.2.1 Définition et prévalence

Le psychiatre Aviel Goodman en 1990 avance une définition de l'addiction comme : “un processus par lequel un comportement, qui peut fonctionner à la fois pour produire du plaisir et pour soulager un malaise intérieur, est utilisé sous un mode caractérisé par : l'échec répété dans le contrôle de ce comportement (impuissance) et la persistance de ce comportement en dépit de conséquences négatives significatives (défaut de gestion)” (Goodman, 1990).

L'OMS définit trois niveaux de consommation d'alcool (OMS, 1975) :

- ◆ **Les usages dits récréatifs** : il s'agit des consommations ponctuelles, éventuellement festives et à des doses restreintes.
- ◆ **Les usages excessifs** : ce sont les consommations fréquentes d'une quantité non négligeable d'alcool ou de drogue. Ces usages entraînent des modifications au niveau du

système cérébral, qui, envahi par ces substances devra retrouver un équilibre pour fonctionner normalement.

◆ **Les usages pathologiques** : ils se caractérisent quant à eux par l'incapacité de l'individu à résister à son envie de consommation, bien qu'il soit averti des conséquences néfastes qu'elle aura sur lui et son environnement personnel et professionnel.

L'usage nocif de l'alcool entraîne 3 millions de décès chaque année dans le monde, ce qui représente 5,3 % de l'ensemble des décès. Chez les personnes âgées de 20 à 39 ans, environ 13,5 % du nombre total de décès sont attribuables à l'alcool (OMS, 2022). Outre ses conséquences sur la santé, l'usage nocif de l'alcool entraîne des pertes économiques et sociales importantes pour les individus comme pour la société (OMS, 2022).

I.2.2 Sémiologie

L'addiction à l'alcool se manifeste par un désir irrésistible de consommer (compulsion), une augmentation de la motivation pour la recherche d'alcool, l'apparition des symptômes de la dépendance au cours du sevrage et la rechute après plusieurs jours voire année d'abstinence (Gorwood, 2004 ; Heilig et Koob, 2007).

Les personnes addictes manifestent au cours du sevrage (8 à 12 heure après l'arrêt de la consommation d'alcool) les symptômes de la dépendance physique et psychologique qui persiste au-delà des périodes de sevrages. Ces symptômes chez l'homme sont marqués par une hyperactivité du système nerveux autonome, une augmentation du tremblement des mains, une insomnie, la nausée ou le vomissement, les hallucinations visuelles, tactiles ou auditives, l'agitation psychomotrice, l'anxiété, la dépression et une crise convulsive généralisée (Kushner, 2012). Cependant les signes du sevrage dépendent de l'espèce animale. Ainsi, les rats font relativement peu de convulsions mais peuvent facilement développer l'anxiété au cours du sevrage après une administration répétée d'alcool (Bourhis, 1998).

1.2.3 Différentes formes d'addiction

On distingue principalement l'addiction aux substances et l'addiction comportementale. L'addiction aux substances concerne tous les produits qui se fixent sur le système de récompense en modifiant son fonctionnement (Dupont et Naassila, 2016). Ces produits sont l'alcool, le tabac, les stupéfiants et les médicaments psychoactifs (Pascoli *et al.*, 2016). L'addiction comportementale est représentée par la pratique des jeux d'argent, le sport et le sexe (Dupont et Naassila, 2016).

I.2.4 Physiopathologie

Quelques théories permettent d'expliquer la physiopathologie de l'addiction à l'alcool, il s'agit notamment de la sensibilisation motivationnelle, l'impulsivité et les phénomènes de rechute (Dupont et Naassila, 2016 ; Gorwood *et al.*, 2004).

♦ Théorie de la sensibilisation motivationnelle

L'alcool stimule la libération de la dopamine de manière directe en stimulant les neurones dopaminergiques de l'ATV ou de manière indirecte en bloquant l'inhibition GABAergique exercée sur ces neurones (Pascoli *et al.*, 2016). Il a été démontré qu'une diminution de la dopamine cérébrale au cours du sevrage chez les personnes addictes pouvait motiver le comportement à la recherche de la drogue (Diana *et al.*, 1996).

♦ Impulsion, compulsion et la convulsion

L'impulsivité désigne le désir de rechercher du plaisir. Plusieurs auteurs ont ainsi suggéré que les perturbations au niveau de la sérotonine seraient la conséquence d'un défaut de disponibilité du tryptophane, son précurseur, au niveau cérébral. Celui-ci serait en effet métabolisé préférentiellement par la voie des kynurénines, suite à l'activation hépatique de la tryptophane 2,3-dioxygénase sous l'effet des glucocorticoïdes et d'une prise aiguë d'alcool (Vignau *et al.*, 2010). Une diminution de la concentration de sérotonine cérébrale augmente l'impulsivité. L'hérédité de l'alcoolodépendance, au sens large, est de l'ordre de 50 % (entre 40 % et 70 %) (Gorwood, 1997). Il existe deux variants de gène de transporteur de la sérotonine : le variant court (S) et le variant long (L). Des études de transfection ont montré que le variant court (S) conduit à une transcription 2 à 2,5 fois plus faible que le variant long (L), et à une activité du transporteur dans les mêmes proportions (Heils *et al.*, 1996). L'allèle S pourrait surtout être impliqué chez les sujets alcoolodépendants présentant des passages à l'acte compulsifs (Sora *et al.*, 2001 ; Philip *et al.*, 2004). La compulsion désigne un désir puissant par lequel le sujet est amené à accomplir certains actes sans lesquels il ne peut résister.

♦ Axe hypothalamo-hypophyso-surrénal et la rechute

Des études précliniques chez des rongeurs suggèrent que la transition de la consommation d'alcool à l'abus puis à la dépendance est due à des altérations des voies neuronales liées au stress résultant de l'exposition à des cycles répétés d'intoxication et de sevrage alcooliques (Heilig et Koob, 2007 ; Breese *et al.*, 2011). La dépendance à l'alcool se caractérise par une altération du fonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénal

(HHS) (Richardson *et al.*, 2008). On pense que le dysfonctionnement de l'axe HHS contribue à un certain nombre de symptômes, notamment la dysphorie, le besoin impérieux d'alcool et une propension accrue à rechuter au début de l'abstinence (Sinha *et al.*, 2011 ; Stephens et Wand, 2012). L'alcool active directement l'axe HHS en régulant l'activité cellulaire paraventriculaire (PVN) conduisant à la libération du facteur de libération de corticotrophine (Willey *et al.*, 2012).

I.2.5 Alcoolisme et le statut oxydant

Le stress oxydant se définit comme étant un déséquilibre profond de la balance entre les prooxydants et les antioxydants en faveur des premiers, ce qui conduit à des lésions tissulaires importantes. En clinique, les personnes ayant souffert de syndromes de sevrage répétés ont une fréquence plus élevée de crises d'épilepsie, lesquelles incriminent l'activation des récepteurs NMDA (Booth et Blow, 1993 ; Becker, 1994). L'exposition chronique à l'éthanol augmente le nombre de récepteurs NMDA du glutamate et diminue celui de GABA, ce qui est responsable d'une excitotoxicité par un flux entrant de calcium dans le neurone. Un niveau élevé de calcium intracellulaire peut induire une perturbation du métabolisme normal des mitochondries neuronales ayant pour conséquence une surproduction des espèces réactives de l'oxygène et lesquelles entraînant la mort des neurones (Tsai *et al.*, 1998).

I.2.6 Modèle animal de l'addiction à l'alcool

Les modèles animaux peuvent être définis comme des préparations expérimentales développées à partir d'une espèce pour étudier des phénomènes se manifestant au sein d'une autre espèce (Geyer and Markou, 1995). En partant du principe qu'il existe une homologie, ou au moins une analogie, entre les caractéristiques physiologiques et comportementales de différentes espèces, il est possible d'extrapoler à l'homme, des résultats obtenus en étudiant l'animal. Plusieurs techniques ont été utilisées pour modéliser l'addiction (Geyer and Markou, 1995).

La première modélisation de l'addiction se limite à l'expression d'une dépendance physique et psychologique liée à l'expression de symptômes de tolérance et de sevrage. Ainsi, un modèle d'addiction consistait à établir chez l'animal un état de maintenance physiologique pendant quelques jours en réponse à la drogue (tolérance), puis à soudainement retirer la drogue, pour mesurer les effets du sevrage (Campbell, 2007). Les animaux étaient donc dans un premier temps rendus dépendants par l'administration forcée de la substance (Campbell, 2007).

I.2.7 Traitement de l'addiction à l'alcool

Les traitements conventionnels de l'alcoolisme comprennent des agonistes GABAergiques (benzodiazépine, gammahydroxybutyrate (GHB), l'acamprosate et le Baclofène) jouant le rôle antiépileptique et réduisant l'anxiété (Mohamed, 2016). Ils peuvent également être des antagonistes opioïdiques (nalmifène et la naltrexone) pouvant réduire par cette voie l'activation du circuit de la récompense induite par l'alcool et freinent le renforcement de la consommation et l'envie d'absorber le produit (craving) (Mohamed, 2016).

I.3 Anxiété et l'alcoolisme

I.3.1 Définition et épidémiologie

L'anxiété est un affect humain universel, qui a une fonction d'alerte permettant l'évitement du danger (Richa *et al.*, 2008). Cette anxiété peut devenir pathologique, par son intensité, par sa durée, par le handicap fonctionnel qu'elle entraîne, ou encore par son mode d'apparition, déconnecté de toute situation objectivement anxiogène (Botia *et al.*, 2014).

Près de 90 % des alcoolos-dépendants n'ont aucun trouble anxieux indépendant ni induit (Stein *et al.*, 1998 ; Chilcoat, 1998). Dans des populations de patients souffrant de pathologies alcooliques ou hospitalisés pour sevrage, la prévalence des troubles anxieux, toutes catégories confondues, varie de 23 à 70 %, celle du trouble panique est proche de 50 % (Chignon, 1999). Seules les phobies spécifiques ont une association faible avec l'abus d'alcool (Alonso *et al.*, 2004).

I.3.2 Différents types de troubles anxieux

Il existe plusieurs types de troubles anxieux :

- le trouble anxieux généralisé (TAG) : est décrit par le Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux (DSM-V) comme la présence d'inquiétudes et/ou de soucis excessifs, persistants et incontrôlables concernant un certain nombre d'événements ou d'activités pendant une période d'au moins six mois ;
- le trouble panique (TP) : selon le DSM-V, les personnes atteintes de TP manifestent des attaques de panique récurrentes, définies par l'occurrence soudaine d'une appréhension intense qui atteint un pic en quelques minutes ;
- l'agoraphobie : est selon le DSM-V définie comme la peur de se retrouver dans des situations ou des lieux d'où il serait difficile de s'échapper. Cette angoisse est aussi fondée sur la peur de ne pouvoir trouver de l'aide facilement pour être secouru ;

➤ le trouble d'anxiété sociale (TAS) : Selon le DSM-V, communément appelé phobie sociale, est une peur marquée des situations sociales ou de performances dans lesquelles la personne s'attend à se sentir embarrassée, jugée ou rejetée par autrui ;

➤ la phobie spécifique : comme expliqué dans le DSM-V se caractérise par une peur intense, irrationnelle et persistante d'un objet ou d'une situation qui ne présente que peu voire aucun danger réel ;

➤ le trouble obsessionnel compulsif (TOC) : est caractérisé par la survenue d'obsessions (irruption dans la pensée d'un sentiment ou d'une idée) ou de compulsions (sont des actes que le sujet ne peut s'empêcher d'accomplir) récurrentes, suffisamment sévères pour entraîner une perte de temps, un sentiment marqué de souffrance ou un dysfonctionnement significatif (Nutt et Ballenger, 2003 ; Nutt, 2005).

I.3.3 Liens physiopathologiques entre l'alcoolisme et l'anxiété

Il existe des liens entre l'anxiété et l'alcoolisme (Kushner *et al.*, 2012). Environ 19,4% des patients présentant un abus ou une dépendance à l'alcool accusent aussi un trouble anxieux. Inversement, 17,9% des patients ayant un trouble anxieux présenteront durant la vie un trouble lié à la consommation d'alcool. Dans plusieurs cas, il semblerait qu'un phénomène d'auto-médicamentation soit à l'origine de la consommation chez les personnes anxieuses. Elles ressentent un soulagement à court terme des symptômes anxieux lors de la consommation d'alcool, puis consomment d'avantage, dans l'optique de faire définitivement disparaître les symptômes (Bolton *et al.*, 2009 ; Robinson *et al.*, 2009). Des théories plus récentes postulent également que ce processus de renforcement négatif était central dans l'apparition et le maintien des comportements d'abus et de dépendance à l'alcool (Koob, 2013). Selon certaines hypothèses, des symptômes de panique et d'anxiété généralisée peuvent facilement être confondus avec ceux d'un sevrage à l'alcool, comme par exemple des crampes musculaires, de la tachycardie, de la sudation et des nausées. Cependant, chez des personnes souffrant d'une comorbidité anxiété-abus d'alcool, le trouble anxieux peut précéder, suivre ou survenir simultanément avec l'alcoolisme (Marquenie, *et al.*, 2007, Richa *et al.*, 2008). Les troubles anxieux liés à l'alcoolisme pourraient être la conséquence d'un déséquilibre entre les influx excitateurs, principalement dus aux neurones glutamatergiques et les influx inhibiteurs GABAergiques. La consommation chronique d'alcool augmente le nombre de récepteurs au glutamate et diminue ceux du GABA. (Nutt et Malizia, 2001 ; Richa *et al.*, 2008).

I.3.4 Traitement de l'anxiété

Le traitement pharmacologique de l'anxiété repose essentiellement sur les benzodiazépines (BDZ) et les antidépresseurs. Les BDZ offrent la possibilité de soulager rapidement le patient (Gaignault et Nédélec, 1983). On distingue entre autre le diazépam et le chlordiazépoxyde. Tous les BZD se fixent spécifiquement sur le site modulateur aux BZD présent sur les récepteurs de l'acide γ -aminobutyrique de type A (GABAA), dont l'expression est principalement localisée au niveau du système limbique, du cortex et des noyaux gris centraux (Gaignault et Nédélec, 1983).

I.4 Etude ethnobotanique de *Citrus medica*

I.4.1 Description

Les citronniers atteignent à l'âge adulte 3 à 6 m de haut et sont recouverts d'un feuillage clairsemé (Figure 5). La fleur possède cinq sépales, cinq pétales, de nombreuses étamines et un pistil isolé (Navnidhi *et al.*, 2018). Les fruits des principales espèces et variétés cultivées du genre *Citrus* diffèrent par leur coloration, leur forme, leur calibre, la composition de leur jus et leur période de maturité. D'un point de vue botanique, les agrumes sont des fruits charnus de type baie avec un péricarpe structuré en trois parties bien différenciées : l'épicarpe appelé flavédo, le mésocarpe appelé albédo et l'endocarpe (pulpe) (Navnidhi *et al.*, 2018). Le citron est une baie jaune pâle, l'exocarpe forme une écorce tannée contenant une huile essentielle aromatique, employée en parfumerie et dans l'industrie alimentaire (Navnidhi *et al.*, 2018).

