

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-Chimique
Spécialité Biochimie Appliquée

Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle

En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Evaluation de l'effet hépato-protecteur des extraits
et des nanoparticules de l'écorce et des feuilles de
*Fraxinus angustifolia***

Présenté par :

Chibane Lina & Djafri Kenza

Soutenu le : 09 juillet 2024

Membre de jury :

Président :	Mr BOUADAM S.	MAA
Promotrice :	Mme MOULAOU K.	MCB
Examinatrice :	Mme BENLOUKILM.	MAA

Année universitaire : 2023/2024

Remerciements

Nous tenons d'abord à remercier Dieu, le tout-puissant, pour nous avoir donné la patience, la volonté, le courage et la santé nécessaires pour mener à bien notre travail de recherche et terminer ce mémoire.

Tout d'abord, nous exprimons notre profonde gratitude à notre chère promotrice, Mme Moulaoui Kenza, pour sa disponibilité, sa patience, ses conseils, son aide et son orientation tout au long de ce travail. Nous avons eu la chance de bénéficier de ses connaissances et compétences dans le domaine de la recherche scientifique.

Nous adressons nos sincères considérations et nos remerciements les plus chaleureux aux membres du jury, qui nous font l'honneur d'examiner et d'évaluer notre travail.

Nous remercions également tout le personnel du laboratoire de génétique, qui ont contribué à la réalisation et au bon déroulement de ce travail, sans oublier personne.

Notre reconnaissance et nos sincères remerciements vont à toute l'équipe du laboratoire d'histologie de la faculté de médecine pour leur accueil si chaleureux, leur gentillesse, ainsi que tous les efforts qu'ils ont fournis pour mener à bien notre travail.

Enfin, nous tenons à remercier tous les enseignants du département physico-chimique (SNV) pour la qualité de leur enseignement tout au long de notre parcours universitaire.

Dédicace

L'être humain est un être orgueilleux, ce qui peut nous mener à croire à l'illusion dans la quel on croit être les seules responsables de toutes nos réussites, mais la réalité est tout autres, tous ce que nous sommes et tous ce que nous accomplissons nous reviens à nous ainsi qu'à toute personne qui d'une manière ou une autre a pu nous influencé à être qui nous sommes.

Nous dédions ce mémoire à nos parents, dont l'amour, le soutien et les encouragements nous ont portés tout au long de cette aventure académique. Leur confiance en nos capacités nous a inspirés à persévérer et à atteindre nos objectifs.

Nous dédions également ce travail à nous-mêmes, pour notre détermination, courage, patience et optimisme même dans les moments les plus incertains et notre résilience face aux défis rencontrés durant ce parcours.

Enfin, nous dédions ce travail à toutes les personnes chères à nos yeux, amis et proches, qui nous ont soutenus, encouragés et inspirés. Leur présence et leur bienveillance ont été des sources inestimables de motivation et de réconfort.

Kenza & Lina

Table de matières

Liste des abréviations.

Liste des figures.

Liste des tableaux.

Table des matières

Introduction	1
I. Le foie	2
I.1.1. Définition	2
I.1.2. Anatomie topographie	2
I.1.3. Histologie	2
I.1.4. Fonction	3
I.1.5. Hépto-toxicité.....	3
I.1.6. Mécanisme de l'hépto-toxicité.....	3
I.2. Paracétamol.....	4
I.2.1. Généralités et données pharmaceutiques.....	4
I.2.2. Mode d'action	4
I.2.3. Mécanisme de métabolise du paracétamol	4
I.2.3.1. Mécanisme de toxicité par le paracétamol.....	5
1994 ;Seirafi et al., 2007 ;Albichr et Hantson, 2018).	5
I.3. Peroxydation lipidique	7
I.3.1 Mécanisme	7
I.3.2. Impact du paracétamol sur la peroxydation lipidique.....	8
I.3.3. Mécanismes de lésions hépatiques induites par la peroxydation lipidique.....	9

Table de matières

<i>1.4.4. Taxonomie</i>	<i>11</i>
<i>1.4.5. Usage traditionnelle</i>	<i>12</i>
<i>1.4.6. Activité biologique</i>	<i>12</i>
<i>1.4.7. Composition phytochimique</i>	<i>12</i>
<i>1.4.7.1. Les coumarines</i>	<i>13</i>
<i>1.4.7.2. Les flavonoïdes</i>	<i>13</i>
<i>1.4.7.3. Les lignanes</i>	<i>13</i>
<i>1.4.7.4. Les acides phénoliques</i>	<i>14</i>
<i>1.4.8. Les activités biologiques des métabolites secondaires</i>	<i>14</i>
<i>1.4.8.1. Effet antioxydant</i>	<i>14</i>
<i>1.4.8.2. Effet anti inflammatoire</i>	<i>15</i>
<i>1.4.8.3. Effet hépato protecteur</i>	<i>15</i>
<i>1.4.9. Mode d'action des polyphénols contre l'hépatotoxicité induit par le paracétamol</i>	<i>16</i>
<i>1.4. Nanoparticules</i> <i>1.5.1. Généralités</i>	<i>16</i>
<i>1.5.2. Encapsulation</i>	<i>17</i>
<i>1.5.3. Les différents types de nanoparticule</i>	<i>17</i>
<i>1.5.3.1. Liposome</i>	<i>17</i>
<i>1.5.3.2. Les nanoparticules polymère</i>	<i>18</i>
<i>II.1 Matériel</i>	<i>20</i>
<i>II.1.2. Matériel animal</i>	<i>20</i>
<i>II.2 Méthodes</i>	<i>21</i>
<i>II.2.3 Dosage des composés phénolique</i>	<i>22</i>
<i>II.2.3.2 Dosage des flavonoïdes</i>	<i>23</i>
<i>II.2.3.3 Dosage des tanins condensés</i>	<i>23</i>

Table de matières

II.2.3.4. Dosages des tanins hydrolysables	Erreur ! Signet non défini.
encapsulé et non encapsulé II.2.5.1. Principe	24
II.2.5.2. Méthodes :	24
II.2.5.3 Sacrifice des animaux	26
II.2.5.4. Préparation des homogénat des foies des souris	27
II.2.5.5 Evaluation des activités antioxydants et hépato-protectrice des extraits de feuilles et écorce de <i>Fraxinus angustifolia</i>	28
II.2.5.5.2 Aspartate Aminotransférase (AST)	28
II.2.5.5.3 Alanine Aminotransférase (ALT)	28
Alanine + 2 Oxoglutarate (ALAT) → Glutamate + Pyruvate Pyruvate + NADH + H ⁺ (LDH) → Lactate + NAD ⁺	28
II.2.5.5.4 Phosphatase Alcaline (PAL)	29
II.2.5.5.5 Dosage hépatique du malondialdéhyde	29
II.2.6 .Evaluation histologique des foies	30
. 33	
III. Résultats	35
III.2 Teneur en phénols totaux, en flavonoïdes et en tannins	35
III.3.1 Étude de l'effet hépato-protecteur des extraits de <i>F. angustifolia</i> contre la toxicité induite par le paracétamol	36
III.3.2 Caractérisation des liposomes	37
III.3.3 Changement des poids corporel des souris	37
III.3.4 Poids relatifs des foies des souris	37
III.3.5 Evaluation des taux hépatiques de MDA	38
III.3.7 Évaluation des taux sériques des transaminases (ALAT et ASAT)	40
III.3.9 Évaluation du taux de phosphatase alcaline	41
III.3.10. L'étude histopathologique du foie	42
III. Discussion	44

Table de matières

▪ <i>Forouzandeh, H., Azemi, M.E., Rashidi, I., Goudarzi, M., & Kalantari, H., (2013)</i>	59
▪ <i>Kahkonen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J.P., Pihlaja, K., Kujala, T.S., et</i>	61
▪ <i>Kanbur, M., Eraslan, G., Beyaz, L., Silici, S., Liman, BC., Altinordulu,</i>	62
▪ <i>Lee, Y., Shin, D.H., Kim, J.H., Hong, S., Choi, D., Kim, Y.J., . Jung, Y., (2010)</i>	63
▪ <i>Lemasters, J. J., Qian, T., Bradham, C. A., Brenner, D. A., Cascio, W. E., Trost, L.C.,</i>	63
▪ <i>Mamirovna, T.O., Komiljonovich, P.M., Rasuljonovich, M.R., (2020)</i>	65
▪ <i>Mazumder, D.N., Steinmus, C., Bhattacharaya, P., Von-Ehrenstein, O.S., Ghosh,</i>	65
▪ <i>Moulaoui, K., Caddeo, C., Manca, M. L., Castangia, I., Valenti, D., Escribano, E.,</i>	66
▪ <i>Nsairat, H., Khater, D., Sayed, U., Odeh, F., Al Bawab, A., & Alshaer, W., (2022)</i>	68
▪ <i>Soppimath, K. S., Aminabhavi, T. M., Kulkarni, A. R., & Rudzinski, W. E., (2001)</i>	70
<i>Abstract</i>	76

III. Références bibliographiques

Annexes

Liste des abréviations

- **ALAT** :Alanine aminotransférase.
- **AP-1** :Protéine activatrice-1
- **Apaf-1** : Facteur d'activation de la protéase apoptotique1.
- **APAP** :l'acétaminophène
- **ASAT** :Aspartate aminotransferase.
- **ATP** : Adénosine Triphosphate
- **ATPase** : Adénosine tri-phosphatase
- **ChREBP** :Carbohydate responsive element-binding protein),
- **COX-2** :Cyclooxygenase2.
- **CYP2E1** : Cytochrome P450 2E1.
- **CYP450** : Cytochrome P450.
- **ERO** :espèces réactives de l'oxygène
- **FAS** : Séquence activée des fibroblastes.
- **GCS** : glutamylcystéine synthétase .
- **GPx4** :Sélenoprotéine glutathion peroxydase4.
- **GSH** :Glutathion
- **H&E** : Hématoxyline/Éosine.
- **H₂ O₂** : Peroxyde d'hydrogène.
- **IG** : Voie intragastrique.
- **iNOS** :Inducible Nitric Oxide Synthase
- **IP** : Voie intrapéritonéale.
- **LOX** :Lipoxygenases
- **LPO** : Peroxydation lipidique.
- **LXR** :Liver X receptor
- **MAPK** : Protéine kinase activée par les mitogènes.
- **MDA** :Malondialdéhyde
- **NADH** : Nicotinamide adénine dinucléotide hydrate.
- **NAPQ1** :N-acetyl-p-benzoquinone-imine.

Liste des abréviations

- **NF- κ B** :Facteur nucléaire kappa-light-chain-enhancer des cellules B activées.
- **NO** : Acide nitrique.
- **Nrf2** :Facteur de nécrose tumorale2.
- **PAL** : Phosphatase Alcaline.
- **PAPS** :3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate
- **PTMP** :pore de transition de perméabilité mitochondriale.
- **ROS** :espèces réactives de l'oxygène.
- **SOD** :Super-oxyde dismutase.
- **TBA** :Thiobarbiturique
- **TNF- α** : Interféron alpha.
- **FAE** : *Fraxinus angustifolia* écorce.
- **FAF** : *Fraxinus angustifolia* feuilles.

Liste des figures

Figure	Titre	Page
01	Vue anatomique de la face antérieure du foie.	2
02	N-acétyl-p-aminophénol (paracétamol).	4
03	Métabolisme du paracétamol et son rôle dans la toxicité	6
04	Mécanisme d'hépatotoxicité du paracétamol	7
05	Mécanisme de la peroxydation lipidique.	8
06	Schéma représentatif de l'ouverture du PTPM dans la mitochondrie lors de mort cellulaire	10
07	Photographie originale de <i>Fraxinus Angustifolia</i>	11
08	Schéma représentant les éléments structuraux des flavonoïdes essentiels à leur capacité de piégeage des radicaux libres.	15
09	Représentation schématique A. Des liposomes B. La structure d'une nano-capsule et d'une nano-sphère	18
10	Photographie originale des A. les feuilles et de B. L'écorce de <i>Fraxinus angustifolia</i> .	20
11	Souris Albinos dans une cage.	21
12	Broyage de l'écorce de <i>Fraxinus angustifolia</i> .	21
13	Administration des extraits par voie orale.	26
14	Sacrifice des souris et récupération du foie	27
15	Histogramme représentant le taux d'extraction des deux extraits éthanolique des feuilles (FAF) et d'écorce (FAE) de <i>Fraxinus angustifolia</i>	35
16	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.	38

Liste des figures

17	L'effet des extraits et des liposomes sur les taux hépatiques des MDA chez des souris traitées par le paracétamol, les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SE.	43
18	Coupes histologiques du foie observées par microscope optique avec un grossissement $G \times 10$.	42
19	Coupes histologiques du foie observées au microscope optique avec un grossissement $G \times 10$	43

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
I	Classification taxonomique de <i>Fraxinus angustifolia</i> .	12
II	coumarines identifiées dans <i>Fraxinus angustifolia</i>	14
III	Distribution des groupes et des traitements administrés	25
IV	Teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes en tanins condensé et en tanins hydrolysable dans les extraits éthanolique d'écorce et des feuilles de <i>F. angustifolia</i> , Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm SD.	36
V	Les variations de poids corporel des souris.	37
VI	Variation de la concentration sérique du ASAT et ALAT dans le sérum des souris traitées par le paracétamol (700 mg/ml) et l'extrait de la plante <i>Fraxinus angustifolia</i> brut et encapsulé et un témoin.	40
VII	Variation des taux de la phosphatase alcaline dans le sérum des souris traitées par le paracétamol (700 mg/ml) et l'extrait de la plante <i>Fraxinus angustifolia</i> brut et encapsulé et un témoin.	41

INTRODUCTION

Le foie est un organe clé pour de nombreuses fonctions physiologiques essentielles, jouant un rôle fondamental dans le métabolisme des substances internes et externes, y compris la détoxification et l'élimination des xénobiotiques tels que les produits naturels, les polluants environnementaux et les médicaments comme le paracétamol (**Trefts et al., 2017**). Le paracétamol est l'un des analgésiques et antipyrétiques les plus populaires en automédication. Bien qu'efficace pour soulager la douleur et réduire la fièvre, une utilisation prolongée ou une surdose peut entraîner de graves dommages hépatiques, étant responsable d'environ la moitié des cas d'insuffisance hépatique aiguë, soulignant les risques associés à une utilisation inappropriée de ce médicament (**Blieden et al., 2014**).

Depuis des siècles, les remèdes naturels et les plantes médicinales ont été les piliers de la médecine traditionnelle. Malgré les avancées significatives de l'industrie pharmaceutique moderne, l'utilisation des plantes n'a jamais complètement disparu, continuant d'être une ressource précieuse pour de nombreuses personnes à travers le monde (**Fabricant et Farnsworth, 2001**). *Fraxinus angustifolia*, une espèce végétale abondamment présente dans le bassin méditerranéen, possède une histoire séculaire d'utilisation significative en médecine traditionnelle, étant renommée pour son contenu élevé en substances biologiquement actives, et est un sujet d'intérêt pour la recherche pharmacologique et médicinale moderne (**Nowwarote et al., 2012**).

L'encapsulation des molécules d'intérêt thérapeutique est un domaine de recherche en pleine expansion, crucial pour de nombreuses applications industrielles, notamment dans le secteur pharmaceutique. Cette technologie permet de stabiliser des molécules instables ou peu solubles en les utilisant comme vecteurs efficaces pour les substances actives (**Guterres et al., 2007**).

L'objectif de ce travail est d'évaluer l'effet hépato-protecteur de l'extrait éthanolique des feuilles et de l'écorce de *Fraxinus angustifolia*, ainsi qu'encapsulé dans des liposomes. Cette évaluation est basée sur le dosage de l'activité enzymatique de la MDA, de la glutathion, des transaminases, de la phosphatase alcaline et sur la réalisation des coupes histologiques des foies des souris.

Synthèse
bibliographique

Synthèse bibliographique.
CHAPITRE I

I.1 Le foie

I.1.1. Définition

Le foie, est la plus grande glande de l'organisme, pèse entre 1,6 et 2 kg, et arbore une teinte brune rougeâtre, jouant un rôle essentiel dans l'exécution de nombreuses fonctions vitales. (Bessaguet et Desmoulière, 2021).

I.1.2. Anatomie topographie

Le foie se positionné dans la région supérieure droite de l'abdomen est distinct des poumons et du cœur par le diaphragme, le foie occupe la totalité de l'hypochondre droit et s'étend jusqu'à l'épigastre et l'hypochondre gauche (Gosling, 2003).

Il présente une structure caractérisée par sa division en deux lobes, droite et gauche, délimitée par l'insertion du ligament falciforme (Figure 01), qui assure également sa connexion à la paroi abdominale antérieure (Bessaguet et Desmoulière, 2021).

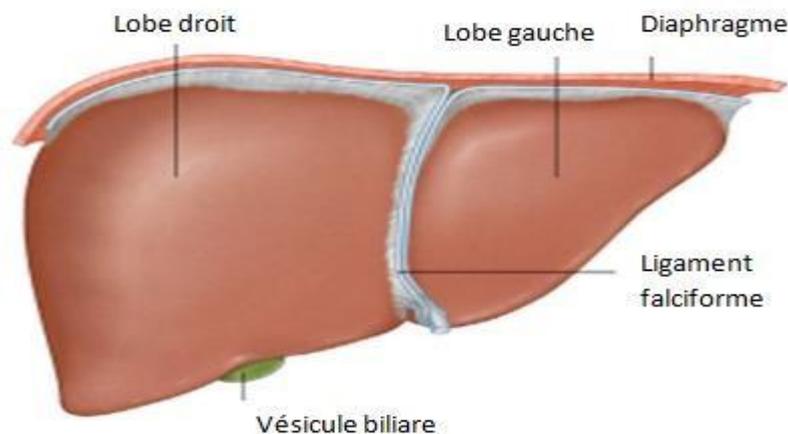


Figure (01) : Vue anatomique de la face antérieure du foie (lucidarme, 2017).

I.1.3. Histologie

Le parenchyme hépatique est principalement composé d'hépatocytes, qui représentent environ 80 % des cellules hépatiques et jouent un rôle essentiel dans les processus métaboliques et de détoxification essentiel à l'organisme. Les autres cellules présentes comprennent les cellules de Kupffer, également appelées macrophages résidents du foie, ainsi que d'autres cellules immunitaires, les cellules stellaires (impliquées dans la fibrose) et les cellules endothéliales sinusoidales (Anty et al., 2014 ; Vallée et al., 2020), sa surface externe est revêtue d'une capsule de tissu conjonctif qui s'étend à l'intérieur du parenchyme, suivant le trajet des vaisseaux sanguins (Helga et Wolfgang, 2015).

Synthèse bibliographique.
CHAPITRE I

I.1.4. Fonction

Le foie est un organe vital qui remplit de nombreuses fonctions essentielles. Il agit comme une usine chimique et métabolique, un système excréteur, et une glande mixte. En tant que glande endocrine, le foie synthétise des facteurs de croissance, tandis qu'en tant que glande exocrine, il produit la bile. De plus, il participe à l'immunité grâce à ses cellules de Kupffer et assure la synthèse de nombreuses protéines sanguines telles que l'albumine et les facteurs de coagulation **(Leclercq et Sempoux, 2018)**.

Il joue également un rôle crucial dans la modulation de l'inflammation, le stockage des vitamines et du fer, et il représente une importante réserve énergétique pour l'organisme. En somme, le foie est l'organe central de la régulation des métabolismes et de la détoxification, et incarne ainsi une usine multifonctionnelle au sein du corps humain **(Guiliani et Blin, 2019)**.

I.1.5. Hépto-toxicité

L'hépto-toxicité, se réfère à une atteinte du foie induite par l'exposition à un médicament ou à un autre agent non infectieux, ce qui entraîne un dysfonctionnement hépatique **(Navarro et Senior, 2006)**. La toxicité hépatique peut se manifester par des lésions, des nécroses ou d'inflammations, et dans les situations les plus critique, elle peut également se traduire par une accumulation de graisse dans le foie, caractérisée par une stéatose hépatique **(Danan, 1993)**.

I.1.6. Mécanisme de l'hépto-toxicité

De multiples mécanismes peuvent conduire à l'hépto-toxicité notamment :

- ✓ Le dysfonctionnement de la membrane cellulaire et la mort cellulaire induite par la liaison covalente du médicament aux protéines cellulaires conduisent à la formation de complexes adduits qui deviennent des antigènes, déclenchant ainsi une réponse immunitaire.
- ✓ La perturbation des mécanismes cellulaires du métabolisme des médicaments conduit à une altération du flux biliaire.
- ✓ La mort cellulaire régulée (apoptose), activée à travers les voies de signalisation du facteur de nécrose tumorale et de Fas.
- ✓ La suppression de l'activité mitochondriale, entraînant l'accumulation de radicaux libres d'oxygène et la peroxydation des lipides, l'augmentation des réserves lipidiques et la mort des cellules **(kaplowitz, 2002 ;Lee, 2003)**.

Synthèse bibliographique.
CHAPITRE I

I.2. Paracétamol

I.2.1. Généralités et données pharmaceutiques

Le paracétamol, également connu sous le nom d'acétaminophène ou N-acétyl-p-aminophénol, (**Figure 2**) est un dérivé phénolique découvert il y a plus d'un siècle. Sa structure chimique comprend un cycle benzénique substitué par un groupe hydroxyle et un groupe acétamide. Actuellement, il est l'un des analgésiques et antipyrétiques les plus fréquemment utilisés, souvent administré par voie orale. (**Clayden et al., 2002**).

Il se distribue rapidement et uniformément dans les tissus. Son absorption se fait principalement par transport passif à partir du tractus gastro-intestinal, tandis que sa métabolisation s'effectue essentiellement au niveau du foie par glucuro-conjugaison et sulfo-conjugaison et son élimination se fait principalement par voie urinaire (**Prescott, 1980 ; Pons, 1997 ; Kociancic et Reed, 2003**).

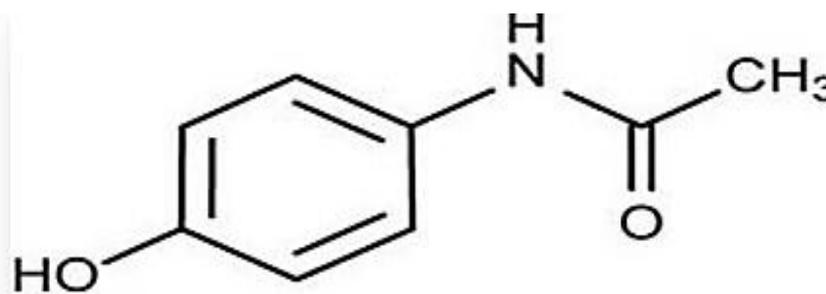


Figure (02) : N-acétyl-p-aminophénol (paracétamol) (Dirad, 2009).

