

UNIVERSITÉ DE YAOUNDE I

THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I

CENTRE DE RECHERCHE ET DE  
FORMATION DOCTORALE EN SCIENCES  
DE LA VIE, SANTE ET ENVIRONNEMENT



CENTRE FOR RESEARCH AND TRAINING  
IN GRADUATE STUDIES IN LIFE, HEALTH  
AND ENVIRONMENTAL SCIENCES

UNITE DE RECHERCHE ET DE FORMATION  
DOCTORALE EN SCIENCES DE LA VIE

RESEARCH AND DOCTORATE TRAINING  
UNIT IN LIFE SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

DEPARTEMENT OF BIOCHEMISTRY

LABORATOIRE DE PHARMACOLOGIE ET DE TOXICOLOGIE  
LABORATORY OF PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY

**Evaluation *in vitro* du potentiel de certaines plantes  
médicinales Camerounaise contre les maladies  
neurodégénératives: Cas de la Maladie de Parkinson**

THESE

Présentée en vue de l'obtention du **Doctorat/Ph.D en Biochimie**

Spécialité: **Pharmacologie Moléculaire**

Par

**NGOUNGORE NDAM Viviane Laure**

**Matricule : 04T092**

**Master en Biochimie**

Sous la supervision de :

**MOUNDIPA FEWOU Paul**  
**Professeur**

**Jury:**

Président: MBACHAM Wilfred FON,  
Rapporteur: MOUNDIPA FEWOU Paul,  
Membres: DJAMEN Dieudonné,  
ABGOR Gabriel ABGOR,

PIEME Constant Anatole,

Professeur, Université de Yaoundé I  
Professeur, Université de Yaoundé I  
Professeur, Université de Yaoundé I  
Directeur de Recherches, Institut de  
Recherches Médicales et d'études  
des Plantes Médicinales Yaounde  
Maître de Conférences, Université  
de Yaoundé I



**Année académique 2020-2021**

UNIVERSITÉ DE YAOUNDE I

THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I

CENTRE DE RECHERCHE ET DE  
FORMATION DOCTORALE EN SCIENCES  
DE LA VIE, SANTE ET ENVIRONNEMENT



CENTRE FOR RESEARCH AND TRAINING  
IN GRADUATE STUDIES IN LIFE, HEALTH  
AND ENVIRONMENTAL SCIENCES

UNITE DE RECHERCHE ET DE FORMATION  
DOCTORALE EN SCIENCES DE LA VIE

RESEARCH AND DOCTORATE TRAINING  
UNIT IN LIFE SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

DEPARTEMENT OF BIOCHEMISTRY

LABORATOIRE DE PHARMACOLOGIE ET DE TOXICOLOGIE  
LABORATORY OF PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY

**Evaluation *in vitro* du potentiel de certaines plantes  
médicinales Camerounaise contre les maladies  
neurodégénératives: Cas de la Maladie de Parkinson**

**THESE**

Présentée en vue de l'obtention du **Doctorat/Ph.D en Biochimie**

Spécialité: **Pharmacologie Moléculaire**

Par

**NGOUNGOURE NDAM Viviane Laure**

**Matricule : 04T092**

**Master en Biochimie**

Sous la supervision de :

**MOUNDIPA FEWOU Paul**

**Professeur**

**Jury:**

Président:	MBACHAM Wilfred FON,	Professeur, Université de Yaoundé I
Rapporteur:	MOUNDIPA FEWOU Paul,	Professeur, Université de Yaoundé I
Membres:	DJAMEN Dieudonné,	Professeur, Université de Yaoundé I
	ABGOR Gabriel ABGOR,	Directeur de Recherches, Institut de Recherches Médicales et d'études des Plantes Médicinales Yaounde
	PIEME Constant Anatole,	Maître de Conférences, Université de Yaoundé I

**Année académique 2020-2021**

CENTRE DE RECHERCHE ET DE  
FORMATION DOCTORALE EN SCIENCES DE  
LA VIE, SANTE ET ENVIRONNEMENT

CENTRE FOR RESEARCH AND TRAINING IN  
GRADUATE STUDIES IN LIFE, HEALTH AND  
ENVIRONMENTAL SCIENCES

UNITE DE RECHERCHE ET DE FORMATION  
DOCTORALE EN SCIENCES DE LA VIE

RESEARCH AND DOCTORATE TRAINING  
UNIT IN LIFE SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE



DEPARTEMENT OF BIOCHEMISTRY

## ATTESTATION DE CORRECTION

Nous soussignés, **Dr AGBOR Gabriel AGBOR** et **Pr MBACHAM FON Wilfred** respectivement Examineur et Président du Jury de Thèse de Doctorat/PhD en Biochimie, spécialité Pharmacologie Moléculaire, soutenue par **Mme NGOUNGOURE NDAM Viviane Laure** (matricule **04T092**) le 11 Mai 2021 à 10h dans la salle S01/02 Extension de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I sur le thème intitulée « **Evaluation *in vitro* du potentiel de certaines plantes médicinales Camerounaise contre les maladies neurodégénératives: Cas de la Maladie de Parkinson** » attestons que la candidate a effectué les corrections conformément aux exigences du jury.

En foi de quoi la présente attestation lui est délivrée pour servir et valoir ce que de droit.


Fait à Yaoundé, le **10 JUN 2021**

Examineur


Président du Jury

Le Chef de Département

  
**Gabriel A. Agbor, PhD**  
Directeur de Recherche

  
**Pr. Wilfred F. Mbacham**  
MS, DS, ScD (Harvard), FASI, FCAS  
Public Health Biotechnologist



<b>UNIVERSITÉ DE YAOUNDÉ I</b>  <b>Faculté des Sciences</b>  Division de la Programmation et du Suivi des Activités Académiques		<b>THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I</b>  <b>Faculty of Science</b>  Division of Programming and Follow-up of Academic Affairs
<b>LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS</b>		<b>LIST OF PERMANENT TEACHING STAFF</b>

**ANNÉE ACADEMIQUE 2020/2021**

(Par Département et par Grade)

**DATE D'ACTUALISATION 03 Mars 2020**

**ADMINISTRATION**

**DOYEN** : TCHOUANKEU Jean Claude, *Maitre de Conférences*

**VICE-DOYEN / DPSAA** : ATCHADE Alex de Théodore, *Maître de Conférences*

**VICE-DOYEN / DSSE** : AJEAGAH Gideon AGHAINDUM, *Professeur*

**VICE-DOYEN / DRC** : ABOSSOLO Monique, *Maitre de Conférences*

**Chef Division Administrative et Financière** : NDOYE FOE Marie C. F., *Maitre de Conférences*

**Chef Division des Affaires Académiques, de la Scolarité et de la Recherche DAASR** :  
 MBAZE MEVA'A Luc Léonard, *Professeur*

<b>1- DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (38)</b>			
N°	NOMS ET PRÉNOMS	GRADE	OBSERVATIONS
1	BIGOGA DIAGA Jude	Professeur	En poste
2	FEKAM BOYOM Fabrice	Professeur	En poste
3	FOKOU Elie	Professeur	En poste
4	KANSCI Germain	Professeur	En poste
5	MBACHAM FON Wilfred	Professeur	En poste
6	MOUNDIPA FEWOU Paul	Professeur	<i>Chef de Département</i>
7	NINTCHOM PENLAP V. épouse BENG	Professeur	En poste
8	OBEN Julius ENYONG	Professeur	En poste
9	ACHU Merci BIH	Maître de Conférences	En poste
10	ATOCHO Barbara Mma	Maître de conférences	En poste
11	AZANTSA KINGUE Gabin Boris	Maitre de Conférences	En poste
12	BELINGA née NDOYE FOE M. C. F.	Maître de Conférences	Chef DAF / FS

13	BOUDJEKO Thaddée	Maître de Conférences	En poste
14	DJUIDJE NGOUNOUE Marcelline	Maître de Conférences	En poste
15	EFFA NNOMO Pierre	Maître de Conférences	En poste
16	MOFOR née TEUGWA Clotilde	Maître de Conférences	Inspecteur de Service MINESUP
17	NANA Louise épouse WAKAM	Maître de Conférences	En poste
18	NGONDI Judith Laure	Maître de Conférences	En poste
19	NGUEFACK Julienne	Maître de Conférences	En poste
20	NJAYOU Frédéric Nico	Maître de Conférences	En poste
21	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Maître de Conférences	En poste
22	AKINDEH MBUH NJI	Chargé de Cours	En poste
23	BEBOY EDZENGUELE Sara Nathalie	Chargé de Cours	En poste
24	DAKOLE DABOY Charles	Chargé de Cours	En poste
25	DJUIKWO NKONGA Ruth Viviane	Chargé de Cours	En poste
26	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Chargé de Cours	En poste
27	EWANE Cécile Anne	Chargé de Cours	En poste
28	FONKOUA Martin	Chargé de Cours	En poste
29	BEBEE Fadimatou	Chargé de Cours	En poste
30	KOTUE KAPTUE Charles	Chargé de Cours	En poste
31	LUNGA Paul KEILAH	Chargé de Cours	En poste
32	MANANGA Marlyne Joséphine	Chargé de Cours	En poste
33	MBONG ANGIE M. Mary Anne	Chargé de Cours	En poste
34	PECHANGOU NSANGO Sylvain	Chargé de Cours	En poste
35	Palmer MASUMBE NETONGO	Chargé de Cours	En poste
36	MBOUCHE FANMOE Marceline Joëlle	Assistante	En poste
37	ABIA Wilfred Angie	Assistant	En poste
38	OWONA AYISSI Brice Vincent	Assistant	En poste

<b>2- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES (BPA) (46)</b>			
1	AJEAGAH Gideon AGHAINDUM	Professeur	Vice Doyen/DSSE
2	BILONG BILONG Charles Félix	Professeur	<i>Chef de Département</i>
3	DIMO Théophile	Professeur	En poste
4	DJIETO LORDON Champlain	Professeur	En Poste
5	ESSOMBA née NTSAMA MBALA	Professeur	<i>V Doyen/FMSB/UYI</i>
6	FOMENA Abraham	Professeur	En Poste
7	KAMTCHOUING Pierre	Professeur	En poste

8	NJAMEN Dieudonné	Professeur	En poste
9	NJIOKOU Flobert	Professeur	En Poste
10	NOLA Moïse	Professeur	En poste
11	TAN Paul VERNYUY	Professeur	En poste
12	TCHUEM TCHUENTE Louis Albert	Professeur	<i>Inspecteur de service Coord.Progr. /MINSANTE</i>
13	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Professeur	En poste
14	DZEUFLET DJOMENI Paul Désiré	Professeur	En poste
15	KEKEUNOU Sévilor	Professeur	En poste
16	BILANDA Danielle Claude	Maître de Conférences	En poste
17	DJIOGUE Séfirin	Maître de Conférences	En poste
18	JATSA BOUKENG Hermine épouse MEGAPTCHÉ	Maître de Conférences	En Poste
19	MEGNEKOU Rosette	Maître de Conférences	En poste
20	MONY Ruth épouse NTONE	Maître de Conférences	En Poste
21	NGUEGUIM TSOFAK Florence	Maître de Conférences	En poste
22	TOMBI Jeannette	Maître de Conférences	En poste
23	ALENE Désirée Chantal	Chargé de Cours	En poste
24	ATSAMO Albert Donatien	Chargé de Cours	En poste
25	BELLET EDIMO Oscar Roger	Chargé de Cours	En poste
26	DONFACK Mireille	Chargé de Cours	En poste
27	ETEME ENAMA Serge	Chargé de Cours	En poste
28	GOUNOUE KAMKUMO Raceline	Chargé de Cours	En poste
29	KANDEDA KAVAYE Antoine	Chargé de Cours	En poste
30	LEKEUFACK FOLEFACK Guy B.	Chargé de Cours	En poste
31	MAHOB Raymond Joseph	Chargé de Cours	En poste
32	MBENOUN MASSE Paul Serge	Chargé de Cours	En poste
33	MOUNGANG Luciane Marlyse	Chargé de Cours	En poste
34	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Chargé de Cours	En poste
35	NGOUATEU KENFACK Omer Bébé	Chargé de Cours	En poste
36	NGUEMBOK	Chargé de Cours	En poste
37	NJUA Clarisse Yafi	Chargé de Cours	Chef Div. UBA
38	NOAH EWOTI Olive Vivien	Chargé de Cours	En poste
39	TADU Zephyrin	Chargé de Cours	En poste

40	TAMSA ARFAO Antoine	Chargé de Cours	En poste
41	YEDE	Chargé de Cours	En poste
42	BASSOCK BAYIHA Etienne Didier	Assistant	En poste
43	ESSAMA MBIDA Désirée Sandrine	Assistante	En poste
44	KOGA MANG DOBARA	Assistant	En poste
45	LEME BANOCK Lucie	Assistante	En poste
46	YOUNOUSSA LAME	Assistant	En poste

### 3- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VÉGÉTALES (BPV) (33)

1	AMBANG Zachée	Professeur	Chef Division/UYII
2	BELL Joseph Martin	Professeur	En poste
3	DJOCGOUE Pierre François	Professeur	En poste
4	MOSSEBO Dominique Claude	Professeur	En poste
5	YOUMBI Emmanuel	Professeur	<i>Chef de Département</i>
6	ZAPFACK Louis	Professeur	En poste
7	ANGONI Hyacinthe	Maître de Conférences	En poste
8	BIYE Elvire Hortense	Maître de Conférences	En poste
9	KENGNE NOUMSI Ives Magloire	Maître de Conférences	En poste
10	MALA Armand William	Maître de Conférences	En poste
11	MBARGA BINDZI Marie Alain	Maître de Conférences	CT/MINESUP
12	MBOLO Marie	Maître de Conférences	En poste
13	NDONGO BEKOLO	Maître de Conférences	<i>CE / MINRESI</i>
14	NGODO MELINGUI Jean Baptiste	Maître de Conférences	En poste
15	NGONKEU MAGAPTCHE Eddy L.	Maître de Conférences	En poste
16	TSOATA Esaïe	Maître de Conférences	En poste
17	TONFACK Libert Brice	Maître de Conférences	En poste
18	DJEUANI Astride Carole	Chargé de Cours	En poste
19	GOMANDJE Christelle	Chargé de Cours	En poste
20	MAFFO MAFFO Nicole Liliane	Chargé de Cours	En poste
21	MAHBOU SOMO TOUKAM Gabriel	Chargé de Cours	En poste
22	NGALLE Hermine BILLE	Chargé de Cours	En poste
23	NGOUO Lucas Vincent	Chargé de Cours	En poste
24	NNANGA MEBENGA Ruth Laure	Chargé de Cours	En poste
25	NOUKEU KOUAKAM Armelle	Chargé de Cours	En poste
26	ONANA JEAN MICHEL	Chargé de Cours	En poste

27	Godswill NTSOMBAH NTSEFONG	Assistant	<i>En poste</i>
28	KABELONG BANAHOU Louis Paul Roger	Assistant	En poste
29	KONO Léon Dieudonne	Assistant	En poste
30	LIBALAH Moses BAKONCK	Assistant	En poste
31	LIKENG LI-NGUE Benoit C.	Assistant	En poste
32	TAEDOUNG Evariste Hermann	Assistant	En poste
33	TEMEGNE NONO Carine	Assistante	En poste

#### 4- DÉPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (CI) (35)

1	AGWARA ONDOH Moïse	Professeur	<i>Vice Recteur Univ, Bamenda</i>
2	ELIMBI Antoine	Professeur	En poste
3	Florence UFI CHINJE épouse MELO	Professeur	<i>Recteur Univ. Ngaoundere</i>
4	GHOGOMU Paul MINGO	Professeur	<i>Ministre Chargé de Miss. PR</i>
5	NANSEU Njiki Charles Péguy	Professeur	En poste
6	NDIFON Peter TEKE	Professeur	<b>CT MINRESI/Chef de Département</b>
7	NGOMO Horace MANGE	Professeur	<i>Vice Chancelor/UB</i>
8	NDIKONTAR Maurice KOR	Professeur	<i>Vice-Doyen Univ. Bamenda</i>
9	NENWA Justin	Professeur	En poste
10	NGAMENI Emmanuel	Professeur	<i>DOYEN FS Uds</i>
11	BABALE née DJAM DOUDOU	Maître de Conférences	<i>Chargée Mission P.R.</i>
12	DJOUFAC WOUMFO Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
13	EMADACK Alphonse	Maître de Conférences	En poste
14	KAMGANG YOUBI Georges	Maître de Conférences	En poste
15	KEMMEGNE MBOUGUEM Jean C.	Maître de Conférences	En poste
16	KONG SAKEO	Maître de Conférences	<i>En poste</i>
17	NDI NSAMI Julius	Maître de Conférences	<i>En poste</i>
18	NJIOMOU C. épouse DJANGANG	Maître de Conférences	En poste
19	NJOYA Dayirou	Maître de Conférences	En poste
20	YOUNANG Elie	Maître de Conférences	En poste



21	ACAYANKA Elie	Chargé de Cours	En poste
22	BELIBI BELIBI Placide Désiré	Chargé de Cours	CS/ ENS Bertoua
23	CHEUMANI YONA Arnaud M.	Chargé de Cours	En poste
24	KENNE DEDZO Gustave	Chargé de Cours	En poste
25	KOUOTOU DAOUDA	Chargé de Cours	En poste
26	MAKON Thomas Beauregard	Chargé de Cours	En poste
27	MBEY Jean Aime	Chargé de Cours	En poste
28	NCHIMI NONO KATIA	Chargé de Cours	En poste
29	NEBA née NDOSIRI Bridget NDOYE	Chargé de Cours	CT/MINFEM
30	NYAMEN Linda Dyorisse	Chargé de Cours	En poste
31	PABOUDAM GBAMBIE A.	Chargé de Cours	En poste
32	TCHAKOUTE KOUAMO Hervé	Chargé de Cours	En poste
33	NJANKWA NJABONG N. Eric	Assistant	En poste
34	PATOUAOSSA Issofa	Assistant	En poste
35	SIEWE Jean Mernoz	Assistant	En poste

#### **5- DÉPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (CO) (35)**

1	DONGO Etienne	Professeur	Vice-Doyen / PSAA
2	GHOGOMU TIH Robert Ralph	Professeur	Dir. IBAF/UDA
3	NGOUELA Silvère Augustin	Professeur	Chef de Département UDS
4	NKENGFACK Augustin Ephreïm	Professeur	<i>Chef de Département</i>
5	NYASSE Barthélemy	Professeur	<i>En poste</i>
6	PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel	Professeur	<i>Directeur/ MINESUP</i>
7	WANDJI Jean	Professeur	En poste
8	Alex de Théodore ATCHADE	Maître de Conférences	<i>DEPE/ Rectorat/UYI</i>
9	EYONG Kenneth OBEN	Maître de Conférences	<i>Chef Service DPER</i>
10	FOLEFOC Gabriel NGOSONG	Maître de Conférences	En poste
11	FOTSO WABO Ghislain	Maître de Conférences	En poste
12	KEUMEDJIO Félix	Maître de Conférences	En poste
13	KEUMOGNE Marguerite	Maître de Conférences	En poste
14	KOUAM Jacques	Maître de Conférences	En poste
15	MBAZOA née DJAMA Céline	Maître de Conférences	En poste
16	MKOUNGA Pierre	Maître de Conférences	En poste

17	NOTE LOUGBOT Olivier Placide	Maître de Conférences	Chef Service/MINESUP
18	NGO MBING Joséphine	Maître de Conférences	Sous/Directeur MINERESI
19	NGONO BIKOBO Dominique Serge	Maître de Conférences	En poste
20	NOUNGOUE TCHAMO Diderot	Maître de Conférences	En poste
21	TABOPDA KUATE Turibio	Maître de Conférences	En poste
22	TCHOUANKEU Jean-Claude	Maître de Conférences	<i>Doyen /FS/ UYI</i>
23	TIH née NGO BILONG E. Anastasie	Maître de Conférences	En poste
24	YANKEP Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
25	AMBASSA Pantaléon	Chargé de Cours	En poste
26	KAMTO Eutrophe Le Doux	Chargé de Cours	En poste
27	MVOT AKAK CARINE	Chargé de Cours	En poste
28	NGNINTEDO Dominique	Chargé de Cours	En poste
29	NGOMO Orléans	Chargé de Cours	En poste
30	OUAHOUE WACHE Blandine M.	Chargé de Cours	En poste
31	SIELINOUE TEDJON Valérie	Chargé de Cours	En poste
32	TAGATSING FOTSING Maurice	Chargé de Cours	En poste
33	ZONDENGOUMBA Ernestine	Chargé de Cours	En poste
34	MESSI Angélique Nicolas	Assistant	En poste
35	TSEMEUGNE Joseph	Assistant	En poste

#### **6- DÉPARTEMENT D'INFORMATIQUE (IN) (25)**

1	ATSA ETOUNDI Roger	Professeur	<i>Chef Div. MINESUP</i>
2	FOUDA NDJODO Marcel Laurent	Professeur	<i>Chef Dpt ENS/Chef IGA.MINESUP</i>
3	NDOUNDAM René	Maître de Conférences	En poste
4	AMINOUE Halidou	Chargé de Cours	<i>Chef de Département</i>
5	DJAM Xaviera YOUHEP KIMBI	Chargé de Cours	En Poste
6	EBELE Serge Alain	Chargé de Cours	En Poste
7	KOUOKAM KOUOKAM E. A.	Chargé de Cours	En poste
8	MELATAGIA YONTA Paulin	Chargé de Cours	En poste
9	MOTO MPONG Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
10	TAPAMO Hyppolite	Chargé de Cours	En poste
11	ABESSOLO ALO'O Gislain	Chargé de Cours	En poste

12	MONTHE DJIADEU Valery M.	Chargé de Cours	En poste
13	OLLE OLLE Daniel Claude Delort	Chargé de Cours	C/D Enset. Ebolawa
14	TINDO Gilbert	Chargé de Cours	En poste
15	TSOPZE Norbert	Chargé de Cours	En poste
16	WAKU KOUAMOU Jules	Chargé de Cours	En poste
17	BAYEM Jacques Narcisse	Assistant	En poste
18	DOMGA KOMGUEM Rodrigue	Assistant	En poste
19	EKODECK Stéphane Gaël Raymond	Assistant	En poste
20	HAMZA Adamou	Assistant	En poste
21	JIOMEKONG AZANZI Fidel	Assistant	En poste
22	MAKEMBE. S. Oswald	Assistant	En poste
23	MESSI NGUELE Thomas	Assistant	En poste
24	MEYEMDOU Nadège Sylvianne	Assistante	En poste
25	NKONDOCK. MI. BAHANACK.N.	Assistant	En poste

#### **7- DÉPARTEMENT DE MATHÉMATIQUES (MA) (30)**

1	EMVUDU WONO Yves S	Professeur	<i>CD Info/ Inspecteur MINESUP</i>
2	AYISSI Raoult Domingo	Maître de Conférences	<i>Chef de Département</i>
3	NKUIMI JUGNIA Célestin	Maître de Conférences	En poste
4	NOUNDJEU Pierre	Maître de Conférences	En poste
5	MBEHOU Mohamed	Maître de Conférences	En poste
6	TCHAPNDA NJABO Sophonie B.	Maître de Conférences	Directeur/AIMS Rwanda
7	AGHOUKENG JIOFACK Jean Gérard	Chargé de Cours	Chef Cellule MINPLAMAT
8	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
9	DJIADEU NGAHA Michel	Chargé de Cours	En poste
10	DOUANLA YONTA Herman	Chargé de Cours	En poste
11	FOMEKONG Christophe	Chargé de Cours	En poste
12	KIANPI Maurice	Chargé de Cours	En poste
13	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste
14	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
15	MBANG Joseph	Chargé de Cours	En poste
16	MBELE BIDIMA Martin Ledoux	Chargé de Cours	En poste

17	MENGUE MENGUE David Joe	Chargé de Cours	En poste
18	NGUEFACK Bernard	Chargé de Cours	En poste
19	NIMPA PEFOUNKEU Romain	Chargé de Cours	En poste
20	POLA DOUNDOU Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
21	TAKAM SOH Patrice	Chargé de Cours	En poste
22	TCHANGANG Roger Duclos	Chargé de Cours	En poste
23	TCHOUNDJA Edgar Landry	Chargé de Cours	En poste
24	TETSADJIO TCHILEPECK M. E.	Chargé de Cours	En poste
25	TIAYA TSAGUE N. Anne-Marie	Chargé de Cours	En poste
26	BITYE MVONDO Esther Claudine	Assistante	En poste
27	MBIAKOP Hilaire George	Assistant	En poste
28	MBATAKOU Salomon Joseph	Assistant	En poste
20	MEFENZA NOUNTU Thiery	Assistant	En poste
30	TCHEUTIA Daniel Duviol	Assistant	En poste

#### **8- DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MIB) (19)**

1	ESSIA NGANG Jean Justin	Professeur	DRV/IMPM
2	ETOA François Xavier	Professeur	<i>Chef de Département</i>
3	BOYOMO ONANA	Maître de Conférences	En poste
4	NWAGA Dieudonné M.	Maître de Conférences	En poste
5	NYEGUE Maximilienne Ascension	Maître de Conférences	En poste
6	RIWOM Sara Honorine	Maître de Conférences	En poste
7	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Maître de Conférences	En poste
8	ASSAM ASSAM Jean Paul	Chargé de Cours	En poste
9	BODA Maurice	Chargé de Cours	En poste
10	BOUGNOM Blaise Pascal	Chargé de Cours	En poste
11	ESSONO OBOUGOU Germain G.	Chargé de Cours	En poste
12	NJIKI BIKOÏ Jacky	Chargé de Cours	En poste
13	TCHIKOUA Roger	Chargé de Cours	En poste
14	ESSONO Damien Marie	Assistant	En poste
15	LAMYE Glory MOH	Assistant	En poste
16	MEYIN A EBONG Solange	Assistante	En poste
17	NKOUDOU ZE Nardis	Assistant	En poste
18	SAKE NGANE Carole Stéphanie	Assistante	En poste
19	TOBOLBAÏ Richard	Assistant	En poste

<b>9. DEPARTEMENT DE PYSIQUE (PHY) (40)</b>			
1	BEN- BOLIE Germain Hubert	Professeur	En poste
2	EKOBENA FOU DA Henri Paul	Professeur	<i>Chef Division. UN</i>
3	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	En poste
4	KOFANE Timoléon Crépin	Professeur	En poste
5	NANA ENGO Serge Guy	Professeur	En poste
6	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	<i>Chef de Département</i>
7	NOUAYOU Robert	Professeur	En poste
8	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Professeur	<i>Sous Directeur/ MINRESI</i>
9	PEMHA Elkana	Professeur	En poste
10	TABOD Charles TABOD	Professeur	Doyen Univ/Bda
11	TCHAWOUA Clément	Professeur	En poste
12	WOAFO Paul	Professeur	En poste
13	BIYA MOTTO Frédéric	Maître de Conférences	DG/HYDRO Mekin
14	BODO Bertrand	Maître de Conférences	En poste
15	DJUIDJE KENMOE épouse ALOYEM	Maître de Conférences	En poste
16	EYEBE FOU DA Jean sire	Maître de Conférences	En poste
17	FEWO Serge Ibraïd	Maître de Conférences	En poste
18	HONA Jacques	Maître de Conférences	En poste
19	MBANE BIOUELE César	Maître de Conférences	En poste
20	NANA NBENDJO Blaise	Maître de Conférences	En poste
21	NDOP Joseph	Maître de Conférences	En poste
22	SAIDOU	Maître de Conférences	Sous Directeur/Minresi
23	SIEWE SIEWE Martin	Maître de Conférences	En poste
24	SIMO Elie	Maître de Conférences	En poste
25	VONDOU Derbetini Appolinaire	Maître de Conférences	En poste
26	WAKATA née BEYA Annie	Maître de Conférences	<i>Sous Directeur/ MINESUP</i>
27	ZEKENG Serge Sylvain	Maître de Conférences	En poste
28	ABDOURAHIMI	Chargé de Cours	En poste
29	EDONGUE HERVAIS	Chargé de Cours	En poste
30	ENYEGUE A NYAM épouse BELINGA	Chargé de Cours	En poste
31	FOUEDJIO David	Chargé de Cours	Chef Cell. MINADER

32	MBINACK Clément	Chargé de Cours	En poste
33	MBONO SAMBA Yves Christian U.	Chargé de Cours	En poste
34	MELI'I Joelle Larissa	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
35	MVOGO ALAIN	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
36	OBOUNOU Marcel	Chargé de Cours	DA/Univ Inter Etat/Sangmelima
37	WOULACHE Rosalie Laure	Chargé de Cours	En poste
38	AYISSI EYEBE Guy François Valérie	Assistant	En poste
39	CHAMANI Roméo	Assistant	En poste
40	TEYOU NGOUPOU Ariel	Assistant	En poste

### 10- DÉPARTEMENT DE SCIENCES DE LA TERRE (ST) (45)

1	BITOM Dieudonné	Professeur	<i>Doyen / FASA / Uds</i>
2	FOUATEU Rose épouse YONGUE	Professeur	En poste
3	KAMGANG Pierre	Professeur	En poste
5	NDJIGUI Paul Désiré	Professeur	<i>Chef de Département</i>
6	NDAM NGOUPAYOU Jules-Remy	Professeur	En poste
7	NGOS III Simon	Professeur	DAAC/UMa
8	NKOUMBOU Charles	Professeur	En poste
9	NZENTI Jean-Paul	Professeur	En poste
10	ABOSSOLO née ANGUE Monique	Maître de Conférences	<i>Vice-Doyen / DRC</i>
11	GHOGOMU Richard TANWI	Maître de Conférences	CD/UMa
12	MOUNDI Amidou	Maître de Conférences	<i>CT/ MINIMDT</i>
13	NGUEUTCHOUA Gabriel	Maître de Conférences	CEA/MINRESI
14	NJILAH Isaac KONFOR	Maître de Conférences	En poste
15	ONANA Vincent Laurent	Maître de Conférences	En poste
16	BISSO Dieudonné	Maître de Conférences	<i>Directeur/Projet Barrage Memve'ele</i>
17	EKOMANE Emile	Maître de Conférences	<i>En poste</i>
18	GANNO Sylvestre	Maître de Conférences	En poste
19	NYECK Bruno	Maître de Conférences	En poste
20	TCHOUANKOUE Jean-Pierre	Maître de Conférences	En poste
21	TEMDJIM Robert	Maître de Conférences	En poste
22	YENE ATANGANA Joseph Q.	Maître de Conférences	<i>Chef Div. /MINTP</i>
23	ZO'O ZAME Philémon	Maître de Conférences	<i>DG/ART</i>

24	ANABA ONANA Achille Basile	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
25	BEKOA Etienne	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
26	ELISE SABABA	Chargé de Cours	En poste
27	ESSONO Jean	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
29	EYONG JOHN TAKEM	Chargé de Cours	En poste
29	FUH Calistus Gentry	Chargé de Cours	<i>Sec. d'Etat/MINMIDT</i>
30	LAMILLEN BILLA Daniel	Chargé de Cours	En poste
31	MBESSE CECILE OLIVE	Chargé de Cours	En poste
32	MBIDA YEM	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
33	METANG Victor	Chargé de Cours	En poste
34	MINYEM Dieudonné-Lucien	Chargé de Cours	<i>CD/UMa</i>
35	MOUAFO Lucas	Chargé de Cours	En poste
36	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargé de Cours	En poste
37	NGO BIDJECK Louise Marie	Chargé de Cours	En poste
38	NOMO NEGUE Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
39	NTSAMA ATANGANA Jacqueline	Chargé de Cours	En poste
40	TCHAKOUNTE J. épouse NOUMBEM	Chargé de Cours	<i>Chef.cell / MINRESI</i>
41	TCHAPTCHET TCHATO De P.	Chargé de Cours	En poste
42	TEHNA Nathanaël	Chargé de Cours	En poste
43	TEMGA Jean Pierre	Chargé de Cours	En poste
44	FEUMBA Roger	Assistant	En poste
45	MBANGA NYOBE Jules	Assistant	En poste

## Répartition chiffrée des Enseignants de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I

NOMBRE D'ENSEIGNANTS					
DÉPARTEMENT	Professeurs	Maîtres de Conférences	Chargés de Cours	Assistants	Total
BCH	9 (1)	13 (9)	14 (6)	3 (1)	<b>39 (17)</b>
BPA	13 (1)	9 (6)	19 (5)	5 (2)	<b>46 (14)</b>
BPV	6 (0)	11(2)	9 (6)	7(1)	<b>33 (9)</b>
CI	10(1)	10(2)	12 (2)	3(0)	<b>35 (5)</b>
CO	7 (0)	17 (4)	9 (3)	2(0)	<b>35(7)</b>
IN	2 (0)	1 (0)	13 (1)	9 (1)	<b>25 (2)</b>
MAT	1 (0)	5(0)	19 (1)	6 (2)	<b>31 (3)</b>
MIB	2 (0)	5 (2)	6 (1)	6(2)	<b>19 (5)</b>
PHY	12 (0)	15(2)	10 (3)	3 (0)	<b>40 (5)</b>
ST	8 (1)	15 (1)	19 (5)	2 (0)	<b>45(7)</b>
<b>Total</b>	<b>70 (4)</b>	<b>101 (28)</b>	<b>130 (33)</b>	<b>46(9)</b>	<b>345 (74)</b>

Soit un total de **345 (74)** dont :

- Professeurs **70 (4)**
- Maîtres de Conférences **101(28)**
- Chargés de Cours **130 (33)**
- Assistants **46(9)**

( ) = Nombre de Femmes



## **DEDICACE**

Je dédie ce travail:

**A DIEU TOUT-PUISSANT.**

## REMERCIEMENTS

Cette thèse qui a bénéficié de la contribution de plusieurs organismes constitue le couronnement d'un long processus mené par plusieurs personnes. Je voudrais exprimer ma profonde gratitude, respectivement :

- Au **Pr Moundipa Fewou Paul**, Chef de Département de Biochimie et chef du Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie. Vous m'avez accueilli depuis mon Master. Merci d'avoir accepté de diriger ces travaux et d'apporter toute votre expertise tout au long de ce travail, en dépit de votre programme chargé ;
- Au **Pr Juan Segura-Aguilar** du Programme of Molecular and Clinical Pharmacology, Faculté de Médecine, Université de Chili à Santiago de m'avoir accueilli dans son laboratoire pour la réalisation d'une partie de cette thèse et pour ses conseils ;
- Au **Dr Patricia Munoz** pour son encadrement, ses conseils et critiques durant mon séjour au laboratoire en Chili;
- A tous les enseignants du Département de Biochimie de l'Université de Yaoundé I pour la formation académique reçue ;
- Aux **Dr Simon Fewou Ngamli, Dr Nfotie Njoya Emmanuel et Dr Owona Brice Vincent** pour leurs conseils, critiques et leur disponibilité durant la réalisation de ce travail ;
- A **tous les membres** du Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie pour leur assistance et pour tous les conseils qu'ils m'ont prodigués pendant la réalisation de ce travail et aussi lors des séminaires du laboratoire ;
- Aux **tradipraticiens** du Département du Noun qui nous ont livré leur secret sur les plantes étudiées ;
- Au **personnel** de l'Herbier National du Cameroun qui a procédé à l'indentification botanique des plantes ;
- A mon époux, **Divine Foundjem Tita** pour sa disponibilité et davantage ses encouragements.
- A mes enfants **Sama Foundjem Tita, Kehbuma Foundjem Tita et Jinga Foundjem Tita** qui sont pour moi une raison de vivre et une source d'émulation.
- A **mes parents** qui ont toujours œuvré pour mon éducation, constituant de ce fait un facteur stimulant dont les effets ne cesseront de m'exalter.
- A **mes frères et sœurs**, que ce travail soit pour eux l'expression de la cohésion familiale qu'ils ont su me faire découvrir.

- A **tous ceux** qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail et dont je n'ai pas pu citer les noms. Trouvez ici l'expression de ma profonde gratitude ;

Pour les organismes, je tiens à exprimer ma profonde gratitude ;

- A l'**International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB)** pour la bourse d'étude de 4 mois (N° S/CMR 17-01) pour la réalisation d'une partie de ce travail ;
- A l'**Organisation Africaine de la Propriété Intellectuelle (OAPI)** pour le financement du projet (Grant N°48/14) afin de réaliser une partie de ce travail.

## TABLE DE MATIERE

LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS .....	i
REMERCIEMENTS .....	xiv
DEDICACE .....	xiv
TABLE DE MATIERE .....	xvii
LISTE DES ABREVIATIONS.....	xxiii
LISTE DES TABLEAUX .....	xxiv
LISTE DES FIGURES .....	xxv
RESUME .....	xxvii
ABSTRACT.....	xxix
INTRODUCTION GENERALE.....	1
1- Introduction .....	1
2- Hypothèse de recherche .....	3
3- Objectifs.....	4
3-1- Objectif général.....	4
3-2- Objectifs spécifiques .....	4
CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE.....	5
I-1- Rappel sur le système nerveux .....	5
I-1-1- Les neurones.....	6
I-1-2- Les cellules gliales.....	7
I-1-2-1-les astrocytes .....	8
I-1-2-2-Les microglies .....	8
I-1-2-3-Les oligodendrocytes.....	8
I-2- Mécanismes communs aux maladies neurodégénératives .....	9
I-2-1-Généralités sur les maladies neurodégénératives .....	9
I-2-2-Formation d'agrégats protéiques .....	11
I-2-3- Le stress oxydant .....	12

I-2-3-1- les radicaux libres.....	13
I-2-3-2- Les conséquences du stress oxydant .....	14
I-2-3-3- Les défenses antioxydantes.....	15
I-2-3-3-1- Antioxydants non enzymatiques.....	16
I-2-3-3-2- Antioxydants enzymatiques.....	17
I-2-3-4- Implication du stress oxydant dans les maladies neurodégénératives.....	18
I-2-4- La neurotransmission.....	19
I-2-4-1- Exemples de quelques neurotransmetteurs et leurs fonctions .....	20
I-2-4-1-1- L'acétylcholine .....	20
I-2-4-1-2- Le glutamate .....	21
I-2-4-1-3- La dopamine .....	22
I-2-4-2- Implications du déficit de la neurotransmission dans les maladies neurodégénératives. .....	22
I-2-5- La neuro-inflammation .....	25
I-2-5-1- Médiateurs moléculaires de la neuro-inflammation.....	25
I-2-5-1-1- Les cytokines pro-inflammatoires.....	25
I-2-5-1-2- Les chimiokines .....	25
I-2-5-1-3- L'oxyde nitrique (NO) .....	26
I-2-5-1-4- Les prostaglandines et leucotriènes.....	26
I-2-5-2- Implication de la neuro-inflammation dans les maladies neurodégénératives. ....	27
I-3- La maladie de Parkinson .....	28
I-3-1- Généralités sur la maladie de Parkinson .....	28
I-3-2- Aminochrome dans la maladie de Parkinson .....	32
I-3-2-1- Oxydation de la dopamine en aminochrome .....	32
I-3-2-2- Mécanismes d'action de l'aminochrome .....	34
I-3-2-3- Aminochrome et dysfonctionnement mitochondrial.....	35
I-3-3- Astrocytes dans la maladie de Parkinson.....	36

I-3-3-1- Rôle et fonctions des astrocytes .....	36
I-3-3-2-Astrocytes et la MP .....	38
I-3-4- Modèles expérimentaux d'étude de la maladie de Parkinson .....	39
I-3-4-1- Modèles d'étude de la MP <i>in vivo</i> .....	39
I-3-4-1-1-Modèles génétiques.....	39
I-3-4-1-2-Modèles toxiques .....	39
I-3-4-2- Modèles d'étude de la MP <i>in vitro</i> .....	42
I-3-5- Approche thérapeutique contre la maladie de Parkinson .....	43
I-3-5-1- Approche moderne .....	43
I-3-5-1-1- Traitements médicamenteux de la MP .....	43
I-3-5-1-2- Traitements neurochirurgicaux .....	45
I-3-5-2- Plantes médicinales et maladie de Parkinson .....	46
CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES .....	48
II-1-Matériels .....	48
II-1-1-Réactifs .....	48
II-1-2-Appareils.....	48
II-1-3- Description des lignées cellulaires utilisées .....	48
II-1-4- Description de la Zone d'étude (Enquête ethno pharmacologique).....	49
II-2- METHODES.....	51
II-2-1- Enquête ethno pharmacologique.....	51
II-2-1-1-Collecte des données.....	51
II-2-1-2- Récolte des plantes.....	51
II-2-2-1- Préparation des extraits de plantes avec divers solvants .....	51
II-2-2-1-1-Chromatographie sur Couche Mince .....	52
II-2-2-1-2-Préparation des extraits de plantes.....	53
II-2-2-2- Evaluation de l'activité anti-oxydante des extraits bruts de plantes .....	53
II-2-2-2-1-Test de la capacité antioxydante des extraits bruts de plantes .....	54

II-2-2-2-Effet des extraits bruts de plantes sur la peroxydation lipidique .....	54
II-2-2-2-1-Préparation de l'homogénat du cerveau du rat.....	54
II-2-2-2-2-Inhibition de la peroxydation lipidique dans l'homogénat de cerveau du rat .....	54
II-2-2-2-3-TEST DU POUVOIR REDUCTEUR DES EXTRAITS BRUTS DE PLANTES .....	55
II-2-2-2-4-Test anti-radicalaire au DPPH.....	56
II-2-2-3- Analyse quantitative des polyphénols totaux et flavonoïdes présents dans chaque extrait brut de plante .....	57
II-2-2-3-1-Détermination de la teneur en polyphénols totaux des différents extraits .....	57
II-2-2-3-2-Détermination de la teneur en flavonoïdes dans les extraits de plantes.....	58
II-2-2-4- Evaluation de l'activité anti-acétylcholinestérase des extraits bruts de plantes .....	58
II-2-2-5- Activité anti-inflammatoire des extraits bruts de plantes.....	59
II-2-2-5-1-Culture cellulaire et traitement avec les extraits bruts de plantes.....	60
II-2-2-5-1-1-Mesure de la viabilité cellulaire : Test au MTT .....	60
II-2-2-5-1-2-Mesure de la production de l'Oxyde Nitrique (NO) .....	61
II-2-2-5-2-Effet des extraits bruts de plantes sur l'inhibition de la lipoxigénase.....	62
II-2-3- Evaluation <i>in vitro</i> de l'effet protecteur de certains extraits bruts de plantes contre la toxicité induite par l'aminochrome sur les cellules astrocytomes humaines .....	64
II-2-3-1- Culture Cellulaire.....	64
II-2-3-2- Evaluation <i>in vitro</i> de la toxicité des extraits bruts de plantes .....	65
II-2-3-2-1-Traitement des cellules avec les extraits bruts de plantes .....	65
II-2-3-2-2-Test de mortalité cellulaire par cytométrie en flux .....	65
II-2-3-3- Évaluation <i>in vitro</i> de l'effet protecteur des extraits bruts de plantes contre la toxicité induite par l'aminochrome .....	67
II-2-3-3-1-Synthèse et purification de l'aminochrome .....	67
II-2-3-3-2-Culture cellulaire et traitement .....	69
II-2-3-3-3-Test de mortalité cellulaire par cytométrie en flux .....	69
II-2-3-4- Evaluation <i>in vitro</i> de l'effet des extraits bruts de plantes sur le dysfonctionnement du potentiel de membrane mitochondriale ( $\Delta\Psi_m$ ) induit par l'aminochrome .....	69

II-2-4-Analyses statistiques des résultats.....	71
CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSIONS .....	72
RESULTATS .....	72
III-1- Enquete ethnopharmacologique.....	72
III-1-1- Résultat de l'enquête ethno pharmacologique .....	72
III-1-2-Discussion partielle .....	79
III-1-3-Conclusion partielle .....	81
III-2- Evaluation <i>in vitro</i> des activités antioxydante, anti-acétylcholinestérase et anti-inflammatoire des extraits bruts de plantes.....	82
III-2-1- Solvant d'extraction des plantes .....	82
III-2-2- Activités antioxydantes des différents extraits bruts de plante.....	82
III-2-2-1- Capacité antioxydante totale des extraits de plantes.....	82
III-2-2-2- Inhibition de la peroxydation lipidique dans l'homogénat du cerveau de rat. ....	83
III-2-2-3- Pouvoir réducteur des différents extraits bruts de plantes .....	86
III-2-2-4- Activité de piégeage du radical DPPH° .....	86
III-2-3- Détermination de la teneur en polyphénols totaux et flavonoïdes des extraits de plante .....	89
III-2-4- Activité anti- acétylcholinestérase des extraits bruts de plantes.....	90
III-2-5- Activité anti-inflammatoire des extraits bruts de plantes.....	92
III-2-5-1-Effet des extraits bruts de plantes sur la production de NO .....	92
III-2-5-2- Effet des extraits bruts de plantes sur l'inhibition de la lipoxycgénase .....	96
III-2-5- Discussion partielle .....	99
III-2-6-Conclusion partielle .....	103
III-3- Evaluation <i>in vitro</i> de l'effet protecteur de certains extraits bruts de plantes contre la toxicité induite par l'aminochrome sur les cellules astrocytomes humaines .....	104
III-3-1- Evaluation de la cytotoxicité des extraits de plantes .....	104
III-3-2- Évaluation <i>in vitro</i> de l'effet protecteur des extraits bruts de plantes contre la toxicité induite par l'aminochrome .....	109



III-3-3- Evaluation de l'effet des extraits bruts de plantes sur le dysfonctionnement du potentiel de membrane mitochondriale ( $\Delta\Psi_m$ ) induit par l'aminochrome.....	114
III-3-4-Discussion partielle.....	117
III-3-5-Conclusion partielle.....	120
III-4- Discussion Générale.....	121
CHAPITRE IV: CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	125
IV-1- Conclusion Générale.....	125
IV-2- Perspectives.....	126
BIBLIOGRAPHIE.....	127
WEBOGRAPHIE.....	149
ANNEXES.....	a

## **LISTE DES ABREVIATIONS**

**ANOVA** : Analysis of variance (Analyse de la variance)

**ACh** : acétylcholine

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

**CH<sub>2</sub>CL<sub>2</sub>/MeOH** : Chlorure de méthylène/ méthanol.

**CI<sub>50</sub>** : Concentration inhibitrice 50

**DMSO** : Diméthyl sulfoxyde.

**DO** : Densité optique

**ENR** : Espèce nitrée réactive.

**EROs** : Espèce réactives de l'oxygène.

**GSTM2** : Glutathion S-transférase humaine Mu-2

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : peroxyde d'hydrogène

**L-DOPA** : L-dihydroxyphenylalanine

**MA** : Maladie d'Alzheimer

**MAO** : Monoamine oxydase

**MDA** : malondialdéhyde

**MP** : Maladie de Parkinson

**NMDA** : N-Méthyl-D-Aspartate

**nACh** : récepteur nicotinique de l'acétylcholine

**NaCl** : Chlorure de sodium

**NO** : Oxyde nitrique<sup>[SEP]</sup>

**O<sub>2</sub><sup>o-</sup>** : Anion superoxyde

**OH<sup>o</sup>** : Radical hydroxyle

**ONOO<sup>-</sup>** : Nitroperoxyde

**PBS** : Phosphate buffer saline (tampon phosphate salin)

**pH** : Potentiel d'hydrogène

**qsp** : quantité suffisante pour

**SNC** : Système nerveux central

**SNC** : Substance noire compacte

**SOD** : Superoxyde dismutase

**TCA**: *Trichloroacetic acid* (acide trichloroacétique)

**TBA**: *Thiobarbituric acid* (acide thiobarbiturique)

**TNF** : *Tumor necrosis factor*

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Quelques maladies neurodégénératives, zones affectées et différents symptômes ....	10
Tableau II : Maladies neurodégénératives associées avec les protéines anormales.....	12
Tableau III: Différents espèces réactives et leurs propriétés .....	14
Tableau IV: Quelques neurotransmetteurs, leurs fonctions et les maladies causées.....	24
Tableau V: Médiateurs pro-inflammatoires sécrétés par les astrocytes et microglies durant le processus neuro-inflammatoire .....	26
Tableau VI: Certains médicaments couramment utilisés dans le traitement de la MP, leurs modes d'action et leurs effets secondaires .....	45
Tableau VII : Quelques composés ayant des effets anti-parkinsoniens .....	47
Tableau VIII: Liste de plantes médicinales utilisées dans le Noun pour traiter les désordres neurologiques .....	73
Tableau IX: Capacité antioxydante totale des différents extraits bruts de plantes .....	84
Tableau X: Valeurs de CI <sub>50</sub> des extraits bruts de plantes pour la peroxydation lipidique dans l'homogénat du cerveau de rats.....	86
Tableau XI: Pouvoir réducteur des différents extraits bruts de plantes.....	87
Tableau XII: Valeurs de CI <sub>50</sub> des extraits bruts de plantes pour le piégeage du radical libre (DPPH) .....	89
Tableau XIII: Teneurs en polyphénols et flavonoïdes totaux des extraits bruts de plantes .....	90
Tableau XIV: Activité anti acétylcholinestérase (AChE) et valeurs de CI <sub>50</sub> des extraits bruts de plantes .....	91
Tableau XV: Valeurs des CI <sub>50</sub> en µg/mL pour la production de NO des extraits bruts de plante	96
Tableau XVI: Valeurs de CI <sub>50</sub> des extraits bruts de plantes pour l'inhibition de la lipoxigénase (15-LOX) .....	97
Tableau XVII: Effet de quelques extraits bruts de plantes sur la mortalité cellulaire.....	108
Tableau XVIII: Effet des extraits bruts de plantes □A. laxiflora et C. purpurascens□ sur la mortalité cellulaire.....	109

## LISTE DES FIGURES

Figure 1: Organisation du système nerveux.....	5
Figure 2: Structure du cerveau humain.....	6
Figure 3: Schéma illustrant la structure du neurone.....	7
Figure 4: Schéma illustrant les cellules gliales et les neurones dans le SNC.....	7
Figure 5 : Exemples de maladies neurodégénératives et les zones du système nerveux qu'elles affectent. Macro: Observation macroscopique–Micro: Observation microscopique.....	10
Figure 6: Mécanisme d'accumulation des protéines anormales dans le tissu nerveux.....	11
Figure 7: Mécanismes provoquant un stress oxydant au sein d'une cellule.....	13
Figure 8: Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie.....	15
Figure 9 : Repartition des principales défenses antioxydantes dans les cellules.....	16
Figure 10: Génération des EROs, neutralisation dans les cellules neuronales et leur rôle dans les maladies neurodégénératives.....	19
Figure 11: Les différentes étapes de la transmission nerveuse.....	20
Figure 12: Métabolisme de l'acétylcholine.....	21
Figure 13: Biosynthèse des eicosanoïdes à partir de l'acide arachidonique.....	27
Figure 14: Processus neuro-inflammatoire.....	28
Figure 15: Schéma illustrant la localisation des différentes zones du cerveau impliquées dans la MP.....	29
Figure 16: Différentes stades de la MP.....	32
Figure 17: Oxydation de la dopamine en aminochrome.....	33
Figure 18: Mécanisme d'action de l'aminochrome.....	35
Figure 19: Conjugaison de la dopamine o-quinone et de l'aminochrome avec du glutathion en présence du Glutathion S-transférase humaine Mu-2 (GSTM2).....	38
Figure 20: Structures de la dopamine et des principales neurotoxines utilisées pour reproduire les caractéristiques de la MP dans des modèles animaux.....	41
Figure 21: Pathogenèse des modèles induits par les toxines.....	42
Figure 22: Localisation de la zone d'étude sur la carte du Cameroun.....	50
Figure 23: Schéma du protocole d'extraction des plantes.....	53
Figure 24: Répartition des différentes familles et parties de plantes utilisées.....	77
Figure 25: Exemple de chromatogramme d'essai d'extraction.....	82
Figure 26: Inhibition la péroxydation lipidique par les extraits de plantes.....	85

Figure 27: Piégeage du DPPH par les extraits de plantes à différentes concentrations .....	88
Figure 28: Inhibition de l'acétylcholinestérase par les extraits de plantes .....	91
Figure 29: Pourcentage d'inhibition du NO par les extraits bruts de plantes .....	93
Figure 30: Pourcentage de viabilité cellulaire des extraits bruts de plantes sur la production de NO .....	94
Figure 31: Effet des extraits bruts de plantes sur la concentration du NO .....	95
Figure 32: Inhibition de la lipoxigénase des extraits bruts de plante .....	98
Figure 33: Exemple du Résultats bruts obtenus après analyse en cytométrie de flux.....	107
Figure 34: Effet de l'extrait d' <i>Alchornea laxiflora</i> (E3) sur la mortalité cellulaire induite par l'aminochrome .....	110
Figure 35: Effet de l'extrait de <i>D. edulis</i> (E8) sur la mortalité cellulaire induite par l'aminochrome .....	111
Figure 36: Effet de l'extrait de <i>C. acuminata</i> (E9) sur la mortalité cellulaire induite par l'aminochrome .....	112
Figure 37: Effet de l'extrait de <i>C. purpurascens</i> (E10) sur la mortalité cellulaire induite par l'aminochrome .....	112
Figure 38: Effet de l'extrait de <i>A. muricata</i> (E24) sur la mortalité cellulaire induite par l'aminochrome .....	113
Figure 39: Effet de l'extrait de <i>A. senegalensis</i> (E26) sur la mortalité cellulaire induite par l'aminochrome .....	114
Figure 40: Effet d'extrait d' <i>A. laxiflora</i> (E3) sur le dysfonctionnement du potentiel de la membrane mitochondriale induit par l'aminochrome .....	115
Figure 41: Effet d'extrait de <i>D. edulis</i> (E8) sur le dysfonctionnement du potentiel de la membrane mitochondriale induit par l'aminochrome .....	116
Figure 42: Effet d'extrait d' <i>A. muricata</i> (E24) sur le dysfonctionnement du potentiel de la membrane mitochondriale induit par l'aminochrome .....	116
Figure 43: Effet d'extrait d' <i>A. senegalensis</i> (E26) sur le dysfonctionnement du potentiel de la membrane mitochondriale induit par l'aminochrome .....	117

## RESUME

Les maladies neurodégénératives, telles que la maladie de Parkinson, se caractérisent par une perte progressive de la structure et de la fonction des neurones. La faible réponse thérapeutique et le caractère progressif de ces maladies, ainsi qu'un large éventail d'effets secondaires tels que la nausée, les vomissements, les hallucinations, la constipation, les vertiges et les effets hépatotoxiques causés par les approches thérapeutiques moderne incitent la science à rechercher un traitement médicamenteux complémentaire ou alternatif en particulier à partir des plantes médicinales. La médecine traditionnelle camerounaise à base de plantes utilisées contre certains troubles neurologiques tels que l'épilepsie, la dépression, l'anxiété, la migraine, les convulsions et la schizophrénie, représente des avantages thérapeutiques pour le traitement des maladies neurodégénératives. Pour valoriser cette médecine, une enquête ethnobotanique a été menée dans le Département du Noun. Les extraits bruts ont été préparés avec le mélange de solvant CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, leur effet antioxydant et anti acétylcholinestérase ont été déterminées *in vitro*. Les propriétés anti-inflammatoires des extraits bruts des plantes recensées ont été également déterminées en évaluant *in vitro* leur effet inhibiteur de la production d'oxyde nitrique (NO) par les macrophages RAW 264.7 stimulées par les lipopolysaccharides et inhibiteur de la 15-lipoxygénase (15-LOX). L'effet protecteur des extraits actifs sur les cellules glioblastomes humaines/astrocytomes U373MG contre la toxicité induite par l'aminochrome a été évalué *in vitro*. Comme résultats, trente plantes médicinales ont été recensées. Parmi ces plantes, la famille des Astéraceae a été la plus représentée avec 6 espèces; et les feuilles, les parties les plus utilisées. La plupart des extraits bruts a présenté un meilleur potentiel antioxydant comparé à la vitamine C ou le trolox, plus précisément, l'extrait de *Dacryodes edulis* a présenté la capacité antioxydante la plus élevée (385,15 mg AAE / g d'extrait), l'extrait d'*Alchornea laxiflora* a présenté une meilleure inhibition de la peroxydation lipidique (3,20 µg / mL), l'extrait de *Cola acuminata* a présenté un pouvoir réducteur plus élevé (0,620) et l'extrait d'*Annona senegalensis* a montré une meilleure activité antiradicalaire (7,40 µg/mL). L'extrait de *Crinum purpurascens* a présenté une meilleure activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase avec une valeur de CI<sub>50</sub> de 99,40 µg/mL significativement supérieure à celle de la galanthamine, composé de référence. L'extrait de *C. purpurascens* a présenté la meilleure activité inhibitrice du NO avec une CI<sub>50</sub> de 12,08±1,68 µg/mL valeur comparable à celle de la quercétine (6,59 ±0,87 µg/mL). L'extrait de graines d'*Annona muricata* a présenté une activité inhibitrice de la 15-LOX la plus élevée avec une valeur de CI<sub>50</sub> de 30,43 µg/mL. Les extraits bruts d'*A. senegalensis*, d'*A. laxiflora*, de *D. edulis*, de *C. acuminata*, de *C. purpurascens* et d'*A. muricata* ayant présentés des meilleures

activités citées précédemment ont été sélectionnés pour la suite de notre étude. Les extraits d'*A. laxiflora*, de *D. edulis*, d'*A. muricata* et d'*A. senegalensis* ont diminué de manière significative ( $p < 0,05$ ) la toxicité induite par l'aminochrome sur les cellules U373MGsiGST6. Aucune différence significative n'a été observé entre ces extraits de plantes et la nicotine, composé de référence. Cependant seuls les extraits d'*A. laxiflora* et d'*A. muricata* ont augmentés de manière significative ( $p < 0,05$ ) le potentiel membranaire mitochondrial dans les cellules U373MGsiGST6. Il en ressort de cette étude que plusieurs plantes sont utilisées par les tradipraticiens de santé du Département du Noun contre certains désordres neurologiques. Ce resultat confirme ainsi l'importance de l'utilisation de ces plantes par les tradipraticiens de santé.

**Mots clés:** Maladie de Parkinson, plantes médicinales, désordres neurologiques, anti-acétylcholinestérase, anti-inflammatoire, neuroprotection.

## ABSTRACT

Neurodegenerative diseases, such as Parkinson's disease, are characterized by a progressive loss of the structure and function of neurons. The weak therapeutic response and the progressive nature of these diseases, as well as, a wide range of side effects (such as nausea, vomiting, hallucinations, constipation, dizziness and hepatotoxic effects) caused by modern therapeutic approaches, necessitated a complementary or alternative drug treatment that is relatively safe, particularly from medicinal plants. Traditional Cameroonian herbal medicine used against some neurological disorders (such as epilepsy, depression, anxiety, migraine, seizures and schizophrenia), represent therapeutic benefits for the treatment of neurodegenerative diseases. To promote this medicine, an ethnobotanical survey was carried out in the Noun Division. The crude extracts were prepared using the mixture of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and MeOH (1:1, v/v). Their antioxidant and anti-acetylcholinesterase effects were determined *in vitro*. The anti-inflammatory properties of the crude extracts of plants were determined *in vitro* by evaluating their inhibitory effect on the production of nitric oxide (NO) by the RAW 264.7 macrophages stimulated by lipopolysaccharides and inhibitor of 15-lipoxygenase (15-LOX). The protective effect of the active extracts on human glioblastoma / U373MG astrocytoma cells against aminochrome-induced toxicity was also evaluated *in vitro*. Out of thirty identified and studied medicinal plants, the Asteraceae family was the most represented with six species, and its leaves were the most used parts. Most of the crude extracts showed a better antioxidant potential compared to vitamin C or trolox. More precisely, the extract of *Dacryodes edulis* exhibited the highest antioxidant capacity (385.15 mg AAE / g of extract), *Alchornea laxiflora* extract showed better inhibition of lipid peroxidation (3.20 µg / mL), *Cola acuminata* extract showed higher reducing power (0.620) and *Annona senegalensis* extract showed better anti-free radical activity (7.40 µg / mL). *Crinum purpurascens* extract exhibited better acetylcholinesterase inhibitory activity with an IC<sub>50</sub> value of 99.40 µg / mL, which is significantly higher than that of the reference compound galanthamine. The extract of *C. purpurascens* exhibited the best inhibitory activity of NO with an IC<sub>50</sub> of 12.08 ± 1.68 µg / mL comparable to that of quercetin (6.59 ± 0.87 µg / mL). *Annona muricata* seed extract exhibited the highest 15-LOX inhibitory activity with an IC<sub>50</sub> value of 30.43 µg / mL. The extracts of *A. senegalensis*, *A. laxiflora*, *D. edulis*, *C. acuminata*, *C. purpurascens* and *A. muricata* which have presented the best activities mentioned above were selected for the rest of our study. The extracts of *A. Laxiflora*, *D. edulis*, *A. muricata* and *A. senegalensis* significantly (p<0.05) decreased aminochrome-induced toxicity on U373MGsiGST6 cells. No significant difference was observed between these plant extracts and the reference compound, nicotine. However, only extracts from *A. laxiflora* and *A. muricata*



significantly ( $p < 0.05$ ) increased mitochondrial membrane potential in U373MGsiGST6 cells. It emerges from this study that several plants used by the traditional health practitioners of the Noun Division are effective against some neurological disorders.

**Key words:** Parkinson's disease, medicinal plants, neurological disorders, anti-acetylcholinesterase, anti-inflammatory, neuroprotection.



# **INTRODUCTION GENERALE**

## 1- Introduction

Les maladies neurodégénératives (MND) constituent un groupe de pathologies progressives liées à un dysfonctionnement métabolique au sein du tissu nerveux, conduisant à la mort des neurones et à la destruction du système nerveux. On peut citer la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la maladie de Huntington, la sclérose latérale amyotrophique, la sclérose en plaque et le glaucome. L'étiologie des maladies neurodégénératives est multifactorielle et se compose d'une interaction entre les facteurs environnementaux, génétiques et l'âge (**Nieoullon, 2011**). La prévalence globale des démences est estimée à 35,6 millions de la population mondiale, et on prévoit qu'elle pourrait atteindre 69,56 millions en 2030 et 115,38 millions en 2050 si rien n'est fait (**World Alzheimer Report 2010**). De toutes ces formes de démence, la maladie d'Alzheimer (MA) et la maladie de Parkinson (MP) sont les formes de démences les plus fréquentes chez les personnes âgées. Outre la principale caractéristique biochimique de ces maladies, qui est l'accumulation de protéines malformées dans certaines régions du cerveau ; le déficit cholinergique, la neuro-inflammation et le stress oxydatif sont également impliqués dans leur pathogenèse (**Niranjan, 2014 ; Singh, 2015; Chen and Zhang, 2014 ; Diana Gallego et al., 2011; Hwang, 2013**). En dehors de la MA, l'inhibition de l'acétylcholinestérase (AChE) est également considérée comme une stratégie thérapeutique prometteuse pour d'autres types de démence et de la maladie de Parkinson (**Pagano et al., 2015**). Les médicaments actuels pour le traitement de la MA ou MP incluent les inhibiteurs de l'AChE pour les cas légers à modérés (**Anand et al., 2014; Bishara et al., 2015; Henderson et al., 2016; Pagano et al., 2015**). Malheureusement, ces inhibiteurs ont des effets indésirables, notamment des troubles gastro-intestinaux, une hépatotoxicité, des nausées, des vomissements, des diarrhées, des vertiges, une syncope et une bradycardie (**Čolović et al., 2013; Mukherjee et al., 2007**). Afin de prévenir ou de limiter la progression de la maladie, la plupart des recherches pharmacologiques ont porté sur des inhibiteurs présentant moins d'effets secondaires (**Prakash et al., 2015**). Les processus neuro-inflammatoires peuvent contribuer à la cascade d'événements conduisant aux dommages neuronaux progressifs observés lors du vieillissement et de troubles cognitifs liés au vieillissement (**Hirsch et al., 2012**). Au cours de l'inflammation, de nombreux médiateurs pro-inflammatoires comprenant la production d'oxyde nitrique (NO) et l'activation des enzymes telles que les lipoxigénases (LOX) sont augmentés. Dans les maladies neurodégénératives, les cellules nerveuses libèrent un taux élevé de NO, ce qui provoque des dommages considérables aux tissus environnants, y compris les neurones (**Yuste et al., 2015**). De plus, l'activité accrue des lipoxigénases dans des situations pathologiques produit des

eicosanoïdes qui provoquent des réponses inflammatoires cytotoxiques (**Phillis et al., 2006**). La production des radicaux libres au cours du métabolisme dans les cellules neuronales est délétère en cas de déséquilibre entre la production et l'élimination. Il a été rapporté que lors du vieillissement ou d'une lésion cérébrale, la production des radicaux libres devient très élevée et contribue à la modification de molécules biologiques telles que les acides nucléiques, les protéines, les lipides et les glucides (**Gandhi and Abramov, 2012**). Par conséquent, les plantes médicinales ayant une teneur élevée en polyphénols et des activités antioxydantes peuvent avoir une grande pertinence dans la prévention et le traitement des maladies neurodégénératives (**Elena et al., 2011 ; Madeo et Elsayad, 2013; Zhao and Zhao, 2013**). Compte tenu de ces différentes conditions structurelles et pathologiques qui caractérisent les maladies neurodégénératives ; une variété de cibles et des méthodes plus efficaces sont nécessaires pour leur traitement.