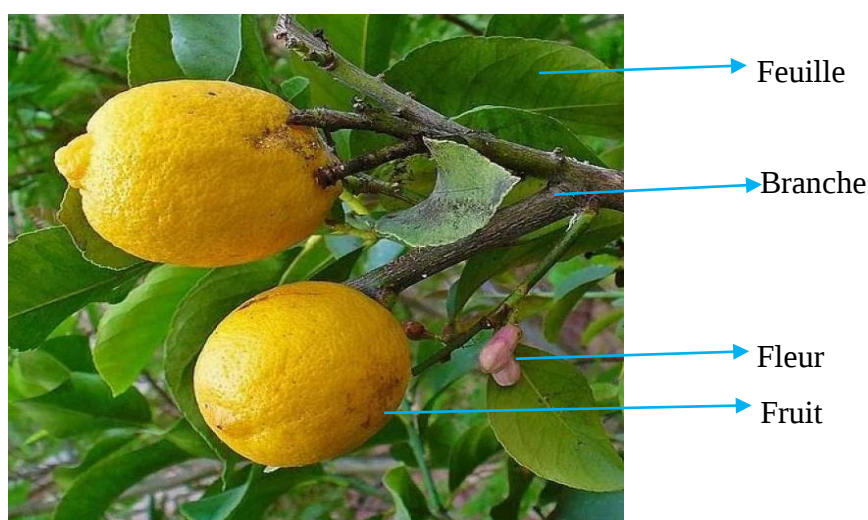


Figure 4 : Feuilles, fleur, branches et fruits d'un citronnier (photographie prise par WAGA Gaston le 19 Septembre 2023 à Yaoundé).

I.4.2 Répartition géographique

Les citronniers sont cultivés dans les régions tropicales et subtropicales du globe, particulièrement dans la péninsule Ibérique, en Italie et en Californie (Ramful *et al.*, 2010 ; Navnidhi *et al.*, 2018). Au Moyen âge, les citronniers ont été introduits en Espagne et en Afrique du Nord à partir du Proche-Orient (Ramful *et al.*, 2010 ; Navnidhi *et al.*, 2018).

I.4.3 Taxonomie

Tableau I : Classification systématique de *Citrus medica* (Navnidhi *et al.*, 2018)

Règne	: Plantae
Embranchement	: Angiospermes
Classe	: Equisetopsida
Sous-classe	: Magnoliidae
Super-ordre	: Rosanae
Ordre	: Sapindales
Famille	: Rutaceae
Genre	: <i>Citrus</i>
Espèce	: <i>Citrus medica</i> Linné. 1753

I.4.4 Usages traditionnelles et pharmacologiques

Les fruits de *Citrus medica* sont utilisés comme compléments alimentaires pour aromatiser le thé, préparer la bouillie et pour la préparation de certains plats traditionnels ou gâteaux (Navnidhi *et al.*, 2018). Ils sont également utilisés dans les industries alimentaires pour la production de jus frais et en parfumerie (Navnidhi *et al.*, 2018 ; Bardeau, 2009). Le citron est utilisé comme antiaddictifs, antimicrobiennes, toniques, anxiolytiques, diurétiques, fébrifuges. On l'utilise également pour entretenir la peau et contre l'obésité (Navnidhi *et al.*, 2018 ; Bardeau, 2009).

Les études phytopharmacologiques réalisées sur les extraits de *Citrus medica* ont montré que la plante possède des propriétés antioxydantes, antimicrobiennes, antiprolifératives, antihyperglycémiantes et cardioprotectrices, (Navnidhi *et al.*, 2018). Ces activités pharmacologiques sont dues à des nombreux composés bioactifs telsque, les phénols, les flavonoïdes, l'iso-limonène, le citral, le limonène, la vitamine C et le pectine (Navnidhi *et al.*, 2018 ; Louiza *et al.*, 2016).

I.4.5 Etude phytochimique de *Citrus medica*

Les études phytochimiques réalisées sur les extraits des fruits de *Citrus Medica* ont montré la présence des nombreux métabolites secondaires comme les flavonoïdes, les terpènes (limonène et le citral), les tanins, les composés phénoliques et les caroténoïdes (Navnidhi *et al.*, 2018). Ces métabolites secondaires possèderaient des propriétés antihypertensives, antihyperglycémiantes, antimicrobiennes, antifongiques et antioxydantes (Ramful *et al.*, 2010).

MATERIEL ET METHODES

II.1 Matériel

II.1.1 Matériel végétal

Le choix de la plante a été faite après des enquêtes auprès des tradithérapeutes. Le matériel végétal était constitué des fruits en maturité de *Citrus medica*. La collecte du matériel végétal a été effectuée le 02 décembre 2022 dans la région du Centre au Cameroun. Ces fruits ont été achetés sur le marché du Mfoundi à Yaoundé. L'échantillon constitué des fruits a été identifié en comparaison avec le matériel de Gayum H du spécimen de la collection d'Herbier national du Cameroun enregistré sous le numéro 65106 HNC.

II.1.2 Matériel animal

Les animaux utilisés pour l'expérimentation étaient des rats mâles albinos de souche Wistar, âgés d'environ huit semaines et pesant en moyenne 150 g. Ces animaux ont été élevés à l'animalerie du Laboratoire de Physiologie Animale de l'Université de Yaoundé I dans des cages en plastique fermées par un grillage. Tous les animaux ont été nourris et abreuvés à l'eau de robinet ad libitum. L'animalerie était éclairé d'une luminosité moyenne et une température proche de 25°C.

Tableau II : Composition de l'aliment pour un kilogramme

Constituants	Quantité en %
Farine de maïs	60
Farine de poisson	20
Farine de blé	10
Poudre d'arachides	6
Farine d'os	2
Complexe vitaminique	1
Sel de cuisine	1

II.1.3 Dispositifs comportementaux

◆ Labyrinthe en croix surélevé

Le dispositif du labyrinthe en croix surélevé que nous avons utilisé, était celui décrit par Ngo Bum *et al.* (2009) (Figure 6A). Fait en bois, il était élevé à une hauteur de 50 cm du sol et comprenait deux bras ouverts opposés de (50 cm de longueur × 12 cm de largeur) et deux bras fermés opposés de (50 cm de longueur × 40 cm de hauteur × 12 cm de largeur) avec une plateforme au centre de 12 x 12 cm de côté (Figure 6B).

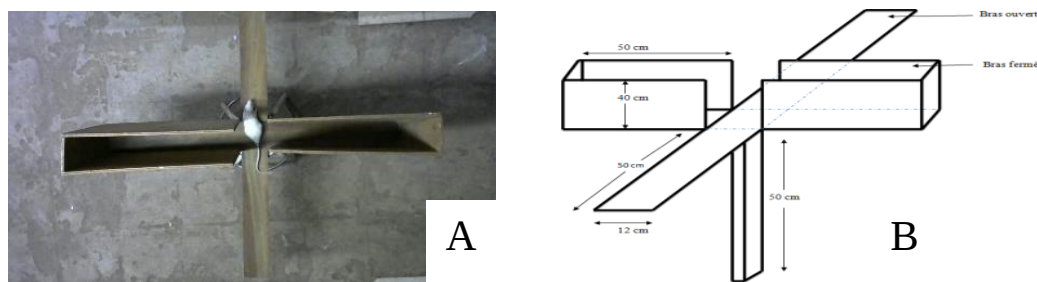


Figure 5: Photographie (A) et représentation schématique (B) du labyrinthe en croix surélevé (photographie prise par WAGA Gaston au laboratoire de Physiologie Animale de l'Université de Yaoundé I, Mars 2023).

◆ Arène ouverte

L'arène ouverte est un dispositif communément utilisé pour évaluer l'activité locomotrice, le niveau d'exploration et la réactivité émotionnelle chez les rongeurs (Brown *et al.*, 1999). C'est une enceinte carrée aux bords élevés et faite de bois (Figure 7). Sa surface d'exploration est divisée en 17 carrés dont 16 carrés divisent la base du dispositif et 1 carré central (Brown *et al.*, 1999). Les dimensions de l'arène ouverte utilisées étaient de 165 cm de longueur, 165 cm de largeur et 83 cm de hauteur.



Figure 6 : Photographie de l'arène ouverte (photographie prise par WAGA GASTON au Laboratoire de Physiologie animale de l'Université de Yaoundé I, Mars 2023).

II.2 Méthodes

II.2.1 Préparation de l'extrait hydro-méthanolique des fruits *Citrus medica*

Nous avons procédé à une extraction hydro-méthanolique contrairement au tradithérapeute qui utilisait un solvant hydro-éthanolique après un screening ayant montré que le solvant hydro-méthanolique augmentait l'extraction des molécules bioactives. Cependant,

des fruits mûrs de *Citrus medica* ont été soigneusement lavés, découpés et le jus a été recueilli à l'aide d'un presse-citron. La peau et la pulpe ont été séchées à l'abris du soleil puis réduites en poudre. Six cent grammes de la poudre (Figure 8) a été soumis à une extraction par macération dans six litres d'un mélange méthanol (95°) /eau distillée (7/3 : V/V) pendant 72 heures. Le macérât ainsi obtenu a été filtré à l'aide d'un papier wattman N°3 puis évaporé dans une étuve réglée à 45°. La quantité d'extrait obtenue a été pesée et le rendement a été déterminé de la manière suivante. Rendement (%) = (masse de l'extrait sec/masse de la poudre sèche) × 100.

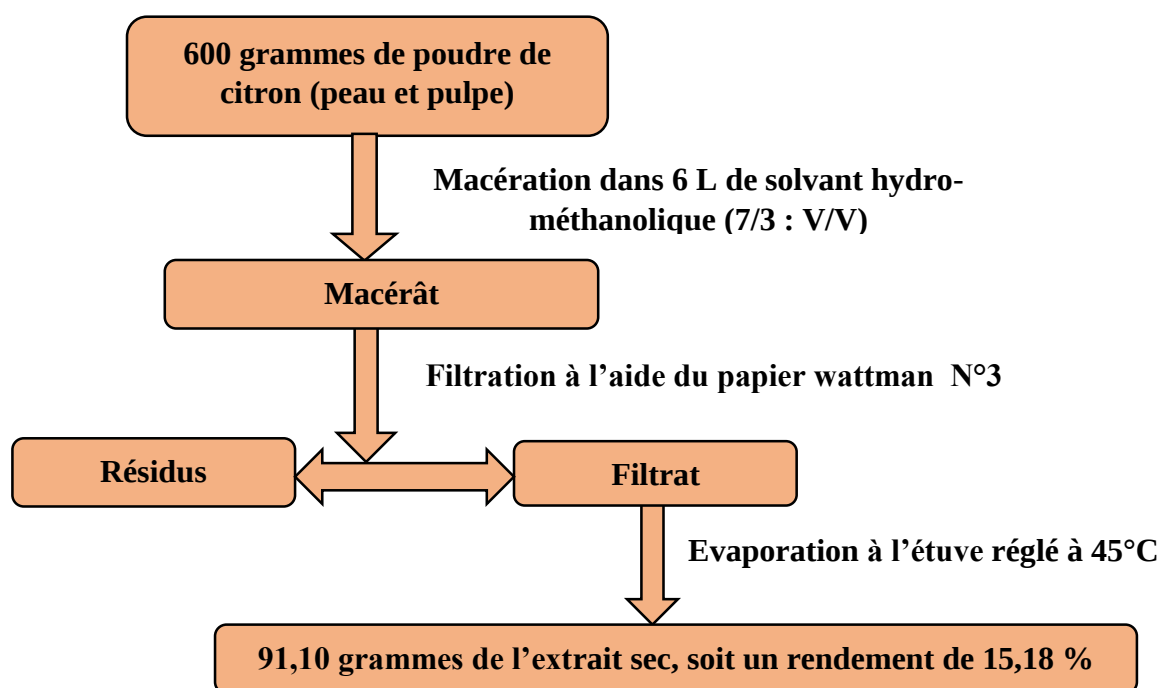


Figure 7 : Protocole d'extraction des fruits de *Citrus medica*

II.2.2 Etude phytochimique de l'extrait hydro-méthanolique des fruits de *Citrus medica*

➤ Estimation de la teneur en phénols

Les phénols totaux ont été évalués par la méthode décrite par Folin et Ciocalteu. (1927). Les concentrations (0,02-0,15 mg/mL) obtenue en diluant 15 mg du standard (acide gallique) et d'extrait de la plante ont été préparées avec un mélange de solution contenant 100 µL d'acide gallique ou extrait, 500 µL de réactif FC, et 400 µL de carbonate de sodium 7,5 %. Le mélange a été incubé à température ambiante pendant 10 mn et l'absorbance a été lue à 730 nm au spectrophotomètre. La concentration totale de phénols dans le composé en acide gallique équivalent a été déterminée par la courbe d'étalonnage de l'acide gallique et exprimée en mg d'acide gallique équivalent (GAE)/g d'extrait des fruits de *Citrus medica* (Figure 9). La

concentration totale de phénols contenue dans l'échantillon a été calculée en utilisant la formule : $C = c V/m$.

C = concentration totale de phénols contenues dans 1 mg GAE/g d'extrait sec, c = concentration d'acide gallique obtenu de la courbe d'étalonnage en mg/mL, V = volume d'extrait en mL, m = masse d'extrait en gramme (g).

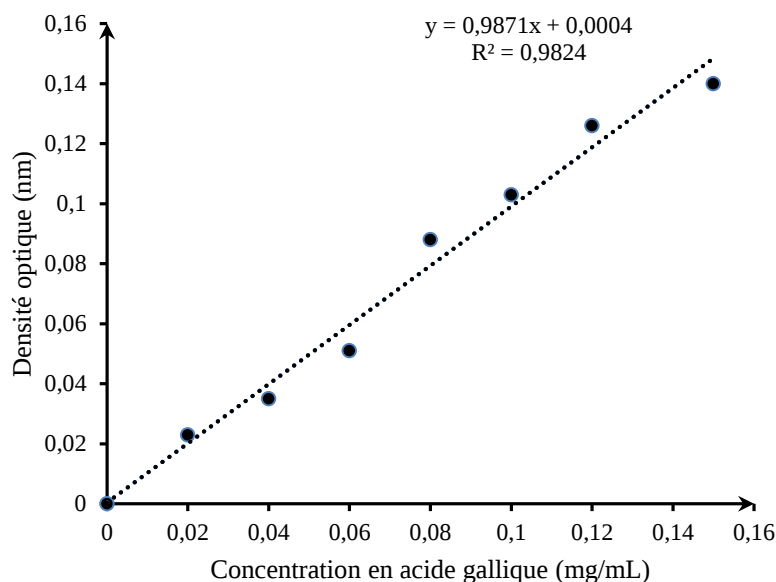


Figure 8 : Courbe d'étalonnage des phénols

➤ Estimation de la teneur en flavonoïdes totaux

L'estimation de la teneur en flavonoïdes totaux a été déterminée par la méthode de Dehpour *et al.* (2009). Différentes concentrations (0,02-0,15 mg/mL) obtenue en diluant 15 mg du standard (rutine) et de l'extrait de plante ont été préparées avec 500 µL de routine ajouté à 1500 µL de méthanol à 95 % (v/v), 100 µL de chlorure d'aluminium 10 % (m/v), 100 µL d'acétate de sodium 1M ; 2,8 mL d'eau distillée. Le mélange a été agité et incubé à l'abris de la lumière et à température ambiante pendant 30 mn pour permettre la réaction. L'absorbance a été mesurée à 415 nm au spectrophotomètre. Les résultats ont été déterminés par la courbe d'étalonnage de routine et exprimés en mg de routine équivalent (RE)/g d'extrait des fruits de *Citrus medica* (Figure 10).