I.2.2. Mode d'action

Le mécanisme d'action complet du paracétamol n'est pas encore entièrement compris. Cependant, il semblerait qu'il implique l'insensibilisation des chémorécepteurs aux médiateurs de la douleur tels que la bradykinine. En outre, il inhiberait la synthèse des prostaglandines centrales, ce qui contribue à son effet analgésique, et diminuerait l'action des pyrogènes endogènes au niveau des centres thermorégulateurs de l'hypothalamus, ce qui explique son effet antipyrétique (**Ramlawi et al., 2013**).

I.2.3. Mécanisme de métabolisme du paracétamol

Synthèse bibliographique.
CHAPITRE I

I.2.1.1. Mécanismes de métabolisation du paracétamol à dose normale

Le paracétamol est principalement métabolisé par le foie via deux principales voies hépatiques : la glucuroconjugaison et la sulfoconjugaison. Ces processus sont facilités par des transférases, subdivisées en deux sous-classes. La première sous-classe est l'uridine diphosphate glucuronyltransférase (UDP-glucuronyl transférase), utilisant l'acide uridine-5'-diphospho-D- glucuronique (UDPGA) comme coenzyme. Cette dernière transforme le paracétamol en un dérivé glucuroconjugué en transférant un groupement glucuronate au paracétamol. La seconde sous-classe est la sulfotransférase, dont la coenzyme est le 3-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate (PAPS). Cette coenzyme transforme le paracétamol en un dérivé sulfoconjugué par transfert d'un groupement sulfate inorganique. Les métabolites formés par ces deux voies de détoxification sont ensuite excrétés dans l'urine. Une fraction minime du paracétamol, moins de 5 %, est éliminée sous forme inchangée (**Sterner, 1999**).

Environ 5 % du paracétamol est métabolisé par les cytochromes P450 (CYPs), principalement le CYP2E1 et le CYP3A4, en N-acétyl-p-benzoquinone imine (NAPQI)(**Figure 3**). Ce métabolite est ensuite détoxiqué par le glutathion (GSH), un tri-peptide composé de cystéine, de glycine et d'acide glutamique (**Grahamet al.,2005 ; Saad Albichr et Philippe, 2017**).

I.2.3.1. Mécanisme de toxicité par le paracétamol

L'intoxication par le paracétamol se caractérise par un dysfonctionnement du métabolisme de détoxification, où la glucuronoconjugaison et la sulfoconjugaison sont perturbées, entraînant une oxydation hépatique en cas de surdosage. Cela conduit à une métabolisation accrue du paracétamol par les cytochromes P450, formant un métabolite hépatotoxique appelé N-acétyl-p-benzoquinone-imine (NAPQI), qui épuise le stock limité de glutathion. Le NAPQI se lie par covalence avec des groupements thiols de macromolécules cellulaires vitales telles les protéines hépatiques intramoléculaires LXR (Liver X receptor), ChREBP (Carbohydrate responsive element-binding protein), déclenchant ainsi une lyse hépatocellulaire(**Garrec et al., 1994 ;Seirafi et al., 2007 ;Albichr et Hantson, 2018**).

Le processus de stress oxydatif est un élément crucial dans la toxicité associée au paracétamol. Lorsque les cytochromes métabolisent le paracétamol pour former le NAPQI, cela engendre la production d'anions superoxyde. Ces anions sont ensuite convertis en peroxyde d'hydrogène

Synthèse bibliographique.

CHAPITRE I

par dismutation (Figure 4). De plus, ils peuvent réagir avec l'oxyde nitrique (NO), donnant naissance au peroxy-nitrite. Ces espèces réactives de l'oxygène peuvent affecter diverses cibles biologiques, conduisant à l'oxydation des lipides, des protéines et des bases de l'ADN (Garrec et al., 1994).

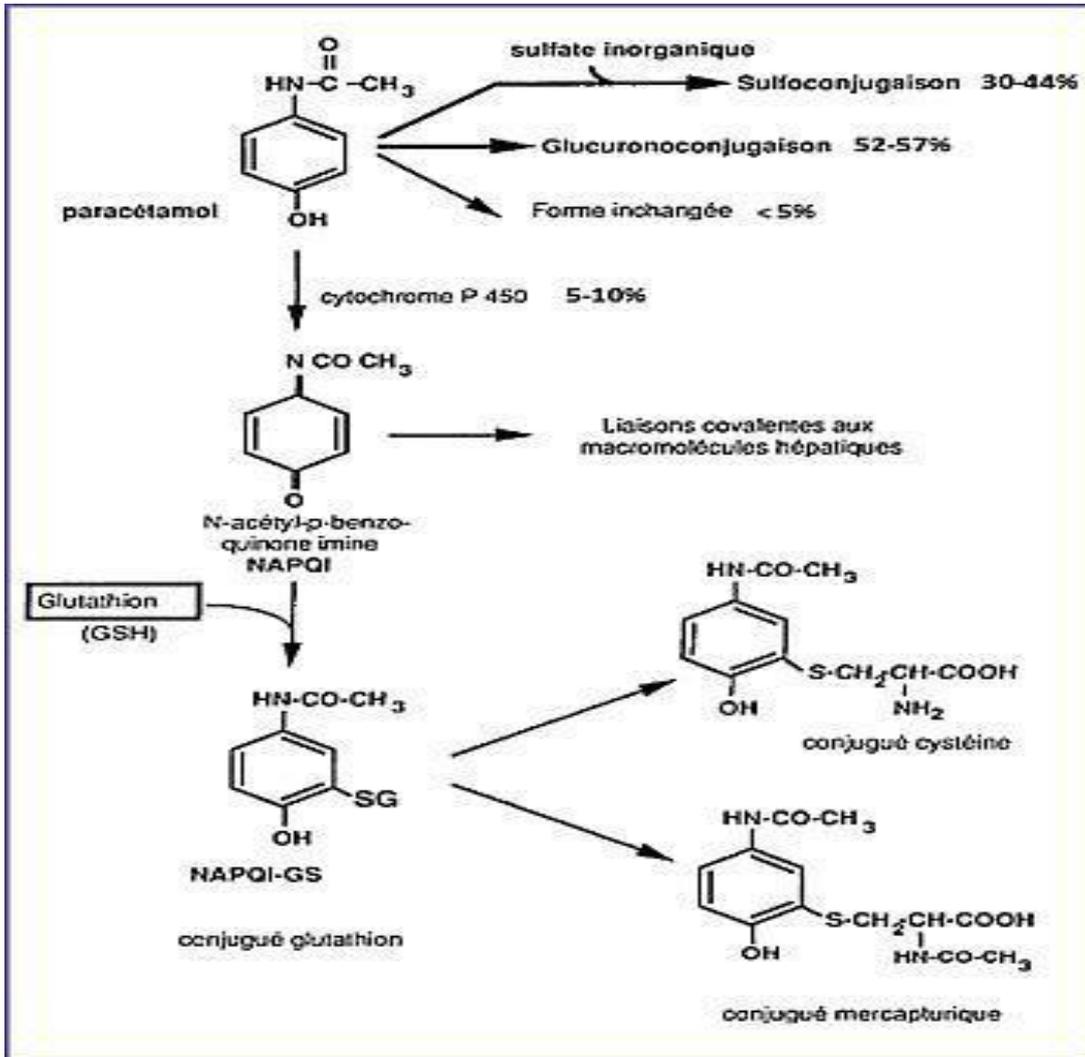


Figure (03) : Métabolisme du paracétamol et son rôle dans la toxicité (Saad Albichr et Philippe, 2017).

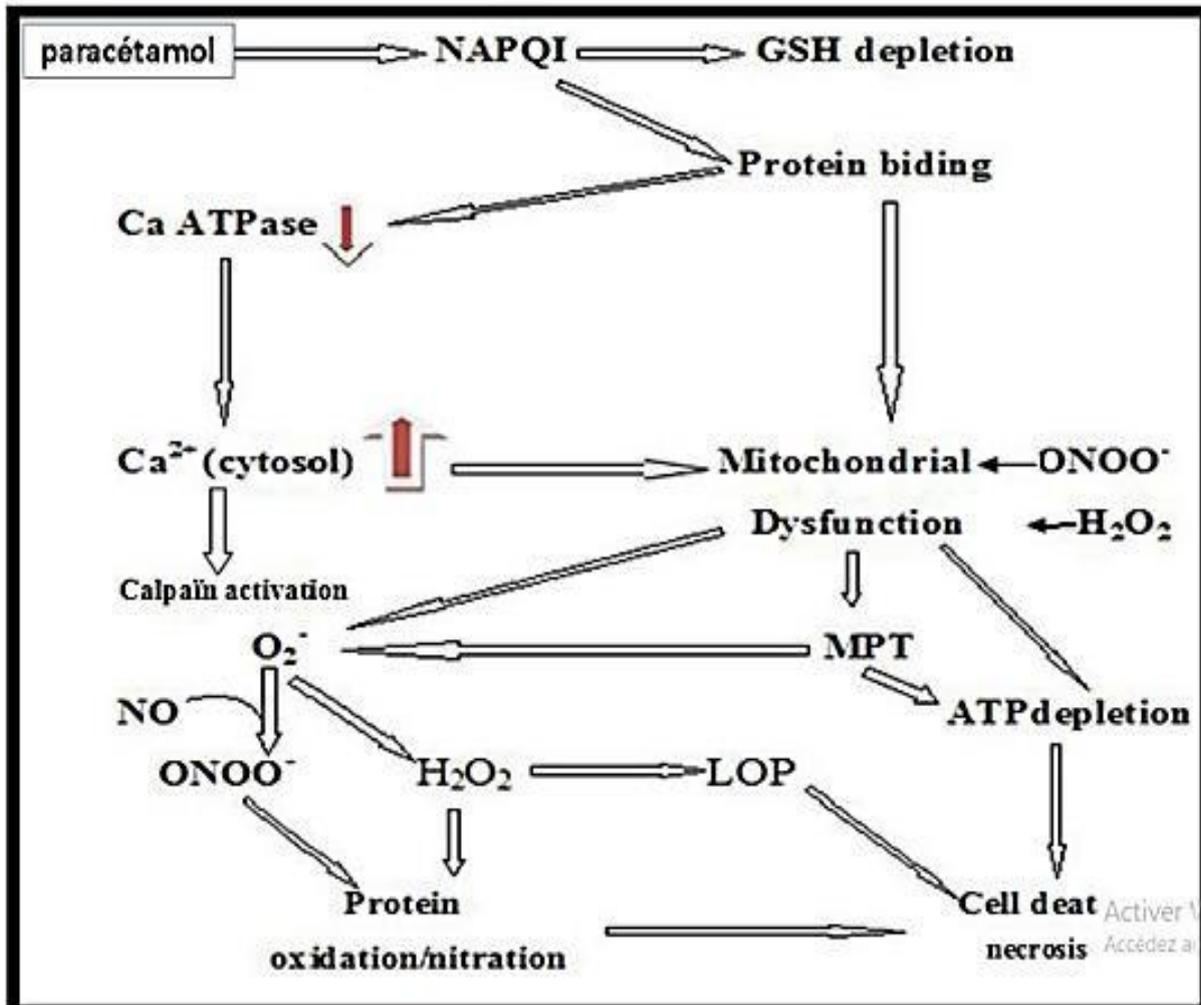


Figure (04) : Mécanisme d'hépto-toxicité du paracétamol (Jaeschke et al., 2003).

I.3. Peroxydation lipidique

I.3.1 Mécanisme

La peroxydation lipidique est un processus complexe qui survient lorsque les membranes biologiques sont exposées au stress oxydatif. Ce processus entraîne une détérioration progressive de la structure membranaire et une diminution de son activité fonctionnelle en ciblant le cholestérol et les phospholipides contenant des acides gras insaturés (Girotti, 1985).

Lorsque les lipides sont soumis à l'attaque des radicaux libres, un atome d'hydrogène est souvent

Synthèse bibliographique.

CHAPITRE I

abstrait d'un groupe allylique, formant ainsi un radical diényle. Ce radical subit ensuite un réarrangement de liaison pour former un diène conjugué, suivi de la capture d'oxygène pour former un radical peroxy ; ce radical peut à son tour réagir avec d'autres acides gras insaturés, conduisant à la formation d'hydro-péroxydes lipidiques ; la décomposition de ces derniers peut conduire à la formation d'une grande variété d'aldéhydes, résultant du clivage β des radicaux alcoyles (Figure 5) (Moore et Roberts, 1998).

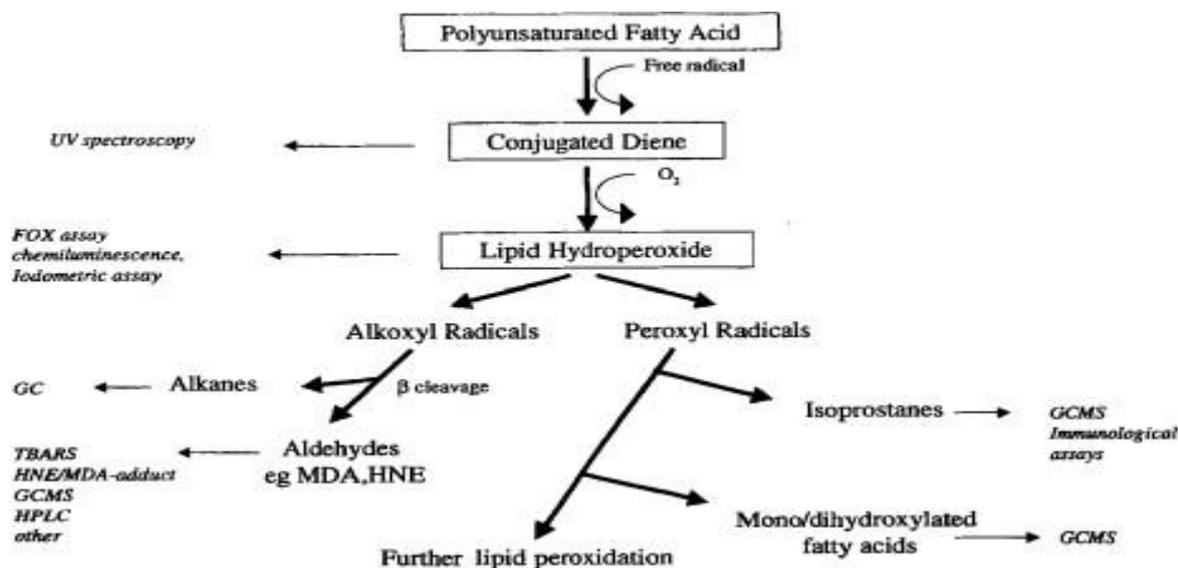


Figure 5 : Mécanisme de la peroxydation lipidique (Moore et Roberts, 1998).

I.3.2. Impact du paracétamol sur la peroxydation lipidique

Le paracétamol impacte la peroxydation lipidique par divers mécanismes complexes, influencés par des inducteurs enzymatiques et des conditions cellulaires spécifiques. Chez les rats comme les souris, le prétraitement avec des inducteurs du cytochrome P-450, comme le 3-méthylcholanthrène, augmente l'activation du paracétamol, entraînant une déplétion en glutathion (GSH) et une accumulation de malondialdéhyde (MDA), marqueur de la peroxydation lipidique, lorsque le GSH cellulaire est réduit de 20-30 % des valeurs normales (Albano *et al.*, 1983).

La présence excessive de NAPQI, augmente l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale, ce qui constitue une source critique de production des ERO (espèces réactives de l'oxygène) dans l'hépatotoxicité liée au paracétamol. Les électrons libérés par une respiration mitochondriale altérée réagissent avec l'oxygène pour former des super-oxydes (O_2^-), lesquels peuvent être convertis en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par l'action du super-oxyde dismutase (SOD). Le H_2O_2 peut alors amplifier l'oxydation des protéines ou conduire à la peroxydation des lipides (LPO), endommageant les membranes cellulaires et altérant la

fonction hépatique (Center, 1993 ; Knight *et al.*, 2002).

I.3.3. Mécanismes de lésions hépatiques induites par la peroxydation lipidique

Plusieurs facteurs importants peuvent contribuer à la mort des hépatocytes, parmi lesquels le stress oxydant et la peroxydation lipidique. Certains produits issus de cette dernière peuvent altérer la structure et les fonctions des mitochondries, entraînant une modification de la perméabilité de leurs membranes (Fromenty, 2010).

Les lésions hépatiques sont déclenchées par la dérégulation calcique via l'inhibition de la PMCA, induisant la mort cellulaire par nécrose ou apoptose. La peroxydation lipidique, suite au stress oxydant, favorise l'ouverture du PTPM mitochondrial, perturbant la phosphorylation oxydative et conduisant à la nécrose. L'ouverture du PTPM peut également déclencher l'apoptose par libération de cytochrome C (Figure 6). Enfin, la stéatose hépatique, résultant de la peroxydation lipidique, peut progresser vers la fibrose hépatique par activation des cellules étoilées et la production de composants de la matrice extracellulaire (Fromenty, 2010 ; Bernardi *et al.*, 2007).

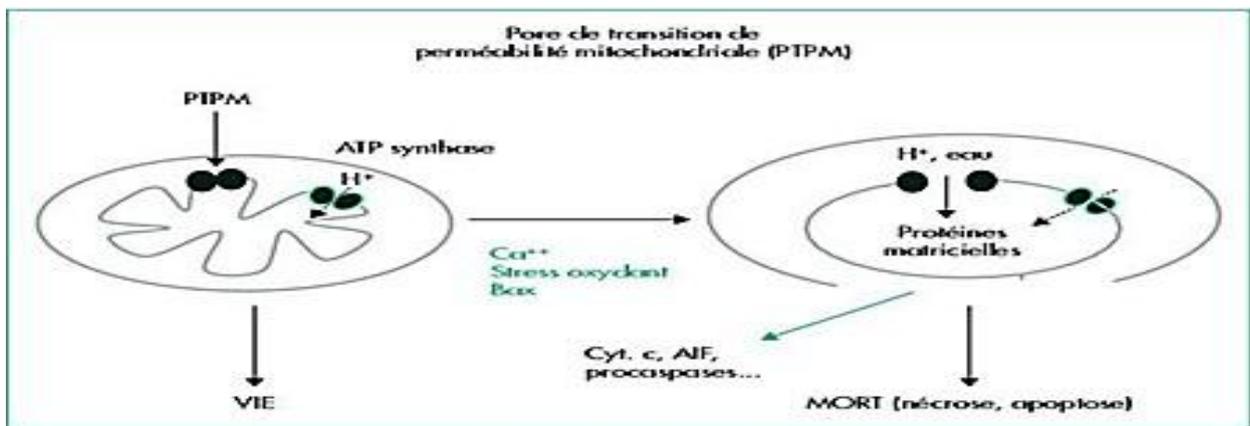


Figure (06) : Schéma représentatif de l'ouverture du PTPM dans la mitochondrie lors de mort cellulaire (Berson, 2005).

Synthèse bibliographique.
CHAPITRE I

I.4. Fraxinus angustifolia

I.4.1. Description botanique

Fraxinus angustifolia est un arbre de hauteur moyenne, atteignant entre 15 et 25 mètres, avec une couronne ovoïde un peu irrégulière de 10 à 15 mètres de largeur. Ses feuilles sont caduques, opposées et imparipennées, mesurant de 12 à 25 cm de long, avec 9 à 13 folioles. En automne, elles prennent une coloration pourpre violacé ou bordeaux. Cet arbre peut vivre environ 200 ans (Kandamir, 1997). L'écorce est lisse et grise chez les jeunes arbres, devenant plus rugueuse avec l'âge (Schauenberg et Ferdinand, 2009).

I.4.2. Nomination

Fraxinus appartenant à la famille des Oléacées réunit 600 espèces dans 25 genres (Lee et al., 2012) ; *Fraxinus angustifolia* communément appelée le frêne à feuilles étroites, est une espèce d'arbre d'une large distribution géographique et des variations morphologiques significatives, des recherches récentes ont permis de reconnaître trois sous-espèces principales réparties dans différentes régions (Caudullo et al., 2016).

I.4.3. *Fraxinus angustifolia* subsp. *angustifolia*

Elle est caractérisée par des feuilles étroites (Figure 7) et une distribution géographique qui s'étend du sud de l'Europe jusqu'au nord-ouest de l'Afrique. On la trouve également dans certaines parties du Caucase. Elle préfère les climats tempérés doux et pousse souvent le long des rivières et dans les zones humides (Caudullo et al., 2016).

Synthèse bibliographique.
CHAPITRE I



Figure 7 : Photographie originale de *Fraxinus angustifolia*

1.4.4. Taxonomie

L'espèce *Fraxinus angustifolia* est classée dans la position systématique suivante (**Tableau I**)

Tableau I : Classification taxonomique de *Fraxinus angustifolia* selon une étude phylogénétique International Plant Names Index (IPNI), 2024

Règne	Plantae
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Lamiales
Famille	Oleaceae
Genre	Fraxinus
Espèce	<i>Fraxinus angustifolia</i>

Synthèse bibliographique.

CHAPITRE I

1.4.5. Usage traditionnelle

Depuis plusieurs siècles la sève de l'écorces subit un séchage à l'air après son extraction afin d'obtenir la manne qui est dotée d'un goût doux-amer, qui est ensuite utilisée tel un laxatif et un diurétique doux; en Algérie les feuilles et l'écorces de *F. angustifolia* ont été utilisées en infusion afin de traiter l'arthrite, les hémorroïdes et la fièvre, bien que la composition de ce dernier ne suggère pas de tels effets (Kasmi *et al.*, 2021). Diverses parties de cette espèce ont été utilisées dans le traitement des affections inflammatoires. Elle est également prisée pour ses effets antipyrétiques, antitussifs et expectorants (Ahmane *et al.*, 2019).

1.4.6. Activité biologique

Fraxinus angustifolia est dotée d'une panoplie d'effets biologiques et thérapeutiques, dont des effets antioxydants qui jouent un rôle important dans la protection contre les radicaux libres (Abbad, 2018), un potentiel anti-inflammatoire et anti-thrombogène, elle est riche en acide phénolique, de tyrosol et d'hydroxytyrosol, évoquant un élixir de santé et de vitalité (Kasmi *et al.*, 2021). *Fraxinus angustifolia* possède également une activité antibactérienne qui pourrait être une alternative aux produits chimiques dans la lutte contre les infections bactériennes (Tahiri, 2016). De plus, *Fraxinus angustifolia* a démontré des effets hypo-glycémiant, contribuant à la régulation du taux de glucose sanguin et potentiellement bénéfique pour les personnes atteintes de diabète (Sarfraz *et al.*, 2017). Enfin, elle possède un effet neuroprotecteur, aidant à prévenir les dommages neuronaux et à protéger le système nerveux central contre divers stress oxydatifs et inflammatoires (Zhang *et al.*, 2014).