Initialement découverte en 1817 par James Parkinson, la maladie de Parkinson (MP) est le deuxième trouble neurodégénératif progressif le plus fréquent après la maladie d'Alzheimer (**Wirdefeldt et al., 2011**). Elle se caractérise principalement par une dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques dans la substance compacte noire, ce qui entraîne des symptômes moteurs tels que tremblements au repos, rigidité, bradykinésie et instabilité posturale (**Dexter and Jenner, 2013**). La prévalence mondiale de cette maladie est de 0,3% dans la population générale, avec une tendance à augmenter avec l'âge (**Tysnes and Storstein, 2017**). Plusieurs modèles cellulaires de la MP, notamment l'exposition à la 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP), à la roténone et à la 6-hydroxydopamine (6-OHDA) sont couramment utilisés (**Segura-Aguilar, 2018a**). Cependant, ces toxines induisent une perte rapide et massive de cellules dopaminergiques *in vitro* (**Williams, 1986**), alors que les symptômes du parkinsonisme chez l'homme peuvent prendre jusqu'à plusieurs années après la dégénérescence nigrale (**Braak et al., 2004**). De plus, la protection *in vitro* contre ces toxines ne se traduit pas nécessairement par une pharmacothérapie efficace dans la MP (**Segura-Aguilar et al., 2016; Segura-Aguilar, 2018b**). L'oxydation de la dopamine en neuromélanine implique la formation des o-quinones tels que l'aminochrome et cette auto-oxydation est un processus naturel, car les personnes âgées en bonne santé ont leurs neurones dopaminergiques intacts (**Zecca et al., 2002**). Cependant, dans certaines conditions, cet aminochrome induit un dysfonctionnement mitochondrial, une génération d'oligomères neurotoxiques d' $\alpha$ -synucléine, un dysfonctionnement de la dégradation de protéines des systèmes protéasomales et lysosomales, une neuroinflammation, un stress du réticulum endoplasmique et un stress oxydatif (**Segura-**

**Aguilar et al., 2014; Segura-Aguilar, 2017a).** Au vue de tout ce qui précède et en plus du fait que l'aminochrome soit formé à l'intérieur des cellules contrairement aux autres neurotoxines exogènes, il a été proposé comme un nouveau modèle préclinique de la MP (**Segura-Aguilar, 2017b**). Les astrocytes, cellules les plus abondantes du système nerveux central (SNC), jouent un rôle important dans le maintien de l'activité neuronale (**Ben Haim et al., 2015**), d'où un dysfonctionnement de ces cellules entraînent la mort des neurones (**Rangasamy et al., 2010**). Dans les astrocytes, la dopamine peut aussi s'auto-oxyder en aminochrome, mais les astrocytes via leur glutathion S-transférase Mu 2 (GSTM2) sont capables de catalyser la conjugaison de l'aminochrome avec du glutathion et donc de prévenir la toxicité de l'aminochrome (**Baez et al., 1997; Segura-Aguilar et al., 1997 ; Huenchuguala et al., 2014**).

Le médicament le plus couramment utilisé pour le traitement de la MP est la lévodopa (L-dopa), un précurseur de la dopamine, qui augmente les taux de dopamine dans le cerveau et atténue les symptômes. Cependant, ce médicament a de nombreux effets secondaires et perd de son efficacité en quelques années (**Dorszewska et al., 2014**), par conséquent, de nouvelles thérapies sont nécessaires. Plusieurs plantes médicinales présentent un intérêt particulier dans plusieurs régions d'Afrique et sont donc hautement qualifiées pour le développement de médicaments (**Elujoba et al., 2005**). De plus, certaines études ont montré que les plantes médicinales contenant des polyphénols ont des effets neuroprotecteurs et antioxydants (**Ebrahimi and Schluesener, 2012 ; Bhullar et al., 2013**) et peuvent représenter une source potentielle de développement de médicaments contre la MP. En Afrique, les plantes médicinales sont utilisées dans les pratiques traditionnelles pour traiter les maladies neurologiques (**Bum et al., 2011; Kantati et al., 2016**). Ainsi les populations du Département du Noun font recours à la médecine traditionnelle pour le traitement des maladies neurologiques, et à notre connaissance les propriétés pharmacologiques de ces plantes contre les maladies neurodégénératives plus particulièrement la maladie de Parkinson n'ont pas été examinées. D'où l'importance de notre étude afin de valoriser l'utilisation de ces plantes médicinales Camerounaise du Département du Noun.

## **2- Hypothèse de recherche**

Les plantes médicinales Camerounaise du Département du Noun utilisées pour traiter les troubles neurologiques sont des potentielles sources de nouveaux médicaments contre la maladie de Parkinson

### 3- Objectifs

#### 3-1- Objectif général

L'objectif général de ce travail a été d'évaluer *in vitro* les propriétés antioxydantes, anti-acétylcholinestérase, anti-inflammatoires et neuroprotectrices des extraits de plantes utilisées dans le Département du Noun pour traiter certains troubles neurologiques.

#### 3-2- Objectifs spécifiques

Plus spécifiquement, il s'agissait de:

- ✓ Mener une enquête ethnobotanique auprès des tradipraticiens de santé du Département du Noun afin de répertorier les plantes médicinales utilisées pour traiter les troubles neurologiques;
- ✓ Evaluer *in vitro* les propriétés antioxydantes, anti-acétylcholinestérase et anti-inflammatoires des extraits de plantes recensées
- ✓ Evaluer *in vitro* l'effet protecteur des extraits actifs sur les cellules astrocytomes humaines contre la toxicité induite par l'aminochrome.

Ces objectifs spécifiques se fondent sur les hypothèses suivantes:

**Hypothèse 1:** Le traitement des troubles neurologiques par les tradipraticiens de santé du Département du Noun implique l'utilisation d'une grande diversité de plantes médicinales.

**Hypothèse 2:** Ces plantes sont capables de bloquer la production des radicaux libres, d'inhiber l'activité de l'acétylcholinestérase, d'inhiber la production de l'oxyde nitrique et d'inhiber la lipoxygénase..

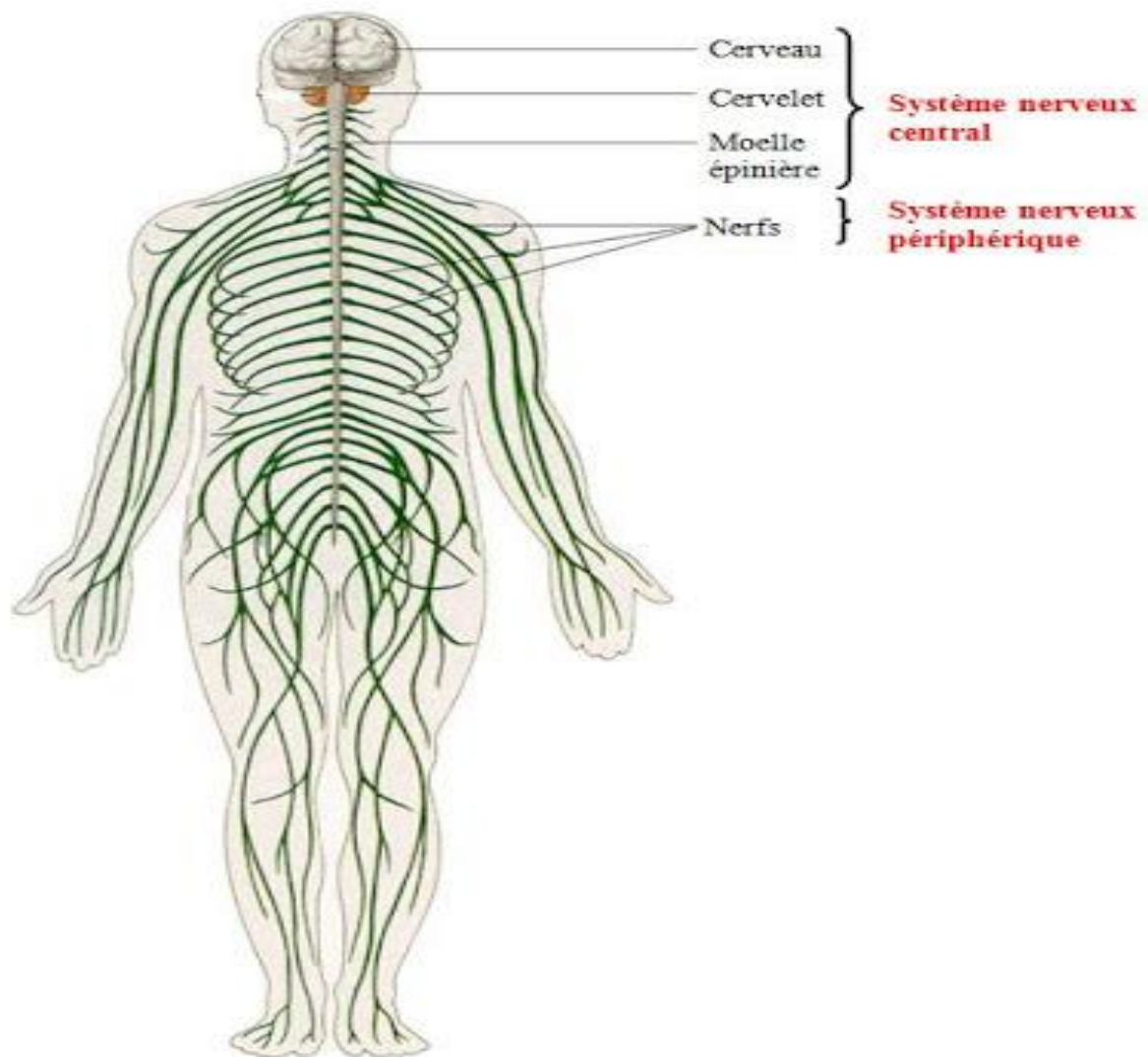
**Hypothèse 3:** Ces plantes sont capables de protéger les cellules astrocytomes humaines contre la toxicité induite par l'aminochrome, molécule induisant un certain nombre des mécanismes impliqués dans la pathogenèse de la MP.



**CHAPITRE I: REVUE DE  
LITTERATURE**

## I-1- Rappel sur le système nerveux

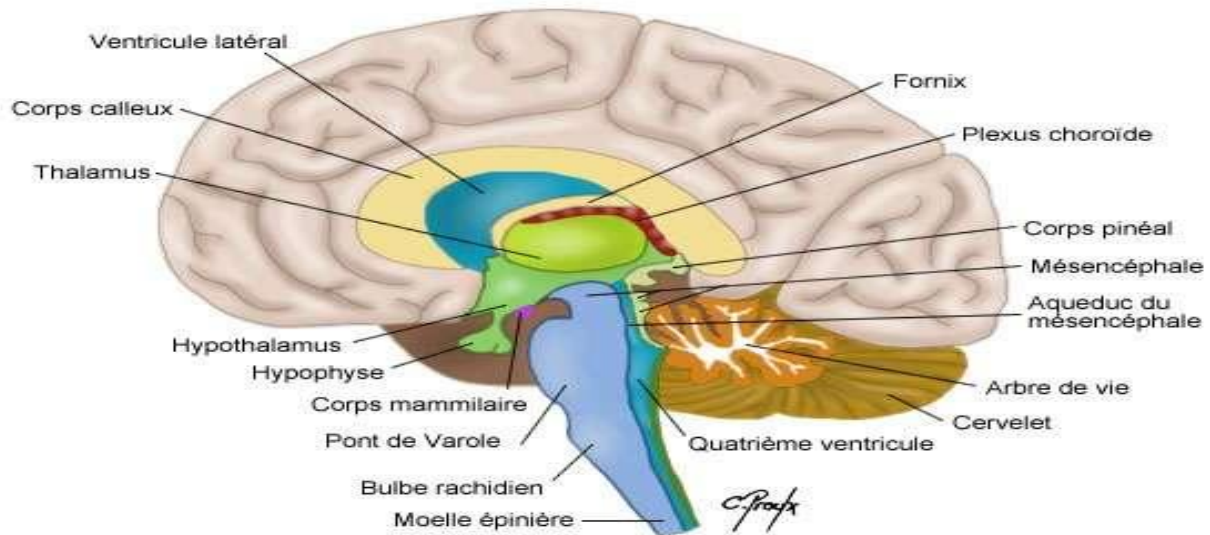
Le système nerveux (SN) est un ensemble de structures anatomiques caractéristique du règne animal impliqué dans la conduction, la transmission et le traitement des informations. Il est formé de deux grandes parties : le système nerveux périphérique (SNP) et le système nerveux central (SNC). Le SNP est formé de nerfs crâniens et de nerfs spinaux qui connectent l'encéphale et la moelle à tous les points de l'organisme. Quant au système nerveux central, Il est constitué de l'encéphale (cerveau, cervelet et tronc cérébrale) logé dans la boîte crânienne et la moelle épinière située dans le canal rachidien (figure 1).



**Figure 1: Organisation du système nerveux.** Image ENS Lyon

Le cerveau (voir figure 2) est l'organe du système nerveux central qui régule toutes les fonctions vitales. Il est constitué de deux grandes types de cellules : les neurones et les cellules gliales. Les cellules gliales étant 10 à 50 fois plus nombreuses que les neurones.





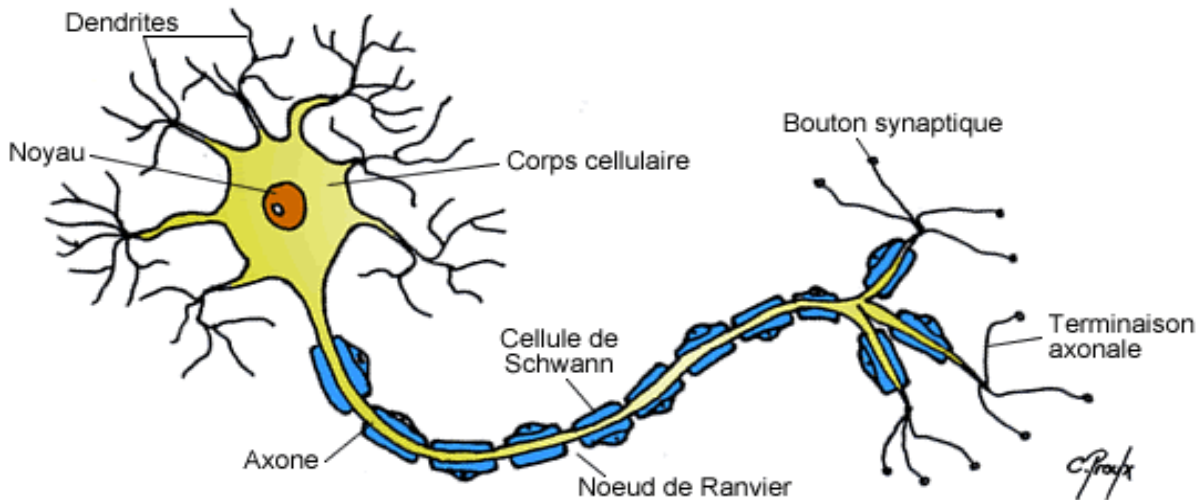
**Figure 2: Structure du cerveau humain.**

[www.cours-pharmacie.com/physiologie/systeme-nerveux.html](http://www.cours-pharmacie.com/physiologie/systeme-nerveux.html) Image Chantal Proulx

### **I-1-1- Les neurones**

Les neurones (ou cellules neuronales) sont les unités structurales du système nerveux. Ces cellules acheminent les messages sous forme d'influx nerveux (Figure 3). Ce sont des cellules ammotiques pouvant vivre et fonctionner de manière optimale pendant toute une vie (100 ans) lorsqu'ils reçoivent une bonne nutrition. Les neurones ont une vitesse de métabolisme exceptionnellement élevée. Ils peuvent avoir les structures fonctionnelles réceptrices, conductrices (qui engendrent et transmettent le potentiel d'action) et sécrétrice (libérant les neurotransmetteurs). Les neurones sont la brique élémentaire du système nerveux. Ils sont responsables du maintien des fonctions vitales de l'organisme comme la respiration, le rythme cardiaque, le rythme veille/sommeil, mais aussi des fonctions supérieures telles que le langage, l'apprentissage, la prise de décision, la motricité, les sens, etc. Chacune de ces fonctions est régie par un ensemble spécifique de neurones. Chaque cellule est équipée pour recevoir l'information (par ses dendrites), l'intégrer (dans le corps cellulaire) et la transmettre (par son axone). Délimité par une membrane, le neurone est constitué par un corps cellulaire d'où partent des prolongements de deux types : les dendrites (conduisent l'influx nerveux vers le corps cellulaire) et l'axone (conduit l'influx nerveux à partir du corps cellulaire jusqu'à ses cibles). Certaines sont entourées par une gaine de myéline qui les isole électriquement et augmente considérablement la vitesse de propagation de l'influx nerveux (Marieb, 1999). Cet influx est transmis par l'intermédiaire

des synapses et se fait dans une seule direction par l'intermédiaire de deux classes de neurotransmetteurs ou médiateurs chimiques : les amines biogènes et l'acétylcholine.

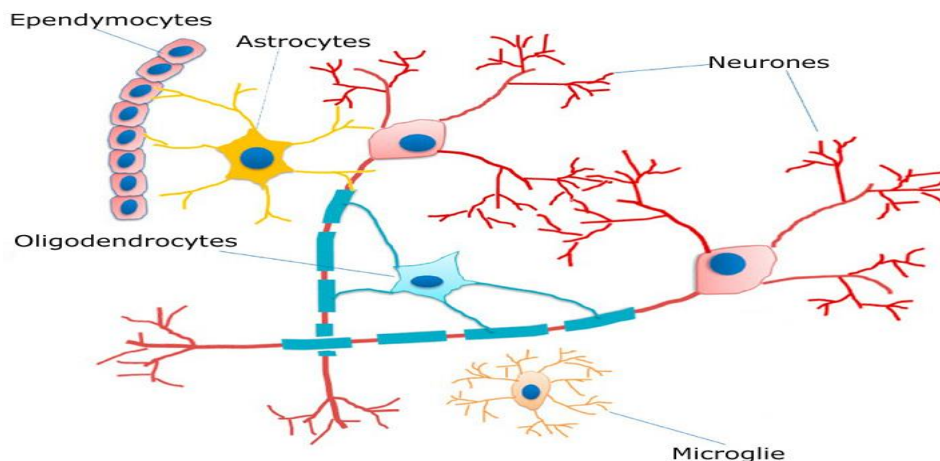


**Figure 3: Schéma illustrant la structure du neurone.**

[www.cours-pharmacie.com/physiologie/systeme-nerveux.html](http://www.cours-pharmacie.com/physiologie/systeme-nerveux.html). Image Chantal Proulx

### I-1-2- Les cellules gliales

Les cellules gliales constituent le tissu de soutien pour les neurones. Elles assurent le lien avec les vaisseaux sanguins et apportent les nutriments essentiels au fonctionnement métabolique du système nerveux. Contrairement aux cellules neuronales, les cellules gliales peuvent se multiplier. On distingue deux types de cellules gliales : les macroglies constituées des astrocytes et oligodendrocytes et les microglies qui sont les macrophages du cerveau.



**Figure 4: Schéma illustrant les cellules gliales et les neurones dans le SNC (Xiao *et al.*, 2014)**

### **I-1-2-1-les astrocytes**

Les astrocytes sont des cellules présentes dans le système nerveux, ayant pour rôle la protection de la myéline et des tissus nerveux, l'élimination des cellules mortes, la lutte contre des agents extérieurs, l'apport en nutriments et en oxygène. Elles permettent l'équilibre du système nerveux et favorisent la neurotransmission. Les astrocytes sont également actives lors d'une lésion de la moëlle épinière ou du cerveau. Elles sont indispensables au fonctionnement du système nerveux et à la survie des neurones. Ils les approvisionnent en nutriments et éliminent aussi les déchets issus du métabolisme (**Tremblay et al., 2019; Morales et al., 2014**). Les astrocytes possèdent une forme étoilée, dont les prolongements cytoplasmiques peuvent être courts mais très nombreux, ou au contraire longs et moins ramifiés. Les astrocytes ont principalement un rôle de soutien et de structure du système nerveux central. Mais ils ont également des rôles fonctionnels importants. Ils participent notamment à la gliose, phénomène de cicatrisation des lésions du système nerveux. Ils interviennent aussi au niveau des synapses pour capturer les neurotransmetteurs, ou au niveau des capillaires pour assurer la barrière hémato-encéphalique. Ils ont aussi un rôle de transport de molécules et d'approvisionnement des neurones en lactate (**Morales et al., 2014**).

### **I-1-2-2-Les microglies**

Les microglies, parties intégrantes du système immunitaire du cerveau sont des macrophages et assurent la défense contre les envahisseurs. Elles font partie d'un ensemble de cellules spécialisées dans le nettoyage des tissus par l'ingurgitation des déchets, leur destruction et leur élimination (**Morales et al., 2014**). Elles dérivent des monocytes (variété de globules blancs) du sang ayant pénétré dans le SNC. Les cellules microgliales sont, dans le SNC, les principales cellules présentatrices de l'antigène. Elles peuvent, lors de lésions du tissu nerveux, s'activer et se mettre à sécréter de nombreuses molécules servant à «faire le ménage», notamment des enzymes digérant les protéines.

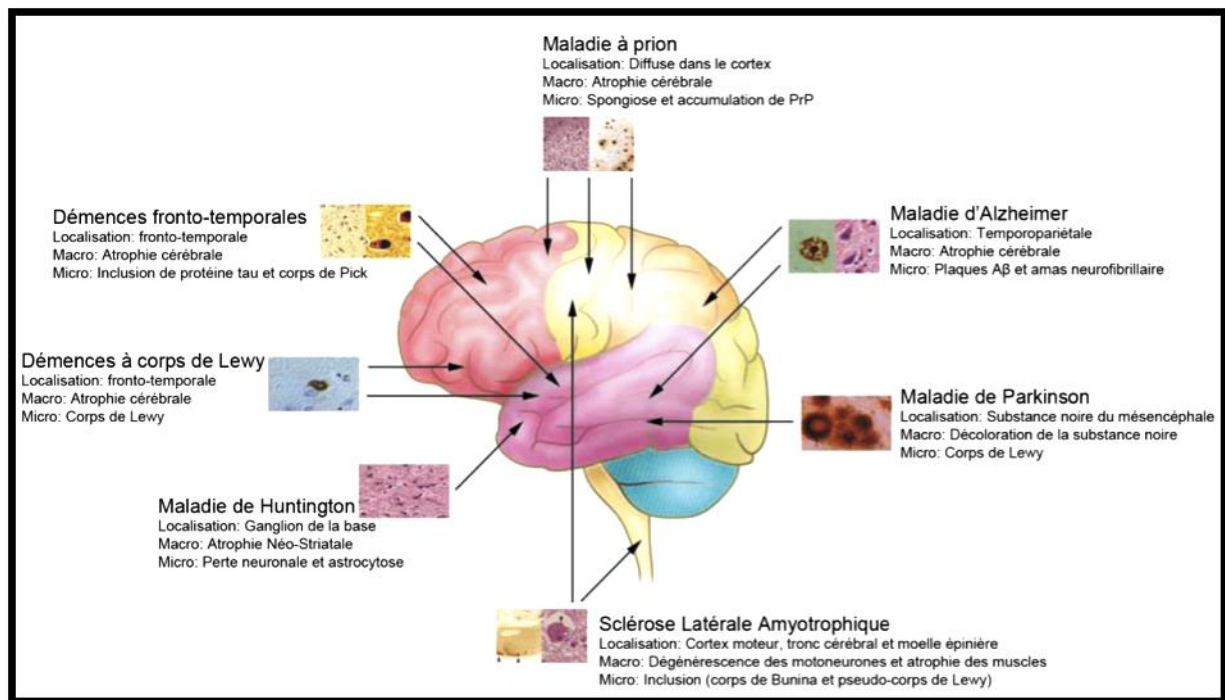
### **I-1-2-3-Les oligodendrocytes**

Les oligodendrocytes constituent la gaine de myéline qui entoure les axones. Cette gaine a pour fonction d'accélérer la conduction nerveuse. Ils possèdent un corps cellulaire de petit volume d'où partent quelques prolongements cytoplasmiques, plus fins et moins nombreux que ceux des astrocytes. Les oligodendrocytes de la substance grise (SG) sont souvent situés au niveau des corps cellulaires des neurones avec lesquels ils effectuent des échanges métaboliques. Les oligodendrocytes de la substance blanche (SB) élaborent la myéline du SNC.

## **I-2- Mécanismes communs aux maladies neurodégénératives**

### **I-2-1-Généralités sur les maladies neurodégénératives**

Les maladies neurodégénératives (MND) constituent un groupe de pathologies progressives qui affectent le cerveau ou le système nerveux entraînant ainsi la mort des neurones (**Kovacs, 2015**). La dégénérescence des neurones peut être diffuse ou limitée à certaines zones du système nerveux (figure 5) suggérant la diversité des symptômes observés : troubles de la motricité, de l'équilibre, du comportement, de la cognition et suggérant des mécanismes physiopathologiques spécifiques ou communs à plusieurs maladies. Parmi les maladies neurodégénératives les plus connues, on a : la maladie d'Alzheimer (MA); la maladie de Parkinson (MP); la sclérose en plaque; la maladie de Huntington (MH); la sclérose latérale amyotrophique (SLA); la maladie de Creutzfeld-Jacob...etc (**Thibaut, 2017**). Si certaines de ces maladies atteignent les adolescents, la plupart se rencontrent chez les personnes âgées (65 ans et plus). La classification des MND reste très difficile de par leur grande hétérogénéité, cependant on a deux catégories: les pathologies provoquant des démences séniles et/ou des troubles moteurs comme les maladies d'Alzheimer, de Parkinson ou encore la chorée de Huntington et les maladies neurologiques entraînant des paralysies comme la sclérose latérale amyotrophique ou la sclérose en plaques (**Dugger and Dickson, 2017**). Les représentants les plus connus sont la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et la maladie de Charcot ou sclérose latérale amyotrophique (SLA) ainsi que la chorée de Huntington. Ces exemples font partie d'une liste de plus d'une centaine de maladies (**Thibaut, 2017**). Les maladies neurodégénératives ont plusieurs caractéristiques, mais une des caractéristiques communes est l'accumulation dans le tissu nerveux d'agrégats intra- ou extracellulaires de protéines mal conformées (dépôts amyloïdes), responsables directement ou indirectement de la mort neuronale (Figure 6). Le tableau I donne un récapitulatif des différentes maladies neurodégénératives, les zones affectées ainsi que les différents symptômes observés au cours de ces maladies.



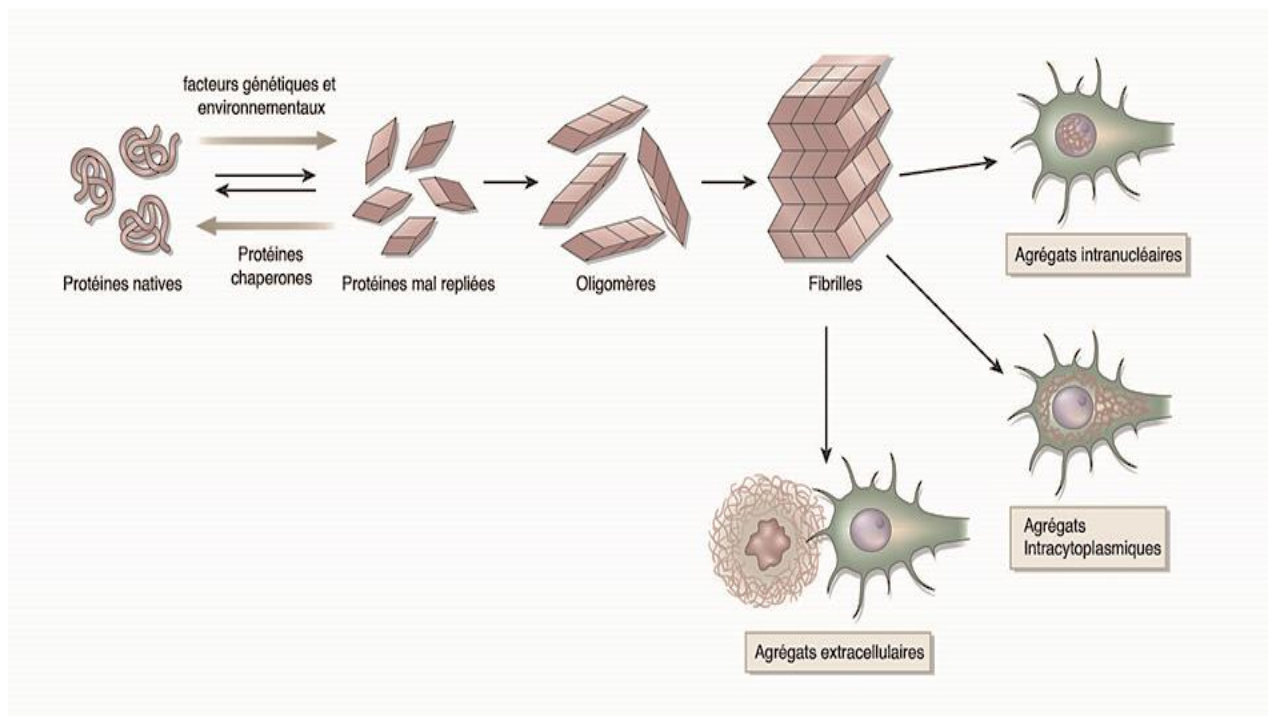
**Figure 5 : Exemples de maladies neurodégénératives et les zones du système nerveux qu'elles affectent. Macro: Observation macroscopique–Micro: Observation microscopique. Adapté de: Bertram and Tanzi, 2005.**

**Tableau I : Quelques maladies neurodégénératives, zones affectées et différents symptômes (Thibaut, 2017)**

Maladie	Zones du système nerveux affectées	Symptômes
Maladie d'Alzheimer	Cortex, hippocampe, tronc cérébral	Trouble de la mémoire, altérations des pensées, du jugement, du jugement, changements comportementaux.
Maladie de Parkinson	Substance noire, cortex	Tremblements des membres au repos, ralentissement de la vitesse d'exécution des gestes, diminution de la mobilité spontanée, raideur musculaire
Maladie de Charcot ou Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA)	Cortex moteur, Moelle épinière	Paralysie progressive des muscles, atrophie musculaire, spasticité, trouble de la respiration et de la déglutition
Maladie d'Huntington	Striatum et autres ganglions de base	Troubles moteurs (chorée), difficulté respiratoire, trouble de la parole et de la déglutition
Maladie de Creutzfeld-Jacob	Système nerveux entier	Trouble de la mémoire, saut d'humeur, Changement du comportement, problèmes d'équilibre, gestes maladroits, problème de vision, problèmes musculaires

## I-2-2-Formation d'agrégats protéiques

Le cerveau de la plupart des patients décédés de maladies neurodégénératives contient des dépôts de protéines anormales que les anatomistes nomment plaques ou agrégats amyloïdes. Ces plaques sont formées de fibrilles de protéines nommées fibres amyloïdes (Figure 6). Dans chaque maladie neurodégénérative, une protéine spécifique, devenue anormale, s'agglutine en fibres amyloïdes (Tableau II) (Sweeney *et al.*, 2017). Après leur synthèse, les protéines acquièrent une forme native spécifique en trois dimensions qui leur permet d'exercer leurs actions biologiques. Il arrive que sous certaines contraintes, des protéines présentent une forme anormale à cause d'un mauvais repliement ((Thibaut, 2017; Soto and Pritzkow, 2018). Dans des conditions physiologiques, ces protéines mal repliées sont soit corrigées par des protéines chaperonnes, soit dégradées et éliminées par le système ubiquitine-protéasome ou par le système phagosome-lysosome (autophagie). Ces protéines normalement solubles vont alors s'agréger entre elles pour constituer des oligomères qui vont eux-mêmes s'agréger formant ainsi des fibrilles qui sont insolubles. Ces dernières vont alors former des inclusions intranucléaires ou intracytoplasmiques et peuvent également constituer des agrégats extracellulaires qu'on appelle alors plaques (Sweeney *et al.*, 2017).



**Figure 6: Mécanisme d'accumulation des protéines anormales dans le tissu nerveux (Thibaut, 2017)**

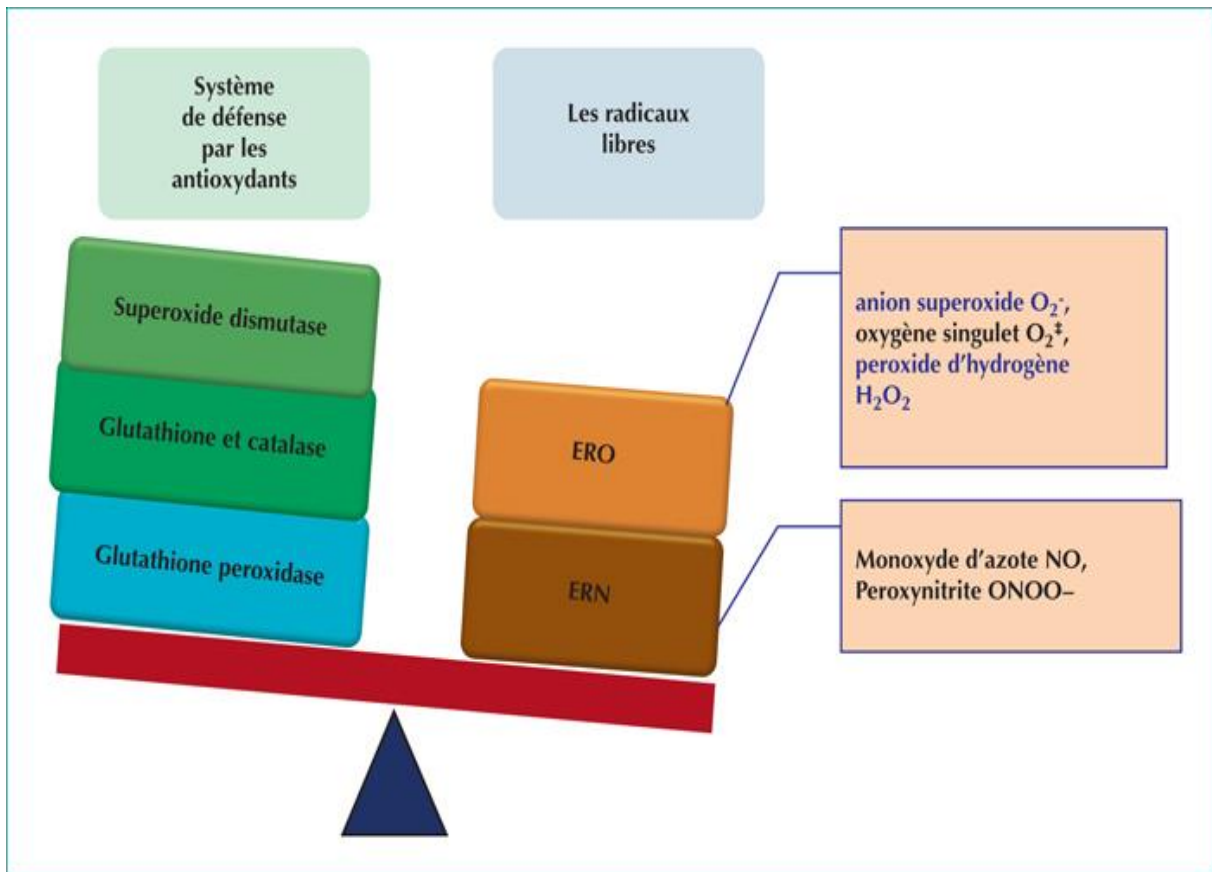
**Tableau II : Maladies neurodégénératives associées avec les protéines anormales (Sweeney et al., 2017).**

Maladie	Protéine agrégée
Maladie d'Alzheimer	Peptide $\beta$
Maladie de Parkinson	$\alpha$ -synucléine
Maladie de Huntington	Hungtintine avec molécules de polyglutamine
Sclérose Latérale Amyotrophique	Superoxyde dismutase 1

### **I-2-3- Le stress oxydant**

Le stress oxydant est un déséquilibre entre la production des espèces réactives de l'oxygène (EROs) et les capacités antioxydantes de l'organisme en faveur de la production des EROs (figure 7) (Negi et al., 2011). Ce déséquilibre peut avoir diverses origines, telle que l'exposition aux radiations ionisantes, la pollution, la consommation du tabac et d'alcool, la prise de certains médicaments et tout processus susceptible de surcharger les réactions de détoxification hépatiques, notamment une perte de poids importante. Le stress oxydant est connu pour être le principal processus pathologique impliqué dans de nombreuses maladies neurodégénératives en raison de la grande sensibilité de celui-ci aux dommages provoqués par les radicaux libres. Le cerveau est l'un des organes les plus susceptibles à l'attaque des radicaux libres (Bhat et al., 2015). En effet, il possède une activité métabolique plus élevée, une plus forte quantité des acides gras polyinsaturés susceptibles aux attaques des radicaux libres, un fort taux d'oxydation neurochimique et d'auto-oxydation de certaines catécholamines, une forte quantité de fer responsable de la production des radicaux libres à travers la réaction de Fenton et il possède un taux plus faible d'enzymes détoxificateurs comme la catalase (Cat), la glutathione peroxydase (GPx) et la superoxyde dismutase (SOD) (Bhat et al., 2015). Tous ces facteurs font en sorte d'accentuer les dommages causés par les radicaux libres.





**Figure 7: Mécanismes provoquant un stress oxydant au sein d'une cellule (Belaïch *et al.*, 2015)**

### **I-2-3-1- les radicaux libres**

Les radicaux libres sont des composés extrêmement instables qui réagissent avec les molécules stables pour appairer son électron. Du à la présence d'un électron célibataire sur un atome d'oxygène ou d'azote, les radicaux libres sont communément dénommés « espèces réactives de l'oxygène (ERO ou ROS) ou de l'azote (ERN ou RNS) ». Le tableau II ci-dessous donne un aperçu des différentes espèces réactives et leurs propriétés.



**Tableau III: Différents espèces réactives et leurs propriétés**

Espèces réactives	Propriétés
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> anion Superoxyde	Produit par la chaîne de transport d'électrons et d'autres sites. Ne peut pas diffuser du site d'origine. Génère les ROS
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Peroxyde d'hydrogène	N'est pas un radical libre, mais peut en générer en réagissant avec des métaux de transition, peut diffuser à travers les membranes
<sup>•</sup> OH Radical Hydroxyles	L'espèce la plus réactive dans l'attaque des molécules biologiques, produit à partir de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> dans la réaction de fenton en présence de Fe <sup>2+</sup> or Cu <sup>2+</sup> .
RO <sup>•</sup> , R <sup>•</sup> , R-S <sup>•</sup> Radicaux organiques	Radical organique libre (R correspond au substituant) Produit à partir de ROH, RH (e.g. au carbone d'une double liaison dans un acide gras) ou de RSH par une attaque de <sup>•</sup> OH
RCOO <sup>•</sup> Radical peroxyde	Un radical organique peroxyde, produit durant la dégradation lipidique (nommé aussi LOO <sup>•</sup> )
<sup>1</sup> O <sub>2</sub> oxygène Singulet	Oxygène avec des spins antiparallèles. Produit à des pressions importantes en oxygène sous l'effet de l'absorption des rayons UV. Il disparaît trop vite pour être toxique in vivo
NO Nitrique oxyde	RNOS. Un radical libre endogène produit par l'oxyde nitrique synthétase. Se lie aux ions métalliques, se combine avec O <sub>2</sub> ou aux autres radicaux contenant l'oxygène pour produire RNOS
ONOO <sup>-</sup> Peroxynitrite	RNOS. Un agent oxydant puissant qui n'est pas un radical libre. Il peut générer NO <sub>2</sub> (dioxyde de nitrogène), qui est un radical.
HOCl acide Hypochloreux	Produit dans les neutrophiles durant le sursaut respiratoire pour détruire les organismes invasifs. La toxicité s'effectue à travers des réactions d'halogénations et d'oxydations. L'espèce réactive est OCl

### I-2-3-2- Les conséquences du stress oxydant

Le principal danger des radicaux libres vient des dommages qu'ils peuvent provoquer lorsqu'ils réagissent avec des composants cellulaires importants tels que l'ADN, les lipides (peroxydation), les protéines ... etc. Cette oxydation provoque des dommages sur tout l'organisme, accélérant le vieillissement et la dégradation des cellules et des tissus (**Favier,**

2003; 1997). Toutes les biomolécules (protéines, lipides et ADN) sont les cibles potentielles des EROs. En ce qui concerne les acides gras polyinsaturés (AGPI) particulièrement, leur oxydation conduit à la formation des produits réactifs tels que l'acide thiobarbiturique dont le malondialdéhyde (MDA).

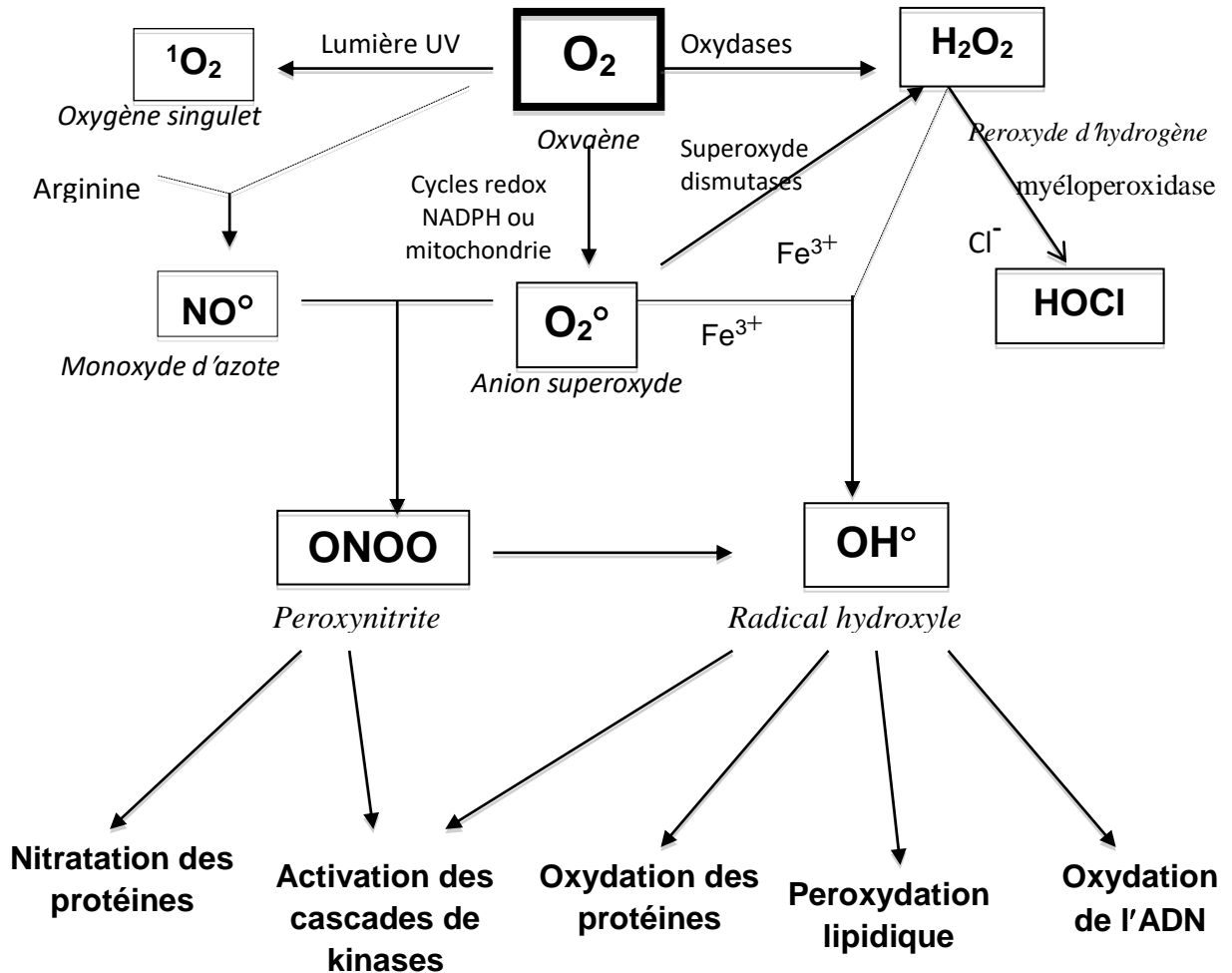
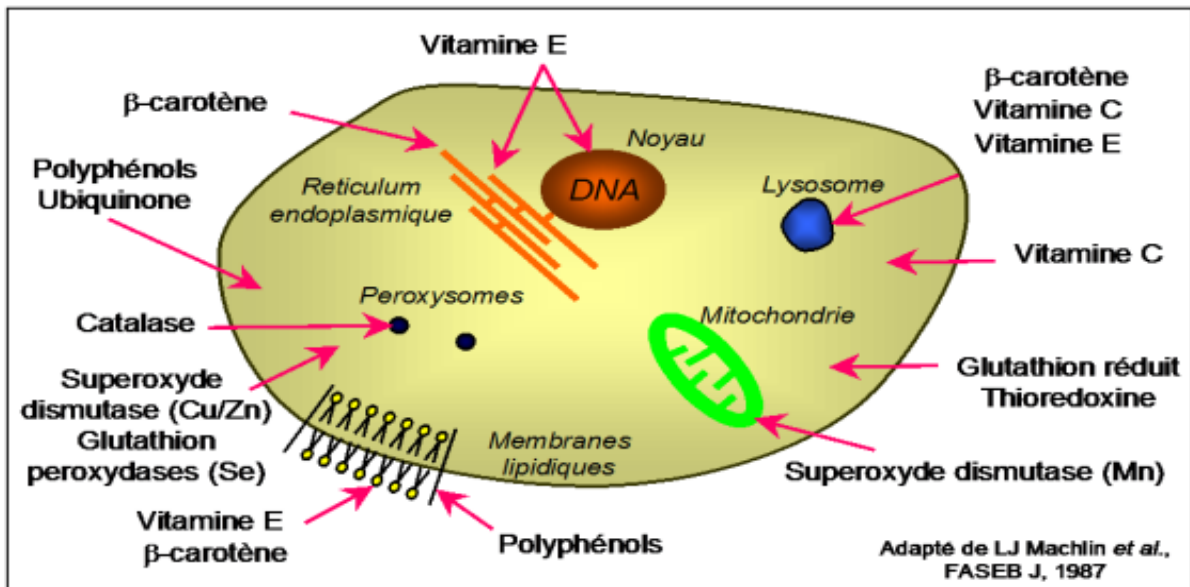


Figure 8: Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie (Favier, 2003)

### I-2-3-3- Les défenses antioxydantes

Pour se protéger des effets délétères des EROs, la cellule dispose d'un système complexe de défenses antioxydants (Figure 9). Deux sources d'antioxydants sont utilisées : une source exogène ou non-enzymatique et une source endogène ou enzymatique. Les antioxydants non-enzymatiques (apportée par l'alimentation) telles que vitamines C, E, caroténoïdes, ubiquinone, flavonoïdes, glutathion ou acide lipoïque ; tandis que les antioxydants enzymatiques telles que superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase sont localisés dans différents compartiments cellulaires (Machlin and Bendich, 1987).



**Figure 9 : Repartition des principales défenses antioxydantes dans les cellules adapté par (Machlin and Bendich, 1987)**

### I-2-3-3-1- Antioxydants non enzymatiques

- La vitamine E ( $\alpha$ -tocophérol) est l'antioxydant liposoluble qui a la plus grande concentration molaire cellulaire. Elle se fixe à la membrane cellulaire et inhibe la chaîne de réactions de peroxydation des lipides en capturant un radical lipidique peroxyde ( $LOO^\circ$ ). Elle devient à son tour un radical moins actif que le  $LOO^\circ$  et pourra alors être pris en charge par une autre molécule antioxydante (Evans, 2000; Machlin and Bendich, 1987)..

- - La vitamine C (acide ascorbique) est une vitamine hydrosoluble, qui se trouve dans le cytosol et dans le fluide extracellulaire. Elle est un donneur d'atome d'hydrogène qui réagit avec les radicaux libres  $O_2^{\circ-}$  et  $l'OH^\circ$  pour les transformer en molécules non toxiques (Evans, 2000; Machlin and Bendich, 1987). Elle peut aussi réduire le radical  $\alpha$ -tocophérol et ainsi permettre une meilleure efficacité de la vitamine E.

- Les caroténoïdes ( $\beta$ -Carotène) sont très nombreux et représentent la principale source alimentaire de rétinol. En plus de leur activité de provitamine A, les caroténoïdes sont capables d'inactiver l'oxygène singulet et les radicaux libres en neutralisant l'électron non apparié, les transformant ainsi en molécules ou ions stables. (Birben et al., 2012)

- Les flavonoïdes sont des substances naturelles issues des plantes, présentes dans tout le règne végétal. Ce sont des pigments responsables de la coloration des fleurs, des fruits et des feuilles. Les flavonoïdes peuvent agir de différentes façons dans les processus de régulation du stress oxydant : par capture directe des espèces réactives de l'oxygène, par chélation de métaux de transition comme le fer (empêchant ainsi la réaction de Fenton) ou par

inhibition de l'activité de certaines enzymes responsables de la production des EROs comme la xanthine oxydase (**Adwas et al., 2019**).

-Le glutathion réduit (GSH) est une petite protéine composée de trois acides aminés:la cystéine, l'acide glutamique et la glycine. Il peut agir directement avec les radicaux libres mais il est essentiellement utilisé comme substrat par les glutathion peroxydases (GP<sub>X</sub>) pour l'élimination des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Lors d'un stress oxydant, le taux de GSH est généralement diminuée. Pour cela, il est important d'évaluer le glutathion oxydé (GSSG) et le rapport glutathion réduit/glutathion oxydé (GSH/GSSG) est souvent utilisé comme un marqueur du stress oxydant (**Birben et al., 2012**). En effet, plus le flux d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est important, plus le glutathion réduit est consommé et le glutathion oxydé augmenté.

#### **I-2-3-3-2- Antioxydants enzymatiques**

- La superoxyde dismutase (EC 1.15.1.11) (SOD) existe sous trois formes qui se différencient par leur localisation cellulaire et par leur cofacteur métallique : une forme cytosolique et nucléaire associée aux ions cuivre et zinc (Cu/Zn-SOD), une forme mitochondriale associée au manganèse (Mn-SOD) et une forme extracellulaire (EC-SOD). La superoxyde dismutase catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**Adwas et al., 2019**).

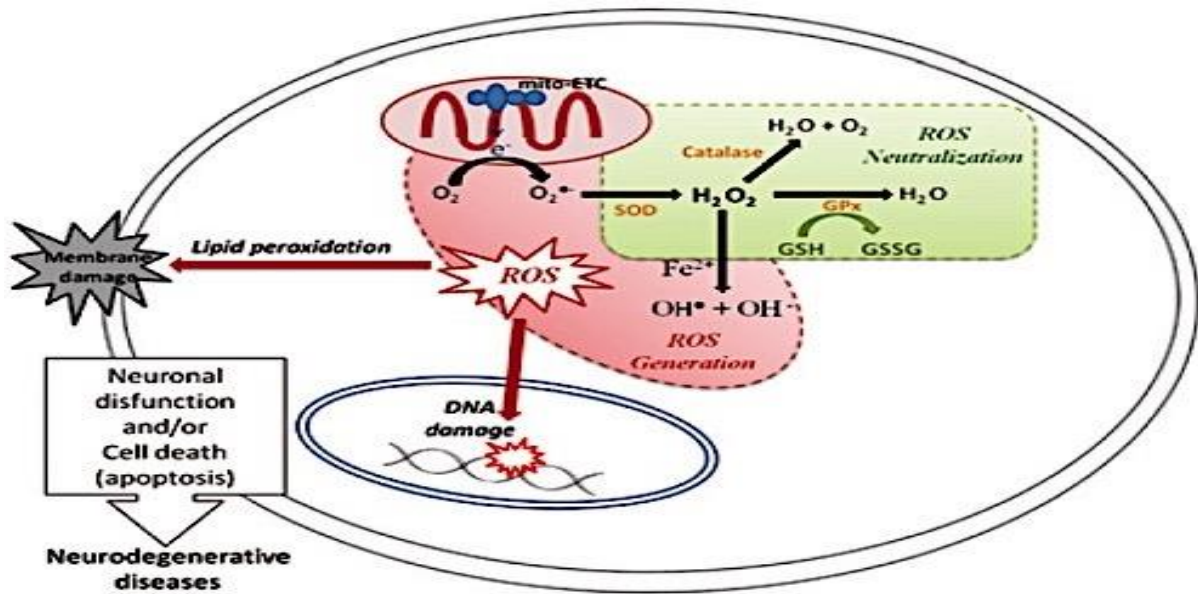
- La Catalase (EC 1.11.1.6) (CAT) est une enzyme capable de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire. La réaction catalysée par cette enzyme consiste en une dismutation du peroxyde d'hydrogène (**Adwas et al., 2019**). La catalase est composée de quatre sous-unités protéiques, chacune contenant un groupement hémique avec Fe<sup>3+</sup> lié au site actif. Chaque molécule a habituellement une molécule de NADPH, H<sup>+</sup> qui lui est liée, la protégeant ainsi d'une éventuelle inactivation par le peroxyde d'hydrogène (**Bonnefont-Rousselot, 2007**).

- Le système du glutathion comprend les glutathion S-transférases, les glutathion peroxydases et la glutathion réductase. Les glutathion S-transférases sont une autre classe d'antioxydants enzymatiques qui catalysent la dégradation des peroxydes lipidiques. La glutathion peroxydase présente une activité élevée avec le peroxyde d'hydrogène et les hydroperoxydes organiques. Ces enzymes aident au mécanisme de détoxification (**Adwas et al., 2019**). La glutathion peroxydase (EC 1.11.1.9) (GP<sub>X</sub>) agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O et O<sub>2</sub>. Lors de cette réaction les deux molécules de glutathion réduit (GSH) sont oxydées en glutathion disulfure (GSSG).

Le glutathion disulfure (GSSG) ainsi produit est à nouveau réduit par la glutathion réductase (GR) utilisant le NADPH comme donneur d'électron (Figure 10).

#### **I-2-3-4- Implication du stress oxydant dans les maladies neurodégénératives<sup>2</sup>**

Le stress oxydatif joue un rôle crucial dans la pathogenèse de nombreuses maladies, notamment les maladies neurodégénératives telles que la MA et la MP (Liu *et al.*, 2017; Chen and Zhang, 2014; Diana Gallego *et al.*, 2011; Hwang, 2013; Kausar *et al.*, 2018). Alors que de nombreux neurones cérébraux peuvent faire face à une augmentation du stress oxydatif, certaines d'entre eux sont vulnérables à l'augmentation du stress oxydatif et ce phénomène est appelé vulnérabilité neuronale sélective (Chen *et al.*, 2012). Cette vulnérabilité neuronale sélective fait référence à la sensibilité différentielle des neurones du SNC aux stress provoquant des lésions ou la mort des cellules et conduisent à la neurodégénérescence. Par exemple, les neurones du cortex entorhinal, de l'hippocampe, du cortex frontal et de l'amygdale sont les populations de neurones les plus sensibles à la neurodégénérescence associée à la MA. Les neurones dopaminergiques de la substantia nigra sont les principaux neurones subissant la mort cellulaire dans la MP (Dias *et al.*, 2013). Par contre, les motoneurones spinaux, les neurones corticaux et du tronc cérébral sont celles touchées dans la sclérose latérale amyotrophique (Chen *et al.*, 2012). Le stress oxydant se manifeste par l'oxydation des protéines et la peroxydation de lipides conduisant à une altération structurale et fonctionnelle des tissus neuronaux (Kausar *et al.*, 2018) et constitue une étape précoce dans le développement de ces maladies (figure 10). Les EORs contribuent au mauvais repliement des protéines, à l'activation des cellules gliales, au dysfonctionnement mitochondrial et à l'apoptose cellulaire subséquente, tous ces mécanismes engendrent une neurodégénération. Par exemple, les EORs causent une apoptose mitochondriale à travers plusieurs voies à savoir la stimulation du pore de transition de perméabilité mitochondriale (PTP), l'activation de la voie de p38, MAP (Mitogen Activated Protein) kinases et l'induction du stress du reticulum endoplasmique conduisant à la libération du cytochrome c et puis une apoptose (Yuste *et al.*, 2015). Dans la MP, le métabolisme de la dopamine produit des molécules reconnues comme source endogène toxique provoquant un stress oxydant sur les cellules avoisinantes (Sutachan *et al.*, 2012). Quant à la MA, la production et l'agrégation des amyloïdes  $\beta$ , la polymérisation et phosphorylation de la protéine Tau sont accélérées par la présence des radicaux libres (Manoharan *et al.*, 2016).



**Figure 10: Génération des EROs, neutralisation dans les cellules neuronales et leur rôle dans les maladies neurodégénératives (Othman and Yabe, 2015).**

ROS: Reactive Oxygen Species, mito-ETC: mitochondrial electron transport chain, SOD: superoxide dismutase, GPx: Glutathione peroxidase, GSH: Glutathion réduit, GSSG: Glutathion oxyde.

#### I-2-4- La neurotransmission

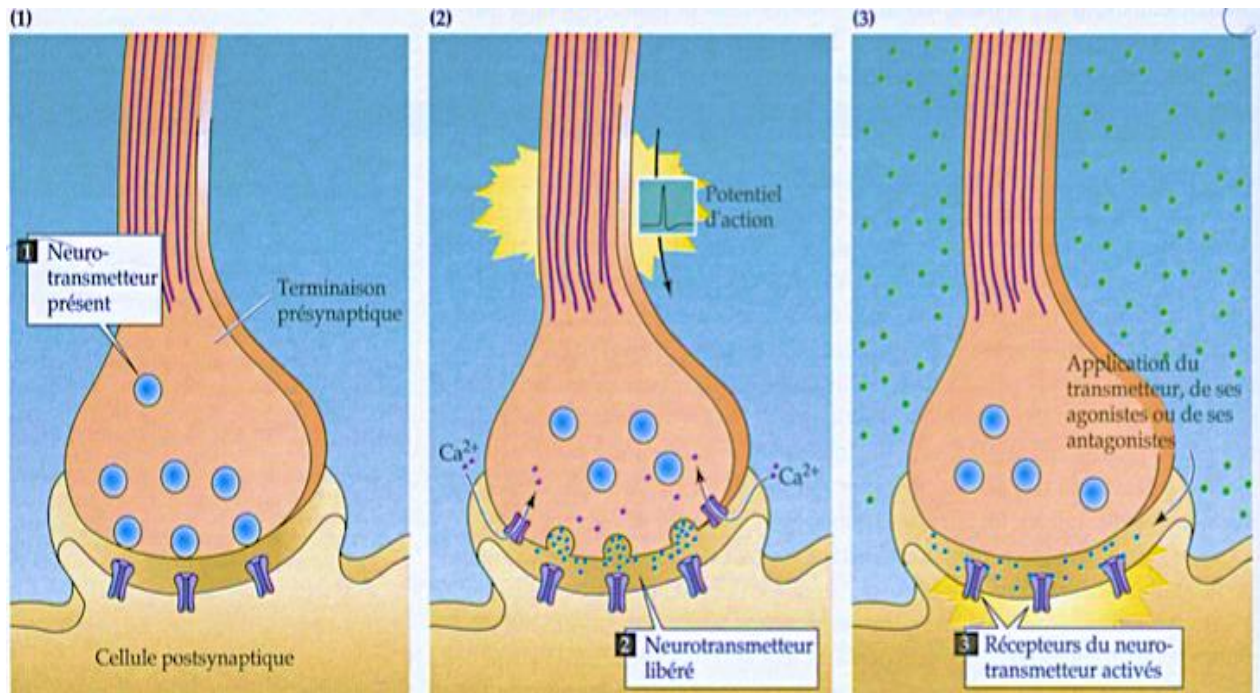
Les maladies neurodégénératives sont souvent accompagnées d'une perturbation de la neurotransmission. L'altération des différentes voies de neurotransmission contribuent ainsi à la modification ou l'arrêt de l'influx nerveux dans certaines régions de cerveau. L'influx nerveux est un phénomène de nature électrique qui se déroule d'un neurone à l'autre grâce à une articulation appelée « synapse ». La majorité de ces points de liaison entre neurones sont situés :

- Entre l'extrémité d'un axone (corpuscule nerveux terminal) et les dendrites d'un autre neurone ;
- Entre l'extrémité d'un axone et le corps cellulaire d'un autre neurone.

Le mécanisme de transmission de l'influx nerveux se déroule en plusieurs étapes (Figure 11), on a d'abord la propagation du signal électrique jusqu'à l'extrémité de l'axone, ensuite grâce à ce signal appelé potentiel d'action les neurotransmetteurs contenus dans les vésicules sont libérés dans la fente synaptique où ils vont se fixer sur des récepteurs membranaires spécifiques situés sur les neurones post-synaptiques. Enfin suite à la fixation de ces neurotransmetteurs, un autre influx nerveux va se déclencher et ainsi de suite jusqu'à la destination finale.



Les neurotransmetteurs sont des substances chimiques libérées par les cellules nerveuses et qui permettent de transmettre l'information de l'influx nerveux d'un nerf à l'autre (à travers une synapse) ou d'un nerf à un muscle ou un organe( **Saikia et al., 2018**). Ils sont synthétisés dans les neurones pré-synaptiques grâce à certaines enzymes puis stockés dans les vésicules qui se trouvent au niveau des terminaisons nerveuses. Les neurotransmetteurs libérés au cours de l'influx nerveux dans la fente synaptique sont éliminés soit par recapture du neurone ou par dégradation par une enzyme.