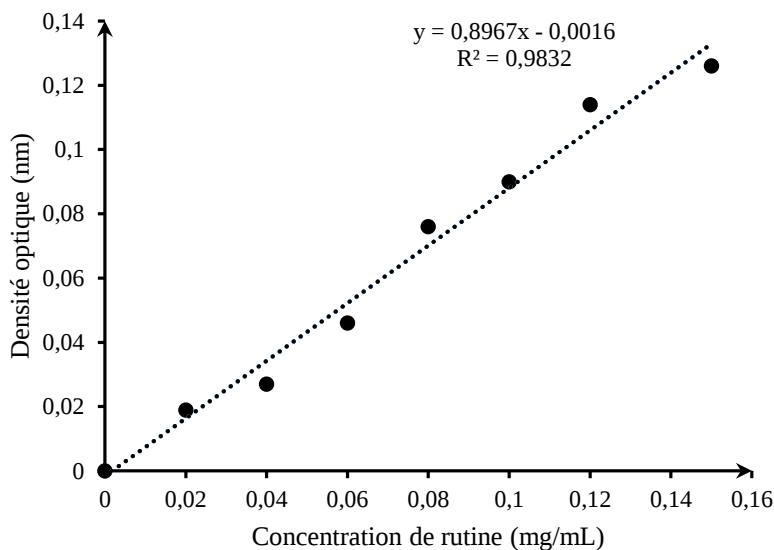


Figure 9 : Courbe d'étalonnage des flavonoïdes

➤ **Estimation de la teneur en tannins**

La teneur en tannins a été déterminée par la méthode de vanilline hydrochloride (Ba *et al.*, 2010). Le réactif a été préparé en mixant à égal volume l'acide chlorhydrique 8 % (v/v), le méthanol 37 % (v/v), et la vanilline dans le méthanol 4 % (m/v). Le mélange a été conservé à 30 °C avant le test. 200 µL d'extrait de plante ou catéchine à différentes concentrations (0,06-0,3 mg/mL) ont été ajoutés à 1000 µL de mélange de réactif de vanilline et incubé dans à l'abris de la lumière à 30 °C pendant 20 min. L'absorbance a été lue à 500 nm par un spectrophotomètre. La concentration totale de tanin en catéchine a été déterminée par la courbe d'étalonnage de catéchine et exprimée en mg de catéchine équivalent (Cat E) /g d'extrait des fruits de *Citrus medica* (Figure 11).

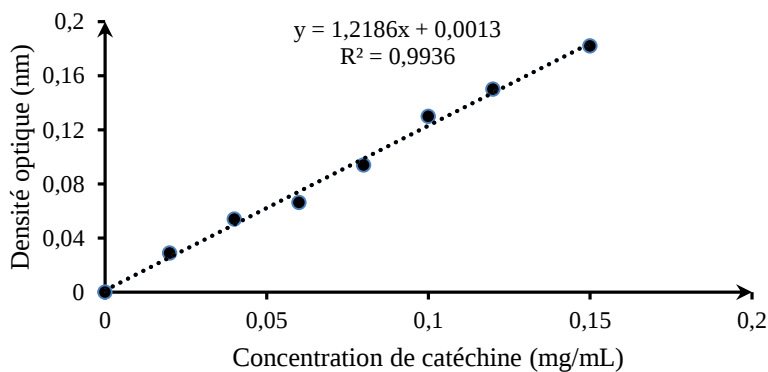


Figure 10 : Courbe d'étalonnage des tannins

II.2.3 Préparation des solutions et tampons

♦ Dilution de l'éthanol

De l'éthanol 20° a été préparé en suivant la table de dilution de Gay-Lussac. Pour ce faire, 408,50 mL d'eau distillée a été ajoutée à 100 mL d'éthanol pur (100°). Cet alcool a été obtenu en distillant de l'éthanol 95° pour éliminer les traces d'eau le ramenant ainsi à 100°.

♦ Solution de NaCl 0,9 %

Pour préparer une solution de NaCl 0,9 %, 9 g de NaCl a été dissous dans 500 mL d'eau distillée. Le volume de la solution a été complété à 1000 mL par ajout d'eau distillée.

♦ Solution de formaldéhyde (formol 4 % tamponné)

Pour préparer un litre de formol 4 %, 6,5 g de phosphate dissodique et 4 g de phosphate monosodique ont été ajoutés à 867 mL d'eau distillée. Après agitation du mélange, 133 mL de solution mère de formaldéhyde (30 %) a été introduit dans le mélange.

♦ Tampon bicarbonate (50 mM ; pH 10,2)

Un volume de 100 mL de solution de tampon bicarbonate (0,5 M ; pH 9) a été préparé en dissolvant 3,05 g de bicarbonate dans 100 mL d'eau distillée.

♦ Réactif de Ellman

Pour la préparation du réactif de Ellman, 5 mg d'acide 2-dithio bis-nitrobenzène (DTNB) ont été dissous dans du tampon phosphate (0,1 M ; pH = 6,5) pour un volume final de 250 mL.

II.2.4 Détermination de la dose à administrer aux animaux

La dose à administrer a été calculée à partir de la prescription du tradithérapeute qui recommandait un demi-verre de 100 mL par jour du macérât. L'équivalent de ce volume a été évaporé pour obtenir 2,53 g de l'extrait sec. A partir de la masse de l'extrait sec et en estimant à 70 kg la masse moyenne d'un individu adulte, la dose journalière ou dose humaine équivalente (DHE) a été déterminée. La dose animale a été déterminée à l'aide de la formule d'interpolation de doses inter-espèces. Elle s'exprime en multipliant la dose humaine équivalente (DHE) par un facteur de conversion, il est de 6,17 chez le rat. Ceci nous a permis d'obtenir une dose mère équivalente à 223 mg/kg (Shin *et al.*, 2010). Cette dose a été encadrée par une dose maximale (446 mg/kg) obtenue en multipliant la dose mère par deux et une minimale (112 mg/kg) en divisant la dose mère par deux. La formules ci-après a été utilisée.

$$\text{DHE (mg/kg)} = (\text{Masse de l' extrait sec})/(\text{Masse corporelle})$$

II.2.5 Alcoolisation, répartition et traitement des animaux

◆ Alcoolisation des animaux

L'addiction à l'alcool a été induite suivant la méthode d'alcoolisation forcée et le modèle d'étude des syndromes de la dépendance physique (les crises de convulsion et les agitations psychomotrices) et psychologique (anxiété) (Pascoli *et al.*, 2016 ; Campbell, 2007). En effet, 57 rats ont été divisés en deux groupes ainsi qu'il suit : un groupe témoin normal (7 rats) recevait par voie *i.p* une solution hydrosaline (0,9% NaCl, 10 mL/kg) et un groupe alcool (50 rats) recevait par voie intrapéritonéale (*i.p*) 10 mL/kg de l'éthanol 20° (V/V). Cet alcool a été obtenu en diluant de l'éthanol pure dans une solution hydrosaline 0,9% NaCl (V/V) représentant une solution physiologique (Naassila, 2013). Les animaux ont été traités quotidiennement pendant 21 jours. Les symptômes de la dépendance psychologique caractérisés l'anxiété après 12 heures de sevrage sont en effet apparus au quinzième jours de l'induction, lors du test de l'arène ouverte. Les animaux alcooliques ont été choisis suivant leur niveau d'anxiété comparé avec le groupe témoin normal.

◆ Répartition et traitement des animaux

Vingt-quatre heures après la phase d'alcoolisation, 35 survivants issus du groupe alcool ont été répartis en 5 groupes de 7 rats et traités pendant 18 jours comme suit : un groupe témoin négatif (7 rats) recevait de l'eau distillée (10 mL/kg, *p.o*), un groupe témoin positif (7 rats) recevait le diazépam (3 mg/kg, *p.o*) et trois groupes de 7 rats chacun traités avec l'extrait hydro-méthanolique de la peau et pulpe des fruits de *Citrus medica* aux doses de 112, 223 et 446 mg/kg, *p.o*. Par ailleurs, le groupe témoin normal (7 rats) a été associé aux 5 groupes issus du groupe alcool et recevait de l'eau distillée (10 mL/kg *p.o*). Du seizième au dix-huitième jour du traitement, les animaux ont été soumis aux tests de l'arène ouverte et du labyrinthe en croix surélevé pour évaluer les symptômes de l'anxiété. Vingt-quatre heures après les tests comportementaux, les rats ont été sacrifiés. Le cortex préfrontal et l'hippocampe (n=5) ont été prélevés pour quantifier quelques marqueurs neurochimiques et du stress oxydant. L'autre partie (n=2) a été fixée dans du formol 10% pour les analyses histopathologiques (Figure 12).

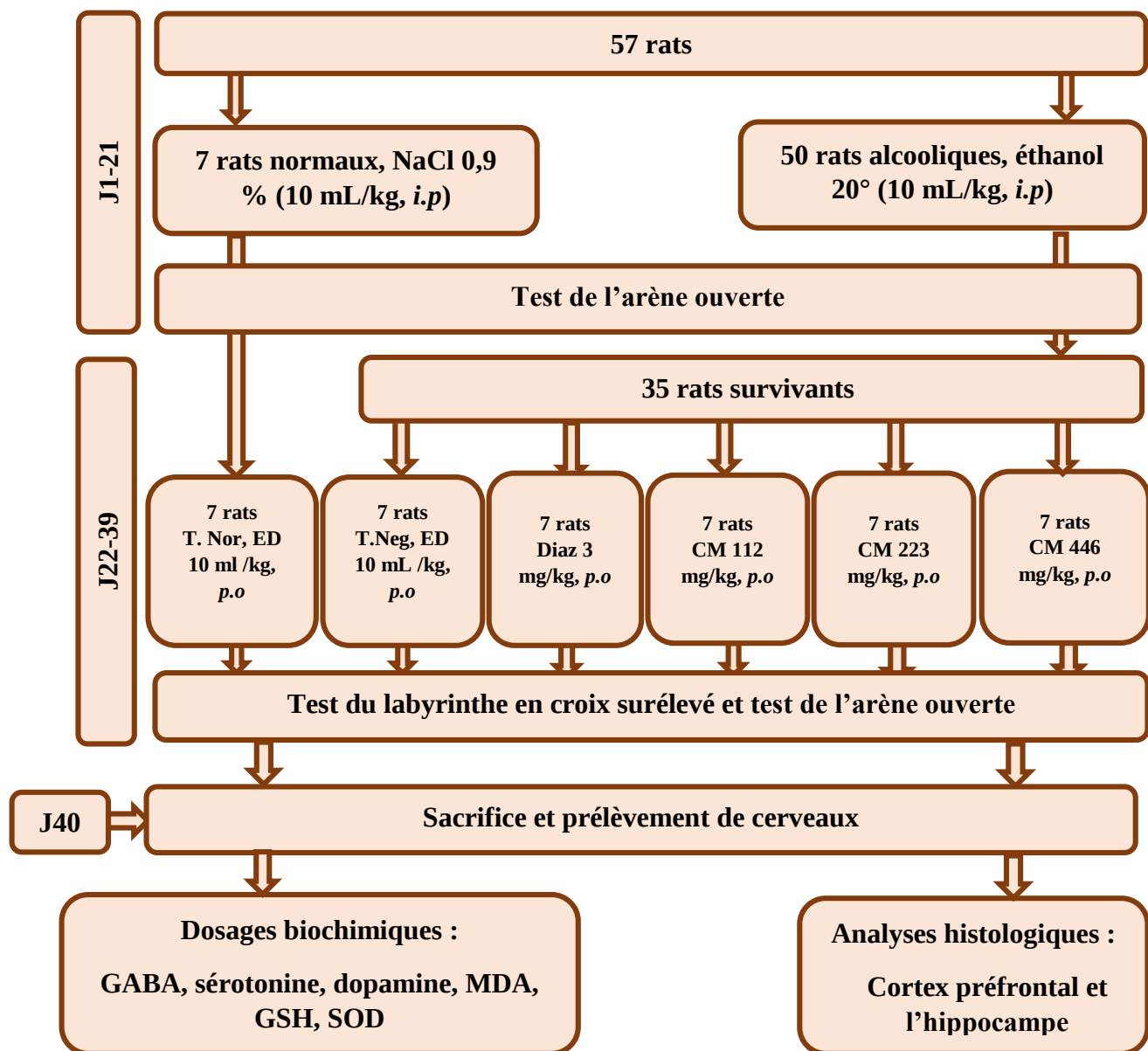


Figure 11 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental

T.Nor=témoin normal, T.Neg= témoin négatif, p.o= per os, i.p= intrapéritonéale, Diaz= diazépam, CM= *Citrus medica*, J= jour

II.2.4 Evaluation des paramètres comportementaux

◆ Test du labyrinthe en croix surélevé

➤ Principe

L'expérience appose la peur des espaces ouverts et le désir d'explorer un nouvel environnement.

➤ Mode opératoire

L'altération des fonctions émotive chez les rats a été testée en utilisant un labyrinthe en croix surélevé. Les rats ont été placés l'un après l'autre dans la plate-forme centrale du labyrinthe et le comportement de chaque animal a été observé pendant une durée de 5 mn. Après le passage de chaque animal, le dispositif expérimental était nettoyé avec l'alcool 70° pour éliminer les odeurs et les déchets laissés par ce dernier. Durant l'observation, les paramètres suivants ont été enregistrés : le nombre d'entrées et le temps passés dans les bras ont été notés. Les résultats ont été exprimés en pourcentage et calculés selon les formules suivantes :

$$\text{TPB (O ou F)\%} = \frac{\text{TPB (O ou F)}}{\text{TTPB}} \times 100$$

$$\text{NEB (O ou F)\%} = \frac{\text{NEB (O ou F)}}{\text{NTEB}} \times 100$$

F : Fermé ; **O** : Ouvert ; **NEB** : Nombres d'entrées dans chaque bras ; **NTEB** : Nombres total d'entrées dans tous les bras
TPB : Temps passé dans chaque type de bras ; **TTPB** : Temps total passé dans tous les bras.

◆ Test de l'arène ouverte

➤ Principe

Ce test est basé sur le comportement d'évitement de la lumière vive, des espaces ouverts et de l'exploration d'un nouvel environnement.

➤ Mode opératoire

Chaque animal a été placé l'un après l'autre dans le centre du dispositif éclairé d'une lumière vive pour une durée de 5 mn. Après le retrait de l'animal, le dispositif était nettoyé avec de l'éthanol 70° pour enlever toute trace d'odeur laissée par l'animal. Les paramètres suivants ont été enregistrés : le nombre de lignes traversées, le temps et le nombre d'entrées dans le carré central du dispositif.

II.2.5 Sacrifice et prélèvement de cerveaux

Les animaux devant être sacrifiés ont été préalablement pesés. Après la pesée, chaque animal a été sacrifié par dislocation cervicale et placé en décubitus dorsal sur une plaque de liège pour être disséqué. Les cerveaux ont été prélevés, essorés avec un papier absorbant puis placés dans des glaçons pour être solidifiés pendant une heure. Après solidification, les hippocampes et le cortex préfrontal ont été retirées et leurs masses évaluées. Ces organes ont été utilisés pour la préparation des homogénats avec du tampon Tris. Pour 0,4 g de tissu, le volume de tampon Tris utilisé a été de 2 mL. Après broyage dans un potier, le mélange a été

introduit dans un tube sec, puis centrifugé à 3 000 tours/mn pendant 25 minutes. Le surnageant a été pipeté et introduit dans un tube Eppendorf puis conservé au congélateur. Une partie de cerveaux a été fixée dans du formol 4 % pour les analyses histopathologiques du cortex préfrontal et de l'hippocampe.