1.4.7. Composition phytochimique

La phytochimie se penche sur la structure, le métabolisme et les fonctions des substances naturelles des plantes. Cette métabolisation peut être catégorisée en métabolisme primaire et métabolisme secondaire (Gurib fakim, 2006), ce dernier étant souvent associé aux bienfaits thérapeutiques des plantes médicinales (Bourgaud *et al.*, 2001).

Parmi les métabolismes secondaires, les polyphénols élaborés à partir d'hydrate de carbone par le biais des voies métaboliques de l'acide shikimique et de l'acétate (Crozier *et al.*, 2009). Leur structure et leur taille varient considérablement, allant de simples molécules phénoliques de faible poids moléculaire, à de gros polymères complexes auxquels sont rattachés des glucosides (Bravo, 1998 ; Gurib fakim, 2006).

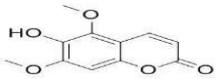
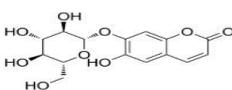
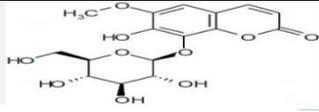
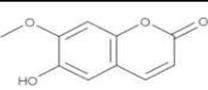
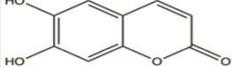
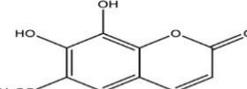
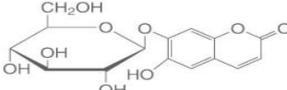
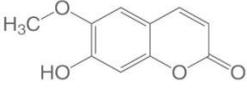
Synthèse bibliographique.
CHAPITRE I

Les classes phénoliques de *Fraxinus angustifolia* sont représentées comme suit :

1.4.7.1. Les coumarines

Les coumarines sont présentes dans toutes les espèces de *Fraxinus*, qu'elles soient sous forme libre ou attachées aux glucosides. Les différentes coumarines présentes dans *Fraxinus angustifolia* sont répertoriées dans les tableaux suivant (**Tableau II**) (**kostova et iossifova, 2007**)

Tableau II : Coumarines identifiées dans *Fraxinus angustifolia* (**kostova et iossifova, 2007**).

Coumarines	Structure	Coumarines	Structure
Fraxinol		Cichoriine	
Fraxine		Isoscooletine	
Esculetine		Fraxetine	
Esculine		Scopoletine	

1.4.7.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires naturels présents dans les végétaux, agissant comme des pigments. Ils sont réputés pour leur capacité à contribuer à la protection de l'organisme contre diverses agressions environnementales (**Martínez-Flórez et al., 2002**). Les flavones et les flavonols sont des composés distinctifs qui se trouvent typiquement dans le genre *Fraxinus* (**kostova et iossifova, 2007**). Quatre flavonol glucosylés ont été détectés dans les extraits des feuilles de *Fraxinus* : la rutine, la quercitine-3-O-glucoside, la nicotiflorine et le kaempférol-O-glucoside (**Kasmietal., 2021**).

1.4.7.3. Les lignanes

Les lignanes, des composés à double cycle phénolique, sont répandus dans le règne végétal et jouent un rôle crucial dans les mécanismes de protection des plantes (**Lamblinetal., 2008**). Plus

Synthèse bibliographique.

CHAPITRE I

spécifiquement, dans *Fraxinus*, les lignanes sont principalement du type tétrahydrofurofurane, se présentant soit sous forme libre, soit sous forme de glucosides. Parmi les exemples de lignanes retrouvées dans *Fraxinus*, figurent le pinoresinol, le pinoresinol-4-O- β -D-glucopyranoside, le 8-Hydroxypinoresinol-4-O- β -D-glucopyranoside et le Fraxiresinol-8-O- β -D-glucopyranoside (**Kostova et Iossifova, 2007**).

1.4.7.4. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques, également appelés phénolcarboxyliques, constituent une classe importante de composés phénoliques présents dans les plantes (**KumaretGoel, 2019**).

Fraxinus angustifolia a révélé la présence de onze acides phénoliques distincts (**Kasmiet al., 2021**). Les phénols isolés se déclinent principalement en composés phénoliques glucosidiques ainsi qu'en dérivés d'acides phénoliques, incluant les acides hydroxy-cinnamiques et les acides caffeoylquiniques (**Hosny, 1998**).

1.4.8. Les activités biologiques des métabolites secondaires

Les composés phénoliques sont reconnus pour leur capacité à potentiellement interagir avec diverses enzymes et à offrir des propriétés antioxydantes, ce qui les positionne comme des acteurs importants dans la protection contre certaines maladies (**Macheix et al., 2005**).

1.4.8.1. Effet antioxydant

La reconnaissance de la capacité des polyphénols végétaux à agir en tant qu'antioxydants dans les systèmes biologiques remonte aux années trente. La capacité des flavonoïdes à neutraliser les ERO a été évaluée en se basant sur des critères chimiques spécifiques. Parmi ces critères, la fonction catéchol présente sur le cycle B agit comme la meilleure donneuse d'hydrogène, favorisant ainsi la délocalisation des électrons. De même, la double liaison entre C2 et C3, combinée à la fonction carbonyle en position 4, entraîne une stabilisation par délocalisation électronique de la molécule (**Figure 8**). En outre, les groupements hydroxyle en positions 3 et 5 contribuent à renforcer cette délocalisation. En fonction de ces critères, la quercétine émerge comme le flavonoïde le plus adapté pour assurer une fonction antioxydante efficace (**Van Acker et al., 1996 ; Martínez-Flórez et al., 2002**).

Synthèse bibliographique. CHAPITRE I

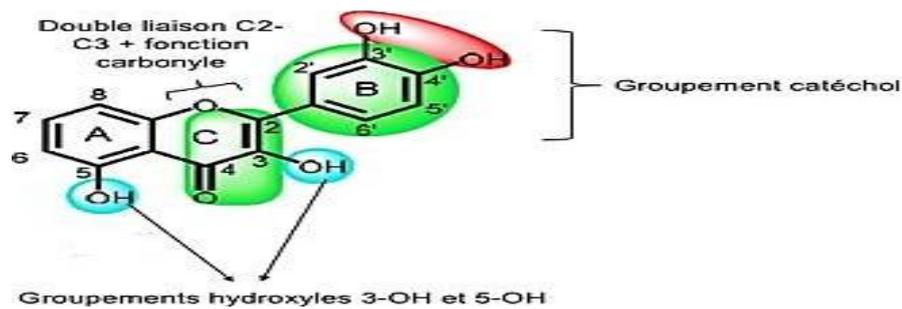


Figure (08) : Schéma représentant les éléments structuraux des flavonoïdes essentiels à leur capacité de piégeage des radicaux libres (Martínez-Flórez *et al.*, 2002).

En outre, les polyphénols ont la capacité d'interagir avec des molécules présentes dans la couche membranaire interne de la membrane plasmique. Ces interactions peuvent induire des modifications au niveau de la membrane, ce qui peut impacter le processus d'oxydation des lipides ou des protéines, et ainsi contribuer au maintien de l'intégrité structurale et fonctionnelle de la membrane. Deux types d'interactions significatives se démarquent : (a) la ségrégation du polyphénol dans le noyau non polaire de la membrane, en raison de la nature hydrophobe du flavonoïde ; et (b) l'interaction des flavonoïdes hydrophiles et des oligomères avec les groupes hydrophiles des lipides à l'interface lipidique-eau, principalement favorisée par la formation de liaisons hydrogène (Oteiza *et al.*, 2005).

1.4.8.2.Effet anti inflammatoire

Les polyphénols ont la capacité d'influencer les systèmes enzymatiques et de signalisation associés aux processus inflammatoires (Hussain *et al.*, 2016). Les mécanismes moléculaires sous-jacents aux activités anti-inflammatoires des polyphénols, comprennent plusieurs aspects : Ils inhibent les enzymes associées aux propriétés pro-inflammatoires telles que la COX-2, la LOX et la iNOS, la suppression de ces enzymes entraîne une diminution de la production d'acide arachidonique, de prostaglandines, de leucotriènes et d'oxyde nitrique (NO), qui sont des médiateurs clés de l'inflammation, bloquent le NF- κ B et la protéine activatrice-1 (AP-1), favorisent l'activation des enzymes détoxifiantes antioxydantes de la phase II, et stimulent la protéine kinase activée par le mitogène (MAPK), la protéine kinase-C et le facteur lié au facteur nucléaire érythroïde 2 (Santangelo *et al.*, 2007).

1.4.8.3.Effet hépato protecteur

Les flavonoïdes et les polyphénols sont les principaux acteurs parmi les hépatoprotecteurs d'origine végétale (Mamirov *et al.*, 2020). Certains de ces polyphénols ont démontré des

Synthèse bibliographique.
CHAPITRE I

affinités de liaison et des efficacités de ligand satisfaisantes pour des cibles biologiques importantes, notamment le CYP2E1, le TNF- α et le GPx4. Ainsi, ces composés phytochimiques ont le potentiel de fournir des effets hépatoprotecteurs, que ce soit en inhibant l'isoforme 2E1 du cytochrome P450, qui altère la conversion des xénobiotiques et des acides gras polyinsaturés en métabolites toxiques pouvant favoriser les lésions hépatiques, ou en modulant l'activité du facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α). De plus, ils peuvent agir en activant la glutathion peroxydase 4 (GPx4) via un mécanisme allostérique (**Leung et Nieto, 2013 ; Costea et al., 2022**).

1.4.9. Mode d'action des polyphénols contre l'hépatotoxicité induit par le paracétamol

L'inhibition de l'enzyme CYP450 par les flavonoïdes empêche la transformation du paracétamol en son métabolite hautement réactif, le NAPQI, contribuant ainsi à prévenir l'hépatotoxicité (**Cao et al, 2017**). De plus, l'activation du facteur de transcription Nrf2 par l'acide caféique induit la synthèse des enzymes de détoxification de la phase 2 ainsi que des enzymes anti-oxydantes (**Lee et al, 2010**), la quercétine augmente significativement la vitesse d'exposition de l'enzyme limitante dans la synthèse de GSH, conduisant à des concentrations intracellulaires élevées de glutathion. Cette action suggère que la quercétine prévient l'épuisement du glutathion par le NAPQI, offrant ainsi une protection contre l'hépatotoxicité. (**Pingili et al., 2020**). En outre, les polyphénols inhibent la liaison entre le NAPQI et les protéines membranaires mitochondriales, empêchant ainsi le NAPQI d'atteindre la chaîne respiratoire et de former des ERO. Cette inhibition protège la Ca²⁺-ATPase, prévenant ainsi le dysfonctionnement mitochondrial, la déplétion de l'ATP et la nécrose hépatocytaire (**Derbal, 2020**).

1.4. Nanoparticules

1.5.1. Généralités

Les nanoparticules constituent une percée majeure. Inspirées par les "balles magiques" de Paul Ehrlich, ces entités submicroniques offrent un potentiel remarquable dans la délivrance précise et contrôlée de médicaments. En exploitant des matériaux tels que les polymères et les lipides, ces particules sont conçues pour cibler spécifiquement les sites d'action dans le corps, minimisant ainsi les effets secondaires indésirables (**Kreuter, 2007**).

Les nanoparticules se divisent en deux catégories : organique et inorganique (**Anselmo et Mitragotri, 2019**), les nanoparticules organiques, telles que les polymères, les liposomes et les

Synthèse bibliographique.
CHAPITRE I

micelles sont développées pour la vaccination, la création de systèmes de délivrance de médicaments à action prolongée, et même pour une administration à travers la peau (**Anselmo et Mitragotri, 2019**).

I.5.2. Encapsulation

L'encapsulation des nanoparticules est une technique sophistiquée et prometteuse dans le domaine de la recherche médicale, elle consiste à envelopper les nanoparticules dans une couche protectrice, souvent à l'aide de matériaux polymériques ou lipidiques, afin de modifier leurs propriétés de surface et d'améliorer leur fonctionnalité dans diverses applications (**Wanget al.,2004**).

Cette approche permet de protéger les médicaments contre la dégradation prématurée et de les transporter directement vers les cellules au tissus spécifiques où ils sont nécessaires (**Wanget al.,2004**).

I.5.3. Les différents types de nanoparticule

Il existe plusieurs types de nanoparticules, chacune ayant ses propres caractéristiques et applications. Voici quelques exemples :

I.5.3.1. Liposome

Les liposomes sont des sphères constituées d'une ou plusieurs doubles couches de phospholipides. Ils sont synthétisés en utilisant des composants non toxiques tels que le cholestérol et des phospholipides (**Figure 9 A**). Le choix des composants de la bicouche lipidique influe sur sa rigidité ou sa fluidité, ainsi que sur sa charge (**Akbarzadeh et al., 2013**).

Du fait de leurs dimensions, allant de 30 nm à plusieurs micromètres, de leur caractère à la fois hydrophobe et hydrophile, ainsi que de leur compatibilité avec l'organisme, les liposomes présentent un potentiel considérable dans le domaine de l'administration de médicaments ainsi que dans d'autre domaine spécifique (**Akbarzadeh et al, 2013**). Ils sont caractérisés par une faible toxicité, n'induisent pas de réponses immunitaires, s'adaptent parfaitement au corps et se dégradent de manière biodégradable (**Oskoueianet al., 2020**).

Les liposomes agissent comme une enveloppe protectrice, isolant leur contenu des enzymes de la bouche et de l'estomac, des environnements alcalins, des sucs digestifs, des sels biliaires, de la flore intestinale et des radicaux libres dans le corps humain. Cette barrière phospholipidique

Synthèse bibliographique.
CHAPITRE I

offre une défense contre l'oxydation et la dégradation du contenu des liposomes, la préservant jusqu'à ce qu'il soit délivré avec précision à la glande, à l'organe ou au système cible pour une utilisation spécifique (Akbarzadeh *et al.*, 2013).

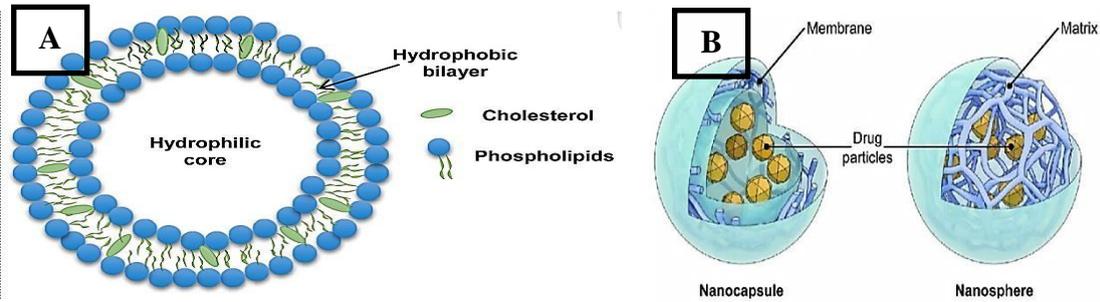


Figure (09) : Représentation schématique A. Des liposomes B. La structure d'une nano-capsule et d'une nano-sphère (Adaptée de Suffredini *et al.*, 2014 ; Nsairat *et al.*, 2022).

I.5.3.2. Les nanoparticules polymère

Les nanoparticules polymères, de nature biodégradable et non toxique, sont de minuscules particules avec un diamètre compris entre quelques dizaines et quelques centaines de nanomètres (Soppimath *et al.*, 2001 ; Nicolas et Couvreur, 2017). Pour leur synthèse, une variété de polymères est utilisée, comprenant à la fois des polymères naturels comme l'albumine, le chitosane ou l'héparine, ainsi que des polymères synthétiques tels que le poly-L-lactide, le poly-[L-glutamate], le poly-[D,L-lactide-co-glycolide] et le PEG (polyéthylène glycol) (Soppimath *et al.*, 2001).

En fonction de la nature et de la structure des polymères et de leur méthode de formulation, il est également envisageable d'obtenir des nanoparticules de différentes morphologies : des nanosphères (constituées d'un cœur matriciel de polymère (Figure (09B)), des nano-capsules (constituées d'une coque polymère contenant un cœur huileux ou aqueux), des micelles polymères (agrégats de copolymères amphiphiles avec un bloc hydrophobe et un bloc hydrophile) et des polymèresomes (Nicolas *et al.*, 2013) .

Matériel
&
Méthodes.

Matériel et Méthodes

CHAPITRE II

II.1 Matériel

II.1.1 Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé comprend des extraits de feuilles et d'écorce de *Fraxinus angustifolia* (**Figure 10**). Le choix de cette plante repose sur son utilisation en médecine traditionnelle pour traiter diverses maladies à caractères inflammatoires.

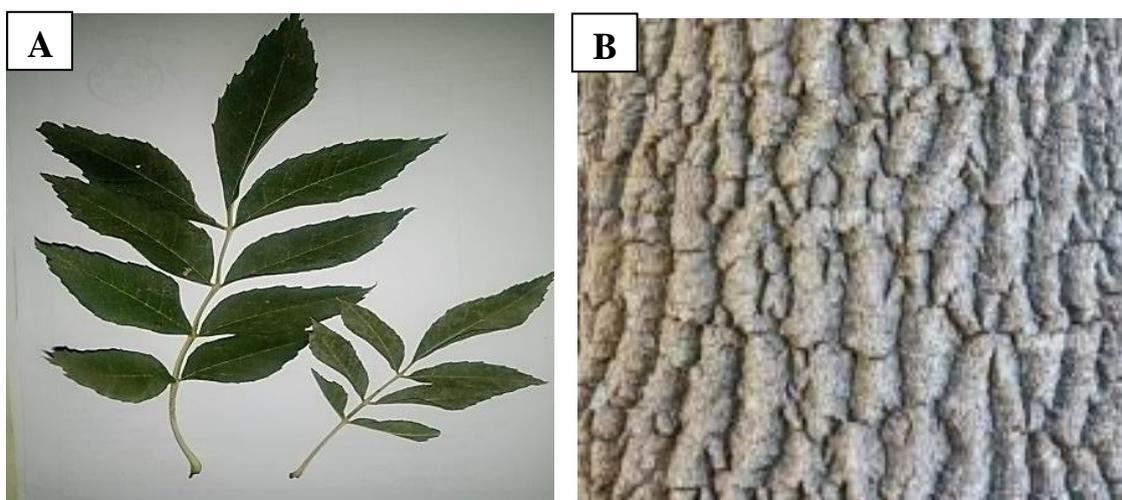


Figure (10) : Photographie originale des A. Les feuilles et de B. L'écorce de *Fraxinus angustifolia*.

II.1.2. Matériel animal

Des souris albinos de sexe masculin, âgées de 6-7 semaines, pesant entre 26 et 38 g, fournies par l'Institut Pasteur d'Alger (Algérie), ont été utilisées pour cette étude (**figure11**).

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 ± 5 % d'humidité, cycle lumière/obscurité de 12h/12h) dans des cages en polycarbonate dans des conditions parfaitement standardisées, avec accès libre 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).

Matériel et Méthodes

CHAPITRE II



Figure (11) : Souris Albinos dans une cage.

II.2 Méthodes

II.2.1 Préparation de la matière végétale

Les feuilles et l'écorce de *Fraxinus angustifolia* ont été récoltées en aout 2023, dans une forêt située à Chemini-Bejaia. Les parties de la plante ont été d'abord séchées à l'ombre et à température ambiante, puis placées dans une étuve à 37°C pendant une semaine pour éliminer toute trace d'humidité. Ensuite, les parties séchées ont été broyées à l'aide d'un broyeur électrique (**Figure 12**) et tamisées pour obtenir une poudre fine de 63 µm. Cette poudre a été stockée à l'abri de la lumière et conservée à -20°C.



Figure (12) : Broyage de l'écorce de *Fraxinus angustifolia*.

Matériel et Méthodes

CHAPITRE II

II.2.2. Préparation des extraits des feuilles et d'écorce de *Fraxinus angustifolia*

La technique d'extraction des feuilles et écorce de *Fraxinus angustifolia* que nous avons employée est l'extraction solide-liquide par sonication, en utilisant l'éthanol comme solvant d'extraction. Cette méthode a été réalisée conformément au protocole de **Pollini et al. (2021)** avec quelques modifications :

1. Séchage et Broyage : pour obtenir une poudre fine.
2. Extraction : La poudre fine est ensuite traitée avec de l'éthanol à 96%, dans un rapport solide/liquide de 1:70.
3. Traitements post-extraction :
 - Sonication : La mixture est soniquée à 37°C pendant 40 minutes.
 - Filtration sous vide, rota-vapeur et enfin une lyophilisation.

Les deux extraits éthanolique ont été conservés à -20 °C jusqu'à leurs utilisations. Les extraits secs de feuilles (FAF) et d'écorces (FAE) de *Fraxinus angustifolia* ont été utilisés pour toutes les expériences. Le taux du rendement des deux extraits a été calculé selon la formule suivante :

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

II.2.3 Dosage des composés phénolique

II.2.3.1 Dosage des phénols totaux

Principe :

Le principe se repose sur l'utilisation du réactif de folin composé d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$). Lorsque les phénols sont oxydés, ce réactif est réduit pour former un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (**Ribéreau-Gayon, 1968**). La coloration ainsi produite, avec une absorption maximale entre 725 et 760 nm, est directement liée à la quantité des polyphénols présente dans les extraits végétaux.

Matériel et Méthodes

CHAPITRE II

Mode opératoire : 20 µl d'extrait est additionné à 100 µl de Folin-Ciocalteu (10%) suivi de 80 µl de bicarbonate de sodium (Na_2CO_3 7.5%), après incubation pendant 30 min à 37°C, les absorbances sont enregistrées à 760 nm.

Pour déterminer la teneur en phénols totaux des extraits, une courbe d'étalonnage a été établie en utilisant l'acide gallique comme référence, et les concentrations sont exprimées en milligrammes équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait.

II.2.3.2 Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes dans nos extraits est effectué par la méthode du trichlorure d'aluminium. Cette méthode repose sur l'interaction des groupements hydroxyle des flavonoïdes avec le chlorure d'aluminium (AlCl_3), formant ainsi un complexe jaunâtre. L'intensité optique de ce complexe est mesurée à une longueur d'onde spécifique, généralement à 430 nm. Cela nous permet d'estimer la concentration des flavonoïdes dans nos échantillons (**maksimovic et al., 2008**).

Mode opératoire : Un volume de 100µl d'une solution de chlorure d'aluminium (AlCl_3) est ajouté à 100µl de chaque solution d'extraits, le mélange est incubé pendant 10 min à l'obscurité et les absorbances sont mesurées à 430 nm.

La courbe d'étalonnage a été établie en utilisant la rutine comme standard. Les concentrations en flavonoïdes ont été exprimées en milligrammes équivalents de rutine par gramme d'extrait.