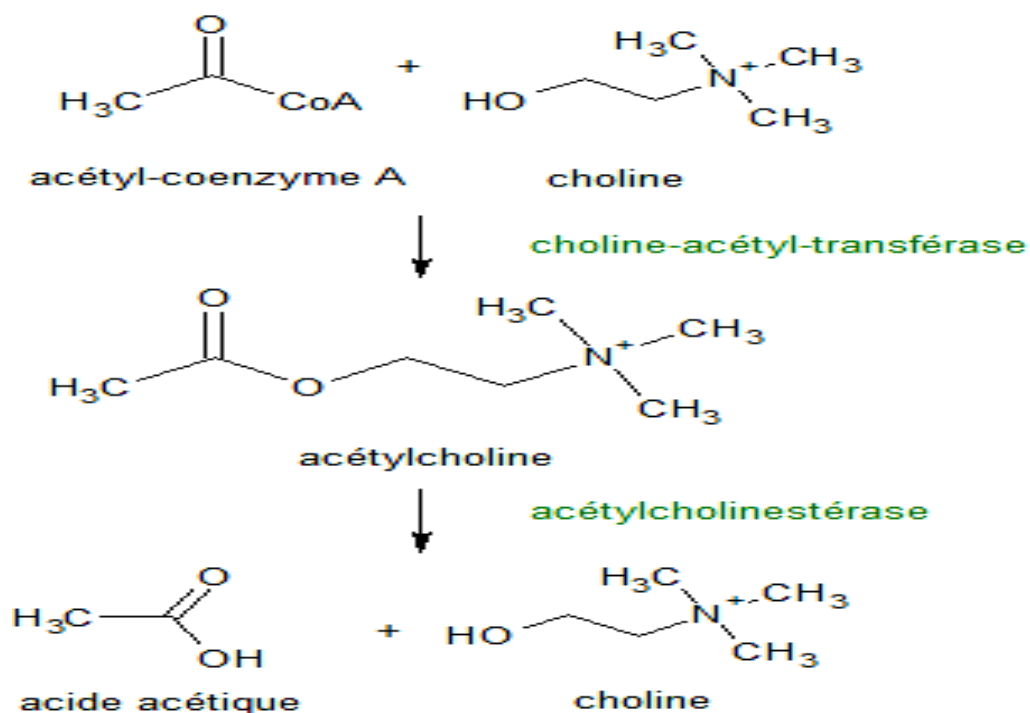
**Figure 11: Les différentes étapes de la transmission nerveuse. D'après: Purves et al., Neuroscience, 2nd edition.**

#### I-2-4-1- Exemples de quelques neurotransmetteurs et leurs fonctions

##### I-2-4-1-1- L'acétylcholine

Découvert en 1920, l'acétylcholine (ACh) est un neurotransmetteur excitateur libéré dans l'espace inter synaptique. Dans le système nerveux central, il est impliqué dans l'éveil, l'attention, la colère, l'agression, la sexualité et la soif. L'acétylcholine commande la capacité à retenir une information, la stocker et la retrouver au moment nécessaire. Lorsque le système qui utilise l'acétylcholine est perturbé, apparaissent des troubles de la mémoire, voire dans les cas extrêmes des formes de démence sénile (**Tata et al., 2014**). Son taux est régulé par deux enzymes : La choline acétyl-tranférase (ChAT) et l'acétylcholinestérase (AChE). Elle est synthétisée à partir de la choline par la ChAT et hydrolysée par l'AChE localisée dans la membrane post-synaptique. L'acétylcholinestérase (EC 3.1.1.7) entraîne la dégradation de l'acétylcholine, en coupant la molécule en deux parties (Figure 12) et interrompant la

transmission du flux nerveux. Ce processus est appelé clivage enzymatique. Il existe deux récepteurs de l'acétylcholine, tous deux présents dans le cortex : le récepteur nicotinique, donc l'antagoniste est la nicotine et le récepteur muscarinique sensible à la muscarine. Le récepteur nicotinique est un récepteur canal qui laisse passer les ions sodium quand il est activé. En revanche, le récepteur muscarinique est un récepteur de type métabotropique, ce qui signifie qu'il ne va pas ouvrir un canal ionique, mais synthétiser une molécule qui va avoir un effet sur le fonctionnement du neurone. Ce genre de récepteur est plus impliqué dans les phénomènes de régulation à moyen et long terme que dans la transmission du potentiel d'action (Kandimalla and Reddy, 2017).



**Figure 12: Métabolisme de l'acétylcholine (wikivisually.com)**

#### I-2-4-1-2- Le glutamate

Le glutamate est le principal neurotransmetteur exciteur du cerveau. Il joue un rôle fondamental dans l'établissement des connexions inter-neuronales responsables de l'apprentissage et de la mémorisation à long terme. Le glutamate est l'un des neurotransmetteurs les plus utilisés dans le cerveau puisque plus du tiers des neurones y font appel (Ezza and Khadrawy, 2014). Les neurones l'utilisent tel quel ou par l'un de ses métabolites, l'acide gamma aminobutyrique (GABA). Il existe trois types de récepteurs post synaptique : le récepteur AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxalepropionate), le récepteur NMDA (N-Methyl-D-Aspartate) et le récepteur kaïnate, ainsi nommés en raison des molécules pharmacologiques capables de les activer sélectivement en l'absence de glutamate.



Les deux premiers sont impliqués dans les phénomènes de mémorisation mais le rôle du troisième est moins bien compris. Leurs effets sont tous excitateurs sur les éléments post synaptiques, ce qui signifie qu'ils vont favoriser l'émission d'un potentiel d'action par le neurone cible. Ces récepteurs sont la cible de certaines drogues qui vont les activer en continu, ce qui va provoquer des hallucinations, et pour le NMDA, de par la cytotoxicité du calcium, une mort du neurone par apoptose (**Lewerenz and Maher, 2015**).

#### **I-2-4-1-3- La dopamine**

La dopamine (DA) est un neurotransmetteur synthétisé à partir de l'acide aminé tyrosine, puis absorbé dans le cerveau via un mécanisme de transport actif. La voie de biosynthèse de la dopamine conduit à la production d'un certain nombre de monoamines de catéchol, telles que l'épinéphrine et la noradrénaline. Ces produits jouent des rôles importants dans de nombreuses fonctions cérébrales, notamment l'attention, la mémoire et la cognition. Par conséquent, des déficits de synthèse de la catécholamine peuvent entraîner plusieurs processus délétères, tels que l'hypertension, la dépression et la dystonie. Elle est importante pour la coordination des mouvements ainsi que pour d'autres fonctions biologiques (**Saikia et al., 2018**)

#### **I-2-4-2- Implications du déficit de la neurotransmission dans les maladies neurodégénératives.**

Nombreuses études ont montré qu'un dysfonctionnement des neurotransmetteurs au niveau des terminaisons nerveuses contribuerait à la perte neuronale. L'ACh joue un rôle important dans la MA : en fait, la mort des neurones entraîne une baisse du niveau d'acétylcholine libéré par les terminaisons nerveuses cholinergiques (**Ferreira-Vieira et al., 2016**). La petite quantité d'acétylcholine présente au niveau des synapses est rapidement hydrolysée par l'acétylcholinestérase lié à une accumulation de cette enzyme, et également l'activité de l'enzyme de synthèse de l'acétylcholine est basse (**Ferreira-Vieira et al., 2016**), ce qui entraîne la perte progressive des terminaisons nerveuses qui deviennent incapables de transmettre l'influx nerveux au niveau synaptique. En effet, lors de la progression de la maladie, l'activité de l'acétylcholine estérase diminue, entraînant une augmentation du taux d'acétylcholine, mais il existe une autre enzyme de la même famille, la butyrylcholine estérase (BuChE), qui reconnaît également l'acétylcholine comme substrat et dont l'activité augmente au cours de la maladie (**Xu et al., 2012**). Plusieurs études neuropathologiques ont révélé l'implication de la neurotransmission cholinergique dans la MP, même en l'absence de démence (**Pagano et al., 2015**). Un dysfonctionnement du système cholinergique du cerveau antérieur basal dans la MP a été décrit et il s'accompagne d'une perte constante de marqueurs

cholinergiques présynaptiques dans le cortex, parfois accompagné d'une perte de sites de liaison des récepteurs muscariniques et nicotiques, tandis que l'activité de la ChAT est réduite dans les parties compactes de la substance noire, hippocampe et surtout dans le néocortex (**Tata et al., 2014**). D'autre part l'implication des récepteurs nAChRs a été démontrée, vu que la nicotine, l'agoniste majeure de ces récepteurs, protège contre la dégénérescence dopaminergique dans différents modèles de la MP. La MP est liée à ce neurotransmetteur à cause d'un manque de dopamine dans les zones motrices, causant des tremblements incontrôlables (**Xu et al., 2012**). Lors de la MA ou PD, des dysfonctionnements du métabolisme énergétique et des systèmes de transport du glutamate, conduisent à l'accumulation de ce neurotransmetteur dans les synapses. Or le glutamate endogène induit un effet neurotoxique (appelé excitotoxicité) via l'activation excessive des récepteurs qui lui sont associés, en particulier les récepteurs du NMDA (N-Méthyl-D-Aspartate). Il y a donc une hyperstimulation continue et faible des récepteurs NMDA par le glutamate, due à une élévation persistante de la concentration de glutamate. Cela aboutit à une augmentation de l'entrée de calcium dans le neurone et finalement conduit à une neurodégénérescence. Ce phénomène est appelé la « neuro-excitotoxicité » et est impliqué dans de nombreux troubles neurologiques. L'excitotoxicité due au glutamate cause une augmentation du calcium intracellulaire via les récepteurs glutamatergiques qui sont perméables au calcium. (**Ezza and Khadrawy, 2014; Lewerenz and Maher, 2015**). Un élément essentiel des mécanismes, qui préviennent une transmission électrique répétitive, est l'évacuation rapide du glutamate synaptique par des transporteurs spécifiques.

**Tableau IV: Quelques neurotransmetteurs, leurs fonctions et les maladies causées**

<b>Neurotransmetteurs</b>	<b>Fonctions</b>	<b>Altérations</b>	<b>Troubles et maladies</b>	<b>Références</b>
Acétylcholine (ACh)	Favorise la mémoire et apprentissage Favorise l'attention	Diminution	Maladie d'Alzheimer et de Parkinson	<b>Jamwal and Kamar, 2019</b>
Dopamine (DA)	Régule la motricité Coordonne certains processus cognitifs et émotionnels Favorise l'attention	Diminution	Maladie de Parkinson Maladie de Huntington précoce	<b>Jamwal and Kamar, 2019</b>
		Augmentation	Schizophrénie Troubles psychotiques Maladie de Huntington tardive	<b>Jamwal and Kamar, 2019</b>
Glutamate (Glu)	Favorise l'apprentissage et la mémorisation des informations à long-terme, la plasticité des synapses du cerveau	Augmentation	Accident vasculaire cérébral Maladie d'Alzheimer Maladie de Parkinson Maladie de Huntington	<b>Meldrum, 2000</b> <b>Lewerenz and Maher, 2015</b>
Sérotonine (5-HT)	Contrôle l'équilibre psycho-affectif Régulation du cycle circadien Contrôle de la douleur	Diminution	Dépression Maladie d'Alzheimer Maladie de Parkinson Anxiété	<b>Butzlaff and Ponimaskin, 2016</b> <b>Politis and Niccolini, 2015</b>
Noradrénaline (NA)	Contrôle la vigilance et favorise l'attention	Diminution	Maladie d'Alzheimer Dépression Maladie de Parkinson	<b>Delaville et al., 2011</b>
Acide gamma aminobutyrique (GABA)	Diminue l'excitabilité des neurones	Diminution	Epilepsie Maladie de Parkinson Maladie de Huntington	<b>Jamwal and Kumar, 2019</b> <b>Garret et al., 2018</b> <b>Blaszczyk, 2016</b>

### **I-2-5- La neuro-inflammation**

La neuro-inflammation se définit comme la réaction inflammatoire qui se développe dans le Système nerveux central (SNC) en réponse à un traumatisme, des infections et/ou des pathologies neurodégénératives. On croyait jusqu'à récemment que le cerveau bénéficiait contrairement aux autres organes d'un privilège immunitaire et qu'il échappait largement à la surveillance immunitaire. Il n'en est rien. Les microglies jouent à ce titre un rôle central puisque c'est la cellule qui phagocyte les éléments étrangers. Elles représentent 10% de la population totale des cellules cérébrales (**Rubio-Perez and Morillas-Ruiz, 2012**). Mais elles peuvent également se retourner contre les cellules voisines, c'est-à-dire les neurones, notamment lors de troubles neurologiques. Ainsi certaines maladies neurodégénératives s'accompagnent d'une activation des cellules gliales (**Li et al., 2014**). Cette réaction provoque une réaction inflammatoire au cours de laquelle il y a production des médiateurs de l'inflammation : les cytokines pro-inflammatoires, les chimiokines, les radicaux libres et les protéines du complément. (**Wang et al., 2015**).

#### **I-2-5-1- Médiateurs moléculaires de la neuro-inflammation**

##### **I-2-5-1-1- Les cytokines pro-inflammatoires**

Pour communiquer entre elles et réguler les réponses inflammatoires, les cellules immunitaires utilisent des facteurs solubles que sont les cytokines. Lorsque les cytokines sont sécrétées, elles agissent : en circulant dans le sang (c'est le mode endocrine), ou en agissant sur les cellules qui les sécrètent elles-mêmes (c'est le mode autocrine) ou en agissant sur les cellules voisines (c'est le mode paracrine). Il existe une quarantaine de cytokines identifiées et regroupées en familles suivant leur structure. Celles jouant un rôle dans les troubles cérébraux sont : Les interleukines (IL) telles que l'interleukine 1 (IL-1), également appelé LAF (leucocyte activating factor), le transforming growth factor- $\beta$ , le facteur de nécrose tumorale (TNF- $\alpha$  pour tumor necrosis factor-alpha), c'est la plus importante des cytokines pro-inflammatoires (**Ramesh et al., 2013**).

##### **I-2-5-1-2- Les chimiokines**

Les chimiokines sont des cytokines impliquées dans la migration cellulaire. Elles sont sécrétées principalement dans le SNC par les cellules astrocytaires et microgliales, et leurs récepteurs se retrouvent sur les cellules neuronales (**Meraz-Ríos et al., 2013**). Elles forment alors un gradient, et dirigent ainsi la migration des populations leucocytaires requises vers le tissu enflammé. Les chimiokines sont repartis en deux classes : les chimiokines  $\alpha$  qui ont une séquence CXC (cystéine-résidu aléatoire-cystéine) et les chimiokines  $\beta$  qui ont une séquence

CC (cystéine-cystéine). La plupart des chimiokines interagissent avec plusieurs récepteurs, et chaque récepteur peut reconnaître plusieurs chimiokines. Les chimiokines jouent un rôle dans la physiologie du SNC incluant la migration neuronale, la prolifération cellulaire et l'activité synaptique. Ils peuvent induire directement ou indirectement la mort neuronale à travers l'activation des récepteurs de chimiokines des neurones (**Ramesh et al., 2013**).

#### **I-2-5-1-3- L'oxyde nitrique (NO)**

Le NO est une molécule qui contribue de manière importante dans la signalisation cellulaire. Il possède une grande diversité d'effets biologiques, tant bénéfiques que toxiques. Il est synthétisé par l'oxyde nitrique synthase (NOS). Dans le SNC, l'isoforme neuronal (nNOS) est largement distribué dans les neurones, les astrocytes et vaisseaux sanguins (**Meraz-Ríos et al., 2013**). La cellule microgliale, quant à elle, exprime la forme inductible de NOS (iNOS) qui possède un potentiel de synthèse bien plus grand que les formes constitutives. Ainsi, lorsque le NO est produit en grande quantité, il devient toxique pour les cellules. Il semble que le NO provoque un dommage de l'ADN, une peroxydation lipidique ainsi qu'une déplétion d'énergie, provoquant la mort de la cellule (**Yuste et al., 2015**).

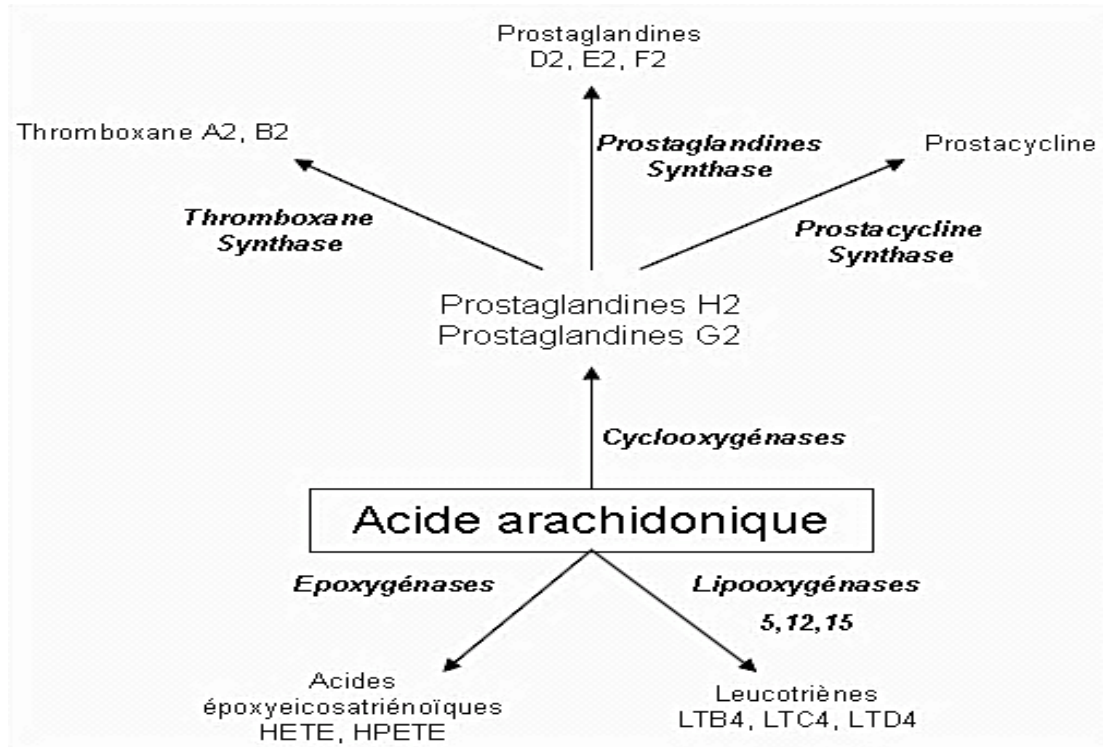
**Tableau V: Médiateurs pro-inflammatoires sécrétés par les astrocytes et microglies durant le processus neuro-inflammatoire (Morales et al., 2014).**

<b>Médiateurs pro-inflammatoires</b>	<b>Effets</b>
<b>Chimiokines</b>	Dysfonction, apoptose et nécrose des neurones, microglies et astrocytes
<b>IL-1<math>\beta</math>, IL-6, IL-12</b>	Activation des astrocytes et microglies
<b>INF-<math>\gamma</math>, TNF<math>\alpha</math></b>	Dysfonction, apoptose et nécrose des neurones, microglies et astrocytes
<b>NO, ROS, O<math>^{\ominus}</math><sub>2</sub></b>	Stress oxydatif dans les cellules; dysfonction, apoptose et nécrose des neurones, microglies et astrocytes

#### **I-2-5-1-4- Les prostaglandines et leucotriènes**

Il est important de noter l'implication des enzymes cyclo-oxygénases (COX) et lipoxygénases (LOX) dans la neuro-inflammation. Ces enzymes catalysent la formation de prostaglandines et leucotriènes à partir de l'acide arachidonique (figure 13). Dans les conditions normales, ces métabolites jouent un rôle dans la fonction synaptique, la régulation du flux sanguin cérébrale, l'apoptose, l'angiogenèse etc. Par ailleurs, dans les conditions

pathologiques, l'activité de ces enzymes augmente conduisant à la neuro-inflammation (Phillis *et al.*, 2006).

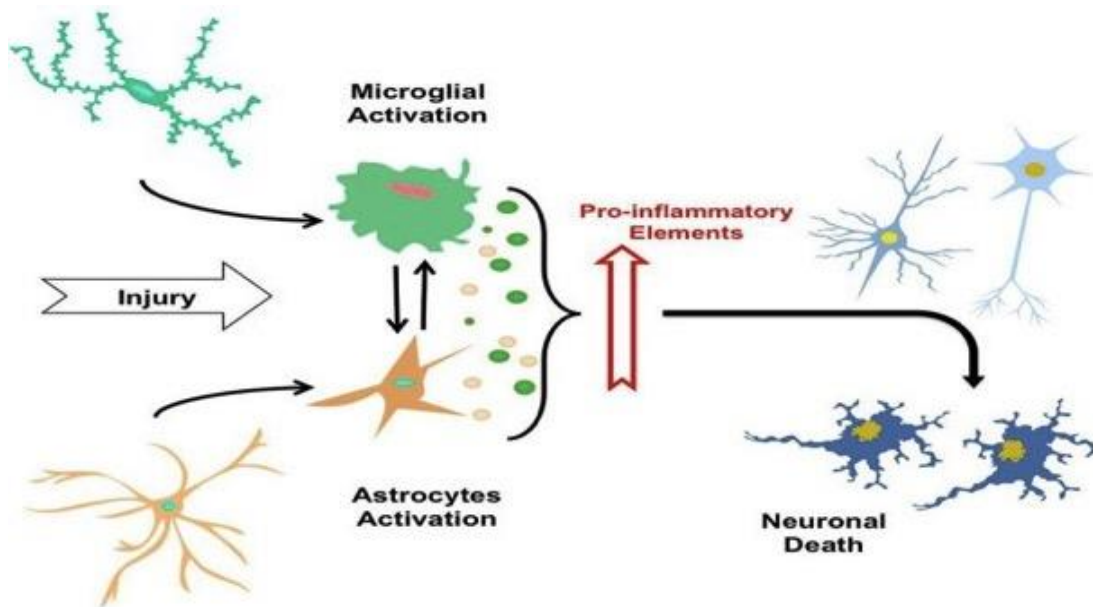


**Figure 13: Biosynthèse des eicosanoïdes à partir de l'acide arachidonique. D'après Franck, 2010.**

#### I-2-5-2-Implication de la neuro-inflammation dans les maladies neurodégénératives.

Il a été démontré que les processus neuro-inflammatoires peuvent contribuer à la cascade des événements conduisant à la mort neuronale (Hirsch *et al.*, 2012). Ces processus sont généralement caractérisés par la présence de microglies activées, autour des plaques séniles dans le cas de la MA et autour des neurones dopaminergiques dégénérés dans le cas de la MP (figure 14). Par ailleurs, une grande étude clinique a prouvé le rôle de la neuro-inflammation en démontrant une diminution de la prévalence de la maladie chez les patients utilisant des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) de façon régulière (Moore *et al.*, 2010). Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont démontré que la mort des neurones était étroitement liée à la production et l'accumulation de facteurs pro-inflammatoires, tels que les cytokines, IL-1, TNF- $\alpha$ , les radicaux NO et de O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Lyman *et al.*, 2014). Par exemple, une quantité excessive de l'IL-1 augmente la production des EORs, qui à son tour activent certains facteurs tels que les p38 Mitogen Activated Protein Kinases (p38 MAPK) et les c-Jun-N-terminal Kinases (JNK) et engendrant ainsi les dommages et la mort cellulaire par apoptose. De plus, une production excessive des TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$  conduit à une cytotoxicité du

glutamate par stimulation directe des récepteurs N-Méthyl-D-Aspartate (Vauzour *et al.*, 2015). Il a été démontré que le TNF- $\alpha$  active certaines voies telles que la voie des caspases, des Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK) et de Nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) toutes impliquées dans la mort cellulaire programmée ou apoptose (Sabio and Davis, 2014)



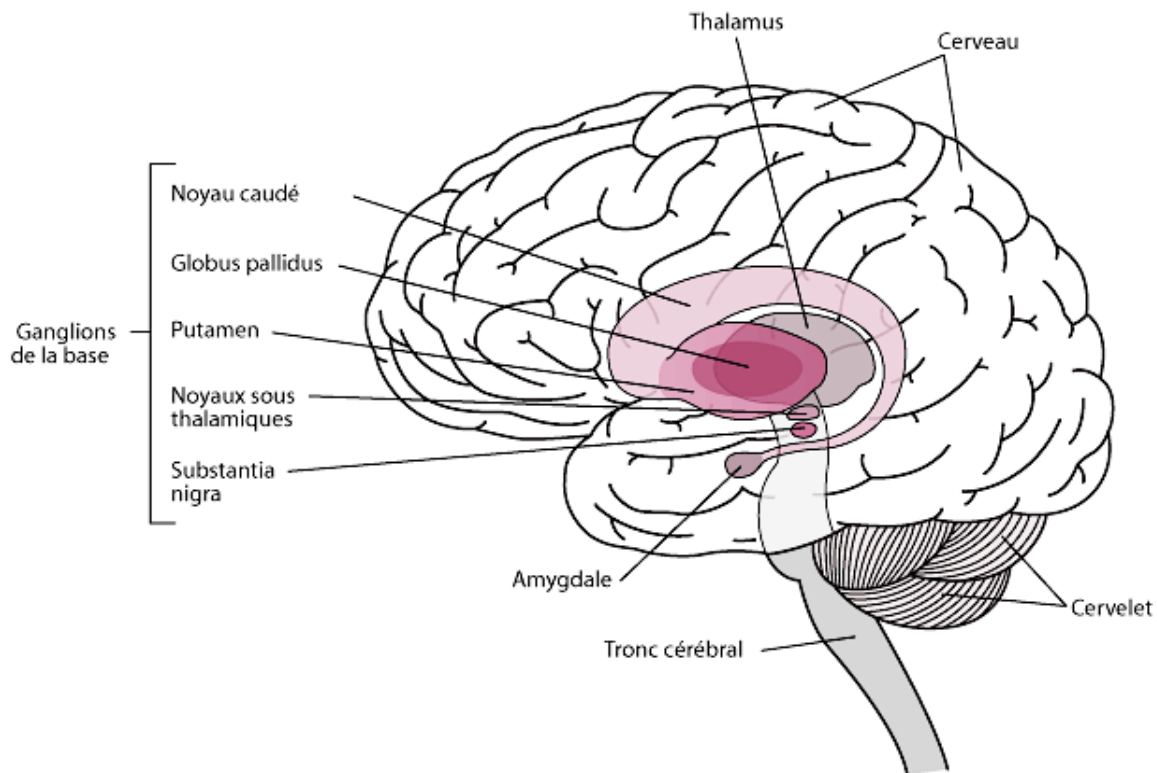
**Figure 14: Processus neuro-inflammatoire (Morales *et al.*, 2014)**

### I-3- La maladie de Parkinson

#### I-3-1- Généralités sur la maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson (MP) est la deuxième maladie neurodégénérative la plus chronique au monde, après la maladie d'Alzheimer (AD), et elle toucherait environ 1% de la population de plus de 60 ans (Wirdefeldt *et al.*, 2011). Elle est caractérisée principalement par la perte des neurones à dopamine dans la substance noire du cerveau. Cette perte est également observée dans d'autres régions cérébrales telles que le noyau cholinergique basal de Meynert, les sous-noyaux du thalamus et de l'amygdale et les neurones sérotoninergiques du noyau du raphé (Braak *et al.*, 2003). La MP est causée par la perturbation de la neurotransmission dopaminergique dans les noyaux gris centraux, ce qui entraîne une réduction du nombre de neurones dopaminergiques dans la substance noire et dans d'autres zones du cerveau, et la formation d'inclusions cytoplasmiques appelées corps de Lewy (Dexter and Jenner, 2013). Ces inclusions cytoplasmiques correspondent à des amas pathogènes formés par une protéine : l' $\alpha$ -synucléine. Naturellement présente chez les sujets

sains, cette protéine est retrouvée au sein des amas pathogènes sous une forme "malade", présentant un problème de conformation qui favoriserait son agrégation anormale.



**Figure 15: Schéma illustrant la localisation des différentes zones du cerveau impliquées dans la MP (Gonzalez-Usigli, 2019).**

Les causes exactes de la dégénérescence neuronale sont incertaines, mais l'âge reste le principal facteur de risque. Dans de plus rares cas, la maladie peut également se déclarer chez des sujets jeunes, parfois dès 25-30 ans. La MP touche légèrement plus les hommes que les femmes (**Pang et al., 2019**). La dégénérescence des neurones dopaminergiques serait favorisée par des facteurs génétiques et environnementaux et les mécanismes précipitant cette dégénérescence sont vraisemblablement multiples (**Pang et al., 2019; Maiti et al., 2017**). Il pourrait s'agir de l'accumulation de radicaux libres, d'un déficit énergétique ou métabolique (dysfonctionnement mitochondrial), ou encore d'un processus inflammatoire. (**Miranda and Greenamyre, 2017; Shapira and Jenner, 2011**). Il existe une susceptibilité génétique à la MP, mais elle est relativement faible. La MP n'est donc généralement pas une maladie héréditaire. Cependant, il existe environ 5% de formes génétiques, liées à des mutations affectant des gènes spécifiques. Certains ont été identifiés, comme le gène de l' $\alpha$ -synucléine, le gène LRRK-2 (leucine-riche repeat kinase 2) ou encore le gène de Parkine (**Maiti et al., 2017**). Tous ceci suggère que la mort cellulaire entraînant la MP est causée par une cascade multifactorielle d'événements et de ce fait une thérapie efficace pour la MP doit s'appuyer sur



des multiples interventions médicamenteuses. Dans le monde, la prévalence de cette maladie est de 0,3% dans la population générale, avec une tendance à augmenter avec l'âge. À 60 ans, la prévalence est d'environ 1%, mais s'élève à plus de 4% à 80 ans. L'incidence de la maladie s'élève à un million de nouveaux cas par année dans le monde (**Tysnes and Storstein, 2017**). Dans les pays en voie de développement une augmentation de l'espérance de vie a été observée augmentant ainsi l'incidence de la maladie de Parkinson. En Afrique, la prévalence est estimée à 1,3 millions de patients (**Cilia et al., 2011**). Cette faible prévalence pourrait être due à différentes méthodologies d'étude et critères de diagnostic, à l'handicap lié à la maladie et différences culturelles dans les populations étudiées, à l'accès réduit aux soins de santé, aussi aux faits que la plupart des patients atteints de MP sont sous-diagnostiqués et non traités, et une pénurie de personnel qualifié (**Williams et al., 2018**). Certaines études ont montré que la MP était la principale cause d'admissions neurologiques chez les personnes âgées, elle a également été notée comme une cause majeure de décès non enregistrés. Néanmoins, la prévalence de la MP en Afrique subsaharienne est comprise entre 0,01-0,235% (**Lekoubou et al., 2014**). Au Cameroun, la MP et d'autres types de démences sont fréquentes (**Callixte et al., 2015**). Des données cliniques et épidémiologiques ont montré que sur 3,9% des consultations neurologiques, 48,8% était de cas de MP (**Kengne et al., 2006**); **Cubo et al., 2017** ont rapporté que la MP représentait 2,1% des consultations neurologiques; par contre **Tegueu et al., 2013** ont rapporté 2,96% de cas de MP .

La MP est une maladie chronique, d'évolution lente et progressive, dont le début est insidieux. La phase préclinique de la maladie, avant l'apparition des premiers symptômes, dure probablement plusieurs années. Pendant cette période, le cerveau compense la baisse de dopamine par des processus de plasticité, permettant un fonctionnement cérébral normal. Les patients restent asymptomatiques jusqu'à ce que 50 à 70% des neurones à dopamine soient détruits et que le cerveau ne soit plus en mesure de compenser. Le diagnostic de la MP repose sur l'existence de trois principaux symptômes moteurs. Ils ne sont pas forcément tous présents en même temps et peuvent être d'intensité variable. Ils restent longtemps asymétriques, ne touchant qu'un côté du corps (**Maiti et al., 2017**). Il s'agit de :

- L'akinésie, une lenteur dans la mise en œuvre et la coordination des mouvements. Elle interfère avec toutes les activités de la vie courante, y compris la marche.
- L'hypertonie, une rigidité excessive des muscles. Elle peut toucher tous les muscles du corps, y compris le rachis. Elle provoque notamment une posture penchée vers l'avant.
- Les tremblements, survenant au repos, affectant surtout les mains et les bras. Ils

peuvent être intermittents et ne sont pas systématiques, épargnant environ 30% des patients.

La MP se manifeste également par des symptômes non moteurs, résultant probablement des répercussions de la maladie sur des structures cérébrales non dopaminergiques. Il peut s'agir de problèmes de sommeil, d'une perte d'odorat (anosmie), de troubles cognitifs, de troubles de l'équilibre, de douleurs, de constipation, de mictions urgentes, de dépression (**Lukasiewicz et al., 2018; Pleiffer, 2016; Chaudhuri and Schapira, 2009; Chaudhuri et al., 2006**). Il est possible que certains de ces symptômes apparaissent avant les symptômes moteurs et soient annonciateurs de ces derniers. C'est notamment le cas des troubles du comportement en sommeil paradoxal (mouvements brusques voire violents accompagnant les rêves) (**Maiti et al., 2017**).

Il existe plusieurs stades de la maladie de Parkinson (Voir figure 16), reflétant l'évolution de sa sévérité chez les patients (**Braak et al., 2002**):

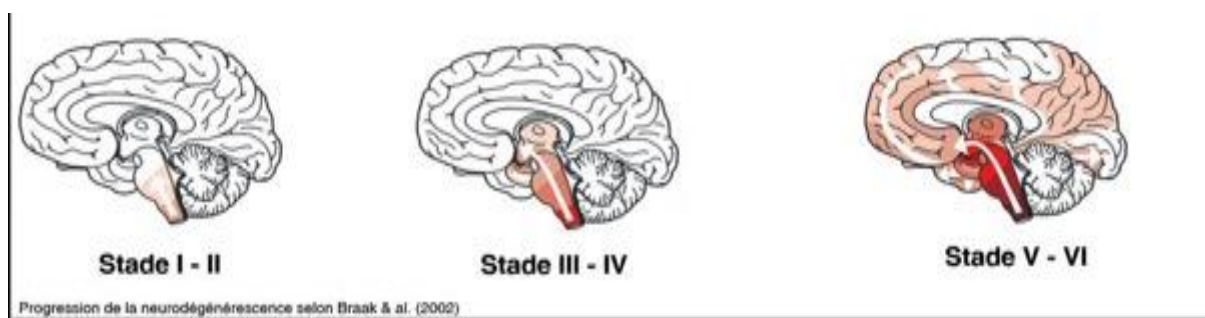
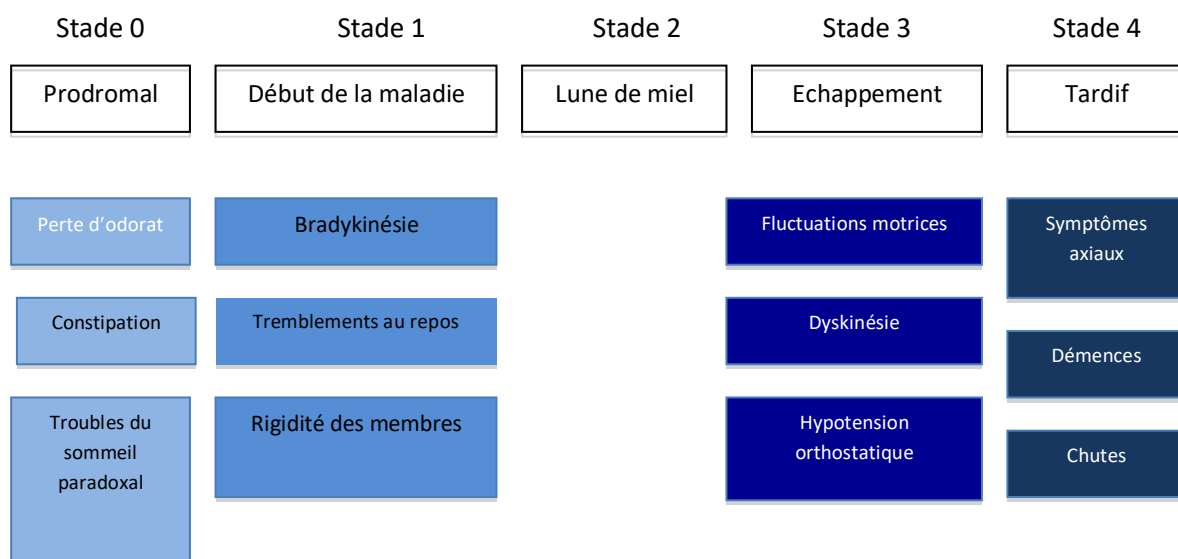
- Stade 0 : Phase prodromale. Elle représente l'ensemble des symptômes apparaissant avant la maladie

- Stade 1 : Début de la maladie. C'est durant cette phase que la maladie va être diagnostiquée et qu'un premier traitement va être proposé. On retrouve les trois symptômes caractéristiques de la maladie à savoir: la bradykinésie, le tremblement au repos et la rigidité.

- Stade 2 : Phase de stabilisation ou lune de miel. Le traitement mise en place permet de palier à la grande majorité des symptômes. Cette phase peut durer de 2 à 6 ans en moyenne. Durant cette phase la maladie continue de progresser et les médicaments permettent juste d'atténuer les symptômes.

- Stade 3: Phase d'échappement thérapeutique, l'efficacité du traitement décroît et les symptômes moteurs réapparaissent.

- Stade 4 : Phase tardive. La dégénérescence neuronale va s'étendre et de nouveaux symptômes vont apparaître comme les troubles axiaux ou cognitifs. Généralement, ces signes vont apparaître après 10 ans de progression de la maladie. La dépendance s'installe peu à peu avec l'augmentation de la sévérité des symptômes moteurs.



**Figure 16: Différentes stades de la MP (Braak et al., 2002).**

### I-3-2- Aminochrome dans la maladie de Parkinson

#### I-3-2-1- Oxydation de la dopamine en aminochrome

L'oxydation de la dopamine (DA) est un processus normal et non toxique, car les individus en bonne santé conservent leurs neurones dopaminergiques contenant de la neuromélanine dans la substance noire, qui s'accumulent avec l'âge (Zecca et al., 2002). L'aminochrome est le précurseur de la neuromélanine car la formation de neuromélanine dépend du réarrangement de l'aminochrome en 5,6-dihydroxyindole, qui est ensuite oxydé en 5,6-indolequinone, puis polymérisé pour former de la neuromélanine (Figure 17). La neuromélanine chélateur des métaux, indique que cette molécule joue un rôle neuroprotecteur. La neuromélanine s'accumule dans les vacuoles à double membrane, empêchant ainsi les effets neurotoxiques de la neuromélanine libre dans les cellules exposées à ce pigment. La dopamine au pH physiologique est capable de s'oxyder en aminochrome en présence d'oxygène (Figure 17). la dopamine peut être oxydée par un électron en radical dopamine o-semiquinone en réduisant l'oxygène en radical superoxyde (réaction 1 de la figure 17), la dopamine o-semiquinone

formé est capable de se disproportionner avec un second radical dopamine o-semiquinone et de générer une molécule de dopamine o-quinone et une molécule de dopamine (réaction 2 de la figure 17), ou peut être oxydé par un électron en dopamine o-quinone en réduisant l'oxygène en radical superoxyde (réaction 3 de la figure 17). La dopamine peut également être oxydée par deux électrons en dopamine o-quinone, une réaction qui est catalysée par la tyrosinase (réaction 4 de la figure 17). La dopamine o-quinone au pH physiologique se cyclise spontanément à une vitesse de  $0,15 \text{ s}^{-1}$  en leucoaminochrome qui s'oxyde automatiquement pour former un aminochrome, réduisant l'oxygène en radical superoxyde (Segura-Aguilar et al., 2014).

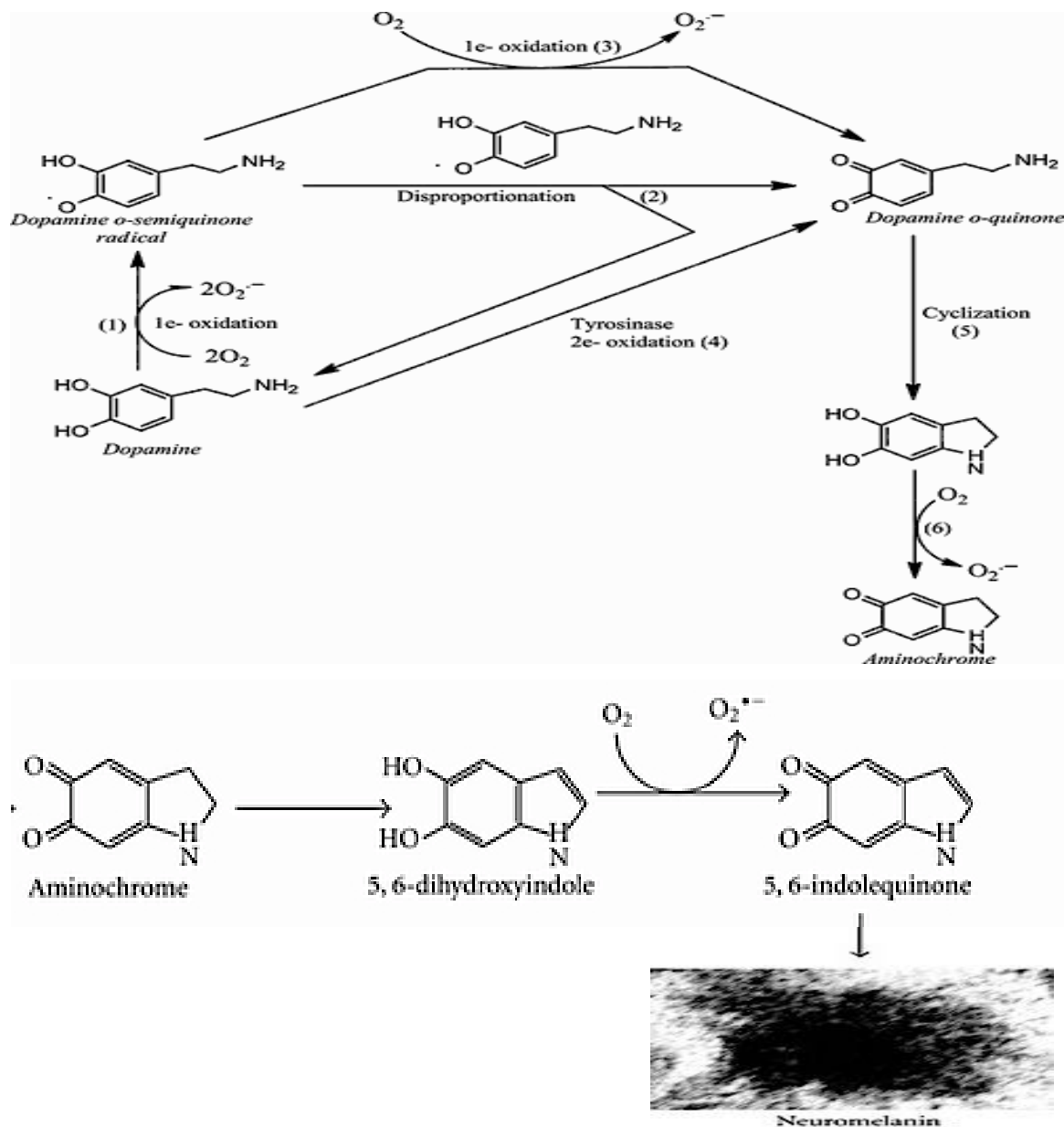


Figure 17: Oxydation de la dopamine en aminochrome (Segura-Aguilar et al., 2014).

### **I-3-2-2- Mécanismes d'action de l'aminochrome**

L'aminochrome induit des mécanismes liés à la dégénérescence des neurones dopaminergiques contenant de la neuromélanine, tels que le dysfonctionnement de la dégradation des protéines des systèmes lysosomal et protéasomal (**Zafar et al., 2006; Huenchuguala et al., 2014**); l'agrégation d'alpha-synucléine en oligomères neurotoxiques (**Muñoz et al., 2015**); le stress oxydatif (**Arriagada et al., 2004**); et le stress du réticulum endoplasmique (**Xiong et al., 2014**) (figure 18). La dégradation des protéines par le protéasome et les systèmes lysosomaux est un événement cellulaire essentiel pour le renouvellement des protéines et la clairance des protéines endommagées. La macroautophagie joue également un rôle important pour recycler les organites endommagés tels que les mitochondries. L'aminochrome induit un dysfonctionnement du système de protéasome en inactivant le gène parkine qui est une ubiquitine ligase 3 du système de protéasome (**Dawson and Dawson, 2010**). Il forme également des adduits et inactive l'ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 (UCHL-1) qui joue un rôle important dans le système de protéasome d'ubiquitine en hydrolysant les liaisons peptide-ubiquitine et en recyclant les monomères d'ubiquitine pour les réutiliser dans le même processus (**Healy et al., 2004**). L'aminochrome induit un dysfonctionnement des lysosomes en affectant l'acidification des lysosomes qui est essentielle à la dégradation des protéines dans les lysosomes (**Huenchuguala et al., 2014**). L'aminochrome forme également des adduits avec l'actine qui perturbent l'architecture du cytosquelette et empêchent la formation du neurofilament d'actine requis pour le transport des mitochondries dans les axones et les dendrites; la formation d'adduits avec la tubuline  $\alpha$  et  $\beta$  empêchent la formation des microtubules nécessaires au transport axonal et la fusion des vacuoles autophagiques avec les lysosomes. L'aminochrome induit également un dysfonctionnement des lysosomes probablement en formant des adduits avec une ATPase vacuolaire qui maintiennent un pH bas à l'intérieur des lysosomes (**Paris et al., 2010**). Le dysfonctionnement des lysosomes et la prévention de la fusion des vacuoles d'autophagie avec les lysosomes entraînent l'inhibition de la dégradation lysosomale des protéines et des organites. L'aminochrome induit la formation de proto-fibrilles neurotoxiques d'alpha-synucléine en formant des adduits avec l'alpha-synucléine au niveau du motif 125YEMPS129 (**Muñoz et al., 2015**). L'aminochrome induit également un stress oxydatif lorsque les flavoenzymes catalysent leur réduction en un radical o-semiquinone leucoaminochrome qui s'auto-oxyde immédiatement en présence de radical superoxyde générant de l'oxygène (**Arriagada et al., 2004**). Les radicaux hydroxyles formés potentialisant le stress oxydatif. (**Segura-Aguilar et**

al., 2014).

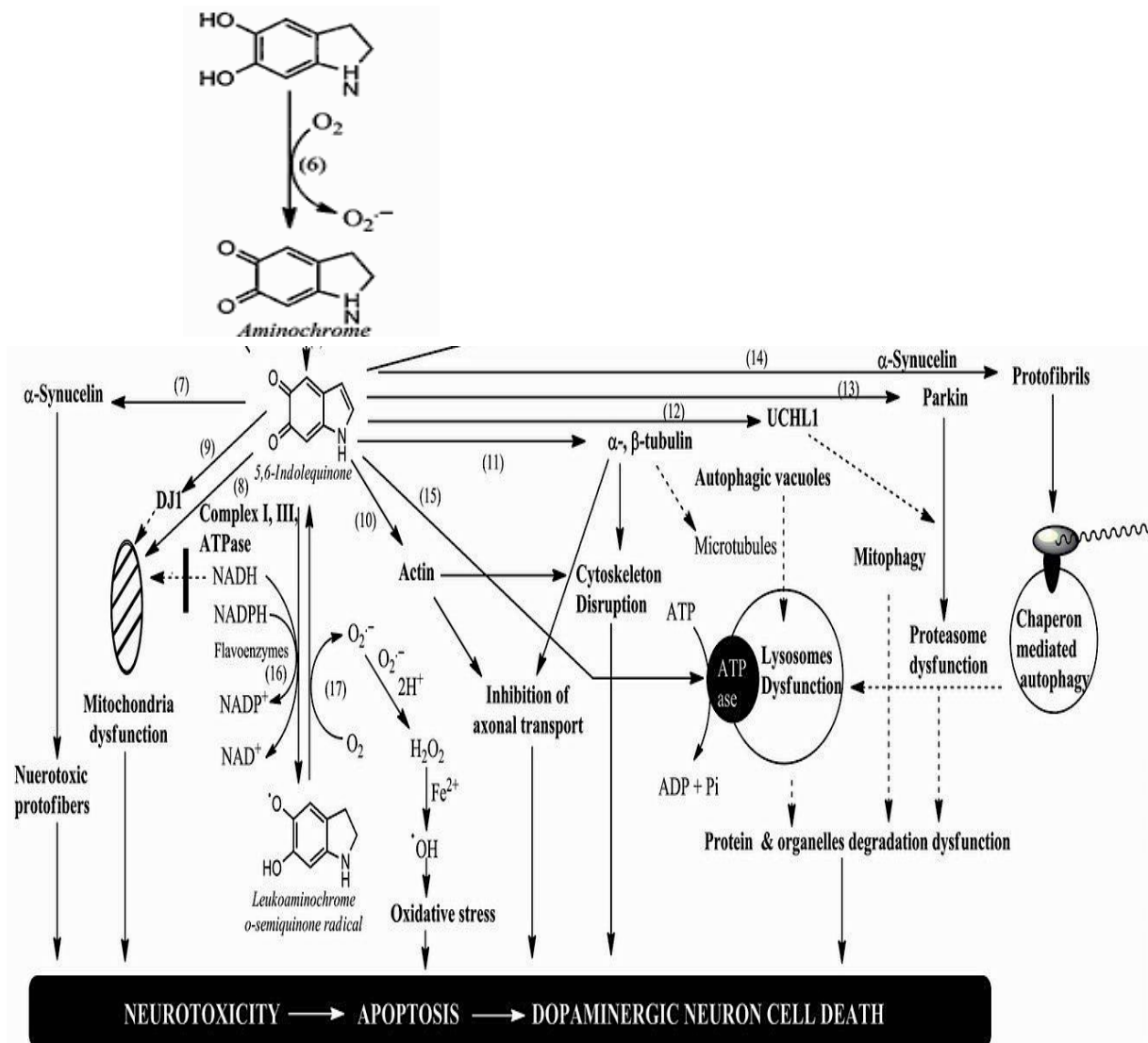


Figure 18: Mécanisme d'action de l'aminochrome. (Segura-Aguilar et al., 2014).

### I-3-2-3-Aminochrome et dysfonctionnement mitochondrial

La mitochondrie est la principale source cellulaire de radicaux libres, ses dysfonctions représentent une cause majeure du stress oxydatif. Les cellules neuronales sont particulièrement sensibles au dysfonctionnement mitochondrial en raison de leur dépendance énergétique du métabolisme mitochondrial. Le dysfonctionnement mitochondrial semble jouer un rôle important dans la perte de neurones dopaminergiques contenant de la neuromélanine dans le système nigrostriatal dans la MP. Le complexe mitochondrial I est particulièrement susceptible d'être modifié par le stress oxydatif et est donc un producteur potentiel d'espèces réactives de l'oxygène (Kausar et al., 2018). L'aminochrome induit un dysfonctionnement mitochondrial en inhibant le complexe I et en diminuant les taux d'ATP

dans différentes lignées cellulaires (Arriagada *et al.*, 2004; Aguirre *et al.*, 2012; Huenchuguala *et al.*, 2017). L'aminochrome est également capable de former des adduits avec les complexes mitochondriaux I et III de la chaîne de transport d'électrons et le complexe V responsable de la phosphorylation oxydative de l'ADP en ATP dans les mitochondries, ainsi qu'avec l'isocitrate déshydrogénase qui est une composante du cycle de Krebs jouant un rôle important dans le catabolisme oxydatif du glucose en ATP en générant le NADH et le FADH<sub>2</sub> requis pour produire de l'ATP dans les mitochondries, ce qui suggère que cette molécule induit un dysfonctionnement mitochondrial et un collapsus d'énergie ultérieur (Segura-Aguilar and Huenchuguala, 2018). L'aminochrome perturbe également les mouvements des mitochondries le long des axones et des dendrites car il forme des adduits avec l'actine et la tubuline  $\alpha$  et  $\beta$  générant des agrégats anormaux (Paris *et al.*, 2010) qui empêchent la formation de microfilaments et microtubules nécessaires au transport axonal et dendritique des mitochondries (Segura-Aguilar *et al.*, 2014). Le potentiel de membrane mitochondriale ( $\Delta\Psi_m$ ) est essentiel pour maintenir la fonction physiologique de la chaîne respiratoire pour produire l'ATP et pour cela sa détermination est primordiale afin de connaître l'état des cellules (Zorova *et al.*, 2018).

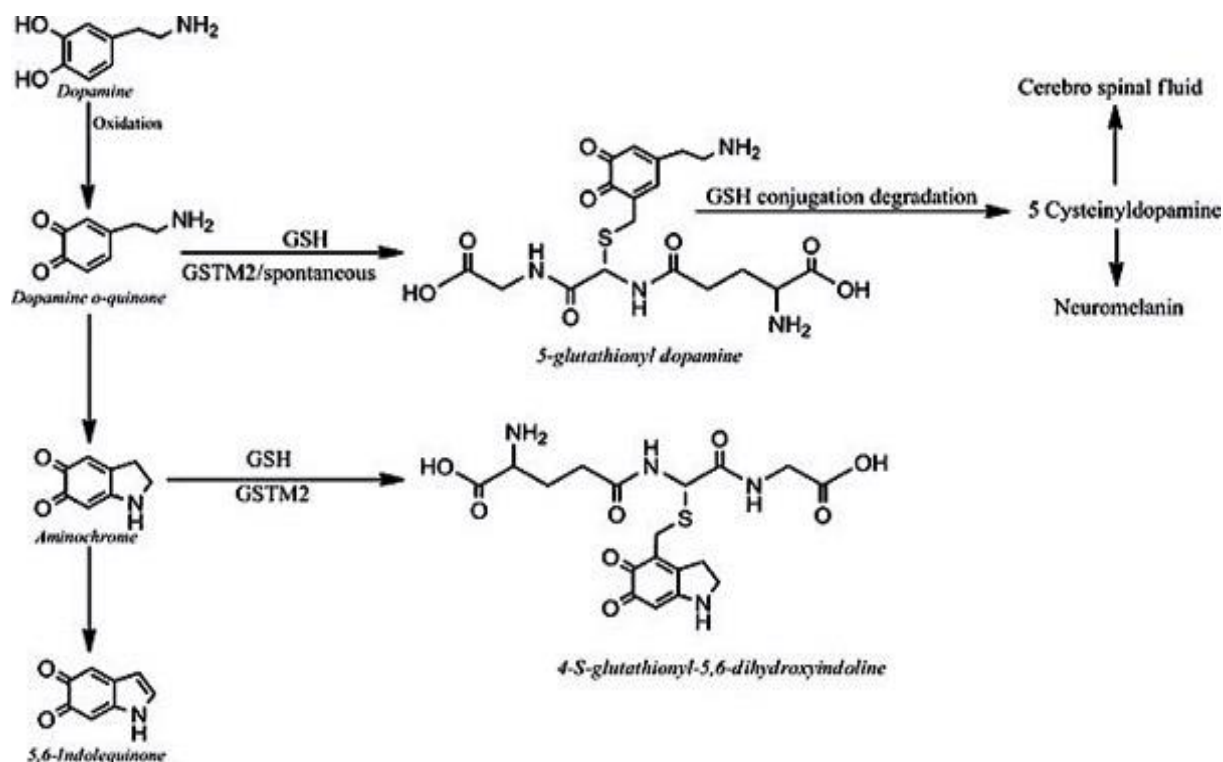
### **I-3-3- Astrocytes dans la maladie de Parkinson**

#### **I-3-3-1- Rôle et fonctions des astrocytes**

Les astrocytes sont le type de cellules le plus répandues dans le système nerveux central, ils constituent environ 55-60% des cellules totales du cerveau. Ils sont caractérisés par l'expression des filaments intermédiaires, la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP) impliquée dans le contrôle de la forme et du mouvement des astrocytes (Montgomery, 1994). Il existe deux types principaux d'astrocytes dans le SNC : les astrocytes protoplasmiques, qui enveloppent les corps neuronaux et les synapses et les astrocytes fibreux qui interagissent avec les nœuds de Ranvier et de l'oligodendrocytes (Stevens and Halliday, 2014). Les astrocytes sont les principales cellules responsables de la régulation du métabolisme du glucose dans le cerveau, transportant ainsi de multiples nutriments et précurseurs métaboliques dans les neurones par la navette malate-aspartate et d'autres transporteurs (Joe *et al.*, 2018). Les astrocytes sont essentiels pour certains processus cellulaires tels que la protection anti-oxydante, la clairance du glutamate, le développement et / ou le maintien des caractéristiques de barrière hémato-encéphalique, la libération de gliotransmetteurs et de cytokines, la promotion du couplage neurovasculaire, l'attraction des cellules par la libération de chimiokines, le maintien du métabolisme général, le contrôle du pH cérébral, la

métabolisation de la dopamine et d'autres substrats par les monoamine oxydases (**Gebreyesus and Gebremichael, 2020; Ben Haim et al., 2015; Phatnani and Maniatis, 2015**). Au cours de lésions cérébrales, ces fonctions astrocytaires sont altérées de manière transitoire ou permanente, et l'impact ultérieur sur les cellules neuronales peut entraîner des conditions pathologiques et des maladies neurodégénératives. Les neurones sont plus susceptibles aux lésions que les astrocytes, car elles ont une capacité antioxydante limitée et dépendent fortement de leur couplage métabolique avec les astrocytes pour lutter contre le stress oxydatif. Comme indiqué précédemment, les astrocytes exercent des rôles à la fois neuroprotecteurs et neurodégénératifs, en fonction des molécules libérées par ceux-ci et des conditions pathologiques ou normales de leur microenvironnement. Par exemple, les astrocytes libèrent des molécules antioxydantes telles que la glutathion S-transférase humaine Mu-2 (GSTM2). La GSTM2 catalyse la conjugaison de la dopamine o-quinone ou de l'aminochrome au glutathion, en 5-S-glutathionyl dopamine ou en 4-S-glutathionyl-5,6-dihydroxyindoline (figure 18) (**Baez et al., 1997; Segura-Aguilar et al., 1997; Dagnino-Subiabre et al., 2000**). Le composé 4-S-glutathionyl-5,6-dihydroxyindoline formé est stable en présence d'agents oxydants biologiques tels que l'oxygène, le peroxyde d'hydrogène et les radicaux superoxydes, ce qui suggère un rôle protecteur pour cette réaction. Le composé 5-S-glutathionyl dopamine est finalement dégradé en un produit final qui est le 5-S-cystélyldopamine retrouvé dans le liquide céphalorachidien humain et la neuromélanine. Il a été proposé que la conjugaison de l'aminochrome et de la dopamine o-quinone au glutathion est un mécanisme protecteur contre la neurotoxicité de ces composés dans les astrocytes. Dans les neurones dopaminergiques, l'addition spontanée de glutathion à la dopamine o-quinone est possible en raison de la forte réactivité de cette o-quinone avec le glutathion. La GSTM2 n'étant pas exprimée dans les neurones dopaminergiques, cette conjugaison se produit spontanément avec d'autres glutathion S-transférases mais le vitesse de ces réactions est significativement plus lent (**Segura-Aguilar et al., 2014**). Le GSTM2 n'est exprimé que dans les astrocytes mais cette enzyme protège à la fois les astrocytes et les neurones dopaminergiques contre la toxicité de l'aminochrome (**Cuevas et al., 2015; Segura-Aguilar et al., 2014; Segura-Aguilar, 2015; Herrera et al., 2017**).





**Figure 19: Conjugaison de la dopamine o-quinone et de l'aminochrome avec du glutathion en présence du Glutathion S-transférase humaine Mu-2 (GSTM2) (Segura-Aguilar *et al.*, 2014)**

### I-3-3-2-Astrocytes et la MP

Dans les circonstances normales et pathologiques, les astrocytes sont connus pour jouer un rôle important dans le maintien de l'environnement neuronal et exercent des effets neuroprotecteurs. Ces dernières années, de nombreuses recherches sur la MP ont été consacrées à l'interaction astrocyto-neuronale, suggérant son importance pour les futures thérapies contre les processus neurodégénératifs (Gebreyesus and Gebremichael, 2020; Miyazaki and Asanuma, 2017). Le dysfonctionnement des astrocytes ou la perte d'astrocytes augmente la susceptibilité des neurones à la mort cellulaire. Les astrocytes sont capables de recapter la protéine  $\alpha$ -synucléine et de la dégrader (Rappold and Tieu, 2010). Il a été montré que chez les patients souffrant de MP, la densité des astrocytes est faible dans la substance noire, par conséquent les neurones présents dans cette région sont de plus en plus vulnérables car absence abondante des astrocytes environnantes pour détoxifier les radicaux oxygénés libres. (Hirsch and Hunot, 2009; Booth *et al.*, 2017). Les astrocytes sont les seules cellules à posséder la glutathione peroxydase (importante dans la détoxification des radicaux libres), leur faible présence dans la SNpc rend cette structure particulièrement sensible au stress oxydatif, augmentant la susceptibilité des neurones à la cytotoxicité (Niranjan, 2014). Dans le traitement de la MP, il a été démontré que les astrocytes convertissent la L-Dopa en

dopamine, et que dans le striatum, ils servent au stockage de la L-Dopa. Par conséquent, un dysfonctionnement métabolique et énergétique des astrocytes contribue non seulement à la MP mais aussi à une détérioration du reponse thérapeutique (**Oksanen et al., 2019**).

### **I-3-4- Modèles expérimentaux d'étude de la maladie de Parkinson**

#### **I-3-4-1- Modèles d'étude de la MP *in vivo***

De nos jours, plusieurs modèles animaux (invertébrés: *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* et escargots; et vertébrés: poissons zèbres, souris, rats et singes) sont utilisés pour modéliser la MP afin de rechercher la pathogenèse, d'identifier des cibles thérapeutiques potentielles et de découvrir de nouveaux médicaments potentiels (**Zeng et al., 2018**). Ces modèles sont soit des modèles génétiques ou transgéniques émergeant de la découverte des formes familiales de la MP, soit des animaux où on a induit la maladie avec des toxiques ou des composés capables d'induire une dégénérescence sélective des neurones dopaminergiques de la SNpc.

