

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA – Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-chimique
Filière : Sciences Biologiques
Option : Biochimie Fondamentale



Réf :

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme
MASTER

Thème

**Activité hépato-protectrice des extraits bruts et encapsuler de
l'écorce et des feuilles de *Fraxinus angustifolia* des souris
intoxiquées par le paracétamol.**

Présenté par :

ASKEUR Ghilas & IGGUI Thilelli

Soutenu le : **27 juin 2023**

Devant le jury, composé de :

M^{me} AIT ALI D.	MCB	Présidente
M^{me} MOULAOUI K.	MCB	Encadreur
M^{me} BOUDJOU S.	MCB	Examinatrice

Année universitaire : 2022/2023

Remerciements

Pour commencer, parce qu'il existe toujours un début à tout, nous remercions Dieu, le tout puissant, qui nous a donné la force, la patience, ainsi que le courage pour dépasser toutes les difficultés.

Nous tenons à remercier chaleureusement notre encadrante Mme MOULAOUI. K, de sa disponibilité, son aide et son soutien.

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury, Mme Ait Ali. D, d'avoir accepté de présider ce jury et Mme BOUDJOU.S d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Nous exprimons nos plus sincères remerciements à tous les membres du laboratoire génétique de bloc 09 faculté SNV à l'université de Bejaia, Mr ZAIDI Sidi Ali et les doctorantes KADI. R et SAIDANI. N, et toute l'équipe de laboratoire sans oublier personne.

Nous n'oublions pas de remercier vivement les membres de laboratoire médecin (laboratoire génie biologique des cancers) de l'université de Bejaia et l'équipe de laboratoire d'analyses médicales à Ahnif-Bouira.

Enfin nous remercions tous ce qui, de près ou de loin, a contribué à la réalisation de ce travail.

Dédicace

« On devient comédien sans le vouloir, et charlatan sans le savoir », Henri Frédéric Amiel.

A los que me son queridos, mí papà, mí mamá y mí

hermana Dehía.

Thilellí.

Dédicace

J'ai avec plaisir dédié ce modeste travail à :

Mes chers parents mon père et ma chère mère, qui ont sacrifiés leur vie pour notre réussite, et qui ils ont été toujours à mon côté dans toutes conditions et dans tout moments.

Ma chers p'tite sœur, je te souhaite tout le bonheur et que de la réussite et dans ton avenir à l'université et que de succès dans l'examen de Baccalauréat que en train d'attendre avec impatiemment votre succès tous les deux, toi et notre frère

Mon cher frère, mon bras droit je te souhaite d'obtenir ton Bac et de continuer ton objectif et de réussir dans tes études supérieurs, je suis toujours à ton côté, tu vas me trouver toujours dans des situations difficile comme premier sauveteur.

Pour leurs affection, compréhension et patience tous simplement je voudrais vous dire je vous aime de tout mon cœur.

Ma chère grand-mère de coté de ma mère, je te souhaite une Lange vie et que dieu vous protège Inchallah, le jour que je vous ai promis est arrivé, et je vous promets le meilleur avenir qui nous attend tous inchallah. Ton petit fils préféré.

Mon cher grand père à côté de mon père, le jour que vous attendez vous et ma grand-mère avec impatience est arrivé, il aît arrivé en fin, ce dédicace je le dédié pour toi que dieu vous

*protège, et pour elle dans le vaste paraît, paix à ton âme chère
grand-mère.*

Votre petit fils

Toute la famille ASKEUR et SAIDANI.

Et spécialement mes chers amis(es), et collègues, je vous aime beaucoup, on a passés que des bonnes moments ensemble, au jourd'hui c'est avec un grand honneur que je vous faire ce dédicace plus spéciale, je voudrais exprimer mes sentiments envers vous, vous étiez les meilleurs collègues et amis (es) que j'ai connue, nous étions la meilleure promotion de toute la faculté, peut-être de toutes l'université.

Ghilas

Remerciements	
Dédicace	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	

Table des matières

Introduction	1
I Chapitre I : Synthèse bibliographique	2
I.1 <i>Fraxinus Angustifolia</i>	2
I.1.1 Le genre <i>Fraxinus</i>	2
I.1.2 Espèce <i>Fraxinus angustifolia</i>	2
I.1.3 Description botanique	2
I.1.4 Répartition géographique	3
I.1.5 Nom vernaculaire	4
I.1.6 La systématique de l'espèce	4
I.1.7 Utilisation traditionnelle.....	5
I.1.8 Activité biologique de <i>Fraxinus Angustifolia</i>	6
I.1.9 Investigation phytochimique	6
I.1.10 Mode d'action de quelques métabolites secondaires	9
I.2 Nanoparticules et l'encapsulation du principe actif	10
I.2.1 L'encapsulation	10
I.3 Toxicité hépatique et le paracétamol	12
I.3.1 Le foie	12
I.3.2 Hépatotoxicité	13

I.3.3	Le paracétamol	13
I.3.4	Mécanisme d'intoxication par le paracétamol.....	16
I.3.5	Intoxication aiguë au paracétamol.....	17
I.4	Effet des polyphénols contre l'hépatotoxicité induite par le paracétamol.....	18
I.4.1	Principales lésions hépatique	18
II	Chapitre II : Matériel et méthodes.....	20
II.1	Matériel.....	20
II.1.1	Matériel végétal	20
II.1.2	Matériel animal	20
II.2	Méthodes	22
II.2.1	Extraction des composés phénoliques	22
II.2.2	Dosage des composés phénoliques	23
II.2.3	L'encapsulation de principe actif par les liposomes	25
II.2.4	Évaluation in vivo de l'effet hépato-protecteur des extraits de <i>Fraxinus angustifolia</i> encapsulé et non encapsulé	25
II.2.5	Étude histologique	30
II.2.6	Étude statistique :	33
III	Chapitre III : Résultats	34
III.1	Le rendement de l'extrait	34
III.2	Teneurs en polyphénols et flavonoïde	35
III.2.1	Analyse sur microscope optique	36
III.3	Étude de l'effet hépato-protecteur des extraits de <i>F. angustifolia</i> contre la toxicité induite par le paracétamol	37
III.3.1	Changement des poids corporel	37
III.3.2	Poids relatifs des foies des souris	37
III.3.3	Effet des extraits des feuilles et d'écorce de <i>F. angustifolia</i> encapsulés ou seul sur les taux hépatiques de GSH chez des souris.....	38
III.3.4	Dosage de l'activité de MPO	39

III.3.5	Évaluation des taux sériques des transaminases (ALAT et ASAT).....	40
III.3.6	L'étude histopathologique du foie.....	41
IV	Chapitre IV : Discussion	44
V	Conclusion.....	51
	Conclusion.....	51
VI	Bibliographie.....	52
	Bibliographie.....	52
	Annexes.....	63

Liste des figures

Figure 1 : Population riveraine de <i>Fraxinus angustifolia</i> dans le sud-est du Portugal (Enderle, 2017).....	3
Figure 2 : Photographie originale correspondants aux différents constituants du frêne ; Feuilles (A) ; Écorce (B) et Fruit (C).	3
Figure 3 : Répartition des parcelles et carte de chorologie simplifiée pour <i>Fraxinus angustifolia</i> (Caudullo et Houston, 2016).....	4
Figure 4 : structures chimiques des polyphénols <i>Fraxinus Angustifolia</i> : (a) 6-O-trans-caffeoyl- β -D-glucopyranoside (Hosny, 1998 ; Kostova et Iossifova, 2007) ; b : acide l-caffeoylquinique (Falé et al., 2013) ; c : Acide 3-caffeoylquinique (acide chlorogénique) (Falé et al., 2013).	7
Figure 5 : Structure de liposome (A) (Hajjali, 2018), composition biochimique et la structure de la bicouche lipidique des nanoliposomes (B) (Mozafari, 2010).....	12
Figure 6 : structures des autres nanoparticules utilisées ; les nanoémulsions (A), les misselles polymères (B), les nanoparticules de lipides solides (C) (Shafiq et al., 2007 ; Mozafari, 2010).	12
Figure 7 : Structure chimique du paracétamol (Dirad, 2009).....	14
Figure 8 : Métabolisme du paracétamol (Saad Albichr, Hantson, 2017).	17
Figure 9 : Localisation de la commune Amizour – Bejaia – Algérie par Google Earth.	20
Figure 10 : Souris Albinos B6 "Mus musculus C57L/6J".	21
Figure 11 : Protocole expérimentale d'extraction de principe actif de <i>Fraxinus angustifolia</i>	22
Figure 12 : Extrait d'écorce (A) ; Extrait des feuilles (B) de <i>Fraxinus angustifolia</i>	23
Figure 13 : Dosage des polyphénols sur une microplaque.....	24
Figure 14 : Dosage des flavonoïdes dans une microplaque.	25
Figure 15 : Administration des extraits par voie orale (A) (gavage) ; L'injection intrapéritonéale (B).	26
Figure 16 : Sacrifice des souris et récupération du foie.	27
Figure 17 : Déshydratation par un automate de déshydratation.....	31
Figure 18 : Les étapes de l'enrobage (la mise en bloc).....	31
Figure 19 : Placement des lames dans l'étuve à T 74°C (A) ; L'émergence des lames dans xylène (B).	31
Figure 20 : Les étapes de la coloration hématoxyline éosine (H&E).	32

Figure 21 : Montage des échantillons.....	33
Figure 22 : diagramme en barre représente le taux d'extraction des deux extraits (EAE) et (EAF).....	34
Figure 23 : Structures des liposomes observés par un microscope optique à grossissement ($G \times 20$).	36
Figure 24 : poids relatifs moyen des souris chez les souris traités par les extraits d'écorce seul, feuilles seules, écorce encapsulé, feuilles encapsulés de <i>Fraxinus angustifolia</i> et liposomes. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. (n= 4), tous les groupes sont reçus une dose de 500 mg/Kg de paracétamol.	38
Figure 25 : Le taux de GSH chez les souris traités par les extraits d'écorce seul, feuilles seules, écorce encapsulé, feuilles encapsulées de <i>Fraxinus angustifolia</i> et liposome. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. (n= 4), tous les groupes sont reçus une dose de 500 mg/Kg de paracétamol.	38
Figure 26 : L'activité enzymatique de la MPO chez les souris traités par les extraits d'écorce seul, feuilles seules, écorce encapsulé, feuilles encapsulées de <i>Fraxinus angustifolia</i> et liposome. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. (n= 4), tous les groupes sont reçus une dose de 500 mg/Kg de paracétamol.....	39
Figure 27 : concentration sérique de l'enzyme ALAT chez les souris traités par les extraits d'écorce seul, feuilles seules, écorce encapsulé, feuilles encapsulés de <i>Fraxinus angustifolia</i> et liposomes. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. (n= 4), ANOVA, suivie du test de Dunette, a été utilisée pour l'analyse statistique * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ comparé au groupe contrôle, tous les groupes sont reçus une dose de 500 mg/Kg de paracétamol.	40
Figure 28 : concentration sérique de l'enzyme ASAT chez les souris traités par les extraits d'écorce seul, feuilles seules, écorce encapsulé, feuilles encapsulés de <i>Fraxinus angustifolia</i> et liposomes. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. (n= 4), tous les groupes sont reçus une dose de 500 mg/Kg de paracétamol.	41
Figure 29 : les coupes histologiques du foie observées par microscope optique avec un grossissement $G \times 20$, g1 représente (le groupe traité par liposomes seuls) ; G6 représente (le groupe contrôle négatif) ; (1) dilatation de la congestion de la veine centro-logulaire (2) inflammation (3) neutrophiles (4) stéatose et nécrose.....	42
Figure 30 : Les coupes histologiques du foie observées par microscope optique avec un grossissement $G \times 20$, dont chacun représenté par son traitement G2 (écorce seul) ; G4 (écorce	

encapsulé) ; G3 (feuilles encapsulés ; G5 (feuilles seules) ; (1) cellules normales, (2) absence de stéatose et de nécrose, (3) une congestion..... 43

Liste des tableaux

Tableau I : Noms vernaculaires de <i>Fraxinus angustifolia</i>	4
Tableau II : systématique de <i>Fraxinus angustifolia</i>	5
Tableau III : Différentes coumarines trouvées dans <i>Fraxinus angustifolia</i> et leurs structure de base (Iossifovaetal., 1997; Kostova et Iossifova, 2007).....	8
Tableau IV : Taux d'extraction (%) des feuilles et d'écorce de <i>Fraxinus angustifolia</i>	34
Tableau V : Teneurs en phénols totaux et flavonoïdes et tannins dans les extraits éthanoliques d'écorce et de feuille de <i>F. angustifolia</i> . Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm SD.	35
Tableau VI : Changement des poids corporel des souris.....	37
Tableau VII : Variation de la concentration sérique du ASAT et ALAT dans le sérum des rats traités par le paracétamol (500 mg/ml) et l'extrait de la plante <i>Fraxinus Angustifolia</i>	40

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ALAT	Alanine aminotransférase
AP-1	Activator protein 1
ARE	Retinoc Acid Response Elements
ASAT	Aspartate aminotransférase
ATP	Adénosine triphosphate
BHQT	Butyl hydroquinone tertiaire
CCM	Vesbacoside, coelaroside et isoacteoside
C-fos	C-FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homologue
COX	Cyclo-oxygénase
CYP	Cytochrome
DPPC	Phosphatidyl-choline
EPK₁	Ets-like transcription factor 1
ERK₂	Extra-cellular Signal-regulated kinase 2
ERO	Espèce réactives de l'oxygène
FAE	Fraxinus angustifolia écorce
FAF	Fraxinus angustifolia feuilles
JNK	Voie C-Jun-N-terminal kinase
MAPK	Mitogen-activated protéine kinase
MPO	Myéloperoxydase
NAPQI	N-acetyl-p-benzoquinone imine
NDMA	N-méthyl D-aspartate
NO	Oxyde nitrique
PH	Potentiel hydrogène
PTPM	Pores de transition de perméabilité mitochondriale
Raf₁	Rapidly accelerated fibrosarcoma 1
SUL	Sulforaphame

Introduction

Le foie est le centre de la majorité des fonctions de l'organisme. Il a un rôle primordial dans le métabolisme des molécules endogènes et exogènes telles que la détoxification et l'élimination des xénobiotiques. Ces composés regroupent des produits naturels, des polluants de l'environnement et des médicaments comme le paracétamol (**Poirier et al., 1975**).

Le paracétamol est l'antalgique et l'antipyrétique le plus utilisé dans l'automédication. La prise de ce médicament, à long terme ou même une surdose à court terme, est accompagnée de risques de cytolyse hépatique. il est responsable d'environ de la moitié des cas d'insuffisance hépatique aiguë (**Mitchell et al., 2011**).

Par ailleurs, pendant longtemps, les remèdes naturels et surtout les plantes médicinales furent le principal, voire l'unique recours de la médecine traditionnelle. Cependant, bien que le développement de l'industrie pharmaceutique a permis à la médecine moderne de traiter un grand nombre de maladies, les plantes médicinales et les remèdes qu'on pouvait en tirer ne furent jamais totalement abandonnés et les gens ne cessèrent jamais de faire appel à la médecine traditionnelle (**Dibong, 2011 ; Hadjadj, 2019**).

D'autre part, *Fraxinus angustifolia* est une plante très répandue dans le bassin méditerranéen utilisée depuis longtemps dans la médecine traditionnelle. Reconnue en tant que source intéressante de substances biologiques actives (**Damien et Hinsinger, 2010 ; Caudullo et Houston Durrant, 2016**).

L'encapsulation de molécules d'intérêt thérapeutique est un sujet d'actualité, il permet l'émergence de nombreuses applications industrielles notamment dans le domaine pharmaceutique, lorsque ces molécules sont instables ou peu solubles, en tant que vecteurs de substances actives (**Jordanovska, 2015**).

C'est dans ce contexte que s'inscrit le présent travail dont l'objectif principal est d'encapsuler les molécules bioactives des feuilles et d'écorce de *Fraxinus angustifolia* dans des nanoparticules pour évaluer leur effet protecteur contre l'hépatotoxicité *in vivo* induite par le paracétamol.

I Chapitre I :
Synthèse
bibliographique

I.1 *Fraxinus Angustifolia*

I.1.1 Le genre *Fraxinus*

Le genre *Fraxinus* est le plus répandu de la famille des oléacées, il comprend environ 64 espèces, se produisant dans les régions tempérées et subtropicales de l'hémisphère nord, largement distribuée en Amérique du Nord et en Asie de l'Est, Il a été décrit pour la première fois par Linnaeus en 1753 (Lee et al., 2012). Le genre est monophylétique (Wallander et Albert, 2000) et unique dans les Oléacées en ayant principalement des feuilles imparipinnées relativement grandes et des samaras à une graine, la plupart des espèces sont des arbres de grande ou moyenne taille, mais certains sont des arbustes dans les zones sèches (Wallander, 2008).

I.1.2 Espèce *Fraxinus angustifolia*

Fraxinus angustifolia connue sous le nom « Frêne oxyphylle », appartient à la famille des Oleaceae, il est le seul membre de la sous-tribu *Fraxininae*, proche de la sous-tribu des Oleinae dans la tribu des Oleae (Wallander et Albert, 2000). Elle est l'une des espèces les plus abondante au nord de l'Algérie (Ayouni et al., 2016), elle est d'une importance économique, commerciale et médicinale (Kostova et Iossifova, 2007).

I.1.3 Description botanique

Le frêne oxyphylle est un arbre à feuilles caduques de taille moyenne, atteignant 40 à 45 m de hauteur et jusqu'à 1,5 m de diamètre (Figure. 1). L'écorce est grise et devient finement et profondément réticulé-fissuré, pour les plus enceins branches et les nouveaux bourgeons sont d'une couleur marron (Yildiz et Evrim, 2008). Les feuilles sont composées, disposées en groupes de 7-13, impaires-pennés, et sont minces, 3-8 cm de long et 1-1,5 cm de large, vertes brillantes et glabres (Caudullo et Houston, 2016) (Figure. 2A). La couronne est dense, irrégulière et en forme de dôme, à pousses courtes et pendantes. L'espèce est monoïque avec des inflorescences hermaphrodites de 10-30 fleurs ; cependant quelques inflorescences avec des mâles purs des fleurs peuvent apparaître (andromonoïques). Les fleurs sont pollinisées par le vent, elles se développent au début du printemps ou même en automne, sans pétales, à stigmates et anthères violets foncés. Le fruit est un samara de 3-4 cm de long (Figure. 2C), aplatie, avec une aile distale, mûrissant à la fin de l'été (Caudullo et Houston, 2016).



Figure 1 : Population riveraine de *Fraxinus angustifolia* dans le sud-est du Portugal (Enderle, 2017)



Figure 2 : Photographie originale correspondant aux différents constituants du frêne ; Feuilles (A) ; Écorce (B) et Fruit (C).

I.1.4 Répartition géographique

Le Frêne oxyphylle est un arbre dur et résilient qu'est capable de pousser dans un large éventail de types de sols et de conditions climatiques, mais il préfère un sol humide et bien drainé. En outre, il est résistant aux maladies communes des arbres et aux ravageurs tels que la chalarose du Frêne, qui affecte d'autres espèces de frênes (Wallander, 2008). *Fraxinus angustifolia* soit largement cultivé dans la plus part des parties du monde en raison de son utilité comme arbre ornemental et de travail, sa gamme natale est le centre-sud de l'Europe, le nord-est de l'Afrique jusqu'au Caucase et l'Asie mineure, représenté par une carte géographique illustré dans la figure. 3. Cette espèce de frêne a un complexe de taxon, et en raison de sa grande variété morphologique, son statut taxonomique n'est pas toujours clair. Sur la base de données moléculaire et morphologique, l'espèces divise en trois sous-espèces distinctes qui se trouvent dans des régions géographiques différentes: le frêne à feuilles

Chapitre I : Synthèse bibliographique

étroites (*Fraxinus angustifolia* sous-espèces *angustifolia*) peut être trouvé dans le sud de l'Europe et l'Afrique du Nord, tandis que le Frêne du Caucase (*Fraxinus angustifolia* sous-espèce de *Oxycarpe*) pousse en Europe centrale, dans les Balkans et dans la région de la mer Noire, et le frêne syrien (*Fraxinus angustifolia* sous-espèce syriaque) existe dans le sud-est de l'Anatolie, du Moyen-Orient à l'Iran (Caudullo et Houston, 2016).



Figure 3 : Répartition des parcelles et carte de chorologie simplifiée pour *Fraxinus angustifolia* (Caudullo et Houston, 2016).

I.1.5 Nom vernaculaire

Les noms vernaculaires de *Fraxinus angustifolia* sont multiples, ils sont énumérés dans le tableau I ci-dessous.

Tableau I : Noms vernaculaires de *Fraxinus angustifolia*.

Appellation scientifique	<i>Fraxinus angustifolia</i> (Rameau et Dumé, 1989).
Nom vernaculaire Anglais	Narrow leaved ash (Wallander, 2008).
Noms vernaculaire Français	Frêne oxyphylle, Frêne à feuille étroites (Rameau et Dumé, 1989).
Nom vernaculaire Amazigh	Aslen, Taslen, Taslent, Tabouchicht (Beloued, 2009).
Nom vernaculaire Arabe	Derdar, Sella, Lessan el acefour, Rasleut, Mesharouane, (Beloued, 2009)

I.1.6 La systématique de l'espèce

L'espèce *Fraxinus angustifolia* est placée selon (Wallander, 2008) suite à une étude phylogénétique moléculaire dans la position systématique suivante :

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Tableau II : systématique de *Fraxinus angustifolia*

Taxonomie	Espèce
Règne	Végétal
Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous classe	<i>Astéridones</i>
Ordre	<i>Lamiales</i>
Famille	Oléacées
Genre	<i>Fraxinus</i>
Espèce	<i>Fraxinus angustifolia.</i>

I.1.7 Utilisation traditionnelle

Le frêne est utilisé depuis l'antiquité dans différentes régions du monde. En fait, les branches et les feuilles de cet arbre sont souvent utilisées comme fourrage pour les animaux (Caudullo et Houston, 2016). Le bois est utilisé pour la construction et constitue une source principale de bois de feu (Boshier et al., 2005). Il est également utilisé pour fabriquer des cannes pour les personnes âgées, des manches d'outils et des paniers. Par ailleurs, l'espèce est largement utilisée pour ces vertus médicinales, les différentes parties de la plante sont surtout utilisées pour traiter les maladies inflammatoire, utilisée aussi comme antipyrétique, antitussive et expectorante (Ahmane et al., 2019 ; Alessandro et al., 2019). Les feuilles et les samares sont très utilisées dans la décoction et l'infusion comme antirhumatismale (Baba-Aissa, 1999). Elles sont très efficaces contre la diarrhée et les parasites intestinaux (Gifa, 2012). Les feuilles sont aussi utilisées pour soigner les infections urinaires. Elles sont laxatives, sudorifiques et toniques (Baba-aissa, 1999). L'écorce est riche en composés phénoliques, elle est utilisée pour soigner les hémorroïdes (Baba-aissa, 1999), les calculs et la lithiase biliaire, les hémorragies passives, les fièvres intermittentes et la goutte (Beloued, 1998 ; Djerroumi et Nacef, 2004). *F. angustifolia* est aussi utilisées pour de nombreuses autres fins traditionnelles dans le but de traiter les pathologies du système digestif, en

dermatologie et les problèmes du système nerveux (Çalis, 1993) et de diminuer le taux du cholestérol (Falé et al., 2014), en association avec un régime amaigrissant hypocalorique (Bellakhdar, 1991).