II.2.6 Dosages des marqueurs neurochimiques

◆ Dosage de l'acide gamma-amino butyrique

➤ Principe

La réaction entre la ninhydrine et le GABA en milieu basique forme un complexe dont l'absorbance est proportionnelle à la quantité d'acide gamma aminobutyrique de GABA (GABA) dans le milieu réactionnel.

➤ Mode opératoire

La quantité d'acide gamma aminobutyrique (GABA) dans les surnageant des homogénats a été évaluée par la technique décrite par Lowe *et al.* (1958). 100 µL de surnageant a été introduit dans le réactif de travail qui était constitué d'un mélange de 0,2 mL de solution de ninhydrine 0,14 M préparée dans une solution de tampon bicarbonate (0,5 M ; pH 9,9), et de 0,1 mL d'acide trichloro-acétique glacial (TCA) 10 %. Le mélange a été incubé à 60°C dans un bain marie pendant 30 mn. A l'aide d'un spectrophotomètre, le complexe résultant de la réaction entre la ninhydrine et le GABA dans le milieu basique a été mesurée. La concentration de GABA (µg/g) dans le surnageant a été déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage du GABA (Figure 13)

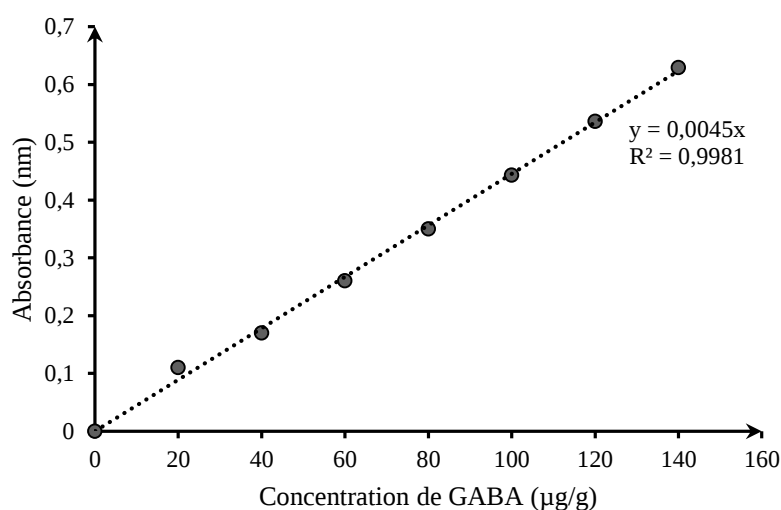


Figure 12 : Courbe d'étalonnage du dosage de l'acide gamma aminobutyrique.

◆ Dosage de la sérotonine

➤ Principe

En présence de l'acide chlorhydrique, la sérotonine va s'oxyder pour donner un dérivé qui va s'associer à l'O-phthaldialdéhyde, afin de donner un complexe coloré, dont l'absorbance à 470 nm est proportionnelle à la concentration de la sérotonine.

➤ Mode opératoire

La concentration de sérotonine dans le surnageant d'homogénat a été estimée avec la méthode décrite par Schlumpf *et al.* (1974). 0,8 mL de la phase surnageante a été pipetée et ajouté à un tube sec contenant 0,2 mL d'heptane et 2,5 mL d'acide chlorhydrique 0,1M. Après 10 mn d'agitation vigoureuse, le tube a été centrifugé dans les mêmes conditions pour séparer deux phases. La phase organique supérieure a été éliminée et la phase aqueuse a été utilisée pour l'estimation de la sérotonine. 0,2 mL d'échantillon, 0,25 mL de réactif O-phthaldialdéhyde (OPT) a été ajouté. Le mélange a été chauffé à 100°C pendant 10 mn. Les lectures ont été réalisées à 470 nm par un spectrophotomètre. Pour le blanc, 0,25 mL contenant du HCl 0,1 M sans OPT a été ajouté. Les concentrations en sérotonine des échantillons, ont été déterminées à l'aide d'une courbe d'étalonnage (Figure 14). Cette courbe a été obtenue à l'aide des différentes concentrations du standards (0, 2, 4, 6, 8, 10 et 12 ng/mL) de sérotonine.

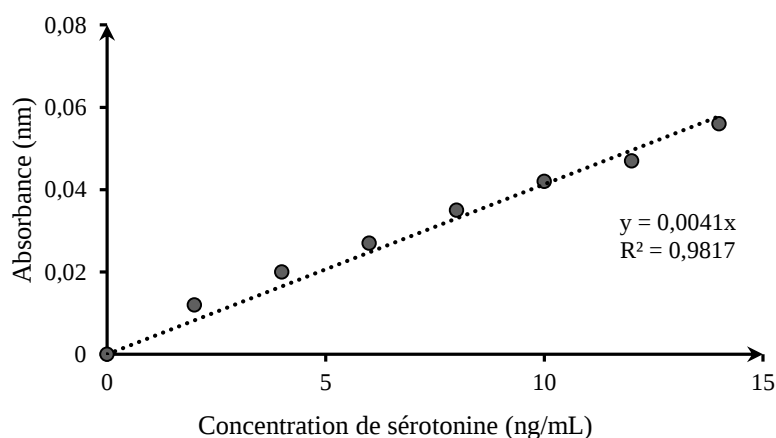


Figure 13 : Courbe d'étalonnage de la sérotonine.

◆ Dosage de la dopamine

➤ Principe

En présence de l'acide chlorhydrique, la dopamine va s'oxyder pour donner un dérivé de l'indole qui va s'associer aux trihydroxyindoles, pour de donner un complexe coloré, dont l'absorbance à 485 nm est proportionnelle à la concentration de la dopamine.

➤ Mode opératoire

Un millilitre de surnageant a été prélevé et ajouté au tube de centrifugation contenant 2,5 mL d'heptane et 1,5 mL HCl à 0,1 M. Après 10 mn d'agitation vigoureuse, le tube a été centrifugé à 2000 tr/mn pour séparer les deux phases. La phase aqueuse a ensuite été prélevée pour le dosage de la dopamine. L'absorbance a été lue à température ambiante à l'aide d'un spectrophotomètre à 485 nm. Les concentrations en dopamine des échantillons ont été déterminées à l'aide de la courbe d'étalonnage (Figure 15) obtenue à partir des valeurs standards de concentration de la dopamine (0, 5, 10, 15 et 20 ng/mL)

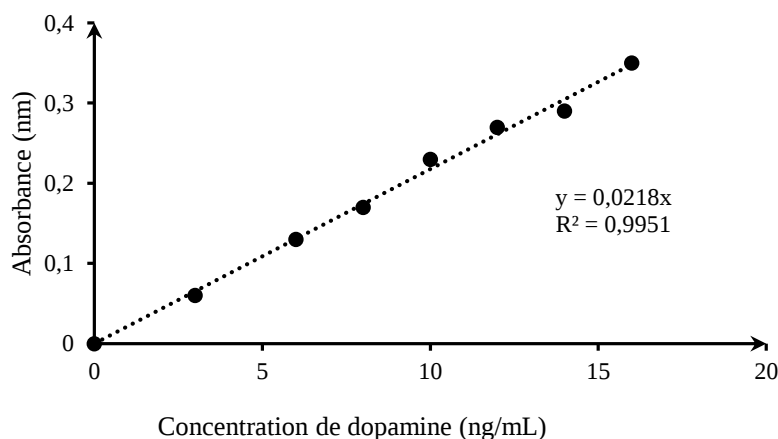


Figure 14: Courbe d'étalonnage de la dopamine.

II.2.7 Dosages des marqueurs du stress oxydant

◆ Dosage du malondialdéhyde

La teneur en MDA a été mesurée selon le protocole décrit par Wilbur *et al.* (1949).

➤ Principe

Le malondialdéhyde (MDA) forme en milieu acide et chaud (100 °C) de l'aldéhyde malonique. Cette dernière réagit avec l'acide thiobarbiturique (TBA) pour former un complexe coloré qui absorbe à 530 nm. Ce complexe rend compte de la quantité de MDA dans l'échantillon.

➤ Mode opératoire

Un volume de 250 µL d'homogénat a été introduit dans les tubes tests et 250 µL de tampon Tris (HCl 50 mM ; KCl 150 mM ; pH 7,4) dans le tube blanc. 250 µL de TCA (20 %) et 500 µL de TBA (0,67 %) ont été ajoutés dans tous les tubes (essai et blanc). Les tubes ont été bouchés à l'aide de billes de verre et incubés à 70 °C au bain marie pendant 10 mn puis refroidis

à l'eau de robinet et centrifugés à 3000 tours/minute pendant 15 mn à température ambiante. Après décantation, le surnageant a été pipeté et l'absorbance a été lue à 530 nm contre le blanc au spectrophotomètre. La concentration en MDA (μmol/g de tissu) selon la relation ci-après.

$$\text{MDA } (\mu\text{mol/g de tissu}) = \frac{\text{DO} \times V_t}{\epsilon \times l \times V_e \times m} \times 10^6$$

DO = densité optique ; V_t = volume total de surnageant (mL) ; V_e = volume utilisé pour le dosage (mL) ; m = masse de tissu (g) ; l = longueur de la cuve = 1 cm ; ϵ = coefficient d'extinction molaire = $1,56 \times 10^5 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

◆ Dosage du glutathion réduit

L'estimation du taux de glutathion réduit (GSH) a été réalisée selon la méthode décrite par Ellman *et al.* (1961).

➤ Principe

L'acide 2,2'-dithio-5,5'-dinitrobenzoïque (DTNB) réagit avec les groupements thiols (-SH) du glutathion pour former un complexe coloré jaune qui absorbe à 412 nm.

➤ Mode opératoire

Un volume de 1,5 mL du réactif d'Ellman a été introduit dans des tubes contenant préalablement 100 μL d'homogénats (tubes à essai) ou 100 μL de tampon Tris-HCl (0,1 M, pH 7,4) (tube blanc). Les tubes ont été agités et incubés à 37 °C pendant 60 minutes. Les absorbances ont été lues à 412 nm contre le blanc à l'aide d'un spectrophotomètre. Par la suite, la concentration du glutathion réduit exprimée μmol/g de tissu a été calculée grâce à la formule suivante :

$$\text{GSH}(\mu\text{mol/g de tissu}) = \frac{\text{DO} \times V_t}{\epsilon \times L \times V_e \times m} \times 10^6$$

DO = densité optique ; V_t = volume total de surnageant (mL) ; V_e = volume utilisé pour le dosage (mL) ; m = masse de tissu (g) ; l = longueur de la cuve = 1 cm ; ϵ = coefficient d'extinction molaire = $13600 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

◆ Evaluation de l'activité de la superoxyde dismutase

L'activité de la SOD a été évaluée selon la méthode de Misra *et al.* (1972).

➤ Principe

La présence de superoxyde dismutase (SOD) inhibe l'oxydation de l'adrénaline en adrénochrome. L'augmentation de l'absorbance à 480 nm, est proportionnelle à l'activité de la SOD entre 20 et 80 sec.

➤ **Mode opératoire**

Un volume de 1666 µL et de 1800 µL de tampon carbonate (50 mM ; pH 10,2) ont été introduit respectivement dans les tubes contenant 134 µL d'homogénat et dans les tubes blancs. La réaction a été déclenchée dans chaque tube par ajout de 200 µL de solution d'adrénaline (0,3 mM). Après homogénéisation, la densité optique a été directement lue à 480 nm à 20 et 80 s par un spectrophotomètre. L'activité spécifique de la SOD a été définie en unité de SOD/mg de tissu. Ensuite, une unité de l'activité de la SOD a été définie comme l'activité de SOD nécessaire pour causer une inhibition de 50 % de l'oxydation de l'adrénaline en adrénochrome pendant une minute. La variation de l'absorbance : ΔDO (mn) = $A_{20\text{ s}} - A_{80\text{ s}}$.

$$\% \text{ inhibition} = 100 - \Delta DO \text{ test} \times \frac{100}{\Delta DO \text{ blanc}}$$

$$\text{Activité SOD (Unité de SOD/g de tissu)} = \frac{\text{Nombre d'unité de SOD/mL}}{\text{mg d'organe} \times f}$$

SOD : super oxyde dismutase ; $A_{20\text{ s}}$: absorbance mesurée à 20 s ; $A_{80\text{ s}}$: absorbance mesurée à 80 s ; ΔDO test : variation de l'absorbance de l'échantillon ; ΔDO blanc : variation de l'absorbance du blanc ; f : facteur de dilution ; %: pourcentage.

II.2.8 Analyses histologiques

L'analyse histologique du cortex préfrontal et de l'hippocampe a été réalisée suivant plusieurs étapes à savoir : la fixation, le “trimming”, la déshydratation, l'inclusion, la coupe, la coloration, le montage et l'observation (kim *et al.*, 2019).

➤ **Fixation** : elle permet de conserver les cellules dans un état aussi proche que possible de celui du vivant. Les organes prélevés ont été fixés dans du formol tamponné 10 % pendant environ 30 jours.

➤ **Recoupe ou “trimming”** : après fixation, une fine tranche de chaque organe fixé (cortex préfrontal et hippocampe) a été prélevée et placée dans des cassettes en plastique préalablement étiquetées.

➤ **Déshydratation** : au cours de cette étape, les cassettes ont préalablement été introduites, à une durée déterminée, dans 6 bacs contenant de l'alcool éthylique de degrés croissants : 1 bac

d'éthanol 70° (1 h), 2 bacs d'éthanol 95° (1 h et 1 h 30), et 3 bacs d'éthanol 100° (1 h, 1 h 30 et 2 h) (déshydratation proprement dite). Après la sortie du 3e bac d'alcool 100°, les cassettes ont séjourné dans deux bains de xylène pendant 1 h et 1 h30 respectivement (éclaircissement), puis dans une série de 3 bacs de paraffine en fusion (60°C) à raison de 1h, 1 h30 et 2 h respectivement (imprégnation).

➤ Inclusion : elle permet de fournir un support externe solide aux tissus en vue de la réalisation de coupes fines. Les portions d'organe ont été placés selon un sens d'orientation déterminé dans des moules en acier inoxydable, puis la surface du moule a été recouverte par la base de la cassette et le moule a été rempli de paraffine en fusion. Le tout a été mis à solidifier sur une plaque réfrigérante.

➤ Coupe : à l'aide d'un microtome Reichert-Jung 2030, les blocs de paraffine contenant les organes ont été coupés à une épaisseur de 5 µm. Les sections de rubans obtenues ont été mises à déplier dans un bain marie (40°C) contenant de l'eau gélifiée (1 ‰), puis récupérées sur des lames porte objet propres préalablement étiquetées. Les lames ont ensuite séjourné pendant 24 heures dans une étuve à 45°C.

➤ Coloration : elle permet d'obtenir une différenciation tinctoriale des éléments cellulaires ou tissulaires. La technique de coloration à l'hématoxyline-éosine (HE) a été utilisée.

➤ Montage et observation : Après la coloration, les lames ont été déshydratées dans trois bains d'éthanol 100° puis éclaircies dans trois bains de xylène (5 minutes par bain). Une fois sortie du xylène, quelques gouttes de résine ont été déposées sur les coupes, puis ces dernières ont été recouvertes à l'aide de lamelles de verre pour observation au microscope. Le microscope (Scientico STM-50) utilisé, était muni d'une caméra digitale de marque Pierron 15601 connectée à un ordinateur Hp Pavilion Core i7, pour la prise des microphotographies. Les sections d'images photographiées au grossissement $\times 400$ ont ensuite été introduites dans le "logiciel cell counter image j" version "ij 146-jdk6" pour le comptage des neurones viables.