II.2.3.3 Dosage des tanins condensés

En milieu d'acide chlorhydrique concentré, les composés condensés subissent une dépolymérisation, produisant de la catéchine. À ce stade, le carbone en position 6 du cycle A interagit avec le groupement aldéhydique présent dans la vanilline, générant ainsi un complexe chromophore rouge. Ce complexe présente une absorbance notable à une longueur d'onde de 500 nm (**Enneb et al., 2015**).

Mode opératoire : Le dosage des tanins condensés est réalisé en suivant le protocole de Kouamé et al. (2021). Un volume de 50 µl de l'extrait est mélangé à 1,5 ml de la solution spécifiée. Ensuite, 750 µl de HCl concentré sont ajoutés au mélange. Ce dernier est incubé pendant 30 minutes. Après incubation, les absorbances sont mesurées à 550 nm.

Matériel et Méthodes

CHAPITRE II

II.2.3.4. Dosages des tanins hydrolysables

Le dosage colorimétrique des tanins hydrolysables repose sur la réaction entre les tanins présents dans l'extrait et le réactif au trichlorure de fer. Cette interaction conduit à la formation d'un complexe de couleur rouge-violette. La densité optique de ce complexe est ensuite mesurée à une longueur d'onde de 660 nm pour déterminer la concentration des tanins dans l'échantillon (Dif *et al.*, 2015).

Mode opératoire : Le dosage des tanins hydrolysables est effectué selon le protocole de Mole *et al.* (1987). Un volume de 1 ml d'extrait de *Fraxinus angustifolia* est mélangé à 3,5 ml de solution de FeCl₃. Le mélange est ensuite incubé pendant 40 minutes. Après cette incubation, les absorbances sont mesurées à 660 nm.

II.2.4.L'encapsulation des extraits de *Fraxinus angustifolia*

Les extraits éthanoliques des feuilles et de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* ont été incorporés dans des liposomes. La préparation des liposomes a été réalisée dans le laboratoire de pharmacie dans le département des sciences de la vie, à l'université de Cagliari, Italie.

II.2.5 Evaluation *in vivo* de l'effet hépto-protecteur des extraits de *Fraxinus angustifolia* encapsulé et non encapsulé

II.2.5.1.Principe

Pour mettre en évidence l'activité hépto-protective de l'extrait éthanolique et des liposomes des feuilles et d'écorce de *Fraxinus angustifolia*, un modèle expérimental d'hépto-toxicité induite par le paracétamol a été sélectionné chez la souris.

II.2.5.2. Méthodes :

La méthode utilisée a été inspirée de la méthode décrite par Forouzandeh *et al.* (2013), avec quelques modifications.

Un total de 60 souris a été utilisé pour cette étude, réparties en 15 groupes de 4 souris chacune. Les traitements administrés comprenaient des extraits bruts non encapsulés de *Fraxinus angustifolia* (100 mg/kg et 50 mg/kg) dissous dans une solution saline physiologique (NaCl 0,9 %) et des extraits encapsulés dissous dans de l'eau bi-distillée. Les administrations ont été effectuées quotidiennement par voie intra-gastrique (IG) pendant 5 jours à l'aide d'une sonde

Matériel et Méthodes
CHAPITRE II

gastro-œsophagienne. Une heure après la dernière administration de chaque traitement, les souris ont reçu une injection de paracétamol (700 mg/kg) par voie intra-péritonéale (IP) (sauf le groupe 15). Les souris sont traitées comme suit (**Tableau III**)

Tableau (III) : Distribution des groupes et des traitements administrés.

Groupe	Traitement
Groupe 1	Contrôle NaCl 0,9%
Groupe 2	Liposome S75
Groupe 3	Liposome S100
Groupe 4	FAE
Groupe 5	Liposomes S75 incorporant FAE 100mg/kg
Groupe 6	Liposomes S100 incorporant FAE 100 mg/kg
Groupe 7	Liposomes S75 incorporant FAE 50mg/kg
Groupe 8	Liposomes S100 incorporant FAE 50mg/kg
Groupe 9	FAF
Groupe 10	Liposomes S75 incorporant FAF 100mg/kg
Groupe 11	Liposomes S100 incorporant FAF 100mg/kg
Groupe 12	Liposomes S75 incorporant FAF 50mg/kg
Groupe 13	Liposomes S100 incorporant FAF 50mg/kg
Groupe 14	Silymarine 50 mg/kg
Groupe 15	Nacl

La nourriture a été enlevée aux souris deux heures avant chaque gavage et leur a été remise deux heures après (Figure 13).

Matériel et Méthodes
CHAPITRE II



Figure (13) : Administration des extraits par voie orale.

II.2.5.3 Sacrifice des animaux

Les souris ont été sacrifiées 24 heures après le dernier traitement par décapitation, sous légère anesthésie à la vapeur de chloroforme, après une nuit de jeûne. Le sang a été prélevé à partir de la veine jugulaire, recueilli dans des tubes héparines, puis centrifugé à 3000 tours/minute pendant 10 minutes. Les plasmas obtenus ont été conservés à -20°C pour les analyses biochimiques des transaminases (**Figure 14**).

Matériel et Méthodes
CHAPITRE II



Figure (14) : Sacrifice des souris et récupération du foie.

II.2.5.4. Préparation des homogénat des foies des souris

Après le sacrifice et la dissection, le foie des souris a été récupéré dans de l'eau physiologique puis pesé grâce à une balance. 100mg du foie a été broyé dans 1 ml du tampon KCl (1,15 % pH 7,4) à l'aide d'un ultrason. L'homogénat obtenu a été soumis à une centrifugation de 4000 g /15 min à 4°C (**Olaleye et al., 2014**). Le surnageant a été ensuite récupéré et mis dans des eppendorf qui ont été conservés à -80 °C jusqu'à usage ultérieur. Quelques échantillons de foie ont été conservés dans du formol à 10 % pour l'étude histologique.

Matériel et Méthodes

CHAPITRE II

II.2.5.5 Evaluation des activités antioxydants et hépato- protectrice des extraits de feuilles et écorce de *Fraxinus angustifolia*

II.2.5.5.1 Dosage sanguin des transaminases

Le dosage de l'aspartate aminotransférase (ASAT), de l'alanine aminotransférase (ALAT) et de la phosphatase alcaline (PAL) a été réalisé au niveau de laboratoire d'analyses médicales MOUALEK, à Bejaia ; ces analyses enzymatique sur le sang ont été réalisé par COBAS INTEGRA, les concentrations de ces enzymes sont exprimées en unités de normes internationales par litre de substrat (UI/L). 1UI correspondant à la quantité d'enzyme convertissant 1 μmol de substrat par minute.

II.2.5.5.2 Aspartate Aminotransférase (AST)

L'aspartate aminotransférase (ASAT) appelée aussi le glutamate oxaloacétate transaminase (GOT) catalyse le transfert d'un groupe aminé à partir de l'aspartate à l' α -céto glutarate formant le glutamate et l'oxaloacétate. Ce dernier est réduit en malate par la malate déshydrogénase (MDH) et le NADH, H⁺ (Nicotinamide adénine dinucléotide) selon les réactions suivantes:

Aspartate + 2 Oxoglutarate (catalysé par ASAT) \rightarrow Glutamate + Oxaloacétate.

Oxaloacétate + NADH + H⁺ (catalysé par MDH) \rightarrow Malate + NAD⁺. (**Davila et al., 1989**)

La diminution de la concentration en NADH, mesurée par spectrophotométrie à 340 nm, est proportionnelle à l'activité catalytique de l'ASAT.

II.2.5.5.3 Alanine Aminotransférase (ALT)

L'alanine aminotransférase (ALAT), également connue sous le nom de glutamate-pyruvate transaminase (GPT), est analysée selon une méthode initialement développée par (**Wroblewski et LaDue, 1956**) puis optimisée par Henry et Bergmeyer. La méthode repose sur la réduction de l'absorbance due à la conversion du NADH en NAD⁺, proportionnelle à l'activité de l'ALAT dans l'échantillon. La réaction chimique impliquée est la suivante :

Alanine + 2 Oxoglutarate (ALAT) \rightarrow Glutamate + Pyruvate

Pyruvate + NADH + H⁺ (LDH) \rightarrow Lactate + NAD⁺

Matériel et Méthodes

CHAPITRE II

La réduction de la concentration de NADH, H⁺, mesurée par spectrophotométrie à 340 nm, est directement proportionnelle à l'activité catalytique de l'ALAT, comme l'ont décrit (**Davila et al.,1989**).

II.2.5.5.4 Phosphatase Alcaline (PAL)

Une enzyme présente dans plusieurs tissus du corps, notamment le foie. Elle joue un rôle crucial dans le métabolisme des protéines, la minéralisation osseuse et la détoxification ; une élévation des niveaux de PAL peut indiquer une hépatite ou cirrhose.



La vitesse de formation du p-Nitrophénole, déterminée par photométrie, est proportionnelle à la concentration catalytique de phosphatase alcaline dans l'échantillon testé.

II.2.5.5.5 Dosage hépatique du malondialdéhyde

La quantité de malondialdéhyde (MDA) hépatique est mesurée selon la méthode décrite par **Ohkawa et al., 1979**. Ce dosage repose sur la formation, en milieu acide et à haute température (100°C), d'un pigment rose résultant de la réaction entre le MDA et l'acide thiobarbiturique (TBA). Ce complexe, absorbant à 530 nm, est extractible par des solvants organiques comme le butanol.

Pour effectuer ce dosage, 100 mg de tissu hépatique sont broyés avec 1 ml de solution de KCl (1,15%) à l'aide d'ultrasons. À 500 µl de ce homogénat, 500 µl de TCA (acide trichloroacétique, 20%) et 1 ml de TBA (0,8%) sont ajoutés. Le mélange est ensuite chauffé à 100°C pendant 15 minutes, puis refroidi avant l'addition de 2 ml de n-butanol. Après centrifugation à 4000 rpm pendant 10 minutes, la densité optique du surnageant est mesurée à 530 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

La concentration de MDA est calculée selon la loi de Beer-Lambert, en utilisant le coefficient d'extinction molaire du complexe MDA-TBA, $\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Buege et Aust, 1978). Le taux de MDA cytosolique est exprimé en nano-moles de MDA libéré par gramme de tissu.

Matériel et Méthodes

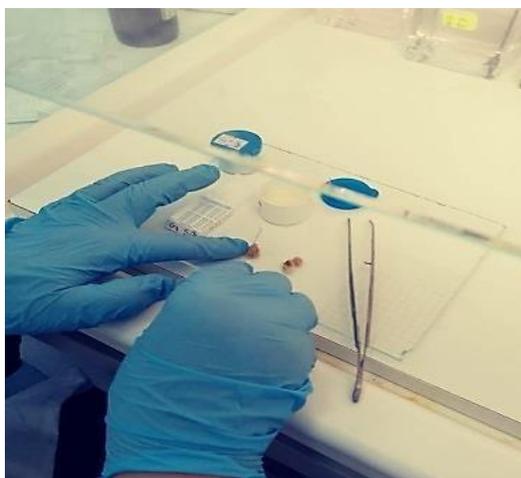
CHAPITRE II

II.2.6 .Evaluation histologique des foies

Les coupes histologiques des foies ont été réalisées au laboratoire de Médecine de la faculté de Médecine, situé sur le campus d'Aboudaou de l'université Abderahmane MIRA à Bejaia. Cette étude vise à valider l'éventuelle hépato-protection des extraits bruts et encapsulés des feuilles et de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* en observant les foies de différents groupes au microscope et en détectant la présence ou l'absence de lésions hépatiques pour chaque groupe. Les coupes histologiques ont été préparées en utilisant la technique de coloration Hématoxyline/Éosine (H&E).

L'hématoxyline, un colorant basique, teinte en bleu violacé les composants acides du tissu, tels que le noyau, les ribosomes et le réticulum endoplasmique rugueux. L'éosine, un colorant acide, colore en rose ou rougeâtre vif les composants basiques du tissu, comme le cytoplasme, les parois cellulaires et les fibres extracellulaires (fisher *et al.*, 2008).

1. La macroscopie



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

Matériel et Méthodes
CHAPITRE II

2. Déshydratation et le paraffinage :

Cette étape exige l'utilisation d'un automate de déshydratation pendant 11 heures et 27 minutes. Les segments hépatiques sont déshydratés par des passages successifs dans des bains d'éthanol de concentrations croissantes, de 70 % à 100 %, chaque bain durant 45 minutes. Ensuite, les échantillons subissent une clarification par immersion dans deux bains de xylène de 30 minutes chacun, permettant la miscibilité avec la paraffine. Au terme de l'étape d'inclusion, les échantillons sont immergés dans deux bains de paraffine liquide, chacun durant 1 heure et 30 minutes.



Matériel et Méthodes CHAPITRE II

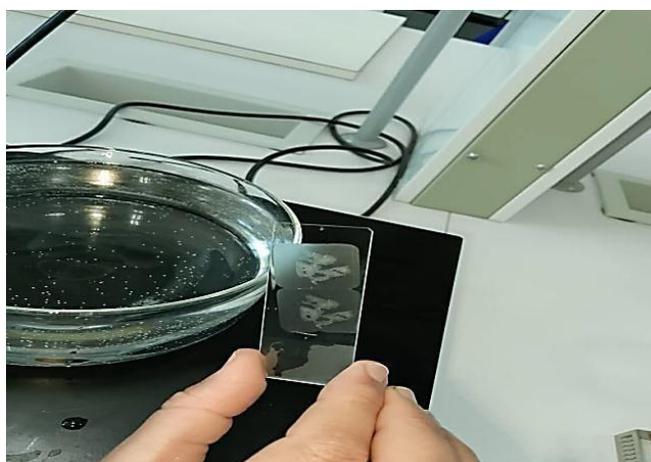
3. Phase d'enrobage



À l'aide d'une station d'enrobage, les échantillons ont été retirés des histocassettes et placés dans des moules remplis de paraffine. Pour obtenir des coupes de 2 μm d'épaisseur, les blocs de paraffine ont été taillés et sectionnés à l'aide d'un microtome.

4. Etalement et déparaffinage :

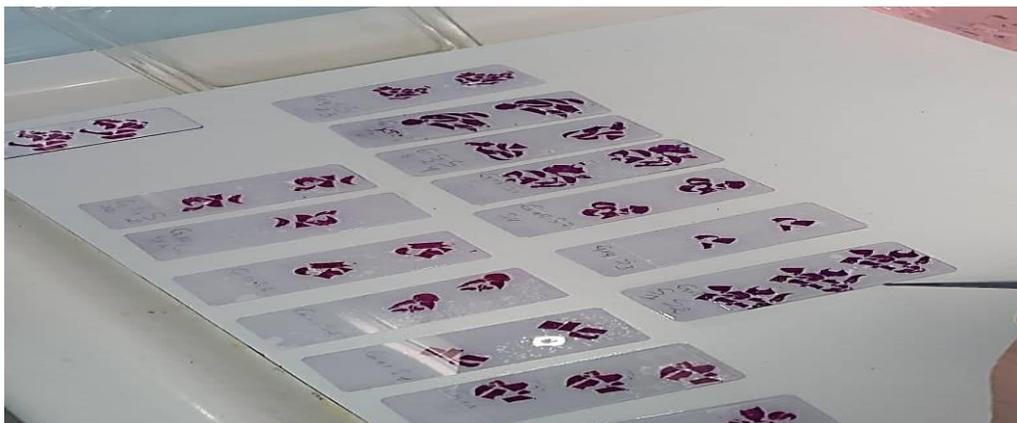
Les échantillons ont été étalés sur des lames à l'aide d'un bain-marie à 70 °C, puis déparaffinés dans une étuve réglée à une température de 74 °C Pendant une nuit.



Matériel et Méthodes CHAPITRE II

6. Réhydratation, Montage et coloration H&E des tissus

- En immergeant nos lames dans le xylène/ 30min, ensuite dans l'éthanol / 10 min ,a la fin dans un bain d'eau distillée afin de rehydrater les tissus hépatiques.
- Le montage a été effectué par la colle EUKITT, en passant au préalable les échantillons dans 2 bains d'éthanol et deux autres de xylène.
- Nous avons réalisé la coloration par l'hématoxyline/3min, suivi par un rinçage et terminé par l'éosine durant 1 min.



Matériel et Méthodes
CHAPITRE II

II.2.7 Etude statistique

Les résultats ont été exprimés par une moyenne \pm SEM (n=4) et la moyenne \pm SD (l'écart type). 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. Suivi du test de Dunnett, afin de comparer les valeurs des groupes traités aux valeurs du groupe contrôle. La signification statistique est exprimée comme ****p<0,0001 ; *** p <0,001 ; ** p < 0,01 ; *p<0,05 ; ns : non significatif.

RESULTATS
&
DISCUSSION

Résultats et discussion

CHAPITRE III

III. Résultats

III.1 Le rendement de l'extrait

L'extraction par ultrason, en utilisant l'éthanol comme solvant d'extraction, à partir des feuilles et d'écorce de *Fraxinus angustifolia* ; nous a permis d'obtenir un rendement qui est illustré dans la (figure 16).

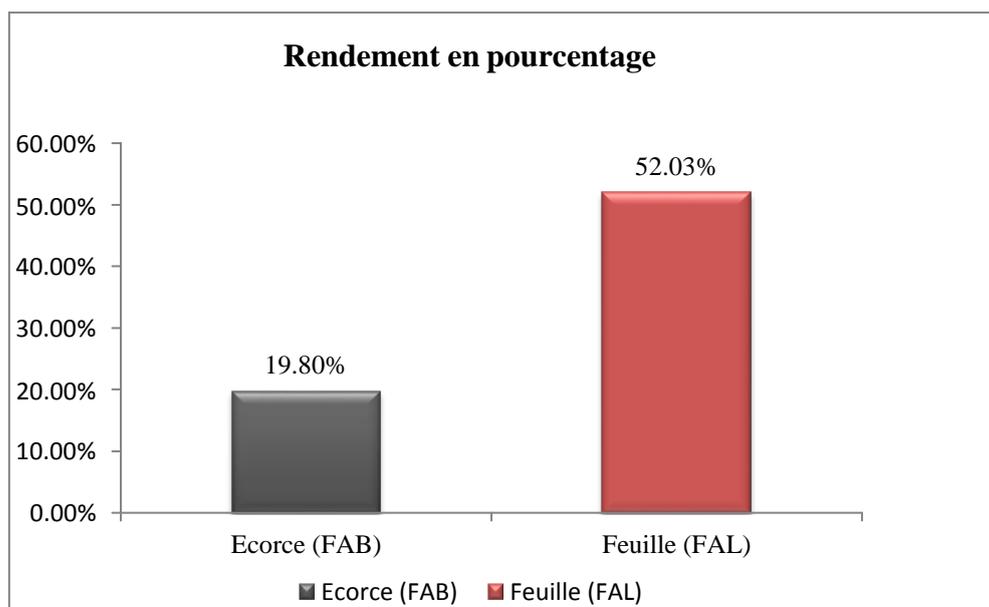


Figure (15) : Histogramme représentant le taux d'extraction des deux extraits éthanoliques des feuilles (FAL) et d'écorce (FAB) de *Fraxinus angustifolia*

Nous pouvons observer que les rendements des extraits brut d'écorce (19,8%) et des feuilles (52,03%) montre une différence importante dans le taux d'extraction entre les deux parties de la plante, bien que l'extrait éthanolique de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* ai un bon rendement, l'extrait éthanolique des feuilles semblent avoir le double en termes de quantité d'extrait obtenu par rapport à l'écorce (figure 16).

III.2 Teneur en phénols totaux, en flavonoïdes et en tannins

Les dosages ont été effectués par des méthodes colorimétriques. La concentration en phénols totaux des deux extraits a été quantifiée par la méthode de Folin-Ciocalteu, tandis que la teneur en flavonoïdes a été déterminée par les méthodes basées sur le chlorure d'aluminium. De plus, la teneur en tanins condensés a été mesurée par la méthode à la vanilline, et celle en tanins hydrolysables par la méthode au trichlorure de fer.

Résultats et discussion
CHAPITRE III

Les résultats sont exprimés en mg équivalents d'acide gallique (Eq AG) par gramme d'extrait pour les phénols totaux, en mg équivalents de rutine (Eq R) par gramme d'extrait pour les flavonoïdes, et en mg équivalents de catéchine (Eq Cat) par gramme d'extrait pour les tanins condensés et en équivalents de l'acide tannique Eq AT par gramme d'extrait pour les tanins hydrolysables. Les valeurs des teneurs sont présentées dans le tableau ci-dessous Tableau (IV).

Tableau (IV) : Teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes en tanins condensé et en tanins hydrolysable dans les extraits éthanolique d'écorce et des feuilles de *F. angustifolia*. Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm SD.

	Quantité des phénols totaux (mg EAG/g extrait)	Quantité des flavonoïdes (mg Eq R/g extrait)	Quantité des Tanins condense (mg Eq Cat/g extrait)	Quantité des Tanins hydrolysable (mg Eq AT/g extrait)
FAB	83,779 \pm 4,419	21,75 \pm 1,241	11,94 \pm 9,233	58,4 \pm 1,763
FAL	96,691 \pm 6,332	63,12 \pm 3,812	15,3 \pm 10,953	93 \pm 8,517

Les résultats indiquent que la plante *Fraxinus angustifolia* est riche en polyphénols, ce qui lui confère potentiellement des activités biologiques accrue. En comparant les extraits des FAL et FAB de *Fraxinus angustifolia*, il est observé que les feuilles présentent des concentrations plus élevées en flavonoïdes (63,12 \pm 3,812 mg Eq R/g extrait vs 21,75 \pm 1,241 mg Eq Q/g extrait) et en en tanins hydrolysables (93 \pm 8,517 mg Eq AT/g extrait vs 58,4 \pm 1,763 mg Eq AT/g extrait) ; par contre pour le dosage en phénols totaux (96,691 \pm 6,332mg Eq AG/g extrait vs 83,779 \pm 4,419 mg Eq AG/g extrait) et en tanins condensés (15,3 \pm 10,953 mg Eq Cat/g extrait vs 11,94 \pm 9,233 mg Eq Cat/g extrait), ils sont presque pareil.

III.3.1 Étude de l'effet hépato-protecteur des extraits de *F. angustifolia* contre la toxicité induite par le paracétamol

L'effet hépato-protecteur des extraits éthanoliques des feuilles et de l'écorce de *Fraxinus angustifolia*, tant sous forme libre qu'encapsulée, a été étudié en utilisant des souris comme modèles animaux. Pour induire l'hépatotoxicité, une dose de 700 mg/kg de paracétamol a été administrée par injection intra-péritonéale. Divers tests ont été réalisés pour évaluer l'effet préventif des extraits, seuls ou encapsulés dans des liposomes. Ces tests comprenaient le dosage

Résultats et discussion
CHAPITRE III

des transaminases, la phosphatase alcaline, la mesure du malondialdéhyde (MDA), l'évaluation du glutathion et une analyse histo-pathologique du foie

III.3.2 Caractérisation des liposomes

Les extraits des feuilles et d'écorce de *F. angustifolia* ont été incorporés dans des liposomes contenant une quantité d'eau. Pour cela, deux types de liposome ont été utilisés, avec du phospholipide S75 et phospholipide S100. Ces deux liposomes ont été préparés avec une quantité de 1 ml d'eau distillé, incorporant 100 mg/ml d'extrait des feuilles et d'écorce de *F. angustifolia*.