I.1.8 Activité biologique de *Fraxinus Angustifolia*

Fraxinus angustifolia est une espèce végétale qui a été étudiée pour ses activités biologiques. Voici quelques découvertes à partir des résultats de recherche :

- Activités anti oxydante : la présence des substances antioxydantes qui ont été révélées par l'analyse CCM (Vesbascoside, coleolaroside et isoacteoside) ont été également prouvées des propriétés antioxydantes, ce qui signifie qu'ils peuvent aider à protéger les cellules contre les dommages causés par les radicaux libres (Abbad, 2018).
- Activité anti-inflammatoire : il a été démontré que les composés phénoliques de *F. angustifolia* ont une activité inflammatoire en inhibant la production des médiateurs inflammatoires (Sarfraz et al., 2017)
- Activité antibactérienne : des études ont démontrées les extraits de *Fraxinus* ont des activités antimicrobiennes qui inhibent ou supprime la croissance de certaines bactéries, ce qui suggère un potentiel d'utilisation dans le domaine de la lutte contre les infections (Tahiri, 2016).

Ils pourraient également être considérés comme une bonne alternative dans le traitement et la prévention de l'obésité. Enfin, la plante *F. angustifolia* pourrait être une source importante de molécules intéressantes dans le domaine de la prévention et du traitement du cancer (kasmir et al., 2021).

I.1.9 Investigation phytochimique

La phytochimie s'intéresse aux métabolites de plantes et leurs dérivés. La performance métabolique des organismes vivants peut être distinguée dans le métabolisme primaire et le métabolisme secondaire. Ces derniers sont inter connectés du fait que la biosynthèse des métabolites secondaires peut être assurée par des métabolites primaires omniprésents (Gurib-Fakim, 2006). La plupart des composés de plantes, révélant des utilités médicales, ont tendance à être des métabolites secondaires (Gurib-Fakim, 2006). Ces métabolites synthétisés par les plantes, sont de plusieurs types :

Les phénols sont parmi les plus grands groupes de métabolites secondaires. Ils s'étendent de structures simples avec un cycle aromatique aux polymères complexes aux quels sont rattachés

Chapitre I : Synthèse bibliographique

des glucosides (Iserinetal., 2001 ; Gurib-Fakim, 2006). Les phénols présentent une très grande variabilité de structure, possédant au moins un composé cyclique aromatique substitué par au moins un groupe hydroxylique (Kougana et al., 2013).

Les classes phénoliques de *Fraxinus angustifolia* d'intérêts pharmacologiques sont résumées comme suit :

I.1.9.1 Les acides phénoliques

Les phénols isolés de *Fraxinus angustifolia* sont de classe de composés phénoliques glucosides et des acides phénoliques dérivés, d'acidehydroxy-cinnamique (Figure 3.a) et deux (2) isomères d'acide caffeoylquini que (figure 3.b et 3.c).

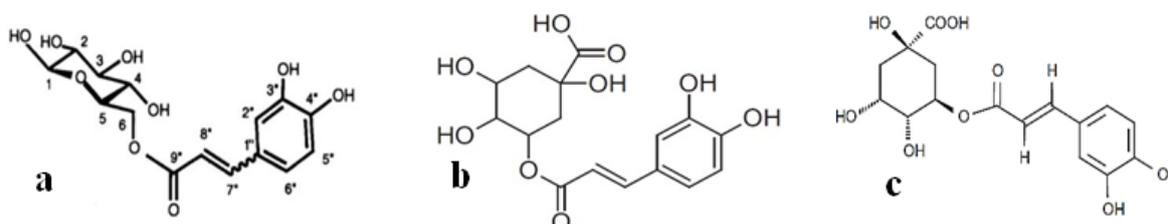


Figure 4 : structures chimiques des polyphénols *Fraxinus Angustifolia* : (a) 6-O-trans-caffeoyl-β-D-glucopyranoside (Hosny, 1998 ; Kostova et Iossifova, 2007) ; b : acide 1-caffeoylquinique (Falé et al., 2013) ; c : Acide 3-caffeoylquinique (acide chlorogénique) (Falé et al., 2013).

Une autre classe des phénylpropanoïdes glycosides se présente chez *Fraxinus angustifolia* Vahl. ; Le verbascoside qui est un glucoside caffeoyl de phénylethanoïde (Hosny, 1998).

I.1.9.2 Coumarines

La présence des coumarines est une caractéristique du genre *Fraxinus* parmi d'autres genres des Oléacées, une source très riche de coumarines sous forme libre et glucosides (Santamour, 1981 ; Kostova et Iossifova, 2007). Dans *Fraxinus angustifolia*, un nombre des hydroxy-coumarines ont été rapportées : 6,7-dihydroxy-, 6, 7, 8-trihydroxy-et 5,6,7-trihydroxycoumarines (Iossifova et al., 1997). Ces dernières sont représentées dans le tableau III suivant :

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Tableau III : Différentes coumarines trouvées dans *Fraxinus angustifolia* et leurs structure de base (Iossifova *et al.*, 1997; Kostova et Iossifova, 2007)

R ¹	R ²	R ³	R ⁴	Nomsvulgaires
	OMe	OH	OGlc	Fraxine
OMe	OH	OMe	H	Fraxinol
H	OH	OH	H	Esculétine
H	OGlc	OH	H	Esculine
H	OH	OGlc	H	Cichoriine

I.1.9.3 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes forment une collection de plus de 6000 composés naturels. Ce sont les pigments responsables de la coloration jaune, orange et rouge de plusieurs organes végétaux (Erlund, 2004 ; Havsteen, 2002).

Tous les flavonoïdes sont des produits de l'enchaînement d'une réaction enzymatique de la benzo-pyrone et peuvent être classés selon les types de substitués présents sur les cycles de la molécule et le degré de saturation du squelette de la benzo-pyrone (Carlo *et al.*, 1999). Les flavonoïdes de *Fraxinus angustifolia* sont résumés dans l'annexe 02,

I.1.9.4 Terpénoïdes

Les terpénoïdes, parfois appelés isoprénoïdes, formés d'une sous-unité isoprène à cinq carbones C₅H₈ et une molécule de dioxyde de carbone. Les sous-unités isoprènes se lient pour former des classes de terpénoïdes, selon leur nombre d'unités isopréniques (n) et leur nombre d'atomes de carbone C₅n on trouve des monoterpènes, diterpènes, triterpènes et sesquiterpènes (Nabors 2008). Le groupe caractéristique de la classe des monoterpènes est les iridoïdes. Le clivage du b-cyclopentane donne une famille spéciale des iridoïdes, les secoiridoïdes, souvent liés à un résidu glucose (Gurib-Fakim, 2006 ; Dinda *et al.*, 2007).

Les composés de cette famille retrouvés majoritairement dans *Fraxinus angustifolia* sont structurés dans l'annexe 03, on cite : l'Oleuropéine, Ligsroside, Neuzhenide, Me10-Hydroxyligstroside, 10-Hydroxyoleuopeine, Angustifolioside A, Angustifolioside B, Angustifolioside C.

I.1.10 Mode d'action de quelques métabolites secondaires

Les métabolites secondaires ont un puissant effet antioxydant, cet effet peut être dû à l'interaction de ces métabolites avec les molécules endogènes intervenant dans le mécanisme de la réponse cellulaire au stress oxydant. Plusieurs recherches ont été réalisées afin d'élucider, identifier et comprendre le mode d'action de ses métabolites

Il y a plus de 25 ans de recherches pour identifier la relation entre l'activité antioxydante des flavonoïdes et leurs structures *in vitro*. Parmi les caractéristiques qui augmentent la corrélation entre leurs structures et cette activité en citant ; le degré élevé d'hydroxylation, la position et l'arrangement des groupements OH spécialement dans le cycle B (Annexe 02), la présence de la double liaison C2-C3 en conjugaison à la fonction 4-carbonyl, le degré de polymérisation des flavonoïdes influence aussi sur l'activité antioxydant et les composés flavonoïdiques en forme hexamérique ont une plus grande capacité à piéger le ONOO⁻ et le O₂⁻ que les composés tétramériques (Heim et al., 2002).

I.1.10.1 Propriétés anti-hépatotoxique

Depuis de nombreuses années, les flavonoïdes dérivés de *Silybum marianum* sont utilisés en médecine conventionnelle pour traiter les troubles hépatiques. Les principes actifs de son extrait sont constitués d'un mélange compliqué connu sous le nom de silymarine. Testée sur un modèle animal, la silymarine a démontré qu'elle avait des effets bénéfiques sur les cellules hépatiques saines et irréversiblement endommagées, agissant sur la membrane cellulaire pour bloquer l'entrée de substances toxiques et favorise la capacité des cellules hépatiques à se régénérer après hépatectomie partielle. La silybine, principal flavolignane présent dans la silymarine, a été attribuée pour son potentiel hépato-protecteur chez des souris exposant à des doses non thérapeutiques d'acétaminophène. Ce flavonoïde s'est avéré hépato-protecteur, mais son mécanisme d'action exact n'est pas encore clair.

La quercétine produite par *Artemisia scoparia* aurait des effets protecteurs contre la toxicité hépatique du paracétamol chez le rat et la souris (Gilani, 1997 ; Laughton et al., 1999).

I.1.10.2 Activités anti-inflammatoires

Yu et ses collaborateurs (1999) ont étudié le rôle du butylhydroquinone tertiaire (BHQT) et de sulforaphane (SUL) dans l'activation de la voie MAPK qui induit l'expression

des enzymes de détoxification. Ces molécules interagissent directement avec Raf 1 (Rapidly accelerated fibrosarcoma 1) conduisant à l'activation de l'ERK 2 (Extra cellular signal-regulated kinase 2). Cette activation permet la phosphorylation de plusieurs protéines cytosoliques et nucléaires telles que Elk 1 (Ets-like transcription factor 1) qui interfère avec c-fos (c-FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog) et active AP-1 (Activator protein 1) permettant sa liaison à ARE et activant ainsi l'expression des enzymes de détoxification (Yongmoon, 2005).

I.2 Nanoparticules et l'encapsulation du principe actif

I.2.1 L'encapsulation

Actuellement, les applications de l'encapsulation sont très nombreuses et généralisées à plusieurs secteurs d'activités partant de la chimie à l'agroalimentaires (Kolhe *et al.*, 2003). Suivant les domaines et les applications, l'encapsulation a pour but d'assurer la protection, la compatibilité et la stabilisation d'une matière active dans une formulation. Elle permet d'améliorer la présentation d'un produit ou encore de masquer une odeur ou un goût. Enfin, l'encapsulation peut modifier et contrôler le profil de libération d'une substance active pour obtenir, par exemple, un effet prolongé ou déclenché (Akdin, 2016).

L'encapsulation est un procédé qui a pour but de piéger une substance ou un mélange de substances précis à l'aide de matériaux adaptés. Les substances qui feront l'objet d'une encapsulation peuvent être liquides, solides ou gazeuses. Généralement, ce sont des principes actifs sensibles ou instables à certains facteurs environnementaux et qui ont une action bien ciblée (Kerdudo *et al.*, 2014).

I.2.1.1 Techniques et efficacité d'encapsulation

Il n'existe pas de système universel d'encapsulation pour une substance active donnée. En effet, lorsque l'actif à protéger est un complexe de molécules, tels que les extraits naturels, les contraintes et les difficultés de développement sont importantes. Les différences entre les composés (hydrophilie/hydrophobicité, différences de masses moléculaires, fonctions chimiques diverses, etc.) vont conduire à des différences d'interaction avec le ou les matériaux de recouvrement, entraînant par exemple des rendements d'encapsulation variables (Kerdudo *et al.*, 2015). De nombreuses méthodes d'encapsulation (l'émulsification-diffusion, la polymérisation en mini-émulsion, la nano précipitation....) ont été développées afin de

Chapitre I : Synthèse bibliographique

s'adapter à divers types de substances actives et matériaux enrobants. Ces différentes méthodes permettent d'obtenir des particules aux caractéristiques variées (taille, épaisseur de la paroi, perméabilité) permettant de moduler la libération de la substance active (**Chausson, 2006**).

Le terme « nanoparticule » recouvre une large gamme d'assemblages supramoléculaires utilisés pour véhiculer d'autres molécules et les isoler du milieu extérieur, en présentant l'exemple utilisé :

I.2.1.2 Liposomes

Les liposomes sont des systèmes d'encapsulation de structures sphériques composées d'une ou plusieurs bicouches phospholipidiques entourant des compartiments aqueux internes (figure. 5).

La taille du liposome va dépendre de la technique utilisée pour le synthétiser, elle est environ 70fois plus petite qu'un globule rouge, de l'ordre de quelques dizaines à quelques milliers de nanomètre de diamètre. Les liposomes peuvent encapsuler et délivrer efficacement à la fois des substances hydrophiles (dans le noyau central aqueux), lipophiles (dans la membrane) et amphiphiles (à l'interface membrane/eau) ; les phospholipides constituent l'élément principal des liposomes avec ou sans cholestérol. Ils sont non-toxiques non-immunogènes, biocompatibles et biodégradables (**Ehsan et al., 2019**).

Les liposomes peuvent être fabriqués à partir de différents phospholipides naturels et/ou synthétiques (Phosphatidyl-éthanolamine, Phosphatidyl-glycérol, Phosphatidyl-choline (DPPC), Phosphatidyl-sérine, Phosphatidyl-inositol) (**Slingerland et al., 2012**).

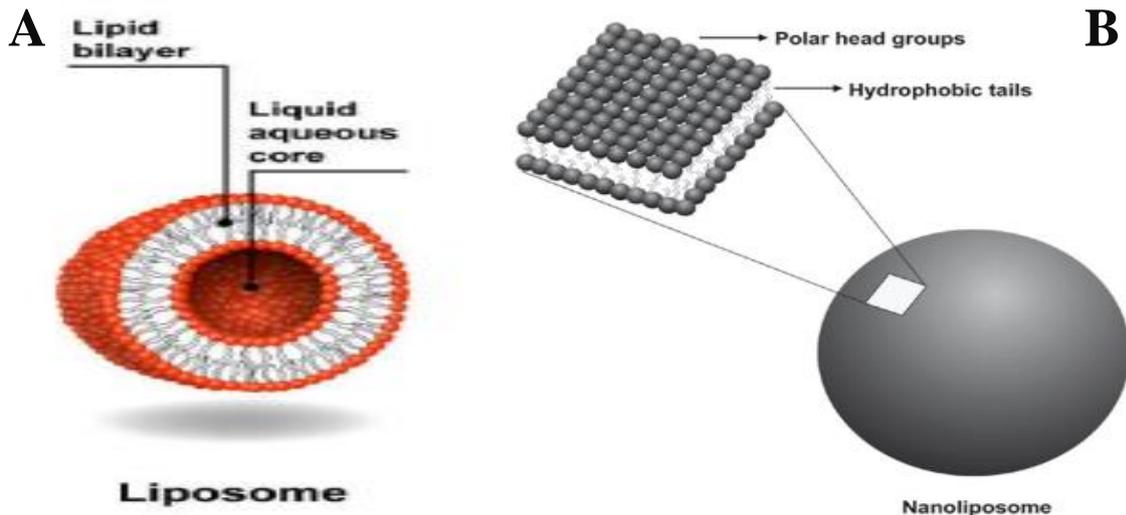


Figure 5 : Structure de liposome (A) (Hajjali, 2018), composition biochimique et la structure de la bicouche lipidique des nanoliposomes (B) (Mozafari, 2010).

Il existe d'autres types des nanoparticules utilisées dans l'encapsulation, en citant ; les nanoémulsions, les micelles polymères, les nanoparticules de lipides solides, illustrées dans (figure. 6 A, B et C) (Shafiq et al., 2007 ; Mozafari, 2010).

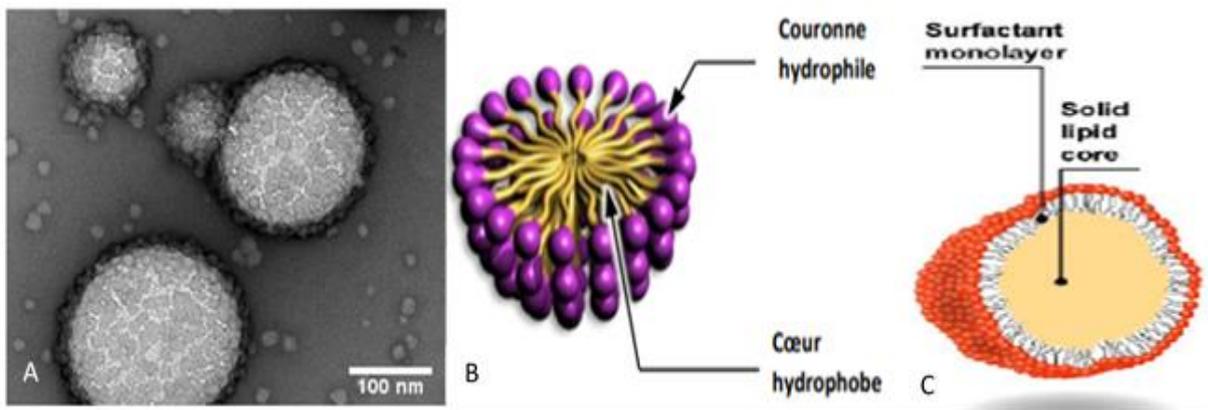


Figure 6 : structures des autres nanoparticules utilisées ; les nanoémulsions (A), les micelles polymères (B), les nanoparticules de lipides solides (C) (Shafiq et al., 2007 ; Mozafari, 2010).

I.3 Toxicité hépatique et le paracétamol

I.3.1 Le foie

Le foie est l'organe le plus complexe et le plus volumineux de l'organisme humain, il pèse entre 1,6 et 2 Kg, il présente une couleur brun-rouge (Desmoulière, 2021), situé dans la partie supérieure droite de l'abdomen (Claire, 2014), le foie est enveloppé par une capsule conjonctif, qui s'invagine profondément en formant plusieurs sillons permettant de définir les

Chapitre I : Synthèse bibliographique

quatre lobes, qui sont : le lobe hépatique droit est le plus grand, est visible sur toute les faces de foie, le lobe hépatique gauche est la partie la plus étroite de l'organe, le lobe caudé, le plus postérieur, et le lobe carré, situé sous le lobe gauche (**Desmoulière, 2021**).

I.3.1.1 Cellules de foie

Le foie est constitué de différents types cellulaires telles que ; les hépatocytes, les plus abondantes de foie, elles constituent 70 à 80% du poids hépatique, et les cholangiocytes, cellules de l'épithélium biliaire. Ces deux types de cellules constituent ce que l'on appelle le parenchyme hépatique, et sont responsable de nombreuses fonctions métaboliques essentielles. Le foie est également constitué de cellules non parenchymateuses comme les cellules étoilées ou d'Ito, les cellules de Kupffer (macrophages), et les cellules endothéliales. Chacun de ces types de cellules joue un rôle important dans le fonctionnement de foie (**Sartor, 2015**).

I.3.1.2 Fonctions de foie

Le foie est indispensable pour l'organisme, il joue un rôle essentiel dans de nombreuses fonctions vitales, comme la digestion des matières grasses, le stockage des nutriments, il intervient également dans les voies métaboliques et joue un rôle crucial dans la détoxification de nombreuses substances telles que l'alcool et les drogues (**Claire, 2014 ; Desmoulière, 2021**).

I.3.2 Hépatotoxicité

L'hépatotoxicité est définie comme le pouvoir d'une substance comme : les médicaments (paracétamol), les métaux lourds, les produits industriels et les pesticides à endommager le foie. Dans les cas les plus graves, la toxicité du foie peut également se manifester sous forme de nécrose ou d'inflammation et dans les cas plus sévères sous forme de stéatose hépatique (**Danan, 1993**).

I.3.3 Le paracétamol

Le paracétamol (*p*-acetyl-aminophenol), aussi appelé acétaminophène, est un dérivé de l'acétanilide (N-phenylethanamide). Il appartient à la famille des analgésique et antipyrétique couramment utilisé pour soulager la douleur et réduire la fièvre, il existe sous plusieurs

formes galéniques : comprimé sec ou effervescent, poudre en gélules ou sachets, sirop, suppositoire, injectable pour voie intraveineuse (Michaut, 2015).

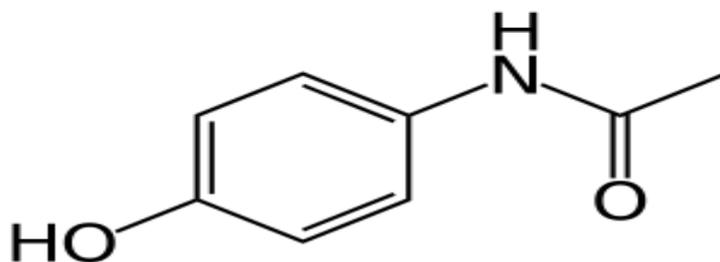


Figure 7 : Structure chimique du paracétamol (Dirad, 2009).

Dans les conditions ordinaires, le paracétamol est une poudre cristalline blanche inodore au goût légèrement amer. Il se trouve sous forme ionisée dans l'estomac et l'intestin grêle, ce qui facilite son absorption (Hassani, 2016). Les propriétés physico-chimiques du paracétamol sont résumées dans l'annexe N° 01.

I.3.3.1 Les propriétés pharmacocinétiques

L'effet d'une substance dépend de la rapidité et de la quantité avec lesquelles elle apparaît sur le site d'activité dans l'organisme. La pharmacocinétique fournit une description des processus clés impliqués dans l'absorption, la distribution, les interactions, la biotransformation et l'élimination sont décrits quantitativement (temporellement et localement) (Gerard, 2019).

I.3.3.1.1 Absorption

Le paracétamol a une bonne biodisponibilité. En effet, son absorption est rapide et complète, se fait au niveau gastro-intestinal, en particulier au niveau du duodénum et par transport passif (Mitchell et Hartmut, 2013). Les concentrations plasmatiques maximales sont atteintes environ 60 minutes après l'ingestion, si l'absorption est massive, celle du paracétamol est ralentie ; elle durera plus de 4 heures (Gerard, 2019).

I.3.3.1.2 La distribution tissulaire et plasmatique

La distribution est une étape au cours de laquelle le xénobiotique est réparti dans l'organisme à partir de la circulation générale. La distribution du paracétamol se fait rapidement dans tous les tissus mais principalement au niveau du foie et du rein, le volume apparent de distribution chez l'homme est de 0,9 L/Kg, le paracétamol se lie peu aux protéines plasmatiques presque 20%. Le paracétamol passe la barrière foeto-placentaire grâce

Chapitre I : Synthèse bibliographique

à sa faible masse moléculaire et passe faiblement dans le lait, il est aussi retrouvé dans la salive à une fraction de 1,21 par rapport au taux plasmatique (Gerard, 2019).

I.3.3.1.3 La biotransformation

Le paracétamol est métabolisé au niveau du foie, suivant différentes voies. La glucuroconjugaison représente 52 à 57 % de la métabolisation du paracétamol et la sulfoconjugaison prend en charge 30 à 44 % de la dose totale du paracétamol présente dans l'organisme, ces réactions prises en charge par des enzymes de conjugaisons, glucuronotransférases et sulfotransférases. Une excrétion urinaire des métabolites succède à ces deux voies de détoxification. Une petite partie, moins de 5 % est excrétée sous forme inchangée. En effet, environ 5% du paracétamol sont métabolisés par les cytochromes P450 (CYPs), majoritairement le CYP2E1 et le CYP3A4, en Nacetyl-*p*-benzoquinone imine (NAPQI), ce métabolite est détoxiqué par le glutathion (GSH). Le GSH est un tri peptide associant la cystéine, la glycine et l'acide glutamique (Saad Albichr et Philippe, 2017).