II.2.9 Analyses statistiques

Les résultats obtenus des différents tests ont été exprimés sous forme de moyenne $\pm$ erreur standard à la moyenne (ESM) ou de pourcentages. Les analyses statistiques et les constructions des graphiques ont été réalisées à l'aide des logiciels XL Stat : GraphPad Prism version 8.0.1.244 et Microsoft Office Excel. La comparaison des différentes valeurs a été faite à l'aide du test d'analyse de la variance « ANOVA » ainsi que du test de comparaison multiple de Tukey, à partir de $p < 0,05$, les différences ont été considérées comme significatives.

RESULTATS ET DISCUSSION

III.1 Résultats

III.1.1 Phytochimie de l'extrait hydro-méthanolique de *Citrus medica*

Le tableau III indique que l'extrait hydro-méthanolique des fruits de *Citrus medica* contient une concentration élevée en phénols par rapport aux flavonoïdes et aux tanins.

Tableau III : Phytochimie de l'extrait hydro-méthanolique des fruits de *Citrus medica*

Métabolites secondaires	Concentration pour 0,02 mg d'extrait sec
Phénols (mg GAE/g)	23,63 ± 2,43
Flavonoïdes (Rutin) mg RE/g	0,05 ± 0,00
Tanins (Catéchine) mg CatE/g	0,12 ± 0,00

Chaque valeur représente la moyenne ± ESM, n= 3, GAE = Galic Acid Equivalent, RE = Rutin Equivalent, CatE = Catéchine Equivalent.

III.1.2 Effets de l'extrait hydro-méthanolique des fruits de *Citrus medica* sur l'anxiété

◆ Effets de l'extrait hydro-méthanolique des fruits de *Citrus medica* sur l'anxiété dans le labyrinthe en croix surélevé

La figure 16 présente les effets de l'extrait hydro-méthanolique des fruits de *Citrus medica* sur les paramètres du labyrinthe en croix surélevé. Il en ressort que, l'éthanol a entraîné une diminution de 28 % ($p < 0,001$) du nombre d'entrées dans les bras ouverts du témoin négatif comparativement au témoin normal (Figure 16A). Chez les groupes ayant reçu l'extrait aux doses 112 mg/kg et 446 mg/kg, le nombre d'entrées dans les bras ouverts a significativement augmenté de 9 % ($p < 0,01$) et 13 % ($p < 0,001$) respectivement par rapport au témoin négatif. Le diazépam a augmenté ce paramètre de 30 % ($p < 0,001$) par rapport au témoin négatif.

En ce qui concerne le temps passé dans les bras ouverts (Figure 16B), ce paramètre diminué de 74 % ($p < 0,00$) chez le témoin négatif comparativement au témoin normal. Chez le groupe ayant reçu l'extrait à la dose 446 mg/kg, il y'a eu une augmentation de temps passé dans les bras ouverts de 33 % ($p < 0,001$) par rapport au témoin négatif. Le diazépam, a augmenté le temps passé dans les bras ouverts de 66 % ($p < 0,001$) par rapport au témoin négatif.

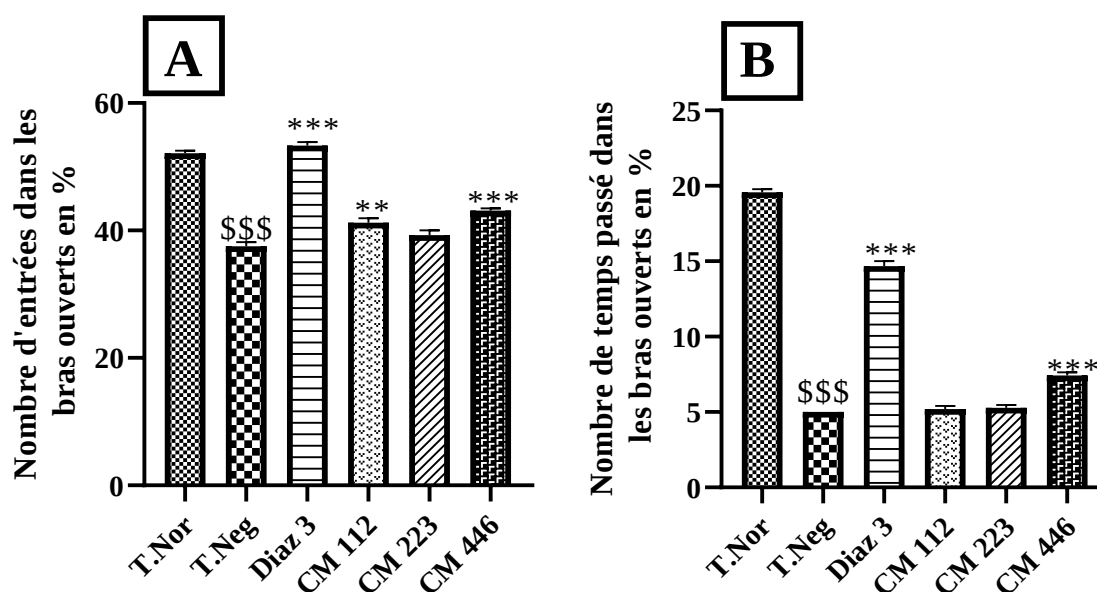


Figure 15 : Effets de l'extrait hydro-méthanolique des fruits de *Citrus medica* sur le nombre d'entrées (A) et de temps passés (B) dans les bras ouverts du labyrinthe en croix surélevé.

Chaque barre représente la moyenne $\pm$ ESM, $n = 7$. \$\$\$ $p < 0,001$, différence significative par rapport au témoin normal. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, différence significative par rapport au témoin négatif. T.Nor = témoin normal ayant reçu de l'eau distillée à 10 mL/kg ; T.Neg = témoin négatif ayant reçu de l'eau distillée à 10 mL/kg ; Diaz = ayant reçu le diazépam 3 mg/kg ; CM 112, CM 223, CM 446 = Groupes traités avec l'extrait aux doses de 112, 223 et 446 mg/kg.

◆ Effets de l'extrait hydro-méthanolique des fruits de *Citrus medica* sur l'anxiété dans l'arène ouverte

Le tableau IV indique que l'éthanol a entraîné une diminution du nombre de lignes traversées chez le témoin négatif de 39 % ($p < 0,001$) en comparaison avec le témoin normal. En revanche, il a été constaté une augmentation significative de 22 % ($p < 0,001$) et 39 % ($p < 0,001$) du nombre de lignes traversées chez les rats ayant reçu l'extrait aux doses de 223 mg/kg et 446 mg/kg respectivement par rapport au témoin négatif. Le diazépam administré dans les mêmes conditions a entraîné une augmentation significative du nombre de lignes traversées de 31 % ($p < 0,001$) par rapport au témoin négatif. L'éthanol a également entraîné une diminution du nombre d'entrées dans le carré central de 73 % ($p < 0,001$) chez le témoin négatif en comparaison au témoin normal. L'extrait à la dose de 446 mg/kg a augmenté le nombre d'entrées dans le carré central de 72 % ($p < 0,001$) par rapport au témoin négatif. En ce qui concerne le temps passé dans le carré central, l'éthanol a diminué ce temps de 72 % ($p < 0,001$) chez le témoin négatif en comparaison avec le témoin normal. L'extrait a augmenté le temps

passé dans le carré central de 65 % ($p < 0,01$) et 71 % ($p < 0,001$) respectivement aux doses 112 mg/kg et 446 mg/kg en comparaison au témoin normal.

Tableau IV : Effets de l'extrait hydro-méthanolique des fruits de *Citrus medica* sur quelques paramètres de l'anxiété dans l'arène ouverte.

	Nombre de lignes traversées	Nombre d'entrées dans le carré central	Durée dans le carré central
T.Nor	41,75 ± 0,86	2,50 ± 0,19	10,75 ± 0,62
T.Neg	25,33 ± 0,67 \$\$\$	0,67 ± 0,21 \$\$\$	3,00 ± 0,26 \$\$\$
Diaz 3	36,50 ± 1,56 ***	0,67 ± 0,21	0,83 ± 0,17
CM 112	28,00 ± 0,70	1,60 ± 0,24	8,60 ± 0,51 **
CM 223	32,57 ± 0,61 ****	0,71 ± 0,18	6,42 ± 0,20
CM 446	41,28 ± 0,42 ***	2,42 ± 0,20 ***	13,14 ± 0,60 ***

Chaque valeur représente la moyenne ± ESM, n = 7. \$\$\$ $p < 0,001$, différence significative par rapport au témoin normal. ** $p < 0,01$, **** $p < 0,001$, différence significative par rapport au témoin négatif. T.Nor = témoin normal ayant reçu de l'eau distillée à 10 mL/kg ; T.Neg = témoin négatif ayant reçu de l'eau distillée à 10 mL/kg ; Diaz = groupe ayant reçu le diazépam 3 mg/kg ; CM 112, CM 223, CM 446 = Groupes traités avec l'extrait aux doses de 112, 223 et 446 mg/kg.

III.1.3 Effets de l'extrait hydro-méthanolique des fruits de *Citrus medica* sur quelques paramètres neurochimiques du cortex préfrontal et l'hippocampe

◆ Effets de l'extrait hydro-méthanolique des fruits de *Citrus medica* sur la neurotransmission GABAergique

La figure 17 indique que l'éthanol a entraîné une diminution significative de la concentration de GABA dans le cortex préfrontal de 48 % ($p < 0,01$). L'extrait, a augmenté de façon significative la concentration de GABA de 70 % ($p < 0,001$), 45 % ($p < 0,01$) et 81 % ($p < 0,001$) dans le cortex préfrontal comparativement au témoin négatif. Dans l'hippocampe, l'éthanol a entraîné une diminution significative de GABA de 73 % ($p < 0,001$) du témoin négatif par rapport au témoin normal. L'extrait a augmenté de 59 % ($p < 0,001$), 57 % ($p < 0,001$) et 43 % ($p < 0,05$) respectivement, en comparaison avec le témoin négatif. Le diazépam a entraîné une augmentation de la concentration de GABA de 64 % ($p < 0,001$) dans l'hippocampe par rapport au témoin négatif.

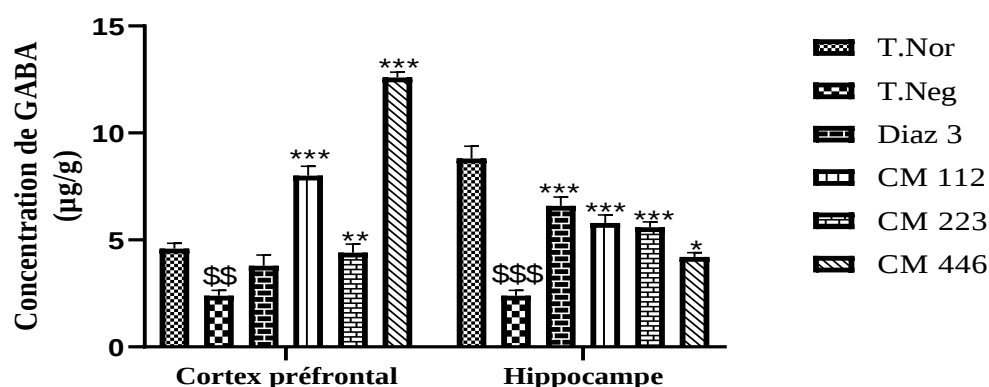


Figure 16 : Effets de l'extrait hydro-méthanolique des fruits de *Citrus medica* sur la concentration de GABA dans le cortex préfrontal et l'hippocampe.

Chaque barre représente la moyenne $\pm$ ESM, $n = 5$. \$\$ $p < 0,01$ et \$\$\$ $p < 0,001$, différence significative par rapport au témoin normal. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, différence significative par rapport au témoin négatif. T.Nor = témoin normal ayant reçu de l'eau distillée à 10 mL/kg ; T.Neg = témoin négatif ayant reçu de l'eau distillée à 10 mL/kg ; Diaz = groupe ayant reçu le diazépam 3mg/kg ; CM 112, CM 223 et CM 446 = Groupes traités avec l'extrait aux doses de 112, 223 et 446 mg/kg.

◆ Effets de l'extrait hydro-méthanolique des fruits de *Citrus medica* sur la neurotransmission sérotoninergique

La figure 18 présente les effets de l'extrait hydro-méthanolique de *Citrus medica* sur la concentration de sérotonine. Il en ressort que l'éthanol a entraîné une diminution de la concentration de sérotonine de 55 % ($p < 0,001$) dans l'hippocampe du témoin négatif par rapport au témoin normal. Dans le cortex préfrontal par contre, la baisse de la contraction de sérotonine était non significative. L'extrait aux doses de 112 et 223 mg/kg a entraîné une augmentation de la concentration de sérotonine de 22 % ($p < 0,001$) et 39 % ($p < 0,001$) respectivement dans le cortex préfrontal par rapport au témoin négatif. Dans l'hippocampe, l'extrait a augmenté la concentration sérotonine de 48 % ($p < 0,001$) à la dose 112 mg/kg et de 52 % ($p < 0,001$) pour les doses 223 mg/kg et 446 mg/kg en comparaison au témoin négatif. Le diazépam a également augmenté de 55 % ($p < 0,001$) la concentration de sérotonine dans l'hippocampe en comparaison au témoin négatif alors que cette même variation n'a pas été significative dans le cortex préfrontal.

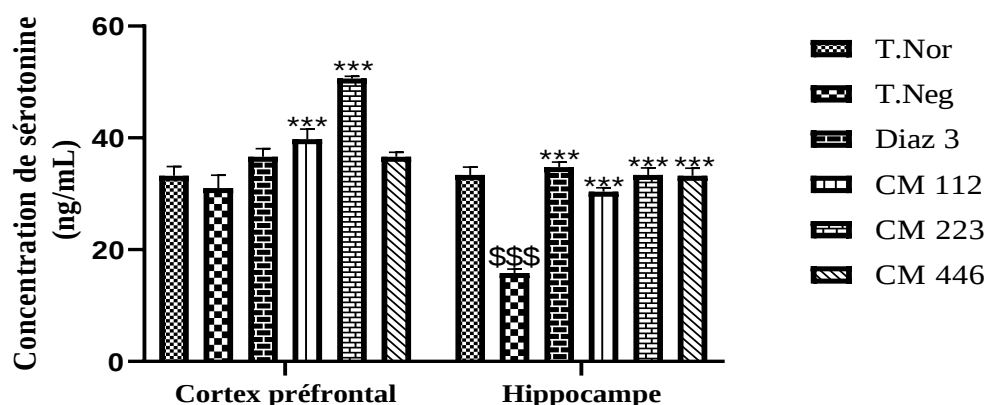


Figure 17 : Effets de l'extrait hydro-méthanolique des fruits de *Citrus medica* sur la concentration de sérotonine dans le cortex préfrontal et l'hippocampe

Chaque barre représente la moyenne $\pm$ ESM, $n = 5$. \$\$\$ $p < 0,001$, différence significative par rapport au témoin normal., *** $P < 0,001$, différence significative par rapport au témoin négatif. T.Nor = témoin normal ayant reçu de l'eau distillée à 10 mL/kg ; T.Neg = témoin négatif ayant reçu de l'eau distillée à 10 mL/kg ; Diaz = groupe ayant reçu le diazépam 3 mg/kg ; CM 112, CM 223, CM 446 = Groupes traités avec l'extrait aux doses de 112, 223 et 446 mg/kg.