III.3.3 Changement des poids corporel des souris

La prise du poids corporel des souris a été réalisée chaque jour pendant les 5 jours de l'expérimentation.

Tableau (V) : Les variations de poids corporel des souris.

Poids (g)	C	LS75	LS100	E100	LS75E100	LS100E100	LS75E50
P Initial	30,92±0,63	32,45±3,25	29,92±2,25	33,16±2,25	33,60±1,16	32,92±2,70	30,57±2,33
P Final	30,50±2,43	33,17±3,88	31,30±2,00	32,52±2,4	34,75±1,07	30,87±2,32	29,27±3,30
LS100E50	F100	LS75F100	LS100F100	LS75F50	LS100F50	S	Témoin
31,70±3,19	32,85±3,081	33,22±1,93	31,07±3,29	31,05±1,52	32,60±1,62	31,72±3,90	32,75±3,02
32,075± 3,51	31,77±1,59	31,72±2,82	32,07±5,28	32,32±1,45	34,80±1,54	28,92±3,32	33,30±3,69

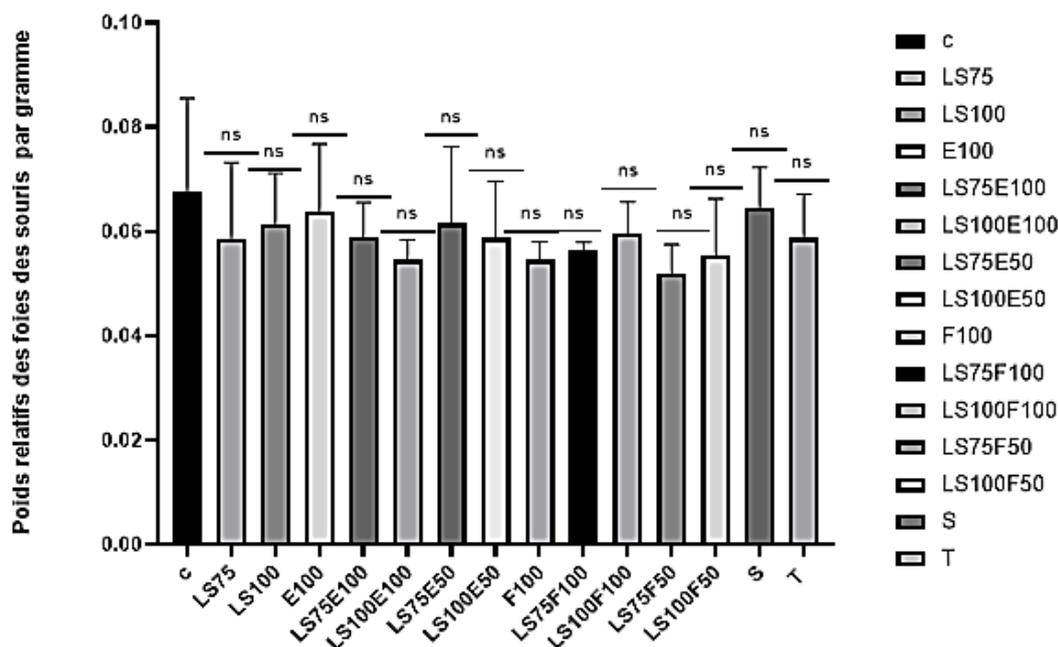
Les résultats représentés dans le Tableau (VI) ont montré que tous les groupes traiter et même le groupe témoin ne présente aucune différence significative des poids corporels par rapport au poids initial ; d'autre part, une baisse du poids corporel a été observée pour le groupe traité par la sylimarine (S).

III.3.4 Poids relatifs des foies des souris

Les foies des souris ont été pesés après leur excision pour déterminer s'il y avait une augmentation ou une diminution de leur taille, indicatif d'une inflammation ou d'une nécrose, respectivement. Les poids relatifs des foies ont été ensuite calculés et sont représentés dans la(Figure 17).

Résultats et discussion

CHAPITRE III



Figure(16) : Poids relatifs moyen des souris traités par les extraits d'écorce et Feuilles seules FAL et FAB, LS75E écorce encapsulé, LS feuilles encapsulés de *Fraxinus angustifolia*, LS75 et LS100 : Liposomes seul. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SD. (n= 4), tous les groupes ont reçus une dose de 700 mg/Kg de paracétamol.

Les résultats montrent que même si le groupe contrôle semble avoir le poids relatif le plus élevé, mais il n'y a pas de différences significatives dans les poids relatifs des foies des souris entre les différents groupes traités et le groupe contrôle. Cela pourrait indiquer que le poids du foie a été proportionnel à celui de la souris. Autrement le paracétamol n'a pas causé de dégâts significatifs aux foies ; l'observation à l'œil nu n'a montré aucune modification dans la taille des foies, hormis le groupe contrôle qui présentaient un gonflement, donc une taille plus grande que les autres groupes ce qui indique une inflammation.

III.3.5 Evaluation des taux hépatiques de MDA

Les résultats de la mesure du malondialdéhyde (MDA), représentés en nmol/mg de tissu hépatique, sont présentés dans la figure 28. Le MDA est un marqueur de la peroxydation lipidique, reflétant le niveau de stress oxydatif et les dommages potentiels subis par les cellules hépatiques dans le cadre de cette étude sur les effets hépato-protecteurs des extraits éthanoliques de *Fraxinus angustifolia* et des liposomes incorporant ces derniers (Figure 18).

Résultats et discussion CHAPITRE III

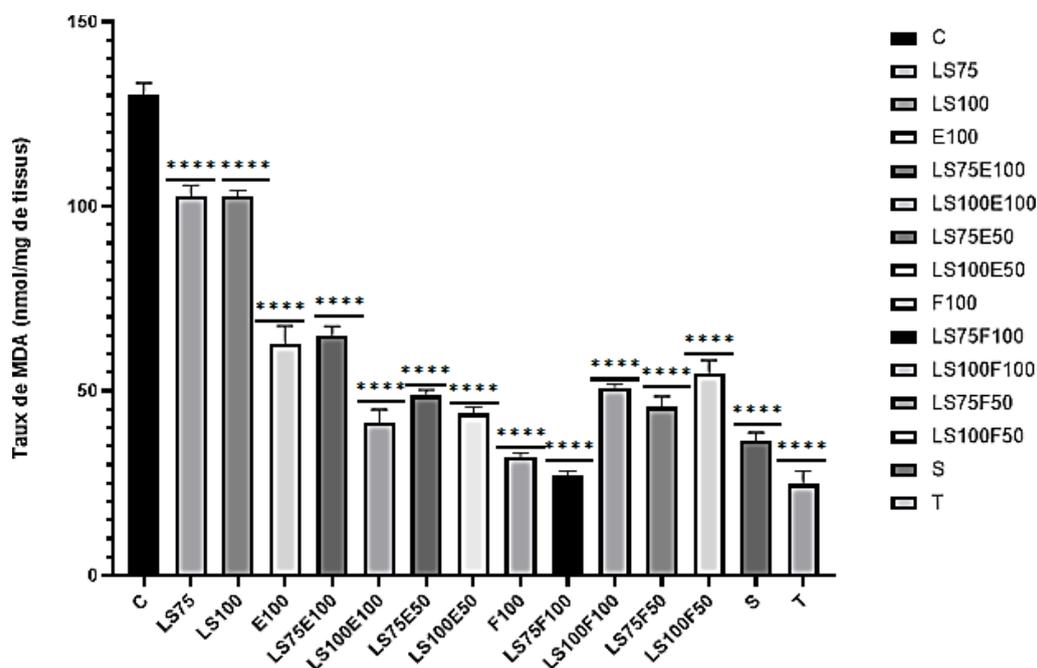


Figure (17) : L'effet des extraits et des liposomes sur les taux hépatiques des MDA chez des souris traiter par le paracétamol, les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SE. (n = 4), tous les groupes ont reçu une dose de 700 mg/kg de paracétamol.

Les résultats illustrés dans le graphe montrent que les niveaux de malondialdéhyde (MDA) varient considérablement entre les différents groupes. Le groupe témoin/NaCl présente les niveaux de MDA les plus bas $24,70 \pm 3,58$, tandis que le groupe contrôle non traité affiche les niveaux significativement les plus élevés avec $130,18 \pm 3,25$. Comparé au contrôle, tous les traitements montrent une réduction hautement significative des niveaux de MDA. Les extraits de feuilles $31,96 \pm 1,22$ sont plus efficaces que les extraits d'écorce avec $62,83 \pm 4,78$, indiquant une meilleure capacité hépto-protectrice. Les extraits encapsulés dans les liposomes, ont montré aussi une efficacité. Notamment, les extraits des feuilles encapsulés dans liposome LS75F100 avec $26,95 \pm 1,37$ qui présentent les valeurs les plus basses, surpassant même la silymarine avec $36,48 \pm 2,24$ et l'extrait seul. Entre les deux types de liposomes, il existe une petite différence d'efficacité, avec liposome S75 légèrement plus performant que le liposome S100 dans les extraits des feuilles contrairement à l'écorce. Ces observations suggèrent que l'encapsulation des extraits de *Fraxinus angustifolia* améliore significativement leur effet hépto protecteur, avec une différence notable entre les extraits des feuilles et d'écorce et entre les deux types de liposomes.

Résultats et discussion
CHAPITRE III

III.3.7 Évaluation des taux sériques des transaminases (ALAT et ASAT)

Chez des souris normales, les taux de transaminases (ALAT et ASAT) ont été mesurés pour déterminer l'efficacité des extraits et des liposomes contre la toxicité induite par le paracétamol. Les résultats ont montré une diminution significative des niveaux de transaminases, suggérant que les extraits, qu'ils soient utilisés seuls ou encapsulés, possèdent des propriétés hépatoprotectrices notables dans le **tableau VI** :

Tableau VI : Variation de la concentration sérique du ASAT et ALAT dans le sérum des souris traitées par le paracétamol (700 mg/ml) et l'extrait de la plante *Fraxinus angustifolia* brut et encapsulé et un témoin.

	(ALAT) U/L	(ASAT) U/L
Contrôle	100,78±11,02	463,26 ± 13,27
LS75	98,35 ± 12,26 ^{ns}	326,96 ± 7,14 ****
LS100	88,03 ± 15,34 ^{ns}	334,58±10,45****
E100	44,87 ± 12,60****	180,88 ± 12,72****
LS75E100	50,51 ± 11,82****	172,71 ± 12,10****
LS100E100	57,94 ± 13,66****	136,08 ± 14,09****
LS75E50	60,71 ± 13,78****	199,09 ± 15,76****
LS100E50	65,54±07,78**	255,70±12,12****
F100	50,80±12,78****	98,78±13,87****
LS75F100	44,78±13,45****	102,90±15,58****
LS100F100	38,45±08,59****	228,03 ± 10,34****
LS75F50	47,54±09,45****	258,78±12,58****
LS100F50	54,78±07,54****	206,67±13,45****
SIL	33,54±8,65****	132,58±12,54****
NACL	38,33±12,45****	142,58±12,58****

Les valeurs sont exprimées en moyenne±SD. (n=4). ** P<0,01, ***P<0,001 ****, ns : non significatif. Indique une différence significative par rapport au contrôle (Test de Dunnett)

Les résultats de l'ALAT montrent que plusieurs traitements ont un effet hépatoprotecteur très hautement significatif, en particulier les traitements E100, LS75E100, F100, LS75F100, ainsi qu'avec la dose de 50 mg, par contre les formulations liposomes seules (LS75 et S100) n'ont pas d'effet significatif, ce qui suggère que ces formulations n'ont pas d'effet significatif sur la réduction de la toxicité hépatique induite par le paracétamol ; tandis que les groupes SIL et NACL montrent une réduction marquée.

Résultats et discussion
CHAPITRE III

Les niveaux d'ASAT dans le premier groupe qui a reçu uniquement du paracétamol a montré des niveaux significativement élevés, indiquant des dommages hépatiques sévères induits par la toxicité du paracétamol contrairement au groupe NaCl (témoin négatif) qui a présenté les niveaux d'ASAT les plus bas, reflétant une fonction hépatique normale.

Tous les groupes traités ont montré des niveaux d'ASAT significativement réduits par rapport au groupe control. Il y avait une variation remarquable des niveaux d'ASAT parmi les groupes traités, ce qui implique que les différentes doses et formulations en liposome des extraits de *Fraxinus angustifolia* ont influencé les taux des transaminases ;comme par exemple le groupe F100 et LS75F100, qui ont montrés des niveaux d'enzyme significativement plus bas, suggérant que ces traitements particuliers étaient très efficaces.

III.3.9 Évaluation du taux de phosphatase alcaline

L'évaluation de l'effet hépato-protecteur de l'extrait éthanolique de *Fraxinus angustifolia* et des liposomes encapsulant les extraits a été réalisée en observant divers paramètres biochimiques dont la phosphatase alcaline chez la souris.

Tableau VII : Variation des taux de la phosphatase alcaline dans le sérum des souris traitées par le paracétamol (700 mg/ml) et l'extrait de la plante *Fraxinus angustifolia* brut et encapsulé et un témoin.

	PAL U/L
Contrôle	120,78±5,78
Liposome S75	99,32±12,78 ns
Liposome S100	98,35±10,45*
E100	81,56±11,47*****
LS75E100	78,46±10,87*****
LS100E100	56,87±9,35*****
LS75E50	78,79±14,56*****
LS100E50	71,84±1,40*****
F100	50,16±13,47*****
LS75F100	55,00±9,36*****
LS100F100	66,21±5,70*****
LS75F50	65,34±8,60*****
LS100F50	49,78±13,11*****
SIL	43,54±12,56*****
NACL	45,34±9,57*****

Résultats et discussion

CHAPITRE III

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SD. (n=4). ** P<0,01, ***P<0,001 ****, ns : non significatif. Indique une différence significative par rapport au contrôle (Test de Dunnett)

Les résultats illustrés dans le **Tableau VIII** révèlent que les niveaux de phosphatase alcaline (ALP) varient considérablement entre les différents groupes, le groupe témoin présente les taux d'ALP les plus élevés, les extraits éthanoliques d'écorce et de feuilles (E et F 100) réduisent significativement les niveaux d'ALP, cette réduction est encore plus marquée lorsque l'extrait est encapsulé dans les liposomes. Les demi-doses d'extraits des feuilles et d'écorce encapsulés montrent également des réductions. La silymarine (SIL) présente une réduction notable des niveaux d'ALP, comparable à celle observée avec les extraits de *Fraxinus angustifolia* encapsulés.

III.3.10. L'étude histopathologique du foie

Les examens histo-pathologique des sections de foie des souris présentés dans la figure 30 montrent une hépato-toxicité sévère dans les groupes contrôle et les liposomes (S75, S100) seuls, caractérisée par plusieurs types de lésions. Parmi celles-ci, on observe la dilatation et la congestion de la veine centro-lobulaire, des infiltrations de neutrophiles, ainsi que des foyers de nécrose.

Après l'administration des deux extraits, FAF et FAE, encapsulés dans des liposomes S75 et S100 aux doses 100 et 50 mg/kg, les lésions induites par le paracétamol sont considérablement réduites par rapport au groupe contrôle. On observe une apparence normale des hépatocytes, une congestion, et l'absence totale de nécrose et d'infiltration des neutrophiles. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par les dosages des paramètres biochimiques, ce qui confirme la protection de ces deux extraits contre la toxicité hépatique induite par le paracétamol (Figure 20 & Figure 21).

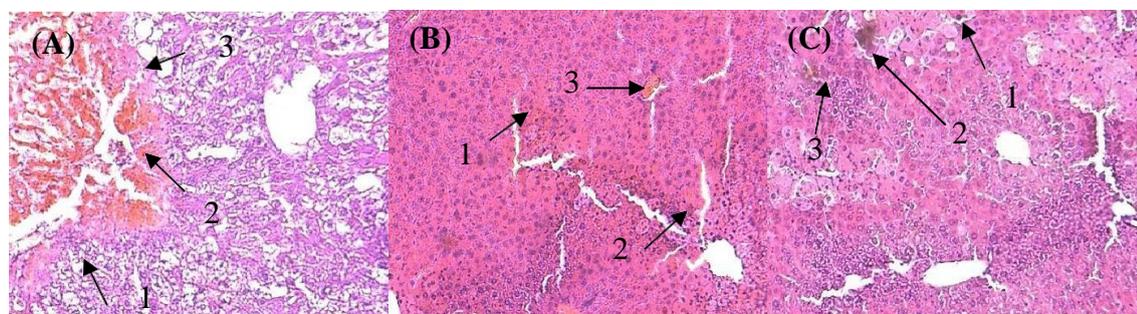


Figure (18) : Les coupes histologiques du foie observées par microscope optique avec un grossissement G \times 10.

Dont A : Contrôle ; **B :** Liposome S75 seul ; **C :** Liposome 2 S100 ; **(1)** Dilatation de la congestion de la veine centro-lobulaire **(2)** Infiltrat inflammation **(3)** Nécrose.

Résultats et discussion
CHAPITRE III

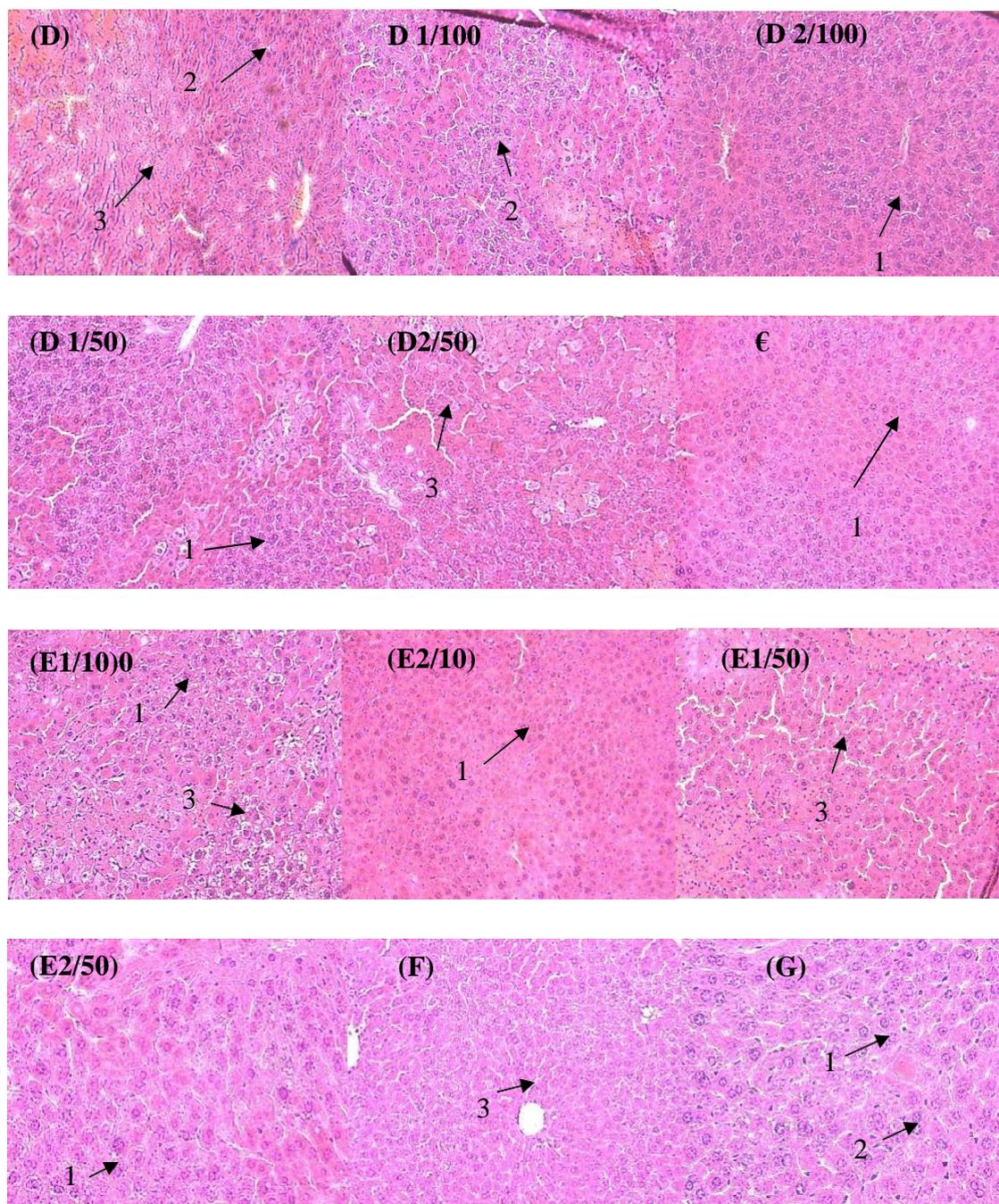


Figure (19) : Les coupes histologiques du foie observées au microscope optique avec un grossissement $G \times 10$.

Chaque figure représenté par son traitement **D** (écorce seul) ; **D1D2/100** (écorce encapsulé dans le liposome S75 et S100 respectivement à dose 100 mg) ; **D1D2/50**(écorce encapsulés dans les liposomes S75et S100) ; **E** (feuilles seules) ; **E1E2/100**(feuille encapsule dans les liposome S75et S100 a des dose de 100 mg respectivement) ; **E1E2/50** (Feuilles encapsules dans les liposomes S75et S100 respectivement a des dose de 50mg) ; **F**(traite avec la silymarine) ; **G** groupe témoin négatif) (1) cellules normales, (2) absence de nécrose, (3) une congestion.

III. Discussion

Le paracétamol est un médicament largement utilisé pour ses effets analgésiques et antipyrétiques. Malgré son profil de risque relativement sûr, il est l'une des principales causes d'intoxication médicamenteuse et de décès par surdose. Aux États-Unis, l'intoxication au paracétamol représente la première cause d'insuffisance hépatique aiguë (**Larson et al., 2005**). Des recherches ont montré que, lorsqu'il est pris à des doses élevées, il peut causer des lésions des cellules hépatiques. Le NAPQI, un métabolite produit par l'oxydation du paracétamol via le CYP 450, est l'une des toxines habituellement éliminées par le foie grâce à sa conjugaison avec l'antioxydant GSH (**Meister et Anderson, 1983**). Cependant, l'accumulation de ce NAPQI peut épuiser le système antioxydant, parfois jusqu'à son élimination complète (**Ajith et al., 2007**).