I.3.3.1.4 Élimination

L'élimination du paracétamol est essentiellement urinaire, 85 à 95% de la dose thérapeutique est excrétée dans les urines en moins de 24 heures chez les sujets sains. La demi-vie d'élimination est d'environ 2 heures, bien qu'elle puisse atteindre 4 heures en cas de lésion hépatique grave. La clairance corporelle totale est de 4,5 à 5,5 ml/kg/min, néanmoins l'effet de l'âge est minime. La clairance rénale du paracétamol dépend du débit urinaire et non du pH et ne diminue pas chez les patients ayant une insuffisance rénale, mais il y a accumulation et rétention des conjugués (Dirad, 2009).

I.3.3.2 Mécanisme d'action de paracétamol

Le mécanisme d'action du paracétamol précis n'est pas complètement compris, mais il est généralement admis qu'il agit au niveau hypothalamique où il empêche la synthèse des prostaglandines, (Mateus, 2023) plus précisément il agirait en augmentant le seuil de la douleur par l'inhibition des isoformes de la cyclo-oxygénase (COX-1, COX-2 et COX-3), des enzymes qui jouent un rôle clé dans la production de prostaglandines à partir de l'acide arachidonique. Le paracétamol n'exerce peu ou pas d'action sur les cyclo-oxygénase périphériques, mais sur les COX central (COX-3), ce qui explique son incapacité à exercer

Chapitre I : Synthèse bibliographique

une activité anti-inflammatoire (**Mateus, 2023**). Le paracétamol bloque la voie de l'oxyde nitrique (NO), qui est activée par plusieurs récepteurs de neurotransmetteurs, principalement la substance P et N-méthyl-D-aspartate (NDMA), ce qui augmente le seuil de la douleur (**Impagnatiello et al., 2008**).

Le paracétamol aurait une action sérotoninergique centrale en agissant au niveau des neurones sérotoninergiques descendant de la moelle épinière (**Krid, 2019**).

I.3.3.3 Types des lésions induites par le paracétamol

I.3.3.3.1 Stress oxydatif

Lors d'une intoxication au paracétamol, le NAPQI épuise les réserves en glutathion qui est le cofacteur de la détoxification de la peroxydase par la glutathion peroxydase. En raison de cette déplétion en glutathion, les taux intracellulaires de peroxyde augmentent, entraînant une réaction de Fenton qui aboutit à un stress oxydatif (**Baali, 2017**).

I.3.3.3.2 Dysfonctionnement mitochondrial

La bioactivation du paracétamol en NAPQI qui entraîne une déplétion en glutathion dans le cytosol, mais également au niveau mitochondrial. Ces deux derniers entraînent une inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale et favorisent la production d'élément réactif d'oxygène (ERO) par la mitochondrie (**Cover et al., 2005**).

Le stress oxydant se développe dans la mitochondrie par la production d'ERO, il est capable d'activer les voies de signalisations du stress cellulaires. C'est notamment le cas de la voie JNK (c-Jun-N-terminal kinase) ; avec un pic d'activation qui survient environ deux heures après l'intoxication au paracétamol. Lorsque JNK est activé, elle est capable de phosphoryler plusieurs protéines qui favorisent la mort cellulaire (**Baali, 2017 ; Dous, 2017**).

I.3.4 Mécanisme d'intoxication par le paracétamol

En cas de surdosage, les voies de détoxification par la glucuronoconjugaison et la sulfoconjugaison sont saturées et la déviation du métabolisme vers une oxydation hépatique accroît la formation de métabolite hépatique NAPQI, qui entraîne une déplétion en glutathion. Le NAPQI non détoxiqué grâce à son caractère électrophile et sa forte instabilité, il se lie à d'autres éléments nucléophiles de la cellule, tels que les bases puriques et pyrimidiques de l'ADN ou les groupements thiols des protéines, activant alors une cascade de kinases, à

Chapitre I : Synthèse bibliographique

l'origine d'un stress oxydant et d'une fragmentation de l'ADN, et de causer un dysfonctionnement mitochondrial et une nécrose centrolobulaire (Saad Albichr, Hantson, 2017).

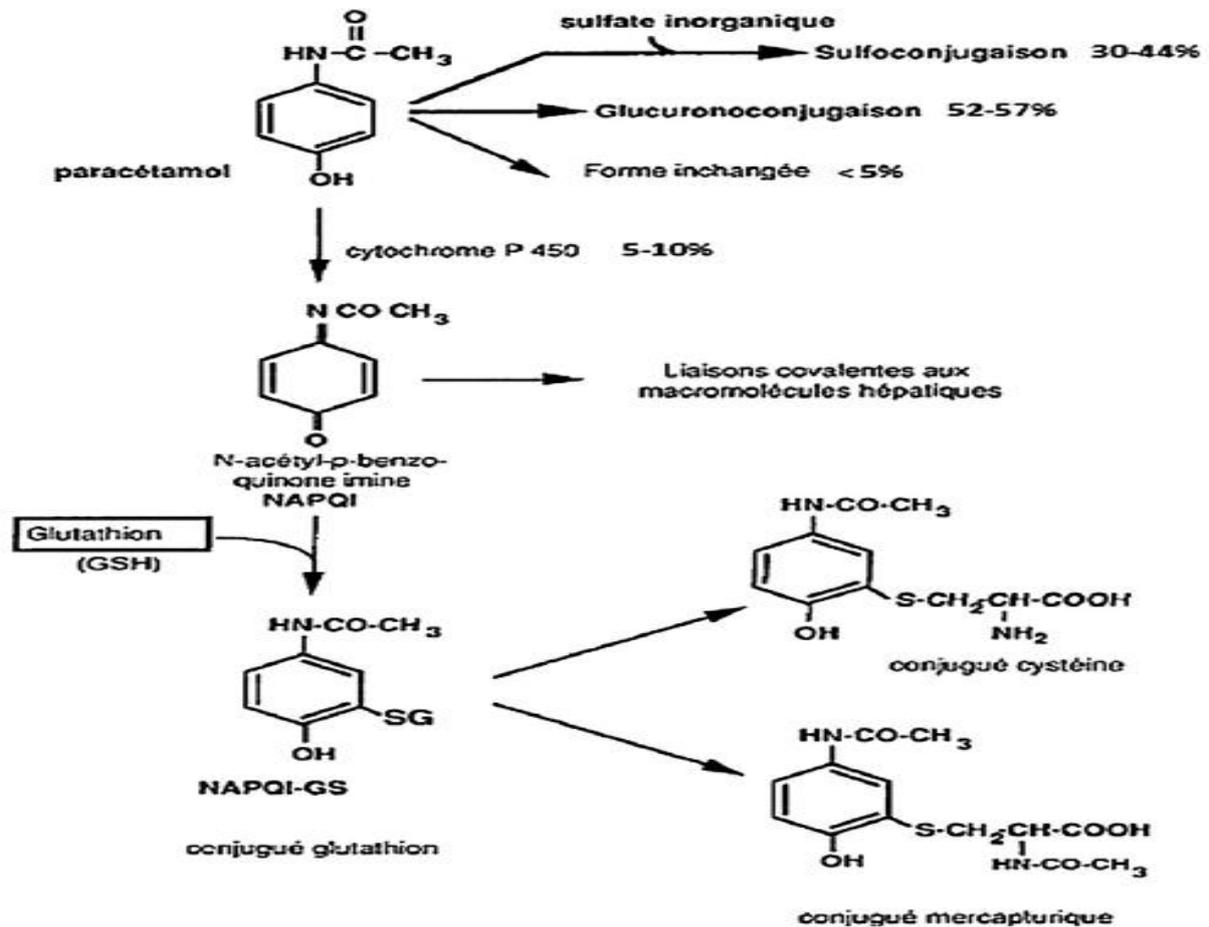


Figure 8 : Métabolisme du paracétamol (Saad Albichr, Hantson, 2017).

I.3.5 Intoxication aiguë au paracétamol

La dose toxique du paracétamol est hautement variable selon les individus. En une prise unique, elle est de l'ordre de 150 mg/kg. Certains ne parlent d'intoxication aiguë que pour des doses élevées supérieures à 200 mg/kg. Cependant le paracétamol peut être toxique pour le foie, même à 4 g/24 h soit des doses thérapeutiques. Administrées sur de longues périodes, ces doses se rapprochent des doses toxiques pouvant entraîner des lésions hépatiques permanentes voire mortelles, surtout chez des patients à la fonction hépatique préalablement altérée (Garrec, 1994).

I.4 Effet des polyphénols contre l'hépatotoxicité induite par le paracétamol

Les composés phénoliques ont un effet antioxydant qui lui confère le statut de substances anti-radicalaires par la suppression ou inhibition du stress oxydatif induit par le paracétamol par divers mécanismes :

- Les polyphénols inhibent la liaison entre le NAPQI et les protéines membranaires mitochondriales, ainsi le NAPQI n'atteint pas la chaîne respiratoire ce qui empêche les fuites des électrons et inhibe la formation des ERO. L'inhibition de la liaison de NAPQI aux protéines membranaires protège la Ca^{2+} -ATPase empêchant ainsi le dysfonctionnement mitochondrial, l'activation des calpaïnes, la déplétion de l'ATP, et la nécrose hépatocytaire (Derbal, 2020).

I.4.1 Principales lésions hépatique

Les hépatites médicamenteuses sont des affections hépatiques causées par l'utilisation de certains médicaments. Lorsqu'un médicament est ingéré, il est métabolisé dans le foie, qui est responsable de l'élimination des substances étrangères du corps. Cependant, la toxicité peut s'exercer sur différents organites des cellules hépatiques conduisant vers divers effets toxiques (Pelletier, 2016).

I.4.1.1 La stéatose

La stéatose hépatique est définie par une accumulation de vacuoles lipidiques dans le cytoplasme. Certains médicaments (le paracétamol, l'acide salicylique, l'acide valproïque...) sont capables d'inhiber la β -oxydation mitochondriale des acides gras, provoquant ainsi l'accumulation de ces derniers sous forme libre ou estérifiés en triglycérides dans les hépatocytes. Cette accumulation de lipides peut être associée à la mort cellulaire en entraînant une déplétion des stocks d'ATP indispensables à la survie. On distingue une stéatose dite microvésiculaire caractérisée par l'accumulation de petites vésicules lipidiques dans le cytoplasme des hépatocytes, et une stéatose macrovacuolaire caractérisée par l'accumulation des triglycérides sous forme d'une grosse vacuole (Allard, 2020).

I.4.1.2 La nécrose

Certains médicaments comme le paracétamol, sont capables d'induire l'ouverture des pores de transition de perméabilité mitochondriale (PTPM), les conséquences de cette ouverture peuvent être néfastes pour l'homéostasie cellulaire. En effet, l'augmentation de la perméabilité de la membrane interne provoque la perturbation de la phosphorylation oxydative ayant pour conséquence une chute de la synthèse d'ATP, entraînant ainsi la mort de la cellule par nécrose en particulier par l'augmentation des concentrations intracellulaires de calcium. La nécrose hépatique peut être aussi induite par la peroxydation lipidique, via la perturbation de l'intégrité de la membrane des hépatocytes (**Bouras, 2007**).

I.4.1.3 La choléstase

La choléstase est l'ensemble des manifestations liées à la diminution ou à l'arrêt de la sécrétion biliaire, en raison d'une obstruction des voies biliaires ou d'une diminution de la formation de la bile par les hépatocytes (**Seirafi, 2007**). De nombreux effets négatifs causés par la choléstase comprennent la malabsorption des graisses et des vitamines liposoluble ainsi que l'incapacité d'éliminer les substances qui devraient être éliminés par la bile (**Bouras, 2007**). Sous l'influence de la choléstase, l'hépatocyte produit des quantités excessives du phosphate alcalin et le cholestérol (**Seirafi, 2007**).

II Chapitre II :
Matériel et
méthodes

II.1 Matériel

II.1.1 Matériel végétal

Le matériel végétal est composé des extraits des feuilles et d'écorce de *Fraxinus angustifolia*. Le choix de cette plante n'était pas arbitraire mais basé sur l'utilisation de cette plante en médecine traditionnelle pour le traitement des maladies causées par le stress oxydatif.

II.1.1.1 Préparation du matériel végétale

Les feuilles et l'écorce de *Fraxinus angustifolia* ont été récoltées la matinée en mois de septembre 2022 dans la forêt d'Azru N Bechar situé à l'est d'Amizour-Bejaia (figure. 9). Les parties de la plante ont été séchées à température ambiante et dans un espace ombragé suivi par un séchage final dans une étuve (37°C) pendant une semaine, afin d'éliminer toute trace d'humidité. À l'aide d'un broyeur électrique, les parties de plantes ont été broyées et tamisées, jusqu'à l'obtention d'une poudre fine (63µm), qui a été stockée à l'abri de la lumière et à -20°C.



Figure 9 : Localisation de la commune Amizour – Bejaia – Algérie par Google Earth.

II.1.2 Matériel animal

Des souris NMRI (Naval Medical Research Institute) âgées de 6-7 semaines, 27-43 g, fournies par l'Institut Pasteur d'Alger (Algérie), ont été utilisées pour cette étude.

Chapitre II : Matériel et méthodes

L'expérimentation a été réalisée au niveau du laboratoire d'expérimentation animale de l'université de Bejaia ; les animaux ont été acclimatés aux conditions de laboratoire deux semaines avant le test. Ils ont été logés dans des conditions ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, $65 \pm 5\%$ d'humidité, cycle lumière/obscurité de 12h/12h) dans les cages en polycarbonate dans des conditions parfaitement standardisées (figure. 10). Avec l'accès à la nourriture et à l'eau. Toutes les expérimentations animales ont été manipulées conformément aux recommandations du Comité international d'éthique (directive 2010/63/UE relative à l'expérimentation animale)



Figure 10 : Souris Albinos B6 "Mus musculus C57L/6J".

II.2 Méthodes

II.2.1 Extraction des composés phénoliques

La méthode d'extraction des composés phénolique que nous avons adoptée est l'extraction solide-liquide par macération en utilisant l'éthanol comme solvant d'extraction effectué selon le protocole **Atmani et al. (2009)** défini sur la figure suivante (figure. 11).

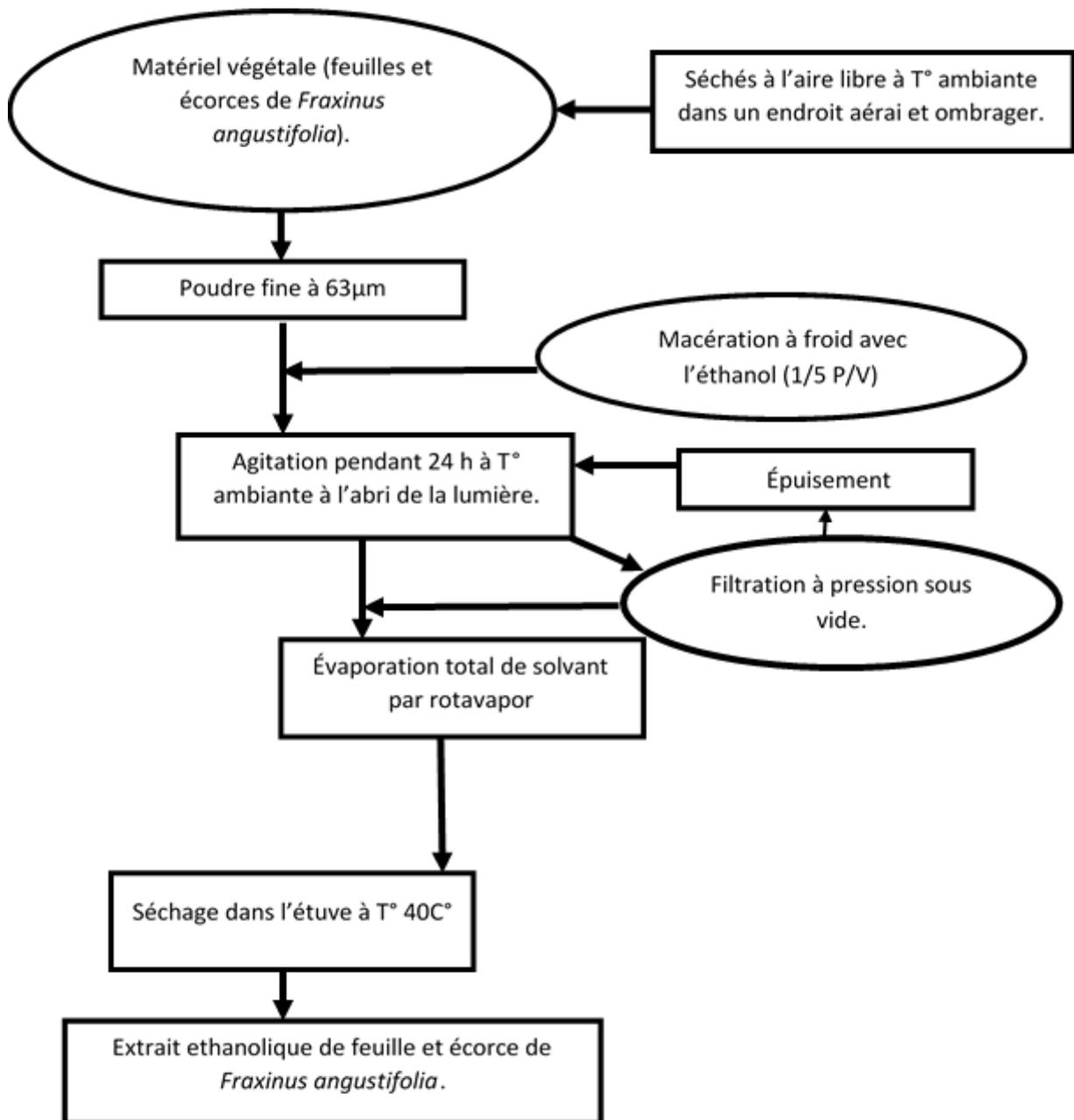


Figure 11 : Protocole expérimentale d'extraction de principe actif de *Fraxinus angustifolia*.

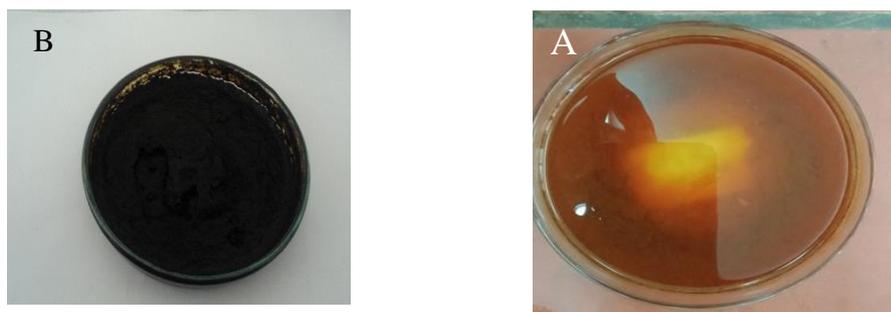


Figure 12 : Extrait d'écorce (A) ; Extrait des feuilles (B) de *Fraxinus angustifolia*.

L'extrait éthanoliques a été stocké à 4° C jusqu'à utilisation. Les extraits secs de *Fraxinus angustifolia* des feuilles (FAF) et d'écorces (FAE) ont été utilisés pour toutes les expériences. Le pourcentage d'extraction de chaque étape a été calculé suivant la formule ci-dessous :

- Taux d'extraction % = $(E/E0) \times 100$ où
- E représente le poids sec de l'extrait (g) et
- E0 le poids de la poudre sèche (g).

II.2.2 Dosage des composés phénoliques

II.2.2.1 Dosage des phénols totaux

Principe

L'estimation de la teneur des composés phénolique a été réalisée selon la méthode de Folin, basé sur la réduction en milieu alcalin du réactif Folin-Ciocalteau qui est un mélange d'acide de phosphotungstène ($H_3PW_{12}O_{40}$) et phosphomolybdène ($H_3PMO_{12}O_4$) par les groupements oxydables des composés phénoliques qui se traduit par une coloration bleu (figure. 13), mesuré à une longueur d'onde de 765 nm (**Djeridane et al., 2006**)

Mode opératoire

20 μ l d'extrait est additionné à 100 μ l de Folin-Ciocalteau (10%) suivi de 80 μ l de bicarbonate de sodium (Na_2CO_3 7.5%), après incubation pendant 30 min à 37°C, les absorbances sont enregistré à 760 nm.

Afin de déterminer la teneur des extraits en phénols totaux, une courbe d'étalonnage a été réalisée en utilisant l'acide gallique comme référence (annexe N°04) et les concentrations sont exprimées en milligrammes équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g d'extrait).

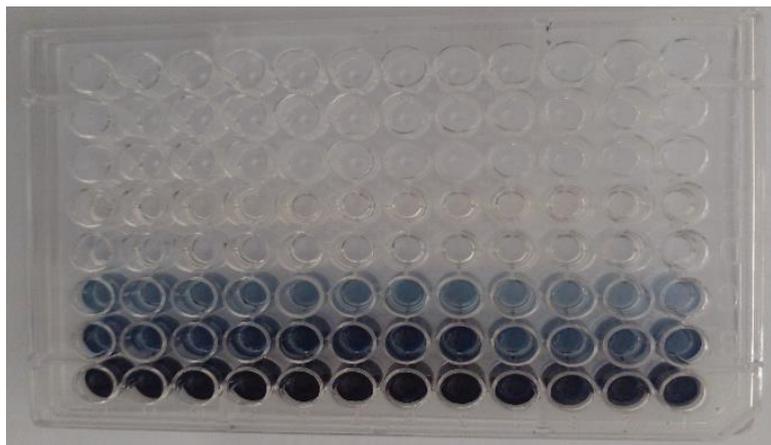


Figure 13 : Dosage des polyphénols sur une microplaque.

II.2.2.2 Dosage des flavonoïdes

Principe

L'estimation de la teneur en flavonoïdes dans nos extraits est réalisée par la méthode de trichlorure d'aluminium ; basé sur l'interaction de groupement hydroxyle des flavonoïdes avec le chlorure d'aluminium, qui se traduit par un complexe jaunâtre (figure. 14), dont l'intensité optique est mesurée à 430 nm.

Mode opératoire :

Le dosage des flavonoïdes est réalisé en appliquant la méthode du chlorure d'aluminium ($AlCl_3$) selon le protocole de **Maksimović et al. (2008)**. Un volume de 1ml d'une solution de chlorure d'aluminium est ajouté à 1ml de chaque solution d'extraits, le mélange est incubé pendant 10 min à l'obscurité et les absorbance sont mesurées à 430 nm.

Une courbe d'étalonnage (annexe N° 04) a été réalisée avec la quercétine, les teneurs en flavonoïdes ont été exprimées en mg équivalent quercétine par gramme d'extrait (mg eq Que/g d'extrait).

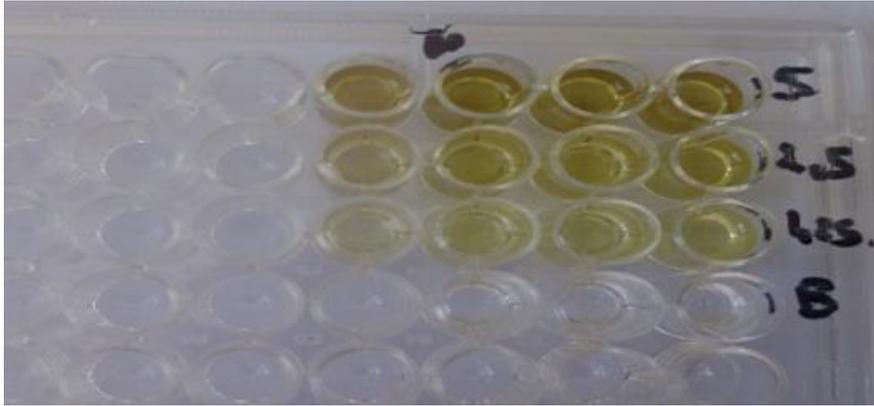


Figure 14 : Dosage des flavonoïdes dans une microplaque.