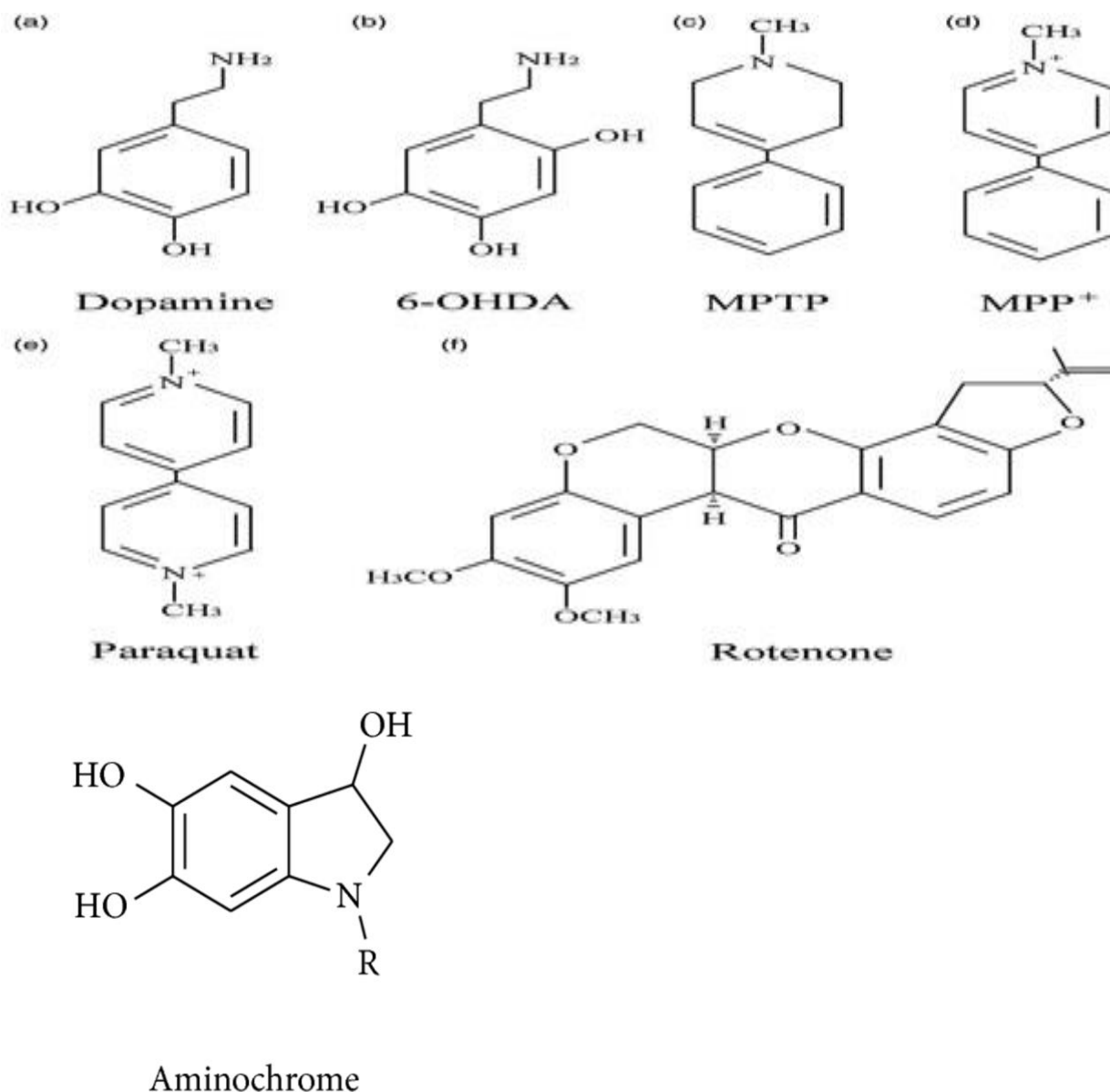
##### **I-3-4-1-1-Modèles génétiques**

Ces modèles visent à reproduire les mécanismes neurodégénératifs observés dans les formes génétiques de la maladie. Les principaux modèles utilisés reposent sur la manipulation des gènes de l' $\alpha$ -synucléine, de la parkine, du DJ-1 et LRRK 2 (leucine-rich. repeat kinase 2). Les modèles génétiques comme la souris porteuse d'une mutation sur le gène de l' $\alpha$ -synucléine, gène est lié à un type dominant de MP familiale. On a également le gène LRRK 2 et parkine, des mutations de ces gènes sont connues pour provoquer une forme familiale autosomale de la MP. Les mutations du gène DJ-1 sont liées à la MP précoce (**Jagmag et al., 2016; Blesa et al., 2016**).

##### **I-3-4-1-2-Modèles toxiques**

Actuellement, plusieurs molécules sont utilisées pour reproduire les changements pathologiques et comportementaux de la maladie humaine. Ces modèles sont basés sur des neurotoxines qui permettent de tester la dégénérescence neuronale DA nigrostriale. Les toxiques les plus utilisées sont le 6-hydroxydopamine (6-OHDA), le 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), la roténone, le paraquat, métamphétamine. La MPTP (1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine) traverse la barrière hémato-encéphalique et est métabolisée en 1-méthyl-4-phénylpyridinium (MPP<sup>+</sup>) par l'enzyme monoamine oxydase B (MAO-B) dans les astrocytes, puis en composé toxique actif. Le MPP<sup>+</sup> est ensuite absorbé par le transporteur de la dopamine où il altère la respiration mitochondriale en inhibant le complexe I de la chaîne de transport d'électrons, provoquant un stress oxydatif et l'activation

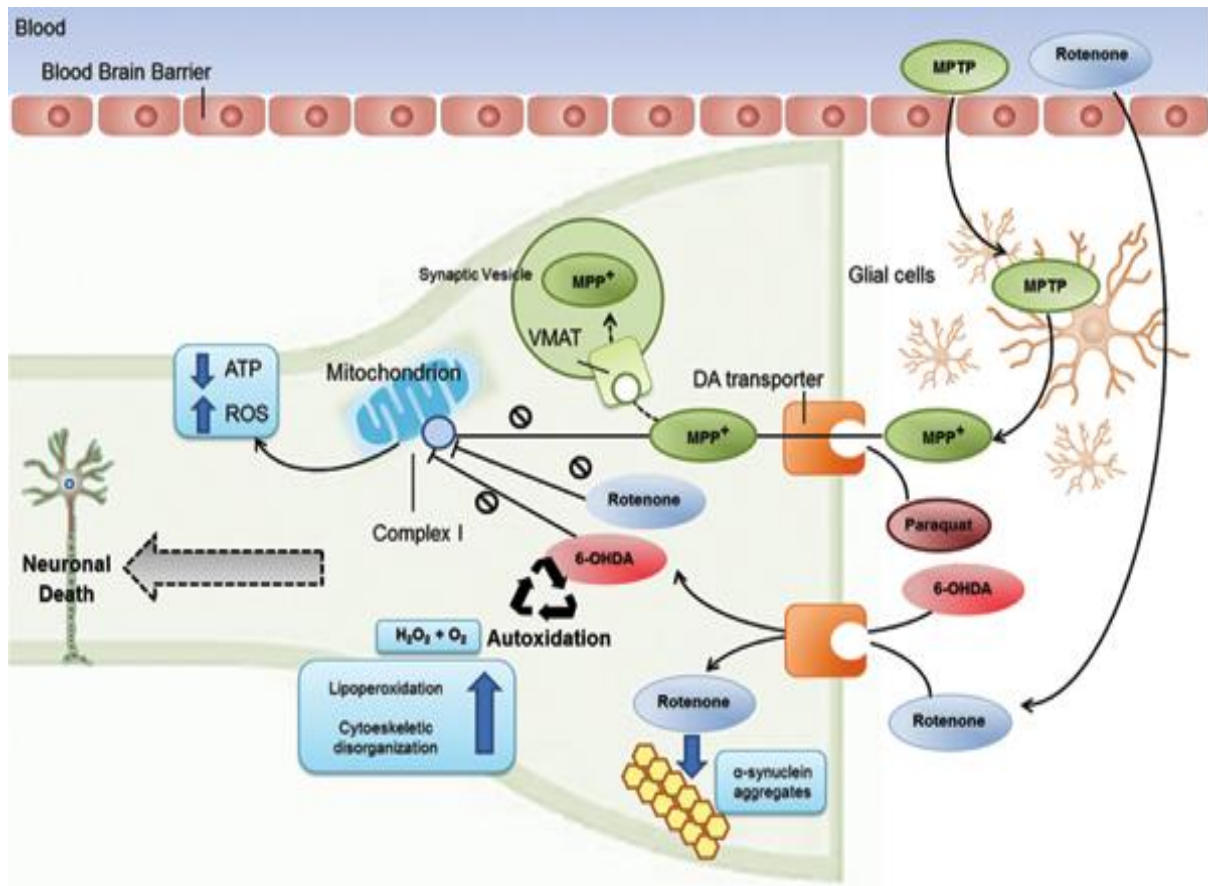
des voies moléculaires de la mort cellulaire programmée. Le paraquat et la 6-hydroxydopamine (6-OHDA) traversent facilement la membrane cellulaire par le transporteur de la dopamine et peuvent également exercer leur toxicité, en partie en ciblant les mitochondries avec la production ultérieure de EROs et de quinones, provoquant la dégénérescence des neurones dopaminergiques nigrostriataux. La roténone est extrêmement hydrophobe et pénètre facilement dans la membrane cellulaire, induisant la formation d'agrégats d' $\alpha$ -synucléine et une altération des mitochondries avec la production ultérieure de EROs et de quinones. (figure 21) (**Jagmag et al., 2016; Blesa et al., 2016, Tieu, 2011**). Cependant, ces toxines induisent une perte rapide de cellules dopaminergiques *in vitro* (**Williams, 1986**), alors que les symptômes du parkinsonisme chez l'homme peuvent prendre jusqu'à plusieurs années après la dégénérescence nigrale (**Braak et al., 2004**). En plus, ces toxiques ne sont dans la majorité des cas pas impliqués dans le déclenchement des pathologies et ne permettent pas d'étudier les causes pathologiques les plus fréquentes de la mort des cellules (**Segura-Aguilar, 2017a**). Ainsi, un nouveau modèle préclinique qui reproduit ce qui se passe dans le processus dégénératif de la maladie de Parkinson a été proposé, il s'agit de l'aminochrome, une o-quinone formée lors de l'oxydation de la dopamine en neuromélanine dans les neurones dopaminergiques contenant de la neuromélanine (**Herrera et al., 2016; Segura-Aguilar et al., 2016a,b; Paris et al., 2007**). Ces avantages sont: qu'il est d'origine endogène et qu'il est directement impliqué dans le dysfonctionnement des mitochondries, la formation d'oligomères neurotoxiques alpha-synucléine, le dysfonctionnement de la dégradation des protéines des systèmes lysosomal et protéasomal, le stress oxydatif et un stress du réticulum endoplasmique (**Segura-Aguilar et al., 2014; Paris et al., 2011; Huenchuguala et al., 2014**).



**Figure 20: Structures de la dopamine et des principales neurotoxines utilisées pour reproduire les caractéristiques de la MP dans des modèles animaux (Zeng *et al.*, 2018; Herrera *et al.*, 2016)**

6-OHDA=6-hydroxydopamine; MPTP=1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine;

MPP<sup>+</sup>=ion 1-méthyl-4-phénylpyridinium.



**Figure 21: Pathogenèse des modèles induits par les toxines (Blesa et al., 2016).**

#### **I-3-4-2- Modèles d'étude de la MP *in vitro***

Le modèle cellulaire est une étape transitoire qui doit permettre la compréhension des mécanismes pathologiques. C'est une étape nécessaire afin de rechercher par la suite les molécules pharmaceutiques capables de retarder ou mieux d'annihiler ces mécanismes pathologiques. Les altérations des processus biochimiques à la MP sont soit induites par des mutations de gènes pertinents ou simulées par l'utilisation de toxines liées à cette pathologie (Alberio et al., 2012). Ces modèles comprennent les cellules primaires, les cellules souches et les lignées cellulaires.

Les cellules primaires issues des patients ou des modèles animaux peuvent être utilisées lorsqu'elles sont facilement accessibles. On a par exemple les dérivés des fibroblastes humaines (Schüle et al., 2009).

Les cellules souches représentent aussi un précieux outil pour la découverte de médicaments. Elles génèrent l'ensemble des cellules de l'organisme et permettent l'obtention des cellules affectées telles que les neurones ou les cellules gliales. Les cellules souches pluripotentes induites humaines (iPS) offrent la possibilité d'obtenir des modèles *in vitro* de

neurones dopaminergiques cependant leur différenciation en neurones est très difficile (**Hu et al., 2015**)

Les lignées cellulaires sont les plus utilisées comme modèles à cause de leur facilité de culture et la possibilité de le modifier génétiquement. Différentes lignées cellulaires sont utilisées. On a les types de lignées cellulaires tumorales telles que les lignées PC12, SH-SY5Y, SKNSH et MN9D qui peuvent être différenciées en neurones dopaminergiques (**Alberio et al., 2012**) et les lignées de cellules non tumorales générées à partir de tissu foetal sain immortalisé et pouvant se différencier en une population homogène de neurones dopaminergiques comme les cellules LUHMES et MESC2.10 (**Lotharius, 2005**).

### **I-3-5- Approche thérapeutique contre la maladie de Parkinson**

#### **I-3-5-1- Approche moderne**

Il n'existe pas de traitement curatif de la maladie. Les possibles thérapies ont donc pour but de corriger les symptômes du patient, principalement les symptômes moteurs, mais aussi le plus longtemps possible. Plusieurs traitements médicamenteux sont utilisés pour soulager les symptômes moteurs et non moteurs (**Oertel and Schulz, 2016**).

##### **I-3-5-1-1- Traitements médicamenteux de la MP**

Plusieurs traitements médicamenteux sont utilisés pour améliorer la motricité et l'autonomie des personnes malades pendant de nombreuses années mais le principal traitement de la maladie de Parkinson est la Lévodopa/Carbidopa (**Olanow et al., 2004**). D'autres médicaments sont soit des agonistes dopaminergiques, soit des inhibiteurs des enzymes du métabolisme de la dopamine ou soit des anticholinergiques.

- La levodopa (L-3, 4-dihydroxyphenylalanine/L-DOPA), qui est administrée avec la carbidopa, est le premier médicament utilisé. La lévodopa est un précurseur de la dopamine. C'est-à-dire qu'elle est convertie en dopamine dans l'organisme. La conversion a lieu dans les noyaux basaux, où la lévodopa aide à compenser la baisse de dopamine due à la maladie. La carbidopa est administrée avec la lévodopa pour empêcher cette dernière d'être convertie en dopamine avant d'atteindre les noyaux basaux. La lévodopa réduit la raideur musculaire, améliore la motricité et réduit considérablement le tremblement. La prise de lévodopa améliore de manière significative la symptomatologie clinique des patients parkinsoniens. Au début du traitement, le patient voit une amélioration rapide de ses symptômes, mais progressivement les prises de lévodopa deviennent de moins en moins efficaces. De plus, la L-dopa conduit à des effets secondaires comme nausées, somnolence, étourdissements et dyskinésies (mouvements involontaires) (**Oertel and Schulz, 2016; Dorszewska et al.,**

2014).

- Les agonistes dopaminergiques sont des molécules qui vont directement agir sur les récepteurs dopaminergiques situés au niveau du striatum. Ils agissent comme la dopamine, peuvent être utiles à n'importe quel stade de la maladie. Ils sont liposolubles ce qui augmente leur durée d'action mais aussi leurs liaisons aux protéines plasmatiques. Ils entraînent cependant des effets secondaires semblables à ceux induits par la L-Dopa, tels que la confusion, la nausée, les vomissements, les hallucinations ou l'hypotension. On a le pramipexole, ropinirole, bromocriptine et apomorphine (**Smulders et al., 2017**).

- Les inhibiteurs enzymatiques sont des molécules qui ont pour but de prolonger l'effet thérapeutique de la L-Dopa, pour cela ils ciblent les enzymes de dégradation de la dopamine augmentant ainsi sa demi-vie et sa biodisponibilité. On a les inhibiteurs de la monoamine oxydase B (MAO-B) qui dégrade la dopamine au niveau du cerveau et les inhibiteurs de la catéchol O-méthyltransférase (COMT) qui transforme la L-DOPA au niveau périphérique, en 3-O-méthyl-dopa (3-OMD), un métabolite inactif présumé antagoniser la pénétration de la L-DOPA dans le cerveau. On a la sélégiline, la rasagiline et la safinamide (MAO-B), et entacapone et tolcapone (COMT). Ils entraînent des effets secondaires tels que la nausée, les vomissements, les hallucinations, la constipation, la dyskinésie et les vertiges (**Smulders et al., 2017; Maiti et al., 2017; Colonnolly and Lang, 2014**).

- Les anticholinergiques (administrés pour leurs effets anticholinergiques) sont efficaces pour diminuer la gravité du tremblement et peuvent être utilisés dans les premiers stades de la maladie de Parkinson. Les médicaments anticholinergiques fréquemment utilisés incluent la benzotropine, l'orphénadrine et le trihexyphénidyle. Elles possèdent de nombreux effets secondaires périphériques indésirables (sécheresse buccale, troubles de l'accommodation, constipation...), mais aussi centraux (confusion, troubles mnésiques) (**Maiti et al., 2017; Colonnolly and Lang, 2014**).

- D'autres médicaments sont également utilisés. On a l'amantadine, un médicament parfois utilisé dans le traitement de la grippe, est employée dans les formes modérées de la maladie de Parkinson, seule ou en association avec la levodopa. On a aussi le propranolol, un bêtabloquant, utilisé pour réduire la gravité d'un tremblement si celui-ci est aggravé par le maintien d'un membre dans une position nécessitant de résister à la force de gravité (par exemple, tenir les bras écartés). Pour le traitement lié aux symptômes non-moteurs, les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase tels que la rivastigmine et donepezil sont utilisées pour l'amélioration des troubles cognitifs. (**Smulders et al., 2017; Oertel and Schulz, 2014**).

Ainsi, la recherche de nouveaux traitements ciblant les symptômes qui ne sont pas sensibles aux médicaments dopaminergiques est donc un défi pour les années futures.

**Tableau VI: Certains médicaments couramment utilisés dans le traitement de la MP, leurs modes d'action et leurs effets secondaires**

Médicaments	Classes	Mode d'action	Effets secondaires	Références
<b>L-DOPA</b>	Précurseur de la dopamine	Augmente la concentration de la dopamine	nausées, vomissements, hypotension artérielle, agitation,	Oertel and Schulz, 2016; Dorszewska <i>et al.</i> , 2014
<b>Apomorphine, Bromocriptine, Pramipexole, Ropinirole</b>	Agonistes de la dopamine	Augmente la concentration de la dopamine	nausée, vomissements, vertiges, hallucinations ou psychose.	Smulders et al., 2017
<b>Selegiline Saffinamide rasagiline</b>	Inhibiteur de la MAO-B	Bloque le métabolisme de la dopamine	Vertiges, insomnie, douleurs musculaires, nausée, constipation, hallucinations.	Maiti et al., 2017; Smulders et al., 2017; Colonnolly and Lang, 2014
<b>Entacapone Tolecapone</b>	Inhibiteur de la COMT	Bloque la dégradation périphérique de la L-dopa	nausée, urine foncée, dyskinésie	Maiti et al., 2017; Colonnolly and Lang, 2014
<b>Benzotropine Trihexyphenidyl orphénadrine</b>	Anti-cholinergiques	Bloque l'excès d'acétylcholine associé à la dyskinésie	Vision floue, déficience cognitive	Maiti <i>et al.</i> , 2017; Colonnolly and Lang, 2014

MAO-B : Monoamine oxydase B, COMT: Catéchol-o-Méthyltransférase

### **I-3-5-1-2- Traitements neurochirurgicaux**

Tous les patients ne sont pas concernés par la chirurgie, car pour beaucoup d'entre eux le traitement médicamenteux suffit. Chez certains patients où des fonctions supérieures sont altérées (avec des troubles de l'équilibre), le traitement chirurgical peut s'avérer inefficace. La chirurgie est généralement proposée aux patients qui ont développé la maladie avant 60 ans et qui au bout de plusieurs années de traitement échappent au traitement médicamenteux



(Benabid *et al.*, 2009). Il est possible d'offrir trois types d'interventions chirurgicales pour traiter les symptômes de la MP : la pallidectomie, la thalamotomie et la stimulation cérébrale profonde (Fasano *et al.*, 2012).

- La pallidectomie : Elle consiste en la destruction d'une partie du paléostriatum (globus pallidus) par radio chirurgie grâce à des électrodes ou à un scalpel gamma. Les effets peuvent durer jusqu'à cinq ans après l'opération.

- La thalamotomie : Elle consiste en la destruction d'une partie du thalamus par radio chirurgie grâce à des électrodes ou à un scalpel gamma. Les impacts de cette amélioration peuvent être visibles jusqu'à dix ans après l'opération.

- La stimulation cérébrale profonde stéréotaxique, la technique consiste à implanter des électrodes dans le noyau sous-thalamique à l'intérieur du paléostriatum (*globus pallidus*) ou dans le thalamus, afin d'émettre des impulsions électriques grâce à un boîtier implanté sous la peau. Cet appareil, qui doit être remplacé tous les trois à cinq ans, produit des décharges électriques dans le noyau sous-thalamique, dans l'objectif de minimiser les tremblements. (Maiti *et al.*, 2017).

### **I-3-5-2- Plantes médicinales et maladie de Parkinson**

Les limitations des traitements de la MP ont entraîné des recherches approfondies sur les médicaments complémentaires ou alternatifs. Il a été montré que certains patients atteints des maladies neurodégénératives comme la maladie de parkinson utilisaient des traitements à base de plantes afin d'améliorer les fonctions cognitives et motrices (Pathak-Gandhi *et al.*, 2017). En raison de la présence de divers composés chimiques dans les plantes, avec des propriétés pharmacologiques spécifiques telles que antioxydantes et anti-inflammatoires, elles peuvent être considérées comme inhibiteur de la dégénération neuronale et bénéfiques dans le traitement des patients atteints de la MP (Mazo *et al.*, 2017; Costa *et al.*, 2016; More *et al.*, 2013). Des études ont été menées sur des plantes dans l'espoir de découvrir de nouvelles thérapies possédant des effets curatifs bénéfiques avec des effets secondaires mineurs. Plusieurs plantes médicinales ont été testées pour leurs effets anti-parkinsoniens, parmi ces plantes on peut citer: *Bacopa monnieri* (L.) Pennell (Scrophulariaceae), *Cassia obtusifolia* L. (Caesalpinaceae), *Mucuna Pruriens* (Fabaceae), *Chrys- anthemum indicum* L. (Asteraceae), *Croton celtidifolius* Baill (Euphorbiaceae), *Gastrodia elata* Blume (Orchidaceae), *Ginkgo biloba* L. (Ginkgoaceae), *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) *Hibiscus asper* Hook.f. (Malvaceae), *Hyoscyamus niger* L. (Solanaceae), *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae), *Morus alba* L. (Moraceae), *Panax ginseng* C. A. Meyer (Araliaceae), *Paullinia cupana* Mart. var.

*sorbilis* (Sapindaceae), *Polygala tenuifolia* Willd. (Polygalaceae) and *Thuya orientalis* L. (Cupressaceae) (Rios *et al.*, 2016; Kasture *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2012; Srivastava *et al.*, 2017). Plusieurs composés issues des plantes médicinales ont été évalué *in vitro* et *in vivo* sur les modèles de la MP et plusieurs ont montré des effets neuroprotecteurs (Kosaraju *et al.*, 2014; Tamilselvam *et al.*, 2013; Costa *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2017; Fu *et al.*, 2015; Rios *et al.*, 2016). Le tableau VII ci-après nous présente quelques uns de ces composés dont leur effet anti-parkinsonien a été démontré expérimentalement. Des études comme celles-ci ont donné des résultats prometteurs à l'appui de l'utilisation de plantes plus particulièrement des plantes couramment utilisées pour le traitement des troubles neurologiques pour la découverte et le développement d'interventions thérapeutiques possibles contre la MP.

**Tableau VII : Quelques composés ayant des effets anti-parkinsoniens**

Composés	Sources	Mode d'action	Références
Asiaticoside	Centella asiatica	Protège les neurones dopaminergiques, réduire le stress oxydatif	Zhang <i>et al.</i> , 2017
Baicalein	Scutellaria baicalensis	Protège des neurones dopaminergiques, réduire le stress oxydatif, inhibe l'agrégation de l' $\alpha$ -synucléine, inhibe l'activation des signaux NF- $\kappa$ B et MAPK	Mu <i>et al.</i> , 2011 Zhu <i>et al.</i> , 2004 Hu <i>et al.</i> , 2016 Zhang <i>et al.</i> , 2017
Curcumin	Tumeric	Protège les neurones dopaminergiques, réduire le stress oxydatif, inhibe l'agrégation de l' $\alpha$ -synucléine	Cui <i>et al.</i> , 2016
Ginsenoside	Ginseng	Anti-apoptotique, réduire la production du NO, TNF- $\alpha$ et IL-1 $\beta$ ,	Lee <i>et al.</i> , 2012
Magnolol	Magnolia officinalis	Augmente le taux de dopamine dans le striatum, réduire la production des EORs	Zhang <i>et al.</i> , 2017
Acide salvianolique	Salvia miltiorrhiza	Réduire l'activité du caspase-3 et la libération du cytochrome c, réduire le stress oxydatif	Tian <i>et al.</i> , 2008



## **CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES**

## **II-1-Matériels**

### **II-1-1-Réactifs**

Tous les réactifs utilisés au cours de ce travail étaient de grade supérieur. Leur mode de préparation est résumé en annexe. L'AChE (type VI-S de electric eel), iodure d'acétylthiocholine (ATCI), 5,5-dithio-bis (acide 2-nitrobenzoïque) (DTNB), 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH), persulfate de potassium, ferrozine, sulfate ferreux, ferricyanure de potassium, acide trichloroacétique, chlorure ferrique, nitroprussiate de sodium, acide L-ascorbique, réactif Folin-Ciocalteu, acide gallique, acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchromane-2-carboxylique (Trolox ®), chlorure d'aluminium, quercétine et bromure de 3- (4,5-diméthylthiazol-2-yl) -2,5-diphényl-tétrazolium (MTT) ont été achetés auprès de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). La 15-lipoxygénase de Glycine max achetée auprès de Sigma (Allemagne) et du Tris (hydroxyméthyl) aminométhane de Sigma (Suisse). Le sérum de veau fœtal (FCS), la pénicilline / streptomycine / fongizone (PSF) et le milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM) ont été obtenus auprès de Highveld Biological Products (Afrique du Sud). La solution saline tamponnée au phosphate (PBS) et la trypsine ont été achetées auprès de Whitehead Scientific (Afrique du Sud). Le milieu RPMI-1640 (ATCC, 30-2001), L-glutamine, HEPES, sodium pyruvate, glucose, sodium bicarbonate, sérum de veau fœtal Fetalclone III, Hyclone (Thermo Scientific, SH30109.03), sodium pénicilline, streptomycine sulfate, et amphotericine ont été achetées à Sigma-Aldrich. Pour l'analyse de la viabilité / cytotoxicité, nous avons utilisé la calcéine AM (Invitrogen, L3224) et l'iodure de propidium (P4864, Sigma-Aldrich). La dopamine et la tyrosinase ont été achetées à Sigma-Aldrich (H8502 et T3824 à 50KU respectivement). Le kit de dosage MitoProbe™ JC-1 pour la cytométrie en flux (M34152) a été acheté chez Molecular Probes.

### **II-1-2-Appareils**

Les équipements utilisés seront annoncés au fur et à mesure dans la description de la méthodologie.

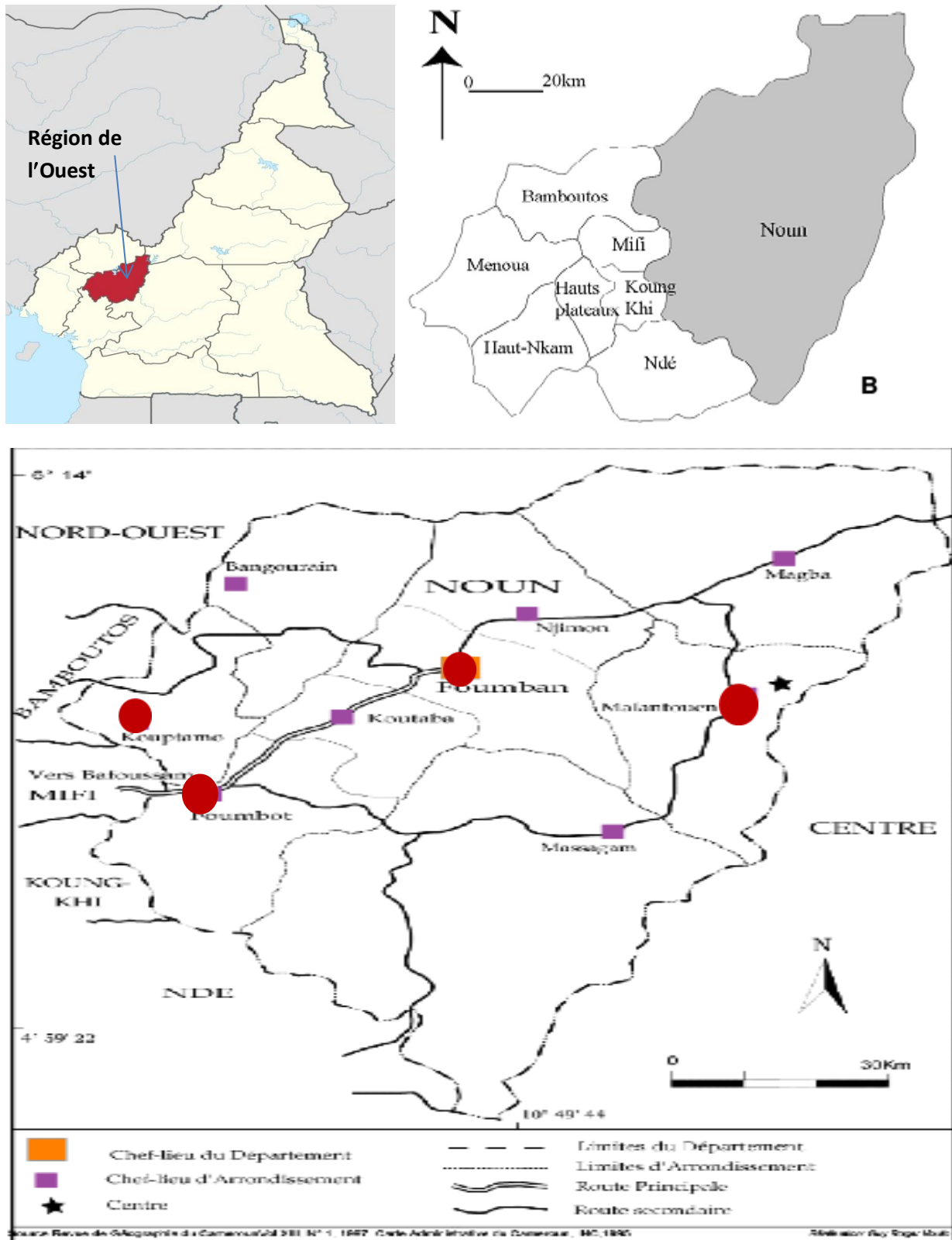
### **II-1-3- Description des lignées cellulaires utilisées**

Les macrophages Raw 264.7 sont des cellules de type monocyte / macrophage, provenant de la lignée cellulaire transformée par le virus de la leucémie Abelson et dérivée de souris BALB / c. Ces cellules sont décrites comme un modèle approprié de macrophages. Ils sont capables de pratiquer la pinocytose et la phagocytose. Lors de la stimulation par les lipopolysaccharides, les cellules RAW 264.7 augmentent la production d'oxyde nitrique (NO) et renforcent la phagocytose.

L'astrocytome humain du glioblastome (U373MG) est une lignée cellulaire dérivée d'une tumeur maligne par la technique de l'explant. Trois types de ces lignées cellulaires ont été utilisées : U373MG comme lignée cellulaire normale; Cellules U373MGsiGST6 dans lesquelles l'expression de la glutathion transférase humaine M2-2 (GSTM2) est réduite à 74% par des small interferences RNA et U373MGpSR, où les plasmides vides ont été introduits.

#### **II-1-4- Description de la Zone d'étude (Enquête ethnobotanique)**

L'enquête ethnobotanique a été effectuée dans la région de l'Ouest, Département du Noun (figure 22) dans différentes localités auprès des tradipraticiens de santé à l'aide d'une fiche d'enquête (voir annexe). La zone d'étude est indiquée à la figure 22 ci-dessous. Situé entre la longitude 10°30 et 11°40 Est et la latitude 5° et 6° Nord, le Noun est un espace naturel particulier. Le climat qui sévit dans le Noun est de type soudano-guinéen caractérisé par deux saisons : une petite saison sèche de Novembre à mars avec une température moyenne comprise entre 30°-35°C et une grande saison de pluies de Mars à octobre avec une température moyenne comprise entre 27°-28°C. Les précipitations annuelles moyennes sont d'environ 2054 mm par an. Le réseau hydrographique du Département est dominé par quelques grands cours d'eau dont le Noun de l'ouest vers le Sud, la Mapé et le Mvî au Nord, le Nchi au Centre, le Nja et le Mweng au Sud. Ces petits fleuves et rivières sont presque tous des affluents de l'important fleuve Mbam qui porte dans le Noun le nom « Ripâ ». En harmonie avec son climat, son sol et son hydrographie, le Noun dispose d'une végétation de transition entre la savane et la forêt. Cette végétation est progressivement altérée par la construction de nouvelles habitations, une intense agriculture et le pâturage. Le sol de couleur noire couvre la zone de Foubot et ses environs. A Fouban, et localités voisines, le sol est de couleur rouge. En 2008, la population du département du Noun était estimée à environ 800 000 habitants, avec une densité moyenne de 104 habitants/km<sup>2</sup>. La population, essentiellement rurale est composée de Bamoun en majorité (environ 88% de la population), Bamiléké, Tikar, Bororo, Haoussa et Nso, elle dépend principalement de l'agriculture, qui occupe 60% à 70% de sa population active et contribue à plus de 60% de sa richesse (Njouonkou *et al.*, 2016).



● Villages où l'enquête a été effectué

Figure 22: Localisation de la zone d'étude sur la carte du Cameroun (A : carte du Cameroun, B et C Département du Noun et ses arrondissements) (Noumi E. 2010)

## **II-2- METHODES**

### **II-2-1- Enquête ethnobotanique**

#### **II-2-1-1-Collecte des données**

L'enquête ethnobotanique a été menée entre Janvier et Mars 2014. Les données ont été recueillies à l'aide d'une fiche d'enquête élaborée (voir annexe). Cette fiche d'enquête comprenait des renseignements sur la connaissance des désordres neurologiques, des plantes médicinales utilisées pour traiter ces désordres, le nom local de la plante, les différentes parties de la plante utilisée, le mode de préparation (infusion, macération ou décoction) et la forme de l'administration du médicament (orale ou externe). Cette fiche d'enquête a été remplie par nous conformément aux déclarations des tradipraticiens et la langue de travail a été celle parlée dans la localité: le Bamoun. Les tradipraticiens de santé ayant accepté librement de partager leurs connaissances sur les maladies, indiquaient au cours de l'enquête la plante ou le mélange de plantes utilisées, la méthode de préparation du remède, les détails sur le mode d'administration, y compris les quantités approximatives et le nombre de doses par jour ou par semaine. Les plantes ont été ainsi collectées et conservées dans les papiers journaux pour leur identification par un botaniste à l'herbier national. Une photographie de chaque plante était également prise pour faciliter son identification. L'accès aux informations n'a pas été facile surtout quand celles-ci relevaient du secret. Certains informateurs ne se sont montrés disponibles et coopératifs que lorsque nous avons eu à déboursier des moyens de compensation.

#### **II-2-1-2- Récolte des plantes**

Les différentes parties de plantes indiquées lors de l'enquête par les tradipraticiens de santé ont été récoltées en Novembre et en Décembre 2014 à Foubot (Ouest). Ces différentes parties (feuilles, racines, écorces, partie aérienne, rhizomes, bulbes, graines ou plante entière) récoltées ont été séchées à température ambiante puis écrasées; les poudres obtenues ont été emballées et conservées pour la suite des travaux.

### **II-2-2- Evaluation *in vitro* des activités antioxydante, anti-acétylcholinestérase et anti-inflammatoire des extraits bruts de plantes**

#### **II-2-2-1- Préparation des extraits de plantes avec divers solvants**

Pour préparer nos extraits nous avons d'abord fait un essai d'extraction sur plaque de silice par chromatographie sur couche mince pour connaître le meilleur solvant d'extraction.

Ainsi, l'éthanol, le méthanol et le mélange chlorure de méthylène/méthanol ont été choisis comme solvant d'extraction.

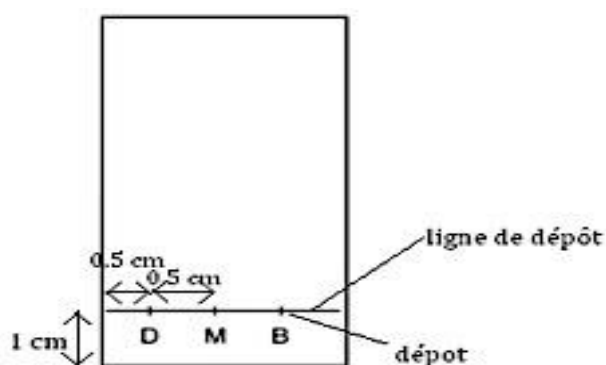
### II-2-2-1-1-Chromatographie sur Couche Mince

#### Principe :

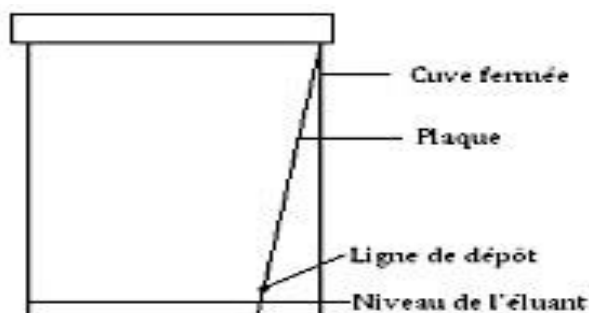
Cette méthode est basée sur la plus ou moins grande affinité de chaque constituant pour la phase stationnaire (silice) et la phase mobile (éluant).

#### Mode opératoire :

Les différents extraits ont été préparé en solubilisant chaque poudre de plante avec différents solvants; puis ils ont été déposés sur la plaque de silice. La préparation de la plaque de silice est indiquée sur la figure ci dessous. Les dépôts ont été effectués à l'aide d'un capillaire puis la plaque a été séchée à l'air libre.



La plaque a été déposée dans la cuve le plus verticalement possible en évitant que la ligne de dépôt ne touche l'éluant (Hexane pure ; Hexane/Acétate d'éthyle 5% ; Hexane/Acétate d'éthyle 25% ; Hexane/Acétate d'éthyle 50% ; Acétate d'éthyle pur et Acétate d'éthyle/Méthanol 5%). La plaque a été retirée de la cuve lorsque le front de l'éluant arrivait à environ 1cm du bord supérieur de la plaque puis séché à l'air.



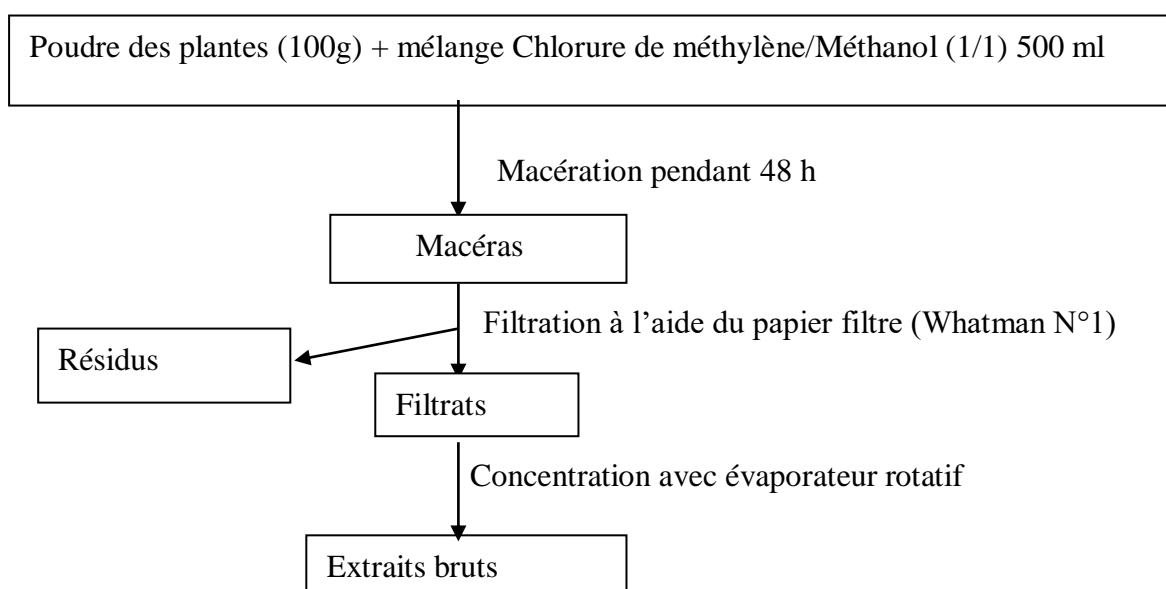
Les plaques ont été révélées avec un révélateur chimique (le diiode) puis à la lampe UV à 254 nm afin de voir le nombre des tâches correspondant aux nombres de composés présents dans chaque extrait de plante.



### II-2-2-1-2-Préparation des extraits de plantes

Cent gramme (100 g) de chaque poudre ont été macérés dans le mélange méthanol-chlorure de méthylène (1 :1v/v) pendant 48 heures sous agitation. Après macération, les mélanges ont été filtrés sur papier filtre Whatman N°1. Les filtrats obtenus ont été concentrés sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif. Les extraits évaporés ont été ensuite conservés à 4°C jusqu'à l'utilisation. Les extraits ont été préparés selon le schéma ci-contre.

Au moment des analyses, chaque extrait de plante a été dissous dans le diméthylsulfoxyde (DMSO 100 %) pure et testé en double.



**Figure 23: Schéma du protocole d'extraction des plantes**

### II-2-2-2- Evaluation de l'activité anti-oxydante des extraits bruts de plantes

La production de radicaux libres est une cause importante dans le processus neurodégénératif due à la sensibilité des neurones à ceux-ci (Bhat *et al.*, 2015). Pour étudier l'activité antioxydante d'un extrait de plante, il est essentiel de faire recours à plusieurs méthodes d'évaluation car l'activité antioxydante d'un extrait de plante est influencée par plusieurs facteurs comme la composition chimique de l'extrait et le modèle expérimental (Blazekovic *et al.*, 2010). Dans cette étude, la capacité antioxydante totale, la peroxydation des lipides (MDA) dans l'homogénat du cerveau de rats, le pouvoir chélateur des ions ferreux et le piégeage des radicaux au 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) ont été utilisés pour évaluer l'activité antioxydante des extraits bruts.

## **II-2-2-1-Test de la capacité antioxydante des extraits bruts de plantes**

### **Principe**

Les phosphates réagissent avec le molybdate d'ammonium pour former un complexe phosphomolybdique ( $\text{H}_3\text{PO}_4 [(\text{MoO}_3)]_{12}$ ) qui en présence d'un antioxydant est réduit en un complexe phosphomolyb-2-molybdique ( $\text{H}_3\text{PO}_4 [(\text{MoO}_3)_{12}\text{MoO}_2]_2$ ) de couleur bleue absorbant à 695 nm.

### **Mode opératoire**

Ce test a été réalisé selon la méthode décrite par **Prieto et al., (1999)**. Dans chaque tube à essai ont été introduit 50  $\mu\text{L}$  d'extrait (concentration finale 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ou du méthanol (contrôle négatif), 1000  $\mu\text{l}$  de la solution d'acide sulfurique 0.6 M, 1050  $\mu\text{L}$  de la solution de phosphate de sodium 28 mM et 1050  $\mu\text{L}$  de la solution de molybdate d'ammonium 4 mM. Le mélange a été incubé à 95 °C pendant 90 minutes. Après refroidissement à température ambiante, la densité optique a été lue à 695 nm.

Pour l'étalon, la solution appropriée d'acide ascorbique a été utilisée et une courbe d'étalonnage (voir annexe) a été obtenue en utilisant des concentrations comprises entre 0 et 100  $\mu\text{g} /\text{mL}$  d'acide ascorbique. La capacité antioxydante a été estimée en mg équivalent d'acide ascorbique par g d'extrait (mg EAA/g d'extrait).

## **II-2-2-2-Effet des extraits bruts de plantes sur la peroxydation lipidique**

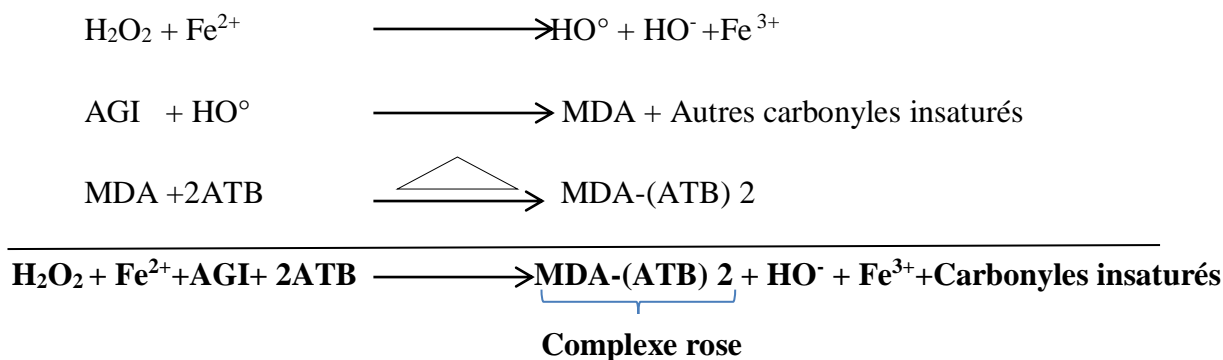
### **II-2-2-2-1-Préparation de l'homogénat du cerveau du rat**

Après sacrifice d'un rat par dislocation cervicale, le cerveau a été isolé et rincé dans l'eau physiologique NaCl 0,9% puis essoré à l'aide d'un papier filtre. Le cerveau a été ensuite pesé, découpé en petits morceaux et homogénéisé à raison de 10% (p/v) avec une solution de KCl 1,15% dans la glace à l'aide d'un homogénéisateur. L'homogénat a été centrifugé (3000 trs/min, 10 min, 4°C) puis le surnageant récupéré et conservé à -20°C jusqu'à utilisation.

### **II-2-2-2-2-Inhibition de la peroxydation lipidique dans l'homogénat de cerveau du rat**

#### **Principe**

En présence du  $\text{FeCl}_2$  et du  $\text{H}_2\text{O}_2$ , les acides gras polyinsaturés sont oxydés et il y a formation du malon dialdéhyde (MDA). Celui-ci réagit en milieu acide et à chaud, avec l'acide Thiobarbiturique pour former un complexe coloré rose qui absorbe à 532 nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité du complexe formé dans le milieu.



### Mode opératoire

Ce test a été réalisé selon la méthode décrite par **Jeong et al., (2011)**. En effet, dans chaque tube à essai ont été introduit successivement 50  $\mu\text{L}$  d'extrait de plante (0,1; 1; 10 et 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 1 mL d'homogénat du cerveau 10%, 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{FeCl}_2$  0,5 mM et 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,5 mM. La peroxydation lipidique a été induite dans l'homogénat du cerveau de rats par les ions  $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Dans les tubes contrôles négatifs, 50  $\mu\text{L}$  de DMSO a été introduit à la place de l'extrait et dans le tube blanc, l'homogénat a été introduit plus tardivement. Après incubation pendant 1h à 37°C, 1mL de TCA 15% et 1mL de TBA 0,67% ont été ajoutés dans les tubes. Dans le tube blanc, 1mL d'homogénat a été ajouté. L'ensemble a été porté à ébullition pendant 15 minutes au bain marie. Après refroidissement et centrifugation des tubes (3000 trs/min, 5 min, 4°C), l'absorbance du surnageant a été lue à 532 nm contre le blanc. Le trolox a été utilisé comme composé de référence. Le pourcentage d'inhibition a été enfin calculé en utilisant l'équation suivante :

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{\text{DO contrôle} - (\text{DO}_1 - \text{DO}_2)}{\text{DO contrôle}} \times 100$$

DO contrôle = Absorbance du tube contrôle négatif

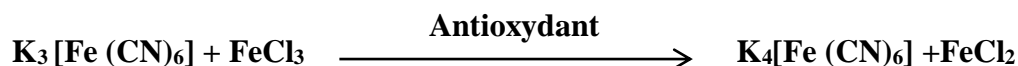
DO<sub>1</sub> = Absorbance du tube essai

DO<sub>2</sub> = Absorbance du tube sans homogénat

### II-2-2-2-3-Test du pouvoir réducteur des extraits bruts de plantes

#### Principe

La méthode est basée sur la réaction de réduction du  $\text{Fe}^{3+}$  présent dans le complexe ferricyanure de potassium ( $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ) en  $\text{Fe}^{2+}$ , la réaction est révélée par le virement de couleur jaune du fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) en couleur bleu vert du fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ), l'intensité de cette coloration est mesuré par spectrophotométrie à 700 nm.



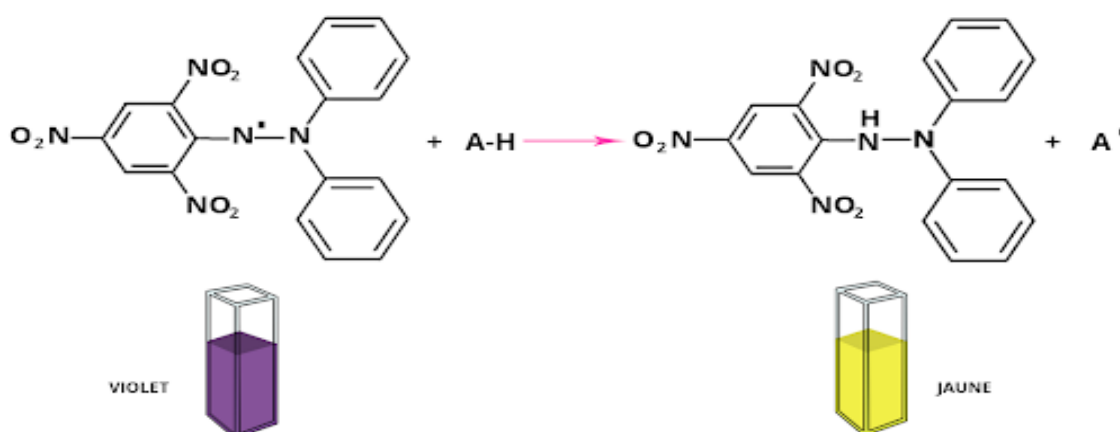
### Mode opératoire

Ce test a été réalisé selon la méthode décrite par **Moyo et al., (2010)**. Dans chaque tube à essai ont été ajoutés 50  $\mu\text{L}$  d'une solution d'extrait (concentration finale 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ou de la vitamine C (contrôle positif), 1100  $\mu\text{L}$  de tampon phosphate (0,2 M pH= 6,6) et 1 mL d'une solution de ferricyanure de potassium 0,25%. Le tout a été incubé à 50°C pendant 20 min, puis refroidi à la température ambiante. Après refroidissement, 1 mL d'acide trichloracétique 10% ont ajoutés pour stopper la réaction, puis les tubes ont été centrifugés à 3000 trs/min pendant 10 min. A 1 mL du surnageant ont été ajoutés 1ml d'eau distillée puis 200  $\mu\text{L}$  d'une solution de chlorure ferrique 0,02%. Après 10 min d'incubation, la lecture des absorbances a été faite contre un blanc à 700 nm. Dans le tube blanc, 200  $\mu\text{L}$  du tampon phosphate a été ajouté à la place de  $\text{FeCl}_3$ .

#### II-2-2-2-4-Test anti-radicalaire au DPPH

### Principe

L'antioxydant (AH) stabilise le radical libre DPPH° en DPPH-H en lui transférant son atome d'hydrogène (H) ce qui entraîne un changement de couleur de la solution méthanolique de DPPH qui passe progressivement du violet au jaune. Cette décoloration est suivie à 517 nm.



### Mode opératoire

Ce test a été réalisé selon la méthode décrite par **Magama et al., (2013)**. Le DPPH a été solubilisé dans le méthanol pour avoir une solution de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Dans des tubes ont été introduit 50  $\mu\text{L}$  de chaque extrait à différentes concentrations (0,1; 1; 10 et 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 3100

µL de la solution méthanolique de DPPH. Après agitation par un vortex, les tubes ont été placés à l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes. La lecture a été effectuée par la mesure de l'absorbance à 517 nm.

Le contrôle négatif était composé de 3100 µL de la solution méthanolique au DPPH, 50 µL de DMSO. Le contrôle positif (composé de référence) était la vitamine C préparé aux mêmes concentrations que les extraits.

### **II-2-2-3- Analyse quantitative des polyphénols totaux et flavonoïdes présents dans chaque extrait brut de plante**

Afin d'avoir une idée sur la composition phytochimique des extraits de plantes, les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes ont été quantifiées.

#### **II-2-2-3-1-Détermination de la teneur en polyphénols totaux des différents extraits**

##### **Principe**

Le réactif de Folin-Ciocalteu est un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) qui par réduction lors de l'oxydation des phénols, donne un mélange d'oxydes bleus de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et de molybdène ( $Mo_8O_{23}$ ). La coloration bleue obtenue possède une absorption maximale comprise entre 725 et 750 nm et est proportionnelle à la quantité de composés phénoliques.

##### **Mode opératoire**

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué avec le réactif colorimétrique Folin-Ciocalteu selon la méthode de **Wong et al., (2006)**. Dans chaque tube à essai ont été introduit successivement 50 µL de chaque extrait (100 µg/mL) dissous dans le méthanol, 2,4 mL d'eau distillée, 0,2 mL de réactif de Folin-Ciocalteu 2N et 0,5 mL de la solution de carbonate de sodium  $Na_2CO_3$  20%. Le mélange final a été secoué et puis incubé pendant 1 heure dans l'obscurité à température ambiante. L'absorbance de tous les extraits a été mesurée par un spectrophotomètre à 765 nm.

L'échantillon a été testé en triple et une courbe d'étalonnage (voir en annexe) avec six points de données pour l'acide gallique avec une concentration allant de 0 à 50 µg /mL a été obtenue. Les résultats ont été projetés sur la courbe d'étalonnage de l'acide gallique et la teneur en polyphénols totaux a été exprimée en microgrammes d'équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g).

### **II-2-2-3-2-Détermination de la teneur en flavonoïdes dans les extraits de plantes**

#### **Principe**

La méthode colorimétrique de trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) a été utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans nos extraits.

#### **Mode opératoire**

A 0,5 mL de chaque extrait (100  $\mu\text{g/mL}$ ) et du standard (dissous dans le méthanol) a été ajouté un volume égal d'une solution d' $\text{AlCl}_3$  (2% dans le méthanol). Le mélange a été vigoureusement agité et l'absorbance lue à 430 nm après 1h d'incubation (**Rahman et al., 2013**).

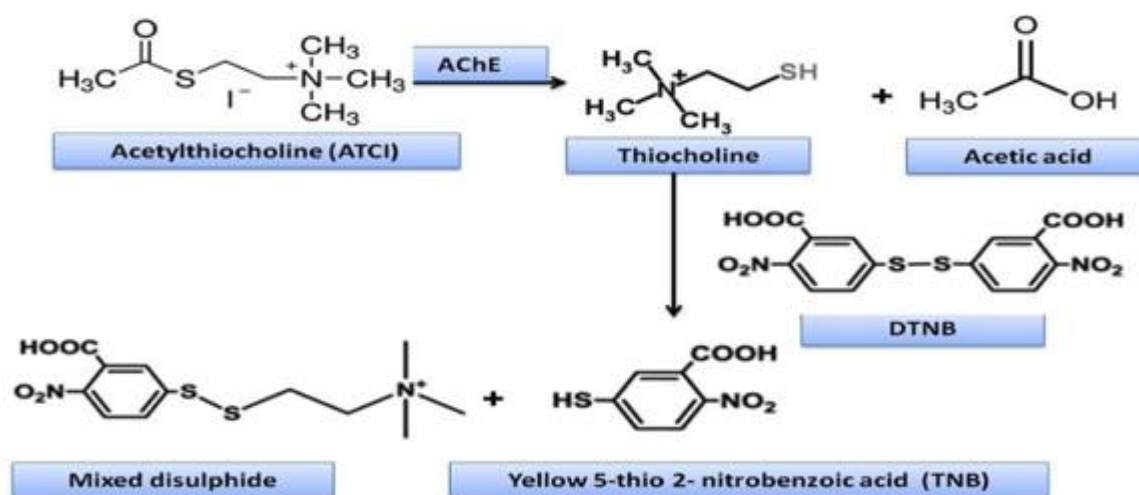
La courbe d'étalonnage (voir en annexe) a été obtenue en utilisant une solution de quercétine dissoute dans du méthanol à une concentration allant de 0 à 50  $\mu\text{g/mL}$ . La teneur en flavonoïdes totaux des échantillons a été exprimée en milligrammes d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g).

### **II-2-2-4- Evaluation de l'activité anti-acétylcholinestérase des extraits bruts de plantes**

Une augmentation de l'activité de l'acétylcholinestérase a été observée au cours de certaines maladies neurodégénératives telles que la MA et la MP. Donc une inhibition de cette enzyme permet un bon fonctionnement du système cholinergique.

#### **Principe**

L'acétylcholinestérase hydrolyse le substrat ATCI (Iodure d'acétylthiocholine) en thiocholine et acétate, produits non colorés. La thiocholine en présence du DTNB (acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque) donne un produit jaune, le 5-thio-2-nitrobenzoate, ce qui permet de suivre la cinétique au spectrophotomètre à 405 nm. Les réactions ci-dessous indiquent l'hydrolyse de l'ATCI et la transformation de la thiocholine en produit coloré.



### Réaction d'hydrolyse de l'acétylcholine par l'acétylcholinestérase

#### Mode opératoire

L'inhibition de l'activité de l'acétylcholinestérase a été déterminée en utilisant la méthode colorimétrique d'Ellman., 1961 modifiée par **Adewusi et al., (2012)**. Dans une cuve spectrophotométrique, ont été ajoutés successivement 50 µL d'extrait (25; 50; 100 et 200 µg/mL), 100 µL de IATch 1,5 mM, 500 µL de DTNB 3 mM, 250 µL de tampon B (Tris-HCl 50 mM ; pH 8 ; BSA 0,1%). L'absorbance a d'abord été lue 5 fois à 405 nm afin d'éliminer toute activité enzymatique parasite et la contribution de couleur dues aux extraits de plantes. Après ajout de 100 µL d'AChE (type VI-S de electric eel de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).préalablement incubé à 37°C, l'absorbance a été lue chaque 15 secondes pendant 5 min.

$$\% \text{ Inhibition} = 100 - \left[ \frac{\text{Absorbance de l'échantillon}}{\text{Absorbance du contrôle}} \right] \times 100$$

La concentration de l'extrait offrant 50% d'inhibition (CI<sub>50</sub>) a été obtenue en traçant le pourcentage d'inhibition contre la concentration de l'extrait.

#### II-2-2-5- Activité anti-inflammatoire des extraits bruts de plantes

L'implication de l'inflammation dans la pathogenèse des maladies neurodégénératives est de plus en plus élucidée dans la littérature. La mort des neurones est étroitement liée à la production accrue de l'oxyde nitrique (NO) et à l'activation de la lipoxygénase (**Hirsch et al., 2012; Yuste et al., 2015; Phillis et al., 2006**). Dans cette étude, l'activité anti-inflammatoire des extraits bruts de plantes a été réalisée en évaluant l'inhibition de la production de NO par les cellules Raw 264.7 activées par le lipopolysaccharide (LPS) et l'inhibition de la lipoxygénase.

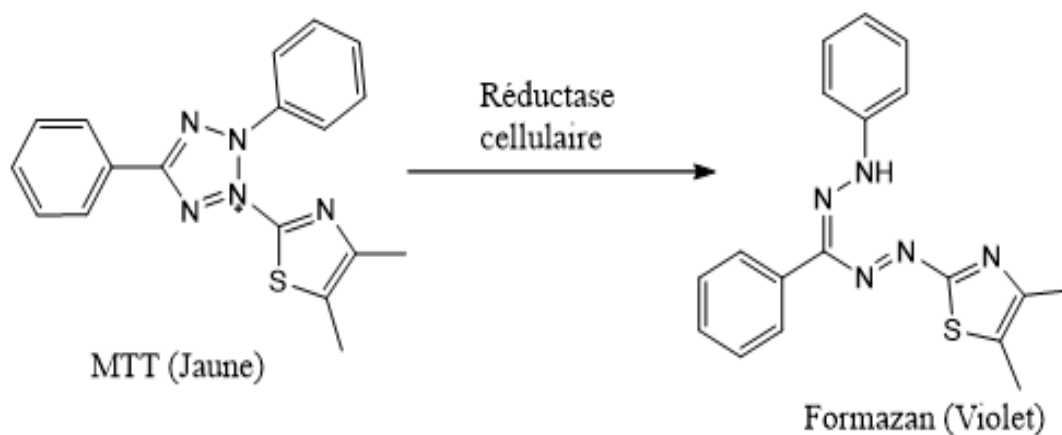
### II-2-2-5-1-Culture cellulaire et traitement avec les extraits bruts de plantes

Les macrophages Raw 264.7 ont été maintenues à 37°C dans un incubateur sous une atmosphère de 5% CO<sub>2</sub> et 95% O<sub>2</sub> dans le milieu DMEM contenant la L -glutamine (4,5 g/L and 4 mM) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal et 1% de solution de PSF (pénicilline/streptomycine/fongizone). Cent microlitres de suspension cellulaire (2×10<sup>6</sup> cellules par mL) ont été introduits dans chaque puits de la plaque de 96 puits et incubées toute la nuit pour permettre l'attachement des cellules au fond des puits. Après cette incubation, les cellules ont été traitées avec du LPS (concentration finale : 1 µg/mL) seul ou avec du LPS et différentes concentrations (12,5; 25; 50 et 100 µg/mL) d'extraits dissouts dans du DMSO et puis dilué dans le milieu de culture (concentration finale du DMSO 0,2%). Après 24h d'incubation, le surnageant a été retiré pour le dosage de NO et les cellules restantes dans la plaque utilisées pour la mesure de la viabilité cellulaire dans du PBS en utilisant le test au MTT. La quercétine, un inhibiteur standard de NO a été utilisé comme contrôle positif.

#### II-2-2-5-1-1-Mesure de la viabilité cellulaire : Test au MTT

##### Principe

Le test au MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium bromide) est une méthode colorimétrique permettant de déterminer la viabilité cellulaire à travers l'évaluation l'activité métabolique des cellules. Le principe du test repose sur l'utilisation d'un sel de tétrazolium qui est réduit en formazan par certains enzymes intracellulaires des cellules vivantes. La quantité de formazan produite est proportionnelle à l'activité métabolique des cellules. Ce composé insoluble de couleur violette devra être solubilisé par du DMSO ou de l'isopropanol pour permettre son dosage spectrophotométrique à 570 nm (Mosmann, 1983).



#### Réaction de réduction du MTT en formazan par la réductase



## Mode opératoire

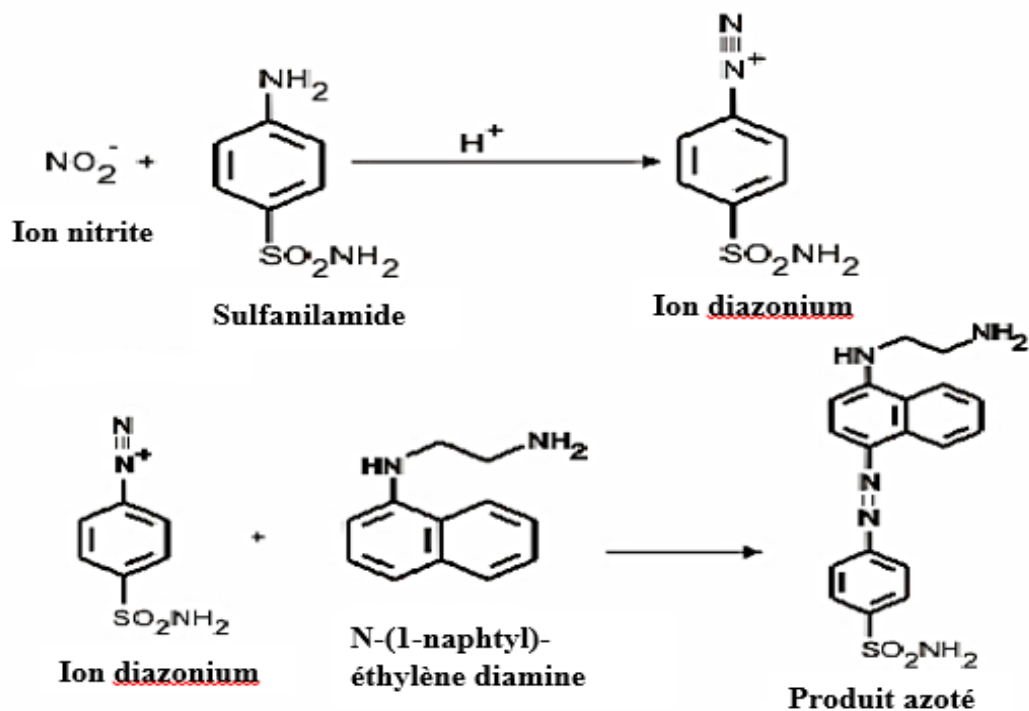
Après traitement, 200  $\mu\text{L}$  de milieu de culture DMEM frais et 30  $\mu\text{L}$  de la solution de MTT préparée avec le PBS (5 mg/mL) ont été ajoutés suivi d'une incubation 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  pendant 4 heures. Le milieu de culture a été ensuite aspiré à l'aide d'une pompe (Integra, USA), puis les cristaux de formazan dissous dans 50  $\mu\text{L}$  de DMSO. L'absorbance a été lue à 570 nm au moyen d'un lecteur de microplaque (Synergy Multi-Mode Reader, BioTek). Le pourcentage de viabilité cellulaire a été calculé par rapport à la valeur obtenue avec les cellules traitées avec du LPS seul considéré comme 100% de viabilité.

$$\% \text{ de viabilité} = (\text{Absorbance du groupe test} / \text{Absorbance du groupe témoin}) \times 100$$

### II-2-2-5-1-2-Mesure de la production de l'Oxyde Nitrique (NO)

#### Principe

En milieu acide et en présence de nitrite formé, l'acide nitreux diazotise le sulphanilamide et le produit est couplé à la N-(1-naphtyl) éthylène diamine. Le colorant azoïque résultant a une couleur rouge vif pourpre qui peut être mesurée à 540 nm.