Depuis des millénaires, les plantes médicinales ont été exploitées pour prévenir ou traiter diverses maladies (**Fiorcci, 2006**). Actuellement, la quête de substances naturelles aux propriétés anti-oxydantes, utilisables dans les secteurs alimentaire, cosmétique et de la santé, connaît une intensification (**Repetto et Llesuy, 2002**).

Fraxinus angustifolia est largement utilisé dans la médecine populaire du nord de l'Algérie pour ses propriétés anti-inflammatoires et anti-oxydantes (**Atmani et al., 2009 ;Moulaoui et al., 2015 ; Ayouni et al., 2016**). Les extraits de cette plante ont démontré un fort potentiel antioxydant, notamment en inhibant l'activité de la xanthine oxydase (**Berboucha et al., 2010**). De plus, ils ont montré des activités antidiabétiques (**Lowman et al., 1983**) et une activité anti-péroxydation lipidique (**Medjahed et al., 2016**). Ces résultats confirment l'efficacité traditionnelle de *Fraxinus angustifolia* et justifient la poursuite des recherches pour identifier d'autres effets bénéfiques, tels que des propriétés hépato-protectrices contre le stress oxydatif. Pour tester l'effet hépato-protecteur de *Fraxinus angustifolia*, nous avons effectué une extraction par l'éthanol, permettant d'explorer plus en profondeur les bienfaits potentiels attribués aux polyphénols présents dans cette plante. Le choix de l'éthanol comme solvant est due à sa compatibilité de polarité avec les polyphénols et les flavonoïdes, ce qui permet d'avoir une meilleure extraction sans pour autant altérer de manière significative les structures moléculaires (**Cowan, 1999**). D'autre part, il est moins nocif que le méthanol, qui peut exercer un effet de méthanolyse sur les tannins (**Bruneton, 1999**).

Résultats et discussion

CHAPITRE III

Nos résultats montrent un rendement d'extraction de 52,03% pour les feuilles et de 19,8% pour l'écorce en comparaison, avec **Ayouni et al. (2016)** qui ont obtenu un rendement de 19,8% pour les feuilles et de 10,8% pour l'écorce, pour un extrait collecté à Chemini, quant à **Ahmane et al. (2019)**, ils ont rapporté des rendements de 17% pour les feuilles et de 5% pour l'écorce, récoltés à Amizour. Ces résultats indiquent que nous avons obtenu des rendements d'extraction nettement supérieurs.

Les différences dans les rendements d'extraction entre notre étude et celles précédemment rapportées peuvent être attribuées à divers facteurs liés aux conditions spécifiques d'extraction comme souligné par **Ayouni et al. (2016)**, ces variations peuvent résulter du choix du solvant, de la matrice végétale utilisée, de la durée et de la méthode d'extraction, ainsi que des paramètres physiques et chimiques influençant le processus. Les taux d'extraction des composés phénoliques dépendent notamment du rapport solide-liquide, de la granulométrie de la poudre végétale, de la température et du pH du milieu (**Nazck et Shahidi, 2004 ; Falleh et al., 2008**).

Les résultats obtenus pour les taux des phénols totaux dans les feuilles ($96,691 \pm 6,332$) et l'écorce ($83,779 \pm 4,419$) de *Fraxinus angustifolia* montrent une différence modérée par rapport à d'autres études. En comparaison, **Berboucha et al. (2010)** rapporte des taux beaucoup plus élevés pour les feuilles avec 535 mg/g. **Kasmi et al. (2021)** présentent des taux plus faibles pour les deux parties (24 pour les feuilles et 17 pour l'écorce), tandis qu'**Ahmane et al. (2019)** montrent des taux plus élevés pour les feuilles (536 ± 3 mg) mais similaires pour l'écorce (83 ± 1 mg). En comparant nos résultats avec ceux des autres études, il est évident que *Fraxinus angustifolia* est une source notable de polyphénols. Cette richesse en composés phénoliques a également été soulignée par **Li et al. (2008)**, qui ont classé cette espèce au deuxième rang en termes de teneur en phénols totaux parmi les 45 plantes médicinales étudiées.

Les résultats divergents des autres études sur les concentrations de flavonoïdes dans *Fraxinus angustifolia*. Notre étude a révélé des concentrations de 21,75 mg/g dans l'écorce et 63,12 mg/g dans les feuilles, tandis que **Berboucha et al. (2010)** ont trouvé des valeurs de 31 ± 1 mg/g pour l'écorce et 63 ± 2 mg/g pour les feuilles. En comparaison avec les travaux de **Medjahed et al. (2016)**, ils ont obtenu des résultats beaucoup plus élevés avec $100 \pm 10,76$ mg/g pour l'écorce et $50 \pm 10,76$ mg/g pour les feuilles, tandis que **Ayouni et al. (2016)**, ils ont rapporté une concentration notablement plus élevée de $175,94 \pm 9,34$ mg/g pour les feuilles. À l'opposé des résultats de **Atmani et al. (2009)**, qui ont trouvés une concentration beaucoup plus faible de 6,6mg/g de flavonoïdes dans l'écorce. Le genre *Fraxinus* est connu pour être une source riche

Résultats et discussion

CHAPITRE III

en flavones et flavonols qui sont des dérivés de quercétine et kaempferol (**Kostova et Iossifova, 2006**) et cette richesse se reflète également dans la variabilité significative des niveaux de tanins discutés ci-dessous.

Les résultats de notre étude sur les niveaux de tanins dans *Fraxinus angustifolia* révèlent une variabilité significative selon les parties de la plante et par rapport aux études comparées. Nous avons observé une prédominance des tanins hydrolysables par rapport aux tanins condensés, avec une concentration plus élevée dans les feuilles par rapport à l'écorce. En revanche, **Touhami et al. (2017)**, ont rapporté des concentrations plus élevées de tanins condensés dans deux villes en Tunisie, avec une quantité plus importante dans l'écorce par rapport aux feuilles.

La différence entre les taux obtenus pour les feuilles et l'écorce peut être attribuée aux fonctions physiologiques distinctes des parties de la plante, comme suggéré par **Kähkönen et al. (1999)** et la variation du contenu phénolique décrite dans la littérature peut être attribuée à plusieurs facteurs, notamment la méthode d'extraction utilisée. De plus, des facteurs environnementaux tels que la zone géographique, le climat, le sol, la topographie, et la présence de microorganismes sur la plante et dans le sol, ainsi que la période de récolte et le stade de développement de la plante, peuvent également influencer la teneur en polyphénols (**Locatelli et al., 2010 ; Ahmane et al., 2019**).

L'utilisation des liposomes comme vecteurs biodégradables et biocompatibles pour les médicaments présente des avantages significatifs, augmentant l'efficacité thérapeutique tout en réduisant la toxicité. Des études ont démontré que les liposomes sont rapidement éliminés de la circulation sanguine par le système phagocytaire mononucléaire, se localisant principalement dans le foie et la rate. Cette propriété est particulièrement bénéfique pour le traitement des maladies associées à des facteurs inflammatoires, car elle permet un ciblage précis des zones pathologiques tout en minimisant l'exposition des tissus sains aux agents thérapeutiques (**Gregoriadis et Neerunjun, 1974 ; Lian et al., 2001 ; allen et al., 2013**). Cette méthode peut être particulièrement efficace dans le cas d'une inflammation du tissu hépatique, ce qui est l'objectif de notre étude.

Les lésions hépatiques induites par le paracétamol constituent un modèle expérimental couramment utilisé pour évaluer l'efficacité des médicaments hépato-protecteurs, en raison de sa capacité à induire une hépato-toxicité après une seule dose, comme l'ont montré plusieurs études et recherches (**Chenoweth et al., 1962 ; sallie et al., 1991 ; Kanbur et al., 2009 ; Naguib**

Résultats et discussion

CHAPITRE III

et al., 2014). La période expérimentale de 5 jours a été choisie en comparaison avec les études de la littérature, montrant que cette durée est adéquate pour évaluer le potentiel hépatoprotecteur des extraits d'une plante (Liu et al., 2011 ; Forouzandeh et al., 2012 ; Kalantarie et al., 2018). Pour induire cette hépato-toxicité, la voie intra-péritonéale a été privilégiée car elle produit des effets plus rapide que la voie intra-gastrique. Pour évaluer l'effet protecteur des extraits de *Fraxinus angustifolia* contre la nécrose hépatique induite par l'injection de paracétamol, cinq paramètres ont été analysés : le poids relatif du foie des souris, les niveaux plasmatiques des transaminases, l'analyse de la phosphatase alcaline, le taux de malondialdéhyde (MDA) et le taux de la glutathion. Les résultats biochimiques obtenus ont été corroborés par une étude histologique.

En ce qui concerne les poids relatifs des souris, la figure (17) à démontrer un poids élevé dans le groupe control par rapports aux autres groupes ce qui suggère que l'hépatotoxicité induite par le paracétamol a causé une inflammation et un gonflement significatifs du foie.

Ce gonflement est une réponse typique à une lésion hépatique aiguë, sachant que ce groupe a été injecter avec du paracétamol sans traitement, la surdose de ce dernier a épuiser les réserve de glutathion laissant le NAPQI libre pour causer des dommages oxydatifs aux cellules hépatiques, entraînant une dénaturation des protéine et une mort cellulaire par nécrose (James et al., 2003 ; Begriche et al., 2023).

Tandis que les groupes traitées avec les extraits éthanolique de *F. angustifoliade* FAE jusqu'à LS100F50 (encapsulés et non encapsulés) à 100 et 50 mg/kg, ont eu une absence de lésions ou de gonflement significatifs du foie dans ces groupes, on suggère que les composés phénoliques des extraits tel les flavonoïdes comme la rutine, neutralisent les ERO, qui activent les enzymes COX et LOX cela en se liant à leurs sites actifs empêchant leurs substrat naturel (l'acide arachidonique) de s'y lier et d'être métaboliser en prostaglandine pro-inflammatoire (García-Lafuente et al., 2009), conduisant ainsi à une réduction du stress oxydatif et les dommages cellulaires causés par le métabolite toxique NAPQI produit lors du métabolisme du paracétamol (McGill et al., 2012 ; Lancaster et al., 2014).

Dans la présente étude, l'administration de 700 mg/kg de paracétamol par voie intra-péritonéale aux souris a conduit à une nécrose hépato-cytaire, ce qui s'est traduit par des niveaux accrus de transaminase et phosphatase alcaline libérée dans le sang.

Résultats et discussion

CHAPITRE III

Les groupes traités ont montré une diminution considérable de l'ALAT, de l'ASAT et de l'APL, que ce soit sous forme encapsulée ou brute. Cette diminution pourrait être attribuée à la libération immédiate des composés bioactifs (polyphénols) de *Fraxinus angustifolia*, tels que les flavonoïdes, qui réduisent le stress oxydatif et l'inflammation hépatique. En inhibant la production de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α et l'IL-6, ces flavonoïdes modulent les voies de signalisation telles que NF- κ B, contribuant ainsi à normaliser les niveaux d'ALAT, d'ASAT et d'APL (**Zhao et al., 2018 ; Bouabid et al., 2020**).

Les résultats obtenus avec les feuilles traitées, particulièrement avec les liposomes S100 à la dose de 100 mg, montrent une amélioration notable des niveaux d'ALAT et d'ASAT. Cette efficacité pourrait être attribuée à la protection offerte par les liposomes, qui préservent les composés bioactifs de la dégradation enzymatique et des conditions acides de l'estomac ; cette approche augmente la stabilité et la biodisponibilité des composés actifs, permettant une libération contrôlée et une meilleure interaction avec les cellules cibles (**Allen et Cullis, 2013**). Cependant, les liposomes eux-mêmes ne possèdent pas de propriétés bioactives, ce qui explique leur incapacité à fournir un effet hépato-protecteur direct ou à réduire les niveaux d'ALAT, se limitant à leur rôle de véhicule de livraison (**Allen et Cullis, 2013**).

La peroxydation lipidique, marqueur clé du stress oxydant, est évaluée par la mesure de TBARS (MDA) (**Limaye et al., 2003**). Ce processus résulte de l'attaque par les radicaux libres des lipides polyinsaturés, entraînant leur dégradation oxydative (**Mazunder et al., 2005**). Une augmentation de cette peroxydation peut être due à une production accrue de radicaux libres ou à une diminution de leur élimination, souvent liée à un épuisement des systèmes antioxydants (**Battacharya et al., 1997 ; Cho et al., 2002**). Le métabolite toxique du paracétamol, le N-acétyl-p-benzoquinone imine (NAPQI), est bien documenté pour épuiser les systèmes antioxydants cellulaires (**James et al., 2003; McGill et al., 2012**). La peroxydation lipidique conduit finalement à endommager les macromolécules dans les biomembranes vitales, générant une nécrose hépatique. Ce processus contribue à affaiblir la fluidité membranaire et à réduire l'activité des enzymes et des récepteurs membranaires (**Pallavi et al., 2003**).

Les groupes traités, avec les extraits ou les liposomes incorporant les extraits, ont montré une diminution des niveaux de MDA. En particulier, les feuilles de *Fraxinus angustifolia* à des

Résultats et discussion

CHAPITRE III

doses de 100 et 50 mg/kg ainsi que les liposomes encapsulant ce dernier ont présenté les taux les plus élevés en glutathion et les taux les plus faibles en MDA.

Les résultats de l'activité du MDA montrent clairement que les extraits éthanoliques de *Fraxinus angustifolia* possèdent une activité scavenging des radicaux libres très efficace, ces résultats sont en accord avec **Medjahed et al. (2016)**, qui montrent que l'analyse HPLC a révélé la présence de puissants composés antioxydants dans les deux extraits, tels que l'acide caféique et la lutéoline dans l'écorce, et la quercétine dans les feuilles. En effet, l'acide caféique active le Nrf2, qui est un facteur de transcription clé dans la régulation de la réponse anti-oxydante cellulaire (**Ma, 2013**). Cette activation induit la synthèse des enzymes de détoxification de la phase 2 et des enzymes anti-oxydantes (**Lee et al., 2010**).

Les différences entre les liposomes, telles que la composition lipidique, la taille des particules et les méthodes de préparation, jouent un rôle crucial dans leur capacité à encapsuler et à libérer efficacement les composés bioactifs (**Torchilin, 2005**). La composition lipidique spécifique, comme le Phospholipid S100 ou S75, affecte la stabilité et la libération contrôlée des liposomes, influençant ainsi leur efficacité dans les applications thérapeutiques (**Allen et Cullis, 2013**). La taille des particules et les méthodes de préparation, telles que l'extrusion et la sonication, sont également déterminantes pour *assurer une distribution homogène et une absorption optimale des composés actifs* (**Bangham et al., 1965; Akbarzadeh et al., 2013**), optimisant ainsi leur efficacité hépto-protectrice et thérapeutique globale (**Bulbake et al., 2017**).

Les analyses histo-pathologique ont confirmé que le stress oxydatif joue un rôle crucial dans les lésions hépatiques observées, incluant la peroxydation lipidique et la nécrose hépatique. Le groupe traité avec le paracétamol a montré des signes marqués de dilatation et de congestion de la veine centro-lobulaire, ainsi qu'une nécrose sévère et une infiltration inflammatoire. La peroxydation lipidique, résultant de l'accumulation de N-acétyl-p-benzoquinone imine (NAPQI), conduit à une déplétion du glutathion (GSH), un antioxydant essentiel. Cette déplétion facilite la génération ERO, qui attaquent les lipides membranaires, provoquant ainsi des dommages structurels et fonctionnels aux cellules hépatiques (**Hinson et al., 2010; McGill et Jaeschke, 2013**). Les ERO perturbent les mitochondries, responsables de la production d'énergie cellulaire, par le biais de la peroxydation lipidique. Cette perturbation entraîne une altération de la perméabilité membranaire mitochondriale, conduisant à la libération des facteurs pro-apoptotiques tel la protéine bax et à l'induction de la nécrose cellulaire (**Jaeschke, 2003 ; Garrido et al., 2006**).

Résultats et discussion

CHAPITRE III

En plus du stress oxydatif, la réponse immunitaire joue également un rôle déterminant dans la progression des lésions hépatiques. Les cellules T cytotoxiques du foie activé libèrent le TNF- α , les perforines et les granzymes, responsables de la nécrose des hépatocytes. Cette nécrose est suivie par la libération des DAMPs (Danger associated molecular patterns), activant les cellules de Kupffer. L'activation de ces cellules entraîne la sécrétion des médiateurs inflammatoires, de cytokines et de chimiokines, favorisant l'apoptose des hépatocytes et activant le système immunitaire inné. Cela conduit au recrutement et à l'accumulation des monocytes et neutrophiles au site de l'inflammation et des nécroses hépato-cytaires (**Schwabe et al., 2020**).

Ces résultats histo-pathologiques et biochimiques démontrent que les liposomes incorporant les extraits FAF et FAE, ainsi que les deux extraits qu'ils soient administrés seuls ou encapsulés dans des liposomes, offrent une protection contre la toxicité hépatique induite par le paracétamol. Les groupes traités montrent une réduction notable des lésions hépatiques, telles que la nécrose et l'infiltration des neutrophiles, ainsi qu'une amélioration de l'apparence des hépatocytes et une diminution de la congestion veineuse. De plus, il a été observé que l'impact des liposomes incorporant les deux extraits est comparable à celui de la silymarine, et même supérieur dans le cas des extraits des feuilles administrés seuls ou encapsulés dans le liposome S75 à une dose de 100 mg, (en termes de réduction du MDA) suggérant ainsi qu'ils peuvent agir par les mêmes mécanismes.

Ces observations confirment les propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoires et anti-apoptotiques des extraits de *Fraxinus angustifolia*, y compris lorsqu'ils sont encapsulés, comme démontré par plusieurs études antérieures.

L'activité anti-inflammatoire de *Fraxinus angustifolia* a été solidement établie dans la littérature scientifique, notamment par le travail de **Moulaoui et al. (2015)**. Ces études suggèrent que cette activité pourrait être attribuée à une modulation de la voie NF- κ B, comme indiqué par **Lee et al. (2010)** et **Liu et al. (2011)**. De plus, des recherches récentes menées par **Zhang et al. (2013)** ont montré que les flavonoïdes présents dans *Fraxinus angustifolia* sont capables d'inhiber l'expression de NOS inducible (NOSi) et de cyclo-oxygénase (COX), ce qui contribue à leur effet anti-inflammatoire en atténuant la production de médiateurs pro-inflammatoires.

Une autre étude de **Derbal, 2020** a montré l'activité anti-apoptotique des polyphénols. Ces composés inhibent la liaison entre le NAPQI et les protéines membranaires mitochondriales, empêchant ainsi le NAPQI d'atteindre la chaîne respiratoire et de former des ERO. Cette

Résultats et discussion

CHAPITRE III

inhibition protège la Ca²⁺-ATPase, prévenant ainsi le dysfonctionnement mitochondrial, la déplétion de l'ATP et la nécrose hépato-cytaire. L'inhibition de l'enzyme CYP450 par les flavonoïdes empêche la transformation du paracétamol en son métabolite hautement réactif, le NAPQI, contribuant ainsi à prévenir l'hépatotoxicité (Cao *et al.*, 2017).

Les études menées par **Atmani *et al.* (2009)** ainsi que **Ayouni *et al.* (2016)** ont mis en évidence l'activité antioxydante des extraits de feuilles et d'écorce de *Fraxinus angustifolia*. Cette activité est principalement attribuée à la présence d'acide caffeoylquinique, de flavonoïdes et de l'acide salicylique dans ces extraits (**Dudonné *et al.*, 2011 ; Rubiolo *et al.*, 2013; Kasmi *et al.*, 2021**).

Ces résultats indiquent que les liposomes encapsulant les extraits de feuilles et d'écorce de *Fraxinus angustifolia* montrent une remarquable activité hépato-protectrice. Cette performance pourrait être due à la taille réduite des liposomes, ainsi qu'à leur composition et à leur localisation prolongée dans l'organisme.

Conclusion

CONCLUSION

Le foie est considéré comme l'organe le plus exposé aux diverses maladies nocives en raison de sa fonction capitale de détoxification de toutes les substances accédant au corps humain, y compris le paracétamol.

Dans le présent travail, nous nous sommes intéressés à l'évaluation des effets hépatoprotecteurs des extraits éthanoliques des feuilles et d'écorce de *Fraxinus angustifolia* et des liposomes incorporant ces derniers, contre la toxicité hépatique induite par le paracétamol chez la souris. Les évaluations ont inclus le poids relatif des foies, des paramètres biochimiques (ALAT, ASAT, phosphatase alcaline), le taux de MDA et celui du glutathion, ainsi qu'une analyse histologique des lésions hépatiques.

Nos résultats montrent que l'administration de ces extraits, tant bruts qu'encapsulés dans des liposomes a significativement réduit les niveaux de malondialdéhyde (MDA), d'ALAT, d'ASAT et de phosphatase alcaline, notamment les extraits des feuilles qui ont montré des valeurs réduites de ($26,95 \pm 1,37$ nmol/g, $44,78 \pm 13,45$ U/L, $102,90 \pm 15,58$ U/L et $55,00 \pm 9,36$ U/L) respectivement, comparativement au groupe contrôle. De manière notable, cette réduction s'est accompagnée d'une augmentation significative des niveaux de glutathion mesurée à $0,3477 \pm 0,0013$ nmol/mg, les observations microscopiques des tissus hépatiques des souris ayant reçu uniquement le paracétamol ou les liposomes dépourvus d'extrait ont montré une altération de l'aspect hépatique qui se manifeste par des lésions nécrotiques et une infiltration des cellules inflammatoires, tandis que les groupes traités avec les extraits ont présenté une restauration de la structure hépatique témoignant de la réduction des paramètres étudiés.

Ces conclusions mettent en évidence le potentiel des extraits de *Fraxinus angustifolia*, notamment en état intra-liposomes, comme agents thérapeutiques prometteurs pour la prévention et le traitement des lésions hépatiques induites par des substances hépatocytotoxiques, à savoir le paracétamol. Les mécanismes sous-jacents semblent être liés aux propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et anti-apoptotiques de la plante. Ces caractéristiques justifient une étude plus approfondie de son potentiel préventif. Il serait pertinent de mesurer les niveaux de diverses enzymes antioxydantes, telles que la super-oxyde dismutase (SOD) et la catalase, et de mener des recherches supplémentaires afin d'optimiser leur utilisation clinique.