II.2.3 L'encapsulation de principe actif par les liposomes

II.2.3.1 Fabrication des liposomes

Principe

La méthode d'hydratation d'un film lipidique est la méthode de préparation la plus simple des liposomes.

II.2.4 Évaluation in vivo de l'effet hépto-protecteur des extraits de *Fraxinus angustifolia* encapsulé et non encapsulé

II.2.4.1 Traitement des animaux

La méthode suivie est celle de **Forouzandeh et al., (2013)** avec quelques modifications. Le principe de cette méthode repose sur l'évaluation de l'effet hépto-protecteur des extraits après administration d'une dose toxique du paracétamol.

Un effectif de 24 souris a été utilisé pour ce protocole. Ces souris ont été réparties en 6 groupes de 4 chacun. Les extraits brut encapsulés et non encapsulés de *Fraxinus angustifolia* (200 mg/Kg) dissous dans de l'eau physiologique (NaCl à 0,9 %), ainsi que les liposomes et le véhicule eau physiologique (NaCl à 0,9 %) ont été administrés aux souris par voie intra-gastrique (IG) chaque jour pendant 5 jours, à l'aide d'une sonde gastro-œsophagienne alors que la voie intra-péritonéale a été adoptée pour le paracétamol (500 mg/Kg), 1 heure après administration de la dernière dose de chaque traitement; les souris sont traitées comme suit :

Groupe I : A reçu la solution de liposome seul.

Groupe II : A reçu l'extrait d'écorce seul de *F angustifolia*.

Chapitre II : Matériel et méthodes

Groupes III : A reçu les liposomes incorporant l'extrait des feuilles de *F. angustifolia*.

Groupes IV : A reçu les liposomes incorporant l'extrait d'écorce de *F. angustifolia*.

Groupes V : A reçu l'extrait des feuilles seul de *F. angustifolia*.

Groupes VI (control négatif) : A reçu de l'eau distillée.

La nourriture a été enlevée aux souris une heure avant chaque gavage et leur a été remise une heure après.

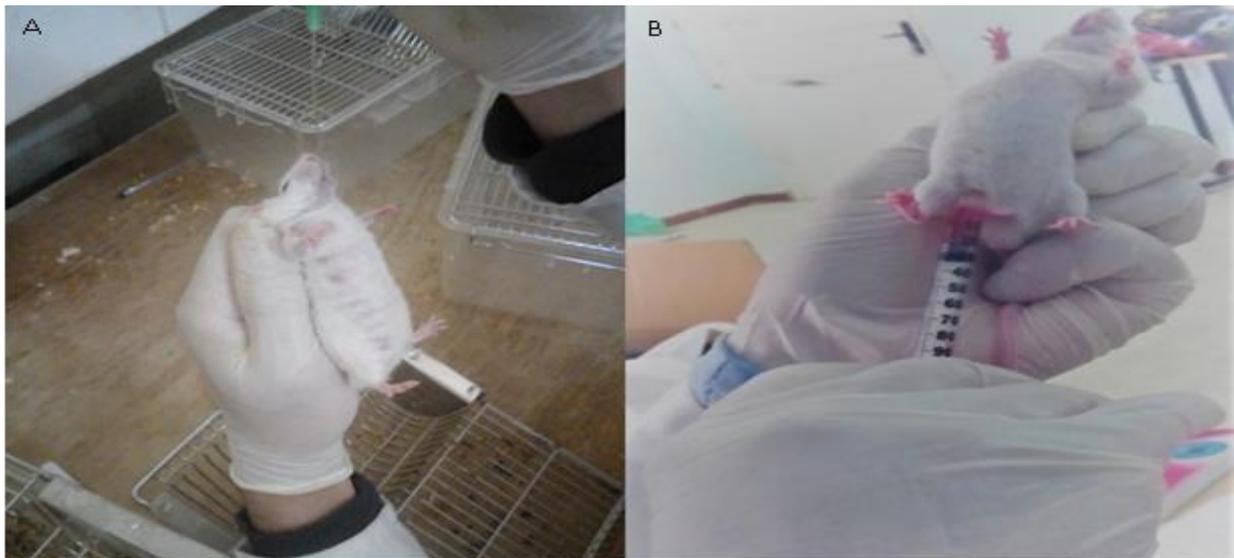


Figure 15 : Administration des extraits par voie orale (A) (gavage) ; L'injection intra-péritonéale (B).

II.2.4.2 Sacrifice des animaux

Les souris ont été sacrifiées 24 h après le dernier traitement par décapitation sous légère anesthésie à la vapeur de chloroforme, cela après un jeûne nocturne. Le sang a été récolté à partir de la jugulaire est mis dans des tubes héparines et centrifugé à 3000 tours/minutes pendant 10 minutes, les plasmas sont conservés à (-20°C) pour les dosages biochimiques des transaminases.

Les foies ont été récupérés, lavés dans de l'eau saline froide (NaCl 0,9%), ils ont été séchés puis pesés. Les foies ont été divisés en deux parties dont les deux lobes sont présents :

- **Partie (1)** correspond à 1/3 du foie total, a été mise dans du formol à 10 % pour l'étude histologique.

- **Partie (2)** correspond à 2/3 du foie total, a été conservée à -80 °C pour l'étude biochimique.

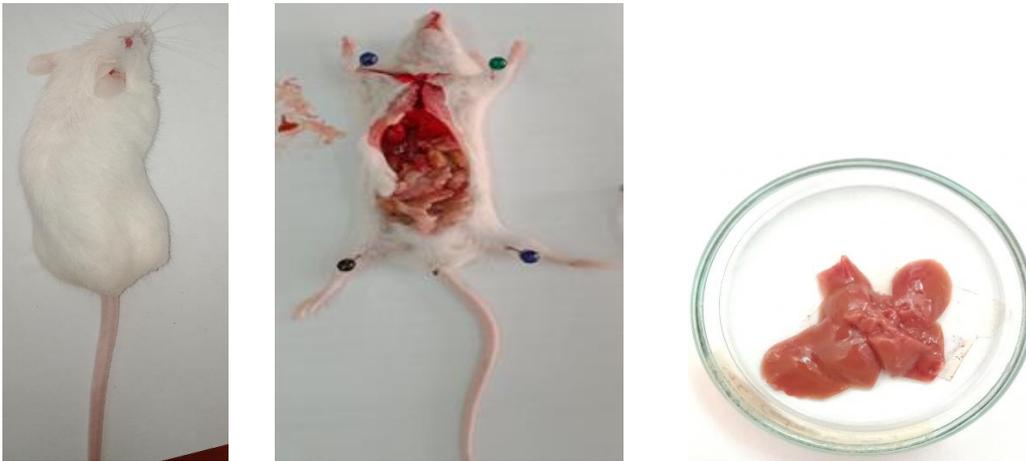


Figure 16 : Sacrifice des souris et récupération du foie.

II.2.4.3 Dosage sanguin des transaminases

Le dosage de l'aspartate aminotransférase (ASAT) et de l'alanine aminotransférase (ALAT) a été réalisé au niveau laboratoire d'analyse médicale d'Ahnif-Bouira selon la méthode standardisé, par la méthode du dosage enzymatique couplé selon la fiche technique du Kit SPINREACT (Espagne). La concentration de ces enzymes est exprimée en unité internationale par litre de substrat (UI/L). 1UI correspond à la quantité d'enzymes qui transforment 1 μ mol de substrat/min.

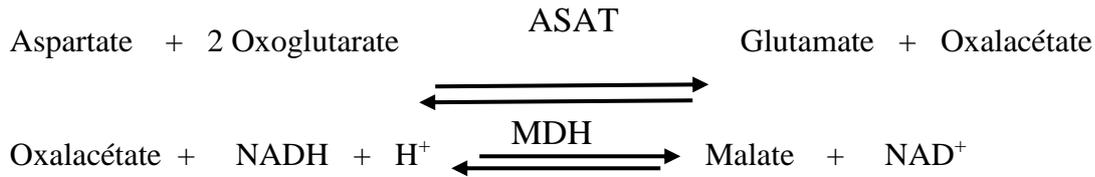
Les méthodes utilisées pour les deux paramètres biochimiques suivies dans la fiche technique de BIOLABO, le dosage a été réalisé par l'automate de biochimie.

II.2.4.3.1 Aspartate aminotransférase (ASAT)

Principe

La méthode utilisée par le laboratoire pour le dosage de paramètre Aspartate Aminotransférase (ASAT) développée par Kamen et al, optimisée par Henry et al. La diminution de l'absorbance est proportionnelle à l'activité de l'ASAT dans le spécimen, est mesuré à 340 nm. Suivant la réaction :

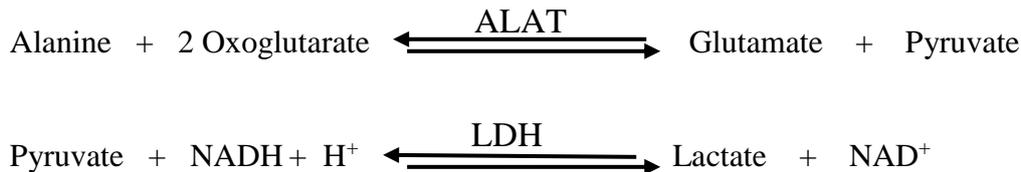
Chapitre II : Matériel et méthodes



Le taux de diminution de la concentration en NADH, H⁺ mesuré par spectrophotométrie à 340 nm, est proportionnel à l'activité catalytique d'ASAT.

II.2.4.3.2 Alanine amino transférase (ALAT)

L'alanine aminotransférase (ALAT) appelée aussi le glutamate-pyruvate transaminase (GPT), la méthode a été développée par Wroblewski et al, optimisée par Henry et Bergmeyer. La diminution de l'absorbance due à la conversion du NADH en NAD⁺ est proportionnelle à l'activité de l'ALAT dans le spécimen, suivant la réaction :



Le taux de la diminution de la concentration en NADH, H⁺ mesuré par spectrophotométrie à 340 nm, est proportionnel à l'activité catalytique de ALAT (Davila et al., 1989).

II.2.4.4 Préparation des homogénats du foie

Une partie de chaque foie de chaque souris a été coupée et mise dans une solution tampon froide (KCl à 0,15 M et EDTA à 1 mM) selon le rapport 1/10 (m/v). Le foie a été broyé à l'aide d'un homogénéisateur (Heidolph : Silent Crusher S). Les homogénats ont été centrifugés à 10000 rpm pendant 20 min à 4 °C. Les surnageants ont été récupérés puis conservés à -80 °C jusqu'à utilisation.

1 g du foie a été broyé dans 10 ml du tampon KCl-EDTA (0,15 M à pH 7,4) ou KCl (1,15 % pH 7,4) à l'aide d'un mortier en porcelaine puis homogénéisé dans un homogénéisateur de marque HEIDOLPH. L'homogénat obtenu a été soumis à une centrifugation de 10000 g /20 min à 4°C (Olaleye et al., 2014). Le surnageant a été ensuite récupéré et mis dans des eppendorfs qui ont été conservés à -80 °C jusqu'à usage ultérieur.

II.2.4.4.1 Dosage de l'activité de la myéloperoxydase (MPO)

L'activité MPO a été évaluée selon les techniques proposées par **Rodriguez-Palacios et al. 2015** avec quelques modifications. Chaque échantillon de foie a été pesé et placé dans un rapport de 100 mg de tissu dans 1 ml de tampon de PBS (pH : 6) contenant 0,5 % de HTAB et homogénéisé à froid. L'homogénat a été centrifugé à 12 000 g à 4 °C pendant 5 min. Le surnageant a été ajouté dans des plaques à 96 puits en triple exemplaire à un volume de 20 µl. Ensuite, 200 µl de PBS (1/10, pH 6,0), contenant 190 µl (8 mg/ml de dichlorhydrate d'o-dianisidine) et 10 µl H₂O₂ (0,1 %). Après incubation pendant 5 min, L'absorbance à 620 nm a été mesurée à l'aide d'un lecteur microplaque.

La mesure de l'infiltration cellulaire est effectuée en comparant le nombre total de cellules dans le groupe traité comparé au groupe de contrôle.

Le pourcentage d'inhibition de l'activité MPO est obtenu selon la formule suivante :

$$\% I = \frac{Ac - At}{Ac} \times 100, \text{ où}$$

Ac = Absorbance du groupe contrôle et At = Absorbance du groupe tes

II.2.4.4.2 Dosage de l'activité tissulaire du glutathion (GSH)

L'activité de la Glutathion a été évaluée selon les techniques proposées par **Sedlak et Lindsay. 1968** avec quelques modifications. Tous les échantillons ont été pesés et placés dans un rapport de 100 mg de tissu dans 1 ml de tampon de PBS (pH : 7), homogénéisé à froid. L'homogénat a été centrifugé à 12 000 g à 4 °C pendant 5 min. le surnageant a été ajouté dans des microplaques à 96 puits en triple exemplaire à un volume de 50 µl. Ensuite 150 µl de 10 mM 5,5'- l'acide dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) ont été ajoutés. La réaction du GSH avec le DTNB a produit un dérivé de couleur jaune de l'acide 5'-thio-2-nitrobenzoïque (TNB). En passe à la lecture après 5 min, à une absorbance de 412 nm à l'aide d'un lecteur microplaque (BioTek, Elx800, USA). Concentration de GSH (µmol/mg prot) a été calculée à partir d'une courbe standard utilisant différentes concentrations de norme GSH, est présentée en annexe N° 05.

II.2.5 Étude histologique

Les coupes histologiques ont été réalisées au niveau du service d'histopathologie au sein du laboratoire de médecine de l'Université de Bejaia. Cette étude permet de valider l'éventuelle hépato-protection des extraits de *Fraxinus angustifolia* encapsulés ou non, à travers la visualisation microscopique des foies des différents groupes et détecter, pour chacun, la présence ou l'absence de lésions.

La partie de chaque foie récupéré dans le formol destinée à l'étude histologique a été coupée longitudinalement pour obtenir des segments. Ces derniers ont été mis dans des cassettes, puis fixés dans du formol (10 %) pendant 24 h

Mettre les cassettes dans le panier et le faire passer dans le cycle par l'appareil de l'automate de déshydratation qui possède 12 bains (figure. 17), ce cycle est constitué de trois phases ; phase de déshydratation, phase d'éclaircissement et la phase d'inclusion.

Passage des échantillons dans les huit bains d'éthanol de concentration croissante (de 70% jusqu'à 100%) pendant 45 min pour chaque bain.

Le passage des échantillons dans les deux bains d'un liquide intermédiaire pendant 30 minutes pour chaque bain, afin d'en éliminer les traces d'éthanol absolu. On utilise dans cette étape d'imprégnation le xylène, solvant intermédiaire favorable aux échanges membranaires entre l'éthanol -- xylène d'une part et le xylène -- paraffine d'autre part.

L'arrivage des échantillons aux deux derniers bains de paraffine, ils restent pendant 1h 30min dans chaque bain, ce qui permet la pénétration de la paraffine à l'intérieur des tissus (cellules) grâce à la solubilité de la paraffine dans le xylène, et ceci pour but de donner une certaine rigidité aux tissus afin de permettre la réalisation des coupes fines d'une épaisseur de 2 à 4 μm .



Figure 17 : Déshydratation par un automate de déshydratation.

L'inclusion (station d'enrobage) a été réalisée dans des moules permettant la confection de cassettes qui se montent ensuite sur le microtome. Les différents segments ont été entièrement immergés dans une paraffine chaude ($68\text{ }^{\circ}\text{C} - 70\text{ }^{\circ}\text{C}$) (figure. 18), puis congelés à une température qui varie entre $5,8\text{ }^{\circ}\text{C}$ et $6,1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Les coupes ont été ensuite réalisées avec une épaisseur de $3\text{ à }5\text{ }\mu\text{m}$ sur le microtome, et transférées dans un bain-marie à $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Les coupes ont été étalées sur des lames et laissées sur une plaque chauffante à $52\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant environ 10 min. Ainsi, les lames ont été mises dans des porte-lames et chauffées à l'étuve à une température de $78\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 2 à 3 h.



Figure 18 : Les étapes de l'enrobage (la mise en bloc)

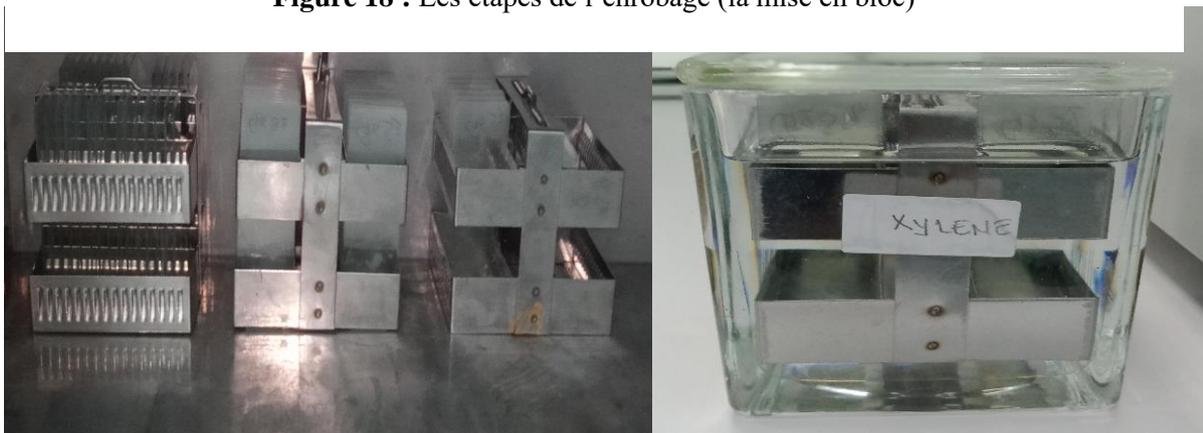


Figure 19 : Placement des lames dans l'étuve à $T\text{ }74^{\circ}\text{C}$ (A) ; L'émergence des lames dans xylène (B).

Les lames sont placées dans une étuve réglée à une température de $74\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 24h, afin d'éliminer la paraffine périphérique (figure. 19 A). En suite les lames sont immergées dans un

Chapitre II : Matériel et méthodes

bain de xylène pendant 30 min, ce qui permet l'élimination de la paraffine intra cellulaire (figure. 19 B).

Les lames sont incluses dans de l'éthanol pendant 10min, puis dans de l'eau, ce dernier pénètre à l'intérieure des cellules ce qui favorise au colorant lui-même de pénétrer les membranes cellulaires (préparation à la coloration).

Après rinçage, les coupes réhydratées ont été placées dans un bain d'hématoxyline pendant 2 min pour colorer les noyaux. L'excès de colorant est enlevé par rinçage avec de l'eau. Elles ont été mises ensuite dans un bain d'éosine pendant 30 secondes pour colorer le cytoplasme, puis rincées avec de l'eau et mises dans un bain d'alcool (3 min) pour éliminer l'excès de colorant (figure.20).

Les coupes ont été incubées ensuite dans un bain de xylène (15 min) pour éliminer l'alcool et nettoyer les lames. Après coloration, les lames ont été couvertes de lamelles à l'aide d'un Eukit (étape de montage) illustrée dans la figure 21, puis laissées à l'air libre pour le séchage. Après le séchage, les lames ont été nettoyées avec du xylène pour éliminer l'excès de l'Eukit. Ainsi les lames sont prêtes pour l'observation microscopique à l'aide d'un microscope optique (OPTIKA) à des grossissements différents G ($\times 4$; $\times 10$; $\times 40$) avec appareil photo intégrée.



Figure 20 : Les étapes de la coloration hématoxylène éosine (H&E).



Figure 21 : Montage des échantillons.

II.2.6 Étude statistique :

Les résultats ont été exprimés par une moyenne \pm SEM (Standard Error Mean). Les différences entre les groupes ont été déterminées en utilisant le logiciel Graph Pad Prism 5.03, l'analyse de la variance one-way ANOVA. Les différences ont été considérées comme significatives à $P < 0,05$.

III Chapitre III :

Résultats

III.1 Le rendement de l'extrait

Le choix de la méthode d'extraction à utiliser est très important avant l'analyse qualitative et quantitative des extraits de plantes. Nous avons opté une extraction par macération de la poudre végétale dans l'éthanol, le choix de ce solvant a été utilisé dans le but d'extraire le maximum de composés phénoliques, comme il est moins altérant que le méthanol (Mueller-Harvey, 2001).

Les taux d'extraction des extraits *Fraxinus angustifolia* des feuilles (FAF) et d'écorce (FAE) sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau IV : Taux d'extraction (%) des feuilles et d'écorce de *Fraxinus angustifolia*.

L'extrait	Rendement
Écorce (FAE)	32,49%
Feuille (FAF)	41, 9 %

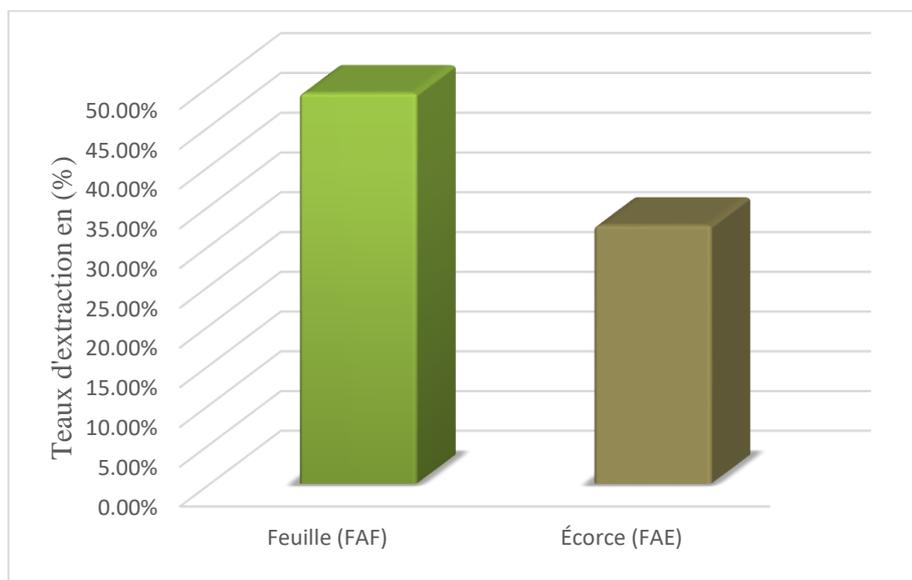


Figure 22 : diagramme en barres représente le taux d'extraction des deux extraits (EAE) et (EAF).

Les taux d'extrait brut des différentes parties de la plante étudiée présentent des rendements considérablement importants, dont la meilleure teneur est constatée par l'extrait éthanolique des feuilles de *Fraxinus angustifolia* (41,90%) par rapport à celui obtenu avec l'écorce (32,49%), (figure. 22).

III.2 Teneurs en polyphénols et flavonoïde

Les méthodes colorimétriques sont principalement utilisées pour leur simplicité et leur sensibilité élevée. Le contenu en phénols totaux des deux extraits a été estimé par la méthode de Folin-Ciocalteu, alors que les flavonoïdes a été déterminé par les méthodes de chlorure d'aluminium.