Réaction de diazotation entre le nitrite, la sulfanimide et le N-(1-naphtyl)-éthylène diamine

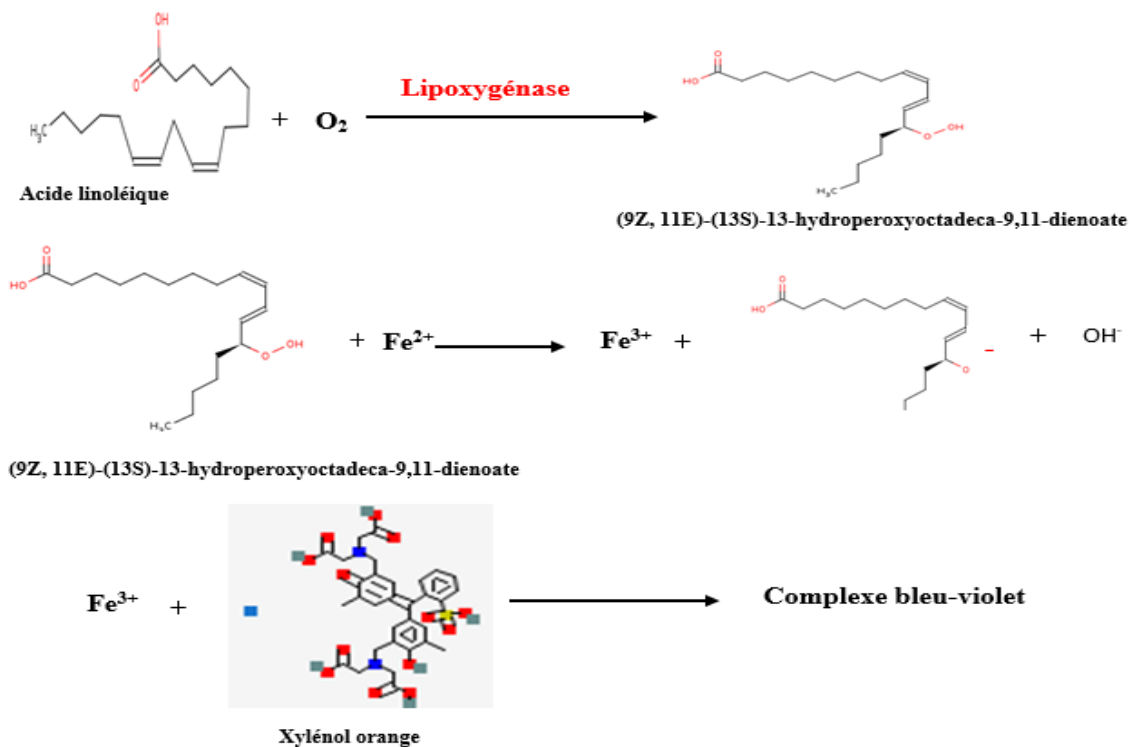
## **Mode opératoire**

La production de NO est déterminée en mesurant le niveau d'accumulation de nitrite, un indicateur de NO dans le surnageant après 24 heures de traitement avec les LPS en présence ou en absence des différentes concentrations d'extraits de plantes, en utilisant une réaction colorimétrique avec le réactif de Griess. Après 24 heures d'incubation, 100  $\mu$ L du surnageant de chaque puits ont été transférés dans une nouvelle microplaque de 96 puits et un volume équivalent de réactif de Griess (1% sulfanilamide et 0,1 % naphthyléthylène diamine dihydrochloride dans 2,5% d'acide phosphorique) a été ajouté. Le mélange a été ensuite laissé à l'obscurité et à température ambiante pendant 15 minutes, puis l'absorbance mesurée à 550 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque (Synergy Multi-Mode Reader, BioTek). La concentration du nitrite a été déterminée à partir d'une courbe standard de nitrate de sodium (0-100  $\mu$ M). Le pourcentage d'inhibition a été calculé sur la base de l'habilité des extraits à inhiber la production de l'oxyde nitrique par les cellules comparé avec le contrôle négatif (Cellules traitées avec du LPS sans extraits) considéré comme 0% d'inhibition (voir formule 1).

### **II-2-2-5-2-Effet des extraits bruts de plantes sur l'inhibition de la lipoxygénase**

#### **Principe**

Le test repose sur le principe selon lequel, dans des conditions acides, l'hydroperoxyde lipidique peut oxyder le  $Fe^{2+}$  en  $Fe^{3+}$ , lequel oxyde ensuite le xylénol orange pour former un complexe  $Fe^{3+}$ / xylénol orange qui absorbe à 560 nm.



### Réaction d'oxydation de l'acide linoléique en un complexe Fe<sup>3+</sup>/ xylénol orange par la lipoxygénase

#### Mode opératoire

Ce test a été réalisé selon la méthode décrite par **Dzoyem and Eloff., (2015)**. La 15-lipoxygénase (*Glycine max*) 40 µL a été incubée avec différentes concentrations des extraits de plantes ou la quercétine (contrôle positif) à température ambiante pendant 5 minutes. Puis l'acide linoléique (concentration finale 140 µM) dans le tampon Tris-HCl (50 mM, pH 7.4) a été ajouté et le mélange incubé à l'obscurité et à température ambiante pendant 20 minutes. Le test a été terminé par ajout de 100 µL de réactif de FOX [Acide sulfurique (30 mM), xylénol orange (100 µM), sulfate de fer (II) (100 µM), méthanol/Eau (9/1)]. L'inhibition de la lipoxygénase par les extraits de plantes a été déterminée en calculant le pourcentage d'inhibition de la production d'hydro-péroxyde à partir de la valeur de l'absorbance lu à 560 nm après 30 minutes à 25°C.

$$\% \text{ Inhibition} = \left[ \frac{\text{Absorbance du contrôle} - \text{Absorbance de l'extrait}}{\text{Absorbance du contrôle}} \right] \times 100$$

### **II-2-3- Evaluation *in vitro* de l'effet protecteur de certains extraits bruts de plantes contre la toxicité induite par l'aminochrome sur les cellules astrocytomes humaines**

L'aminochrome formé par auto-oxydation de la dopamine entraîne une toxicité par divers mécanismes au niveau neuronal et astrocytaire. Il a été démontré que un dysfonctionnement des astrocytes augmente la susceptibilité des neurones à la mort . Au niveau des astrocytes cette toxicité est fortement diminuée car présence de l'enzyme glutathion s-transférase mu 2 capable de conjuguer le glutathion avec l'aminochrome. Les extraits bruts de plantes qui protégeraient ces astrocytes contre la toxicité de l'aminochrome seront considérés comme actifs. Trois types cellulaires ont été utilisés, les cellules U373MG normales, les Cellules U373MGsiGST6 dans lesquelles l'expression de l'enzyme glutathion transférase humaine Mu 2 (GSTM2) est réduite à 74% par des small interferences RNA dirigées contre l'enzyme par rapport aux cellules normales, et les cellules U373MGpSR, où les plasmides vides ont été introduits servant de control cellulaire .

#### **II-2-3-1- Culture Cellulaire**

Les cellules ont étéensemencées dans les boîtes de pétri (10 cm de diamètre) à raison de  $10^7$  cellules pour 10 mL de milieu de culture RPMI-1640 (ATCC, 30-2001) contenant 2 mM de L-glutamine, 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate, 4,5g/l glucose, et 1500 mg/L sodium bicarbonate, supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal Fetalclone III, Hyclone (Thermo Scientific, SH30109.03), 10 U / mL sodium pénicilline, 10 U /mL streptomycine sulfate, et amphotéricine. Les cellules ont été cultivées en atmosphère 5% CO<sub>2</sub> à 37°C et le milieu de culture changé après chaque 2 jours jusqu'à ce qu'on atteigne une confluence de 80-100% (**Huenchuguala et al., 2014**). Une fois cette confluence atteinte, le milieu de culture a été aspiré à l'aide d'une pompe et les cellules lavées 2 fois avec du tampon phosphate salin (PBS 0.1M pH 7.4) stérile. Après lavage, les cellules ont été détachées par incubation pendant 2 minutes avec 3 mL d'une solution de Trypsine-EDTA 0,25%. La collecte a été ensuite réalisée en ajoutant 2 mL de milieu de culture puis l'ensemble mélangé plusieurs fois à l'aide d'une pipette stérile. Les cellules ainsi collectées ont été centrifugées (800g, 5 min, 25°C) et le culot cellulaire a été suspendu dans 10 mL de milieu de culture. Cent microlitres de cette suspension ont été prélevés pour le comptage cellulaire au bleu trypan dans une cellule de *Neubauer*. Après comptage, une partie a été réensemencée dans les nouvelles boîtes de pétri et le reste utilisé pour les expériences.

## **II-2-3-2- Evaluation *in vitro* de la toxicité des extraits bruts de plantes**

### **II-2-3-2-1-Traitement des cellules avec les extraits bruts de plantes**

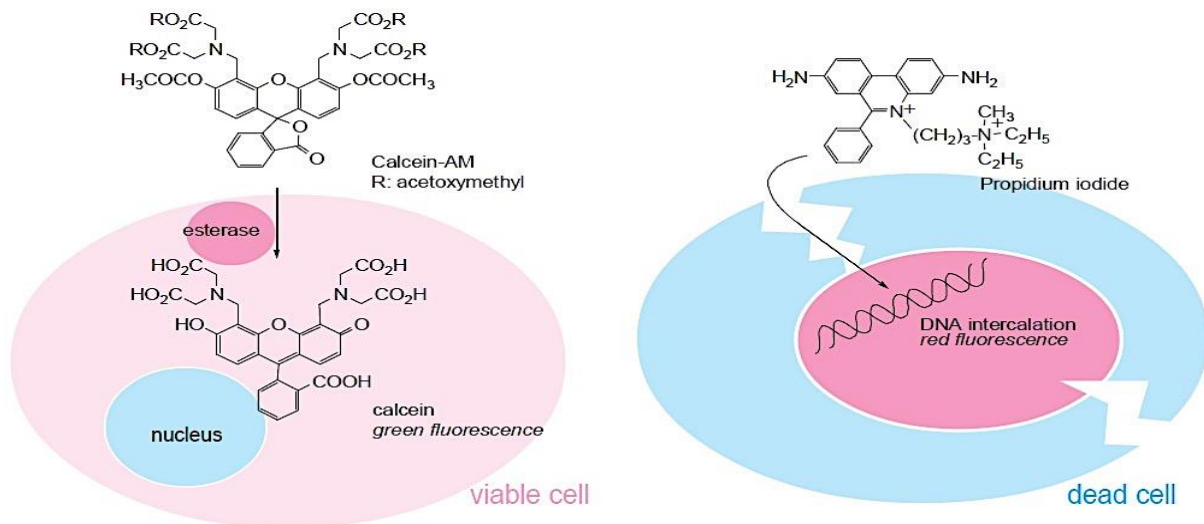
Les différentes lignées cellulaires (U373MG, U373MGsiGST6 et U373MGpSR) ont été cultivées à 37° C sous 5% de CO<sub>2</sub> dans des boîtes de Pétri dans du milieu RPMI-1640 (ATCC, 30-2001) contenant 2 mM de L-glutamine, 10 mM de HEPES, 1 mM du pyruvate de sodium, 4,5 g /L de glucose et 1500 mg /L de bicarbonate de sodium, supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal, Hetalone Fetalclone III (Thermo Scientific, SH30109.03), 10 U / mL de pénicilline sodique, 10 U / mL de sulfate de streptomycine et amphotéricine. Un millilitre d'une suspension cellulaire (5 x 10<sup>6</sup> cellules par mL) a étéensemencée dans des plaques à 24 puits et les cellules ont été incubées pendant une nuit à 37° C avec 5% de CO<sub>2</sub> pour permettre l'adhésion des cellules au fond de la plaque. Ensuite, après avoir retiré le milieu en utilisant une pompe aspirante, du milieu frais a été ajouté et les cellules ont été incubées avec différentes concentrations (100, 50, 25 et 12,5 µg / mL) des extraits dissous dans du DMSO et dilués dans du milieu de culture (Concentration DMSO dans le milieu 0,2%) pendant 24 heures. Le traitement a été fait en triplicate.

### **II-2-3-2-2-Test de mortalité cellulaire par cytométrie en flux**

#### **Principe**

La cytométrie en flux est une technique qui permet la mesure simultanée de plusieurs caractéristiques physiques et biologiques d'une cellule. Elle permet de mesurer sur une suspension de particules (cellules, bactéries, parasites, billes.) les caractéristiques individuelles de chaque particule telle que la taille, la forme et la complexité et n'importe quel composant ou fonction qui puisse être détecté par un composé fluorescent. Les cellules en suspension passent une à une devant un ou plusieurs faisceau(x) laser et des détecteurs captent des signaux émis par chaque cellule tels que : La lumière diffusée aux petits angles (Forward Scatter, FSC) qui renseigne sur la taille des particules. La lumière diffusée à 90 degrés (Side Scatter – SSC) qui renseigne sur la forme, la structure interne et la granularité des particules. Les signaux de fluorescence : Fluorescence émise par la cellule elle-même (auto fluorescence) et Fluorescence émise par un anticorps couplé à un fluorochrome et qui se lie spécifiquement à la cellule. Deux réactifs fluorescents ont été utilisés dans ce travail : L'acétoxyméthyl-calceïne (calceïne-AM) et à l'iodure de propidium. Ce sont deux réactifs fluorescents qui distinguent la population de cellules vivantes de la population de cellules mortes en utilisant 510–560 nm (excitation) et LP-590 nm (émission) pour l'iodure de propidium et 450–490 nm (excitation) et 515–565 nm (émission) pour la calceïne-AM. La calceïne-AM marque les cellules vivantes en vert fluorescent, après son hydrolyse par les estérases présentes dans les

cellules viables. Les cellules vivantes aux membranes intactes se distinguent par leur capacité à exclure l'iodure de propidium (PI), qui pénètre facilement dans les cellules mortes ou endommagées et s'intercalant dans l'ADN des cellules mortes.



### Réaction d'hydrolyse de la calcéine AM par les estérases en un composé vert fluorescent et intercalation de l'Iodure de propidium dans l'ADN avec émission d'une fluorescence rouge

#### Mode opératoire

La mortalité cellulaire a été mesurée en comptant les cellules vivantes et mortes avec un appareil de cytométrie en flux (FACSCalibur, BD Biosciences, USA), après coloration à la calcéine-AM et à l'iodure de propidium. Ce sont deux réactifs fluorescents qui distinguent la population de cellules vivantes de la population de cellules mortes en utilisant 510–560 nm (excitation) et LP-590 nm (émission) pour l'iodure de propidium et 450–490 nm (excitation) et 515–565 nm (émission) pour la calcéine AM. Après traitement, le milieu a été soigneusement éliminé et les cellules lavées avec du PBS 3 fois, avant incubation pendant 30 min à l'obscurité avec 500 µL du mélange calcéine AM (0,5 µM) et iodure de propidium (5 µM), préparé dans du PBS. Après incubation, la solution contenant du PBS a été retirée, puis 500 µL de trypsine / EDTA à 0,5% ont été ajoutés pour détacher les cellules pendant un temps nécessaire pour le détachement des cellules et 500 µL de milieu frais ajouté dans chaque puits avant de les recueillir dans le tube. Après centrifugation (3000 g x 5 min), le culot a été remis en suspension dans 1 mL de tampon de coloration pour cytométrie en flux pour analyse. La double analyse a été introduite à l'aide d'un diagramme de points en quadrant dans lequel les

cellules mortes ont été identifiées comme étant positives pour l'iodure de propidium. Les cellules vivantes n'étaient positives que pour la calcéine AM, et les cellules en apoptose tardive ont été reconnues comme étant double positives pour la calcéine AM et l'iodure de propidium. Enfin, le nombre de cellules de chaque catégorie nous a permis de calculer le pourcentage de mortalité selon la formule ci-contre:

$$\% \text{ de mortalité} = \left[ \frac{\text{Nbre Mo} + \text{Nbre Ap}}{\text{Nbre Vi} + \text{Nbre Mo} + \text{Nbre Ap}} \right] \times 100$$

Nbre Mo: Nombre des cellules mortes

Nbre Ap: Nombre des cellules en apoptose

Nbre Vi: Nombre des cellules vivantes

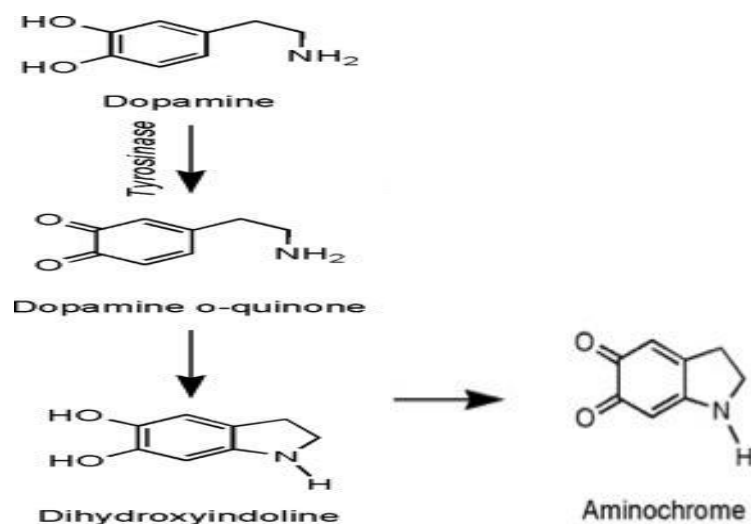
### **II-2-3-3- Évaluation *in vitro* de l'effet protecteur des extraits bruts de plantes contre la toxicité induite par l'aminochrome**

#### **II-2-3-3-1-Synthèse et purification de l'aminochrome**

##### **Principe**

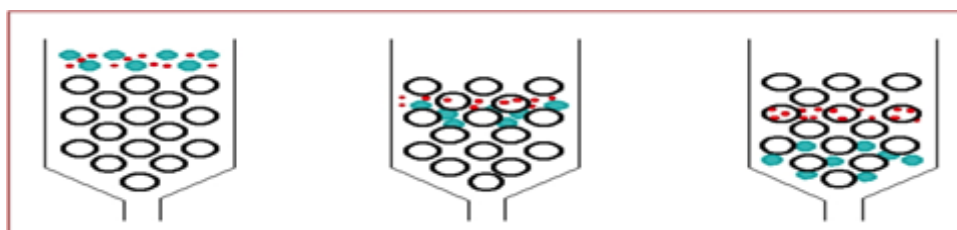
L'aminochrome est formé par l'oxydation de la dopamine par la tyrosinase à pH physiologique, qui peut encore être purifiée par chromatographie. Il est stable pendant environ 3 heures.

**Synthèse :** La dopamine dissociée peut être oxydée en un radical o-sémiquinone de dopamine par réduction d'une molécule d'oxygène pour former un radical superoxyde. Le radical o-sémiquinone dopamine peut alors être disproportionné avec un autre radical o-sémiquinone dopamine, générant une molécule de dopamine et une molécule de o-quinone de dopamine. Alternativement, le radical o-sémiquinone de dopamine peut subir une oxydation d'un électron en o-quinone de dopamine en réduisant une molécule d'oxygène moléculaire en un radical superoxyde. La dopamine o-quinone se cyclise immédiatement pour former un aminochrome, qui n'est stable que dans les environnements dont le pH est inférieur à 2.



### Synthèse de l'aminochrome à partir de la dopamine et la tyrosinase

**Purification :** Elle se fait par chromatographie d'exclusion ou gel filtration. Elle est basée sur la séparation des molécules à travers un gel poreux en fonction du poids moléculaire de la protéine.



### Purification de l'aminochrome par chromatographie d'exclusion

#### Mode opératoire

Pour la synthèse de l'aminochrome, la dopamine (7,5 mM) et 10 ng de tyrosinase ont été incubés dans du tampon phosphate de potassium 25 mM, pH 6, pendant 15 à 20 minutes à température ambiante. Pour la purification de l'aminochrome, la solution d'incubation a été chargée sur une colonne CM-Sephadex C50-1000 (18 x 0,7 cm) (Sigma-Aldrich, C25120). La solution rouge-orange correspondant à l'aminochrome a été recueillie et détectée par spectrophotométrie en mesurant l'absorbance à 480 nm. La concentration en aminochrome a été déterminée par le coefficient d'extinction molaire de 3058 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Segura-Aguilar et Lind, 1989).

$$\text{Concentration d'AM en } \mu\text{M} = \frac{\text{Absorbance à 480 nm}}{3058 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} (\text{coefficient d'extinction Moléculaire})} \times 10^4$$



### **II-2-3-3-2-Culture cellulaire et traitement**

Les différentes lignées cellulaires ont été cultivées comme décrit dans le paragraphe II-2-3-2-1. Après pré-incubation pendant 2 heures des cellules avec différentes concentrations des extraits dissous dans du DMSO pure, puis dilués dans le milieu de culture (Concentration DMSO dans le milieu 0,2%), les cellules ont été intoxiquées par incubation dans un milieu contenant de l'aminochrome (concentration finale : 75  $\mu$ M). La nicotine provenant de Sigma, St.Louis, MO, USA (20 et 50  $\mu$ M), un protecteur contre la toxicité de l'aminochrome, a servi de contrôle positif (Muñoz *et al.*, 2012). La concentration en aminochrome (75  $\mu$ M) utilisée était basée sur la précédente étude qui a montré que, à cette concentration l'aminochrome induit la mort cellulaire après 24h d'incubation avec les mêmes lignées cellulaires (Huenchuguala *et al.*, 2014). Après 24h d'incubation, la mortalité cellulaire a été mesurée.

### **II-2-3-3-3-Test de mortalité cellulaire par cytométrie en flux**

La mortalité cellulaire a été mesurée comme décrit dans le paragraphe II-2-3-2-2 en comptant les cellules vivantes et mortes avec un appareil de cytomètre en flux (FACSCalibur, BD Biosciences, USA), après coloration avec de la calcéine AM et de l'iodure de propidium.

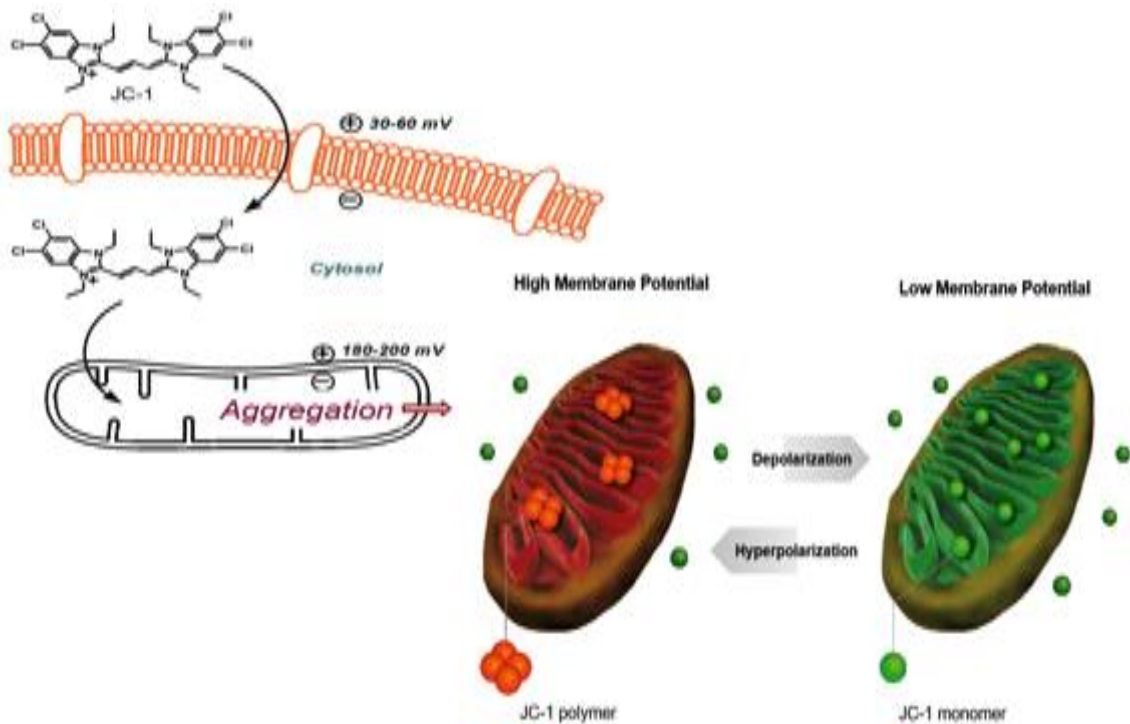
### **II-2-3-4- Evaluation *in vitro* de l'effet des extraits bruts de plantes sur le dysfonctionnement du potentiel de membrane mitochondriale ( $\Delta\Psi_m$ ) induit par l'aminochrome**

Le potentiel de la membrane mitochondriale constitue un indicateur sensible de l'état énergétique et fonctionnel des cellules. L'évaluation du potentiel de la membrane mitochondriale a été faite selon le protocole du kit MitoProbe™ JC-1 Assay Kit.

#### **Principe**

La technique de coloration JC-1 a été développée dans le but de détecter le potentiel membranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) dans des cellules viables intactes afin d'avoir les informations nécessaires sur leurs conditions physiopathologiques. Le colorant cyanique JC-1 (5,5',6,6'-tétrachloro-1,1,3,3'-tétraéthylbenzimidazolylcarbocyanine iodure) colorant fluorescent cationique lorsqu'il est ajouté à des cellules vivantes, est connu pour être localisé exclusivement dans les mitochondries, en particulier dans de bonnes conditions physiologiques caractérisées par un potentiel de membrane mitochondriale ( $\Delta\Psi_m$ ) suffisant. L'accumulation de JC-1 dans ces organites conduit à la formation d'agrégats J (avec un maximum spécifique d'émission de fluorescence rouge à 590 nm), qui s'ajoute à la

fluorescence verte typique des monomères J (maximum d'émission de 529 nm). L'absence de  $\Delta\Psi_m$  conduit à la dépression de l'accumulation mitochondriale de JC-1 et à une diminution de la formation d'agrégats J. Par conséquent, le rapport entre la fluorescence rouge et verte des cellules chargées de JC-1 est souvent utilisé pour la détection du potentiel de la membrane mitochondriale. Ce rapport de la fluorescence rouge / verte est indépendant de la forme, de la densité ou de la taille des mitochondries et dépend uniquement du potentiel de la membrane.



### Accumulation du colorant cyanique JC-1 dans les mitochondries

#### Mode opératoire

L'évaluation du potentiel de la membrane mitochondriale a été évalué selon le protocole du kit MitoProbe™ JC-1 Assay Kit. Les différentes lignées cellulaires ont été cultivées comme décrit précédemment. Ensuite, les cellules ont été activées par incubation dans un milieu contenant de l'aminochrome (concentration finale : 75  $\mu\text{M}$ ) seul (contrôle négatif) ou de l'aminochrome avec différentes concentrations des extraits dissous dans du DMSO, puis dilués dans le milieu de culture pendant 24 heures à 37°C avant analyse à l'aide de l'appareil de cytométrie en flux (FACSCalibur, BD Biosciences, USA). Le rapport de la fluorescence rouge / verte a été déterminé.

#### **II-2-4-Analyses statistiques des résultats**

Les données sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart type de tests effectués en triple. Les valeurs  $CI_{50}$  (concentration inhibitrice 50) des échantillons ont été calculées en traçant la courbe de régression non linéaire du pourcentage d'inhibition par rapport au logarithme des concentrations à l'aide du logiciel GraphPad Prism Software 5.0. Les résultats ont été analysés statistiquement à l'aide du même logiciel. La signification statistique a été évaluée à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) pour des comparaisons multiples. Le test post-hoc par le test de Bonferroni a été effectué pour distinguer quels groupes étaient spécifiquement différents. Le seuil de probabilité  $p < 0,05$  a été considéré comme statistiquement différent.



## **CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSIONS**

## **RESULTATS**

### **III-1- Enquete ethnobotanique**

#### **III-1-1- Résultat de l'enquête ethnobotanique**

Dix (10) tradi-thérapeutes ont été interviewés individuellement et ont livré les recettes utilisées pour traiter différentes formes de troubles neurologiques (dépression, agitations, maux de tête, insomnie, schizophrénie, épilepsie, migraine, anxiété, convulsions, mal des nerfs). A cet effet, 30 espèces de plantes ont été recensées appartenant à 19 familles ; la famille des Asteraceae est la plus représentée avec 6 espèces, suivie de la famille des Euphorbiaceae avec 3 espèces (Figure 24). L'enquête a révélé que les feuilles (46 %) et les écorces (26%) sont les parties les plus utilisées (Figure 24), la préparation la plus utilisée par les tradi-praticiens est la décoction avec de l'eau ou du vin de palme, la maladie la plus traitée est l'épilepsie (Figure 24) et le mode le plus commun de l'administration est l'ingestion orale. Le tableau VIII nous donne la liste des plantes utilisées en médecine traditionnelle dans le département du Noun pour traiter les troubles neurologiques cités plus haut.

**Tableau VIII: Liste de plantes médicinales utilisées dans le Noun pour traiter les désordres neurologiques**

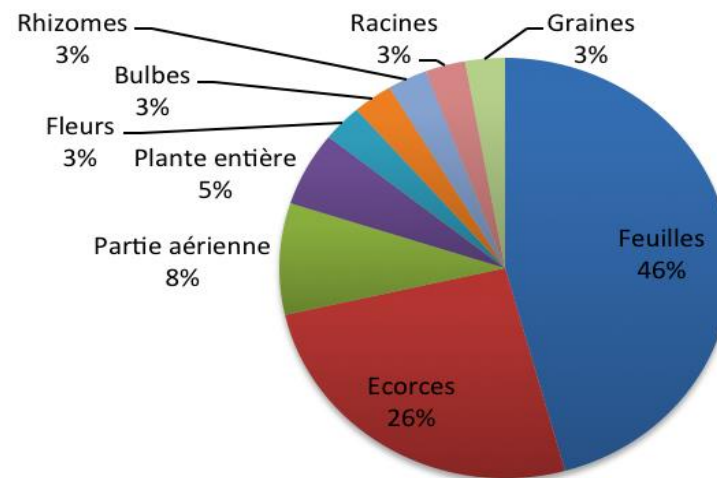
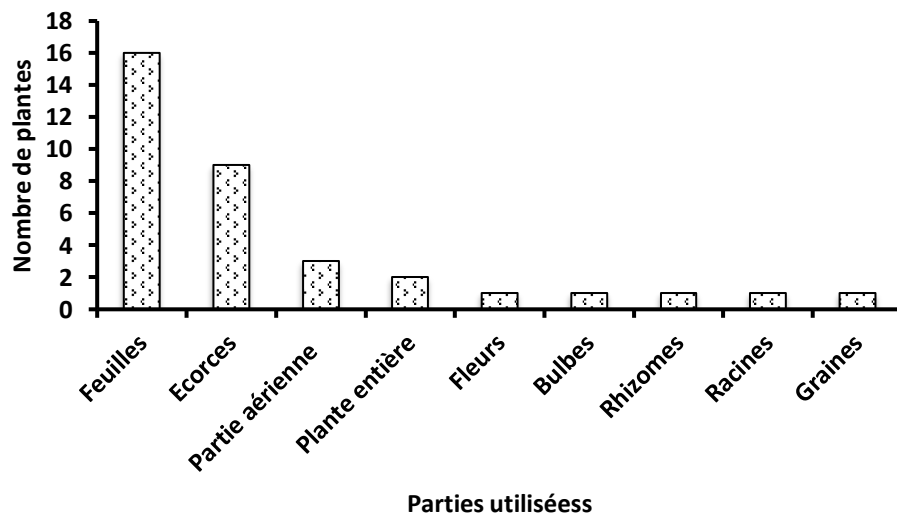
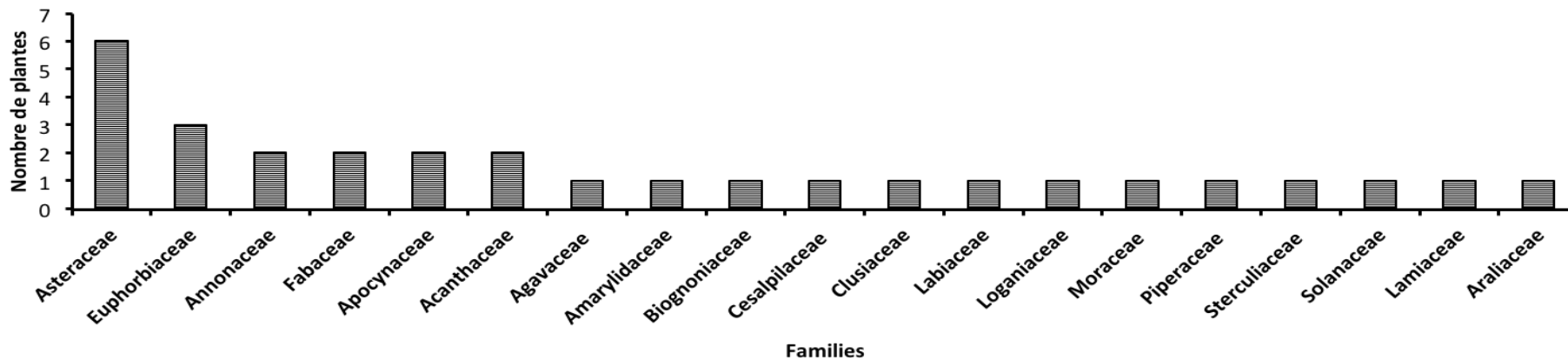
N°	Familles	Noms scientifiques et numéro d'identification	Noms vernaculaires (Bamoun)	Parties utilisées	Mode de préparation	Durée du traitement	Voie d'administration	Maladies traitées
1	ACANTHACEAE	<i>Acanthus montanus</i> 26004/SRF/Cam.	Fozem	Feuilles	Infusion	1 verre pdt 3 jrs	Orale	Dépression
2	AGAVACEAE	<i>Draceana deisteliana</i> Engl 27673 YA	Nkunkù	Feuilles	Décoction	½ verre chaque matin pdt 3 jrs	Orale	Convulsions
3	AMARYLIDACEAE	<i>Crinum purpurascens</i> Herb. 40058/HNC	NduéKé	Bulbes	Décoction avec le vin de raphia	1 verre chaque matin pdt 3 jrs	Orale	Epilepsie
4	ANNONACEAE	<i>Annona muricata</i> L. 32879/HNC	Chawa-chawa	Feuilles ou graines	Décoction	1 verre chaque matin pdt 1 semaine	Orale	Dépression/ mal des nerfs
5	ANNONACEAE	<i>Annona senegalensis</i> Pers. 7783 YA	Kuopshe-kuopshe	Feuilles ou écorce	Décoction	1 verre chaque matin pdt 3 jrs	Orale	Convulsions/ Epilepsie
6	APOCYNACEAE	<i>Voacanga africana</i> Stapf 47215 YA	Pè pepkèn	Ecorce	Décoction	1 verre au couché pdt 3 jrs	Orale	Schizophrénie
7	APOCYNACEAE	<i>Dacryodes edulis</i> (G. Don) H.J. Lam.	Youom	Ecorce	Décoction	½ verre chaque matin pendant 4 semaines	Orale	Dépression/ Epilepsie
8	ARALIACEAE	<i>Polyscias fulva</i> Hiern. 2990 YA	Pugue (Pûngùè)	Ecorce	Décoction	1 verre chaque matin pendant 3 semaines	Orale	Anxiété/ Dépression
9	ASTERACEE	<i>Ageratum conyzoides</i> Lin 6575 SRFK	Menjotefu	Partie aérienne	Macération	3 gouttes dans les narines chaque matin jusqu'à la guérison	Nasale	Epilepsie/ Dépression
10	ASTERACEE	<i>Emilia cocinia</i> (Sims) G. Don 29441/HNC	Shin Mû	Feuilles	Décoction	1 verre/jr pdt 5 jrs	Orale	Migraine

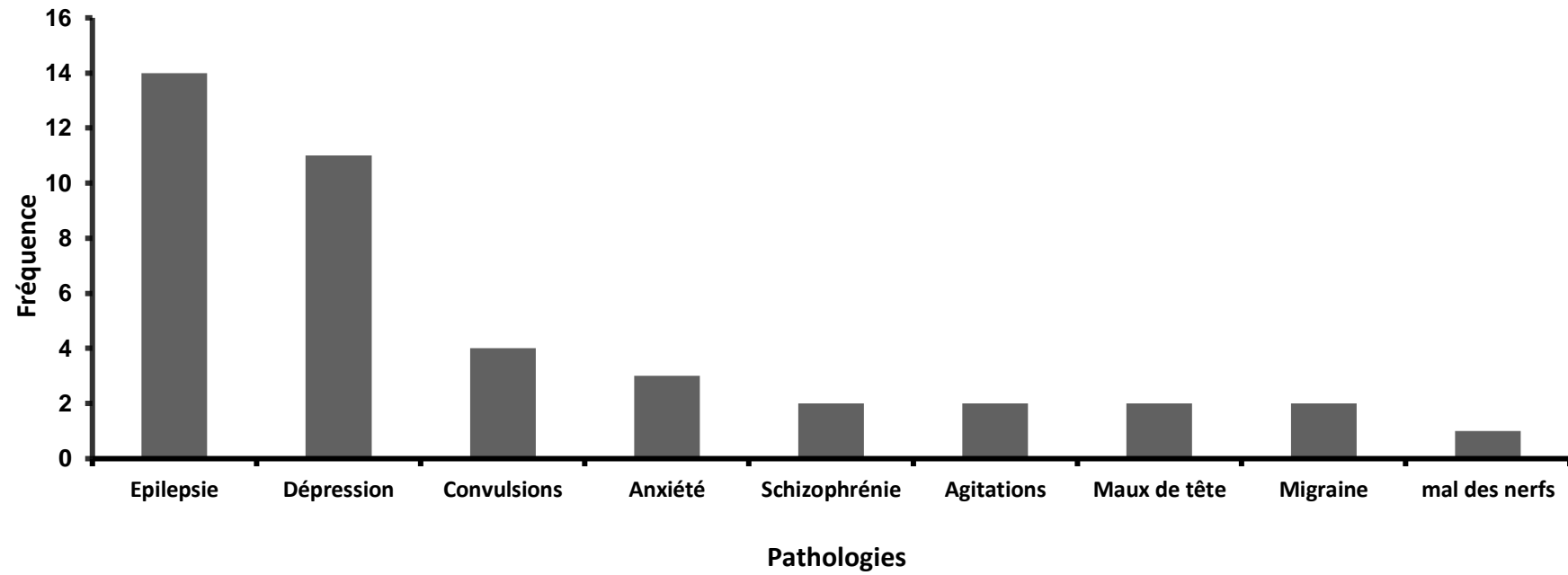
11	ASTERACEE	<i>Sonchus oleraceus</i> Lin 44928/HNC	Melile Ntam- Ntam	Partie aérienne	Décoction	1 verre/jr pdt 3 jrs	Orale	Epilepsie
12	ASTERACEE	<i>Vernonia guineensis</i> benth N°11133/SRF-Cam	Mgbùkwet	Rhizomes	Décoction	1 verre matin ; midi et soir (pdt 2 semaines)	Orale	Epilepsie
13	ASTERACEE	<i>Spilanthes africana</i> D.C. 33075/HNC	Nba kouom	Fleurs	Décoction	1 verre/jr pdt 3 jrs	Orale	Maux de tête
14	ASTERACEAE	<i>Bidens pilosa</i> L. 41693/HNC	Fuwen	Plante entière	Décoction	1 verre/jr pdt 3 jrs	Orale	Epilepsie/ Dépression
15	BIOGNONIACEAE	<i>Spathodea companulata</i> P.Beaux N°50085/HNC	Vivet	Ecorce	Décoction	1 verre matin ; midi et soir (pdt 2 semaines)	Orale	Epilepsie
16	CESALPILACEAE	<i>Senna alata</i> (lin) link 29494/HNC	Sùé nâsa	Feuilles	Décoction	1 verre matin ; midi et soir pdt 3 jrs	Orale	Convulsions/ agitation
17	CLUSIACEAE	<i>Allanblackia florinbunda</i> Oliv. 1380/HNC	/	Feuilles	Décoction	1 verre/jr pdt une semaine	Orale	Epilepsie
18	EUPHORBIACEAE	<i>Euphorbia hirta</i> L. N°14288/SRF-Cam	Bùmon	Partie aérienne	Décoction	1 verre/jr pdt 3 jrs	Orale	Dépression
19	EUPHORBIACEAE	<i>Croton macrothachyus</i> Hochst et Del N°17909/SRF-Cam	Kùteshâ	Racines	Décoction	1 verre chaque matin pdt 3 jrs	Orale	Epilepsie
20	EUPHORBIACEAE	<i>Alchornea laxiflora</i> (benth) Pax & K.H. 2093 YA	Meshé	Feuilles	Décoction	1 verre matin ; midi et soir (pdt 1 semaine)	Orale	Anxiété/ Dépression
21	FABACEAE	<i>Erythrina senegalensis</i> D.C 35259 YA	Megham	Feuilles ou écorce	Décoction	1 verre/jr pdt 3 jrs	Orale	Epilepsie
22	FABACEAE	<i>Piliostigma</i>	Pien	Feuilles	Décoction	1 verre/jr pdt 5 jrs	Orale	Dépression

		<i>thonningii</i> (Schum.) Milne-Redh. 2689 YA		ou écorces				
23	LABIACEAE	<i>Ocimum gratissimum</i> Lin 42852 YA	Sem mvù	Feuilles	Décoction	1 verre matin, midi et soir pdt une semaine	Orale	Dépression
24	LOGANIACEAE	<i>Anthocleista schweinfurthii</i> Gil 2281 YA	Yü'rum	Feuilles	Décoction	1 verre/ jr pdt une semaine	Orale	Convulsions/ agitation
25	MORACEAE	<i>Ficus exasperata</i> Vahl. 5123/SRF/Cam	Ghùghu	Feuilles ou écorce	Décoction	1 verre chaque soir pdt une semaine	Orale	Epilepsie
26	PIPERACEAE	<i>Piper umbellatum</i> 20934/SFR/Cam	Boupouete	Feuilles	Décoction	2 verres/ jr pdt 3 jrs	Orale	Anxiété/ dépression
27	STERCULIACEAE	<i>Cola acuminata</i> (P. Beauv.) Schott & Indl. 1729/SRF/Cam	Shin pè'	Ecorce	Décoction	½ verre chaque matin pendant 3 semaines	Orale	Schizophrénie
28	SOLANACEAE	<i>Nicotiana tabacum</i> L. 18637/SRF/Cam	Dapà	Feuilles	Décoction	1 verre/ jr pdt une semaine	Orale	Maux de tête/migraine
29	ACANTHACEAE	<i>Asystasia</i> sp	/	Feuilles	/	3 gouttes dans les narines chaque matin pdt 3 jrs	Nasale	Epilepsie
30	LAMIACEAE	<i>Clerodendron</i> sp	Mélile	Plante entière	Macération	½ verre chaque matin (jusqu'à la guérison)	Orale	Epilepsie

HNC: Herbar National du Cameroun; SRF/Cam: Société des Réserves forestières du Cameroun; pdt: pendant; jr(s): jour(s)







**Figure 24: Répartition des différentes familles et parties de plantes utilisées, et la fréquence des pathologies traitées**



*Acanthus montanus*



*Dacryodes edulis*



*Nicotiana tabacum*



*Crinum purpurascens*



*Annona muricata*



*Piliostigma thonningii*



*Bidens pilosa*



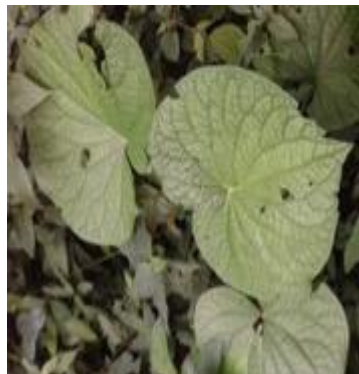
*Ageratum conyzoides*



*Euphorbia hirta*



*Ocimum gratissimum*



*Piper Umbellatum*



*Senna alata*



*Vernonia guineensis* (feuilles et rhizomes)



*Ficus exasperata*

**Photo: Photos de quelques plantes identifiées (Ngoungoure, 2014)**

### **III-1-2-Discussion partielle**

Les connaissances traditionnelles sont essentielles à la sécurité alimentaire et à la santé de millions de personnes dans les pays en développement. Elle a souvent joué un rôle dans le développement de la science moderne et continuera de le faire à l'avenir (WHO, 2002). Les plantes médicinales jouent un rôle central dans le système de soins de santé d'une grande partie de la population mondiale. Ceci est particulièrement important en Afrique et dans d'autres pays en développement. Par exemple, des études montrent qu'au moins 80% des Africains utilisent la médecine traditionnelle comme traitement de premier choix (Elujoba *et al.*, 2005). La phytothérapie dans la médecine traditionnelle africaine joue toujours un rôle important dans la gestion des maladies neurologiques, principalement parmi les populations à très faible revenu (Taiwe and Kuete, 2014). Des informations sur l'utilisation de plantes médicinales pour le traitement de maladies spécifiques sont disponibles dans le monde entier. Cependant, leur utilisation doit être étudiée et documentée (Alzweiri *et al.*, 2011). Au cours de la dernière décennie, plusieurs groupes de recherche ont tenté d'identifier des médicaments naturels contre les troubles neurologiques.

Les troubles neurologiques sont les maladies affectant le système nerveux central et périphérique. Ceux-ci comprennent l'épilepsie, la dépression, la schizophrénie, les convulsions, la maladie d'Alzheimer et d'autres démences, les maladies cérébrovasculaires, la sclérose en plaques, la maladie de Parkinson, les neuroinfections, etc. (Calvo and Calvero, 2015). Selon le rapport de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) (WHO, 1981), des centaines de millions de personnes dans le monde souffrent de troubles neurologiques. Environ 6,8 millions de personnes meurent chaque année des troubles neurologiques. Les pays en développement sont très préoccupés par ces troubles, notamment en raison de l'amélioration des conditions de vie, qui se traduit par une augmentation de l'espérance de vie.



En Afrique, de nombreuses espèces de plantes sont utilisées comme médicaments traditionnels. Selon Kuete et Efferth (2010) (**Kuete and Efferth, 2010**), il existe une riche tradition dans l'utilisation des médicaments à base de plantes pour le traitement de plusieurs maux au Cameroun. Beaucoup de ces plantes médicinales contiennent divers composés qui démontrent les meilleures activités concernant de nombreuses maladies. Au Cameroun, peu d'études ont été menées jusqu'à présent sur les plantes médicinales utilisées contre les troubles neurologiques. Certains rapports de **Ngo Bum et al., (2009; 2011;2012)** ont montré les effets potentiels des plantes camerounaises sur la dépression, l'anxiété et d'autres maladies neurologiques. Cependant, il manque toujours des données sur les enquêtes ethnobotaniques de ces plantes. La présente étude permet de combler cette lacune en fournissant des informations de base sur les plantes utilisées dans la région occidentale du Cameroun et en particulier chez les Bamoums contre les troubles neurologiques. Il s'agit de la première phase d'une étude pharmacologique plus large visant à identifier les plantes potentiellement actives pour le traitement des maladies neurodégénératives. Une analyse approfondie des données de l'enquête suggère que, parmi toutes les espèces de plantes collectées sur le terrain, les plantes de la famille des Asteraceae étaient prédominantes. En examinant la répartition des familles, les plantes les plus utilisées ont été classées comme suit : 6 espèces d'Asteraceae, 3 espèces d'Euphorbiaceae, 2 espèces d'Annonaceae, 2 espèces de Fabaceae et 2 espèces d'Apocynaceae (Figure 30). Le pourcentage élevé de plantes de la famille des astéracées peut être justifié par les résultats très satisfaisants obtenus par les patients sous traitement. Cela pourrait également impliquer une large gamme de composés biologiquement actifs dans cette famille de plantes. Cela pourrait également être attribué à leur abondance relative dans la zone d'étude et à leur efficacité supposée, telles que rapportées par les informateurs clés (**Tsobou et al., 2013**). Un autre élément important de ces données est le fait que toutes les plantes échantillonnées étaient de type sauvage. Cela pourrait être dû à cet environnement sauvage qui est certainement nécessaire pour une accumulation appropriée d'ingrédients actifs. Amri et Kisangau (**2012**) souscrivent à l'observation selon laquelle seuls quelques praticiens en phytothérapie étaient impliqués dans la culture de plantes médicinales et que la plupart d'entre eux étaient effectivement récoltés dans la nature (**Amri and Kisangau, 2012**).

Notre analyse a révélé que dans l'ensemble, 9 parties de plantes ont été utilisées comme produits médicinaux. Les feuilles étaient les parties de la plante les plus utilisées (46% du total), suivies des écorces (26%), de la partie aérienne (8%), des plantes entières (5%), des graines, des bulbes, des fleurs, des racines et des rhizomes (3%). Tsobou et ses collaborateurs (**2013**) ont indiqué que l'utilisation courante des feuilles dans la préparation des

remèdes pourrait en partie être due à la relative facilité de trouver cette partie de la plante ; et que les feuilles restent vertes et disponibles pendant la plupart des mois de l'année (**Tsobou *et al.*, 2013**). Il a été rapporté que des feuilles de plantes s'accumulent des polyphénols tels que les tannins et alcaloïdes pouvant être responsables de leurs propriétés médicinales, ce qui explique son utilisation à grande échelle. La prévalence de l'utilisation de feuilles pour la préparation de remèdes traditionnels à base de plantes a été rapportée par d'autres auteurs (**Gbolade, 2012; Focho *et al.*, 2010**). L'enquête a révélé qu'en médecine traditionnelle, toutes les extractions de plantes étaient effectuées à l'eau et que l'un des principaux modes de préparation des médicaments était la décoction. Il n'était pas surprenant que la décoction soit le mode de préparation préféré. La décoction est connue pour être une méthode d'extraction efficace par rapport à l'utilisation d'extrait broyé dans de l'eau froide, car l'ébullition conserve également le médicament plus longtemps et permet de tuer les micro-organismes potentiellement associés aux plantes récoltées.

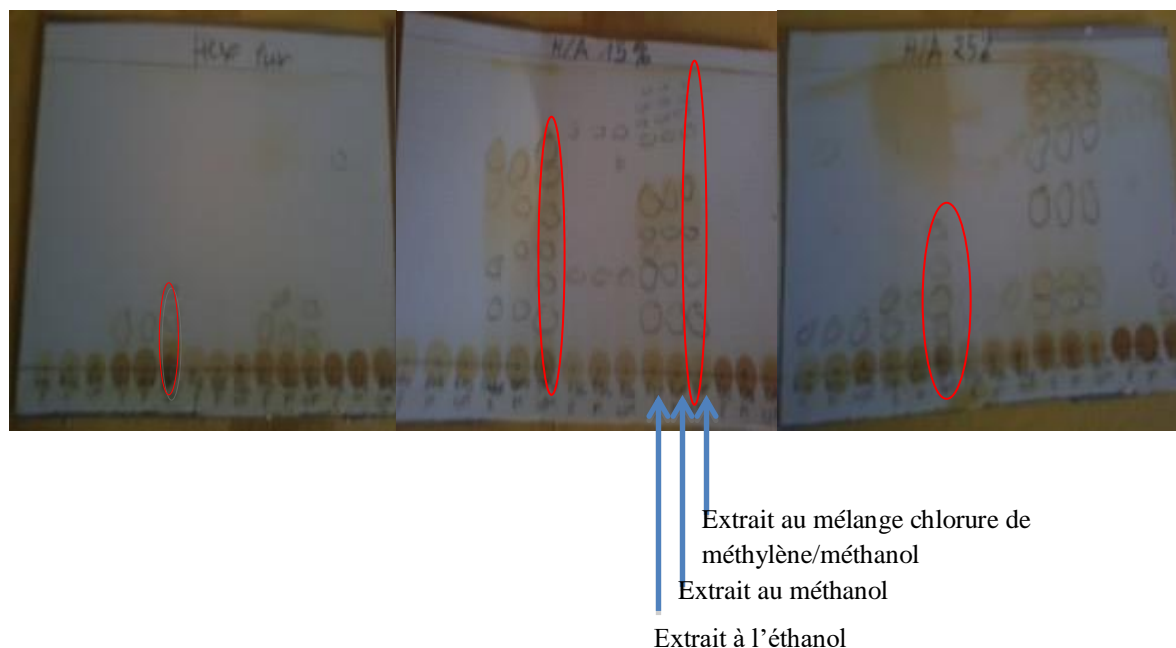
### **III-1-3-Conclusion partielle**

Il ressort de cette étude que: Trente espèces de plantes ont été collectées et identifiées, de préférence les plantes de la famille des astéracées. Les feuilles (46% ), les parties le plus utilisées, suivies des écorces (26%) et la décoction à l'eau, le mode de préparation préféré.

## III-2- Evaluation *in vitro* des activités antioxydante, anti-acétylcholinestérase et anti-inflammatoire des extraits bruts de plantes

### III-2-1- Solvant d'extraction des plantes

Après révélation de la plaque, il a été observée que le meilleur solvant d'extraction est le mélange chlorure de méthylène/méthanol comme indiqué sur le chromatogramme de la figure 25. Pour cela le mélange chlorure de méthylène/méthanol a été sélectionné pour la préparation de nos extraits.



**Figure 25: Exemple de chromatogramme d'essai d'extraction**

Hex pur: Hexane pur, H/A 15% : Hexane/Acétate d'éthyle 15% et H/A 25% : Hexane/Acétate d'éthyle 25%. Les parties encerclées indiquent les taches de composés obtenues avec le mélange chlorure de méthylène/méthanol.

### III-2-2- Activités antioxydantes des différents extraits bruts de plante

L'activité antioxydante a été évaluée en testant : le pouvoir réducteur, la capacité antioxydante des extraits puis, en évaluant leur aptitude à piéger les radicaux DPPH° et à inhiber la peroxydation lipidique dans l'homogénat du cerveau de rats. Les dosages des polyphénols totaux et flavonoïdes des extraits ont été effectués. Pour chaque test, les observations sont les suivantes.

#### III-2-2-1- Capacité antioxydante totale des extraits de plantes

La capacité antioxydante totale des extraits bruts varie entre 149,39 et 385,15 mg d'Equivalent d'Acide Ascorbique / g d'extrait (voir tableau IX). L'extrait de *Dacryodes edulis* a présenté la capacité antioxydante totale la plus élevée, avec 385,15 mg AAE / g d'extrait.

### III-2-2-2- Inhibition de la peroxydation lipidique dans l'homogénat du cerveau de rat.

Pour l'inhibition de la peroxydation lipidique, l'activité des extraits de plantes contre la peroxydation lipidique non enzymatique dans l'homogénat de cerveau de rats a indiqué qu'à une concentration de 100 µg / mL, neuf (9) extraits bruts ont présenté une activité inhibitrice supérieure à 50%. Ces neuf extraits ont été testés à des concentrations finale de 0,1; 1; 10; 100 µg/mL et l'inhibition a été effective pour tous ces extraits avec une activité dépendante de la concentration (figure 26). L'extrait d'*Alchornea laxiflora* a présenté une CI<sub>50</sub> (3,20 µg / mL) inférieure à celle du trolox (4,35 µg / mL). D'autres extraits comme l'extrait de *D. edulis* (6,60 µg / mL), *C. acuminata* (9,50 µg / mL), *Ocimum gratissimum* (11,20 µg / mL) et *A. senegalensis* (29,20 µg / mL) ont présenté des CI<sub>50</sub> supérieures au trolox. Les valeurs des CI<sub>50</sub> sont regroupées dans le tableau X ci- dessous.



Tableau IX: Capacité antioxydante totale des différents extraits bruts de plantes

Plantes Médicinales	Capacité antioxydante totale à 100µg/mL (mg EAA/g)
<i>Acanthus montanus</i>	198,18±0,42
<i>Ageratum conoides</i>	200,60± 5,99
<i>Alchornea laxiflora</i>	296,96±2,99
<i>Voacanga Africana</i>	165,75±6,21
<i>Annona muricata</i> (feuilles)	254,54±2,57
<i>Bidens pilosa</i>	344,84±0,85
<i>Dacryodes edulis</i>	<b>385,15±3,64</b>
<i>Cola acuminata</i>	289,09±2,57
<i>Crinum purpurascens</i>	191,51±1,28
<i>Croton macrostachyus</i>	257,57±4,71
<i>Emilia coccinea</i>	203,63±1,28
<i>Euphorbia hirta</i>	268,48±4,28
<i>Ficus exasperata</i>	292,72±5,57
<i>Nicotiana tabacum</i>	249,39±2,78
<i>Piliostigma thonningii</i> (feuilles)	253,33±0,85
<i>Piliostigma thonningii</i> (écorces)	350,60±3,64
<i>Piper umbellatum</i>	335,75±5,99
<i>Polyscias fulva</i>	346,36±4,49
<i>Senna alata</i>	290,60±2,78
<i>Spilanthes Africana</i>	210,90±4,71
<i>Vernonia guineensis</i>	295,15±0,42
<i>Annona muricata</i> (graines)	193,93±3,85
<i>Allanblackia floribunda</i>	149,39±0,64
<i>Annona senegalensis</i> (écorces)	318,19±8,44
<i>Annona senegalensis</i> (feuilles)	135,41±18,26
<i>Draceana deisteliana</i>	98,05±11,78
<i>Ocimum gratissimum</i>	87,22±8,24
<i>Erythrina senegalensis</i>	83,33±5,89
<i>Anthocleista sweinfurthii</i>	192,22±7,85

mg EAA/g: milligramme d'équivalent d'acide ascorbique par gramme d'extrait

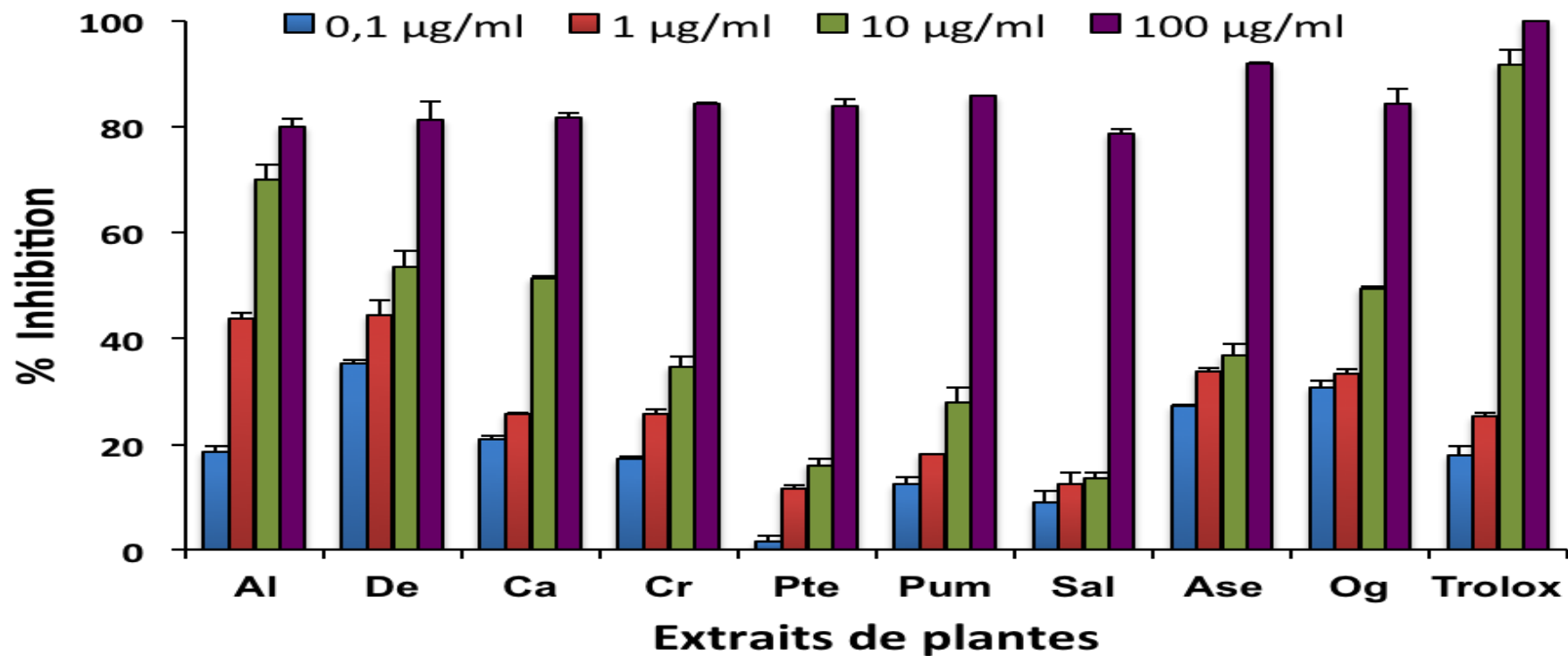


Figure 26: Inhibition de la peroxydation lipidique par les extraits de plantes

Al = *A. laxiflora*, De = *D. edulis*, Ca = *C. acuminata*, Cr = *Crinum purpurascens*, Pte = *P. thonningii* (écorces), Pum = *P. umbellatum*, Sal = *S. alata*, Ase = *A. senegalensis* (écorces), Og = *O. grassimum*

**Tableau X: Valeurs de CI<sub>50</sub> des extraits bruts de plantes pour la peroxydation lipidique dans l'homogénat du cerveau de rats**

<b>Plantes Médicinales</b>	<b>Parties de la plante utilisée</b>	<b>Peroxydation lipidique CI<sub>50</sub> (µg/mL)</b>
<i>Alchornea laxiflora</i>	Feuilles	<b>3,20±0,10</b>
<i>Dacryodes edulis</i>	Ecorces	<b>6,60±2,77</b>
<i>Cola acuminata</i>	Ecorces	9,50±0,04**
<i>Crinum purpurascens</i>	Bulbes	39,60± 1,97***
<i>Piliostigma thonningii</i>	Ecorces	68,10±2,40***
<i>Piper umbellatum</i>	Feuilles	53,50±3,32***
<i>Senna alata</i>	Ecorces	63,15±0,21***
<i>Annona senegalensis</i>	Ecorces	29,20±2,61***
<i>Ocimum gratissimum</i>	Feuilles	11,20±0,35***
<b>Trolox</b>		4,35±0,00

Les valeurs sont les moyennes ± écart- type de 3 essais différents en double. \*\* significativement différent du trolox à p<0,01 et \*\*\*Significativement différent du trolox à p<0,001.