♦ Effets de l'extrait hydro-méthanolique des fruits de *Citrus medica* sur la neurotransmission dopaminergique

La figure 19 présente les effets de l'extrait hydro-méthanolique des fruits de *Citrus medica* sur la concentration de la dopamine dans le cortex préfrontal et l'hippocampe. Il en ressort que, l'administration chronique de l'éthanol a entraîné une augmentation de la concentration de dopamine de 33 % ($p < 0,001$) dans le cortex préfrontal chez le témoin négatif en comparaison au témoin normal. Cette variation était non significative dans l'hippocampe. L'extrait a entraîné une diminution significative de la concentration de dopamine dans le cortex préfrontal de 50 % ($p < 0,001$) pour les doses 112 mg/kg et 446 mg/kg et de 72 % ($p < 0,001$) pour la dose 223 mg/kg. Par contre, dans l'hippocampe, il a été constaté une augmentations de la concentration de dopamine de 46 % ($p < 0,001$), 36 % ($p < 0,001$) et 28 % ($p < 0,001$) pour les doses de 112, 233 et 446 mg/kg respectivement en comparaison au témoin négatif. Pour le rats ayant reçu le diazépam, il a été constaté une diminution significative de la concentration de dopamine dans le cortex préfrontal de 27 % ($p < 0,001$) tandis qu'elle a significativement augmentée dans l'hippocampe par rapport au témoin négatif.

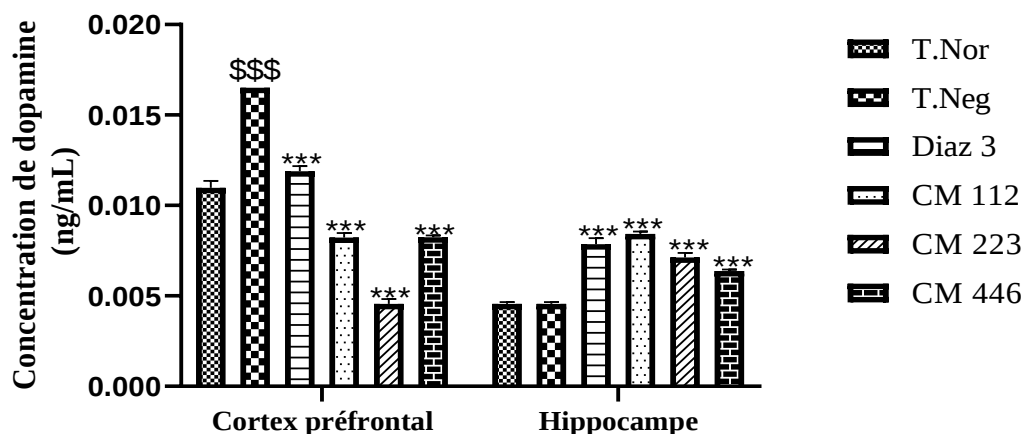


Figure 18 : Effets de l'extrait hydro-méthanolique des fruits de *Citrus medica* sur la concentration de dopamine dans le cortex préfrontal et l'hippocampe

Chaque barre représente la moyenne $\pm$ ESM, $n = 5$ \$\$\$ $p < 0,001$, différence significative par rapport au témoin normal. *** $P < 0,001$, différence significative par rapport au témoin négatif. T.Nor = témoin normal ayant reçu de l'eau distillée à 10 mL/kg ; T.Neg = témoin négatif ayant reçu de l'eau distillée à 10 mL/kg ; Diaz = groupe ayant reçu le diazépam 3 mg/kg ; CM 112, CM 223 et CM 446 = Groupes traités avec l'extrait aux doses de 112, 223 et 446 mg/kg.

III.1.4. Effets de l'extrait hydro-méthanolique des fruits de *Citrus medica* sur le stress oxydant dans le cortex préfrontal et l'hippocampe

◆ Effets de l'extrait hydro-méthanolique des fruits de *Citrus medica* sur la concentration du malondialdéhyde

La figure 20 présente les effets de l'extrait hydro-méthanolique des fruits de *Citrus medica* sur la concentration du malondialdéhyde. Il en ressort que l'éthanol a augmenté la concentration du malondialdéhyde (MDA) dans le cortex préfrontal et l'hippocampe de 57 % ($p < 0,001$) et 36 % ($p < 0,001$) respectivement en comparaison au témoin normal. En revanche, l'extrait a significativement diminué la concentration de MDA de 50 % ($p < 0,001$), 93 % ($p < 0,001$) et 90 % ($p < 0,001$) dans le cortex préfrontal pour les doses respectives de 112, 223 et 446 mg/kg. De même cette diminution a été de 45 % ($p < 0,001$) dans l'hippocampe à la dose 446 mg/kg en comparaison au témoin négatif. Chez les rats ayant reçu le diazépam, il a été observé une diminution de la concentration de MDA de 90 % ($p < 0,001$) dans le cortex préfrontal en comparaison avec le témoin négatif. Cette diminution était non significative dans l'hippocampe.

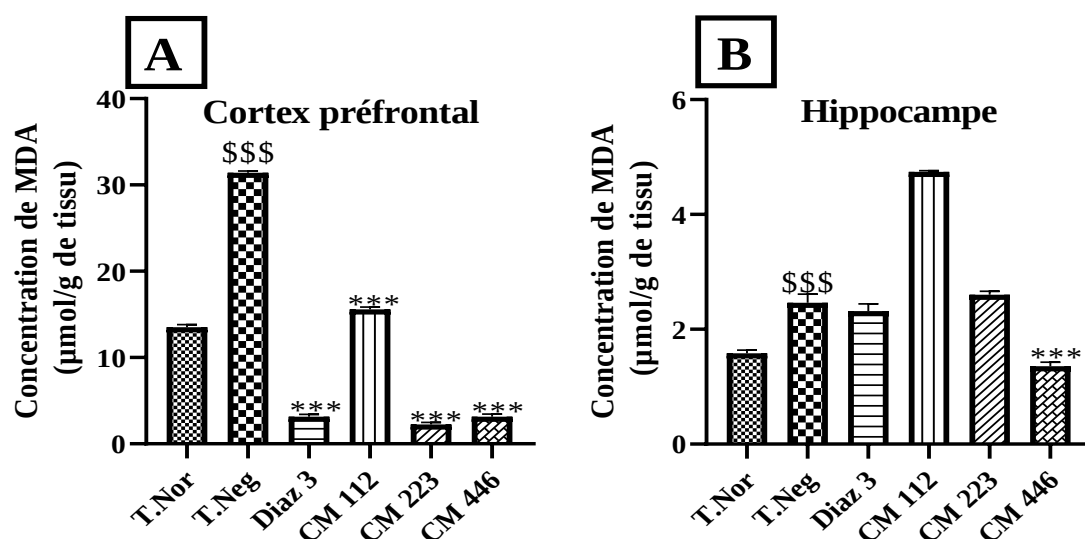


Figure 19 : Effets de l'extrait hydro-méthanolique des fruits de *Citrus medica* sur la concentration de MDA dans le cortex préfrontal et l'hippocampe

Chaque barre représente la moyenne $\pm$ ESM, $n = 5$. \$\$\$ $p < 0,001$, différence significative par rapport au témoin normal. *** $P < 0,001$, différence significative par rapport au témoin négatif. T.Nor = témoin normal ayant reçu de l'eau distillée à 10 mL/kg ; T.Neg = témoin négatif ayant reçu de l'eau distillée à 10 mL/kg ; Diaz = groupe ayant reçu le diazépam 3 mg/kg ; CM 112, CM 223, CM 446 = Groupes traités avec l'extrait aux doses de 112, 223 et 446 mg/kg.

◆ Effets de l'extrait hydro-méthanolique des fruits de *Citrus medica* sur la concentration de glutathion réduit

La figure 21 présente les effets de l'extrait hydro-méthanolique des fruits de *Citrus medica* sur la concentration du glutathion réduit (GSH). Il en ressort que, l'éthanol a entraîné une diminution de la concentration de GSH de 40 % ($p < 0,001$) et 13 % ($p < 0,001$) respectivement dans le cortex préfrontal et l'hippocampe du témoin négatif en comparaison au témoin normal. Chez les rats ayant reçu l'extrait, la concentration de GSH a significativement augmentée de 18 % ($p < 0,001$) à la dose 223 mg/kg dans le cortex préfrontal et de 12 % ($p < 0,001$) à la dose 446 mg/kg dans l'hippocampe en comparaison au témoin négatif.

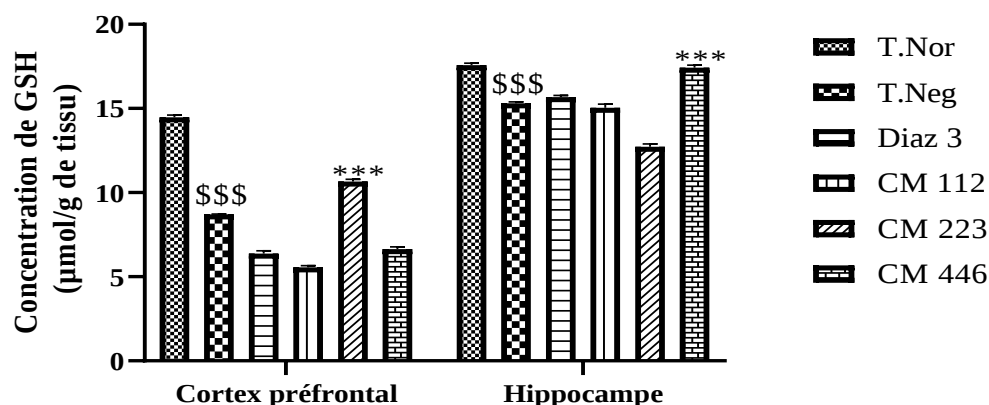


Figure 20 : Effets de l'extrait hydro-méthanolique des fruits de *Citrus medica* sur la concentration de GSH dans le cortex préfrontal et l'hippocampe

Chaque barre représente la moyenne $\pm$ ESM, $n = 5$. \$\$\$ $p < 0,001$, différence significative par rapport au témoin normal ; *** $P < 0,001$, différence significative par rapport au témoin négatif. T.Nor = témoin normal ayant reçu de l'eau distillée à 10 mL/kg ; T.Neg = témoin négatif ayant reçu de l'eau distillée à 10 mL/kg ; Diaz = groupe ayant reçu le diazépam 3 mg/kg ; CM 112, CM 223 et CM 446 = Groupes traités avec l'extrait aux doses de 112, 223 et 446 mg/kg.

◆ Effets de l'extrait hydro-méthanolique des fruits de *Citrus medica* sur l'activité de superoxyde dismutase

La figure 22 présente les effets de l'extrait hydro-méthanolique des fruits de *Citrus medica* sur l'activité de la super oxyde dismutase (SOD). Il en ressort que l'administration chronique de l'éthanol n'a pas affecté significativement l'activité de cette enzyme. L'extrait ainsi que le diazépam administré dans les mêmes conditions, n'ont pas affecté significativement l'activité de la SOD.

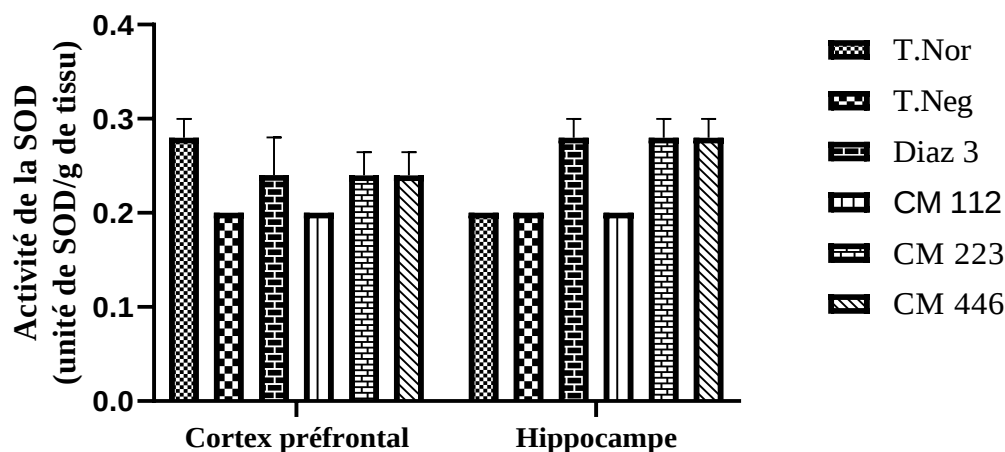


Figure 21 : Effets de l'extrait hydro-méthanolique des fruits de *Citrus medica* sur l'activité de SOD dans le cortex préfrontal et l'hippocampe

Chaque barre représente la moyenne $\pm$ ESM, $n=5$. T.Nor = témoin normal ayant reçu de l'eau distillée à 10 mL/kg ; T.Neg = témoin négatif ayant reçu de l'eau distillée à 10 mL/kg ; Diaz = groupe ayant reçu le diazépam 3 mg/kg ; CM 112, CM 223, CM 446= Groupes traités avec l'extrait aux doses de 112, 223 et 446 mg/kg.

III.1.5 Effets de l'extrait hydro-méthanolique des fruits de *Citrus medica* sur la microstructure du cortex préfrontal et l'hippocampe

Les figures 23, 24 et 25 présentent les effets de l'extrait hydro-méthanolique des fruits de *Citrus medica* sur les altérations histologiques. Il en ressort que l'administration chronique de l'éthanol a entraîné des altérations des tissus du cortex préfrontal et l'hippocampe des rats du témoin négatif en comparaison au témoin normal. Ces altérations sont marquées d'une part une diminution de la densité cellulaire due une perte des neurones. D'autre part elles sont marquées par la présence des grains pycnotiques et des noyaux condensés indiquant la mort ou la dégénérescence des neurones. Chez les rats ayant reçu l'extrait aux doses de 112 et 223 mg/kg, il a été observé la présence de quelques neurones dégénérés dans le cortex préfrontal et l'hippocampe. Le groupe ayant reçu l'extrait à la dose de 446 mg/kg, la structure du cortex préfrontal et l'hippocampe est semblable à celle du témoin normal. Chez les rats ayant reçu le diazépam, la structure du cortex préfrontal et l'hippocampe est aussi semblable à celle du témoin normal.