Références

Bibliographiques

Références bibliographiques

A

- **Ahmane, N., Atmani-Kilani, D., Chaher, N., Ayouni, K., Rahmani-Berboucha, M., Costa, GD, Debbache-Benaida, N., Richard, T. et Atmani, D., (2019)** ‘Identification of bioactive compounds from *Fraxinus angustifolia* extracts with anti-NADH oxidase activity of bovine milk xanthine oxidoreductase’, *Turkish Journal of Biology* ,(43), pp .133-147.
- **Ajith, A.T., Hema, U., Et Aswathy, M.S., (2007)** ‘ Zingiber officinale roscoe prevents acetaminophen-induced acute hepatotoxicity by enhancing hepatic antioxidant statu’, *Food and Chemical Toxicology*, (45), pp. 2267-2272.
- **Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S. W., Zarghami, N., Hanifepour, Y., Nejati-Koshki, K., (2013)** ‘Liposome: classification, preparation, and applications’, *Nanoscale Research Letters*, 8(1), pp. 102.
- **Albichr, I.S., et Hantson, P., (2018)** ‘Le paracétamol à dose thérapeutique : quelles populations à risque d’hépatotoxicité ?’, *Toxicologie Analytique et Clinique*, 30(1), pp. 19–34.
- **Allen, T.M., et Cullis, P.R., (2013)** ‘Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications’, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(1), pp. 36-48.
- **Anania, F., (2001)** ‘Aldehydes potentiate $\alpha 2(I)$ collagen gene activity by JNK in hepatic stellate cells’, *Free Radical Biology and Medicine*, 30(8), pp. 846–857.
- **Anty, R., Patouraux, S., Tran, A., et Gual, P.,(2014)**‘Obésité et maladie du foie gras non alcoolique’, *Obésité*, 9(4), pp. 271–279.
- **Aouacheri, W., Saka, S., et Djafer, R., (2009)** ‘L'effet toxique d'un insecticide (alphanéthrine) sur l'activité du système enzymatique de détoxification du

Références bibliographiques

glutathion', *Annales de Toxicologie Analytique*, 21(3), pp. 125-129.

- **Atmani, D., Chaher, N., Atmani, D., Berboucha, M., Debbache, N., et Boudaoud, H., (2009)** 'Flavonoids in Human Health: From Structure to Biological Activity', *Current Nutrition & Food Science*, 5(4), pp. 225-237. Available at:
- **Ayouni, K., Berboucha-Rahmani, M., Kim, HK, Atmani, D., Verpoorte, R., & Choi, YH., (2016)** 'Outil métabolomique pour identifier les composés antioxydants des extraits de feuilles et d'écorce de tige de *Fraxinus angustifolia*' *IndCropsProd*.

B

- **Bangham, A. D., Standish, M. M., & Watkins, J. C., (1965)** 'Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids' *Journal of Molecular Biology*, 13(1), pp. 238-252.
- **Begrache, K., Penhoat, C., Bernabeu-Gentey, P., Massart, J., et Fromenty, B., (2023)** 'Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity in Obesity and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Critical Review', *Livers*, 3(1), pp. 33-53.
- **Berboucha, M., Ayouni, K., Atmani, D., Atmani, D., et Benboubetra, M., (2010)** 'Etude cinétique de l'inhibition de la xanthine oxydase par des extraits de deux plantes algériennes sélectionnées traditionnellement utilisées pour le traitement des maladies inflammatoires' *Journal of Medicinal Food*, 13(4), pp. 896 à 904.
- **Bernardi, P., et Rasola, A., (2007)** 'Calcium and Cell Death: The Mitochondrial Connection', in *E. Carafoli and M. Brini (eds) Calcium Signalling and Disease. Dordrecht: Springer Netherlands (Subcellular Biochemistry)*, pp. 481–506.
- **Berson, A., (2005)** 'Hépatotoxicité médicamenteuse par atteinte mitochondriale', *Mini-revue hépato-gastro*, 12(3), p. 191-198.
- **Bessaguet, F., et Desmoulière, A., (2021)** 'Le foie', *Actualités Pharmaceutiques*, 60(605), pp. 57–61.
- **Bhattacharaya, P., Chatterjee, D., & Jacks, G., (1997)** 'Occurrence of Arsenic-contaminated groundwater in alluvial aquifers from delta plains, Eastern India:

Références bibliographiques

Options for safe drinking water supply' ,*Water Resour. Dev*, 13, 79-92.

- **Bors, W., Heller, W., Michel, C., et Saran, M., (1990)** 'Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies', *Methods in Enzymology*, 343, pp. 355-343.
- **Bouabid, K., Lamchouri, F., Toufik, H., et Faouzi, M.E.A., (2020)** 'Phytochemical Investigation, in vitro and in vivo antioxidant properties of aqueous and organic extracts of toxic plant: *Atractylisgummifera* L', *Journal Of Ethnopharmacology*, 253, pp. 112640.
- **Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., et Gontier, E., (2001)** 'Production of plant secondary metabolites: a historical perspective', *Plant Science*, 161(5), pp. 839–851.
- **Bradford, M.M., (1976)** 'A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding', *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), pp. 248-254.
- **Bravo, L., (1998)** 'Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance', *Nutrition Reviews*, 56(11), pp. 317–333.
- **Bruneton, J., (1999)** 'Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales' *Techniques et Documentations. Édition Lavoisier*, (3), pp. 286-347.
- **Buege, J.A., et Aust, S.D., (1978)** 'Microsomal lipid peroxidation', *Methods in Enzymology*, 52, pp. 302-310.
- **Bulbake, U., Doppalapudi, S., Kommineni, N., Khan, W., (2017)** 'Liposomal Formulations in Clinical Use: An Updated Review' ,*Pharmaceutics*, 9(2), pp. 12

C

- **Cao, L., Kwara, A., et Greenblatt, D.J., (2017)** 'Metabolic interactions between acetaminophen (paracetamol) and two flavonoids, luteolin and quercetin, through in-vitro inhibition studies', *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 69(12), pp. 1762–1772.

Références bibliographiques

- **Center, S.A., (1993)** ‘Feline Hepatic Lipidosis’, *In Veterinary Annual*, (33), p. 244-254.
- **Chenoweth, M. B., et Hake, C. L., (1962)** ‘The smaller halogenated aliphatic hydrocarbons’, *Annual Review of Pharmacology*, 2(1), pp. 363-398.
- **Clayden, J., Warren, S., Greeves, N., and Wothers, P., (2002)** ‘*Chimieorganique*’, 2nd edn., Paris: De Boeck.
- **Costea, L., Chițescu, C.L., Boscencu, R., Ghica, M., Lupuliasa, D., Mihai, D.P., et Gîrd, C.E., (2022)** ‘The Polyphenolic Profile and Antioxidant Activity of Five Vegetal Extracts with Hepatoprotective Potential’, *Plants*, 11(13), pp. 1680.
- **Cowan, M.M., (1999)** ‘Plant Products as Antimicrobial Agents’, *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), pp. 564-582.
- **Crooks, R. M., Zhao, M., Sun, L., Chechik, V., & Yeung, L. K.,(2001)** ‘Dendrimer-Encapsulated Metal Nanoparticles :Synthesis, Characterization, and Applications to Catalysis’, *Accounts Of Chemical Research*, 34(3), pp. 181 190.
- **Crozier, A., Lean, M. E., McDonald, M. S., & Black, C., (1997)** ‘Quantitative Analysis of the Flavonoid Content of Commercial Tomatoes, Onions, Lettuce, and Celery’, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(3), pp. 590–595.

D

- **Danan, G., 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’, *Journal of Clinical Epidemiology*, 46(11), pp. 1323–1330.
- **Davila, J. C., Rodriguez, J. F., & Melendez, E., (1989)** ‘Measurement of ASAT activity using spectrophotometry at 340 nm: Application in clinical and experimental studies’, *Journal of Biochemical Methods*, 18(3), pp. 215-225.

Références bibliographiques

- **Dif, M.M., Benchiha, H., Mehdadi, Z., Benali-Toumi, F., Benyahia, M., & Bouterfas, K., (2015)** 'Quantification study of polyphenols in different organs of *Papaver rhoeas* L' ,*Phytothérapie*, 13(5), 314-319.
- **Dudonné, S., Poupard, P., Coutière, P., Woillez, M., Richard, T., Mérillon, J.M, et Vitrac, X. (2011)** 'Composition phénolique et propriétés antioxydantes de l'extrait de bourgeon de peuplier (*Populus nigra*) : contribution antioxydante individuelle des composés phénoliques et effet transcriptionnel sur le vieillissement cutané' ,*Journal de chimie agricole et alimentaire*, 59(9), pp. 4527-4536.

E

- **Ellman, G.L., (1959)** 'Tissue sulfhydryl groups', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82(1), pp. 70-77.
- **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*, pp. 1-300.
- **Enneb, H., Belkadhi, A., Cheour, F., Ferchichi, A., Sboui, A., Arroum, S., Khorchani, T., (2015)** 'Comparaison des composés phénoliques et du pouvoir antioxydant de la plante de henné (*Lawsonia inermis* L.)', *Journal of New Sciences* ,pp. 20.

F

- **Fairhurst, S., Barber, DJ., Clark, B., & Horton, A.A., (1982)**'Studies on paracetamol-induced lipid peroxidation', *Toxicology (Amsterdam)*, 23(2-3), pp. 249-259.
- **Fakurazi, S., Hairuszah, I., & Nanthini, U., (2008)** 'Moringa oleifera Lam prévient les lésions hépatiques induites par le paracétamol en rétablissant le niveau de glutathion' ,*Toxicologie alimentaire et chimique*, 46(8), 2611-2615.

Références bibliographiques

- **Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., & Abdely, C., (2008)** 'Phenolic composition of *Cynaracardunculus* L. organs, and their biological activities', *Comptes Rendus Biologies*, 331, pp. 372-379.
 - **Fiorrucci, S., (2006)** 'Activités biologiques de composés de la famille des flavonoïdes : approche par méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire', *Thèse de doctorat*, Université de Nice-Sophia Antipolis.
 - **Fischer, A. H., Jacobson, K. A., Rose, J., & Zeller, R., (2008)** 'Hematoxylin and Eosin Staining of Tissue and Cell Sections', *CSH Protocols*, 2008(5), pdb.prot4986.
 - **Forman, H. J., Zhang, H., & Rinna, A., (2009)** 'Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis', *Molecular Aspects Of Medicine*, 30(1-2), pp. 1-12.
 - **Forouzandeh, H., Azemi, M.E., Rashidi, I., Goudarzi, M., & Kalantari, H., (2013)** 'Etude de l'effet protecteur de l'extrait de *Teucrium polium* L. sur l'hépatotoxicité induite par l'acétaminophène chez la souris', *Revue Iranienne de Recherche Pharmaceutique : IJPR*, 12(1), pp. 123.
 - **Fromenty, B., (2010)** 'Mécanismes de l'hépatotoxicité médicamenteuse', *EMC - Hépatologie*, 5(3), pp. 1-12.
- G**
- **Gagliotti Veillée de Mello, S.V., & Frode, T.S., (2018)** 'Approches basées sur des modèles expérimentaux in vitro et in vivo pour étudier les propriétés anti-inflammatoires des coumarines', *Chimie médicinale actuelle*, 25(12), pp. 1446-1476.
 - **García-Lafuente, A., Guillamón, E., Villares, A., Rostagno, M.A., et Martínez, J.A., (2009)** 'Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease', *Inflammation Research*, 58(9), pp. 537-552.
 - **Garrec, S., Burnat, P., et Gentes, P., (1994)** 'Paracetamol', *Lyon pharmaceutique*, 45, pp. 227-242.

Références bibliographiques

- **Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M., Puig, PE, Didelot, C., et Kroemer, G., (2006)** ‘Mécanismes de libération du cytochrome c par les mitochondries’, *Mort cellulaire et différenciation*, 13(9), pp. 1423-1433.
- **Girotti, A.W., (1985)** ‘Mechanisms of lipid peroxidation’, *Journal Of Free Radicals In Biology & Medicine*, 1(2), pp.87 95.
- **Gosling, J.A., Harris, P.F., Willan, P.L.T., et Whitmore, I., (2003)** ‘Anatomie humaine: Atlas en couleurs ’, *De Boeck Supérieur*, pp .316.
- **Graham, G.J., Scott, K.F., et Day, R.O., (2005)** ‘Tolerability of Paracetamol’, *Drug Safety*, 28(3), pp.227 240.
- **Gregoriadis, G., &Neerunjun, D. E., (1974)** ‘Control of the rate of hepatic uptake and catabolism of liposome-entrapped solutes’, *Biochimica et BiophysicaActa (BBA) - Biomembranes*, 343(1), pp. 63-74.
- **Guiliani, J.P., Blin R., (2019)** ‘ La détoxification hépatique ’, *Revue professionnelle de naturopathie*, pp .56-61.
- **Gurib-Fakim, A. (2006)** ‘Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow’, *Molecular Aspects of Medicine*, 27(1), pp. 1–93.

H

- **Hamad, I., Harb, A.A., &Bustanji, Y., (2024)** ‘Systèmes d'administration de médicaments à base de liposomes dans la recherche sur le cancer : une analyse des efforts et des réalisations du paysage mondial’, *Pharmaceutics*, 16(3), 400.
- **Helga, F., Wolfgang, K., (2015)** ‘Atlas de poche d'anatomie’, *Paris : Médecine sciences Flammarion*, pp. 428.
- **Hinson, J.A., Roberts, D.W et James, L.P., (2010)** ‘Mécanismes de la nécrose hépatique induite par le paracétamol ’, *Handbook of Experimental Pharmacology*, 196, pp. 369-405.
- **Hosny, M. (1998)** ‘*Phytochemistry*’, (47) ,pp.1569.

Références bibliographiques

- **Hussain, T., Tan, B., Yin, Y., Blachier, F., Tossou, M.C., & Rahu, N., (2016)** ‘Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us?’ ,*Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, , pp. e7432797.

I

- **Ishida, Y., Kondo, T., Tsuneyama, K., Lu, P., Takayasu, T., & Mukaida, N., (2004)** ‘The pathogenic roles of tumor necrosis factor receptor p55 in acetaminophen-induced liver injury in mice’ , *Journal of Leukocyte Biology*, 75(1), pp. 59–67.

J

- **Jaeschke, H., (2003)** ‘ Rôle des espèces réactives de l'oxygène dans les lésions hépatiques induites par le paracétamol ’ , *Drug Metabolism Reviews*, 35(1), pp. 145-158.
- **James, L.P., Mayeux, P.R., & Hinson, J.A., (2003)** ‘ Hépatotoxicité induite par l'acétaminophène ’ , *Drug Metabolism and Disposition*, 31(4), pp. 1499-1506.

K

- **Kahkonen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J.P., Pihlaja, K., Kujala, T.S., et Heinonen, M., (1999)** ‘ Activité antioxydante des extraits de plantes contenant des Composés phénolique, *Journal de chimie agricole et alimentaire*, 47, pp. 3954-3962.
- **Kalantari, H., Foruozaandeh, H., Khodayar, M.J., Siahpoosh, A., Saki, N., et Kheradmand, P., (2018)** ‘ Effets antioxydants et hépatoprotecteurs des fractions de Capparis spinosa L. et de la quercétine sur les lésions hépatiques aiguës induites par l'hydroperoxyde de tert-butyle chez la souris ’ , *Revue de Médecine Traditionnelle et Complémentaire*, 8(1), pp. 120-127.
- **Kamina, P. (2012)** ‘ Anatomie clinique ’ , France:Maloine ,(2e ed).
- **Kamina, P. (2013)** ‘ L’essentiel en anatomie ’ , Paris : Maloine, pp.250.

Références bibliographiques

- **Kanbur, M., Eraslan, G., Beyaz, L., Silici, S., Liman, BC., Altınordulu, Ş., et Atasever, A., (2009)** ‘Les effets de la gelée royale sur les lésions hépatiques induites par le paracétamol chez la souris’, *Pathologie expérimentale et toxicologique*, 61(2), pp. 123-132.
- **Kandamir, A., Güray, H., Kutbay, N., & Kılıç, D. (1998)** ‘Phytosociological and ecological structure of *Fraxinus angustifolia* subsp. *oxycarpa* forests in the central BlackSea region’, *Turkish Journal of Botany*, 22, pp. 157-162.
- **Kaplowitz, N. (2002)** ‘Biochemical and Cellular Mechanisms of Toxic Liver Injury’, *Seminars in Liver Disease*, 22(2), pp. 137–144.
- **Kasmi, S., Hamdi, A., Atmani-Kilani, D., Debbache-Benaidia, N., Jaramillo-Carmona, S., Rodríguez-Arcos, R., ... & Guillén-Bejarano, R., (2021)** ‘Caractérisation des composés phénoliques isolés de la plante *Fraxinus angustifolia* et plusieurs bioactivités associées’, *Journal of Herbal Medicine*, 29, 100485.
- **Knight, T.R., Ho, Y.S., Farhood, A., et Jaeschke, H., (2002)** ‘Le peroxy-nitrite est un médiateur critique de l'hépatotoxicité de l'acétaminophène dans les foies murins: protection par le glutathion’, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 303, pp. 468-475.
- **Kociancic, T., et Reed, M.D., (2003)** ‘Acetaminophen intoxication and length of treatment: how long is long enough?’, *Pharmacotherapy*, 23, pp. 1052-9.
- **Kostova, I., et Iossifova, T., (2007)** ‘Chemical components of *Fraxinus* species’, *Fitoterapia*, 78(2), pp. 85–106.
- **Kouamé, T.M., Siakal, S., KASSI, A.B., & SORO, Y., (2021)** ‘Détermination des teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et tanins de jeunes feuilles non encore ouvertes de *Piliostigmationningii* (Caesalpinaceae)’, *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 15(1), 97-105.
- **Kreuter, J., (2007)** ‘Nanoparticles—a historical perspective’, *International Journal Of Pharmaceutics*, 331(1), p.1 10.

Références bibliographiques

- **Kumar, N., et Goel, N., (2019)** ‘Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications’, *Biotechnology Reports*, 24, pp. e00370.

L

- **Labbe, G., Pessayre, D., EtFromenty, B., (2008)** ‘Drug-induced liver injury through mitochondrial dysfunction: mechanisms and detection during preclinical safety studies’, *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 22(4), pp. 335–353.
- **Lamblin, F., Hano, C., Fliniaux, O., Mesnard, F., Fliniaux, M.A., & Lainé, É., (2008)** ‘Intérêt des lignanes dans la prévention et le traitement de cancers’, *médecine/sciences*, 24(5), pp. 511–520.
- **Lancaster, E.M., Hiatt, J.R., etZarrinpar, A., (2014)** ‘Acetaminophen hepatotoxicity: an updated review’, *Archives Of Toxicology*, 89(2), pp. 193-199.
- **Larson, A.M., (2005)** ‘Acetaminophen-induced acute liver failure: results of a United States multicenter, prospective study’, *Hepatology*, 42(6), pp. 1364-1372.
- **Leclercq, I., et Sempoux, C., (2018)** ‘*Histophysiologie du foie*’.
- **Lee, W.M. (2003)** ‘Acute Liver Failure in the United States’, *Seminars in Liver Disease*, 23(3), pp. 217–226.
- **Lee, Y., Shin, D.H., Kim, J.H., Hong, S., Choi, D., Kim, Y.J., . Jung, Y., (2010)** ‘Caffeic acid phenethyl ester-mediated Nrf2 activation and IκB kinase inhibition are involved in NFκB inhibitory effect: Structural analysis for NFκB inhibition’, *European Journal of Pharmacology*, 643(1), pp. 21–28.
- **Lemasters, J. J., Qian, T., Bradham, C. A., Brenner, D. A., Cascio, W. E., Trost, L. C., Herman, B., (1999)** ‘Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of necrotic and apoptotic cell death.’, *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 31(4), pp. 305–319.
- **Leung, T.-M., et Nieto, N., (2013)** ‘CYP2E1 and oxidant stress in alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease’, *Journal of Hepatology*, 58(2), pp. 395–398.

Références bibliographiques

- **Li, H.B., Wong, C.C., Cheng, K.W., et Chena, F., (2008)** ‘Propriétés antioxydantes in vitro et teneurs phénoliques totales dans les extraits méthanoliques de plantes médicinales’, *LWT*, 41, pp. 385-390.
- **Lian, T., et Ho, R.J.Y., (2001)** ‘Tendances et développements dans les systèmes d'administration de médicaments liposomaux’, *Journal des Sciences Pharmaceutiques*, 90(6), pp. 667-680.
- **Lippi, G., Montagnana, M., Salvagno, G. L., Guidi, G. C.,(2005)** ‘Alkaline phosphatase: a review focused on clinical aspects’, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 43(7),pp. 280-284.
- **Liu, P., Chen, G., & Zhang, J., (2022)** ‘Une revue des liposomes comme système d'administration de médicaments : état actuel des produits approuvés, environnements réglementaires et perspectives d'avenir’ ,*Molecules*, 27(4), pp. 1372.
- **Locatelli, M., Travaglia, F., Coïsson, JD, Martelli, A., Stévigny, C. , et Arlorio, M., (2010)** ‘Activité antioxydante totale de la peau de noisette (NocciolaPiemonte IGP) : Impact des différentes conditions de torréfaction’,*Chimie alimentaire*, 119(4), pp.1647-1654.
- **Lowman, M.D., et Box, J., (1983)** ‘Variation de la ténacité des feuilles et de la teneur en phénols parmi cinq espèces d'arbres de la forêt tropicale australienne’ ,*Austr J Ecol*, 8, pp.
- **Lu, S. C. (2009)** ‘Regulation of glutathione synthesis’, *Molecular Aspects Of Medicine*, 30(1-2), pp. 42-59.
- **Lucidarme, O., (2017)** ‘Echographie abdominale’ *Elsevier Health Sciences*.

M

- **Ma, Q., (2013)** ‘Rôle de nrf2 dans le stress oxydant et la toxicité’ ,*Revue Annuelle de Pharmacologie et de Toxicologie*, 53(1), pp. 401-426.

Références bibliographiques

- **Macheix, J.-J., Fleuriet, A., Jay-Allemand, C., (2005)** ‘Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d’importance économique’, *PPUR presses polytechniques*.
- **Maksimović, Z., (2008)** ‘In vitro antioxidant activity of ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L., Asteraceae) herb’, *Elsevier Science Direct*, pp. 356-361.
- **Malhi, H., Gores, G.J., Lemasters, J.J., (2006)** ‘Apoptosis and necrosis in the liver: A tale of two deaths?’ *Hepatology*, 43(S1), pp. S31–S44.
- **Mamirovna, T.O., Komiljonovich, P.M., Rasuljonovich, M.R., (2020)** ‘hepatoprotective potential of polyphenols in CCl4-induced hepatic damage’ *, European science review*, (11–12), pp. 3–8.
- **Marieb, E. N., (2008)** ‘Human Anatomy & Physiology (8th ed.)’, *Pearson Benjamin Cummings*, pp. 982-984.
- **Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J.M., (2002)** ‘Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes’ *Nutrición hospitalaria*, 17(6).pp. 271-278.
- **Mazumder, D.N., Steinmus, C., Bhattacharaya, P., Von-Ehrenstein, O.S., Ghosh, N., Gotway, M., (2005)** ‘Bronchitis in persons with skin lesions resulting from arsenic in drinking water’, *Epidemiology*, 16(6) .pp760-765.
- **McGill, M.R., Sharpe, M.R., Williams, C.D., Taha, M., Curry, S.C., Jaeschke, H., (2012)** ‘The mechanism underlying acetaminophen-induced hepatotoxicity in humans and mice involves mitochondrial damage and nuclear DNA fragmentation’, *The Journal Of Clinical Investigation*, 122(4), pp. 1574-1583.
- **McGill, M.R., Jaeschke, H., (2013)** ‘Biomarqueurs mécanistiques de l’hépatotoxicité induite par l’acétaminophène et de l’insuffisance hépatique aiguë : des modèles précliniques aux patients’ *, Avis d’expert sur le métabolisme et la toxicologie des médicaments*, 9(6), pp. 743-754.