Le taux des phénols totaux et des flavonoïdes dans les extraits éthanoliques du *Fraxinus angustifolia* ont été déterminés par méthode colorimétrique, et les résultats obtenus sont exprimés en mg Eq AG/g extrait pour les phénols totaux et mg Eq Q/g extrait pour les flavonoïdes. La teneur en polyphénols dans sont représentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau V : Teneurs en phénols totaux et flavonoïdes et tannins dans les extraits éthanoliques d'écorce et de feuille de *F. angustifolia*. Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm SD.

Extrait	Quantité des phénols totaux (mg EAG/g extrait)	Quantité des flavonoïdes (mg Eq Q/g extrait)
FAF	84,28 \pm 3,88	52,26 \pm 1,98
FAE	78,08 \pm 5,4	25,16 \pm 3,19

A la première lecture des résultats, nous constatons que les teneurs des extraits varient de 84 mg Eq acide gallique/g d'extrait pour FAF à 78 mg Eq AG/g d'extrait pour FAE.

Les flavonoïdes sont quantifiés en mg équivalent de quercétine ; l'extrait FAF a enregistré aussi la teneur la plus élevée estimée à 52,26 \pm 1,98 mg EQ/g d'extrait, contre 25,16 \pm 3,19 mg EQ/g d'extrait FAE.

Selon les résultats illustrés ci-dessus (tableau VI), on remarque que *F. angustifolia* est riche en polyphénols, les teneurs obtenues sont : 84,28 mg EAG/g pour FAF contre 78,08 mg EAG/g pour FAE.

La méthode de Folin-Ciocalteu est très sensible mais malheureusement peu spécifique car beaucoup de composés réducteurs non phénoliques peuvent interférer tels que les caroténoïdes et la vitamine E (Kahkonen et al., 1999) ; cependant, elle reste la méthode la plus utilisée. Les teneurs des extraits des feuilles et d'écorce de *Fraxinus Angustifolia* ont été

exprimées en équivalent d'acide gallique à partir de la courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions (annexe N° 03).

III.2.1 Analyse sur microscope optique

Nous nous attaquons ainsi à l'analyse de la formulation des liposomes, et obtenons ces photos prises par appareil (figure. 23) :

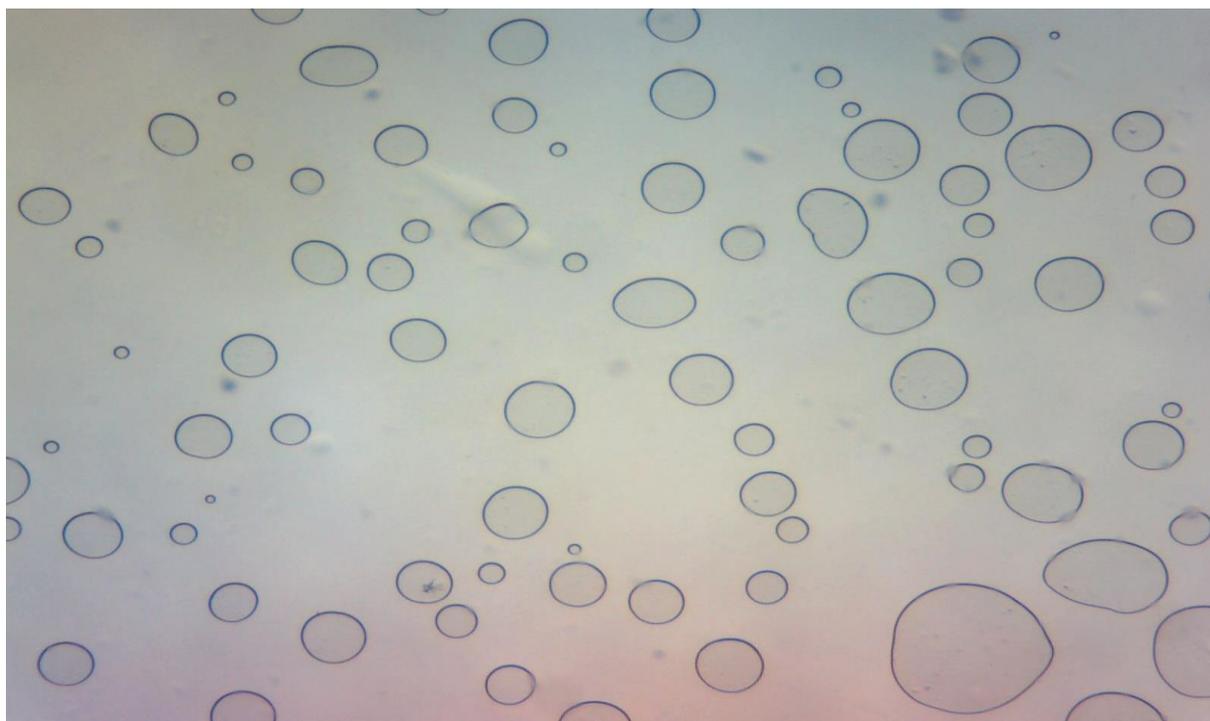


Figure 23 : Structures des liposomes observés par un microscope optique à grossissement ($G \times 20$).

D'après les images obtenues (figure. 23), les microparticules à base d'une matrice phosphatidylcholine incorporant les extraits sont bien présentes en solution, à l'œil, nous pouvons déduire que leur forme diffère mais elles ont plus ou moins toutes un aspect sphérique.

III.3 Étude de l'effet hépato-protecteur des extraits de *F. angustifolia* contre la toxicité induite par le paracétamol

L'effet hépato-protecteur des extraits éthanolique des feuilles et d'écorce de *Fraxinus angustifolia* seuls et encapsulés ont été évalués en utilisant la souris comme modèle animal. L'hépatotoxicité a été induite par l'injection intra-péritonéale d'une dose de 500 mg/kg du paracétamol. Plusieurs tests ont été réalisés pour déterminer l'effet préventif des extraits seuls encapsulés dans des liposomes, et cela, à travers le dosage des transaminases, la mesure enzymatique de la myelopéroxydase, la glutathion et une étude histopathologie du foie.

III.3.1 Changement des poids corporel

Tableau VI : Changement des poids corporel des souris.

Poids (P) en (g)	contrôle	liposome	E seul	F seul	E encapsulé	F encapsulé
P initial	38,61±4,29	33,08±0,99	31,83±1,47	28,45±1,18	32,05±2,59	31,96± 1,43
P final	35±3,95	29,95±0 ,97	28,82±2,01	24,75±1,76	28,80±2,95	30,09±1,25

III.3.2 Poids relatifs des foies des souris

Les foies des souris ont été pesés après leur excision pour vérifier s'il y a une augmentation ou une diminution de leur taille due à une inflammation ou une nécrose, respectivement. Les poids relatifs des foies ont été ensuite calculés et sont représentés dans la (figure. 24).

Elle montre qu'il n'existe aucune différence significative entre les poids relatifs des foies de toutes les souris traitées avec l'extrait éthanolique des feuilles et d'écorce de *F. angustifolia* seul et encapsulé à la concentration de 200 mg/kg par rapport au groupe extrait éthanolique de feuille seul et le groupe liposome seul, suggérant que le poids du foie a été proportionnel à celui de la souris. Ceci veut dire que le paracétamol n'a pas causé des lésions significatives aux foies des souris. L'observation à l'œil nu a confirmé l'absence de modifications dans la taille des foies des souris chez les groupes mentionnés ci-dessus. Par contre celui du groupe contrôle, on a remarqué un gonflement du foie de cette souris par rapport aux foies des souris des autres groupes. Ce gonflement est révélateur d'une inflammation plus accrue du foie de ces souris par rapport aux autres groupes.

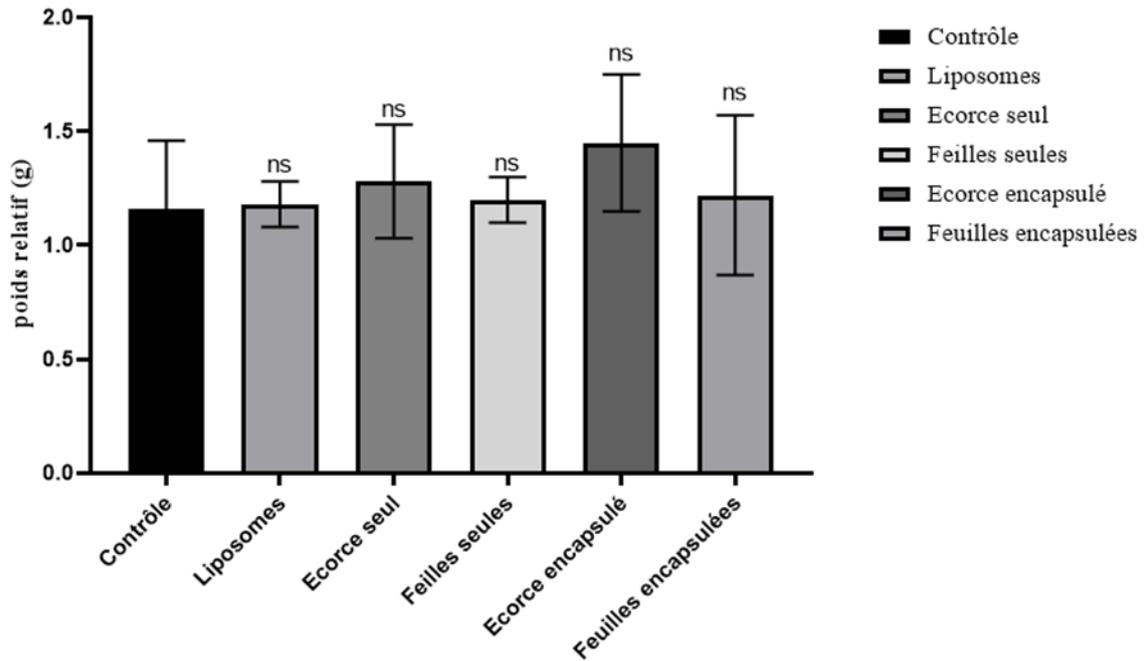


Figure 24 : poids relatifs moyen des souris chez les souris traités par les extraits d'écorce seul, feuilles seules, écorce encapsulé, feuilles encapsulés de *Fraxinus angustifolia* et liposomes. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. (n= 4), tous les groupes sont reçus une dose de 500 mg/Kg de paracétamol.

III.3.3 Effet des extraits des feuilles et d'écorce de *F. angustifolia* encapsulés ou seul sur les taux hépatiques de GSH chez des souris

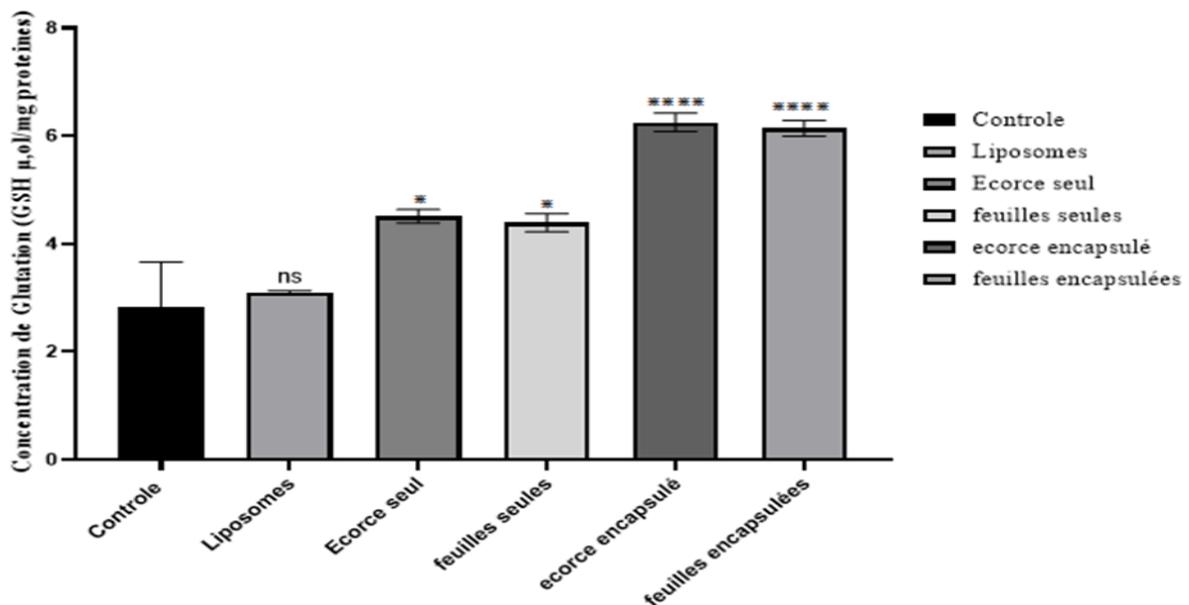


Figure 25 : Le taux de GSH chez les souris traités par les extraits d'écorce seul, feuilles seules, écorce encapsulé, feuilles encapsulées de *Fraxinus angustifolia* et liposome. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. (n= 4), tous les groupes sont reçus une dose de 500 mg/Kg de paracétamol.

Les données montrent une diminution significative des taux de GSH au niveau du foie des souris du groupe liposome, en raison de son interaction avec le processus de détoxification, de neutraliser le NAPQI, ce pendant lorsque la dose de paracétamol est élevée la quantité de NAPQI produite dépasse la capacité de GSH à la neutralisation ce qui entraîne une diminution de GSH hépatique. Par contre chez les souris traitées par les extraits seuls et encapsulés, où le taux de GSH a subi une augmentation chez les groupes FAF encapsulé et FAE encapsulé d'une manière hautement significative, par rapport aux groupes des souris traités par FAF et FAE seuls, l'administration de ces extraits encapsulés a augmenté le taux de GSH (figure. 25).

III.3.4 Dosage de l'activité de MPO

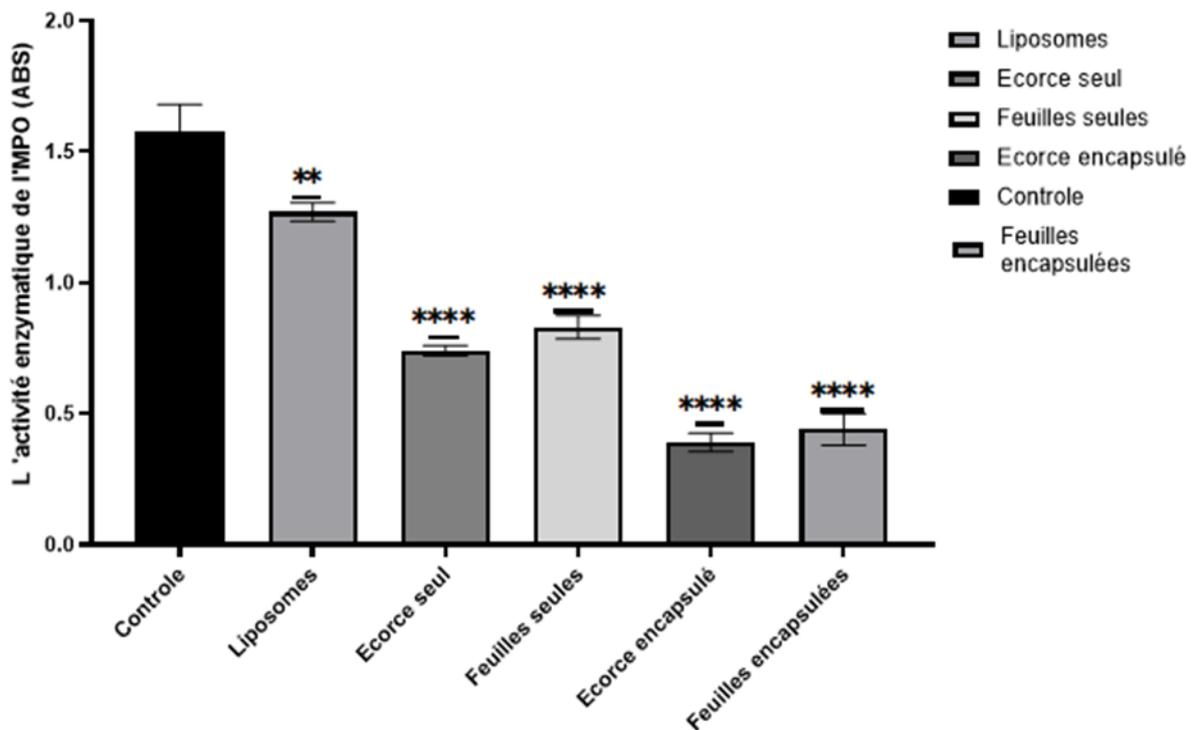


Figure 26 : L'activité enzymatique de la MPO chez les souris traitées par les extraits d'écorce seul, feuilles seules, écorce encapsulé, feuilles encapsulées de *Fraxinus angustifolia* et liposome. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. (n= 4), tous les groupes sont reçus une dose de 500 mg/Kg de paracétamol.

Le dosage de l'activité de la MPO a montré qu'il a subi une augmentation significative au niveau du foie, chez le groupe liposomes seuls. Les extraits FAF et FAE seul et encapsulés ont la capacité de réduire de manière très hautement significative l'activité de la MPO dans le foie des souris.

III.3.5 Évaluation des taux sériques des transaminases (ALAT et ASAT)

Effet de l'extrait sur les taux des transaminases chez des souris normales. L'évaluation de l'effet hépato-protecteur des extraits éthanoliques de *Fraxinus angustifolia* seuls et encapsulé dans des liposomes contre la toxicité induite par le paracétamol, a été effectuée on se basant sur plusieurs paramètres, parmi eux on a mesuré les activités enzymatiques des paramètres biochimiques, telle que (ASAT) et (ALAT), dont les normes sont considérées comme suit : ASAT [75 – 225] U/L et pour ALAT [15 – 45] U/L.

Tableau VII : Variation de la concentration sérique du ASAT et ALAT dans le sérum des rats traités par le paracétamol (500 mg/ml) et l'extrait de la plante *Fraxinus Angustifolia*.

Les transaminases Les groupes	Alanine Amino Transférase (ALAT) U/L	Aspartate Amino Transférase (ASAT) U/L
Liposomes seuls	48,35 ± 2,26	256,96 ± 7,14
FAE seul	44,87 ± 1,60	180,88 ± 2,72
FAF seule	30,51 ± 1,82	172,71 ± 2,10
FAE encapsulés	27,94 ± 3,66	136,08 ± 6,09
FAF encapsulés	39,71 ± 3,78	122,09 ± 33,76
Contrôle	88,03 ± 5,34	416,26 ± 30,27

V : Véhicule (NaCl 0,9 %), FAF: Extrait éthanolique des feuille de *F. angustifolia* FAE: Extrait éthanolique d'écorce de *F. angustifolia*. Toutes les valeurs sont représentées par la moyenne ± SEM, (N = 4), one-way

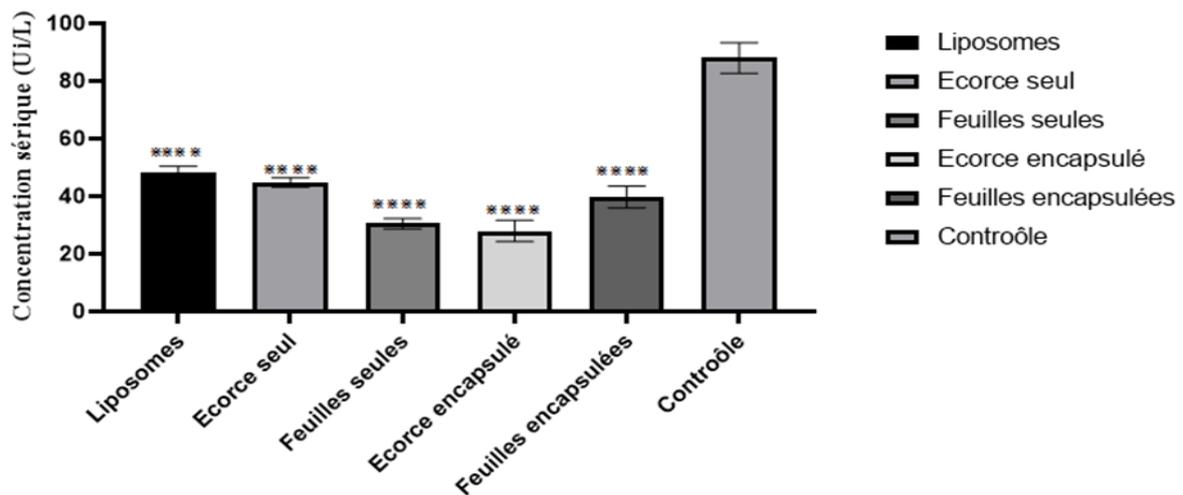


Figure 27 : concentration sérique de l'enzyme ALAT chez les souris traités par les extraits d'écorce seul, feuilles seules, écorce encapsulé, feuilles encapsulés de *Fraxinus angustifolia* et liposomes. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM. (n= 4), ANOVA, suivie du test de Dunette, a été utilisée pour l'analyse statistique * P < 0,05 ; ** P < 0,01 ; *** P < 0,001 comparé au groupe contrôle, tous les groupes sont reçus une dose de 500 mg/Kg de paracétamol.

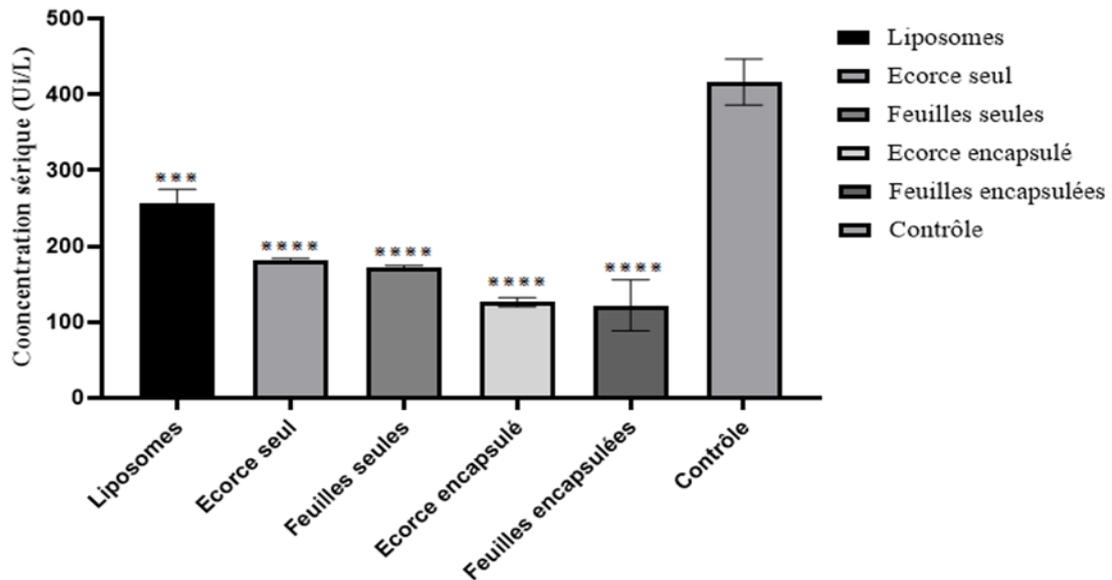


Figure 28 : concentration sérique de l'enzyme ASAT chez les souris traités par les extraits d'écorce seul, feuilles seules, écorce encapsulé, feuilles encapsulées de *Fraxinus angustifolia* et liposomes. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM. (n= 4), tous les groupes sont reçus une dose de 500 mg/Kg de paracétamol.