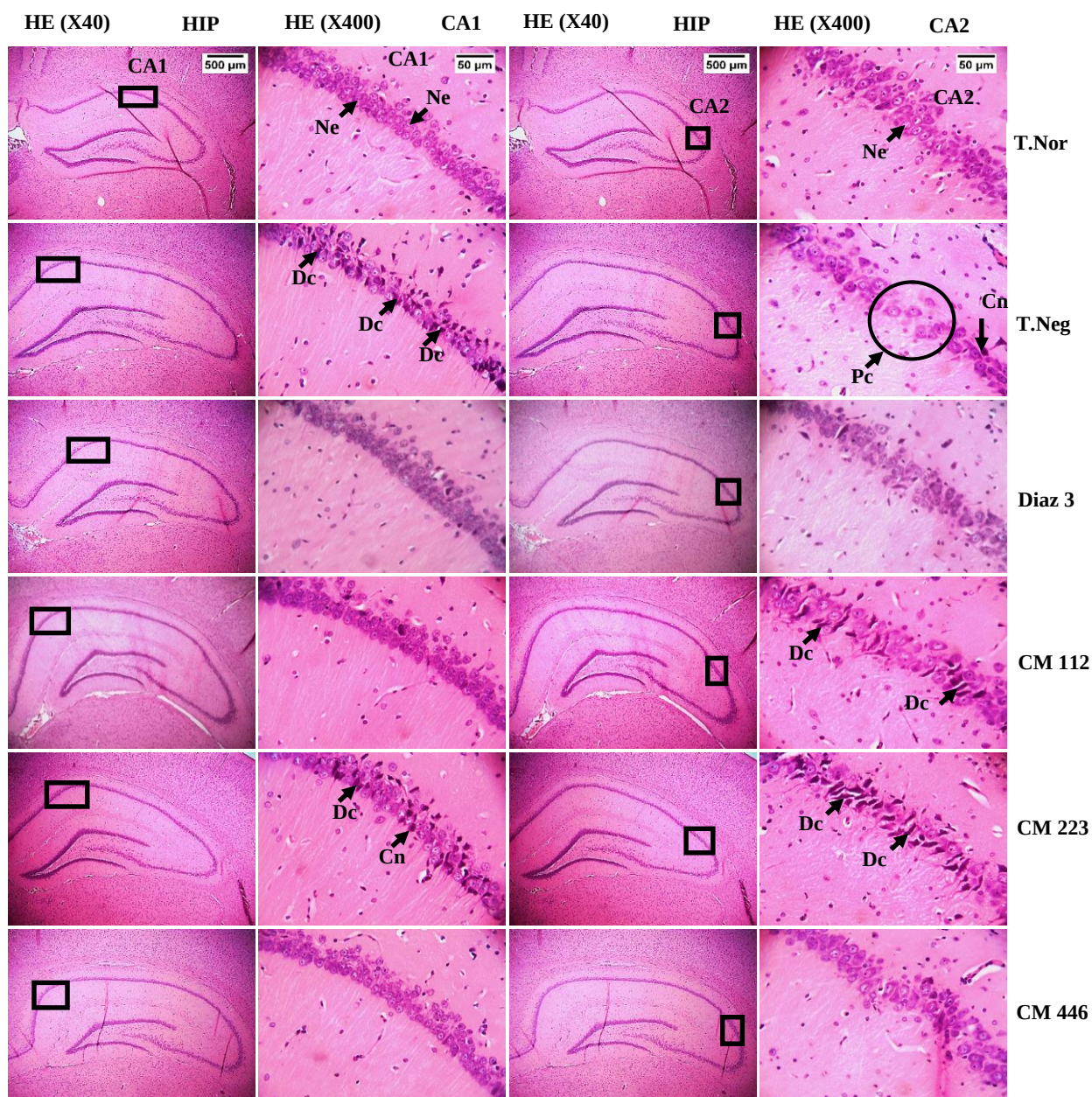


Figure 22: Micrographie de la zone CA1 et CA2 de l'hippocampe.

T.Nor = témoin normal ayant reçu de l'eau distillée à 10 mL/kg ; T.Neg = témoin négatif ayant reçu de l'eau distillée à 10 mL/kg ; Diaz = groupe ayant reçu le diazépam 3mg/kg ; CM 112, CM 223 et CM 446 = Groupes traités avec l'extrait aux doses de 112, 223 et 446 mg/kg. Ne = Neurone sain ; Cn = Cellule nécrosée ; Dc = Dégénérescence cellulaire ; Pc = Perte cellulaire, Vc = vacuole, HIP = hippocampe ; HE = Hématoxyline-éosine

III.1.6 Effets de l'extrait hydro-méthanolique des fruits de *Citrus medica* sur le nombre de neurones viables dans la zone CA1, CA3 et du gyrus denté de l'hippocampe ainsi que du cortex préfrontal

Le tableau V présente les effets de l'extrait hydro-méthanolique des fruits *Citrus medica* sur le nombre de neurones viables de la zone CA1, CA3 et du gyrus denté de l'hippocampe ainsi que cortex préfrontal. Il en ressort que l'éthanol a entraîné des pertes de neurones de 59 % dans la zone CA1 et le cortex préfrontal ; de 20 et 27 % dans la zone CA3 et le gyrus denté de l'hippocampe du témoin négatif en comparaison avec le témoin normal. L'extrait hydro-méthanolique des fruits de *Citrus medica* a diminué la perte de neurones de 37 % dans la zone CA1 à la dose 112 mg /kg en comparaison au témoin négatif. A la dose 223 mg/kg, l'extrait a diminué la perte des neurones de 26, 32 et 38 % dans les zones CA1, GD et CP respectivement comparé au témoin négatif. A la dose 446 mg/kg, l'extrait hydro-méthanolique des fruits de *Citrus medica* a diminué la perte de neurones de 58, 14,16 et 50 % dans les zones CA1, CA3, GD, et CP respectivement comparé au témoin négatif. En ce qui concerne les rats traités avec du diazépam, il a été constaté une diminution significative de la perte de neurones de 58, 19, 30 et 64 % dans les zones CA1, CA3, GD, et CP respectivement.

Tableau V : Effets de l'extrait hydro-méthanolique des fruits de *Citrus medica* sur le nombre de neurones viables de la zone CA1, CA3 et du gyrus denté de l'hippocampe ainsi que du cortex préfrontal

	CA1	CA3	GD	CP
T.Nor	113,50 ± 2,95	107,60 ± 1,50	416,80 ± 2,59	165,83 ± 2,25
T.Neg	46,50 ± 0,86\$\$\$	85,60 ± 2,50\$\$\$	304,20 ± 3,46\$\$\$	67,60 ± 1,20\$\$\$
Diaz 3	110,50 ± 0,50***	105,80 ± 2,98***	437,20 ± 2,35***	186,00 ± 2,21***
CM 112	74,25 ± 3,56***	59,80 ± 2,22	311,40 ± 3,91	58,40 ± 2,22
CM 223	63,00 ± 3,18**	80,40 ± 2,27	448,00 ± 2,81***	108,60 ± 2,06***
CM 446	110,67 ± 2,81***	99,50 ± 3,37**	361,83 ± 2,65***	136,60 ± 3,04***

Chaque valeur représente la moyenne ± ESM, n =7. \$\$\$p < 0,001, différence significative par rapport au témoin normal ; **P < 0,01 ; ***P < 0,001, différence significative par rapport au témoin négatif. T.Nor = témoin normal ayant reçu de l'eau distillée à 10 mL/kg ; T.Neg = témoin négatif ayant reçu de l'eau distillée à 10 mL/kg ; Diaz = groupe ayant reçu le diazépam 3 mg/kg ; CM 112, CM223, CM 446 = Groupes traités avec l'extrait aux doses de 112, 223 et 446 mg/kg. GD = Gyrus denté ; CP = Cortex préfrontal.

III.2 Discussion

Selon l'Organisation mondiale de la santé, l'addiction est un ensemble de phénomènes comportementaux, cognitifs et physiologiques. Elle survient à la suite d'une consommation répétée d'une substance psychoactive associée à un désir puissant de reprendre la substance (Dupont et Naassila, 2016). Elle se manifeste par une difficulté à contrôler la consommation, une poursuite de la consommation malgré les conséquences nocives, un désinvestissement progressif des autres activités et obligations au profit de cette substance, une tolérance accrue et parfois un syndrome de sevrage physique (Dupont et Nassila, 2016).

La présente étude visait à évaluer les effets de l'extrait hydro-méthanolique des fruits de *Citrus medica* sur un modèle d'addiction induit à l'éthanol chez le rat. Il en ressort que l'administration quotidienne par voie intrapéritonéale de l'éthanol chez les rats a entraîné chez ces derniers l'apparition de l'anxiété. L'administration de l'extrait hydro-méthanolique des fruits de *Citrus medica* a significativement inversé le comportement des rats dans ces dispositifs. Ces résultats corroborent ceux obtenus par Kandeda *et al.* (2022) qui ont observés des variations similaires dans ces paradigmes au cours d'un modèle d'anxiété au Kaïnate. En effet, nous avons observé chez les rats ayant reçu l'extrait hydro-méthanolique des fruits de *Citrus medica* une augmentation de la concentration de GABA et de sérotonine dans le cortex préfrontal et l'hippocampe démontrant l'effet anxiolytique de l'extrait. *Citrus medica* contient des phénols, des flavonoïdes et des tanins. En effet, il a été démontré que des composés phénoliques (hyperforine et adhyperforine), des flavonoïdes et des tanins inhibent la monoamine oxydase ainsi que la recapture de la sérotonine, de la dopamine et de la noradrénaline au niveau de la fente synaptique (Tissot, 2019). De même, les flavonoïdes agiraient sur les récepteurs GABA_A (Goetz, 2021). L'ensemble de ces résultats montrent que l'extrait de *Citrus medica* aurait des effets antiaddictifs pouvant favoriser le sevrage.

L'administration de l'éthanol a entraîné une diminution de la concentration de GABA dans le cortex préfrontal et l'hippocampe du témoin négatif. L'alcool est un modulateur des récepteurs GABA_A, l'injection chronique d'éthanol entraîne une altération au niveau de la neurotransmission GABAergique par désensibilisation de ces récepteurs (Richa *et al.*, 2008). Il est de même connu que l'alcool est un antagoniste des récepteurs MNDA, sa consommation chronique entraîne une augmentation de ces récepteurs (Booth et Blow, 1993 ; Becker, 1994). Ce qui est responsable des syndromes de sevrage (anxiété et hyperactivité) relatif à une hyperactivité glutamatergique (Grover *et al.*, 1998 ; Richa *et al.*, 2007). En effet, il a été constaté que chez les rats ayant reçu l'extrait hydro-méthanolique des fruits de *Citrus medica* ont une

augmentation significative de la concentration de GABA dans le cortex préfrontal et dans l'hippocampe. Il est connu que les médicaments qui modulent l'activité des récepteurs GABA sont utilisés dans le sevrage de l'alcool (Mohamed, 2016). Les benzodiazépines, agonistes GABAergiques sont utilisées dans le sevrage de l'addiction à l'alcool, essentiellement en raison de leurs propriétés à contrebalancer les syndromes de sevrage et l'excitotoxicité (Litten et Allen, 1999). L'extrait hydro-méthanolique des fruits de *Citrus medica* contient des phénols, des flavonoïdes et des tanins. Il a été démontré que des flavonoïdes, des acides phénols, des coumarines et des phytostérols ont une action sur les systèmes GABAergique et opioïde certains de ces flavonoïdes sont des ligands pour les récepteurs aux benzodiazépines (Tissot, 2019). Ces résultats montrent que l'extrait de *Citrus medica* aurait des effets antiaddictifs en favorisant de sevrage le sevrage à l'alcool.

L'administration chronique de l'éthanol chez les rats a entraîné une diminution significative de la concentration de sérotonine dans l'hippocampe du témoin négatif. Plusieurs auteurs ont ainsi suggéré que les perturbations au niveau de la sérotonine seraient la conséquence d'un défaut de disponibilité du tryptophane, son précurseur, au niveau cérébral. Celui-ci serait en effet métabolisé préférentiellement par la voie des kynurénines, suite à l'activation hépatique de la tryptophane 2,3-dioxygénase sous l'effet d'une prise aiguë d'alcool et les glucocorticoïdes (Vignau *et al.*, 2010). Selon Homberg, une réduction importante des taux de sérotonine mènerait un individu à adopter un comportement automatique, centré sur le stimulus, son cortex préfrontal n'exerçant pas son plein contrôle sur les structures sous-corticales (Homberg, 2012). Ce modèle de déficits exécutifs liés à la flexibilité cognitive s'appliquerait bien à l'impulsivité (Fineberg, *et al.*, 2010). En effet, il a été constaté une augmentation significative de la concentration de sérotonine dans le cortex préfrontal et l'hippocampe des rats ayant reçu l'extrait hydro-méthanolique des fruits de *Citrus medica*. De nombreuses études ont montré que les inhibiteurs de la recapture de la sérotonine pouvaient être une aide dans le maintien de l'abstinence et dans la réduction de la consommation d'alcool. (Belleville et Cristini, 2000). L'extrait de *Citrus medica* contient des phénols, des flavonoïdes, et des tanins. Il a été démontré que des composés phénoliques (hyperforine et adhyperforine), des flavonoïdes et des tanins inhibent la monoamine oxydase et la recapture de la sérotonine, de la dopamine et de la noradrénaline au niveau de la fente synaptique (Tissot, 2019). Ceci montre que l'extrait hydro-méthanolique des fruits de *Citrus medica* pourrait avoir des effets antiaddictifs en réduisant l'impulsivité et/ou le désir compulsif.

L'administration chronique de l'éthanol chez les rats a entraîné une augmentation significative de la concentration du MDA et une diminution de celle du GSH chez le témoin négatif. L'alcool est un antagoniste des récepteurs NMDA, la consommation chronique d'alcool entraîne une augmentation du nombre de ces récepteurs. L'hyperactivité glutamatergique favorise une entrée massive des ions calcium dans la cellule qui peut la tuer par une excitation excessive et génère des espèces réactives de l'oxygène. La production chronique des espèces réactives de l'oxygène altère le tissu par l'attaque des lipides, des glucides, des protéines et générant des produits dérivés ainsi que la diminution du système antioxydant de protection (Becker, 1994). En effet, il a été constaté une diminution significative du MDA et une augmentation significative du GSH chez les rats ayant reçu l'extrait. *Citrus medica* contient des phénols, des flavonoïdes et des tanins. Selon des études réalisées in vitro sur l'essai d'activité de piégeage des radicaux libres du 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) et sur l'essai de puissance de réduction, Mohammed *et al.* (2018) ont rapporté que les phénols et les flavonoïdes ont un pouvoir antioxydant. Ces résultats montrent que *Citrus medica* aurait des activités antioxydantes.

L'administration chronique de l'éthanol a entraîné des altérations des neurones du cortex préfrontal et de l'hippocampe des rats témoins négatifs. Ces altérations sur le plan histologique sont marquées par une diminution du nombre des neurones viables, de la densité des neurones, la présence des noyaux cellulaires condensés et des grains de pycnose. D'après Chandler *et al.* (1993), des lésions cérébrales durables pourraient également être la conséquence de syndromes de sevrage non traités, via un mécanisme d'excitotoxicité (Chandler *et al.*, 1993 ; Thomas et Morrisett, 2000). En effet, nous avons observé chez les rats ayant reçu l'extrait hydro-méthanolique des fruits de *Citrus medica* une diminution des altérations des neurones dans le cortex préfrontal et l'hippocampe. Cette activité est due aux propriétés de la plante à agir sur les radicaux libres ainsi que ses propriétés à contrebalancer l'excitotoxicité par l'augmentation de la concentration de GABA. En effet la plante contient des phénols, des flavonoïdes et des tanins. Il a été démontré que certains des phénols et les flavonoïdes ont un pouvoir antioxydant (Mohammed *et al.*, 2018) et que d'autres auraient une action sur le système GABAergique conduisant à une diminution de l'hyperexcitabilité (Tissot 2019). Ces résultats montrent que l'extrait hydro-méthanolique de *Citrus medica* pourrait avoir des effets neuroprotecteurs.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La présente étude avait pour objectif d'évaluer les effets de l'extrait hydro-méthanolique des fruits de *Citrus medica* sur un modèle d'addiction induit à l'éthanol chez le rat. Il en ressort que l'administration chronique de l'éthanol chez les rats a entraîné l'addiction par l'apparition de l'anxiété, un déséquilibre de la neuromodulation (GABA, sérotonine et dopamine), une augmentation du stress oxydant ainsi que des altérations histologiques.