Références bibliographiques

- **McGill, M.R., et Jaeschke, H., (2013)** ‘Métabolisme et élimination de l'acétaminophène : avancées récentes en matière d'hépatotoxicité et de diagnostic’, *Pharm Res*, 30(9), pp. 2174-2187.
- **Medjahed, Z., Atman-Kilani, D., Fauconnier, M.L., Richard, G., et Atmani, D., (2016)** ‘Hepatoprotective and antidiabetic activities of *Fraxinus angustifolia* Vahl extracts in animal models: characterization by high performance liquid chromatography analysis’, *Turkish Journal of Medical Sciences*, 46(3), pp. 910-920.
- **Meister, A., et Anderson, M.E., (1983)** ‘Glutathione’, *Revue annuelle de biochimie*, 52, pp. 60-711.
- **Millán, J. L., (2006)** ‘Alkaline phosphatases: Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes’, *Purinergic Signalling*, 2(2), pp. 335-341.
- **Mole, S., Waterman, P.G., (1987)** ‘A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies: I. Techniques for chemically defining tannins.’, *Oecologia*, 72, pp.137-147.
- **Moore, K., et Roberts, L.J., (1998)** ‘Measurement of Lipid Peroxidation’, *Free Radical Research (Online)*, 28(6), pp.659 671.
- **Moore, M., Thor, H., Moore, G., Nelson, S., Moldeus, P., & Orrenius, S., (1985)** ‘The toxicity of acetaminophen and N-acetyl-p-benzoquinone imine in isolated hepatocytes is associated with thiol depletion and increased cytosolic Ca²⁺’, *Journal of Biological Chemistry*, 260(24), pp. 13035–13040.
- **Moulaoui, K., Caddeo, C., Manca, M. L., Castangia, I., Valenti, D., Escribano, E., Manconi, M., (2015)** ‘Identification et nanopiégeage du phytocomplexe polyphénolique de *Fraxinus angustifolia* : potentiel de cicatrisation in vitro et in vivo’, *Revue Européenne de Chimie Médicinale*, 89, pp. 179-188.

Références bibliographiques

▪ **Myhrstad, M. C.W., Carlsen, H., Nordström, O., Blomhoff, R., & Moskaug, J.O., (2002)** ‘Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the γ -glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter’, *Free Radical Biology and Medicine*, 32, pp. 386-393.

N

▪ **Naczki, M., & Shahidi, F., (2004)** ‘Extraction et analyse des composés phénoliques dans les aliments’, *Journal of Chromatography A*, 1054, pp. 95-111.

▪ **Naguib, M., Diaz, P., Zeidan, A., & Cleveland, J.? (2014)** ‘The role of transaminases in amino acid metabolism and energy production’, *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 54(1), pp.1-8.

▪ **Naguib, Y.M., Azmy, R.M., Samaka, R.M., Salem, M.F., (2014)** ‘Pleurotus ostreatus s'oppose au dysfonctionnement mitochondrial et au stress oxydatif dans les lésions hépato-rénales induites par l'acétaminophène’, *Médecine Complémentaire et Alternative BMC*, (14), pp. 1-12.

▪ **Navarro, V.J., et Senior, J.R., (2006)** ‘Drug-Related Hepatotoxicity’, *New England Journal of Medicine*, 354(7), pp. 731–739.

▪ **Nicolas, J., et Couvreur, P., (2017)** ‘Les nanoparticules polymères pour la délivrance de principes actifs anticancéreux’, *médecine/sciences*, 33(1), pp. 11–17.

▪ **Nicolas, J., Mura, S., Brambilla, D., Mackiewicz, N., Couvreur, P., (2013)** ‘Design, functionalization strategies and biomedical applications of targeted biodegradable/biocompatible polymer-based nanocarriers for drug delivery’, *Chemical Society Reviews*, 42(3), pp. 1147–1235.

▪ **Nieto, N., Friedman, S.L., Cederbaum, A.I., (2002)** ‘Cytochrome P450 2E1-derived Reactive Oxygen Species Mediate Paracrine Stimulation of Collagen I Protein Synthesis by Hepatic Stellate Cells’, *Journal of Biological Chemistry*, 277(12), pp. 9853–9864.

Références bibliographiques

- **Niki, E., Yoshida, Y., Saito, Y., & Noguchi, N., (2005)** ‘Lipid peroxidation : Mechanisms, inhibition, and biological effects’, *Biochemical And Biophysical Research Communications (Print)*, 338(1), pp.668-676.
- **Nsairat, H., Khater, D., Sayed, U., Odeh, F., Al Bawab, A., & Alshaer, W., (2022)** ‘Liposomes: structure, composition, types, and clinical applications’, *Heliyon*, 8(5), pp. e09394.

o

- **Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K., (1979)** ‘Assay for lipid peroxides in animal tissues
- **Oskoueian, E., Karimi, E., Noura, R., Ebrahimi, M., Shafaei, N., & Karimi, E., (2020)** ‘Nanoliposomes encapsulation of enriched phenolic fraction from pistachio hulls and its antioxidant, anti-inflammatory, and anti-melanogenic activities’, *Journal of Microencapsulation*, 37(1), pp. 1–13. Availableat:
- **Oteiza, P. I., Erlejman, A. G., Verstraeten, S. V., Keen, C. L., & Fraga, C. G., (2005)** ‘Flavonoid-membrane Interactions: A Protective Role of Flavonoids at the Membrane Surface?’ *Journal of Immunology Research*, 12, pp. 19–25.

P

- **Pallavi, G., Amy, I. K., & Graham, F.H., (2003)** ‘The Orientation of Mycobacteriophage Bxb1 Integration Is Solely Dependent on the Central Dinucleotide of attP and attB’ *Molecular and Cellular*, 12(5), pp.1101-1111.
- **Pietta, P., (2000)** ‘Flavonoids as Antioxidants’, *Journal Of Natural Products*, 63(7), pp. 1035-1042.
- **Pingili, R.B., (2020)** ‘A systematic review on hepatoprotective activity of quercetin against various drugs and toxic agents: Evidence from preclinical studies’, *Phytotherapy Research*, 34(1), pp. 5–32.

Références bibliographiques

- **Pons, G., (1997)** ‘Traitement de la fièvre par le paracétamol’, *Journal de Pédiatrie et de Puériculture*, 10(3), pp. 144-149.
- **Prescott, L.F. (1980)** ‘Kinetics and metabolism of paracetamol and Phenacetin’, *British Journal Of Clinical Pharmacology*, 10(S2).

R

- **Repetto, M.G., & Llesuy, S.F., (2002)** ‘Propriétés antioxydantes des composés naturels utilisés en médecine populaire pour les ulcères gastriques’, *Braz J Med Biol Res*, 35(5), pp. 523-525.
- **Ribéreau-Gayon, P., (1973)** ‘Interpretation chimique de la couleur des vins Rouges’, *Vitis*, 12(1), 19-126.
- **Rohnert, U., Kunz, W., et Bors, W., (199)** ‘L'acide salicylique comme piègeur efficace de radicaux hydroxyles : une comparaison avec d'autres composés’, *Journal de chimie organique*, 63(16), pp. 5616-5623.

S

- **Saad, I., Albichr, H., and Hantson, P., (2017)** ‘Le paracétamol à dose thérapeutique: quelles populations à risque d'hépatotoxicité?’, *Toxicologie Analytique et Clinique*, 30(1),pp. 19-34
- **Santangelo, C., Vari, R., Scazzocchio, B., Di Benedetto, R., Filesi, C., & Masella, R., (2007)** ‘Polyphenols, intracellular signalling and inflammation’, *Annali dell Istituto superiore di sanità*,(43), pp. 394–40
- **Schmitt, S., (2016)** ‘Évaluation de la taille et de la masse du foie : comparaison du volume du foie déterminé par volumétrie CT 3D et du poids du foie’, *European Radiology*, 26(5), pp.1529-1536.
- **Schwabe, R.F., et Tacke, F., (2020)** ‘Immunologie du foie : mécanismes de lésions et de régénération du foie’, *Nature Reviews Immunologie*, 20(4), pp. 203-217.

Références bibliographiques

- **Seirafi, M., Iten, A., Hadengue, A., (2007)** ‘Acetaminophen : hepatotoxicity at therapeutic doses and risk factors’, *Revue Médicinale Suisse*, (3), pp. 2345-2349.
- **Soppimath, K. S., Aminabhavi, T. M., Kulkarni, A. R., & Rudzinski, W. E., (2001)** ‘Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices’, *Journal of Controlled Release*, 70(1), pp. 1–20.
- **Sterner, O., (1999)** ‘*Chemistry, health and environment*’, 1st edn., Allemagne: Wiley VCH.5.
- **Suffredini, G., East, J.E., Levy, L.M., (2014)** ‘New Applications of Nanotechnology for Neuroimaging’, *American Journal of Neuroradiology*, 35(7), pp. 1246–1253.

T

- **Torchilin, V.P. (2005)** ‘Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers’, *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(2), pp. 145-160.
- **Torchilin, (2005)** ‘Progrès récents avec les liposomes comme supports pharmaceutiques’, *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(2), pp.145-160.
- **Touhami, I., Ghazghazi, H., Sellimi, H., Khaldi, A., & Mahmoudi, H. (2017)** ‘Activités antioxydantes et teneurs en phénols des extraits d'écorce et de feuilles d'un arbre indigène tunisien : *Fraxinus angustifolia* Vahl. subsp. *Angustifolia*”

V

- **Valpour, E., Arikan, B., (2015)** ‘Optimization of tyrosinase enzyme production from native *Bacillus* sp. MV29 isolate’, *Journal of Applied Biological Sciences*, 9(2), pp. 77-82.
- **Vallée, D., Blanc, M., Lebeaupin, C., & Bailly-Maitre, B., (2020)** ‘La réponse au stress du réticulum endoplasmique dans la physiopathologie des maladies chroniques du foie’, *médecine/sciences*, 36(2), pp. 119–129.

Références bibliographiques

- **Van Acker, S. A., Tromp, M. N., Griffioen, D. H., Van Bennekom, W. P., Van Der Vijgh, W. J., & Bast, A., (1996)** ‘Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids’, *Free Radical Biology and Medicine*, 20(3), pp. 331–342.

W

- **Wallander, E., (2008)** ‘Systematics of Fraxinus (Oleaceae) and evolution of dioecy’, *Plant Syst*, 273, pp.25-49.
- **Wang, Y., Davé, R.N., Pfeffer, R., (2004)** ‘Polymer coating/encapsulation of nanoparticles using a supercritical anti-solvent process’, *The Journal Of Supercritical Fluids*, 28(1), pp. 85-99.
- **Whyte, M. P., (1994)** ‘Physiological role of alkaline phosphatase explored in hypophosphatasia’, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 760(1), pp. 157-169.

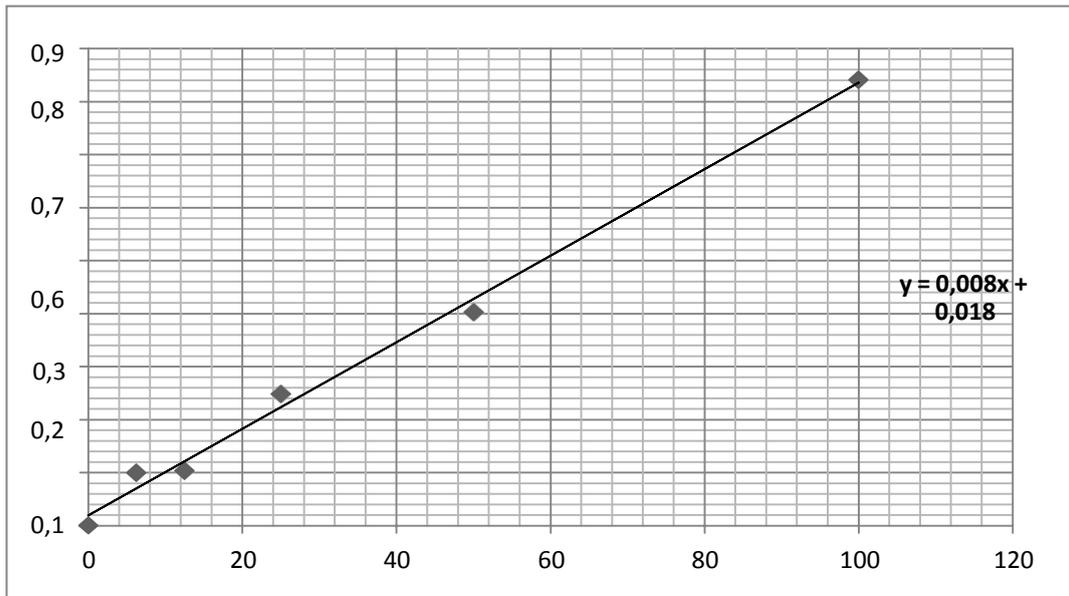
Z

- **Zaefarian, F., Abdollahi, M. R., Cowieson, A., & Ravindran, V., (2019)** ‘Avian Liver: The Forgotten Organ’, *Animals*, 9(2), pp. 63.
- **Zhao, Z., Zhang, X., Su, L., Xu, L., Zheng, Y. et Sun, J., (2018)** ‘Fine tuning subsets of CD4+ T cells by low-dosage of IL-2 and a new therapeutic strategy for autoimmune diseases’, *International Immunopharmacology*, 56, pp. 269-276.

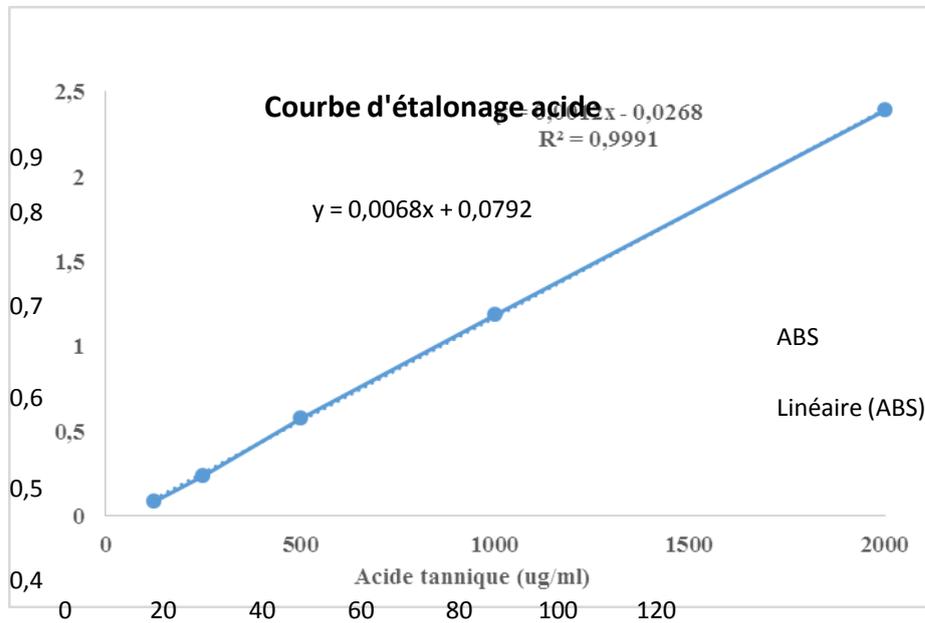
Références bibliographiques

Annexes

Annexes

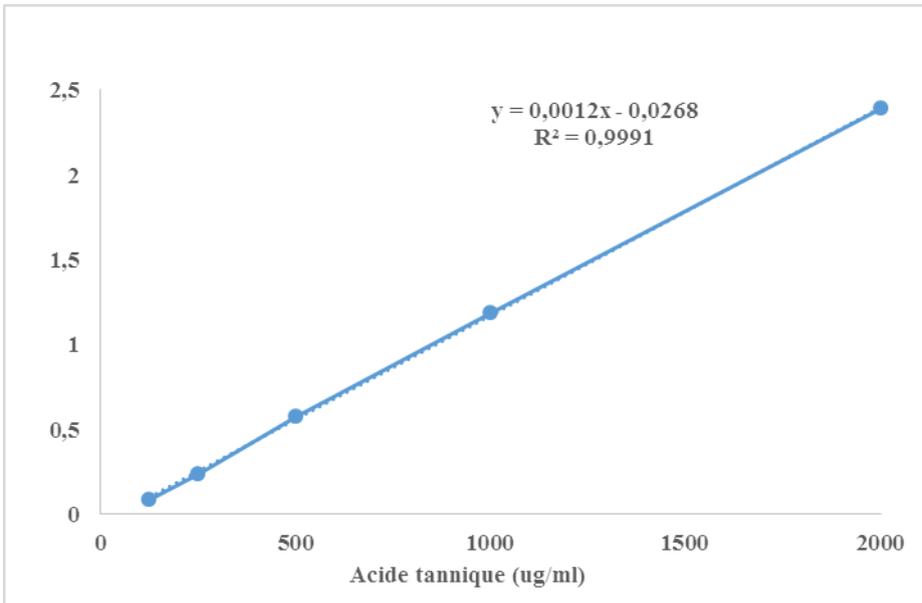


Annexe 1: courbe d'étalonnage des flavonoïdes

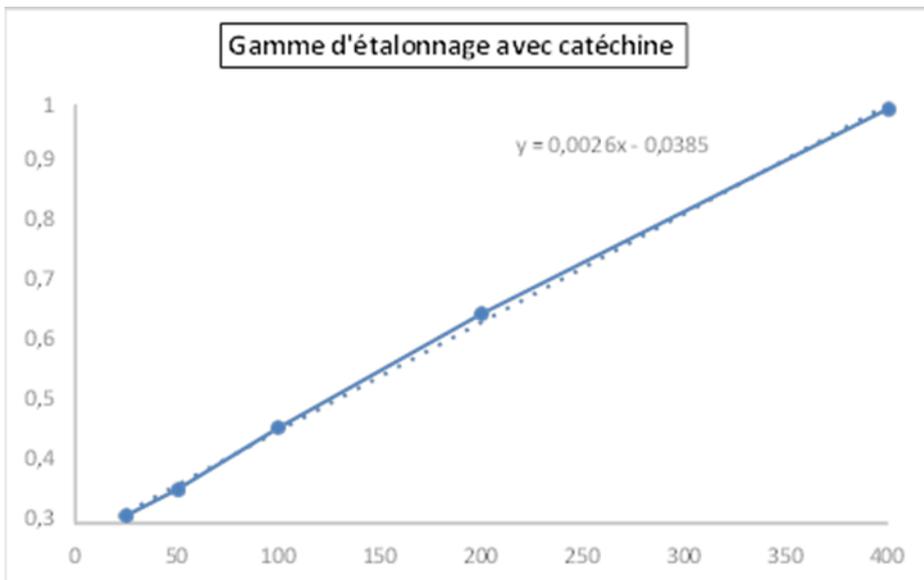


Annexe 2: courbe d'étalonnage des polyphénols.

Annexes



Annexe 3 : Courbe d'étalonnage des tanins hydrolysable.



Annexe 4 : Courbe d'étalonnage des tanins condensés.

Resumé

Fraxinus angustifolia, dotée d'activités anti-oxydantes et anti-inflammatoires, est utilisée en phytothérapie traditionnelle. Le présent travail porte sur l'évaluation de l'activité hépato-protectrice in vivo des extraits éthanoliques de feuilles et d'écorce de cette plante, encapsulés dans des liposomes et sous forme libre. Les expériences ont été menées sur des souris après induction de l'hépto-toxicité par injection intra-péritonéale de paracétamol à une dose de 700 mg/kg. Les taux de glutathion (GSH), de malondialdéhyde (MDA), des transaminases hépatiques, de la phosphatase alcaline, ainsi que des coupes histologiques des foies des souris ont été évalués. Les résultats ont montré une légère amélioration des niveaux de GSH chez les souris traitées avec les extraits encapsulés dans deux types de liposomes différents, comparé aux extraits seuls. De plus, les valeurs de MDA, des transaminases hépatiques et de la phosphatase alcaline ont été significativement réduites chez les souris traitées par les extraits éthanoliques de feuilles et d'écorce de *F. angustifolia*, qu'ils soient encapsulés ou non, par rapport au groupe contrôle. Les examens histopathologiques des groupes traités ont révélé une diminution des foyers de nécrose hépatique et de l'infiltration inflammatoire comparativement au groupe contrôle. En conclusion, les extraits de feuilles et d'écorce de *F. angustifolia*, encapsulés ou sous forme libre, peuvent protéger le foie contre la toxicité induite par le paracétamol en normalisant les paramètres étudiés. Ces résultats suggèrent une potentialité hépato-protectrice prometteuse des extraits de *Fraxinus angustifolia*.

Mots clés : *Fraxinus angustifolia*, hépato-toxicité, liposomes, malondialdéhyde, transaminases, phosphatase alcaline.

Abstract

Fraxinus angustifolia, endowed with antioxidant and anti-inflammatory activities, is used in traditional phyto-therapy. This study focuses on evaluating the in vivo hepato-protective activity of ethanolic extracts from the leaves and bark of this plant, both encapsulated in liposomes and in their free form. Experiments were conducted on mice after inducing hepatotoxicity by intraperitoneal injection of paracetamol at a dose of 700 mg/kg. The levels of glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), hepatic transaminases, alkaline phosphatase, and histological sections of the mice livers were evaluated. The results showed a slight improvement in GSH levels in mice treated with extracts encapsulated in two different types of liposomes, compared to the extracts alone. Additionally, the values of MDA, hepatic transaminases, and alkaline phosphatase were significantly reduced in mice treated with ethanolic extracts of *F. angustifolia* leaves and bark, whether encapsulated or not, compared to the control group. Histopathological examinations of the treated groups revealed a decrease in hepatic necrosis foci and inflammatory infiltration compared to the control group. In conclusion, extracts from the leaves and bark of *F. angustifolia*, whether encapsulated or in free form, can protect the liver against paracetamol-induced toxicity by normalizing the studied parameters. These results suggest a promising hepato-protective potential of *Fraxinus angustifolia* extracts.