Il a été observé une augmentation des taux sériques de ALAT ($88,03 \pm 5,34$ U/L) et de ASAT ($416,26 \pm 30,27$ U/L) au niveau du groupe contrôle traité par le paracétamol (500 mg/kg) en comparaison aux autres groupes traités extraits de (FAF) et (FAE) encapsulés ou non (Tableau VII). Même remarque pour le groupe traités par les liposomes seules, on a observé une augmentation légère et peu significative, atteint les limites considérées, avec les valeurs de ($48,35 \pm 2,26$ U/L) pour ALAT et ($256,96 \pm 17,14$ U/L) pour ASAT (figure. 27 et 28)

L'administration des extraits des feuilles et d'écorce de *Fraxinus angustifolia* à 200 mg/kg encapsulé dans des liposomes, suivie d'une dose de 500 mg/kg de paracétamol a montré une diminution dans les taux de ALAT ($27,94 \pm 3,66$ UI/L) ; ($39,71 \pm 3,78$ UI/L) et de ASAT ($136,08 \pm 6,09$ UI/L) ; ($172,71 \pm 2,10$ UI/L), comparativement au groupe extraits seuls avec ALAT ($44,87 \pm 1,60$ UI/L) ; ($30,51 \pm 1,82$ UI/L) et de ASAT ($180,88 \pm 2,72$ UI/L) ; ($172,71 \pm 2,10$ UI/L) écorce et feuille respectivement. (Figure. 27 et 28)

III.3.6 L'étude histopathologique du foie

Les examens histopathologiques des sections de foie des souris sont représentés dans la figure 30 Chez le groupe contrôle et le groupe liposome seul, on observe une hépatotoxicité sévère indiquée par plusieurs types de lésions ont été décelées, parmi elles, la dilatation et la

congestion de la veine centro-lobulaire, des infiltrations des neutrophiles, des stéatoses et des foyers de nécrose (Figure. 29).

Après administration des deux extraits FAF et FAE encapsulés dans des liposomes ou seul à une dose de 200 mg/kg, les lésions causées par le paracétamol sont moindres par rapport au contrôle. On remarque un aspect normal des hépatocytes, une congestion, et une absence totale de la stéatose, de la nécrose et de l'infiltration de neutrophiles (figure. 30).

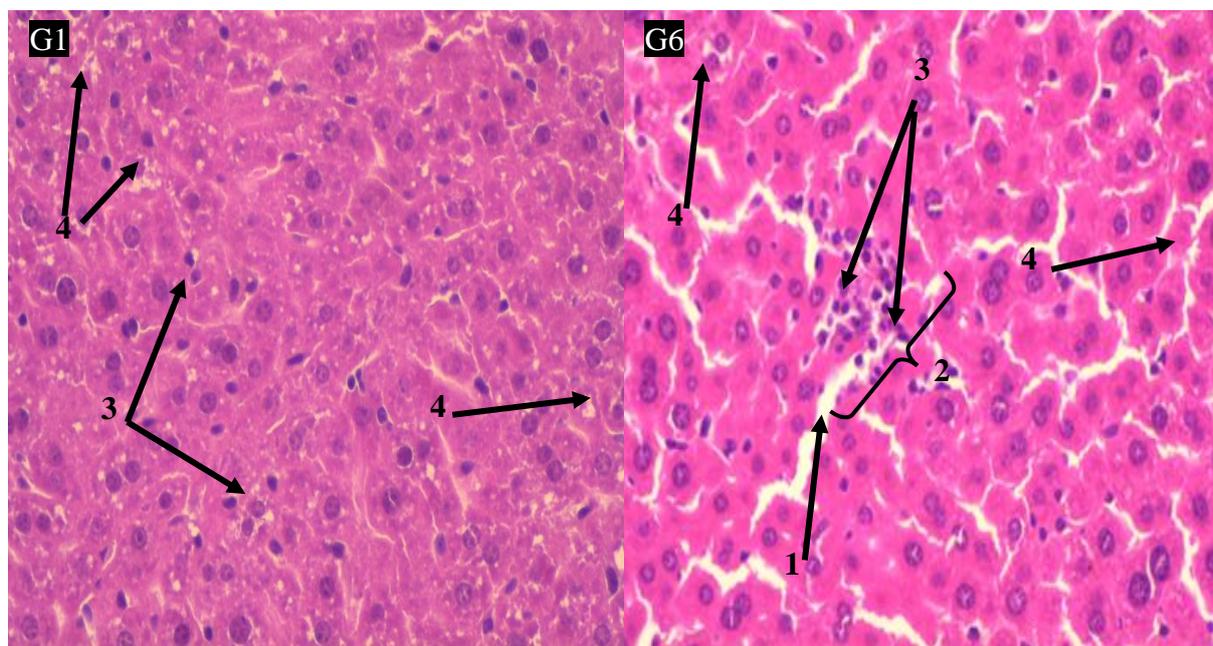


Figure 29 : les coupes histologiques du foie observées par microscope optique avec un grossissement $G \times 20$, G1 représente (le groupe traité par liposomes seuls) ; G6 représente (le groupe contrôle négatif) ; (1) dilatation de la congestion de la veine centro-lobulaire (2) inflammation (3) neutrophiles (4) stéatose et nécrose.

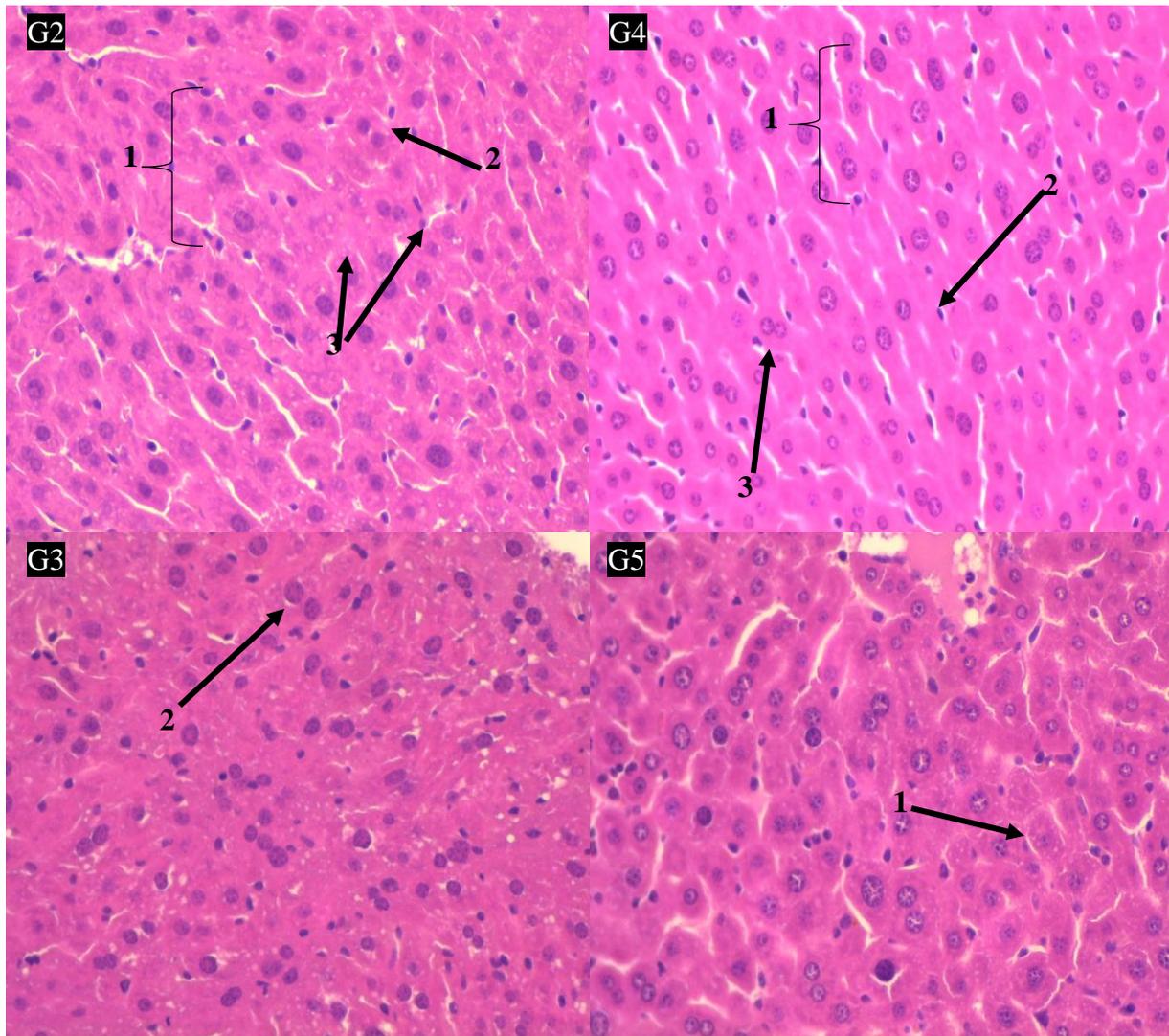


Figure 30 : Les coupes histologiques du foie observées par microscope optique avec un grossissement $G \times 20$, dont chacun représenté par son traitement G2 (écorce seul) ; G4 (écorce encapsulé) ; G3 (feuilles encapsulés) ; G5 (feuilles seules) ; (1) cellules normales, (2) absence de stéatose et de nécrose, (3) une congestion.

IV Chapitre IV :

Discussion

L'être humain est exposé à plusieurs substances toxiques d'origine endogène ou de provenance exogène qui sont généralement détoxifiées par le foie. Le NAPQI, métabolite issu de l'oxydation du paracétamol par le CYP 450, est l'une des toxines éliminées par le foie grâce à sa conjugaison à l'antioxydant GSH (Meister et Anderson, 1983). L'accumulation de NAPQI induit l'épuisement de l'antioxydant (Reid et al., 2005) menant ainsi à l'hépatotoxicité par plusieurs mécanismes, parmi eux la peroxydation lipidique (Hinson, 2010). L'hépatotoxicité induite par le paracétamol est très fréquente car il est l'antalgique et l'antipyrétique le plus utilisé mondialement (Mitchell et al., 2011). Cette hépatotoxicité peut engendrer différentes pathologies telles que la stéatose et représente la première cause d'insuffisance hépatique aiguë en Europe et en Amérique du Nord (Pachikian et al., 2010). Au cours des dernières années, l'utilisation de médicaments à base de plantes pour le traitement des maladies du foie a augmenté partout dans le monde (Luyckx et Scheen, 1997). Par conséquent, remplacer les remèdes synthétiques ayant des effets secondaires qui causent l'urticaire et l'hypotension (Larocque, 2013) par des molécules d'origine naturelle qui ne retiennent que l'efficacité thérapeutique souhaitée, est devenu la priorité de plusieurs laboratoires de pharmacologie.

Fraxinus angustifolia est une plante largement utilisée dans la médecine traditionnelle pour prévenir et guérir plusieurs pathologies (Fournier, 2010). Afin de valider cette utilisation, plusieurs études ont été conduites sur ses feuilles et sur l'écorce. Ces dernières ont montré différentes activités biologiques telles que l'activité anti-inflammatoire (Moulaoui et al., 2015 ; Berboucha et al., 2010), antioxydant (Atmani et al., 2009), antidiabétique (Medjahed et al., 2016), ainsi qu'une activité anti-péroxydation lipidique *in vitro* (Medjahed et al., 2016). Ce qui a permis de suggérer que cette plante pourrait avoir une activité hépato-protectrice *in vivo* protégeant ainsi le foie contre un stress oxydant. Afin de pouvoir tester l'effet hépatoprotecteur des feuilles et écorce *F. angustifolia*, l'extraction des principes actifs contenus dans cette partie est une étape indispensable. Il a été rapporté que cette extraction est influencée par la méthode d'extraction, la taille des particules, la période de la récolte et les conditions de stockage (Chavan et al., 2001).

L'éthanol est un excellent solvant qui permet l'extraction des polyphénols et possède une faible toxicité en comparaison à celle du méthanol (Cowan, 1999). Pour cela, les extraits éthanoliques des feuilles et d'écorce de *F. angustifolia* ont été utilisés pour cette étude. Il a été

préparé à partir d'une fine poudre de 63 µm dans le but d'augmenter la surface d'échange entre le solvant et la poudre.

Le résultat obtenu dans notre étude (figure. 23) sont supérieur à celui trouvé dans d'autres études ; notamment celle de **Benzeghiba et Hadji (2018)** effectuée sur les deux régions de Bordj Bou Arreridj (Gueliaa « 18,5% » et Genzette « 21,2% »), et celle de **Abbas et Miloudi (2017)** au niveau d'El-Djelfa « 16,91% ».

Nos résultats sont en accord avec la littérature, où le rendement d'extraction des composés phénolique varié en fonction de la partie utilisée, le mode de récolte, le solvant d'extraction, le temps de contact, le type et le protocole d'extraction (**Felhi et al., 2017; Kouweltonet al., 2017**).

Le critère de taux d'extraction n'est pas suffisant pour préconiser la richesse d'un extrait en composés phénoliques car les extraits de plantes contiennent d'autres pigments. Cette évidence est montrée dans l'étude de quantification des phénols totaux et des flavonoïdes discutés ci-dessous.

Les résultats obtenus dans le tableau V montrent les teneurs en polyphénols totaux et flavonoïdes dans les deux extraits de *Fraxinus*, Ces résultats concordent avec ceux obtenus par **Atmani et al. (2009)** en termes de proportions (teneurs plus importantes dans l'extrait FAF que FAE). Toutefois, ils ont rapporté des teneurs moindres en polyphénols et en flavonoïdes dans les extraits testés.

Une autre étude menée par **Katanilic et ses collaborateurs (2006)** dans laquelle un classement de 70 plantes médicinales a été effectué selon leur richesse en phénols totaux, montre que les taux trouvés varient de 9 à 118 mg Eq cat/g d'extrait. En comparant nos résultats à ceux apportés par ces auteurs, on conclue que *F. angustifolia* est riche en ces composés tel qu'elle est déjà considérée par **Li et ses collaborateurs (2008)**, en la classant deuxième en terme de teneur en phénols totaux, parmi les 45 plantes médicinales qu'ils ont étudié.

Des résultats semblables ont été obtenus dans des études antérieures (**Athmena et al., 2009**). Chez la même famille de la plante, un taux de flavonoïdes plus élevé ($95,56 \pm 1,50$ mg Eq cat/g extrait) a été retrouvé chez *Fraxinus americana* (**Owen et Johns, 1999**). Le genre *Fraxinus* est connu pour être une source riche en flavones et flavonols qui sont des dérivés de quercetine et kaempferol (**Kostova et Iossifova, 2006**). Par contre, la différence entre les taux

obtenus au niveau des feuilles et de l'écorce sont dus à la différences des fonctions physiologiques des parties de la plante (**Kähkönen et al., 1999**).

La différence dans la composition en phytochimiques entre les feuilles et l'écorce pourrait être liée à plusieurs facteurs. Le facteur déterminant est la partie de plante utilisé, la méthode d'extraction ; il a aussi été rapporté qu'au sein de la même espèce récoltée de la même région et même période, des variations dans la composition peuvent être dues au microclimat, à la composition du sol, à la pluviosité, aux agressions microbiennes et parasitaires, à la lumière (rayons UV) et l'âge de l'arbre (**Dorais et al., 2008**).

Des études récentes parlent sur un phénomène de distribution des liposomes dans le foie et la rate, montrent que la clairance rapide des liposomes dans la circulation par absorption dans les cellules du système phagocytaire mononucléaire dans le but de traité des maladies où il y avait une implication des facteur inflammatoire (**Gregoriadis et Neerunjun, 1974 ; Kimelberg et al., 1975 ; Juliano et Stamp, 1975**). Cette technique peut être efficace dans le cas d'une inflammation de tissu hépatique ou l'hépatite du foie, ce qui est dans notre objectif dans cette étude.

La période expérimentale a duré 5 jours car en comparaison à la littérature, cette durée est largement suffisante pour déterminer le potentiel hépatoprotecteur des extraits d'une plante (**Rasheed et al., 1995 ; Liu et al., 2011 ; Forouzandeh et al., 2012**). Plusieurs études ont montré que le paracétamol est un modèle expérimental prometteur pour évaluer l'effet hépatoprotecteur des extraits de plantes car l'utilisation d'une seule dose était suffisante pour induire l'hépatotoxicité (**Kanbur et al., 2009; Liu et al., 2011; Pandey et al., 2012; Soliman et al., 2014 ; Naguib et al., 2014**), alors que d'autres substances telles que l'aluminium nécessite plusieurs doses et une plus longue durée expérimentale (**Ighodaro et al., 2012**). Pour induire cette hépatotoxicité, la voie intra-péritonéale a été adoptée car l'effet qu'elle induit est plus rapide que la voie intra gastrique. Mais elle est moins efficace que la voie intraveineuse qui malheureusement demeure difficile à réaliser chez les souris. L'effet des extraits éthanolique des feuilles et d'écorce encapsulé dans des liposomes ou seul sur des biomarqueurs (ALAT, ASAT, GHS et MPO) a été testé car toute altération des niveaux basaux de ces paramètres est considérée comme signes de toxicités. Sous des conditions physiologiques ALAT et ASAT permettent la génération du pyruvate et de l'oxaloacétate, respectivement (**Naguib et al., 2014**), qui sont indispensables pour le cycle de Krebs (**Marieb, 2008**), en plus de la génération du glutamate (**Naguib et al., 2014**) qui est un acide

aminé glucoformateur et le neurotransmetteur excitateur le plus important du système nerveux central (**Marieb, 2008**).

Sur la base des résultats obtenus (figures. 26), on peut déduire que le paracétamol peut provoquer une diminution du GSH dans le foie, mais ce dernier joue un rôle crucial dans la protection contre l'hépatotoxicité induite par le paracétamol. Par conséquent, les extraits FAF et FAE encapsulés sont capables de restaurer les niveaux de GSH dans le foie, donc ont un effet hépato-protecteur.

Dans le cas d'une hépatotoxicité induite par le paracétamol, le mécanisme d'action du GSH est crucial. Le paracétamol est métabolisé dans le foie en un métabolite toxique (NAPQI). Le NAPQI est normalement neutralisé et détoxifié par le GSH grâce à son résidu cystéine, où le glutathion jouera le rôle d'électrophile et fixera le NAPQI. Le conjugué glutathion-NAPQI sera ensuite transporté en dehors des cellules du foie et transformé en acide mercapturique qui sera soit conjugué avec la N-acétylcystéine NAC soit relargué dans la circulation, pour être éliminé par voie urinaire (**Dehostingue, 2019**). Le GSH est régénéré à partir de son métabolite oxydé, le glutathion disulfure (GSSG), par l'enzyme glutathion réductase (GR). Cette réaction nécessite de l'énergie sous forme de NADPH, qui est fourni par la voie des pentoses phosphates. La régénération de GSH est importante pour maintenir des niveaux suffisants de GSH pour neutraliser les métabolites toxiques (**Garait, 2006**).

La MPO est une enzyme présente en concentrations importantes dans les granules primaires des cellules polynucléaires neutrophiles, un type de globules blancs qui joue un rôle dans le système immunitaire. Elle participe à la destruction des agents pathogènes au cours d'une réponse immunitaire (**Poretet *al.*, 2017**). Elle est un biomarqueur du stress oxydatif et de l'inflammation dans l'hépatotoxicité (**Pradhan *et al.*, 2022**). Elle peut catalyser la formation de diverses substances oxydantes, y compris les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les chloramines. Ces composés réactifs peuvent causer des dommages cellulaires et augmenter l'inflammation en activant des voies de signalisation inflammatoires dans les cellules hépatiques (**Klebanof *et al.*, 2013**). De plus, la MPO peut aggraver l'inflammation en recrutant et activant d'autres cellules inflammatoires, telles que les macrophages, par le biais de médiateurs chimiques. Les macrophages activés libèrent à leur tour d'autres médiateurs inflammatoires, amplifiant ainsi la réponse inflammatoire dans le foie. La MPO se lie avec une plus grande affinité à certains composants endommagés de la matrice extracellulaire, ce qui explique son accumulation sur les sites d'inflammation (**Hawkins et Davies, 2021**). Les

hépatocytes jouent un rôle important dans l'inflammation locale, tandis que la suppression de la MPO améliore l'inflammation hépatique (Luci et al., 2020).

Dans la présente étude, l'administration de 500 mg/kg du paracétamol par voie intrapéritonéale aux souris a conduit à une augmentation significative des taux sériques de ALAT ($88,03 \pm 5,34$ U/L) en comparaison au groupe liposome. ALAT est une enzyme spécifique du foie, retrouvée dans le cytosol des hépatocytes et est fortement libérée dans le sang lors de la lyse hépatocytaire. ASAT, quant à elle, est retrouvée dans les mitochondries des hépatocytes, des reins, du cerveau, du muscle cardiaque et squelettique (Naguib et al., 2014). Elle est libérée excessivement dans la circulation sanguine suite à des dommages structurels du foie, ce qui explique l'augmentation significative des niveaux de cette enzyme chez le groupe ayant reçu le contrôle ($416,26 \pm 30,27$ U/L) comparativement aux autres groupes.

Ces résultats ont été confirmés par l'étude histopathologique qui a montré que le groupe contrôle a induit des dilatations et congestions de la veine centro-lobulaire, des stéatoses, des nécroses et des infiltrations des neutrophiles (Figure. 30). Ces observations sont probablement dues à l'accumulation du NAPQI qui conduit à l'épuisement du GSH permettant ainsi la génération des espèces réactives de l'oxygène. Ces dernières provoquent la transition de la perméabilité mitochondriale à travers la peroxydation lipidique (Hinson, 2010). Les cellules T cytotoxiques du foie activé, libèrent le TNF- α , les perforines et les granzymes qui sont responsables de la nécrose des hépatocytes. Cette nécrose est suivie par la libération des DAMPs (Danger associated molecular patterns) qui vont activer les cellules de Kupffer. L'activation de ces cellules permet la sécrétion des médiateurs inflammatoires, des cytokines et des chimiokines favorisant l'apoptose des hépatocytes et activant le système immunitaire inné. Ceci conduit au recrutement et l'accumulation des monocytes et neutrophiles au site de l'inflammation et des nécroses hépatocytaires (Krenkel et al., 2014), induisant ainsi une large congestion et dilatation de la veine centro-lobulaire. Les stéatoses observées (Figure. 30) sont le résultat du stress oxydant qui touche le reticulum endoplasmique.

Par conséquent, le potentiel hépatoprotecteur de l'extrait pourrait être testé. Le traitement des souris avec les liposomes incorporant l'extrait éthanolique des feuilles et d'écorce de *Fraxinus angustifolia* à 200 mg/kg a permis une réduction significative des taux de ASAT, ALAT et MPO ainsi qu'une augmentation de GSH en comparaison aux groupes traités avec les extraits d'écorce et feuille seule.

Campbell et ses collaborateurs (2012) ont prouvé que les nanoparticules ayant un diamètre entre 20 et 200 nm pouvaient avoir une pénétration sur la surface des cellules et à partir de là, de telles particules agissent en tant que réservoirs de médicament, leurs libération est ainsi contrôlée et peut être maintenue pendant de longues périodes de temps.

Ceci est soutenu par la présence d'une structure hépatique d'aspect normale chez les groupes traité avec *Fraxinus angustifolia*. Ces résultats coïncident avec ceux d'autres travaux (**Ali et al., 2013; Pandey et al., 2012**). L'effet protecteur de ces deux extraits encapsulé et seul est dû aux flavonoïdes qui agissent comme un scavenger de radicaux libres, protégeant ainsi la cellule et réduit l'inflammation (**Fakurazi et al., 2008**).