Le traitement avec l'extrait hydro-méthanolique des fruits de *Citrus medica* a diminué les effets induits suite à l'administration chronique d'éthanol par :

- ◆ l'augmentation du temps et du nombre d'entrées dans les bras ouverts du labyrinthe en croix surélevé, une augmentation du nombre d'entrées et du temps passés dans le carré central de l'arène ouverte ;
- ◆ une amélioration de la neuromodulation et une diminution du stress oxydant ;
- ◆ une diminution de la perte des neurones dans le cortex préfrontal et l'hippocampe.

L'ensemble ces résultats montrent que l'extrait hydro-méthanolique des fruits de *Citrus medica* aurait des effets antiaddictifs médiés par des activités neuromodulatrices, antioxydants et neuroprotectrices.

L'étude actuelle a eu un certain nombre de limites. Cependant, nous proposons pour les études ultérieures :

- ◆ d'évaluer les effets de l'extrait hydro-méthanolique des fruits de *Citrus medica* sur dans un modèle d'impulsivité à l'éthanol chez le rat ;
- ◆ d'évaluer les de l'extrait hydro-méthanolique des fruit d *citrus medica* sur les comportement motivationnel à l'éthanol chez le rat.
- ◆ d'évaluer les effets de l'extrait hydro-méthanolique des fruits de *Citrus medica* sur d'autre marqueurs de la dépendance à l'éthanol chez le rat ;
- ◆ évaluer la toxicité de l'extrait hydro-méthanolique des fruits de *Citrus medica*.

REFERENCES

Alan RC., David N. (2004). Neuroanatomie. *Elsevier* ; P 174.

Alonso J., Angermeyer MC., Bernert S., Bruffaerts R., Brugha TS., Bryson H., de Girolamo G., de Graaf R., Demyttenaere K., Gasquet I., Haro JM., Katz SJ., Kessler RC., Kovess V., Lépine JP., Ormel J., Polidori G., Russo LJ., Vilagut G., Almansa J., Arbabzadeh-Bouchez S., Autonell J., Bernal M., Buist-Bouwman MA., Codony M., Domingo-Salvany A., Ferrer M., Joo SS., Martínez-Alonso M., Matschinger H., Mazzi F., Morgan Z., Morosini P., Palacín C., Romera B., Taub N., Vollebergh WAM. (2004). 12-Month comorbidity patterns and associated factors in Europe: Results from the European Study of the Epidemiology of Mental disorders project. *Acta Psychiatrica Scandinavica* ; 420 : 28–37.

Andrianarivelo A., Saint-Jour E., Pousinha P., Fernandez SP., Petitbon A., de Smedt-Peyrusse V., Heck N., Ortiz V., Allichon MC., Kappès V., Betuing S., Walle R., Zhu Y., Joséphine C., Bemelmans AP., Turecki G., Mechawar N., Javitch JA., Caboche J., Trifilieff P., Barik J., Vanhoutte P. (2021). Disrupting D1-NMDA or D2-NMDA receptor heteromerization prevents cocaine's rewarding effects but preserves natural reward processing. *Science Advances*; 7(43): 5970.

Andrianarivelo A., Trifilieff P., Barik J., Vanhoutte P. (2022). Interaction entre les récepteurs de la dopamine et ceux du glutamate. *Médecine/Sciences* ; 38 : 623-676.

Bardeau F. (2009). Les huiles essentielles : Découvrir les bienfaits et les vertus d'une médecine ancestrale. *Editions Lanore*; p 315.

Bardo MT., Rowlett JK., Harris MJ. (1995). Conditioned place preference using opiate and stimulant drugs: a meta-analysis. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*; 19(1):39-51

Becker H. (1994). Positive relationship between the number of prior ethanol withdrawal episodes and the severity of subsequent withdrawal seizures. *Psychopharmacology* ; 116 : 26-32.

Bordet R., Danel T. (2004) Prise en charge pharmacologique de l'addiction pharmacothérapies actuelles et perspectives thérapeutiques. *Pharmacologie* ; 18(1) : 10-15.

Botia B., Legastelois R., Houchi H., Naassila M. (2015). Basal Anxiety Negatively Correlates With Vulnerability to Ethanol-Induced Behavioral Sensitization in DBA/2J Mice: Modulation by Diazepam. *Clinical and Experimental Research* ; 39 (1) : 45-54.

- Deneau G., Yanagita T., Seevers MH.** (1969). Self-administration of psychoactive substances by the monkey. *Psychopharmacologia* ; 16:30-48.
- Diana M., Pistis M., Muntoni A., Gessa G.** (1996). Mesolimbic dopaminergic reduction outlasts ethanol withdrawal syndrome: evidence of protracted abstinence. *Neuroscience*; 71: 411-416.
- Dupont JC., Naassila M.** (2016). Une brève histoire de l'addiction. *Alcoologie et Addictologie* ; 38 (2) : 93-102
- Dyr W., McBride WJ., Lumeng L., Li TK., Murphy JM.** (1993). Effects of D1 and D2 dopamine receptor agents on ethanol consumption in the high-alcohol-drinking (HAD) line of rats. *Alcohol*; 10: 207-219
- Ellman GL., Burkhalter A., Ladoux J.** (1961). A fluorometric method for the determination of hippuric acid. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*; 57: 813-818.
- Folin O., Ciocalteu V.** (1927). On tyrosin and tryptohane Determination in proteins. *journal of Biology and Chemistry*; 73: 627-650.
- Geyer MA., Markou A.** (1995). Animal models of psychiatric disorders. In: *Psychopharmacology: The fourth Generation of Progress* ; 787: 798.
- Goetz P.** (2021). Phytothérapie du sevrage des psychotropes. *Phytothérapie clinique* ; 19 : 33-35.
- Goodman A.** (1990). Addiction: definition and implications. *British Journal of Addiction*; 85: 1403-1411
- Gorwood P., Adès J., Lejoyeux M.** (1997). Facteurs génétiques de l'alcoolisme. In : Alcoolisme et psychiatrie. *Collection Médecine et Psychothérapie* ; 25-40.
- Gorwood P., Lanfumey L., Hamon M.** (2004). Polymorphismes géniques de marqueurs sérotoninergiques et alcoolodépendance. *Medecine/Sciences*; 20 : 1132-1140.
- Grant K., Valverius P., Hudspith M., Tabakoff B.** (1990). Ethanol withdrawal seizures and the NMDA receptor complex. *European Journal of Pharmacology*; 176: 289-296
- Grover CA., Wallace KA., Lindberg SA., Frye GD.** (1998). Ethanol inhibition of NMDA currents in acutely dissociated medial septum/diagonal band neurons from ethanol dependent rats. *Brain Research*; 782: 43-52.

- Hill AS., Sahay A., Hen R.** (2015). Increasing Adult Hippocampal Neurogenesis is Sufficient to Reduce Anxiety and Depression-Like Behaviors. *Neuropsychopharmacology* ; 40 : 2368-2378.
- Jacobson L.** (2014) Hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis: neuropsychiatric aspects. *Comprehensive Physiology*; 4 (2): 715-753
- Jean-François V., Alain S., Marie-Claude LR., François B., Leonor M.** (2011). Neurophysiologie : de la physiologie à l'exploration fonctionnelle. *Elsevier Masson* ; p 276.
- Kandeda KA., Lewale L., Djeuzong E., Kouamouo J., Dimo T.** (2022). An aqueous extract of *Khaya senegalensis* (Desv.) A. Juss. (Meliaceae) prevents seizures and reduces anxiety in kainate-treated rats: modulation of GABA neurotransmission, oxidative stress, and neuronal loss in the hippocampus. *Heliyon* ; 8 : e09549
- Kosten TR., George TP., Kosten TA.** (2002). The potential of dopamine agonists in drug addiction. *Expert Opinion on Investigational Drugs*; 11 (4): 491-499.
- Lee FJS., Xue S., Pei L., Vukusic B., Chéry N., Wang Y., Wang YT., Niznik HB., Yu X., Liu F.** (2002). Dual regulation of NMDA receptor functions by direct protein-protein interactions with the dopamine D1 receptor. *Cell*; 111: 219-30.
- Lingford-Hughes AR., Davies SJ., McIver S., Williams TM., Daglish MR., Nutt DJ.** (2003). Addiction. *British Medical Bulletin*; 65: 209-231.
- Litten RZ., Allen JP.** (1999). Medications for alcohol, illicit drug, and tobacco dependence. An update of research findings. *Journal of Substance Abuse Treatment*; 16: 105-117.
- Liu XY., Chu XP., Mao LM., Wang M., Lan HX., Li MH., Zhang GC., Parelkar NK., Fibuch EE., Haines M., Neve KA., Liu F., Xiong ZG., Wang JQ.** (2006). Modulation of D2R/NR2B interactions in response to cocaine. *Neuron*; 52: 897-909.
- Misslin R., goetz P., mazars G.** (2004). Plantes neurotropes : Modes d'action de certaines plantes médicinales à propriétés neurotropes. *Ethnopharmacologia* ; (34) : 8-12.
- Mohamed AG.** (2016). Du nouveau dans le traitement de l'alcoolisme. *Médecine Générale* ; 959 : 286-287

- Mohamed M., Raoua J., Walid K., Yassine C., Hamadi F.** (2018). *Citrus limon* de Tunisie : Phytochimie et Propriétés physicochimiques et activités biologiques. *Hindawi* ; 1-10.
- Naassila M.** (2013). Alcohol and Rats. *Biological Research on Addiction*; 2 : 1-11.
- Navnidhi C., Ragné K., Sandeep J., Pawan G., Yogest G., Anil P.** (2018). *Citrus medica*: nutritional, phytochemical composition and health benefits food. *Food & Function*; 9: 1978-1992.
- Nutt DJ.** (2005). Overview of diagnosis and drug treatments of anxiety disorders. *CNS Spectrums*; 10: 49-54.
- Nutt DJ., Ballenger JC.** (2003). Anxiety disorders. Chichester, *Jonh Wiley and Sons*; 433-459;
- Nutt DJ., Malizia AL.** (2001) New insights into the role of the GABA(A)-benzodiazepine receptor in psychiatric disorder. *British Journal of Psychiatry* ; 179 : 390-396.
- OMS** (2020). Système mondial d'information sur l'alcool et la santé ; GISAH
- OMS** (2022). Alcool : ses méfaits. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/alcohol>
- OMS.** (1975). Comité OMS d'experts de la pharmacodépendance. Genève.
- Pascoli V., Terrier J., Lüscher C.** (2016). Addiction par stimulation des neurones dopaminergiques mésolimbiques. *Médecine/Science* ; 32 : 692–696
- Paskulin R.** (2009). Iboga : entre mythe et réalité. *Phytothérapie* ; 6 : 1-5.
- Philip G., Laurence L., Michel H.** (2004). Polymorphismes géniques de marqueurs sérotoninergiques et alcoolodépendance. *Medecine/Sciences*; 20: 1132-1140
- Ramful D., Bahorun T., Bourdon E., Tarnus E., Aruoma OI.** (2010). Bioactive phenolics and antioxidant propensity of flavedo extracts of Mauritian citrus fruits: Potential prophylactic ingredients for functional foods application. *Toxicology* ; 278 :75- 87.
- Richa S., Kazour F., Baddoura C.** (2008). Comorbidité des troubles anxieux avec l'alcoolisme. *Annales Médico-Psychologiques* ; 427 : 427–430.
- Robinson JA., Sareen J., Cox BJ., et Bolton JM.** (2009). Correlates of selfmedication for anxiety disorders: results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. *Journal of Nervous and Mental Disease*; 197(12), 873-878.

- Rossetti ZL., Hmaidan Y., Gessa GL.** (1992). Marked inhibition of mesolimbic dopamine release: A common feature of ethanol, morphine, cocaine and amphetamine abstinence in rats. *European Journal of Pharmacology* ; 221 : 227-261.
- Salim S., Chugh G., Asghar M.** (2012) Inflammation in anxiety. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*; 88, 1-25.
- Seo C., Guru A., Jin M., Ito B., Sleezer B., Ho YY., Wang E., Boada C., Krupa NA., Kullakanda DS., Shen C., Warden MR.** (2019). Intense threat switches dorsal raphe serotonin neurons to a paradoxical operational mode. *Science* ; 363: 538-542.
- Shin JW., Seol IC., Son CG.** (2010). Interpretation of Animal Dose and Human Equivalent Dose for Drug Development. *The Journal of Korean Oriental Medicine*; 31(3):1–7.
- Sora I., Hall F., Andrews A., Itokawa M., Li XF., Wei HB., Wichems C., Lesch KP., Murphy DL., Uhl GR.** (2001). Molecular mechanisms of cocaine reward: combined dopamine and serotonin transporter knockouts eliminate cocaine place preference. *Proceedings of the National Academy of Sciences* ; 98 : 5300-5305.
- Spadone C., Glikman M.** (2008). L'étifoxine : un nouveau regard sur le récepteur GABA et l'anxiété ; *Encéphale* ; 34 (1) : 1-12
- Stein MB., Chartier MJ., Hazen AL.** (1998). A direct-interview family study of generalized social-phobia. *The American Journal of Psychiatry* ;155 :90–97.
- Sulzer D., Joyce MP., Lin L., Geldwert D., Haber SN., Hattori T., Rayport S.** (1998). Dopamine neurons make glutamatergic synapses in vitro. *Journal of Neuroscience*; 18: 4588-4602.
- Thibault D., Kortleven C., Fasano C., Dal Bo G., Trudeau LE.** (2010). Découvertes récentes sur la fonction et la plasticité des voies dopaminergiques du cerveau. *Médecine/Sciences*; 26: 165-235
- Thomas M., Morrisett R.** (2000). Dynamics of NMDAR-mediated neurotoxicity during chronic ethanol exposure and withdrawal. *Neuropharmacology*; 39: 218-226
- Tissot O.** (2019). Prise en charge de l'anxiété par la phytothérapie. *Actualités Pharmaceutiques* ; 58 (590) : 27-28.

- Trudeau LE.** (2004). Glutamate co-transmission as an emerging concept in monoamine neuron function. *Journal Psychiatry and Neuroscience*; 29: 296-310.
- Tsai G., Ragan P., Chang R., Chen S., Linnoila M., Coyle J.** (1998). Increased glutamatergic neurotransmission and oxidative stress after alcohol withdrawal. *The American Journal of Psychiatry* ; 155: 726-732
- Vignau J., Soichot M., Imbenotte M., Jacquemont MC., Danel T., Vandamme M., Lhermitte M., Allorge D.** (2010). Impact of Tryptophan Metabolism on the Vulnerability to Alcohol-Related Blackouts and Violent Impulsive Behaviours. *Alcohol and Alcoholism* ; 45(1) :79-88.
- West ED., Dally PJ.** (1959). Effects of iproniazid in depressive syndromes. *British Medical Journal* ;1 (5136): 1491.
- Wilbur KM., Bernheim F., Shapiro OW.** (1949). The thiobarbituric acid reagent as a test for the oxidation of unsaturated fatty acids by various agents. *Archives of Biochemistry*; 24(2): 305-318.
- Willey AR., Anderson RI., Morales M., Ramirez RL., Spear LP.** (2012). Effects of ethanol administration on corticosterone levels in adolescent and adult rats. *Alcohol*; 46 :29–36.
- Wilson CR., Gaffan D., Browning PG., Baxter MG.** (2010). Functional localization within the prefrontal cortex: missing the forest for the trees? *Trends in Neurosciences* ; 33 (12): 533-540.