### III-2-2-3- Pouvoir réducteur des différents extraits bruts de plantes

Dans l'analyse du pouvoir réducteur, la présence de réducteurs (antioxydants) dans les extraits entraîne la réduction du complexe Fe<sup>3+</sup> / ferricyanide en forme ferreuse par donation d'un électron. La réduction du Fe<sup>3+</sup> a été effective comme le témoigne la vitamine C pour tous les extraits de plantes testés. Une absorbance plus élevée indique un pouvoir réducteur plus élevé. Le plus grand pouvoir réducteur a été obtenu avec l'extrait de *C. acuminata* à 100 µg/mL (0,62 ± 0,03) inférieur à la vitamine C (Tableau XI).

### III-2-2-4- Activité de piégeage du radical DPPH°

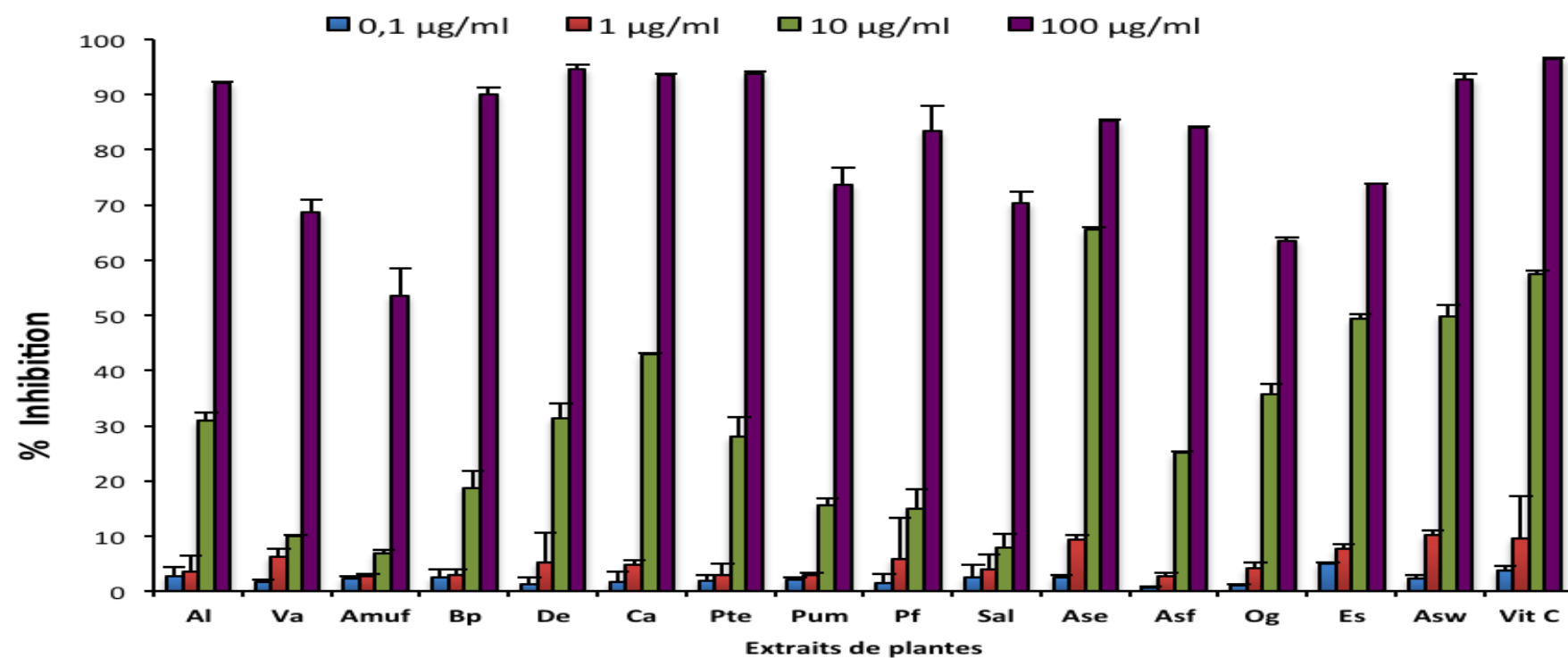
L'activité de piégeage des radicaux libres de différents extraits, ainsi que de l'acide ascorbique, composé de référence a été réalisée et la concentration de l'extrait requise pour réduire la concentration initiale de DPPH de 50% (CI<sub>50</sub>) a été déterminée pour l'extrait qui a montré un pourcentage d'inhibition supérieure à 50%. À 100 µg / mL, quinze (15) extraits bruts ont montré une activité de piégeage de DPPH de plus de 50%. Ces quinze extraits ont été testés à des concentrations finale de 0,1; 1; 10; 100 µg/mL et l'inhibition a été effective pour tous ces extraits avec une activité dépendante de la concentration (figure 27). La meilleure activité de piégeage des radicaux libres a été obtenue avec l'extrait d'A. *Senegalensis*

(écorces) avec une  $CI_{50}$  de 7,40  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , inférieure à celle de la vitamine C ( $CI_{50}$  de 8,41  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ). D'autres extraits comme *E. Senegalensis* ( $CI_{50}$  de 12,20  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) et *A. swainfurthii* ( $CI_{50}$  de 11,03  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) ont présentés également un bon potentiel de piégeage de DPPH. Les valeurs des  $CI_{50}$  sont regroupées dans le tableau XII.

**Tableau XI: Pouvoir réducteur des différents extraits bruts de plantes**

<b>Plantes Médicinales</b>	<b>Pouvoir réducteur (Absorbance à 700 nm)</b>
<i>Acanthus montanus</i>	0,134±0,024
<i>Ageratum conoides</i>	0,149±0,002
<i>Alchornea laxiflora</i>	0,501±0,007
<i>Voacanga Africana</i>	0,436±0,014
<i>Annona muricata</i> (feuilles)	0,276±0,014
<i>Bidens pilosa</i>	0,454±0,002
<i>Dacryodes edulis</i>	0,516±0,002
<i>Cola acuminata</i>	<b>0,620±0,037</b>
<i>Crinum purpurascens</i>	0,200±0,009
<i>Croton macrostachyus</i>	0,169±0,015
<i>Emilia coccinea</i>	0,22±0,009
<i>Euphorbia hirta</i>	0,273±0,096
<i>Ficus exasperata</i>	0,183±0,009
<i>Nicotiana tabacum</i>	0,342±0,007
<i>Piliostigma thonningii</i> (feuilles)	0,354±0,00
<i>Piliostigma thonningii</i> (écorces)	0,571±0,032
<i>Piper umbellatum</i>	0,391±0,118
<i>Polyscias fulva</i>	0,566±0,012
<i>Senna alata</i>	0,439±0,047
<i>Spilanthes Africana</i>	0,284±0,007
<i>Vernonia guineensis</i>	0,311±0,003
<i>Annona muricata</i> (graines)	0,162±0,015
<i>Allanblackia floribunda</i>	0,220±0,031
<i>Annona senegalensis</i> (écorces)	0,520±0,010
<i>Annona senegalensis</i> (feuilles)	0,512±0,004
<i>Draceana deisteliana</i>	0,258±0,033
<i>Ocimum gratissimum</i>	0,383±0,006
<i>Erythrina senegalensis</i>	0,333±0,010
<i>Anthocleista swainfurthii</i>	0,532±0,022
<b>Vitamine C</b>	<b>0,655±0,028</b>

Les valeurs sont les moyennes  $\pm$  écart- type de 3 essais différents en double.



**Figure 27: Piégeage du DPPH par les extraits de plantes à différentes concentrations**

Al = *A. laxiflora*, Va = *V. Africana*, Amuf = *A. muricata* (feuilles), Bp= *B. pilosa*, De = *D. edulis*, Ca= *C. acuminata*, Pte = *P. thonningii* (écorces), Pum = *P. umbellatum*, Pf =*P. fulva*, Sal = *S. alata*, , Ase = *A. senegalensis* (écorces), Asf = *A. senegalensis* (feuilles), Og= *O. grassimun*, Es=*E. senegalensis* (écorces), Asw=*A. sweinfurtii*

Tableau XII: Valeurs de CI<sub>50</sub> des extraits bruts de plantes pour le piégeage du radical libre (DPPH)

Plantes Médicinales	Parties de la plante utilisée	CI <sub>50</sub> DPPH (µg/mL)
<i>Alchornea laxiflora</i>	Feuilles	38,02±1,74 <sup>***</sup>
<i>Voacanga Africana</i>	Ecorces	71,10±2,57 <sup>***</sup>
<i>Annona muricata</i>	Feuilles	91,04±4,55 <sup>***</sup>
<i>Bidens pilosa</i>	Feuilles	49,49±2,76 <sup>***</sup>
<i>Dacryodes edulis</i>	Ecorces	36,57±2,87 <sup>***</sup>
<i>Cola acuminata</i>	Ecorces	22,35±0,27 <sup>***</sup>
<i>Piliostigma thonningii</i>	Ecorces	40,05±3,48 <sup>***</sup>
<i>Piper umbellatum</i>	Feuilles	63,30±2,13 <sup>***</sup>
<i>Polyscias fulva</i>	Ecorces	56,74±0,61 <sup>***</sup>
<i>Senna alata</i>	Ecorces	95,35±1,43 <sup>***</sup>
<i>Annona senegalensis</i>	Feuilles	<b>7,40±0,00</b>
<i>Annona senegalensis</i>	Ecorces	48,04±0,10 <sup>***</sup>
<i>Ocimum gratissimum</i>	Feuilles	56,40±3,28 <sup>***</sup>
<i>Erythrina senegalensis</i>	Feuilles	<b>12,20±1,74</b>
<i>Anthocleista sweinfurthii</i>	Ecorces	<b>11,03±0,51</b>
<b>Vitamine C</b>		8,41±0,20

Les valeurs sont les moyennes ± écart- type de 3 essais différents en double.

\*\*\*Significativement différent de la vitamine C à p<0,001

### III-2-3- Détermination de la teneur en polyphénols totaux et flavonoïdes des extraits de plante

La teneur en polyphénols totaux obtenue en mg Equivalent d'Acide Gallique (EAG) / g d'extrait varie considérablement entre les extraits de plantes, comme indiqué dans le tableau XIII. L'extrait d' *A. Senegalensis* présente une teneur plus élevée (100 mg EAG / g d'extrait), suivi de *C. acuminata* (93,18 mg EAG / g d'extrait), *A. laxiflora* (92,12 mg EAG / g d'extrait), *A. sweinfurthii* (91,81 mg EAG / g d'extrait), *D. edulis* (85,45 mg EAG/ g d'extrait). La teneur totale en flavonoïdes d'extraits de plantes varie entre 0,111 et 6,43 mg Equivalent de quercétine (EQ) / g d'extrait (tableau XIII). Une très faible corrélation a été obtenue entre les activités antioxydantes et les teneurs totales en phénoliques et flavonoïdes (données non présentées).

Tableau XIII: Teneurs en polyphénols et flavonoïdes totaux des extraits bruts de plantes

Plantes médicinales	Teneur en polyphénols totaux (mg EAG/g d'extrait)	Teneur en flavonoïdes totaux (mg EQ/g d'extrait)
<i>Acanthus montanus</i>	25,30±1,49	1,45±0,12
<i>Ageratum conoides</i>	33,48 ± 1,92	1,57±0,08
<i>Alchornea laxiflora</i>	<b>92,12±1,71</b>	3,92±0,55
<i>Voacanga africana</i>	42,72±1,71	0,15±0,02
<i>Annona muricata</i> (feuilles)	35,60±1,78	1,33±0,14
<i>Bidens pilosa</i>	75,45±1,28	6,43±0,47
<i>Dacryodes edulis</i>	85,45±7,71	0,27±0,00
<i>Cola acuminata</i>	<b>93,18±2,78</b>	0,50±0,01
<i>Crinum purpurascens</i>	27,87±4,71	0,76±0,04
<i>Croton macrostachyus</i>	22,12±0,85	0,11±0,01
<i>Emilia coccinea</i>	15,75±0,00	3,57±0,33
<i>Euphorbia hirta</i>	42,27±0,21	3,88±0,53
<i>Ficus exasperata.</i>	13,93±0,42	1,98±0,35
<i>Nicotiana tabacum</i>	24,54±3,42	1,48±0,26
<i>Piliostigma thonningii</i> (feuilles)	36,51±1,92	5,02±0,56
<i>Piliostigma thonningii</i> (écorces)	46,51±4,07	0,21±0,00
<i>Piper umbellatum</i>	33,78±6,64	3,73±0,56
<i>Polyscias fulva</i>	62,12±1,71	0,47±0,00
<i>Senna alata</i>	26,81±1,07	3,26±0,45
<i>Spilanthes africana</i>	36,06±3,42	2,78±0,38
<i>Vernonia guineensis</i>	22,72±2,99	0,21±0,00
<i>Annona muricata</i> (graines)	7,42±0,21	0,19±0,04
<i>Allanblackia floribunda</i>	20,90±0,85	2,26±0,38
<i>Annona senegalensis</i> (écorces)	<b>100±1,28</b>	2,95±0,01
<i>Annona senegalensis</i> (feuilles)	90,45±0,21	3,46±0,00
<i>Draceana deisteliana</i>	52,27±5,78	2,88±0,01
<i>Ocimum gratissimum</i>	81,96±1,49	4,36±0,07
<i>Erythrina senegalensis</i>	85,90±0,21	3,69±0,01
<i>Anthocleista sweinfurthii</i>	91,81±1,28	2,67±0,00

Les valeurs sont les moyennes ± écart- type de 3 essais différents en double.

EAG/g: Equivalent d'Acide Gallique par gramme d'extrait, EQ/g: Equivalent de Quercetine par gramme d'extrait

#### III-2-4- Activité anti- acétylcholinestérase des extraits bruts de plantes

Tous les extraits ont été testés dans un essai préliminaire à une concentration unique de 200 µg / mL par rapport à la galanthamine (composé de référence) à 100 µg / mL. À 200 µg / mL, cinq extraits ont inhibé l'acétylcholinestérase avec un pourcentage d'inhibition supérieure à 50% et cette inhibition a été effective pour tous ces extraits avec une activité

dépendante de la concentration (figure 28). Les valeurs des concentrations inhibitrices à 50% (CI<sub>50</sub>) étaient les suivantes : *Crinum purpurascens* (99,40 ± 1,28 µg / mL) ; *Emilia coccinea* (150,40 ± 1,43 µg / mL); *Erythrina senegalensis* (166,20 ± 2,98 µg / mL); *Ageratum conyzoides* (176,2 ± 0,06 µg / mL) et *Piper umbellatum* (180,60 ± 1,64 µg / mL). Ces plantes étaient moins actives que la galanthamine (CI<sub>50</sub> de 24,65 ± 2,12 µg / mL) (Tableau XIV).

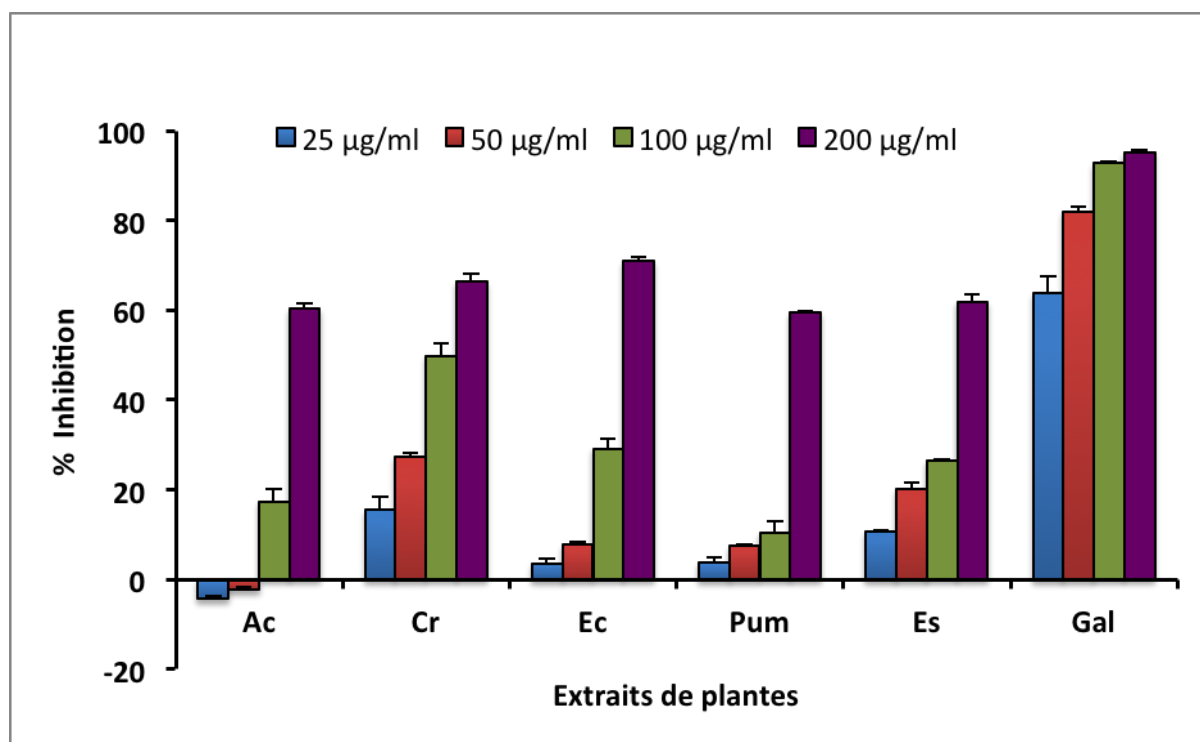


Figure 28: Inhibition de l'acétylcholinestérase par les extraits de plantes

Ac = *A. conyzoides*, Cr = *Crinum purpurascens*, Ec = *E. coccinea*, Pum = *P. umbellatum*, Es = *E. senegalensis*, Gal = Galanthamine.

Tableau XIV: Activité anti acétylcholinestérase (AChE) et valeurs de CI<sub>50</sub> des extraits bruts de plantes

Plantes médicinales	Parties de plantes utilisées	CI <sub>50</sub> d'AChE (µg/mL)
<i>Ageratum conyzoides</i>	Partie aérienne	176,2±0,06***
<i>Crinum purpurascens</i>	Bulbes	99,40±1,28***
<i>Emilia coccinea</i>	Partie aérienne	150,40±1,43***
<i>Piper umbellatum</i>	Feuilles	180,60±1,64***
<i>Erythrina senegalensis</i>	Ecorces	166,20±2,98***
<b>Galanthamine</b>		<b>24,65±2,12</b>

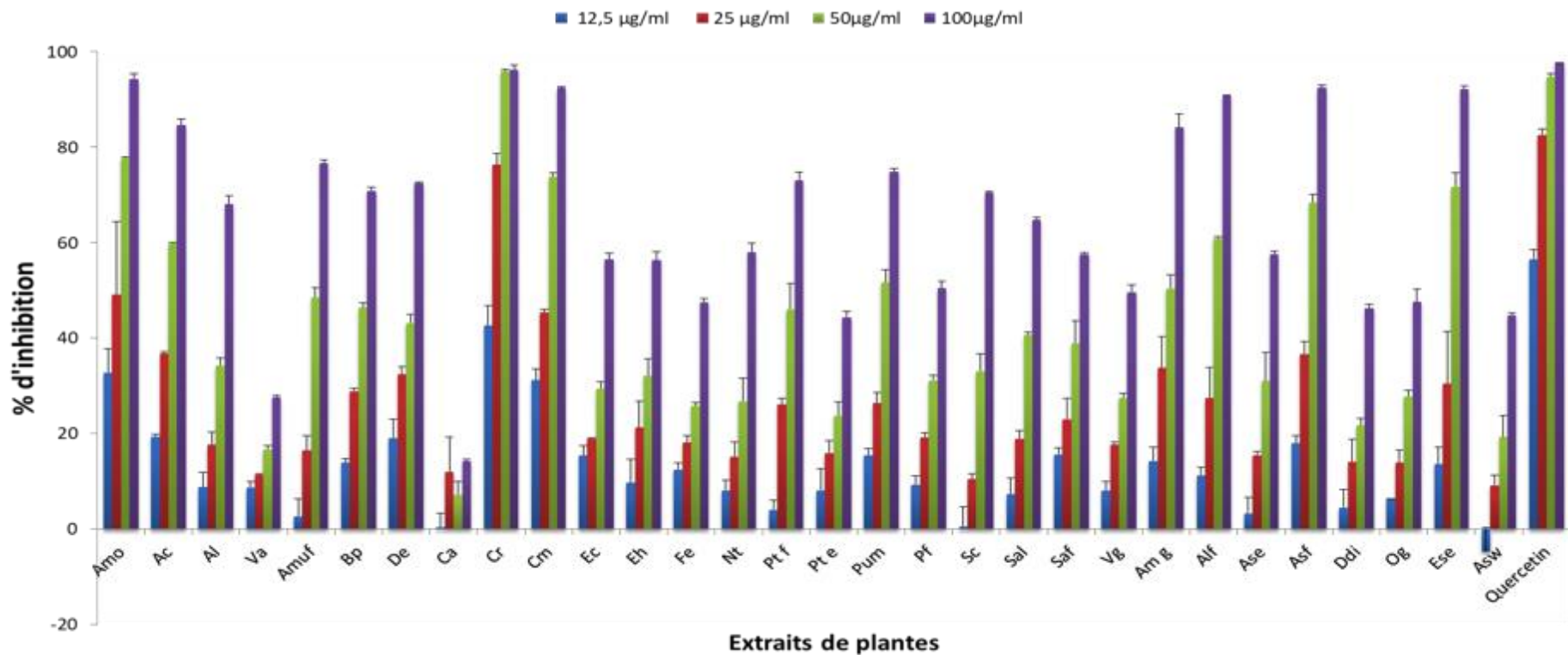
Différence Significative \*\*\* (p<0,001) comparé au control positif.



### **III-2-5- Activité anti-inflammatoire des extraits bruts de plantes**

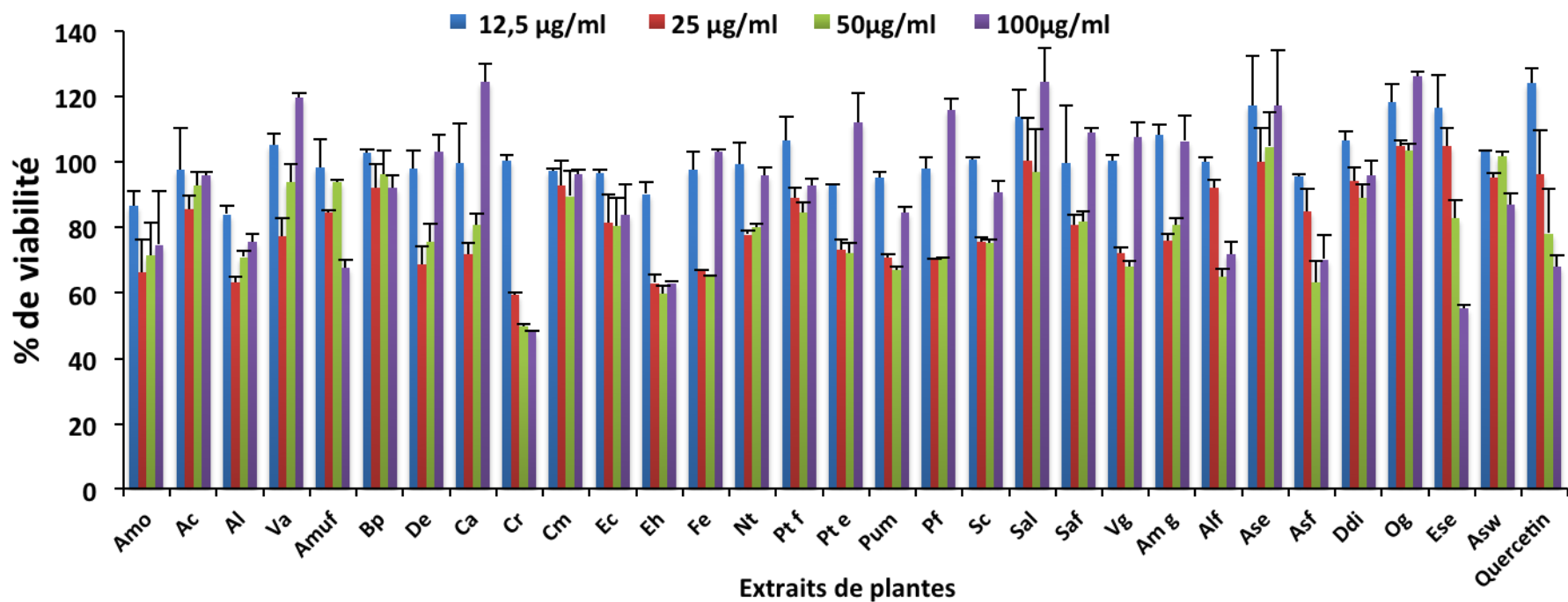
#### **III-2-5-1-Effet des extraits bruts de plantes sur la production de NO**

L'activité inhibitrice de la production de NO des extraits a été évaluée sur des cellules macrophages RAW 264.7 activées par le LPS. Ce test a été validé en utilisant des cellules activées par le LPS seul, et les cellules activées par les LPS et traitées avec de la quercétine (un inhibiteur standard de NO) ont été considérées comme contrôle positif. Après 24 heures de traitement avec le LPS (1 µg/mL) et les extraits, la plupart des extraits ont montré une inhibition de la production de NO dépendant de la concentration (Figure 29) et également une diminution de la concentration de NO dans le milieu de culture (Figure 31). De plus, le pourcentage de viabilité des extraits bruts de plantes variait considérablement en fonction des concentrations (Figure 30). Les valeurs de  $CI_{50}$  de différents extraits ont été calculées et sont présentées dans le tableau XV. L'extrait de *C. purpurascens* a présenté une activité significativement ( $p < 0,01$ ) supérieure ( $12,08 \pm 1,68$  µg/mL) à celle de la quercétine ( $6,59 \pm 0,87$  µg/mL).



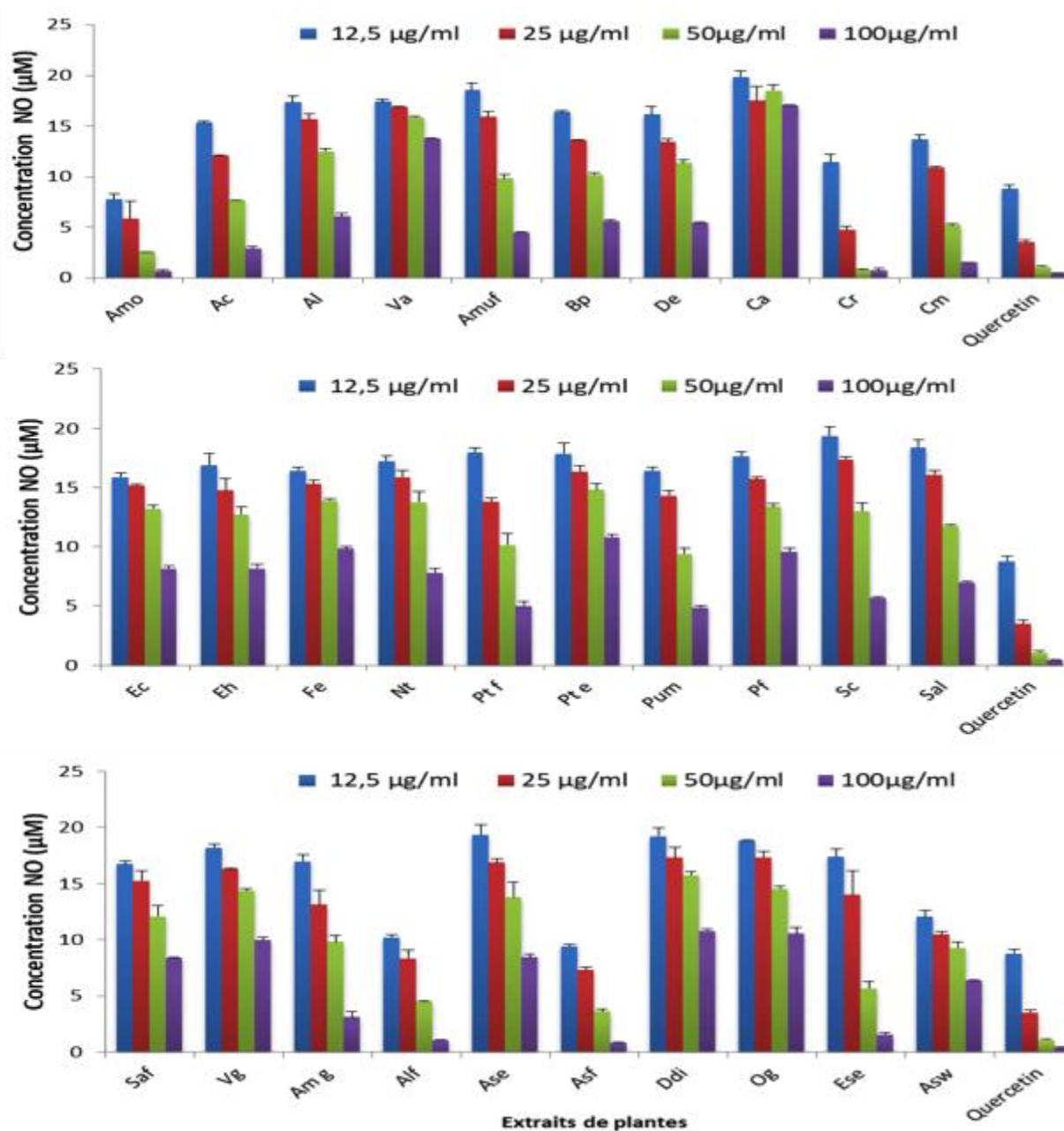
**Figure 29: Pourcentage d'inhibition du NO par les extraits bruts de plantes**

Amo= *A. montanus*, Ac = *A. conyzoides*, Al = *A. laxiflora*, Va = *V. Africana*, Amuf = *A. muricata* (feuilles), Bp= *B. pilosa*, De = *D. edulis*, Ca= *C. acuminata*, Cm = *C. macrostachyus*, Cr = *C. purpurascens*, Ec = *E. cocinea*, Eh= *E. hirta*, Fe = *F. exasperata*, Nt = *N. tabacum*, Ptf = *P. thonningii* (feuilles), Pte = *P. thonningii* (écorces), Pum = *P. umbellatum*, Pf = *P. fulva*, Sc = *S. companulata*, Sal = *S. alata*, Saf= *S. africana*, Vg = *V. guineensis*, Amg = *A. muricata* (graines), Alf = *A. floribunda*, Ase = *A. senegalensis* (écorces), Asf = *A. senegalensis* (feuilles), Ddi = *D. deilistenia*, Og= *O. grassimun*, Ese= *E. senegalensis* (écorces), Asw= *A. sweinfurtii*



**Figure 30: Pourcentage de viabilité cellulaire des extraits bruts de plantes sur la production de NO**

Amo= *A. montanus*, Ac = *A. conizoides*, Al = *A. laxiflora*, Va = *V. Africana*, Amuf = *A. muricata* (feuilles), Bp= *B. pilosa*, De = *D. edulis*, Ca= *C. acuminata*, Cm = *C. macrostachyus*, Cr = *C. purpurascens*, Ec = *E. cocinea*, Eh= *E. hirta*, Fe = *F. exasperata*, Nt = *N. tabacum*, Ptf = *P. thonningii* (feuilles), Pte = *P. thonningii* (écorces), Pum = *P. umbellatum*, Pf = *P. fulva*, Sc = *S. companulata*, Sal = *S. alata*, Saf= *S. africana*, Vg = *V. guineensis*, Amg = *A. muricata* (graines), Alf = *A. floribunda*, Ase = *A. senegalensis* (écorces), Asf = *A. senegalensis* (feuilles), Ddi = *D. deilistenia*, Og= *O. grassimun*, Ese= *E. senegalensis* (écorces), Asw= *A. sweinfurtii*



**Figure 31: Effet des extraits bruts de plantes sur la concentration du NO**

Amo= *A. montanus*, Ac = *A. conoïdes*, Al = *A. laxiflora*, Va = *V. Africana*, Amuf = *A. muricata* (feuilles), Bp= *B. pilosa*, De = *D. edulis*, Ca= *C. acuminata*, Cm = *C. macrostachyus*, Cr = *C. purpurascens*, Ec = *E. cocinea*, Eh= *E. hirta*, Fe = *F. exasperata*, Nt = *N. tabacum*, Ptf = *P. thonningii* (feuilles), Pte = *P. thonningii* (écorces), Pum = *P. umbellatum*, Pf =*P. fulva*, Sc = *S. companulata*, Sal = *S. alata*, Saf= *S. africana*, Vg = *V. guineensis*, Amg = *A. muricata* (graines), Alf = *A. floribunda*, Ase = *A. senegalensis* (écorces), Asf = *A. senegalensis* (feuilles), Ddi = *D. deilistenia*, Og= *O. grassimun*, Ese=*E. senegalensis* (écorces), Asw=*A. sweinfurtii*

**Tableau XV: Valeurs des CI<sub>50</sub> en µg/mL pour la production de NO des extraits bruts de plante**

<b>Plantes Médicinales</b>	<b>Partie de la plante utilisée</b>	<b>CI<sub>50</sub> NO (µg/mL)</b>
<i>Acanthus. Montanus</i>	Feuilles	22,73±5,19**
<i>Ageratum conoides</i>	Partie aérienne	35,14±0,31**
<i>Alchornea laxiflora</i>	Feuilles	66,57±4,01**
<i>Annona muricata</i>	Feuilles	51,59±2,46**
<i>Bidens pilosa</i>	Feuilles	51,05±0,82**
<i>Dacryodes edulis</i>	Ecorces	49,16±2,39**
<i>Crinum purpurascens</i>	Bulbes	12,08±1,68**
<i>Croton macrostachyus</i>	Racines	24,85±0,99**
<i>Emilia coccinea</i>	Partie aérienne	99,41±5,09**
<i>Euphorbia hirta</i>	Partie aérienne	88,98±9,52**
<i>Nicotiana tabacum</i>	Feuilles	95,01±12,14**
<i>Piliostigma thonningii</i>	Feuilles	51,98±1,40**
<i>Piper umbellatum</i>	Feuilles	46,19±1,12**
<i>Senna alata</i>	Feuilles	64,93±1,42**
<i>Spilanthes Africana</i>	Fleurs	78,03±8,89**
<i>Annona muricata</i>	Graines	40,25±2,49**
<i>Allanblackia floribunda</i>	Feuilles	37,55±1,80**
<i>Annona senegalensis</i>	Ecorces	86,77±7,54**
<i>Annona senegalensis</i>	Feuilles	33,83±2,34**
<i>Erythrina senegalensis</i>	Ecorces	33,58±1,08**
<b>Quercétine</b>		6.59±0.87

Différence Significative \*\* (p<0,01) comparé à la quercétine.

### III-2-5-2- Effet des extraits bruts de plantes sur l'inhibition de la lipoxgénase

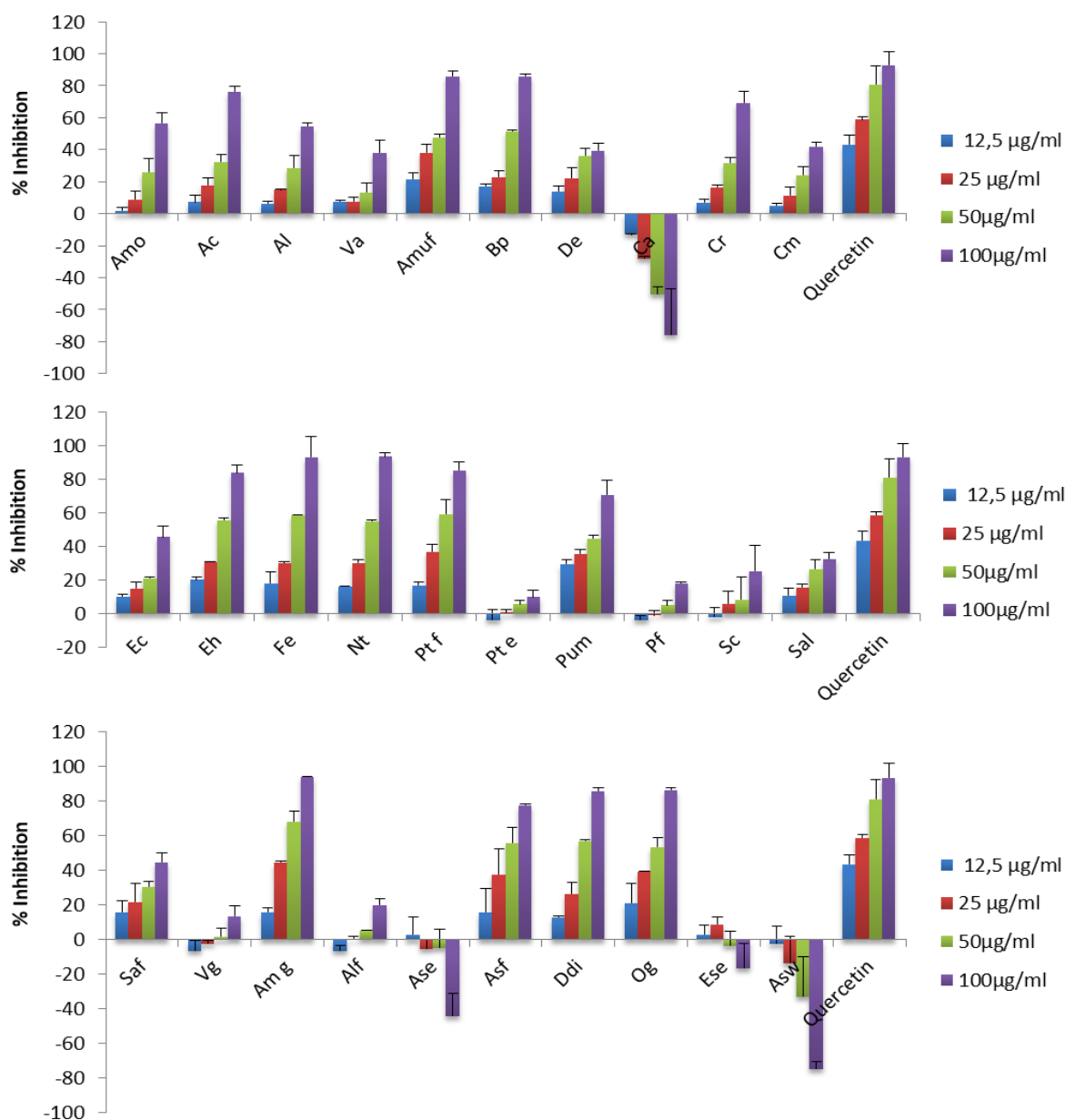
L'inhibition de la 15-lipoxgénase par les extraits a été mesurée en utilisant le test d'oxydation ferrique du xylénol orange (FOX) à base de microplaques à 96 puits. L'inhibition a été effective pour la plus part des extraits de plante testés avec une activité dépendante de la concentration (figure 32). A 100 µg / mL, l'extrait de graines d'*Annona muricata* avait l'activité la plus élevée avec une inhibition de 93,72%. Les extraits de *Cola acuminata*, d'écorce d'*Annona senegalensis*, d'*Erythrina senegalensis* et d'*Anthocleista sweinfurthii* n'étaient pas actifs aux concentrations testées. Les valeurs de la CI<sub>50</sub> étaient comprises entre 30,43 µg / mL (graines d'*A. muricata*) et 93,60 µg / mL (*Acanthus montanus*) (Tableau XVI) et la valeur de la CI<sub>50</sub> d'extraits moins actifs (inhibition inférieure à 50%) était considérée

comme supérieure à 100 µg / mL. La meilleure activité a été obtenue avec l'extrait de graines d' *A. muricata* (CI<sub>50</sub> de 30, 43 µg / mL) significativement supérieure (p<0,05) à celle de la quercétine (CI<sub>50</sub> de 16,14 µg / mL).

**Tableau XVI: Valeurs de CI<sub>50</sub> des extraits bruts de plantes pour l'inhibition de la lipoxigénase (15-LOX)**

<b>Plantes médicinales</b>	<b>Parties de la plante utilisée</b>	<b>CI<sub>50</sub> de 15-LOX (µg/mL)</b>
<i>Acanthus montanus</i>	Feuilles	96,60±4,40*
<i>Ageratum conozoïdes</i>	Partie aérienne	58,97±0,69*
<i>Alchornea laxiflora</i>	Feuilles	90,42±0,42*
<i>Annona muricata</i>	Feuilles	37,12±2,23*
<i>Bidens pilosa</i>	Feuilles	41,63±2,10*
<i>Crinum purpurascens</i>	Bulbes	67,94±5,56*
<i>Euphorbia hirta</i>	Partie aérienne	38,10±2,45*
<i>Ficus exasperata</i>	Feuilles	35,44±1,55*
<i>Nicotiana tabacum</i>	Feuilles	36,51±0,29*
<i>Piliostigma thonningii</i>	Feuilles	36,07±5,48*
<i>Piper umbellatum</i>	Feuilles	45,88±5,63*
<i>Annona muricata</i>	<b>Graines</b>	<b>30,43±1,40*</b>
<i>Annona senegalensis</i>	Feuilles	39,02±11,54*
<i>Draceana deisteliana</i>	Feuilles	40,22±2,56*
<i>Ocimum gratissimum</i>	Feuilles	35,22±1,88*
<b>Quercétine</b>		16,14±1,15

Les valeurs sont les moyennes ± écart- type de 3 essais différents en double. Différence Significative \* (p<0,05) comparé au contrôle positif (quercétine).



**Figure 32: Inhibition de la lipoxygénase des extraits bruts de plante**

Amo= *A. montanus*, Ac = *A. conyzoides*, Al = *A. laxiflora*, Va = *V. Africana*, Amuf = *A. muricata* (feuilles), Bp= *B. pilosa*, De = *D. edulis*, Ca= *C. acuminata*, Cm = *C. macrostachyus*, Cr = *C. purpurascens*, Ec = *E. cocinea*, Eh= *E. hirta*, Fe = *F. exasperata*, Nt = *N. tabacum*, Ptf = *P. thonningii* (feuilles), Pte = *P. thonningii* (écorces), Pum = *P. umbellatum*, Pf =*P. fulva*, Sc = *S. companulata*, Sal = *S. alata*, Saf= *S. africana*, Vg = *V. guineensis*, Amg = *A. muricata* (graines), Alf = *A. floribunda*, Ase = *A. senegalensis* (écorces), Asf = *A. senegalensis* (feuilles), Ddi = *D. deilistenia*, Og= *O. grassimun*, Ese= *E. senegalensis* (écorces), Asw=*A. sweinfurtii*

### III-2-5- Discussion partielle

La production des radicaux libres est une cause importante dans le processus neurodégénératif due à la sensibilité des neurones à ceux-ci. Plusieurs études ont montré l'implication du stress oxydatif dans la pathogenèse des maladies neurodégénératives comme la MA ou MP (**Gandhi and Abramov, 2012; Zhao and Zhao, 2013; Chen and Zhang, 2014**). Plusieurs hypothèses sont émises quant à l'augmentation du stress oxydatif (**Bhat et al., 2015**): (1) une augmentation du fer, aluminium et mercure dans le cerveau capable de stimuler la production des radicaux libres ; (2) une augmentation de l'oxydation des protéines et ADN ; (3) présence d'agrégats protéiques capable de générer les radicaux libres. Egalement, le tissu nerveux est riche en fer ( $Fe^{3+}$ ), en acides gras polyinsaturés, en lipides et son activité métabolique très élevée lui confère une particularité vulnérable au stress oxydatif. La sensibilité du cerveau aux radicaux libres entraîne l'oxydation des protéines, la peroxydation des lipides et l'oxydation de l'ADN présentes dans le cerveau (**Butterfield and Lauderback, 2002 ; Praticó and Sung, 2004**). Au cours du vieillissement, la production des radicaux libres est intensifiée et le fonctionnement du système antioxydant est diminué conduisant à l'oxydation des molécules biologiques (protéines, lipides, ADN, glucides). Cette oxydation provoque un dysfonctionnement cellulaire (**Madeo and Elsayad, 2013**). Plusieurs mécanismes sont mis en jeu par l'organisme pour lutter contre le stress oxydatif. On a les antioxydants endogènes (la superoxyde dismutase, la catalase et le glutathion peroxydase) produits par l'organisme permettant ainsi de pallier l'excès des radicaux libres et empêcher les réactions radicalaires. D'autres antioxydants sont également apportés à l'organisme ceux-ci sont couramment appelés « antioxydants naturels ». Les antioxydants les plus connus sont le  $\beta$ -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) ainsi que les composés phénoliques. Leurs mécanismes d'action sont divers, incluant le captage de l'oxygène singulet, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes, la chélation des métaux de transition (**Evans, 2000**). L'utilisation d'antioxydants présents dans les fruits, les légumes et les plantes est un moyen approprié de retarder le stress oxydatif dans le cerveau. Pour étudier l'activité antioxydante d'un extrait de plante, il est essentiel de faire recours à plusieurs méthodes d'évaluation car l'activité antioxydante d'un extrait de plante est influencée par plusieurs facteurs comme la composition chimique de l'extrait et le modèle expérimental (**Blazekovic et al., 2010**). Plusieurs méthodes sont employées pour étudier les propriétés anti-oxydantes d'une plante. Parmi ces méthodes on a : le piégeage du radical libre DPPH, la neutralisation du dérivé oxygéné  $H_2O_2$ , la chélation des métaux de transition mesurée par la méthode du pouvoir



réducteur, blanchissement du  $\beta$ -carotène et l'inhibition de la xanthine oxydase (**Moyo et al., 2010**). Dans cette étude, les tests de piégeage des radicaux au 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH), de la peroxydation des lipides (MDA), de la capacité antioxydante totale et du pouvoir chélateur des ions ferreux ont été utilisés pour évaluer les activités antioxydantes des extraits bruts. L'activité de piégeage des radicaux libres de DPPH est un modèle très utilisé pour évaluer la capacité de piégeage des radicaux libres de divers composés (**Moyo et al., 2010**). La diminution de l'absorbance dans ce test résulte d'un changement de couleur du violet au jaune, les radicaux étant piégés par les antioxydants par le biais du don d'hydrogène pour former la molécule stable de DPPH. Les substances capables de provoquer cette réaction peuvent être considérées comme des antioxydants ou des pièges de radicaux (**Dimitrios, 2006**). L'extrait de *A. senegalensis* (écorces) a montré une activité plus forte avec une  $CI_{50}$  de  $7,40 \pm 0,00 \mu\text{g/mL}$  comparable à celle de la vitamine C ( $8,41 \pm 0,20 \mu\text{g/mL}$ ). Le pouvoir réducteur d'un composé est un facteur de soutien pour sa capacité antioxydante. Dans l'analyse de la capacité réductrice, les composés antioxydants convertissent la forme oxydante du fer ( $\text{Fe}^{3+}$ ) dans le chlorure ferrique en une substance ferreuse ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Certains auteurs ont signalé que les propriétés réductrices des antioxydants sont généralement associées à la présence de réducteurs. L'extrait de *C. acuminata* présente le pouvoir réducteur le plus élevé, suggérant ainsi la présence de réducteurs dans cet extrait. De nombreuses études menées sur *C. acuminata* concernent plutôt l'activité antioxydante des graines, communément appelée noix de cola (**Lowe et al., 2014; Oboh et al., 2014; Ogunlade et al., 2014**). À notre connaissance, il s'agit du premier rapport sur l'activité antioxydante de l'extrait d'écorce de *C. acuminata*. La méthode au phosphomolybdène a été utilisée pour déterminer l'activité antioxydante totale des différents extraits, et l'extrait de *D. edulis* présente la capacité antioxydante la plus élevée ( $385,15 \text{ mg AAE} / \text{g d'extrait}$ ). Cette capacité antioxydante élevée peut être attribuée à la présence des phénols ( $85,45 \pm 7,71 \text{ mg GAE} / \text{g d'extrait}$ ) dans l'extrait. La peroxydation lipidique est le mécanisme par lequel les espèces réactives de l'oxygène (EROs) attaquent les lipides et qui ont une réactivité suffisante pour extraire un atome d'hydrogène d'un carbone de méthylène situé dans leur chaîne latérale (**Praticó and Sung, 2004**). Il a été rapporté que la peroxydation lipidique est élevée dans le cerveau des patients atteints de MA ou MP (**Butterfield and Lauderback, 2002**). Au cours de la peroxydation des lipides, l'oxydation des acides gras polyinsaturés conduit à la formation de produits finaux de faible poids moléculaire, tel que le malonaldéhyde, qui peut réagir avec deux molécules d'acide thiobarbiturique pour donner un chromogène rouge rosé. La peroxydation lipidique est induite par  $\text{H}_2\text{O}_2 / \text{Fe}^{2+}$ . L'extrait d'*A. Laxiflora* ( $3,20 \mu\text{g} / \text{mL}$ ) était le plus actif par rapport

au trolox, composé de référence (4,35 µg / mL) et cette activité peut être due à sa teneur élevée en composés phénoliques (92,12 mg d'EGA / g d'extrait).

Les composés phénoliques, qui incluent les flavonoïdes, sont couramment présents dans le règne végétal et leurs effets biologiques, y compris l'activité antioxydante, sont multiples. En raison de leur groupe hydroxyle, les composés phénoliques sont connus comme des antioxydants (**Moyo et al., 2010**). Les flavonoïdes sont un groupe de composés polyphénoliques, qui présentent divers effets biologiques pertinents dans les maladies neurodégénératives (**Ahuja et al., 2011; Costa et al., 2016**). Les teneurs totales élevées en phénoliques et en flavonoïdes entraînent une meilleure activité antioxydante. En effet, les résultats montrent que le type et la quantité de composés phytochimiques trouvés varient selon les extraits de plantes. Malheureusement, une très faible corrélation a été observée entre les activités antioxydantes et la teneur en composés phénoliques ou flavonoïdes, ce qui peut être dû à la diversité des plantes utilisées appartenant à différentes familles ou espèces

Tous les extraits de plantes utilisés dans cette étude inhibent l'acétylcholinestérase, mais cinq d'entre eux présentent une très bonne activité inhibitrice, notamment les extraits de *C. purpurascens*, *E. coccinea*, *E. senegalensis*, *A. conyzoides* et *P. umbellatum*. La meilleure activité inhibitrice a été démontrée par l'extrait de *C. purpurascens* appartenant à la famille des Amaryllidacées. Certaines études rapportent le potentiel de plantes de la famille des Amaryllidaceae en tant qu'inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (AChEI), en particulier des espèces *Crinum* (**Abou-Donia et al., 2012; Calderon et al., 2010; Ding et al., 2017; Marston et al., 2017**). On sait que les plantes de la famille des Amaryllidacées contiennent divers composés, tels que des flavonoïdes et des alcaloïdes, inhibiteurs de l'enzyme acétylcholinestérase (**Elgorashi et al., 2004; Houghton et al., 2004**). L'activité indiquée par quatre autres extraits de plantes, à savoir *E. coccinea*, *E. senegalensis*, *A. conyzoides* et *P. umbellatum* peut s'expliquer par la présence de certains alcaloïdes et polyphénols dans les extraits (**Gutierrez et al., 2013**); et d'autres études ont rapporté les activités neuropharmacologiques de certaines de ces plantes (**Biradar and Joshi, 2011; Ndam et al., 2014; Shakir et al., 2013; Simplicite et al., 2014; Togola et al., 2008**).

Il a été rapporté que la neuro-inflammation est impliquée dans la pathogenèse de la plupart des maladies neurodégénératives (**Singh, 2015 ; Pimplikar, 2014 ; Wyss-Coray and Mucke, 2002**). Dans le système nerveux central, l'oxyde nitrique (NO) joue un rôle important dans des processus tels que la libération de neurotransmetteurs, la réabsorption de neurotransmetteurs, la régénération, le développement neurologique, la plasticité synaptique

et la régulation de l'expression des gènes ; mais une production excessive entraîne des lésions neuronales. La production du NO est liée aux maladies neurodégénératives en raison de l'expression accrue de plusieurs enzymes pertinentes pour la neurodégénérescence (**Yuste et al., 2015**). Par conséquent, l'inhibition de la production de NO dans les cellules RAW 264.7 stimulées par les LPS est l'un des moyens possibles de cribler divers composés anti-inflammatoires (**Joo et al., 2014**). L'activité anti-inflammatoire des extraits bruts a été réalisée en évaluant l'inhibition de la production de NO par les cellules RAW 264.7 après les tests de viabilité à l'aide du test au MTT. La plupart des extraits aux quatre concentrations testés n'ont pas d'effet cytotoxique, ce qui indique que l'effet inhibiteur de NO des extraits de plantes sur les cellules n'est pas dû à leur cytotoxicité. La production de NO induite par le LPS était inhibée par la plupart des extraits bruts, en particulier l'extrait de *C. purpurascens*. L'inhibition de la production de NO par les extraits de plantes peut résulter de l'inhibition de l'expression de l'oxyde nitrique synthase (iNOS), et une plante de la pharmacopée camerounaise *Entada africana* a montré cet effet sur les macrophages activés par le LPS (**Owona et al., 2013**). Plusieurs études ont démontrés la présence des alcaloïdes tels que la lycorenine, pratorimine, montanine, crinine ou crinidine dans l'extrait de *C. purpurascens* (**Nkanwen et al., 2009; Refaat et al., 2013**) connus comme inhibiteurs de la production du NO. Les lipoxygénases (LOX) sont des enzymes appartenant à une famille de lipides-peroxydants, qui jouent un rôle régulateur dans le processus inflammatoire et les maladies neurodégénératives. Ces enzymes sont largement exprimées dans le système nerveux central (**Eleftheriadis et al., 2016**). L'enzyme 15-LOX convertit l'acide arachidonique en peroxydes lipidiques qui, en présence du glutathion, sont ensuite convertis en différents médiateurs inflammatoires. Il a été démontré que les inhibiteurs de la lipoxygénase sont capables de protéger les cellules neuronales ainsi que les cellules oligodendrocytes de la mort cellulaire induite par le stress oxydatif (**Van Leyen et al., 2008**). Par conséquent, l'inhibition de la 15-LOX est une nouvelle option pour le traitement des troubles neurodégénératifs. La meilleure activité inhibitrice de 15-LOX a été obtenu avec l'extrait des graines d'*Annona muricata* (CI<sub>50</sub> de 30,43 µg / mL) et cet extrait peut donc être considéré comme un potentiel inhibiteur de LOX. Ces résultats sont comparables à ceux de **Dzoyem and Eloff., 2015** qui ont démontré que l'extrait de *Burkea africana* inhibe la 15-LOX avec une CI<sub>50</sub> de 37,25±0,88 µg/mL.

### III-2-6-Conclusion partielle

Au terme de cette partie dont l'objectif était d'évaluer *in vitro* les propriétés antioxydante, anti-acétylcholinestérase et anti-inflammatoire des extraits bruts de plantes, il en ressort que ;

- Les extraits d' *A. senegalensis* (écorces), *A. laxiflora* (feuilles), *D. edulis* (écorces) et *C. acuminata* (écorces) ont présentés des meilleures activités antioxydantes. Plus précisément, l'extrait de *D. edulis* a présenté la capacité antioxydante la plus élevée (385,15 mg AAE / g d'extrait), l'extrait d'*A. Laxiflora* a présenté une meilleure activité inhibitrice de la peroxydation lipidique (3,20 µg / mL), l'extrait de *C. acuminata* a présenté un pouvoir réducteur le plus élevé (0,620) et l'extrait de *A. senegalensis* a montré une meilleure activité antiradicalaire avec une CI<sub>50</sub> de 7,40 µg/mL. Des teneurs élevées en polyphénols totaux ont été observées chez *A. senegalensis* (100 mg EAG / g d'extrait) et *C. acuminata* (93,18 mg EAG / g d'extrait).
- L'extrait de *C. purpurascens* a présenté une meilleure activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase avec une valeur de CI<sub>50</sub> de 99,40 ± 1,28 µg / mL.
- L'extrait de *Crinum purpurascens* a mieux inhibé la production de NO avec une valeur de CI<sub>50</sub> de 12,08±1,68 µg/mL et l'extrait d'*Annona muricata* a présenté une meilleure activité inhibitrice de la lipoxigénase (CI<sub>50</sub> de 30, 43 µg / mL).

Pour la suite de travail, il a été question d'évaluer *in vitro* l'effet protecteur des extraits actifs de plantes sur les cellules d'astrocytomes humaines U373MG contre la toxicité induite par l'aminochrome. Ainsi, les extraits utilisés dans cette partie de travail ont été sélectionnés sur la base des résultats des activités antioxydantes, anti-acétylcholinestérase et anti-inflammatoires. Ces extraits de plantes sont: *Dacryodes edulis* (écorces), *Cola acuminata* (écorces), *Annona muricata* (graines), *Annona senegalensis* (écorces), *Alchornea laxiflora* (feuilles), *Crinum purpurascens* (bulbes).

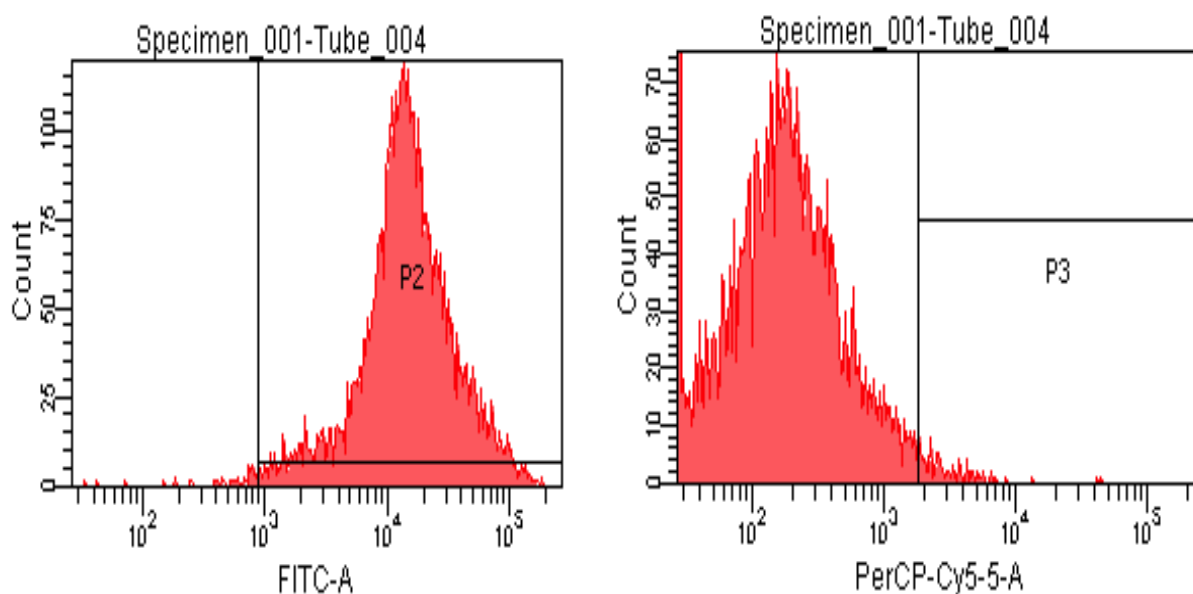
### III-3- Evaluation *in vitro* de l'effet protecteur de certains extraits bruts de plantes contre la toxicité induite par l'aminochrome sur les cellules astrocytomes humaines

#### III-3-1- Evaluation de la cytotoxicité des extraits de plantes

L'étude initiale visait à évaluer l'effet cytotoxique de différents extraits bruts de plantes afin de déterminer la concentration optimale (sous-toxique) de chaque extrait. Les lignées cellulaires d'astrocytomes humaines U373MG, U373MGsiGST6 et U373MGpSR ont été utilisées. Ces cellules ont été incubées avec les extraits à 4 concentrations différentes: 12,5 µg / mL, 25 µg / mL, 50 µg / mL et 100 µg / mL pendant 24 heures puis analysées à l'aide du cytomètre en flux. La figure 33 nous montre un exemple de résultat obtenu après analyse à l'aide de l'appareil de cytométrie en flux (FACSCalibur, BD Biosciences, USA). Le nombre total des cellules compté était de 5000. Les quadrants représentent les cellules vivantes émettant la fluorescence verte, les cellules mortes émettant la fluorescence rouges et les cellules en apoptose.

Le pourcentage de mortalité cellulaire a été déterminé grâce aux résultats du tableau B.