Les liposomes incorporant les extraits de feuilles et d'écorce de *Fraxinus angustifolia* ont restauré les niveaux du GSH de la MPO.

Le paracétamol peut inhiber l'activité d'enzymes génératrices du NADPH, qui est un coenzyme nécessaire pour la régénération du GSH, ce dernier étant un antioxydant important pour la cellule, qui assure la protection contre les espèces réactives de l'oxygène (**Florin et al., 2014**). Les travaux d'une étude ont montré que la présence de la quercétine cause une augmentation significative de la GSH et la diminution de la NADP-H, cette activité protectrice est liée d'un côté à ses propriétés antioxydants et à l'induction de la GSH qui est un antioxydant endogène (**Özkaya et al., 2010**). Vu que la présence de la quercétine dans les extraits des feuilles et d'écorce de *F. angustifolia* a été démontrée (**Ayouni et al., 2015**), l'activité hépatoprotectrice de cette plante peut être justifiée.

L'étude histologique a exhibé que les lésions sévères provoquées par le paracétamol ont été remarquablement réduites par l'administration des extraits des feuilles et d'écorce de *F. angustifolia* seul ou vectorisé dans des liposomes, vu l'absence de nécrose et de stéatose. De plus, il s'est avéré que le profil pharmacologique de ces liposomes incorporant les deux extraits est comparable à celui de la silymarine, (réduction des taux des transaminases et du MPO), suggérant ainsi qu'ils peuvent agir par les mêmes mécanismes. En se basant sur la littérature (**Kanbur et al., 2009; Liu et al., 2011**), l'extrait de feuilles et d'écorce *F. angustifolia* peut être considéré comme une source de phytochimiques capables de contrer l'hépatotoxicité induite par le paracétamol. Les résultats obtenus permettent de suggérer que le potentiel hépato-protecteur des extraits, augmentant ainsi les taux hépatiques du GSH, peut être dû à son activité anti-peroxydation lipidique *in vivo*. En outre, l'absence des infiltrations des neutrophiles, des nécroses et/ou de l'apoptose qui sont confirmées par la réduction de la

libération des transaminases peut être due à l'activité anti-inflammatoire et anti-apoptotique de ces deux extraits. Par conséquent, ces activités sont en partie responsables de l'activité hépatoprotectrice des extraits de *F. angustifolia*. Par ailleurs, l'effet hépatoprotecteur de cette plante peut être dû à sa richesse en phyto-constituants qui ont été déjà identifiés par des études antérieures telles que les flavonoïdes, l'acide caféique (**Greenaway et al., 1990**), le salicylate (**Rubiolo et al., 2013; Dudonné et al., 2011**) et la quercétine (**Palo, 1983**). Ceci permet donc de suggérer que les extraits éthanolique des feuilles et d'écorce de *Fraxinus angustifolia* pourraient agir par l'une des voies ou la combinaison de plusieurs voies citées ci-dessous :

L'effet anti-inflammatoire de *F. angustifolia*, révélé par cette étude, a été déjà déterminé par **Moulaoui et al. (2010)** et **Fales et al. (2013)**. Ceci est probablement dû à l'inhibition de la voie NFκB. Cette suggestion est soutenue par d'autres travaux, ayant démontré que l'acide caffeoylquinine (**Lee et al., 2010**) et les flavonoïdes (**Liu et al., 2011; Zhang et al., 2013**) inhibent l'expression des molécules pro-inflammatoires, NOSi et COX. L'étude de **Atmani et al. (2009)** et **Ayouni et al. (2016)** ont montré que les extraits des feuilles et d'écorce de *F. angustifolia* présente une activité antioxydant. Cette activation est probablement due à la présence de l'acide caffeoylquinine, des flavonoïdes et des coumarines. Par ailleurs, les travaux de **Lee et al. (2010)** ont montré que le acide caffeoylquinine active le facteur Nrf 2 et induit la synthèse des molécules anti-oxydantes et des enzymes de détoxification de la phase II. Aussi, l'acide salicylique, un piègeur des radicaux hydroxyyles (**Rohnert et al., 1998**), peut être responsable de l'activité antioxydant. Un autre mécanisme d'hépto-protection plausible est l'inhibition de la CYP450 par les flavonoïdes présents dans les extraits des feuilles et d'écorce de *Fraxinus angustifolia*, ce qui empêche la transformation du paracétamol en son métabolite hautement réactif, le NAPQI (**Zhang et al., 2013**). L'augmentation de la vitesse d'expression de l'enzyme limitante dans la synthèse de GSH (c-glutamyl-cystéine synthétase) par la quercétine conduit à des concentrations intracellulaires élevées du glutathion (**Myhrstad et al., 2002**). Ceci permet de suggérer que la quercétine empêche l'épuisement du glutathion par le NAPQI et ainsi prévient l'hépatotoxicité.

Ces résultats suggèrent que les liposomes chargés des deux extraits feuilles et d'écorce de *Fraxinus angustifolia* ont une très bonne activité hépto-protecteurs qui pourrait être due à leurs petites tailles ainsi que leurs compositions et leurs localisations prolonger.

\mathcal{V} *Conclusión*

Conclusion

Fraxinus angustifolia est une plante médicinale à plusieurs activités biologiques grâce à sa richesse en différentes métabolites secondaires notamment les flavonoïdes et des polyphénols, qui jouent rôle majeur en médecine traditionnelle.

Le paracétamol est un médicament analgésique capable de provoquer une hépatotoxicité en cas de surdosage.

Par ailleurs, l'encapsulation de principe actif dans les nanostructures est devenue une technique prometteuse dans le domaine pharmaceutique.

L'étude réalisée a pour but d'étudier l'effet protecteur des extraits éthanolique encapsulés d'écorce et des feuilles de *Fraxinus angustifolia* contre l'hépatotoxicité induite par le paracétamol. D'après les résultats obtenus des dosages biochimiques (ALAT, ASAT) et l'évaluation de l'activité de la MPO et de GSH ont révélé une amélioration au niveau de foie chez les groupes traités par les extraits FAF et FAE seul et encapsulés, et de l'étude histologique montre clairement que ces extraits ont pu minimiser les dommages de tissu hépatique des souris traitées. D'autre part, les résultats obtenus chez les groupes traités par les extraits encapsulés montrent que ces derniers ont une activité hépato-protectrice plus élevée que les extraits seuls.

Le progrès du secteur pharmacologique dépend sur la découverte de nouvelles molécules d'origine naturelle qui présentent plus d'efficacité et moins d'effets secondaires que les médicaments synthétiques. Dans cette perspective, il serait intéressant de faire de nouvelles recherches scientifiques approfondies, pour isoler et identifier les différents composés actifs issues de la plante médicinale étudiée *Fraxinus angustifolia*. Ces composés peuvent être utilisés dans le développement de nouveaux médicaments dirigés pour le traitement des maladies liées à des pathologies hépatiques.

VI Bibliographie

Bibliographie

- Ahmane, N et al. (2019). Identification of bioactive compounds from *Fraxinus angustifolia* extracts with anti-NADH oxidase activity of bovine milk xanthine oxidoreductase. *Turkish Journal of Biology*(43), 133-147.
- Ait Youssef, M. (2006). Plantes médicinales de Kabylie. (E. i. Press., Éd.) *Scienc et Technique*, 261.
- Andriantsitohaina, R. (1999). Regulation of vascular tone by plant polyphenols : role of nitric oxide. *Gen Physiol Biophys.*, 3-5.
- Attanzio, A., D'Anneo, A et al. (2019). Composition phénolique de l'extrait hydrophile de manne de Sicile *Fraxinus angustifolia* Vahl et son activité réductrice, antioxydante et anti-inflammatoire in vitro. *MDPI antioxidants*(8), 1-13.
- Boshier, D et al. (2005). *Espèces de frêne en Europe : caractéristiques biologiques et lignes directrices pratique pour une utilisation durable*. université d'Oxford.
- Cover, C., Mansouri, A., Knight, T R., Bajt, M L., Lemasters, J J., Pessayre, D et Jaeschke, H. (2005). Peroxynitrite-induced mitochondrial and endonuclease-mediated nuclear DNA damage in acetaminophen hepatotoxicity. 2.
- Damien, M., Hininger, D. (2010, 06 29). Diversité et évolution du genre *Fraxinus*. p. 175.
- Donaldson, C A K et Poland. (2009). Nanotoxicology : New insights into nanotubes. *Nat Nanotechnol.*, 4, 10-708.
- Fournier, J C., DeRubeis, J R., Hollon, D S., Dimidjian, S., Amsterdam, J D., Shelton, R C., Fawcett, J. (2010). Antidepressant drug effects and depression severity: a patient-level meta-analysis. *JAMA*, 303(1), 47-53.
- Garrec, S., Burnat, P et Gentes, P. (1994). Le paracétamol. 228-242.

- Impagnatiello, F., Herrero, J et Benedini, F. (2008). Composition comprenant un dérivé nitrooxy d'acétaminophène et un médicament anticonvulsivant pour le traitement d'une douleur neuropathique.
- kasmi, S., Hamdi, A., Atmani Kilani, D., Debbache-Binaida, N., Jaramello-Carmona, S., Rodriguez-Arcos, R., Jemenez-Araujo, A., Ayouni, K., Atmani, D., Guillen-Bejarano, R. (2021). Characterization of phenolic compounds isolated from the *Fraxinus angustifolia* plant and several associated bioactivities.
- Luyckx, F H., Desai, C., Thiry, A., Dewé, W., Scheen, A J., Gielen, J E et Lefèbvre, J P. (1998). Liver abnormalities in severely obese subjects: Effect of drastic weight loss after gastroplasty.
- Radermacher, J., Chavan, A., Bleck, J., Vitzthum, A., Stoess, B., Gebel, M J., Galanski, M., Koch, K M et Haller, H. (2001). Use of Doppler Ultrasonography to Predict the Outcome of Therapy for Renal-Artery Stenosis. *New England journal of medicine*, 344, 410-417.
- Saad, I., Albichr., Hantson, P. (2017). Le paracétamol à dose thérapeutique :quelles populations à risque d'hépatotoxicité ?
- Sarfraz, I., Rasul, A., Jabeen, F., Younis, T., Zahoor, M K., Arshad, M., et Ali, M. (2017). *Fraxinus: A Plant with Versatile Pharmacological and Biological Activities.*
- Seirafi, M., Iten, A., Hadengue, A. (2007). Paracétamol: toxicité hépatique aux doses thérapeutiques et populations à risque.
- Tedd, H G et Turrill, W B. (2016). *Fraxinus Pallisae and Its Relationships. Springer on behalf of Royal Botanic Gardens, Kew, 1935, 132-143.*
- Abbad, H., Boussis, A., Medjahed, Z. (2018). *Evaluation De L'activité Antioxydante Des Extraits De Fraxinus Angustifolia Par Des Approches Analytiques Ccm Et Cg-ms.*
- Abdelwahed, I., Bouhlel, Skandrani, I., Valenti, K., Kadri, M., Guiraud, P., Steiman, R., Mariotte, A M., Ghedira, K., Laporte, F., Dijoux-Franca, M G et Chekir-Ghedira, L. (2007). Study of antimutagenic and antioxidant activities of Gallic acid and 1, 2, 3, 4, 6- pentagalloylglucose from *Pistacia lentiscus*. *Confirmation by microarray expression profiling*, 1(165), 1-13.

- Aktumsek, A., Zengin, G., Guler, G.O., Cakmak, Y.S. et Duran, A. (2013). Antioxidant potentials and anticholinesterase activities of methanolic and aqueous extracts of three endemic *Centaurea L.* species. *Food Chemistry Toxicology*.(55), 290-296.
- Allard, J. (2020). *Mise en évidence de l'implication de différents mécanismes dans la survenue de la stéatose hépatique d'origine médicamenteuse en absence de dysfonction mitochondriale sévère*. Rennes.
- AL-Saghir, M G. (2006). *Phylogenetic Analysis of the Genus Pistacia (Anacardiaceae)*. Blacksburg, Virginia.
- Anghel, N., Herman, H., Balta, C., Rosu, M., Stan, MS., Nita, D., Ivan, A., Galajda, Z., Ardelean, A. (2018). Acute cardiotoxicity induced by doxorubicin in right. (4).
- Arab, K., Bouchenak, O., Yahiaoui, K. (2014). Etude phytochimique et évaluation de l'activité antimicrobienne et antioxydante de l'huile essentielle et des composés phénoliques du pistachier lentisque (*Pistacia lentiscus L.*). *J Fundment Appl Sci*, 6(1), 79-93.
- Asongalem, EA., Foyet, HS., Ngogang, J., et al. (2004). Analgesic and antiinflammatory activities of *Erigeron floribundus*. *J Ethnopharmacol.*, 8-301.
- Assimopoulou, A.N., Zlatanov, S N., et Papageorgiou, V P. (2005). Antioxidant activity of natural resins and bioactive triterpenes in oil substrates. *Food Chemistry*. 92, 721–727.
- Athamena, S., Chalghem, I., Kassah-Laouar ,A., Laroui,S. et Khebri, S. (2010). Activite antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminum L.* *Lebanese Science Journal*, 11(1), 72.
- Atmani, D., Chaher, N., Berboucha, M., Ayouni, K., Lounis, H., Boudaoud, H., Debbache, N., Atmani, D. (2009). Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chemistry*., 303–309.
- Aurélien et BOPDA,. (2016). *ADSORPTION DU PARACETAMOL EN SOLUTION AQUEUSE PAR LES CHARBONS ACTIFS OBTENUS DES BALLEES DE RIZ*.
- Ayouni, K., Berboucha-Rahmani, M., Kim, H. K., Atmani, D., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2016). Metabolomic tool to identify antioxidant compounds of *Fraxinus angustifolia* leaf and stem. *Industrial Crops and Products*, 88, 65-77.

- Azib, L., Debbache, B N., DaCosta, G., Atmani, K D., Saidene, N., Ayouni, K., Richard, T. et Atmani, D. (2019). Pistacia lentiscus leaves extract and its major phenolic compounds reverse aluminium-induced neurotoxicity in mice. *Industrial Crops & Products*.(137), 576–584.
- Baali, N. (2017). *Effet hépatoprotecteur d'extraits polyphénoliques de Cynara cardunculus*. Constantine.
- Bachrouch, O., Msaada, K., AidiWannes, W., Talou, T., Ksouri, R et Salem, N. (2015). Variation in composition and antioxidant activity of Tunisian Pistacia lentiscus L. leaf essential oil. *Plant Biosystematics*, 38-47.
- Berrens, L., de la Cuadra, B., Gallego, MT. (1997). Complement inactivation by allergenic plant pollen extracts. *Life Sci*, 503-1497.
- Biglietti., Martinelli, C et Marco. (2020). Nanotechnological approaches for counteracting multidrug resistance in cancer. *Cancer Drug Resistance*., 3, 1005-1020.
- Birt, DF., Hendrich, S., Weiqun, W. (2001). Dietary agents in cancer prevention : : flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacol Therap*, 157-77.
- Borm, W H et De Jong P J. (2008). Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. *J. Nanomedicine*., 03, 133-149.
- Bouras, L et Retima, H. (2007). *Biologie et Physiologie de l'Hépatotoxicité Médicamenteuse Inhérente à l'Utilisation des Anticancéreux*. Jijel.
- Bruneton, J. (1999). *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales*. Paris: Lavoisier.
- Busseniers, B. (2017). *Nano-encapsulation: Distribution d'un médicament dans une population de micelles polymère et mécanisme de perméabilisation de liposomes photosensibles*. Montréal.
- Çalis, I., Hosny, M., Khalifa, T., Nishibe, S. (1993). Secoiridoids from Fraxinus angustifolia. *Phytochemistry*. (33), 1453-1456.
- Cano, B., Cousseau, G., Dowkiw, A., Marçais, B., Husson, C., & Saintonge, F. X. (2021). Le Frêne face à la chalarose. *Centre National de la Propriété Forestière*, 14-42.

- Caudullo, G et Houston Durrant, T. (2016). Fraxinus angustifoliaen Europe : répartition, habitat, usages et menaces. *Espèces d'arbres/Atlas européen des espèces d'arbres forestiers*97, 01, 01.
- Chaumet-Riffaud, G et Chuto, P. (2010). Les nanoparticules. *ELSIVIER MASSON : Médecine Nucléaire.*, 370–376.
- Chausson, M Y., Chevalier, C., Graillat, et Hamaide, Th. (2006). Nanoparticules non ioniques par polymérisation en miniémulsion pour l'encapsulation de Principes Actifs. *MATERIAUX.*, 13-17.
- Chen., Ya-Ching, S et Ching-Yeu. (1995). Additional Secoiridoid Glucosides form Fraxinus Uhdei. (61), 281-283.
- Chime, S A., Kenechukwu, F C et Attama, A A. (2014). Nanoemulsions — Advances in Formulation, Characterization and Applications in Drug Delivery. *INTECH Open science.*, 3, 76-126.
- Cowan, M M. (2012). Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews.*, 12, 564-582.
- Damre, A S., Gokhale, A B., Phadke, A S et al. (2003). Studies on the immunomodulatory activity of flavonoidal fraction of Tephrosia purpurea. *Fitoterapia*, 61-257.
- Danan, D et Benichou, C. (1993). Causality assessment of adverse reactions to drugs--I. A novel method based on the conclusions of international consensus meetings: application to drug-induced liver injuries.
- Danielle, T. (2021). lésion du foie provoquée par les médicaments. 1.
- Derbal, B., Bessila, M et Ourzifi, O. (2020). *Effet protecteur des polyphénols vis à vis la nécrose hépatique induite par le paracétamol.* Constantine.
- Derbal, B., Bessila, M., Ourzifi, O. (2020). *Effet protecteur des polyphénols vis à vis la nécrose hépatique induite par le paracétamol.* Constantine.
- Desmoulière, A. (2021). Le foie. *Isevier Masson*, 57-61.
- Di Carlo,G., Mascolo, N., Izzo, A A et al. (1999). Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci*, 53-337.

- Djéridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, B., Stockerc, P et Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *ELSEVIER Food Chemistry*, 654-660.
- DOERFLINGER A. (2017). *Conception et synthèse de micelles polymérisées pour diagnostic et la thérapie de tumeurs*. Paris.
- Dous, F., Derbal, C et Guerroudj, R. (2017). *Le statut oxydant et la lésion nécrotique hépatocytaire induite Par le paracétamol*. Constantine.
- Driad, Y. (2009). *Stabilité du paracétamol : Application à un sachet*. Nancy.
- Duncan, R. (2000). Polymer Therapeutics into the 21st century. *American Chemical Society.*, 351-363.
- Ehsan, O., Ehsan, K., Reza, N et al. (2019). Nanoliposomes Encapsulation of Enriched-Phenolic Fraction from Pistachio Hulls and It's Antioxidant, Anti-Inflammatory and Anti-Melanogenic Activities. *Journal of Microencapsulation*, 1464.
- Enderle., Vasaitis, R et Rasmus. (2017). Fraxinus dieback in Europe: understanding disease phenomenon and elaborating guidelines for sustainable management (FRAXBACK). *European Cooperation in Science and Technology*, 1-300.
- Erlund, I. (2004). the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability and epidemiology. *Nutr Re*, 851-74.
- FH Luyckx, C Desai, A Thiry, W Dewé, AJ Scheen, JE Gielen et PJ Lefèbvre. (1998). Liver abnormalities in severely obese subjects: Effect of drastic weight loss after gastroplasty. *international journal of obesity*(22), 222-226.
- Frank Lu, C. (1992). *Toxicologie: données générales, procédures d'évaluation, organes cibles, évaluation du risque*.
- Frenkel, B H et Eugene. (2008). Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. *Urologic Oncology.*, 57-64.
- Gerard, C. (2019). *Paracétamol : comment le polymorphisme*. Lorraine.
- Giardinieria, A., Schicchib, R., Geracic, A et al. (2019). Fixed oil from seeds of narrow-leaved ash (*F. angustifolia* subsp. *angustifolia*): Chemical profile, antioxidant and antiproliferative activities. *ELSIViER Food Research International.*, 369-377.

- Gilani, A H., Janbaz, K H., Shah, B H. (1997). Quercetin exhibits hepatoprotective activity in rats. *Biochem Soc Trans.*, 619.
- Gomez, D et Fillat, F. (1982). Utilisation de Frêne comme arbre fourrage dans les Pyrénées de Huesca. *Document d'écologie Pyrénéenne, III-IV* , 481-489.
- Gueroult, P. (2015). *Les nanoparticules dans l'industrie pharmaceutique : Comparaison des méthodes de fabrication*. Université de Bordeaux: Open science.
- Hajali, H. (2015). *Assemblage nanoparticules lipidique solides-polysaccharide: étude des propriétés physico-chimiques pour la vectorisation d'un polyphénol*. Lorraine.
- HAJJALI et Hassan. (2018). *Assemblage nanoparticules lipidiques solides-polysaccharide : étude des propriétés physico-chimiques pour la vectorisation d'un polyphénol*. université de Lorrain: Open Science.
- Hassani, F et Djarouni, T. (2016). *Une étude théorique comparative de l'aspirine et du paracétamol*.
- Havsteen, B H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoïds. *Pharmacol Therap*, 67-202.
- Heinemann, C et Reid, G. (2005). Vaginal microbial diversity among postmenopausal women with and without hormone replacement therapy. *Canadian Journal of Microbiology*, 51.
- Hennebelle, T S., Sahpaz, F et Bailleul. (2014). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte. *Springer-Verlag*, 3-6.
- Hielscher, T. (2019). Des produits pharmaceutiques encapsulés dans des nanoparticules de lipide avec des ultrasons. Récupéré sur Hielscher Ultrasonics GmbH.
- Hildesheim., Madaus, G et Lehrbuch, H B. (1938). *George Olms Verlag*, 1381.
- Huk, I., Brovkovich, V., Nanobash, V J., et al. (1998). Bioflavonoid quercetin scavenges superoxide and increases nitric oxide concentration in ischaemia-reperfusion injury: an experimental study. *y.Br J Surg*, 5-1080.
- Impagnatiello, F., Herrero, J et Benedini, F. (2008). Composition comprenant un dérivé nitrooxy d'acétaminophène et un médicament anticonvulsivant pour le traitement d'une douleur neuropathique.

- Inouye, H., Nishioka, T et Kaniwa, M. (1975). Glucosides of *Fraxinus japonica*. *Phytochemistry*. (14), 304-309.
- Jeandroz, S., Roy, A., et Bousquet, J. (1997). Phylogeny and Phylogeography of the Circumpolar Genus *Fraxinus* (OLEACEAE) Based on Internal Transcribed Spacer Sequences of Nuclear Ribosomal DNA. 241-251.
- Kostova, I et Iossifova, T. (2007). Chemical components of *Fraxinus* species. *ELSIVIER Fitoterapia*.(78), 85–106.
- Kowalczyk, B., Olechnowicz-Stepien, W. (1988). *Herba Pol.*(34), 7.
- Krid, Y. (2019). *L'acétaminophène : un analgésique qui pourrait potentialiser*. Québec.
- Kruedener, S., Schneider, W., Elsner, EF. (1995). *Drug Res*(45), 169.
- Kuo, Y C., Yang, L M., Lin, L C. (2004). Isolation and immunomodulatory effect of flavonoids from "*Syzygium samarangense*". *Planta Med.*, 9-1237.
- Laughton, M J., Evans, P J., Moroney, M A., et al. (1991). INHIBITION OF MAMMALIAN 5-LIPOXYGENASE AND CYCLO-OXYGENASE BY FLAVONOIDS AND PHENOLIC DIETARY ADDITIVES. *Biochem Pharmacol.*, 81-1673.
- Lingelsheim, A. (1920). *Oleaceae–Oleoideae–Fraxineae*. *Springer, Royal Botanic Gardens*, IV, 1-61.
- Maksimovic´, Z. (2008). In vitro antioxidant activity of ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L., Asteraceae) herb. *ELSEVIER Science direct*, 356–360.
- Mallet, C., David, A., Barrière et Eschalier, A. (2012). Le paracétamol : un ancêtre plein d'avenir. 278-281.
- MEDJAHED, Z., ATMAN-KILANI, D., FAUCONNIER, M L., RICHARD, G., ATMANI, D. (2016). Hepatoprotective and antidiabetic activities of *Fraxinus angustifolia* Vahl extracts in animal models: characterization by high performance liquid chromatography analysis. *Journal turc des sciences médicales.*, 46, 910-920.
- Meister, A et Anderson, M E. (1983). Glutathione. *Revue annuelle de biochimie*, 52, 60-711.

- Menon, S., Lawrence, L., Sivaram, V P et Padikkala. (2019). Oroxylum indicum root bark extract prevents doxorubicin-induced cardiac damage by restoring redox balance. 2019.
- Middleton, E J. (1998). The dihydroxy metabolite of the teratogen thalidomide causes oxidative DNA damage. *Adv Exp Med Biol*, 82-175.
- Middleton, E J., Kandaswami, C., Theoharides, T C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation heart disease and cancer. *Pharmacol Rev.*, 673-751.
- Mitchell, R M G et Hartmut, J. (2013). Metabolism and disposition of acetaminophen: recent advances in relation to hepatotoxicity and diagnosis.
- Moulaoui, K. (2015). Evaluation des activités biologiques in vitro et in vivo des extraits de *Fraxinus angustifolia*. *thèse en vue de l'obtention du diplôme de doctorat.*, (p. 44). Université de Béjaia.
- Mozafari, M R. (2010). Nanoliposomes: Preparation and Analysis. 29-50.
- Myhrstad, M.C.W., Carlsen,H., Nordström,O., Blomhoff,R et Oivind Moskaug,J. (2002). Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the γ -glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter. *ELSEVIER*, 32(5), 386-393.
- Nijveldt, R.J., Van Nood, E., Van Hoorn, D E C, et al. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nut*, 4, 25-418.
- Nijveldt,R J., van Nood,E., Van Hoor, D E., Boelens,P G., Van Nooren,K., Avan Leeuwen,P. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. 4.
- Oliveira, A M., Oliveira, M C B., Nicoletti, S., NedirMiranda, G C., Freitas, C T A., Soares, R M.,Façanha, S O., do Santos, E I et Iughetti, R C. (2023). Dengue and its association with hepatic biomarkers: anti-inflammatory action and utilization of paracetamol as a hepato-toxicity factor. *Brazilian Journal of Case Reports*, 11-15. Récupéré sur pharmacomédical.org: <https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/antalgiques-non-opiaces-les-points-essentiels>
- Ong, K C et Khoo H E. (2000). Links Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats. *Life Sci*, 705-1695.

- Ong, KC et Khoo, HE. (1997). Biological effects of myricetin. *Gen Pharmacol. Aug*, 6-121.
- Pelletier, G. (2016, 12 05). *hépatite médicamenteuse*. Récupéré sur Centre hépatobiliaire Paul Brousse.
- Pernel, J. (2013). *LES HEPATITES MEDICAMENTEUSES : ETIOLOGIE, MECANISME ET ETUDE*. Lorraine.
- Pernel, J. (2013). *LES HEPATITES MEDICAMENTEUSES : ETIOLOGIE, MECANISME ET ETUDE PHARMACOEPIDEMIOLOGIQUE A PARTIR DU SITE HEPATOX*.
- Prosie, F., Lesage, F X., Deschamps, F. (2008). Nanoparticles: Structures, utilisations. *Presse Med*, 7-1431.
- Race., Elizabeth, L R., Karen, F., Keane., Margaret, M., Verfaellie et Mieke. . (2013). Medial temporal lobe contributions to short-term memory for faces. *ournal of Experimental Psychology: General*, 142(4), 1309–1322.
- Rice-Evans C. (2001). Flavonoid antioxidants. *Curr Med Chem.*, 797-807.
- Rice-Evans, CA et Miller, NJ. (1996). Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochem Soc Trans*, 5-790.
- Saad Albichr, I et Hantson, P. (2017). Le paracétamol à dose thérapeutique : quelle population à risque l'hépatotoxicité. (1-16).
- Sánchez, M F., Vera, B., Gálvez, J., et al. (2002). Effect of quercitrin on the early stages of hapten induced colonic inflammation in the rat. *Life Sci*, 108-3067.
- SANELA, M., TAMARA, S., RADULOVIC., NEBOJSA, D., CEKI, C et al. (2013). Experimental Design in Formulation of Diazepam Nanoemulsions : Physicochemical and Pharmacokinetic Performances. *Pharmaceutical Nanotechnology.*, 14.
- Sartor, C. (2015). *Hnf4 α and choline metabolism role in β -catenin activated*. Paris-Sud.
- Sawadogo, A N., Dib, P., Calès. (2007). Physiopathologie de la cirrhose et de ses complications Pathophysiology of cirrhosis and its complications.
- Senden, T J., Mooock, K H., Gerald, J F., Burch, W M et al. (1997). The physical and chemical nature of technegas. *J Nucl Med.*, 33-1327.
- Serpone, S H et Nick. (2013). Microwaves in Nanoparticle Synthesis. 24.

- Slingerland, M., Guchelaar, H j et Gelderblom, H. (2012). Liposomal drug formulations in cancer therapy: 15 years along the road. *ELSIVIER*, 160-166.
- Stoyanov, N. (1973). Nos plantes médicinales. *Sofia : Nauka i izkustwo, 1*, 321.
- Tahiri, O., Atmani, D et Atmani, D. (2016). CARACTERISATION DE L'ACTIVITE ANTI-BACTERIENNE DES EXTRAITS DE PISTACIA LENTISCUS ET DE FRAXINUS ANGUSTIFOLIA.
- Takenaka, Y., Tanahashi, T., Shintaku, M., Sakai, T., Nagakura, N., Parida. (2000). Secoiridoid glucosides from *Fraxinus amiricana*. (55), 275.
- Tsukamoto, H., Hisada, S., Nishibe, S. (1985). Coumarins from Bark of *Fraxinus japonica* and *F. mandshurica* var. *japonica*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*(33), 4069-4073.
- Ueda, S S H., Inoue, K., Akaji, M., Fujita, T et Yang, C R. (1994). *Phytochimie*. (35), 177.
- Wallander, E. (2008). Systematics of *Fraxinus* (Oleaceae) and evolution of dioecy. *Plant Syst*, 273, 25-49.
- Wallander, E et Albert, V A. (2000). Phylogeny and classification of Oleaceae based on rps16 and trnL-F sequence data. *American Journal of Botany* 87, 1827-1841.
- Yildiz, M et Evrim Suna, A. (2008). Genotoxicity testing of quizalofop-P-ethyl herbicide using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. *Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics.*, 61, 45-52.
- Yogeshkumar, M., Marilena, L et Alexander, M S. (2009). Liposomes and nanoparticles : nanosized vehicles for drug delivery in cancer. *Elsevier*, 592-599.
- Yongmoon., H. (2005). Ginkgo terpene component has an anti-inflammatory effect on *Candida albicans*-caused arthritic inflammation. *Int Immunopharmacol*, 56-1049.
- Yordanov, D., Nikolov, P., Boychinov, A. . (1973). *Phytothérapie. Sofia : Medicina i fizkultura*, 150.
- Zhang, C., Zhang, S., He, X., Li, M., Wen, H., Shen, J., Zhu, L., Cui, Z. (2013). Amino acid standardized ileal digestibility of cottonseed meals from different areas of China for swine. *Chinese Journal Animale Nutrition.*, 25(12), 2844-2853.

Annexes

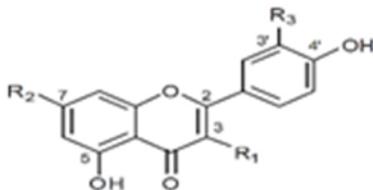
Annexe 01 : **principal caractéristiques physico chimiques du paracétamol.**

Dénomination Commune Internationale	paracétamol
Formule brute	C ₈ H ₉ NO ₂
Nom scientifique	N-acétyl-aminophénol
Masse molaire	151,2 g /mol
Point de fusion	168 - 172°C
Constante de dissociation (PKa)	9,5
Solubilité (eau)	14g/L à 20°C
densité	1,3g/cm ³
Absorption dans l'UV	Une maximum absorption en solution acide à la longueur d'onde de 245nm et en solution alcaline à 257 nm

Annexe 02 : **Différentes classes de flavonoïdes rencontrées dans *Fraxinus angustifolia*. (a) (Lee et al., 2012) ; (b) (Falé et al., 2013 ; Falé et al., 2014) ; (c) (Moulaoui et al., 2015) ; (d)**

(Ayouni et al., 2016) ; (e) (Medjahed et al., 2016).

Flavonols



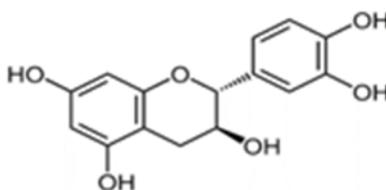
a) Génines

R ¹	R ²	R ³	Noms vulgaires
OH	H	H	Quercétine ^(c)
OH	OH	H	Kaempférol ^{(a)(d)}
H	OH	OH	Lutéoléine ^(c)

b) Hétérosides

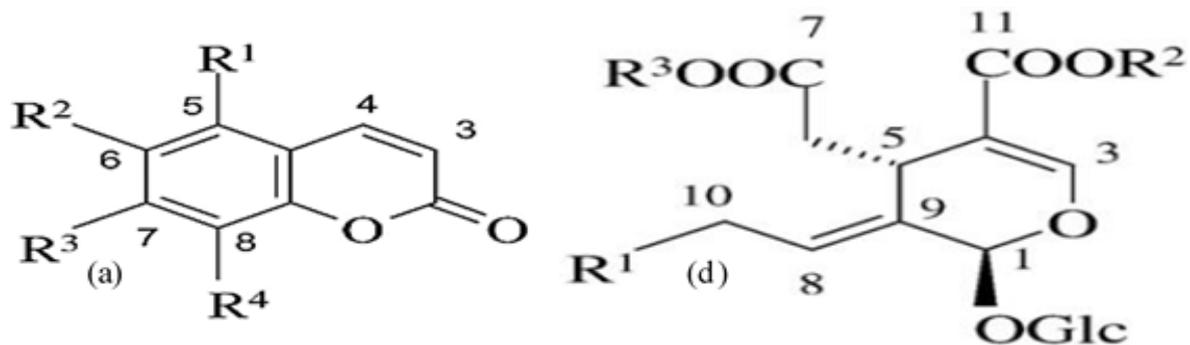
R ¹	R ²	R ³	Noms
O-Glu ⁶ -Rha	OH	OH	Rutine ^{(a)(b)(c)(d)}
OH	H	O-Glu	Quercétine-3-O-glucoside ^{(a)(d)}
OH	OH	O-Gal	Kaempferol-3-O-galactoside ^(a)
OH	OH	O-Glu ⁶ -Rha	Kaempferol-3-O-rutinoside ^(b)
O-CH ₃	O-Rha	O-Glu	Isorhamnetin-3-O-glucoside-7-O-rhamnoside ^(b)

Flavanols



Catéchine^(c)

Annexe 03 : Différents secoiridoïdes oléosides ethydroxyoléosides rencontrés dans *Fraxinus angustifolia*.



R1	R2	R3	Noms
H	Me		Oleuropéine ^{(c)(f)}
H	Me/H		Ligstroside ^{(c)(f)}
H	Me	-6-Glc-1fl-CH ₂ CH ₂ -	Neuzhenide ^{(b)(e)}
OH	Me		Me10-Hydroxyligstroside ^(c)
OH _a	Me		10-Hydroxyoleuropeine ^(c)
H	Me		Angustifolioside A ^{(a)1}
H	Me		Angustifolioside B ^{(a)2}
H			Angustifolioside C ^{(b)3}

^(a)(Çalış et al., 1993);1: (6"-O-(β-D-glucopyranosyl)-oleuropeine)

2:(6"-O-(β-D-glucopyranosyl)-ligstroside)

^(b)(Çalış et al., 1996);3: (6'-O-(β-D-glucopyranosyl)-neo-oleuropeine)

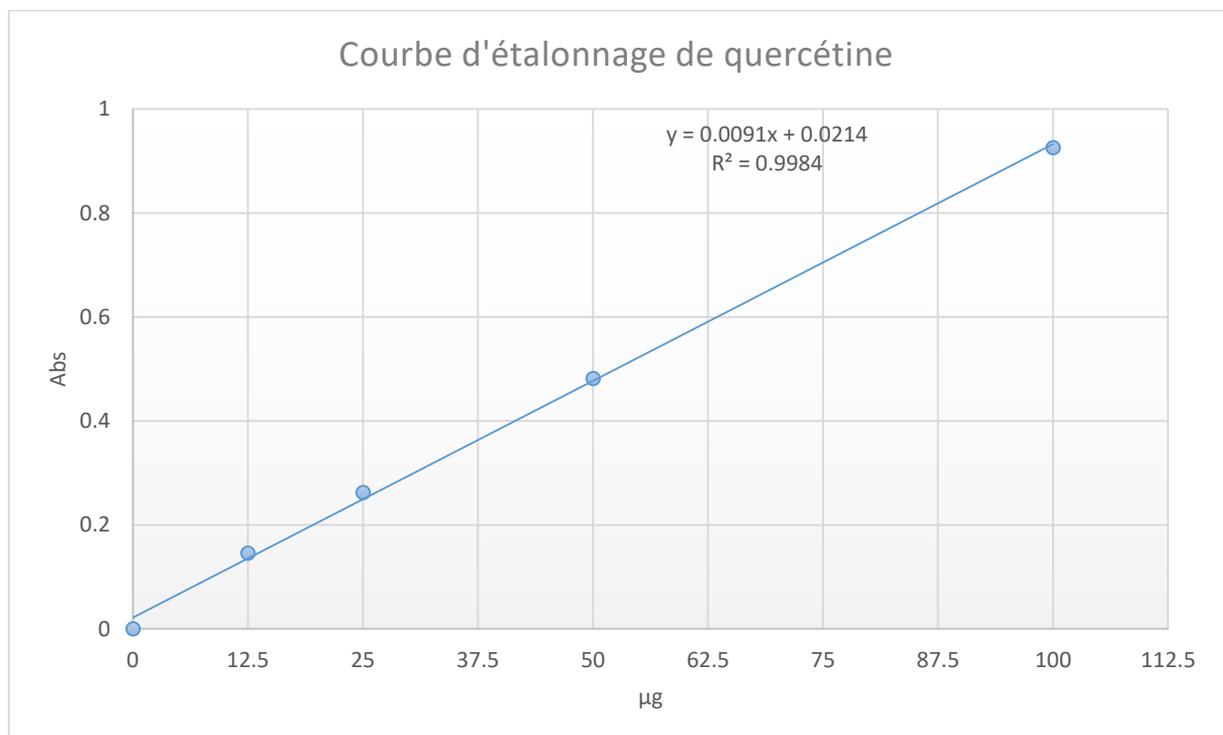
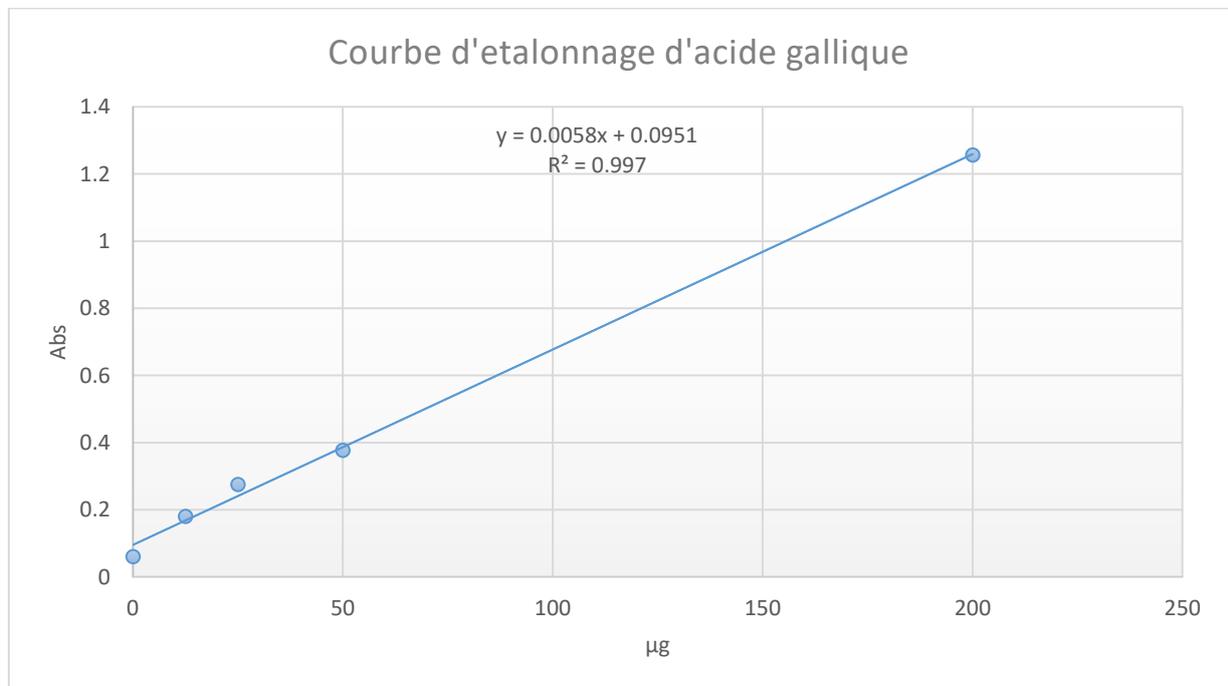
^(c)(Hosny, 1998)

^(d)(Kostova et Iossifova, 2007)

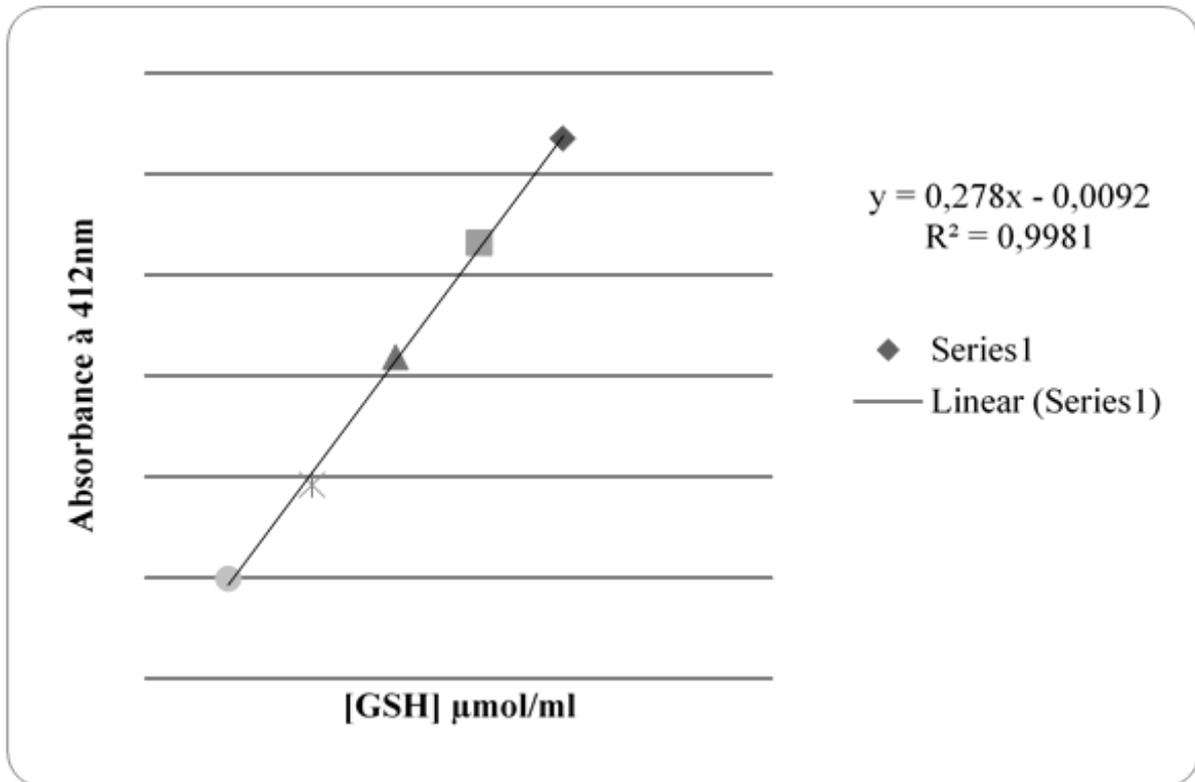
^(e)(García-Villalba et al., 2015)

^(f)(Ayouni et al., 2016)

Annexe 04 : les courbes d'étalonnage des composés phénoliques (polyphénols et flavonoïdes).



Annexe 05 : courbe d'étalonnage de GSH ($\mu\text{mol/ml}$)



Résumé

L'objectif de notre travail a été d'évaluer l'activité hépato-protectrice in vivo des extraits éthanoliques des feuilles et d'écorce encapsulé dans des liposome et seuls de *Fraxinus angustifolia*, Les expériences ont été effectuées sur les souris après induction de l'hépatotoxicité par injection intra-péritonéal du paracétamol à une dose de 500 mg/kg. Le taux de glutathion (GHS), de la myelopéxydase (MPO), des transaminases hépatiques ainsi que des coupes histologiques des foies des souris ont été évalués. Les résultats obtenus ont démontré une augmentation significative des GHS chez les souris traitées par les extraits des feuilles et d'écorce encapsulés dans les liposomes par rapport aux extraits des feuilles et d'écorce seul de *Fraxinus angustifolia*. D'autre part, les valeurs de MPO et des transaminases hépatiques ont été également et significativement réduites chez des souris traitées par les extraits éthanolique de feuilles et d'écorce de *F. angustifolia* encapsulés et seul par rapport au groupe controle. D'après les résultats obtenus, on constate que les extraits des feuilles et d'écorce encapsulés peuvent protéger le foie contre la toxicité provoqué par le paracétamol en normalisant les valeurs des paramètres étudiés.

Mots clés : *Fraxinus angustifolia*, hépatotoxicité, liposome, myeloperoxydase, paramètre hépatique

Abstract

The aim of our work was to evaluate the in vivo hepatoprotective activity of ethanolic extracts of the leaves and bark encapsulated in liposomes and alone from *Fraxinus angustifolia*. The experiments were carried out on mice after induction of hepatotoxicity by intraperitoneal injection of paracetamol at a dose of 500 mg/kg. The levels of glutathione (GHS), myelopexidase (MPO) and hepatic transaminases were assessed, as were histological sections of mouse livers. The results showed a significant increase in GHS in mice treated with liposome-encapsulated leaf and bark extracts compared with *Fraxinus angustifolia* leaf and bark extracts alone. On the other hand, MPO and liver transaminase values were also significantly reduced in mice treated with ethanolic extracts of *F. angustifolia* leaves and bark encapsulated in liposomes compared with the control group. The results show that encapsulated leaf and bark extracts can protect the liver against paracetamol-induced toxicity by normalising the values of the parameters studied.

Key words: *Fraxinus angustifolia*, hepatotoxicity, liposome, myeloperoxidase, hepatic parameter