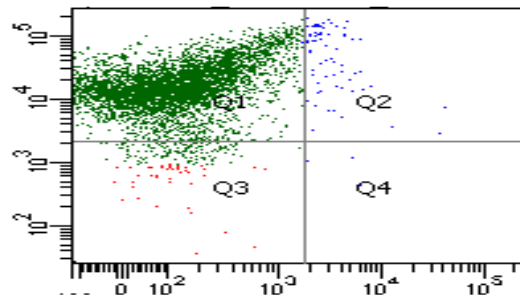
A



B

Experiment Name: 19 de Abril 18 P					
Specimen Name: Specimen_001					
Tube Name: Tube_004					
Record Date: Apr 19, 2018 11:30:03 AM					
\$OP: Administrator					
GUID: cec4090e-f9c8-4f2b-a5e7-30cc20bb9ecf					
Population	#Events	%Parent	FITC-A Mean	PerCP-Cy5-5-A Mean	
All Events	8,459	###	16,807	984	
P1	5,000	59.1	20,694	261	
Q1	4,681	93.6	20,672	191	
Q2	91	1.8	70,271	3,931	
Q3	225	4.5	1,355	165	
Q4	3	0.1	827	4,567	
P2	4,956	99.1	20,872	260	
P3	88	1.8	67,985	4,102	
Q1-1	4,387	87.7	20,937	174	
Q2-1	146	2.9	72,245	2,660	
Q3-1	459	9.2	2,295	168	
Q4-1	8	0.2	2,011	9,125	

C



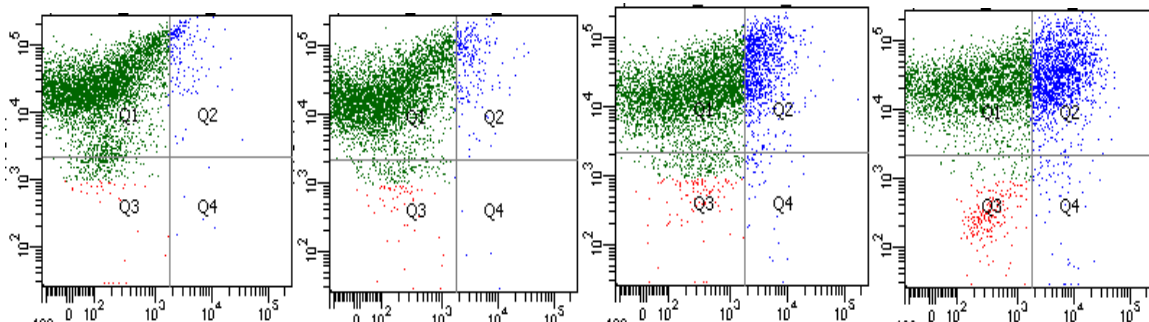
Control

12.5 µg/mL

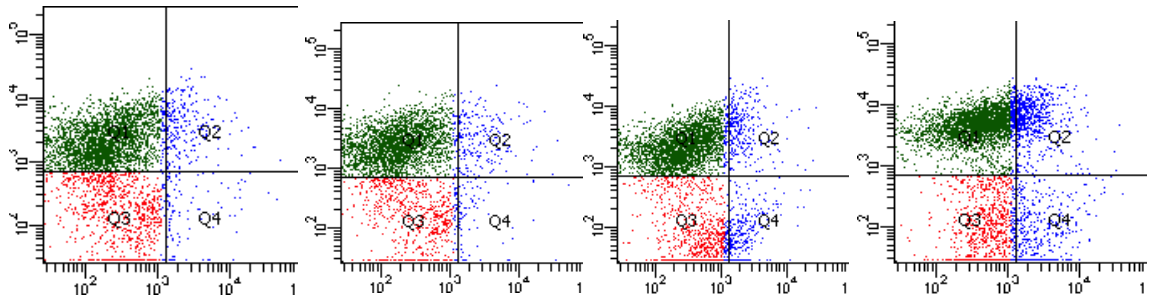
25 µg/mL

50 µg/mL

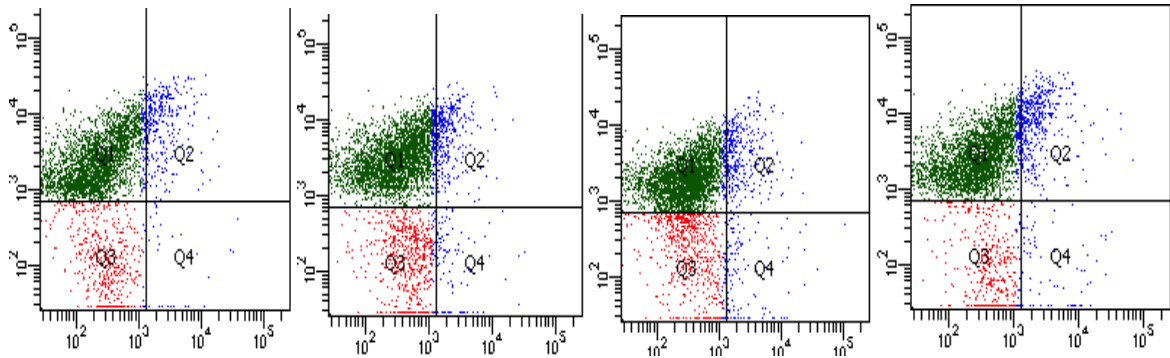
100 µg/mL



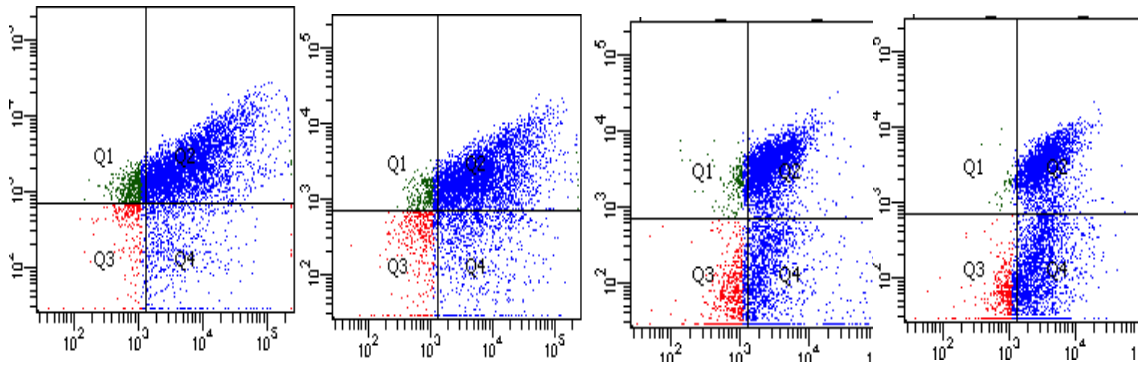
*D. edulis*



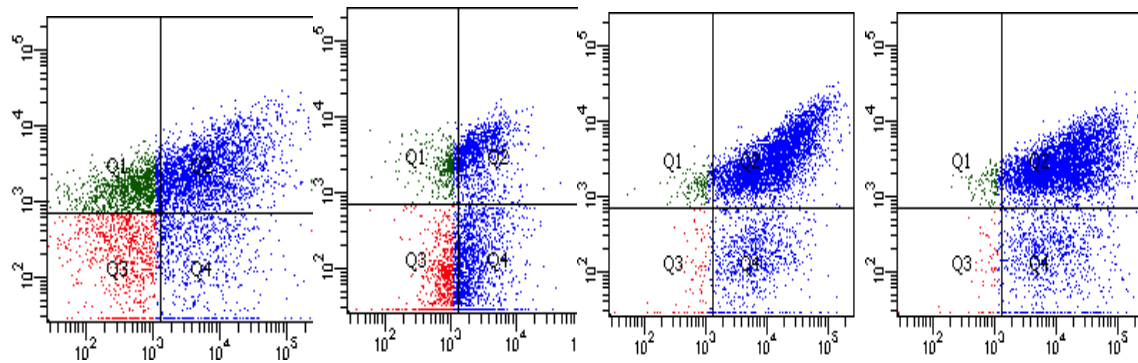
*A. senegalensis*



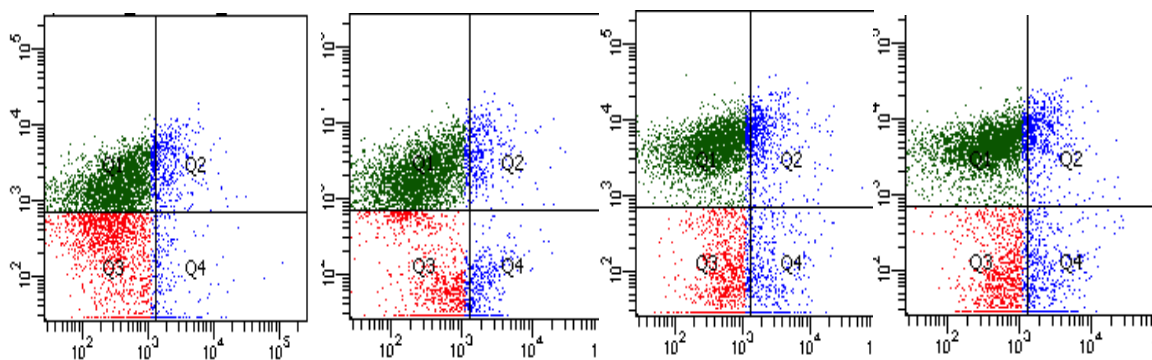
*A. muricata*



*A. laxiflora*



*C. purpurascens*



*C. acuminata*

**Figure 33: Exemple du Résultats bruts obtenus après analyse en cytométrie de flux**

A. Histogrammes représentant les résultats des fluorescences. L'axe des X représente l'intensité de la fluorescence, FITC-A (Vert) et PerCP-Cy5-5-A (Rouge); l'axe des Y représente le nombre de cellules.

B. Tableau des valeurs. P1 populations de cellules.

C. Graphique à points représentant l'effet des différents extraits sur les cellules. Les cellules du quadrant supérieur gauche (Q1) n'étaient positives que pour la calcéine AM montrant les cellules vivantes. Les cellules du quadrant inférieur droit (Q4) n'étaient positives que pour l'iodure de propidium montrant les cellules mortes. Les événements dans le quadrant supérieur droit (Q2) étaient doubles positifs pour les deux marqueurs montrant les cellules en apoptose, alors que le quadrant inférieur gauche (Q3) correspond aux cellules négatives pour les deux colorants. Les graphiques en points sont représentatifs des expériences en double avec des résultats similaires. Il y avait 5000 événements enregistrés / conditions expérimentales.

Les valeurs obtenues dans le tableau de valeur B a permis de calculer le pourcentage de mortalité cellulaire avec Q1 correspondant aux cellules vivantes, Q2 aux cellules en apoptose tardive et Q4 les cellules mortes. Après calculs du pourcentage de mortalité cellulaire, il en ressort que l'incubation de ces cellules avec des extraits de plantes à une concentration de 50 µg / mL ou de 100 µg / mL pendant 24 heures a induit la mort cellulaire ( $P < 0,001$ ). Cependant, à 12,5 µg / mL ou 25 µg / mL, certains extraits de plantes comme *D. edulis*, *C. acuminata*, *A. muricata* et *A. senegalensis* n'ont pas induits la mort cellulaire par rapport au contrôle (DMSO à 0,2%) (Tableau XVII). Parmi les 6 extraits, 2 à savoir *A. laxiflora*, *C. purpurascens* étaient cytotoxiques ( $P < 0,001$ ) aux quatre concentrations testées et les concentrations de ces deux extraits ont été réduites à 0,1; 1 et 10 µg / mL. À 10 µg / mL, nous avons observé une mortalité cellulaire différente du contrôle (DMSO à 0,2%)



Cependant, à 0,1 ou 1 µg / mL, la mortalité cellulaire n'était pas différente du contrôle (DMSO à 0,2%) (Tableau XVIII).

**Tableau XVII: Effet de quelques extraits bruts de plantes sur la mortalité cellulaire.**

		Mortalité cellulaire (%)		
		U373MG	U373MG siGST6	U373MG pSR
<i>Dacryodes</i>	12,5 µg / mL	2,64±0,36	6,66±3,67	8,26±0,74
<i>edulis</i>	25 µg / mL	4,56±0,25	8,34±1,15	6,63±0,12
<b>(Ecorces)</b>	50 µg / mL	20,32±2,02***	33,67±3,19***	32,28±1,16***
	100 µg / mL	30,70±2,16***	39,42±1,05***	31,04±0,60***
<i>Annona</i>	12,5 µg / mL	5,35±1,78	4,91±1,55	8,92±0,81
<i>muricata</i>	25 µg / mL	5,64±1,68	7,00±1,01*	13,50±1,60*
<b>(Graines)</b>	50 µg / mL	11,41±0,68**	15,35±0,14**	14,11±0,34**
	100 µg / mL	16,55±0,61**	30,24±0,06***	19,309±1,45***
<i>Annona</i>	12,5 µg / mL	7,06±3,08*	6,50±1,16	9,07±2,44*
<i>senegalensis</i>	25 µg / mL	10,15±3,15*	8,30±0,66	18,50±0,94**
<b>(Ecorces)</b>	50 µg / mL	17,46±0,58**	30,38±1,71***	23,57±0,64***
	100 µg / mL	54,23±3,38***	59,97±0,79***	55,20±3,55***
<i>Alchornea</i>	12,5 µg / mL	86,98±3,80***	45,37±0,90***	74,33±6,34***
<i>laxiflora</i>	25 µg / mL	82,95±5,71***	65,58±1,50***	81,76±0,60***
<b>(Feuilles)</b>	50 µg / mL	97,11±0,11***	89,55±0,59***	92,27±1,40***
	100 µg / mL	99,61±0,11***	98,57±0,15***	97,47±0,59***
<i>Cola</i>	12,5 µg / mL	20,35±2,08**	8,87±3,55*	9,92±1,12
<i>acuminata</i>	25 µg / mL	23,24±1,35**	7,90±0,13*	11,14±0,44*
<b>(Ecorces)</b>	50 µg / mL	18,23±1,23**	35,45±1,31***	34,01±2,44***
	100 µg / mL	30,44±1,04***	45,67±0,70***	34,34±0,82***
<i>Crinum</i>	12,5 µg / mL	41,70±1,76***	28,36±3,39***	42,70±0,90***
<i>purpurascens</i>	25 µg / mL	78,81±0,26***	39,72±0,94***	80,14±0,74***
<b>(Bulbes)</b>	50 µg / mL	92,43±0,08***	42,04±1,97***	91,86±0,37***
	100 µg / mL	98,63±0,45***	86,30±1,33***	98,29±0,29***
<b>Nicotine</b>	20 µM	4,18±0,97	1,97±0,06	8,79±0,27
	50 µM	5,63±0,42	2,82±0,17	5,83±0,84
<b>Contrôle (DMSO 0,2%)</b>		1,95±0,60	3,48±0,95	5,68±1,67

Les cellules ont été incubées à différentes concentrations pendant 24 heures. Les valeurs sont les moyennes ± SEM (n = 3). La signification statistique a été évaluée à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) permettant des comparaisons multiples (\* P <0,05; \*\* P <0,01; \*\*\* P

<0,001) par rapport au contrôle. Nic 20 et Nic 50 (nicotine à 20 µM et 50 µM respectivement utilisés comme standard.

**Tableau XVIII: Effet des extraits bruts de plantes □*A. laxiflora* et *C. purpurascens*□ sur la mortalité cellulaire**

		Mortalité cellulaire (%)		
		U373MG	U373MGsiGST6	U373MGpSR
<i>Alchornea laxiflora</i> (Feuilles)	0,1 µg / mL	10,77±0,29	5,13±1,50	2,34±1,03
	1 µg / mL	11,29±1,09	3,32±0,41	9,78±2,34
	10 µg / mL	25,84±1,16***	32,05±0,91***	42,40±0,74***
<i>Crinum purpurascens</i> (Bulbes)	0,1 µg / mL	13,45±1,80	9,23±2,97	7,02±5,54
	1 µg / mL	14,15±3,6	9,23±0,08	9,31±0,57
	10 µg / mL	61,10±4,87***	22,25±2,21***	51,84±1,64***
<b>Contrôle (DMSO 0,2%)</b>		8,41±0,65	3,46±0,92	2,34±0,55

Les cellules ont été incubées à différentes concentrations pendant 24 heures. Les valeurs sont les moyennes ± écart-type (n = 3). La signification statistique a été évaluée à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) permettant des comparaisons multiples (\*\*\* P <0,001) par rapport au contrôle.

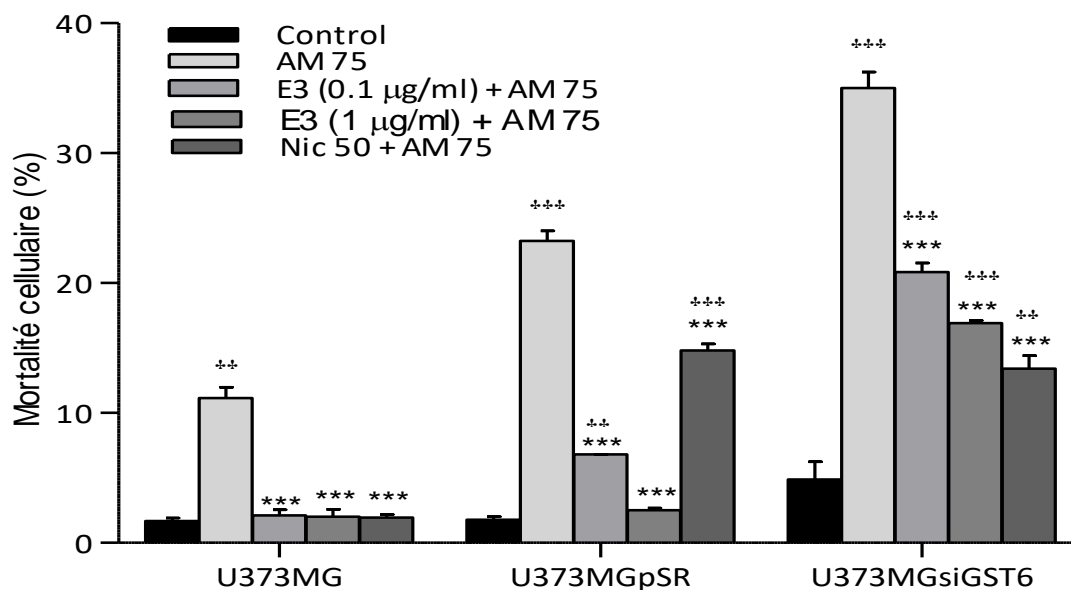
Pour l'évaluation de l'effet protecteur contre la toxicité induite par l'aminochrome, *D. edulis*, *C. acuminata*, *A. muricata*, *A. senegalensis* à 12,5 et 25 µg / mL et *A. laxiflora*, *C. purpurascens* à 0,1 et 1 µg / mL ont été utilisés dans l'expérience suivante car ces doses n'entraînent pas de mortalité différente au contrôle (DMSO 0,2%).

### III-3-2- Évaluation *in vitro* de l'effet protecteur des extraits bruts de plantes contre la toxicité induite par l'aminochrome

Les cellules ont été pré- incubées avec les extraits à 1 et 0,1 µg / mL (*A. laxiflora*, *C. purpurascens*) et à 12,5 µg / mL, 25 µg / mL (*D. edulis*, *C. acuminata*, *A. muricata*, *A. senegalensis*) pendant 2 heures puis l'aminochrome à 75 µM a été ajouté et incubé pendant 24 heures.

En ce qui concerne l'extrait d' *A. Laxiflora*, une diminution de la mort cellulaire a été observée dans les cellules U373MG, U373MGpSR et U373siGST6 traitées avec de l'aminochrome 75 µM en présence de 0,1 µg / ml d'extrait (2,11%; 6,80%; 20,83% de mortalité cellulaire ; P <0,001) ou 1 µg / mL (2,02%; 2,50%; 16,91% de mortalité cellulaire ; P <0,001) par rapport aux cellules traitées uniquement avec l'aminochrome 75 µM (11,12%,

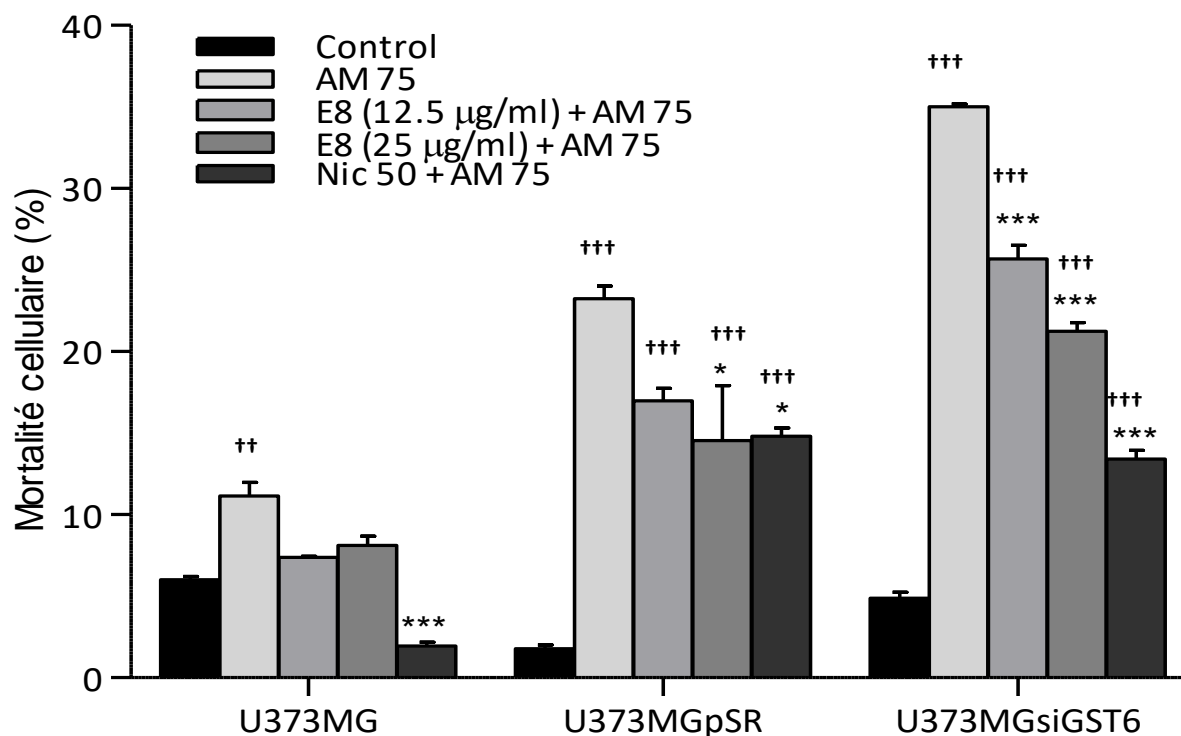
23,26%; 35,03% de mortalité cellulaire) respectivement (figure 34). Nous avons également observé une augmentation de la mortalité cellulaire dans les cellules traitées avec l'aminochrome 75  $\mu\text{M}$  (11,14%; 23,26%; 35,03% de mortalité cellulaire) par rapport au contrôle (1,67%, 1,77%; 4,87% de mortalité cellulaire  $P < 0,01$ ;  $P < 0,001$ ) (Figure 34). Ainsi, la toxicité induite par l'aminochrome 75  $\mu\text{M}$  a été réduite par l'extrait d'*A. laxiflora* à 0,1  $\mu\text{g} / \text{mL}$  et à 1  $\mu\text{g} / \text{mL}$ . Aucune différence n'a été observé entre l'extrait d'*A. laxiflora* et la nicotine (composé de référence).



**Figure 34: Effet de l'extrait d'*Alchornea laxiflora* (E3) sur la mortalité cellulaire induite par l'aminochrome**

Une pré-incubation des cellules avec 0,1  $\mu\text{g} / \text{mL}$  et 1  $\mu\text{g} / \text{mL}$  d'extrait d'*A. laxiflora* pendant 2 heures a protégé de manière significative les cellules contre la toxicité induite par l'aminochrome (AM 75  $\mu\text{M}$ ). La signification statistique a été évaluée à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) permettant des comparaisons multiples (\*\*\*)  $P < 0,001$  par rapport à AM 75 et (†† $P < 0,01$  ; †††  $P < 0,001$ ) par rapport au contrôle (DMSO à 0,2%). Nic 50 (la nicotine à 50  $\mu\text{M}$  a été utilisée comme contrôle positif).

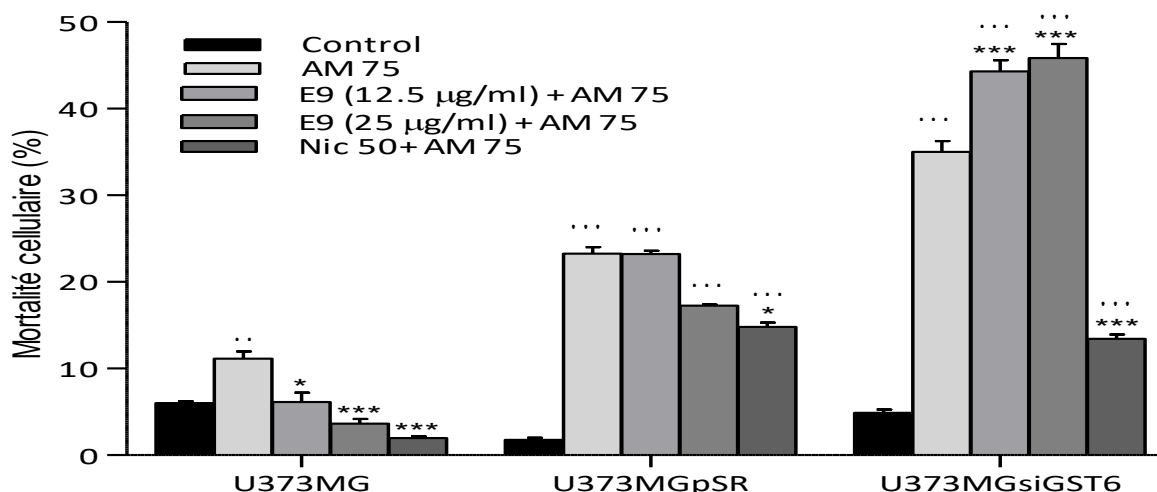
Pour ce qui est de l'extrait de *D. edulis*, une diminution de la mort cellulaire a été observée dans les cellules U373MGsiGST6 pré-incubées avec 12,5  $\mu\text{g} / \text{mL}$  (25,67% de mortalité cellulaire  $P < 0,05$ ) ou 25  $\mu\text{g} / \text{mL}$  (21,26% de mortalité cellulaire  $P < 0,001$ ) avant l'addition d'aminochrome 75  $\mu\text{M}$  par rapport aux cellules traitées avec l'aminochrome uniquement (mortalité cellulaire 35,03%) (Figure 35). Il en ressort que l'extrait de *D. edulis* à 12,5 et 25  $\mu\text{g} / \text{mL}$  a entraîné une protection des cellules. Ainsi, la toxicité induite par l'aminochrome 75  $\mu\text{M}$  a été réduite par *D. edulis* à 12,5  $\mu\text{g} / \text{mL}$  et à 25  $\mu\text{g} / \text{mL}$ .



**Figure 35: Effet de l'extrait de *D. edulis* (E8) sur la mortalité cellulaire induite par l'aminochrome**

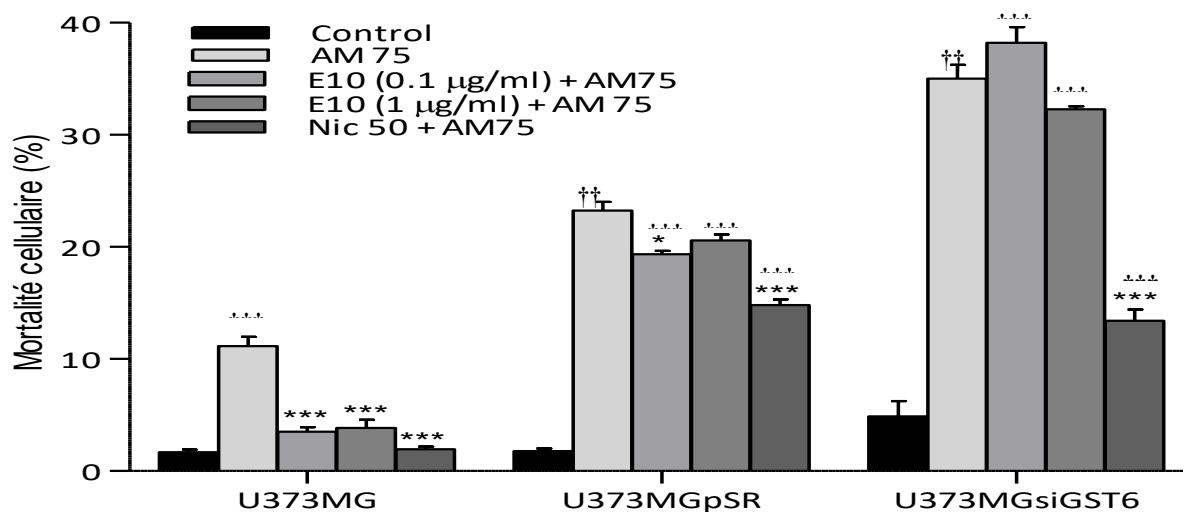
Une pré-incubation des cellules avec 12,5 µg / mL et 25 µg / mL d'extrait de *D. edulis* pendant 2 heures protège de manière significative les cellules contre la toxicité induite par l'aminochrome (AM 75 µM). La signification statistique a été évaluée à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) permettant des comparaisons multiples (\*P<0,05 ; \*\*\* P <0,001) par rapport à AM 75 et (††P<0,01 ; ††† P< 0,001) par rapport au contrôle (DMSO à 0,2%). Nic 50 (la nicotine à 50 µM a été utilisée comme contrôle positif).

Concernant les extraits de *C. acuminata*, et *C. purpurascens*, aucune diminution de la mortalité cellulaire n'a été observée lorsque les cellules U373MGpSR et U373MGsiGST6 ont été pré-incubées avec les extraits avant l'ajout de 75 µM d'aminochrome, par contre une diminution significative a été observée avec les cellules U373MG (Figure 36 et 37).



**Figure 36: Effet de l'extrait de *C. acuminata* (E9) sur la mortalité cellulaire induite par l'aminochrome**

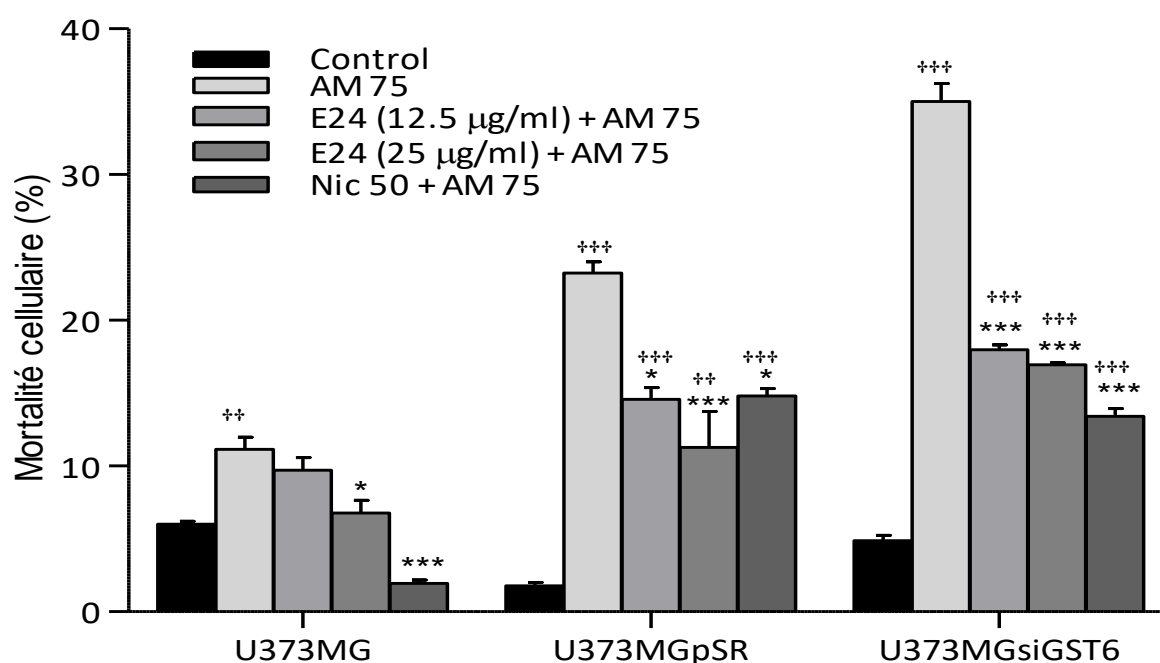
Une pré-incubation des cellules U373MGsiGST6 avec 12,5 µg / mL et 25 µg / mL d'extrait de *C. acuminata* pendant 2 heures n'a pas protégé les cellules contre la toxicité induite par l'aminochrome (AM 75 µM). La signification statistique a été évaluée à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) permettant des comparaisons multiples (\*P<0,05 ; \*\*\* P <0,001) par rapport à AM 75 et (††P<0,01 ; ††† P< 0,001) par rapport au control (DMSO à 0,2%). Nic 50 (la nicotine à 50 µM a été utilisée comme contrôle positif).



**Figure 37: Effet de l'extrait de *C. purpurascens* (E10) sur la mortalité cellulaire induite par l'aminochrome**

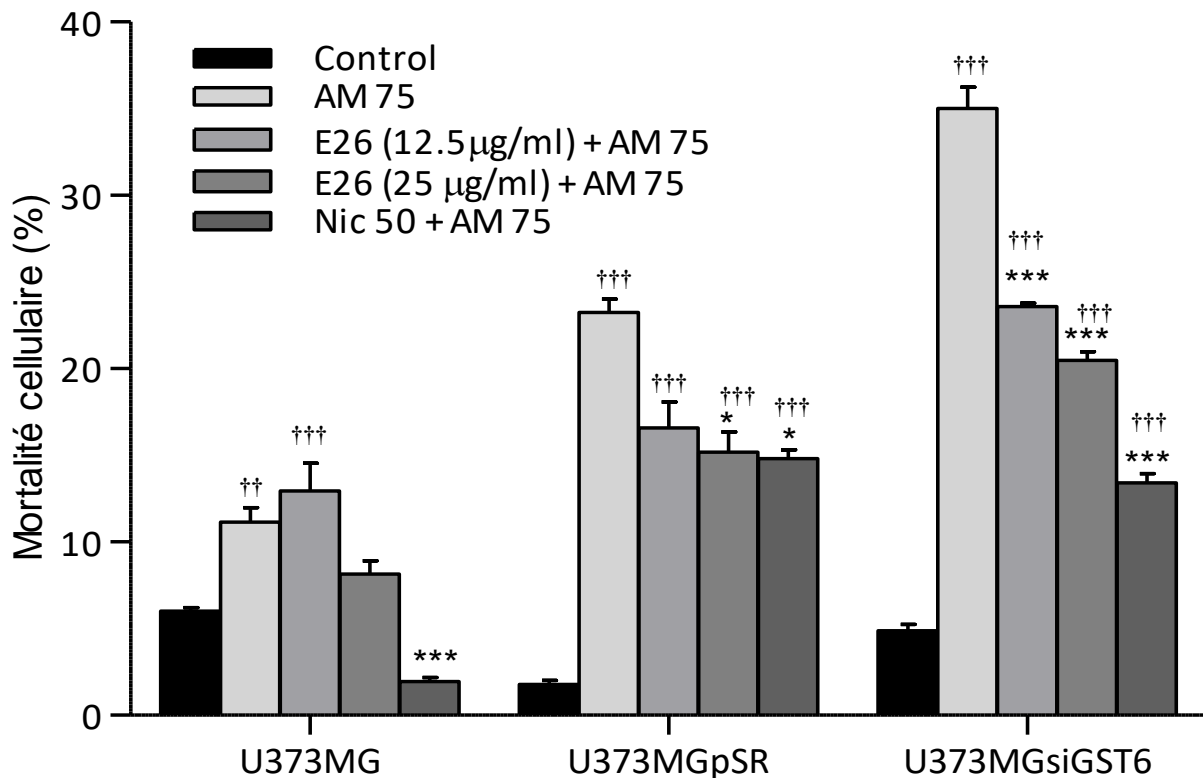
Une pré-incubation des cellules avec 0,1 µg / mL et 1 µg / mL d'extrait de *C. purpurascens* pendant 2 heures n'a pas protégé les cellules contre la toxicité induite par l'aminochrome (AM 75 µM). La signification statistique a été évaluée à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) permettant des comparaisons multiples (\*P<0,05 ; \*\*\* P <0,001) par rapport à AM 75 et (††P<0,01 ; ††† P< 0,001) par rapport au control (DMSO à 0,2%). Nic 50 (la nicotine à 50 µM a été utilisée comme contrôle positif).

Pour ce qui est de l'extrait d'*A. muricata*, une diminution de la mortalité cellulaire a été observée avec les cellules U373MG, U373MGpSR et U373siGST6. Ainsi, la toxicité induite par l'aminochrome 75  $\mu$ M (11,12%; 23,26%; 35,03% de mortalité cellulaire) a été réduite par *A. muricata* à (9,8%; 14,5% et 17,9% respectivement avec 12,5  $\mu$ g / mL, ns (non significatif) et P <0,001) et à (7,0%; 11,2% et 16,9%, respectivement avec 25  $\mu$ g / mL, P <0,05 P <0,001) (figures 38). Aucune différence n'a été observée avec l'extrait et la nicotine. Quant à l'extrait d'*A. Senegalensis*, nous observons que cet extrait à 12,5 et 25  $\mu$ g / mL a entraîné une protection significative des cellules U373siGST6 uniquement. Ainsi, la toxicité induite par l'aminochrome 75  $\mu$ M a été réduite par *A. Senegalensis* à (23,5% et 20,4% p <0,001) (figure 39).



**Figure 38: Effet de l'extrait de *A. muricata* (E24) sur la mortalité cellulaire induite par l'aminochrome**

La pré-incubation des cellules avec 12,5  $\mu$ g / mL et 25  $\mu$ g / mL d'extraits d'*A. muricata* pendant 2 heures protège les cellules contre la toxicité induite par l'aminochrome (AM 75  $\mu$ M). La signification statistique a été évaluée à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) permettant des comparaisons multiples (\*P<0,05 ; \*\*\* P <0,001) par rapport à AM 75 et (††P<0,01 ; ††† P< 0,001) par rapport au contrôle (DMSO à 0,2%). Nic 50 (la nicotine à 50  $\mu$ M a été utilisée comme contrôle positif).



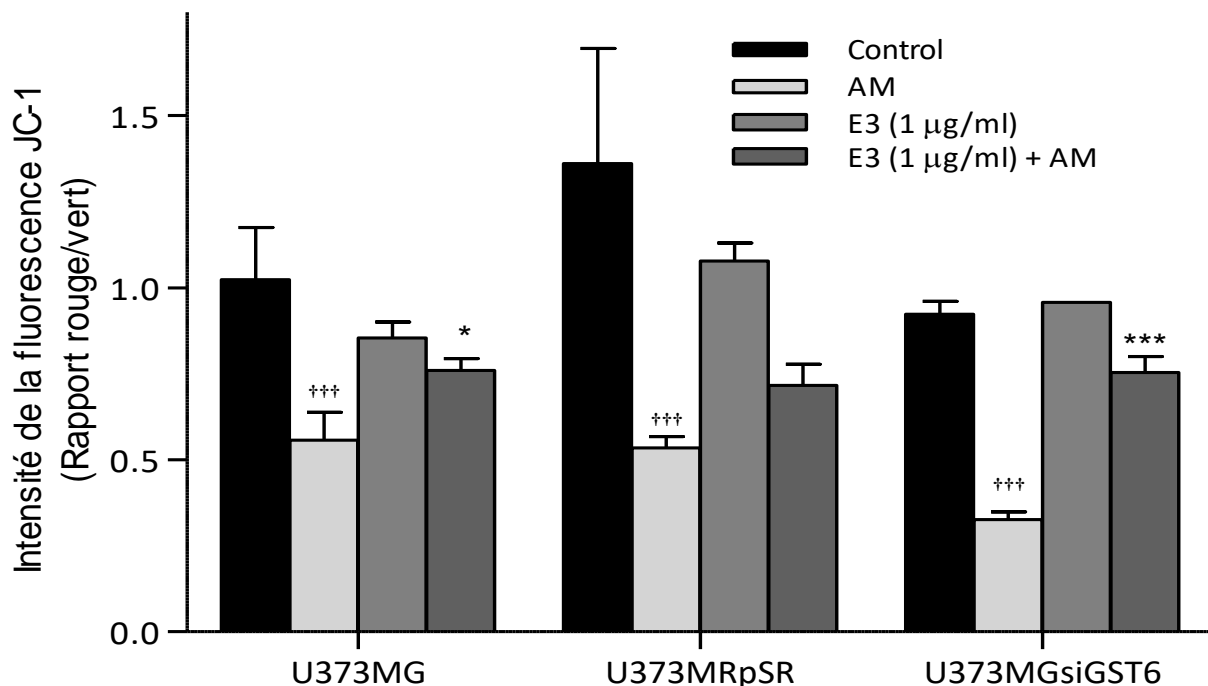
**Figure 39: Effet de l'extrait de *A. senegalensis* (E26) sur la mortalité cellulaire induite par l'aminochrome**

La pré-incubation des cellules avec 12,5 µg / mL et 25 µg / mL d'extrait d'*A. senegalensis* pendant 2 heures protège les cellules U373MGsiGST6 contre la toxicité induite par l'aminochrome (AM 75 µM). La signification statistique a été évaluée à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) permettant des comparaisons multiples (\*P<0,05 ; \*\*\* P <0,001) par rapport à AM 75 et (††P<0,01 ; ††† P< 0,001) par rapport au contrôle (DMSO à 0,2%). Nic 50 (la nicotine à 50 µM a été utilisée comme contrôle positif).

### III-3-3- Evaluation de l'effet des extraits bruts de plantes sur le dysfonctionnement du potentiel de membrane mitochondriale ( $\Delta\Psi_m$ ) induit par l'aminochrome

Le potentiel de membrane mitochondriale a été évalué en utilisant l'extrait d'*A. laxiflora* à 1,0 µg / mL, les extraits de *D. edulis*, d'*A. muricata*, d'*A. senegalensis* à 25 µg / mL, par contre l'effet des extraits de *C. acuminata* et *C. purpurascens* sur le dysfonctionnement mitochondrial n'a pas été évalué car n'ayant pas protégés les cellules contre la toxicité de l'aminochrome. Après pré-incubation des cellules pendant 2 heures avec les extraits puis ajout de l'aminochrome 75 µM, il en ressort que: L'incubation des cellules avec l'aminochrome seul a entraîné une réduction du potentiel membranaire dans les trois lignées cellulaires U373MG, U373MGpSR et U373MGsiGST6 (respectivement 0,55 ±0,13; 0,53 ±0,05; 0,32 ±0,03 rapport de l'intensité de fluorescence rouge /vert, P<0,001) comparé

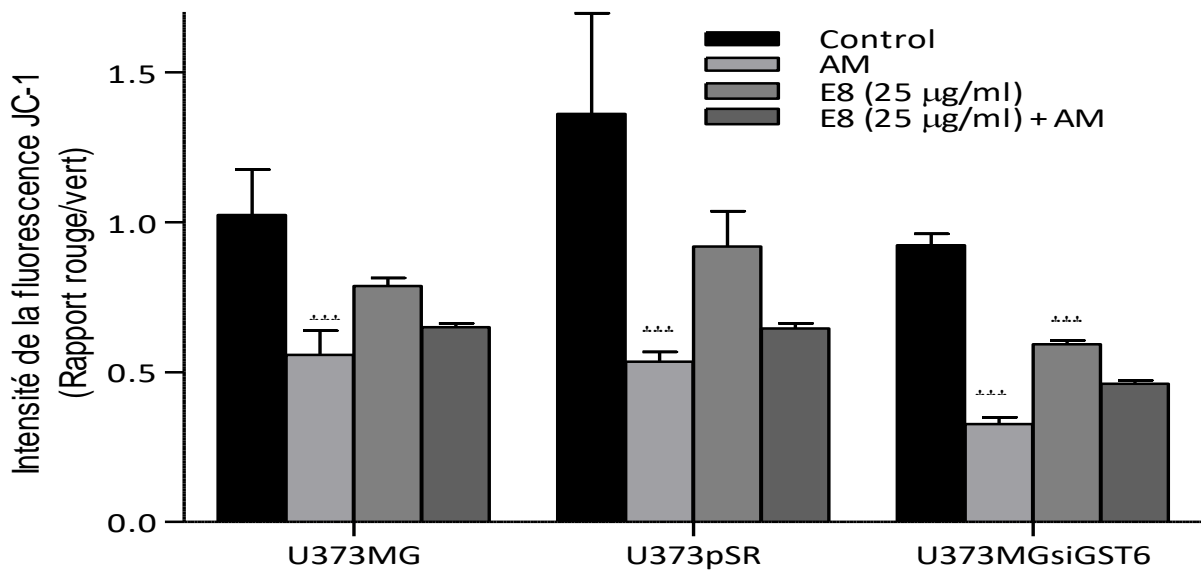
au control DMSO 0,2% (respectivement  $1,02 \pm 0,26$ ;  $1,36 \pm 0,58$ ;  $0,92 \pm 0,06$ ). Par contre une pré-incubation des cellules avec les extraits d'*A. laxiflora* et d'*A. muricata* a entraîné une augmentation du potentiel membranaire dans les trois lignées cellulaires respectivement ( $0,75 \pm 0,05$ ;  $0,73 \pm 0,10$  et  $0,76 \pm 0,08$ ;  $P < 0,05$  et  $P < 0,001$ ) et ( $0,77 \pm 0,05$ ;  $0,68 \pm 0,03$  et  $0,50 \pm 0,01$ ;  $P < 0,05$ ). D'où *A. laxiflora* à une concentration de  $1,0 \mu\text{g} / \text{mL}$  et *A. muricata* à une concentration de  $25 \mu\text{g} / \text{mL}$  protègent les cellules contre les altérations du potentiel de la membrane mitochondriale induites par l'aminochrome (Figure 40 et 42). Dans ce cas, cependant, aucune augmentation du potentiel de membrane mitochondriale n'a été observée avec les extraits de *D. edulis* et *A. senegalensis* (Figure 41 et 43).



**Figure 40: Effet d'extrait d'*A. laxiflora* (E3) sur le dysfonctionnement du potentiel de la membrane mitochondriale induit par l'aminochrome**

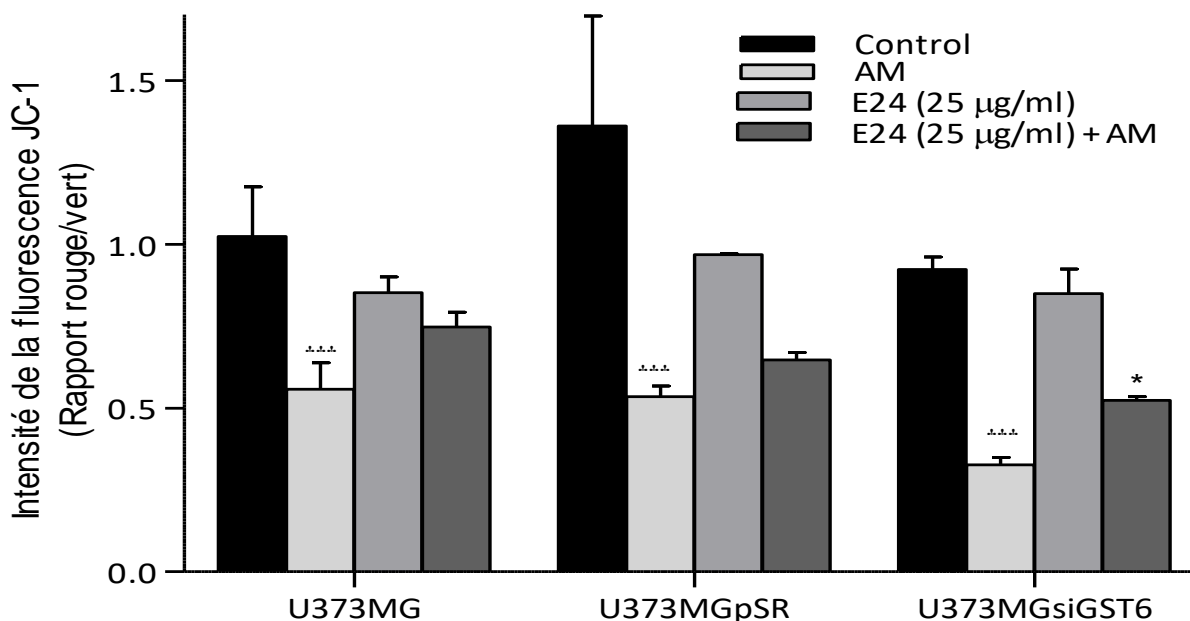
La signification statistique a été évaluée à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) permettant des comparaisons multiples (\* $P < 0,05$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ) par rapport à AM 75 et (†††  $P < 0,001$ ) par rapport au témoin (DMSO à 0,2%).





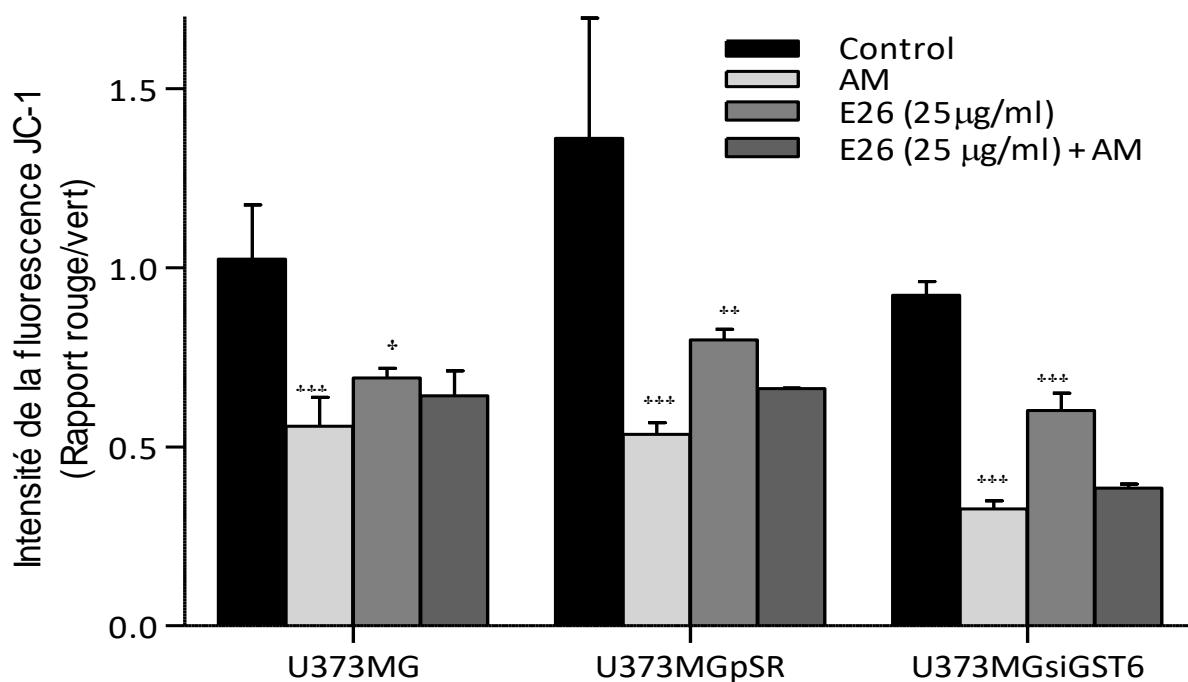
**Figure 41: Effet d'extrait de *D. edulis* (E8) sur le dysfonctionnement du potentiel de la membrane mitochondriale induit par l'aminochrome**

La signification statistique a été évaluée à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) permettant des comparaisons multiples (\* $P < 0,05$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ) par rapport à AM 75 et (†  $P < 0,05$ ; ††  $P < 0,01$ ; †††  $P < 0,001$ ) par rapport au témoin (DMSO à 0,2%).



**Figure 42: Effet d'extrait d'*A. muricata* (E24) sur le dysfonctionnement du potentiel de la membrane mitochondriale induit par l'aminochrome**

La signification statistique a été évaluée à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) permettant des comparaisons multiples (\* $P < 0,05$ ) par rapport à AM 75 et (†††  $P < 0,001$ ) par rapport au témoin (DMSO à 0,2%).



**Figure 43: Effet d'extrait d'*A. senegalensis* (E26) sur le dysfonctionnement du potentiel de la membrane mitochondriale induit par l'aminochrome**

La signification statistique a été évaluée à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) permettant des comparaisons multiples († P < 0,05; †† P < 0,01; ††† P < 0,001) par rapport au témoin (DMSO à 0,2%).

### III-3-4-Discussion partielle

Les astrocytes sont les cellules les plus abondantes du système nerveux central et jouent un rôle crucial dans le maintien de l'activité neuronale (Ben Haim *et al.*, 2015). L'oxydation de la dopamine en aminochrome est réalisable dans les astrocytes et les astrocytes ont une expression constitutive de la glutathione transférase M2 (GSTM2) pour catalyser la conjugaison de l'aminochrome avec le glutathion (Huenchuguala *et al.*, 2014). L'aminochrome a été proposé comme nouveau modèle expérimental préclinique pour étudier la dégénérescence dans la MP (Paris *et al.*, 2007; Segura-Aguilar *et al.*, 2016a,b; Segura-Aguilar, 2017b) et il a été rapporté que l'aminochrome, métabolite de la dopamine le plus stable est une neurotoxine impliquée dans le dysfonctionnement des mitochondries, la formation et la stabilisation de protofibrilles neurotoxiques de l' $\alpha$ -synucléine, le dysfonctionnement de la dégradation des protéines des systèmes protéasomal et lysosomal, la neuro-inflammation et le stress oxydatif (Paris *et al.*, 2009; Segura-Aguilar and Paris, 2014). Les dommages causés par les astrocytes peuvent affecter l'intégrité des neurones conduisant à la neurodégénérescence. Plusieurs plantes ont été testées pour leur activité antiparkinsonienne (Song *et al.*, 2012; Srivastav *et al.*, 2017) et ces plantes possèdent de

nombreuses propriétés pharmacologiques, notamment des propriétés antioxydantes et des anti-inflammatoires comme a montré les résultats précédents. Dans cette étude, les plantes médicinales camerounaises utilisées par les guérisseurs traditionnels pour traiter certains troubles neurologiques ont été évaluées pour leur effet protecteur contre la toxicité de l'aminochrome dans les lignées cellulaires U373MG. Les résultats de cette étude indiquent que les extraits bruts de plusieurs plantes indigènes Camerounaises peuvent protéger contre la toxicité induite par l'aminochrome dans les cellules d'astrocytomes humaines normales (U373MG), les astrocytomes où les plasmides vides ont été introduits (U373MGpSR), et les astrocytomes qui ont été réduits jusqu'à 74% de la glutathion transférase M2 (U373MGsiGST6). Étant donné que GSTM2, en tant qu'enzyme endogène, peut protéger contre la toxicité induite par l'aminochrome en le conjuguant avec du glutathion, les résultats suggèrent fortement que les extraits bruts de plantes peuvent au moins partiellement exercer leur propriété protectrice en renforçant cette enzyme. Ainsi, parmi le 6 extraits de plantes, 4 extraits à savoir : *Alchornea laxiflora*, *Dacryodes edulis*, *Annona muricata* et *Annona senegalensis* ont réduits la toxicité de l'aminochrome et, puisque l'aminochrome a été impliqué dans la pathologie de la MP, les résultats suggèrent également l'utilité potentielle de ces extraits de plantes dans la MP. Il est à noter que l'insertion des plasmides vides dans les cellules n'affectent pas l'activité de l'aminochrome car ces cellules se comportent de la même manière que les astrocytomes normales et que en absence de l'enzyme GSTM2, les cellules sont plus vulnérables à la toxicité de l'aminochrome .

Il est pertinent de noter que la dopamine elle-même, en provoquant un stress oxydatif, peut dans certaines circonstances contribuer à la dégénérescence sélective des neurones dopaminergiques de la substance noire (**Segura-Aguilar et al., 2014**). Par conséquent, lorsqu'il y a une quantité excessive de dopamine cytosolique, celle-ci peut subir une auto-oxydation pour générer des espèces réactives de l'oxygène (EROs). Les EROs en modifiant la respiration mitochondriale peuvent induire des modifications de la perméabilité des mitochondries des cellules cérébrales et donc des lésions du neurone (**Zucca et al., 2014**). L'auto-oxydation du DA peut également produire des quinones pouvant être oxydées en aminochrome, dont le cycle redox conduit à la génération de radicaux superoxydes et à l'accumulation ultime de neuromélanine, pouvant entraîner une toxicité considérable pour les neurones dopaminergiques (**Segura-Aguilar et al., 2014; Segura-Aguilar, 2017a; Zucca et al., 2014, 2017, 2018; Sulzer et al., 2018**). Cette toxicité peut être véhiculée par des protéines apparentées à la PD, telles que l' $\alpha$ -synucléine et la parkine, la superoxyde dismutase-2

(SOD2), l'inactivation du transporteur de DA (DAT) et l'enzyme tyrosine hydroxylase (TH) limitante, ainsi que le dysfonctionnement mitochondrial (**Blesa et al., 2015**). Certaines études ont signalé que l'aminochrome induit un dysfonctionnement mitochondrial en inhibant le complexe I et en diminuant les taux d'ATP (**Huenchuguala et al., 2017; Segura-Aguilar and Huenchuguala, 2018**), ce qui est impliqué dans les dommages causés par les astrocytes menant à un dysfonctionnement neuronal. La diminution de l'activité du Complexe I produit un excès de radicaux superoxydes capables de submerger les systèmes antioxydants naturels et éventuellement de provoquer un stress oxydatif et une neurodégénérescence (**Schapira et al., 1989**). L'effet des extraits de plantes sur l'aminochrome induisant une altération potentielle de la membrane mitochondriale a été évalué. Le potentiel membranaire mitochondrial ( $\Delta\psi_m$ ) est un paramètre important de la fonction mitochondriale utilisé comme indicateur de cellules saines. Comme mentionné précédemment, le dysfonctionnement mitochondrial est également étroitement lié à une augmentation de la formation des EROs. Ainsi, les déficiences du complexe I de la chaîne respiratoire chez les mitochondries représentent la majorité de l'apoptose neuronale, qui est considérée comme une source primaire des EROs dans la MP. Il est intéressant de noter que la production accrue des EROs peut inhiber le complexe I, entraînant un cercle vicieux de mécanisme d'avancement positif. De plus, la phosphorylation oxydative, le principal mécanisme utilisé par les mitochondries pour former de l'ATP, peut conduire à la formation de radicaux libres superoxyde et peroxyde d'hydrogène, contribuant ainsi à la progression de la maladie (**Blesa et al., 2015; Segura Aguilar, 2017a**). Ce scénario peut expliquer la cytotoxicité préférentielle vis-à-vis des neurones DA par des inhibiteurs du complexe I tels que la MPTP ou la roténone (**Blesa et al., 2015**). De plus, les EROs peuvent interférer avec l'élimination des protéines endommagées, entraînant un repliement erroné des protéines (par exemple, la génération de  $\alpha$ -synucléine), qui jouerait un rôle clé dans la pathologie de la MP (**Schapira et al., 2014**).

Bien que l'interaction potentielle des extraits testés avec le repliement des protéines reste à étudier, nos résultats suggèrent une interaction des extraits d'*Alchornea laxiflora* et d'*Annona muricata* avec la fonction mitochondriale. Ainsi, ces extraits spécifiques ont réduit les dommages causés au niveau du potentiel de membrane mitochondriale suite à l'exposition à l'aminochrome. Cependant, la mesure dans laquelle cette interaction pourrait contribuer à leur mécanisme de protection est également sujette à une clarification supplémentaire. Il est également intéressant de noter que les extraits testés dans notre modèle expérimental n'ont, dans la majorité des cas, pas complètement inversé les dommages causés par l'aminochrome. Par conséquent, une purification des composants actifs et l'examen de traitements combinés

de tels extraits avec d'autres médicaments établis ou nouveaux (par exemple, la nicotine) présenteraient un intérêt considérable (Tizabi and Getachew, 2017).

### III-3-5-Conclusion partielle

Au terme de cette partie du travail dont l'objectif était d'évaluer *in vitro* l'effet protecteur de certains extraits de plantes contre la toxicité induite par l'aminochrome, il en ressort que :

- L' extrait d' *Alchornea laxiflora* (0,1 et 1,0  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ), *Dacryodes edulis* (12,5 et 25  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ), *Annona muricata* (12,5 et 25  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) et *Annona senegalensis* (12,5 et 25  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) protègent les cellules d'astrocytome humain où la glutathion transférase M2 a été réduite jusqu'à 74% (U373MGsiGST6) contre la toxicité l'aminochrome
- les extraits d' *Alchornea laxiflora* (1  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) et d' *Annona muricata* (25  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) ont entraîné une augmentation du potentiel membranaire dans les trois lignées cellulaires respectivement ( $0,75 \pm 0,05$ ;  $0,73 \pm 0,10$  et  $0,76 \pm 0,08$ ) et ( $0,77 \pm 0,05$ ;  $0,68 \pm 0,03$  et  $0,50 \pm 0,01$  ), empêchant ainsi le dysfonctionnement mitochondrial induit par l'aminochrome.

### III-4- Discussion Générale

Les maladies neurodégénératives constituent un groupe de pathologies associées à un dysfonctionnement du cerveau dû aux dommages neuronaux. Parmi ces maladies, on peut citer la Maladie d'Alzheimer, Maladie de Parkinson, Maladie de Huntington, la Sclérose en plaques. Ces maladies ont en communes certaines caractéristiques responsables de la pathogenèse de la maladie tels que le stress oxydant, le déficit cholinergique et la neuro-inflammation. De nombreux médicaments sont utilisés pour pallier la progression de la maladie mais malheureusement ne permettent pas de traiter ou de stopper la progression de la maladie et présentent également des effets secondaires. Les plantes médicinales jouent un rôle clé dans les soins de santé plus particulièrement en Afrique où la majorité de la population n'a pas accès à la médecine moderne. L'Organisation mondiale de la santé estime que jusqu'à 80% des habitants des pays en développement dépendent toujours des plantes médicinales locales pour répondre à leurs besoins en soins de santé primaires (OMS, 2002). Les études scientifiques disponibles sur les plantes médicinales indiquent que des produits phytochimiques prometteurs peuvent être développés pour de nombreux problèmes de santé. Le continent africain utilise depuis longtemps les plantes et dans certains pays africains, près de 90% de la population dépend des plantes médicinales comme source de médicaments (Hostettmann *et al.*, 2000). La majorité des Camerounais dépendent des médicaments traditionnels pour leurs besoins en matière de santé. Environ 7% du budget de santé moyen des ménages sont consacrés aux médicaments traditionnels, quel que soit le revenu de leurs habitants (Agbor and Naidoo, 2011). La documentation des connaissances indigènes par le biais d'études ethnobotaniques est importante pour la conservation et l'utilisation des ressources biologiques (Muthu *et al.*, 2006). Par conséquent, l'établissement de noms locaux et d'utilisations indigènes de plantes présente des avantages potentiels importants pour la société. Le traitement des désordres neurologiques par la médecine traditionnelle est connu un peu partout dans le monde entier. Au Cameroun, plusieurs plantes médicinales sont reconnues pour leurs vertus contre certaines maladies y compris les problèmes de troubles neurologiques, peu d'études ethnobotaniques sont faites concernant les plantes médicinales utilisées pour traiter certains troubles neurologiques. Pour cela nous avons effectué une enquête ethnopharmacologique afin de recenser les plantes utilisées par les tradi-praticiens pour traiter les troubles neurologiques. Il en ressort de cette étude que 29 espèces de plantes ont été recensées dans le département du Noun (Région de l'Ouest Cameroun) dans plusieurs

localités. Parmi ces espèces, 6 sont de la famille des Asteraceae, suivi de la famille des Euphorbiaceae avec 3 espèces; les feuilles étaient les parties de plantes les plus utilisées. L'utilisation fréquente des espèces de la famille d'Asteraceae peut être attribuée à son abondance dans différentes localités, et aussi à son efficacité vis à vis des maladies. Certaines de ces plantes comme *Annona muricata*, *Annona senegalensis* ou *Euphorbia hirta* sont utilisées par la population togolaise contre les désordres du système nerveux central (**Kantati et al., 2016**).

Le stress oxydatif, la neuro-inflammation et le déficit cholinergique sont fortement impliqués dans la pathogenèse des maladies neurodégénératives telles que la MA et MP (**Niranjan, 2014 ; Singh, 2015; Chen and Zhang, 2014; Pagano et al., 2015; Diana Gallego et al., 2011; Hwang, 2013**). L'activité antioxydante d'un extrait de plante est influencée par plusieurs facteurs comme la composition chimique de l'extrait, le modèle expérimental et ne peut être décrite par une seule méthode (**Derakhshan et al., 2018**). Il est donc essentiel de faire recours à plusieurs méthodes d'évaluation pour étudier l'activité antioxydante d'un extrait de plante. Dans cette étude, les tests de piégeage des radicaux au 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH), de la peroxydation des lipides (MDA), de la capacité antioxydante totale et du pouvoir chélateur des ions ferreux ont été utilisés pour évaluer les activités antioxydantes des extraits bruts. Il en ressort de cette étude que les extraits d'*A. Senegalensis* (écorces), d'*E. Senegalensis* et d'*A. sweinfurthii* possèdent des meilleures activités contre l'inhibition du radical DPPH; l'extrait de *C. acuminata* présente le pouvoir réducteur le plus élevé; l'extrait de *D. edulis* présente la capacité antioxydante la plus élevée; l'extrait d'*A. Laxiflora* est le plus actif contre la peroxydation lipidique dans l'homogénat du cerveau de rats. Ces résultats suggèrent que certaines plantes médicinales utilisées dans le département du Noun possèdent des bonnes activités antioxydantes. Ces extraits de plantes actifs contiennent des composés chimiques pouvant piéger les radicaux libres produits, réduire la quantité excessive du fer et protéger les lipides membranaires de la peroxydation au niveau du cerveau. C'est ainsi que ces extraits renferment les composés tels que les polyphénols et flavonoïdes. Néanmoins, une corrélation négative a été constatée entre leurs teneurs en polyphénols ou flavonoïdes et les activités antioxydantes. Au cours de la MA ou MP, l'activité de l'acétylcholinestérase augmente conduisant à une dégradation rapide de l'acétylcholine (**Pagano et al., 2015**). De ce fait, les inhibiteurs de cette enzyme sont de plus en plus utilisés pour pallier à la maladie. L'activité anti-acétylcholinestérase de nos extraits a été évaluée in vitro et il en ressort que certains de ces extraits inhibent l'acétylcholinestérase à

l'instar de l'extrait de *Crinum purpurascens*. Cet extrait de plante a également montré une meilleure activité anti-inflammatoire comme décrite plus haut. Certaines études ont montré un lien entre le système cholinergique et l'inflammation, et que les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase jouent le rôle des anti-inflammatoires à travers leur action contre les radicaux libres et la toxicité des amyloïdes, aussi à travers la baisse de la libération des cytokines à partir des microglies activées dans le cerveau (Tabet, 2006; Borovikova *et al.*, 2000). Au cours de ces maladies, une production excessive des EROs y compris le NO, une activation de certaines enzymes telles que les lipoxygénases et un déficit en acétylcholine due à une activité accrue de l'acétylcholinestérase conduit à la mort des neurones. La maladie d'Alzheimer et de Parkinson est caractérisée par une inflammation accrue au niveau du cerveau. Au cours de cette inflammation, les microglies ou les astrocytes produisent de manière excessive les molécules telles que l'oxyde nitrique et activent certaines enzymes comme les lipoxygénases. Le NO ainsi produit de manière excessive provoque des dommages considérables des neurones (Yuste *et al.*, 2015). Par conséquent, l'inhibition de la production de NO dans les cellules RAW 264.7 stimulées par la LPS est l'un des moyens possibles de cribler divers composés anti-inflammatoires (Joo *et al.*, 2014). Dans la présente étude, l'exposition des macrophages RAW 264.7 aux LPS a été associée à une production de NO se traduisant par une accumulation du nitrite dans le milieu de culture. L'extrait de *Crinum purpurascens* a inhibé la production de NO et aucune cytotoxicité n'a été observée. Il a été démontré que les inhibiteurs de la lipoxygénase sont capables de soulager les cellules neuronales de la mort cellulaire induite par le stress oxydatif (Van Leyen *et al.*, 2008). Ainsi, l'extrait de graines d'*Annona muricata* a inhibé l'activité de la lipoxygénase.

La maladie de Parkinson (MP) est la deuxième maladie neurodégénérative après la maladie d'Alzheimer (AD) (Wirdefeldt *et al.*, 2011). Elle est caractérisée par une dégénérescence des neurones dopaminergiques dans la substance compacte noire et aussi par une formation des inclusions cytoplasmiques appelées corps de Lewy. L'oxydation de la dopamine est un processus normal au cours de laquelle il y a formation des o-quinones parmi lesquelles l'aminochrome. L'aminochrome, métabolite de la dopamine est neurotoxique pour les cellules (Segura-Aguilar *et al.*, 2014; Segura-Aguilar, 2017a). Dès lors il est utilisé comme modèle d'étude préclinique. Les astrocytes jouent un rôle très important au niveau du cerveau et secrètent plusieurs molécules antioxydantes telle que la Glutathione transférase humaine M2-2 (GSTM2) qui catalyse la conjugaison du glutathion et de l'aminochrome (Huenchuguala *et al.*, 2014). Dans la présente étude l'effet protecteur des quelques extraits



de plantes contre la toxicité induite par l'aminochrome dans les lignées cellulaires U373MG a été évaluée. Il en ressort qu'en présence d'aminochrome, les extraits de *A. laxiflora*, *D. edulis*, *A. muricata* et *A. senegalensis* protègent les lignées cellulaires U373MGsiGST6 où l'expression de la Glutathione transférase M2 (GSTM2) est inhibée à 26% et ne peuvent pas catalyser la conjugaison de l'aminochrome avec le glutathion. Certaines études ont indiqué que les extraits de *A. laxiflora* et de *D. edulis* contiennent des flavonoïdes tels que la rutine, la quercétine, le glycoside de taxifoline, la cyanidine et la pétunidine (**Ogundipe et al., 2001; Adeloje et al., 2005; Ajibessin, 2011**) capable d'augmenter les niveaux d'antioxydants dans les cellules, tels que le glutathion, les protégeant ainsi de la dégénérescence (**Magalingam et al., 2015; Costa et al., 2016**). Certaines études ont signalé que l'aminochrome induit un dysfonctionnement mitochondrial en inhibant le complexe I et en diminuant les taux d'ATP (**Huenchuguala et al., 2017; Segura-Aguilar and Huenchuguala, 2018**), ce qui est impliqué dans les dommages causés par les astrocytes menant à un dysfonctionnement neuronal. L'effet des extraits de plantes sur l'aminochrome induisant une dégradation potentielle de la membrane mitochondriale a été évalué et nos résultats suggèrent que l'extrait d'*A. Laxiflora* et *A. muricata* inhibe l'effet de l'aminochrome sur le dysfonctionnement de la mitochondrie. Comme indiqué précédemment, l'extrait de *A. Laxiflora* contient des flavonoïdes qui semblent protéger les mitochondries, principale source d'énergie cellulaire (**Magalingam et al., 2015; Costa et al., 2016**). Une identification plus poussée des composants actifs de ces extraits et une élucidation plus détaillée de leur mécanisme d'action et de leur utilité potentielle dans la MP est nécessaire.



**CHAPITRE IV: CONCLUSION  
GENERALE ET PERSPECTIVES**

#### IV-1- Conclusion Générale

Au terme de cette étude dont l'objectif général était d'évaluer *in vitro* le potentiel des certaines plantes médicinales Camerounaises utilisées par les tradi-praticiens pour traiter certains troubles neurologiques contre les maladies neurodégénératives à l'instar de la maladie de parkinson, il en ressort que:

- Le traitement des troubles neurologiques par les guérisseurs traditionnels du Département du Noun implique l'utilisation d'une grande diversité de plantes médicinales, et de préférence les plantes de la famille des Astéraceae.
- Les extraits d'*A. senegalensis* (écorces), *A. laxiflora* (feuilles), *D. edulis* (écorces) et *C. acuminata* (écorces) et *C. purpurascens* (bulbes) possèdent des meilleures activités antioxydantes et anti-acétylcholinestérase. Les extraits de *C. purpurascens* (bulbes) et *A. muricata* (graines) possèdent des meilleures activités anti-inflammatoires. Ces extraits pourraient être valorisés contre les maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson.
- Les extraits bruts de plusieurs plantes indigènes au Cameroun, telles que *A. laxiflora*, *Dacryodes edulis*, *A. muricata* et *A. senegalensis* protègent les cellules d'astrocytomes humaines contre la toxicité induite par l'aminochrome. De plus, deux de ces extraits (*A. laxiflora* et *A. muricata*) ont également empêché le dysfonctionnement mitochondrial induit par l'aminochrome.

Ces résultats soutiennent l'utilisation de ces plantes médicinales par les guérisseurs traditionnels pour traiter les troubles neurologiques et contribuent à la valorisation des certaines plantes médicinales camerounaises utilisées par les tradi-praticiens du Département du Noun (Région de l'Ouest) comme source potentielle des composés dans le traitement de la maladie de Parkinson. Par conséquent, l'isolement du ou des composés actifs à partir des extraits actifs aidera à identifier les puissants composés naturels antioxydants, anti-inflammatoires et AChEI, qui peuvent être utilisés dans un proche avenir pour prévenir et / ou traiter les maladies neurodégénératives.

## IV-2- Perspectives

A la suite de ce travail, il serait important de poursuivre des études. Ainsi, nous comptons dans un avenir proche:

- Investiguer l'effet des extraits les plus actifs sur d'autres mécanismes impliqués dans la neurotoxicité de l'aminochrome
- Evaluer l'effet protecteur des extraits les plus actifs sur un modèle neuronal de la maladie de Parkinson
- Isoler les fractions ou composés actifs et évaluer *in vitro* leurs propriétés pharmacologiques



# **BIBLIOGRAPHIE**

- Abou-Donia AH, Shawky EA, El-Din MMM, Takayama H, El Din AAS.** (2012) Bio-guided isolation of acetylcholinesterase inhibitory alkaloids from the bulbs of *Crinum bulbispermum*. *Natural Products : An Indian Journal* 8(3):107-114.
- Adewusi E.A., Fourche G., Steenkamp V.** (2012) Antioxidant, acetylcholinesterase inhibitory activity and cytotoxicity assessment of the crude extracts of *Boophane disticha* *African Journal of Pharmacological and Therapy*. 1(3):78-83
- Adeloye A. O., Aderogba M. A., Idowu T. O., Obuotor E. M. and Ogundaini A. O.,** (2005) Investigation of the antioxidant activity of *Alchornea laxiflora* (Benth) and its constituent. *Journal of food technology*. 3(3) : 365-369.
- Adwas A.A., Elsayed A.S.I., Azab A.E., Quwaydir F.A.** (2019) Oxidative stress and antioxidant mechanisms in human body. *Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering* 6(1):43–47.
- Agbor Ashu M., Naidoo S.** (2011) Knowledge and practice of traditional healers in oral health in the Bui Division, Cameroon. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 2011, 7 : 6<sup>[1]</sup><sub>SEP</sub>
- Aguirre P., Urrutia P., Tapia V., Villa M., Paris I., Segura-Aguilar J., Núñez M.T.** (2012) The dopamine metabolite aminochrome inhibits mitochondrial complex I and modifies the expression of iron transporters DMT1 and FPN1. *Biometals* 25: 795-803.
- Ahuja J., Suresh J., Deep A., Madhuri Pratyusha R.** (2011) Phytochemical Screening of Aerial Parts of *Artemisia parviflora* Roxb.: A medicinal plant. *Der Pharmacia Lettre*. 3 (6), 116-124.
- Ajibesin, K. K.** (2011) *Dacryodes edulis* (G. Don) H.J. Lam : a review on its medicinal, phytochemical and economical properties. *Research Journal of Medicinal Plant*, vol. 5, no. 1, pp. 32–41
- Alberio T., Lopiano L. and Fasano M.** (2012) Cellular models to investigate biochemical pathways in Parkinson's disease<sup>[1]</sup><sub>SEP</sub>. *FEBS Journal* 279 (2012) 1146–1155
- Alzweiri, M., Sarhan, A.A., Mansi, K., Hudaib, M. and Aburjai, T.,** (2011). Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Jordan, the Northern Badia Region. *Journal of Ethnopharmacology* 137, 27-35.
- Amri, E. and. Kisangau, D.P.,** (2012). Ethnomedicinal study of plants used in villages around Kimboza forest reserve in Morogoro, Tanzania. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 8 :1
- Anand R, Gill KD, Mahdi AA.** (2014) Therapeutics of Alzheimer's disease : Past, present and future. *Neuropharmacology* 76, Part A : 27-50.
- Arriagada C., Paris I., Sanchez de las Matas M.J., Martinez-Alvarado P., Cardenas S., Castañeda P., Graumann R., Perez-Pastene C., Olea-Azar C., Couve E., Herrero M.T., Caviedes P., Segura-**

- Aguilar J.** (2004) On the neurotoxicity mechanism of leucoaminochrome o-semiquinone radical derived from dopamine oxidation: mitochondria damage, necrosis, and hydroxyl radical formation. *Neurobiology Disease* 16:468-477.
- Baez S., Segura-Aguilar J., Widersten M., Johansson A.S., Mannervik B.** (1997) Glutathione transferases catalyse the detoxication of oxidized metabolites (o-quinones) of catecholamines and may serve as an antioxidant system preventing degenerative cellular processes. *Biochemical Journal*. 324 : 25-28.
- Belaïch R., Boujraf S., Benzagmout M.** (2015) Impact du stress oxydatif et de l'inflammation sur les patients hémodialysés. *Médecine thérapeutique* 21(2):95-103.
- Benabid, A. L., Chabardes, S., Mitrofanis, J., and Pollak, P.** (2009). Deep brain stimulation of the subthalamic nucleus for the treatment of Parkinson's disease. *The Lancet Neurology*, 1(8), 67-81
- Ben Haim L, Carrillo-de Sauvage M-A, Ceyzériat Kand Escartin C.** (2015) Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 9 : 278.
- Bertram, L., and Tanzi, R.E.** (2005). The genetic epidemiology of neurodegenerative disease. *The Journal of Clinical Investigation* 115, 1449–1457
- Biradar S, Joshi H.K.** (2011) Psychopharmacological investigations on the benefits of *Ageratum conyzoides* in the modulation of neurodegenerative disorder of Alzheimer's type. *International Journal of Green Pharmaceutical (IJGP)*. 5(3).
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O.** (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *The World Allergy Organization journal*, 5(1), 9–19.
- Bishara D, Sauer J, Taylor D.** (2015) The pharmacological management of Alzheimer's disease. *Progress in Neurology and Psychiatric*. 19(4):9-16.
- Bhat A.H., Dar K.B., Anees S., Zargar M.A., Mosood A., Sofi M.A. and Ganie S.A.** (2015) Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases;a mechanistic insight. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 74:101-110
- Bhullar K.S., Vasantha Rupasinghe H.P.** (2013) Polyphenols : Multipotent Therapeutic Agents in Neurodegenerative Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2013, 18.
- Blažeković B., Vladimir-Knežević S., Brantner A. and Štefan M. B.** (2010) Evaluation of Antioxidant Potential of *Lavandula x intermedia Emeric ex Loisel*. 'Budrovka': A Comparative Study with *L. angustifolia* Mill. *Molecules*, 15: 5971-5987

**Błaszczyc J.W.** (2016) Parkinson's Disease and Neurodegeneration: GABA-Collapse Hypothesis. *Frontiers in Neuroscience* 10:269.

**Blesa J., Trigo-Damas I., Quiroga-Varela A. and Lopez-Gonzalez del Rey N.** (August 24th 2016). Animal Models of Parkinson's Disease, Challenges in Parkinson's Disease, Jolanta Dorszewska and Wojciech Kozubski, IntechOpen, Available from : <https://www.intechopen.com/books/challenges-in-parkinson-s-disease/animal-models-of-parkinson-s-disease>

**Blesa J., Trigo-Damas I., Quiroga-Varela A., Jackson-Lewis V.R.** (2015) Oxidative stress and Parkinson's disease. *Frontiers in Neuroanatomy*. Jul 8; 9 : 91.

**Bonnefont-Rousselot D.** (2007) Stress oxydant et vieillissement. *Spectra Biologie*, 157 : 23-26

**Booth H.D.E., Hirst W. D and Wade-Martins R.** (2017) The Role of Astrocyte Dysfunction in Parkinson's Disease Pathogenesis. *Trends in Neurosciences*, Vol. 40, No. 6<sup>[1]</sup><sub>SEP</sub>: 358-370

**Borovikova L.V., Ivanova S., Zhang M., Yang H., Botchkina G.I., Watkins L.R. Wang H., Abumrad N., Eaton J.W. and Tracey K.J.** (2000) Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 405(6785): 458-462.

**Braak H., Ghebremedhin E., Rüb U., Bratzke H., Tredici K.** (2004) Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell and Tissue Research*. Volume 318, Number 1, Page121

**Braak H., Del Tredici K., Rüb U., de Vos R. A., Jansen Steur E. N., Braak E.** (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology Aging* 24, 197–211.

**Braak, H., Del Tredici, K., Bratzke, H. Hamm-Clement J., Sandmann-Keil D. and Rüb U.** (2002) Staging of the intracerebral inclusion body pathology associated with idiopathic Parkinson's disease (preclinical and clinical stages). *Journal of Neurology* 249, iii1–iii5

**Bum E.N., Taiwe G.S., Moto F.C.O., Ngoupaye G.T., Vougat R.R.N., Sakoue V.D., Gwa C., Ayissi E.R., Dong C., Rakotonirina A., et al.** (2011) Antiepileptic Medicinal Plants used in Traditional Medicine to Treat Epilepsy. In : *Clinical and Genetic Aspects of Epilepsy*. Edited by Afawi Z. Rijeka : InTech; 2011 : Ch. 08.

**Bum, E. N., Ngah, E., Mune, R. N., Minkoulou, D. Z., Talla, E., Moto, F., Ngoupaye, G., Taiwe, G., Rakotonirina, A., and Rakotonirina, S.,** (2012) Decoctions of *Bridelia micrantha* and *Croton macrostachyus* may have anticonvulsant and sedative effects. *Epilepsy & Behavior* 24, 319-323.

**Bum, E.N., Taiwe, G., Nkainsa, L., Moto, F., Etet Seke, P., Hiana, I., Bailabar, T., Seyni, P., Rakotonirina, A., Rakotonirina, S.,** (2009) Validation of Anticonvulsant and Sedative Activity of Six Medicinal Plants. *Epilepsy and Behavior* 14, 454-458.



- Butterfield DA, Lauderback CM.** (2002) Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's Disease brain. Potential causes and consequences involving Amyloid - $\beta$  peptide associated free radical oxidative stress. *Free Radical and Biological Medicine*. 32(11) :1050 -1060.
- Butzlaff M. and Ponimaskin E.** (2016)The role of Serotonin Receptors in Alzheimer's disease. *Opera Medica et Physiologica* Volume 2 Issue 1, pages 77-86
- Calderon AI, Cubilla M, Espinosa A, Gupta MP.** (2010) Screening of plants of Amaryllidaceae and related families from Panama as sources of acetylcholinesterase inhibitors. *Pharmaceutical biology*. 48(9) : 988-993.
- Callixte K.-T., Clet T. B., Jacques D., Faustin Y., Jean François D. and Maturin T.-T.** (2015). The pattern of neurological diseases in elderly people in outpatient consultations in Sub-Saharan Africa. *BMC Research Notes* 8, 159
- Calvo, M. I., and Caverro, R. Y.** (2015). Medicinal plants used for neurological and mental disorders in Navarra and their validation from official sources. *Journal of Ethnopharmacology* 169, 263-268.
- Chaudhuri, K. Ray, and Anthony HV Schapira.** (2009) "Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment." *The Lancet Neurology* 8.5 464-474.
- Chaudhuri, K. Ray, Daniel G. Healy, and Anthony HV Schapira.** (2006) "Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management." *The Lancet Neurology* 5.3 235-245.
- Chen Z. and Zhang C.** (2014) Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neuroscience Bulletin*. 30(2) : 271-281.
- Chen X., Guo C. and Kong J.** (2012). Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Neural regeneration research*, 7(5), 376–385.
- Čolović M.B., Krstić D.Z., Lazarević-Pašti T.D., Bondžić A.M., Vasić V.M.** (2013) Acetylcholinesterase Inhibitors : Pharmacology and Toxicology. *Currents Neuropharmacology*. 11(3) : 315-335.
- Connolly B. S. and Lang A. E.** (2014) Pharmacological treatment of Parkinson disease: a review. *JAMA*, 311(16), 1670.
- Costa S.L., Silva V.D.A., Dos Santos Souza C., Santos C.C., Paris I., Muñoz P., Segura-Aguilar J.** (2016) Impact of plant-derived flavonoids on neurodegenerative diseases. *Neurotoxicity Research*. 30(1) : 41-52.

- Cilia R., Akpalu A., Chan M., Bonetti A., Amboni M., Faceli E. and Rezzoli G.** (2011) Parkinson's Disease in Sub-Saharan Africa : step-by-step into the challenge. *Neurodegenerative Disease Management* 1(3)
- Cubo E., Doumbe J., Mapoure Njankouo Y., Nyinyikua T., Kuate C., Ouyang B., Shah H., Calvo S., Fernandez-Sierra A., Kompoliti K., Njiengwe E. and Louis E.D.** (2017), The Burden of Movement Disorders in Cameroon: A Rural and Urban-Based Inpatient/Outpatient Study. *Movements Disorders and Clinical Practices*, 4: 568-573.
- Cuevas C., Huenchuguala S., Muñoz P., Villa M., Paris I., Mannervik B., Segura-Aguilar J.** (2015) Glutathione transferase-M2-2 secreted from glioblastoma cell protects SH-SY5Y cells from aminochrome neuro toxicity. *Neurotoxicity Research* 27:217-228.
- Cui Q., Li X. and Zhu, H.** (2016). Curcumin ameliorates dopaminergic neuronal oxidative damage via activation of the Akt/Nrf2 pathway. *Molecular medicine reports*, 13(2), 1381-1388.
- Dagnino-Subiabre A., Marcelain K., Arriagada C., Paris I., Caviedes P., Caviedes R., Segura-Aguilar J.** (2000). Angiotensin receptor II is present in dopaminergic cell line of rat substantia nigra and its down regulated by aminochrome. *Molecular and Cellular Biochemical* 212, 131–134.
- Dawson, T. M., and Dawson, V. L.** (2010). The role of parkin in familial and sporadic Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 25 Suppl 1(0 1), S32–S39.
- Dexter D.T., Jenner P.** (2013) Parkinson disease : from pathology to molecular disease mechanisms. *Free Radical Biology and Medicine*. 62 : 132–144
- Diana Gallego, Rojas M, Orozco C.** (2011) Free Radicals, Neuronal Death and Neuroprotection, Neurodegenerative Diseases - Processes, Prevention, Protection and Monitoring. *Dr Raymond Chuen-Chung Chang (Ed), ISBN : 978-953-307-485-6, InTech, 2011*
- Dias V., Junn E. and Mouradian M. Maral** (2013) The Role of Oxidative Stress in Parkinson's Disease. *Journal of Parkinsons Disease*. 3(4) : 461–491
- Dimitrios B.** (2006) Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends Food in Science Technology*. 17 : 505–512.
- Ding Y, Qu D, Zhang K, Cang X, Kou Z, Xiao W, Zhu J :** (2017) Phytochemical and biological investigations of Amaryllidaceae alkaloids : a review. *Journal of Asian and Natural Product Research*. 19(1) : 53-100.
- Delaville C., Deurwaerdère P. D. and Benazzouz A.** (2011). Noradrenaline and Parkinson's disease.

*Frontiers in systems neuroscience*, 5, 31.

**Derakhshan Z., Ferrante M., Tadi M., Ansari F., Heydari A., Hosseini MS., Conti G. O., Sadrabad E. K.** (2018) Antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic extract of pomegranate peels, juice and seeds. *Food and Chemical Toxicology* 114: 108–111

**Dorszewska J., Prendecki M., Lianeri M. and Kozubski W.** (2014) Molecular Effects of L-dopa Therapy in Parkinson's Disease. *Current Genomics*. 15, 11-17

**Dugger, B. N. and Dickson, D. W.** (2017). Pathology of Neurodegenerative Diseases. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 9(7), a028035.

**Dzoyem JP, Eloff JN.** (2015) Anti-inflammatory, anticholinesterase and antioxidant activity of leaf extracts of twelve plants used traditionally to alleviate pain and inflammation in South Africa. *Journal of Ethnopharmacology*. 160 :194-201.

**Ebrahimi A., Schluesener H.** (2012) Natural polyphenols against neurodegenerative disorders : Potentials and pitfalls. *Ageing Research Reviews*. 11 : 329-345.

**Eckert GP.** (2010) Traditional used plants against cognitive decline and Alzheimer disease. *Frontiers in Pharmacology*. 1(138) : 1-10.

**Eleftheriadis N., Poelman H., Leus N.G.J., Honrath B., Neochoritis C.G., Dolga A., Dömling A., Dekker F.J.** (2016) Design of a novel Thiophene Inhibitor of 15-Lipoxygenase-1 with both Anti-inflammatory and Neuroprotective Properties. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 122 : 786-801.

**Elena C.I., Annalisa L., Cecilia C., Daniele O., Giulia R., Michelangelo M. S. G.** (2011) Oxidative Stress Treatment for Clinical Trials in Neurodegenerative Diseases. *Journal of Alzheimer's Disease*. 24 :111-126.

**Elgorashi E, Stafford G, Van Staden J.** (2004) Acetylcholinesterase enzyme inhibitory effects of amaryllidaceae alkaloids. *Planta Medica*. 70(3) : 260-262.

**Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V., Feather-stone R.M.** (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*. 1961; 7.

**Elujoba A.A., Odeleye O. M., Ogunyemi C. M.** (2005) Traditional medicine development for medical and dental primary health care delivery system in Africa. *African Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicines*. 2(1) : 46-61.

**Evans W.J.** (2000) Vitamin E, vitamin C, and exercise. *The American Journal of Clinical Nutrition* 72, 647S-652S.<sup>[L]</sup><sub>[SEP]</sub>

- Ezza H.S.A. and Khadrawy Y.A.** (2014) Glutamate Excitotoxicity and Neurodegeneration. *Journal of Molecular and Genetic Medicine* 8: 141.
- Fasano A., Daniele A. and Albanese A.** (2012). Treatment of motor and non-motor features of Parkinson's disease with deep brain stimulation. *Lancet Neurology*, 11, 429-42.
- Favier A.** (1997) Le stress oxydant: intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur. *Annales de Biologie Clinique*. 55(1):9-16.
- Favier A.** (2003) Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actualité chimique*. 108-115.
- Ferreira-Vieira T. H., Guimaraes I. M., Silva F. R., and Ribeiro F. M.** (2016). Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. *Current neuropharmacology* 14(1), 101–115.
- Focho D., Egbe E., Chuyong G., Fongod A., Fonge B., Ndam W. and Youssoufa B.** (2010) An ethnobotanical investigation of the annonaceae on Mount Cameroon. *Journal of Medicinal Plants Research* 4, 2148-2158.
- Franck D.** (2010) Phénomènes neuro-inflammatoires au cours de l'état de mal épileptique induit par le soman. Correction par des combinaisons atropine-kétamine. *Neurosciences [q-bio.NC]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2010.*
- Fu W., Zhuang W., Zhou S., Wang W.** (2015) Plant-derived neuroprotective agents in Parkinson's disease. *American Journal of Translational Research* 7(7):1189-1202
- Gandhi S., Abramov A.Y.** (2012) Mechanism of Oxidative Stress in Neurodegeneration. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Article ID 428010 :11 pages.
- Garret, M, Du, Z, Chazalon, M, Cho, YH, Baufreton, J.** (2018) Alteration of GABAergic neurotransmission in Huntington's disease. *CNS Neuroscience and Therapeutics*. 24: 292– 300.
- Gbolade, A.,** (2012) Ethnobotanical study of plants used in treating hypertension in Edo State of Nigeria. *Journal of Ethnopharmacology* 144, 1-10.
- Gebreyesus Hindeya H, Gebremichael Gebrehiwot T.** (2020) The Potential Role of Astrocytes in Parkinson's Disease (PD). *Medical Sciences*. 8(1):7.
- Gonzalez-Usigli H.A.** (2019) Maladie de Parkinson. [msdmanuals.com](http://msdmanuals.com)
- Gutierrez M. P. R., Gonzalez M.N. A. and Hoyo-Vadillo C.** (2013) Alkaloids from piper : a review of its phytochemistry and pharmacology. *Mini Review of Medicine Chemistry* 13(2) : 163-193.
- Healy D.G., Abou-Sleiman P.M. and Wood N.W.** (2004) Genetic causes of Parkinson's disease: UCHL-1. *Cell and Tissue Research* 318, 189–194

- Henderson E.J., Lord S.R., Brodie M.A., Gaunt D.M., Lawrence A.D., Close J.C.T., Whone A.L., Ben-Shlomo Y.** (2016) Rivastigmine for gait stability in patients with Parkinson's disease (ReSPonD): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Neurology*. 15(3) : 249-258.
- Herrera A., Muñoz P., Steinbusch H. W. and Segura-Aguilar J.** (2017) Are Dopamine Oxidation Metabolites Involved in the Loss of Dopaminergic Neurons in the Nigrostriatal System in Parkinson's Disease? *ACS Chemical Neuroscience* 8, 702–711.
- Herrera, A., Munoz, P., Paris, I., Díaz-Veliz, G., Mora, S., Inzunza, J., Hultenby K., Cardenas C., Jaña F., Raisman-Vozari R., Gysling, K. Abarca J., Steinbusch H. W. M. and Juan Segura-Aguilar** (2016). Aminochrome induces dopaminergic neuronal dysfunction: a new animal model for Parkinson's disease. *Cellular and molecular life sciences*, 73(18), 3583-3597.
- Hirsch, E. C., Vyas, S., and Hunot, S.** (2012). Neuroinflammation in Parkinson's disease. *Parkinsonism and Related Disorders*. 18. suppl1 S201-S2012.
- Hirsch E.C., Hunot S.** (2009) Neuroinflammation in Parkinson's disease : a target for neuroprotection ? *Lancet Neurology*. 8(4) 382-397
- Hostettmann K., Marston A., Ndjoko K., Wolfender J.-L.** (2000) The Potential of African Medicinal Plants as a Source of Drugs. *Current Organic Chemistry*, 4 : 973-1010.
- Houghton P.J., Agbedahunsi J.M., Adegbulugbe A.** (2004) Choline esterase inhibitory properties of alkaloids from two Nigerian *Crinum* species. *Phytochemistry*. 65(21) : 2893-2896.
- Huenchuguala S., Muñoz P., Zavala P., Villa M., Cuevas C., Ahumada U., Graumann R., Nore B.F., Couve E., Mannervik B., Paris I. and Segura-Aguilar J.** (2014) Glutathione transferase mu 2 protects glioblastoma cells against aminochrome toxicity by preventing autophagy and lysosome dysfunction. *Autophagy*. 10(4) : 618-630.
- Huenchuguala S., Muñoz P. and Segura-Aguilar J.** (2017) The importance of mitophagy in maintaining mitochondrial function in U373MG Cells. Bafilomycin A1 restores aminochrome-induced mitochondrial damage. *ACS Chemical Neuroscience*. 8, 2247–2253.
- Hu W., He Y., Xiong Y., Lu H., Chen H., Hou L., Qiu Z., Fang Y. and Zhang S.** (2015) Derivation, Expansion, and Motor Neuron Differentiation of Human- Induced Pluripotent Stem Cells with Non-Integrating Episomal Vectors and a Defined Xenogeneic-free Culture System. *Molecular Neurobiology*. 53(3):1589-1600
- Hu Q., Uversky V. N., Huang M., Kang H., Xu F., Liu X. and Zhang C.** (2016) Baicalein inhibits  $\alpha$ -synuclein oligomer formation and prevents progression of  $\alpha$ -synuclein accumulation in a rotenone mouse

model of Parkinson's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1862(10), 1883-1890.

**Hwang O.** (2013) Role of oxidative stress in Parkinson's disease. *Experimental Neurobiology*. 22(1) : 11-17.

**Jagmag S.A., Tripathi N., Shukla S.D., Maiti S. and Khurana S.** (2016) Evaluation of Models of Parkinson's Disease. *Frontiers in Neuroscience*. 9 : 503.

**Jamwal S. and Kumar P.** (2019) Insight Into the Emerging Role of Striatal Neurotransmitters in the Pathophysiology of Parkinson's Disease and Huntington's Disease: A Review. *Current neuropharmacology*, 17 (2), 165–175.

**Jeong C.H., Jeong H.R., Choi G.N., Kim D.O., Lee U. and Heo H.J.** (2011) Neuroprotective and antioxidant effects of caffeic acid isolated from *Erigeron annuus* leaf. *Chinese Medicine* 6: 25

**Joe E. H., Choi D. J., An J., Eun J. H., Jou I. and Park S.** (2018). Astrocytes, Microglia, and Parkinson's Disease. *Experimental neurobiology*, 27(2), 77–87.

**Joo T., Sowndhararajan K., Hong S., Lee J., Park S-Y., Kim S., Jhoo J-W.** (2014) Inhibition of nitric oxide production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells by stem bark of *Ulmus pumila L.* *Saudi Journal of Biological Science*. 21(5) : 427-435.

**Kandimalla, R. and Reddy, P. H.** (2017). Therapeutics of Neurotransmitters in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 57(4), 1049–1069

**Kantati Y.T., Kodjo K.M., Dogbeavou K.S., Vaudry D., Leprince J., Gbeassor M.** (2016) Ethnopharmacological survey of plant species used in folk medicine against central nervous system disorders in Togo. *Journal of Ethnopharmacology*. 181 : 214-220.

**Kasture S., Mohan M., and Kasture V.** (2013). *Mucuna pruriens* seeds in treatment of Parkinson's disease: Pharmacological review. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 13(3), 165-174.

**Kausar S., Wang F. and Cui H.** (2018) The Role of Mitochondria in Reactive Oxygen Species Generation and Its Implications for Neurodegenerative Diseases. *Cells* 7, 274;

**Kengne A.P., Dzudie A., Dongmo L.** (2006) Epidemiological features of degenerative brain diseases as they occurred in Yaounde referral hospitals over a 9-year period. *Neuroepidemiology*. 27(4) : 208-11.

**Kovacs Gabor G.** (2015) *Neuropathology of Neurodegenerative Diseases: A Practical Guide*, ed. Gabor G. Kovacs. Published by Cambridge University Press. *Cambridge University Press* 2015

**Kuete V. and Efferth T.** (2010) Cameroonian medicinal plants : pharmacology and derived natural products. *Frontiers in Pharmacology*. 2010; 1(Article 123).

- Kosaraju J., Chinni S., Roy P. D., Kannan E., Antony A. S. and Kumar M. N.** (2014) Neuroprotective effect of *Tinospora cordifolia* ethanol extract on 6-hydroxy dopamine induced Parkinsonism. *Indian journal of pharmacology*, 46(2), 176–180.
- Lee K.W., Jung S.Y., Choi S.M. and Yang E.J.** (2012) Effects of ginsenoside Re on LPS-induced inflammatory mediators in BV2 microglial cells. *BMC Complementary and Alternativ Medicine* 2012; 12: 196. [SEP]
- Lekoubou A., Echouffo-Tcheugui J.B. and Kengne A.P.** (2014) Epidemiology of neurodegenerative diseases in sub-Saharan Africa: a systematic review. *BMC Public Health* 14, 653.
- Lewerenz J. and Maher P.** (2015) Chronic Glutamate Toxicity in Neurodegenerative Diseases-What is the Evidence? *Frontiers in Neuroscience*. 9:469.
- Li V., Tan Meng-S., Jiang T. and Tan L.** (2014) Microglia in Alzheimer's Disease. *BioMed Research International* Article ID 437483, 7 pages
- Liu Z., Zhou T., Ziegler Alexander C., Dimitrion P. and Zuo L.** (2017) Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: From Molecular Mechanisms to Clinical Applications. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* Volume 2017, Article ID 2525967,
- Lowe H.I., Watson C.T., Badal S., Peart P., Toyang N.J., Bryant J.** (2014) Promising efficacy of the *Cola acuminata* plant : a mini review. *Advances in Biology Chemistry*. 4 : 240-245
- Lotharius J.** (2005) Progressive Degeneration of Human Mesencephalic Neuron- Derived Cells Triggered by Dopamine-Dependent Oxidative Stress Is Dependent on the Mixed-Lineage Kinase Pathway. *Journal of Neuroscience* 25, 6329– 6342.
- Lukasiewicz J.C., Jimmy A., Nofa L. and Paradowski B.** (2018) Cognitive impairment in Parkinson's Disease. *International Journal of School and Cognitive Psychology* 5: 202
- Lyman M., Lloyd Dafydd G., Ji X., Vizcaychipi Marcela P., Ma D.** (2014) Neuroinflammation : The role and consequences. *Neuroscience Research* 79 1–12
- Machlin L. J. and Bendich A.** (1987) Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *The FASEB Journal* 1:6, 441-445
- Madeo J. and Elsayad C.** (2013) The Role of Oxidative Stress in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimers Diseases and Parkinsonism*. 3(2) : 116.
- Maiti P., Manna J. and Dunbar Gary L.** (2017) Current understanding of the molecular mechanisms in Parkinson's disease : Targets for potential treatments. *Translational Neurodegeneration* 6 : 28

- Magama S., Lieta M.I., Asita A.O.** (2013) : Antioxidant and free radical scavenging properties of four plant species used in traditional medicine in Lesotho. *International Journal of Medicinal Plants Research*. 2(3) : 170-178.
- Magalingam K.B., Radhakrishnan A.K., Haleagrahara N.** (2015) Protective Mechanisms of Flavonoids in Parkinson's Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2015, 314560.
- Manoharan S., Guillemain G. J., Abiramasundari R. S., Essa M. M., Akbar M. and Akbar M. D.** (2016) The Role of Reactive Oxygen Species in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease, and Huntington's Disease: A Mini Review. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2016, 8590578.
- Marieb E.M.** (1999). Structure et physiologie du tissu nerveux. In anatomie et physiologie humaine. 4<sup>ème</sup> édition. Canada : Edition du renouveau pédagogique 362-369.
- Marston A., Van der Westhuizen J., Zietsman P.** (2017) Investigation of South African Amaryllidaceae for inhibitors of acetylcholinesterase. *Planta Medica*. 75(09) : PC20.
- Mazo N. A., Echeverria V., Cabezas R., Avila-Rodriguez, M., Tarasov, V. V., Yarla, N. S., and Barreto, G. E.** (2017). Medicinal plants as protective strategies against Parkinson's disease. *Current pharmaceutical design*, 23(28), 4180-4188.
- Meldrum, B.S.,** (2000). Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *Journal of Nutrition*. 130 1007s–15s.
- Meraz-Ríos M. A., Toral-Rios D., Franco-Bocanegra D. , Villeda-Hernández J. and Campos-Peña V.** (2013) Inflammatory process in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Integrative Neuroscience* Volume 7 | Article 59
- Miranda Briana R. de and Greenamyre J. Timothy,** CHAPTER 1: Etiology and Pathogenesis of Parkinson's Diseases, in *Oxidative Stress and Redox Signalling in Parkinson's Disease*, 2017, pp. 1-26
- Miyazaki I., and Asanuma M.** (2017). Therapeutic Strategy of Targeting Astrocytes for Neuroprotection in Parkinson's Disease. *Current pharmaceutical design* 23(33), 4936-4947.
- Montgomery D. L.** (1994). Astrocytes: form, functions, and roles in disease. *Veterinary pathology* 31(2), 145-167.
- Mosmann T.** (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 65(1) : 55-63.
- Moore Amy H., Bigbee Matthew J., Boynton Grace E., Wakeham Colin M.,<sup>[L]</sup><sub>[SEP]</sub> Rosenheim Hilary M., Staral Christopher J., Morrissey James L. and Hund Amanda K.** (2010) Non-Steroidal Anti-



Inflammatory Drugs in Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease: Reconsidering the Role of Neuroinflammation. *Pharmaceuticals* 2010, 3, 1812-1841

**Morales I., Guzmán-Martínez L., Cerda-Troncoso C., Farías Gonzalo A. and Maccioni Ricardo B.** (2014) Neuroinflammation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. A rational framework for the search of novel therapeutic approaches. *Frontiers in Cellular Neuroscience* Volume 8 | Article 112

**More S. V., Kumar H., Kang S. M., Song S. Y., Lee K. and Choi D. K.** (2013) Advances in neuroprotective ingredients of medicinal herbs by using cellular and animal models of Parkinson's disease. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2013.

**Moyo M., Ndhlala A.R., Finnie J.F., Van Staden J.** (2010) Phenolic composition, antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities of *Sclerocarya birrea* and *Harpephyllum caffrum* (Anacardiaceae) extracts. *Food Chemistry*. 123 : 69-76.

**Mu M.M., Chakravorty D., Sugiyama T., Koide N., Takahashi K., Mori I., Yoshida T., Yokochi T.** (2001) The inhibitory action of quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 macrophage cells. *Journal of Endotoxin Research*. 7(6) : 431-438.

**Mu X., He G.R., Yuan X., Li X.X., Du G.H.** (2011) Baicalein protects the brain against neuron impairments induced by MPTP in C57BL/6 mice, *Pharmacology of Biochemical and Behaviour* 98 286e291.

**Mukherjee P.K., Kumar V., Mal M., Houghton P.J.** (2007) Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine*. 14 : 289-300.

**Muñoz P., Cardenas S., Huenchuguala S., Briceño A., Couve E., Paris I., Segura-Aguilar J.** (2015) DT-diaphorase prevents aminochrome-induced alpha-synuclein oligomer formation and neurotoxicity. *Toxicology Sciences* 145:37-47.

**Muñoz P., Huenchuguala S, Paris I, Cuevas C, Villa M, Caviedes P, Segura-Aguilar J, Tizabi Y.** (2012) Protective Effects of Nicotine Against Aminochrome-Induced Toxicity in Substantia Nigra Derived Cells: Implications for Parkinson's Disease. *Neurotoxicity Research*. 22(2):177-180.

**Muthu C., Ayyanar M., Raja N. and Ignacimuthu S.** (2006) Medicinal plants used by traditional healers in Kancheepuram District of Tamil Nadu, India. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 2:43

**Ndam L., Mih A., Fongod A., Tening A., Tonjock R., Enang J., Fujii Y.** (2014) Phytochemical screening of the bioactive compounds in twenty (20) Cameroonian medicinal plants. *International Journal of Currents Microbiology and Applied Science*. 3(12): 768-778.

- Negi R., Pande1 D., Kumar A., Khanna R.S. and Khanna H.D.** (2011) Evaluation of biomarkers of oxidative stress and antioxidant capacity in the cord blood of preterm low birth weight neonates. *The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*.1–4
- Nieoullon A.** (2011) Neurodegenerative diseases and neuroprotection: current views and prospects. *Journal of Applied Biomedecine*. 9: 173–183
- Niranjan R.** (2014) The role of inflammatory and oxidative stress mechanisms in the pathogenesis of Parkinson’s disease : focus on astrocytes. *Molecular neurobiology*. 49(1):28-38.
- Njouonkou A. L., De Crop E., Mbenmoun A. M., Kinge T.R., Biyé E.H., Verbeken A.** (2016) Diversity of Edible and Medicinal Mushrooms Used in the Noun Division of the West Region of Cameroon. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 18(5): 387–396.
- Nkanwen E.R.S., Gatsing D., Njamga D. Fodouop S.P.C. and Tane P.** (2009) Antibacterial agents from the leaves of *Crinum purpurascens* herb (Amaryllidaceae). *African Health Sciences* 9 (4) : 264-269
- Obboh G., Akinyemi A.J., Omojokun O.S., Oyeleye I.S.** (2014). Anticholinesterase and antioxidative properties of aqueous extract of *Cola acuminata* seed in vitro. *International Journal of Alzheimer’s Disease*. Vol. 2014, Article ID 498629, 8 pages, 2014.
- Oertel W. and Schulz J. B.** (2016). Current and experimental treatments of Parkinson disease: a guide for neuroscientists. *Journal of neurochemistry*. 139, 325-337.
- Ogundipe O.O., Moody J.O., Houghton P.J., and Odelola H. A.** (2001) Bioactive chemical constituents from *Alchornea laxiflora* (benth) pax and hoffman. *Journal of Ethnopharmacology*. 74(3) : 275–280
- Ogunlade I., Awosanmi I.A., Osukoya O.A.** (2014). Antioxidant activity and total phenolic content of some nuts commonly consumed in South-Western Nigeria. *Journal of Phytopharmacology*. 3(4) : 248-253.
- Oksanen M., Lehtonen S., Jaronen M., Goldsteins G., Hämäläinen R.H. and Koistinaho J.** (2019) Astrocyte alterations in neurodegenerative pathologies and their modeling in human induced pluripotent stem cell platforms. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 76:2739-2760
- Olanow C. W., Agid Y., Mizuno Y., Albanese A., Bonucelli U., Damier P. and Hallett M.** (2004). Levodopa in the treatment of Parkinson's disease: current controversies. *Movement disorders*, 19(9), 997-1005.
- Othman B. and Yabe T.** (2015) Use of hydrogen peroxide and peroxy radicals to induce oxidative stress in neuronal cells. *Reviews in Agricultural Science*, 3:40-45,

- Owona B.A., Njayou N.F., Laufer S., Moundipa P.F., Schluesener H.J.** (2013). A fraction of stem bark extract of *Entada africana* suppresses lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW 264.7 cells. *Journal of Ethnopharmacology*. 149(1) : 162-168.
- Pagano G., Rengo G., Pasqualetti G., Femminella G. D., Monzani F., Ferrara N., et al.** (2015). Cholinesterase inhibitors for Parkinson's disease : a systematic review and meta-analysis. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*. 86(7), 767-773.
- Pang S.Y., Ho P.W., Liu H., Leung C-T., Li L., Chang E.E.S., David Ramsden B. and Ho S-L.** (2019) The interplay of aging, genetics and environmental factors in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Translational Neurodegeneration* 8, 23
- Paris I., Lozano J., Perez-Pastene C., Muñoz P., Segura-Aguilar J.** (2009). Molecular and Neurochemical Mechanisms in PD Pathogenesis. *Neurotoxicity Research*.16 (3): 271-279.
- Paris I., Cardenas S., Lozano J., Perez-Pastene C., Graumann R., Riveros A., Caviedes P., Segura-Aguilar J.** (2007). Aminochrome as a preclinical experimental model to study degeneration of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Neurotoxicity Research*. 12(2) : 125-134.
- Paris, I., Perez-Pastene, C., Cardenas, S., Iturriaga-Vasquez, P., Muñoz, P., Couve, E., Caviedes, P., and Segura-Aguilar, J.** (2010). Aminochrome induces disruption of actin, alpha- and beta-tubulin cytoskeleton networks in substantia-nigraderived cell line. *Neurotoxicity Research*. 18, 82–92.
- Paris I., Muñoz P., Huenchuguala S., Couve E., Sanders L.H., Greenamyre J.T., Caviedes P., Segura-Aguilar J.** (2011) Autophagy protects against aminochrome-induced cell death in substantia nigra-derived cell line. *Toxicological Sciences* 121(2):376–388.
- Pathak-Gandhi N. and Vaidya A. D.** (2017). Management of Parkinson's disease in Ayurveda: Medicinal plants and adjuvant measures. *Journal of ethnopharmacology*, 197, 46-51.
- Pfeiffer R. F.** (2016) "Non-motor symptoms in Parkinson's disease." *Parkinsonism and related disorders* 22: S119-S122.
- Pimplikar S. W.** (2014) Neuroinflammation in Alzheimer's Disease : from Pathogenesis to a Therapeutic Target. *Journal of Clinical Immunology* 34, 64-69.
- Phatnani H. and Maniatis T.** (2015) Astrocytes in Neurodegenerative Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives Biology* 2015; 7 : a020628
- Phillis John W., Horrocks Lloyd A., Farooqui Akhlaq A.** (2006) Cyclooxygenases, lipoxygenases and epoxygenases in CNS : Their role and involvement in neurological disorders. *Brain Research Reviews* 52, 201–243

- Politis M, Niccolini F.** (2015) Serotonin in Parkinson's disease. *Behavioural Brain Research*. 277:136-145.
- Prakash A., Kalra J., Mani V., Ramasamy K., Majeed A.B.A.** (2015) Pharmacological approaches for Alzheimer's disease : neurotransmitter as drug targets. *Expert Review of Neurotherapeutic*. 15(1) : 53-71.
- Praticó D., Sung S.** (2004) Lipid Peroxidation and Oxidative imbalance : Early functional events in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. IOS Press 2004; 6 : 171-175
- Prieto P., Pineda M., Aguilar M.** (1999) Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex : Specific Application to the Determination of Vitamin E. *Analytical Biochemistry* 269, 337-341.
- Purves, Augustine, Fitzpatrick, Katz, McNamara, Williams** (eds). Sinauer Associates. *Neuroscience*, 2nd edition.
- Rahman H. Manjula K. Anoosha T. Nagaveni K. Eswaraiah MC. Bardalai D.** (2013). *In-vitro* antioxidant activity of *citrullus lanatus* seed extracts. *Asian Journal of Pharmacology and Clinical Research* 6:152-7
- Ramesh G., MacLean Andrew G., and Philipp Mario T.** (2013) Cytokines and Chemokines at the Crossroads of Neuroinflammation, Neurodegeneration, and Neuropathic Pain. *Mediators of Inflammation*<sup>[SEP]</sup> Volume 2013, Article ID 480739, 20 pages
- Rangasamy S.B., Soderstrom K., Bakay R.A. and Kordower J.H.** (2010) Neurotrophic factor therapy for Parkinson's disease. *Progress Brain Research* 184, 237–264.
- Rappold P.M. and Tieu K.** (2010) Astrocytes and therapeutics for Parkinson's Disease. *The American Society for Experimental Neurotherapeutics* vol 7, 413-423
- Refaat J., Kamel M. S., Ramadan M. A. and Ali A. A.** (2013) Crinum; An endless source of bioactive principles: A review. Part V Biological profile. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* Vol. 4(4): 1239-1252
- Rios J.L., Onteniente M., Picazo D. and Montesinos M-C.** (2016) Medicinal plants and natural products as potential sources for antiparkinson drugs. *Planta Medica* 82 : 942-951
- Rubio-Perez J.M. and Morillas-Ruiz J.M.** (2012) A review: Inflammatory process in Alzheimer's Disease, role of cytokines. *The Scientific World Journal*. Article ID 756357, 15 pages
- Sabio G. and Davis R. J.** (2014). TNF and MAP kinase signalling pathways. *Seminars in immunology*, 26(3), 237–245

- Saikia A., Bhattacharya P. and Paul S.** (2018) Importance of dopamine in parkinson's disease. *Advances in Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 4(3): 47–48.
- Schapira A.H. and Jenner P.** (2011) Etiology and Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Movement Disorders* 26(6): 1049-1055.
- Schapira A.H.V., Olanow C.W., Greenamyre J.T., Bezard E.** (2014) Slowing of neurodegeneration in Parkinson's disease and Huntington's disease: future therapeutic perspectives. *Lancet* 384: 545–555
- Schapira A. H. V., Cooper J. M., Dexter D., Jenner P., Clark J. B., and Marsden C. D.** (1989) "Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease" *The Lancet* 1989, vol. 1, no. 8649, p. 1269.
- Schüle B., Pera R.A.R., Langston J.W.** (2009). Can cellular models revolutionize drug discovery in Parkinson's disease? *Biochimica et Biophysica. Acta* 1792, 1043– 1051.
- Segura-Aguilar J. and Paris I.** (2014) Mechanisms of Dopamine Oxidation and Parkinson's Disease. *In : Handbook of Neurotoxicity. Edited by Kostrzewa RM. New York, NY : Springer New York; 2014: 865-883.*
- Segura-Aguilar J. and Huenchuguala S.** (2018) Aminochrome Induces Irreversible Mitochondrial Dysfunction by Inducing Autophagy Dysfunction in Parkinson's Disease. *Frontiers in Neuroscience.* 12 :106.
- Segura-Aguilar J.** (2015) A new mechanism for protection of dopaminergic neurons mediated by astrocytes. *Neural Regeneration and Research* 10:1225–1227
- Segura-Aguilar J., Muñoz P., Paris I.** (2016a) Aminochrome as new preclinical model to find new pharmacological treatment that stop the development of Parkinson's disease. *Currents Medical and Chemical* 23(4): 346– 359.
- Segura-Aguilar J., Paris I., Muñoz P.** (2016b) The need of a new and more physiological preclinical model for Parkinson's disease. *Cellular and Molecular Life Science.* 73(7) :1381-1382.
- Segura-Aguilar J.** (2018b) Can we conclude a potential therapeutic action for Parkinson's disease by using postmortem tissue and a preclinical model based on an exogenous neurotoxin ? *Cell Death Disease.* 9(7) :748.
- Segura-Aguilar J.** (2017a) On the role of endogenous neurotoxins and neuroprotection in Parkinson's disease. *Neural Regeneration Research.* 12(6) : 897-901.
- Segura-Aguilar J.** (2018a) Neurotoxins as Preclinical Models for Parkinson's Disease. *Neurotoxicity Research.* 34(4) : 870-877.
- Segura-Aguilar J.** (2017b) Aminochrome as preclinical model for Parkinson's disease. *Oncotarget,* 8 (28) : 45036-45037.

- Segura-Aguilar, J., and Lind, C.** (1989) On the mechanism of the Mn<sup>3</sup> (p)-induced neurotoxicity of dopamine : prevention of quinone-derived oxygen toxicity by DT diaphorase and superoxide dismutase. *Chemico-Biological Interactions*. 72, 309–324.
- Segura-Aguilar J., Paris I., Muñoz P., Ferrari E., Zecca L. and Zucca F. A.** (2014) Protective and toxic roles of dopamine in Parkinson’s disease. *Journal of Neurochemistry*. 129 : 898–915.
- Segura-Aguilar J., Baez S., Widersten M., Welch C.J., Mannervik B.** (1997) Human class Mu glutathione transferases, in particular isoenzyme M2-2, catalyze detoxication of the dopamine metabolite aminochrome. *Journal of Biological Chemistry*. 272 : 5727-31.
- Shakir T., Coulibaly A.Y., Kehoe P.G.** (2013) An exploration of the potential mechanisms and translational potential of five medicinal plants for applications in Alzheimer’s disease. *American Journal of Neurodegenerative Disease*. 2(2) : 70-88.
- Simplice F.H., Abdou B.A., Abaissou N., Hervé H., Lucy M.F., Annabel M.N., Nyenti S., Neh P., Acha A.E.** (2014) Neuroprotective and memory improvement effects of a standardized extract of *Emilia coccinea* (SIMS) G. on animal models of anxiety and depression. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 3(3) : 146-154.
- Singh, S.** (2015). Antioxidants as a preventive therapeutic option for age related neurodegenerative diseases. *Therapeutic Targets for Neurological Diseases* 2015, 2, e592.
- Smulders K., Dale M. L., Carlson-Kuhta P., Nutt J. G. and Horak F. B.** (2016). Pharmacological treatment in Parkinson's disease: Effects on gait. *Parkinsonism & related disorders*, 31, 3–13.
- Song Ju-X., Cho-Wing Sze S., Tzi-Bun Ng, Kai-Fai Lee C., Leung G. P.H., Shaw Pang-C., Tong Y., Zhang Yan-B.** (2012) Anti-Parkinsonian drug discovery from herbal medicines : What have we got from neurotoxic models ? *Journal of Ethnopharmacology*. 139: 698– 711.
- Soto C. and Pritzkow S.** (2018) Protein misfolding, aggregation, and conformational strains in neurodegenerative diseases. *Nature Neuroscience* Volume 21, pages 1332–1340
- Srivastav S., Fatima M., Mondal A. C.** (2017) Important medicinal herbs in Parkinson’s disease pharmacotherapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 92: 856–863
- Stevens C. and Halliday G.** (2014) The Role of Astrocytes in Parkinson’s Disease. *In: Thomas M. (eds) Inflammation in Parkinson's Disease*. Springer, Cham
- Sulzer D., Cassidy C., Horga G., Kang U.J., Fahn S., Casella L., Pezzoli G., Langley J., Hu X.P., Zucca F.A., Isaias I.U., Zecca L.** (2018) Neuromelanin detection by magnetic resonance imaging (MRI) and its promise as a biomarker for Parkinson's disease. *NPJ Parkinson’s Disease* Apr 10;4 :11

- Sutachan J.J., Casas Z., Albarracin S.L., Stab II B.R., Samudio I., Gonzalez J., Morales L., Barreto G. E.** (2012) Cellular and molecular mechanisms of antioxidants in Parkinson's disease. *Nutritional Neuroscience* 2012 VOL. 15 NO. 3
- Sweeney P., Park H., Baumann M., Dunlop J., Frydman J., Kopito R., McCampbell A., Leblanc G., Venkateswaran A., Nurmi A. and Hodgson R.** (2017) Protein misfolding in neurodegenerative diseases: implications and strategies. *Translational Neurodegeneration* 6:6
- Tabet N.** (2006) Acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's Disease: anti-inflammatories in acetylcholine clothing! *Age and Ageing* 35:336-338
- Tamilselvam K., Braidy N., Manivasagam T., Essa M.M., Rajendra N., Thenmozhi A.J. Selvaraju S. and Guillemin G. J.** (2013) "Neuroprotective Effects of Hesperidin, a Plant Flavanone, on Rotenone-Induced Oxidative Stress and Apoptosis in a Cellular Model for Parkinson's Disease," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2013, Article ID 102741, 11 pages, 2013.
- Tata A. M., Velluto L., D'Angelo C. and Reale M.** (2014) Cholinergic System Dysfunction and Neurodegenerative Diseases: Cause or Effect? *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, Vol. 13, No. 7
- Taiwe S. and Kuete V.** (2014) Neurotoxicity and Neuroprotective Effects of African Medicinal Plants. *Toxicological Survey of African Medicinal Plants*
- Tegueu C.K., Nguefack S., Doumbe J., Fogang Y.F., Mbonda P.C., Mbonda E.** (2013).The spectrum of neurological disorders presenting at a neurology clinic in Yaoundé, Cameroon. *Pan African Medical Journal*.14: 148.
- Thibaut B.** (2017) Les maladies neurodégénératives, *Planet-Vie*, Mardi 25 avril 2017, <https://planet-vie.ens.fr/article/2383/maladies-neurodegeneratives>,
- Tian L.L., Wang X.J., Sun Y.N., Li C.R, Xing Y.L., Zhao H.B, Duan M., Zhou Z., Wang S.Q.** (2008) Salvianolic acid B, an antioxidant from *Salvia miltiorrhiza*, prevents 6-hydroxydopamine induced apoptosis in SH-SY5Y cells, *Int. J. Bio- chem. Cell Biol.* 40 409.
- Tieu K.** (2011) A Guide to Neurotoxic Animal Models of Parkinson's Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2011; 1 : a009316
- Tizabi Y. and Getachew B.** (2017) Nicotinic Receptor Intervention in Parkinson's disease: Future Directions. *Clinical Pharmacology and Translational Medicine.* 1(1):14-19

- Togola A., Austarheim I., Theïs A., Diallo D., Paulsen B.S.** (2008) Ethnopharmacological uses of *Erythrina senegalensis*: a comparison of three areas in Mali, and a link between traditional knowledge and modern biological science. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. 4(1):6.
- Tremblay M-E., Cookson M.R. and Civiero L.** (2019) Glial phagocytic clearance in Parkinson's Disease. *Molecular Neurodegeneration* 14:16.
- Tsobou R., Mapongmetsem P. M. and Van Damme P.** (2013) Medicinal Plants Used Against Typhoid Fever in Bamboutos Division, Western Cameroon. *Ethnobotany Research and Applications* 11, 163–174.
- Tysnes Ole-B. and Storstein A.** (2017) Epidemiology of Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission* 124(8) 901-905
- Van Leyen K., Arai K., Jin G., Kenyon V., Gerstner B., Rosenberg P.A., Holman T.R., Lo E.H.** (2008) Novel Lipoxygenase Inhibitors as Neuroprotective Reagents. *Journal of Neuroscience Research*. 86(4) : 904-909.
- Vauzour D., Martinsen A. and Laye S.** (2015) Neuroinflammatory processes in cognitive disorders: Is there a role for flavonoids and n-3 polyunsaturated fatty acids in counteracting their detrimental effects? *Neurochemistry International* 89: 63-74
- Wang W.Y., Tan Meng-S., Yu Jin T. and Tan L.** (2015) Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in Alzheimer's Disease. *Annals of Translational Medicine* 3 (10) :136
- WHO**, 2001. <[www.who.int/whr/2001/media\\_centre/en/whr01\\_fact\\_sheet1\\_en.pdf](http://www.who.int/whr/2001/media_centre/en/whr01_fact_sheet1_en.pdf)>
- Williams A.** (1986) MPTP toxicity : clinical features. *Journal of Neural Transmission, Supplementum* 20 : 5–9
- Williams U., Bandmann O. and Walker R.** (2018) Parkinson's Disease in Sub-Saharan Africa: A Review of Epidemiology, Genetics and Access to Care. *Journal of Movement Disorders*. May; 11(2): 53–64.
- Wirdefeldt K., Adami H-O., Cole P., Trichopoulos D., Mandel J.** (2011) Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. *European Journal of Epidemiology* 26(1) :1.
- Wong S.P., Leong L.P., Koh J.H.W.** (2006) Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chemistry* 99:775–783.
- World Alzheimer Report 2010.** The global economic impact of Dementia.
- World Health Organization.** (1981). WHO protocol: epidemiologic studies of neurologic disorders. Geneva.
- World Health Organization** (2002) Traditional medicine strategy 2002-2005. World Health



Organization Geneva : World Health Organization; 2002, WHO/ EDM/TRM/2002.1.

**Wyss-Coray T. and Mucke L.** (2002) Inflammation in neurodegenerative disease - a double-edged sword. *Neuron* 35.

**Xiao L., Saiki C., Ide R.** (2014) Stem cell therapy for central nerve system injuries : glial cells hold the key. *Neural Regeneration Research*. 9 : 1253-60

**Xiong R., Siegel D., Ross D.** (2014) Quinone-induced protein handling changes: implications for major protein handling systems in quinone-mediated toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 280:285-295.

**Xu Y., Yan J., Zhou P., Li J., Gao H., Xia Y. and Wang Q.** (2012). Neurotransmitter receptors and cognitive dysfunction in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Progress in neurobiology*, 97(1), 1–13.

**Yuste J.E., Tarragon E., Campuzano C.M., Ros-Bernal F.** (2015) Implications of glial nitric oxide in neurodegenerative diseases. *Frontiers in Cell Neuroscience*. 9(322).

**Zafar K.S., Siegel D., Ross D.** (2006) A potential role for cyclized quinones derived from dopamine, DOPA, and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid in proteasomal inhibition. *Molecular Pharmacology* 70 (3), 1079–1086.

**Zecca L., Fariello R., Riederer P., Sulzer D., Gatti A., Tampellini D.** (2002) The absolute concentration of nigral neuromelanin, assayed by a new sensitive method, increases throughout the life and is dramatically decreased in Parkinson's disease. *FEBS Letters*, 510(3) : 216-220.

**Zeng Zeng Xian-S., Geng Wen-S. and Jia Jin-J.** (2018). Neurotoxin-Induced Animal Models of Parkinson Disease: Pathogenic Mechanism and Assessment. *American Society of Neurochemistry Neuro.*<sup>[SEP]</sup> Volume 10: 1–15<sup>[SEP]</sup>

**Zhang H., Bai L., He J., Zhong L., Duan X., Ouyang L., Zhu Y., Wang T., Zhang Y., Shi J.** (2017). Recent advances in discovery and development of natural products as source for anti-Parkinson's disease lead compounds. *European Journal of Medicinal Chemistry* 141 257e272

**Zhang X., Yang Y., Du L., Zhang W., and Du G.** (2017). Baicalein exerts anti-neuroinflammatory effects to protect against rotenone-induced brain injury in rats. *International immunopharmacology*, 50, 38-47.

**Zhao, Y. and Zhao, B.** (2013). Oxidative Stress and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2013 Article ID 316523, 10 pages.

**Zhu M., Rajamani S., Kaylor J., Han S., Zhou F., Fink A.L.,** (2004) The flavonoid baicalein inhibits

fibrillation of alpha-synuclein and disaggregates existing fibrils *Journal of Biological and Chemical* 279 26846e26857.

**Zorova L. D., Popkov V. A., Plotnikov E. Y., Silachev D. N., Pevzner I. B., Jankauskas S. S., Babenko V. A., Zorov S. D., Balakireva A.V., Juhaszova M., Sollott S.J. and Zorov D.B.** (2018) Mitochondrial membrane potential. *Anal of Biochemical* 552: 50–59

**Zucca F. A, Basso E, Cupaioli FA, Ferrari E, Sulzer D, Casella L, Zecca L.** (2014) Neuromelanin of the human substantia nigra : an update. *Neurotoxicity Research* 25 : 13–23.

**Zucca FA, Vanna R, Cupaioli FA, Bellei C, De Palma A, Di Silvestre D, Mauri P, Grassi S, Prinetti A, Casella L, Sulzer D, Zecca L.** (2018) Neuromelanin organelles are specialized autolysosomes that accumulate undegraded proteins and lipids in aging human brain and are likely involved in Parkinson's disease. *NPJ Parkinson's Disease* 2018 Jun 5; 4 : 17.

**Zucca FA, Segura-Aguilar J, Ferrari E, Muñoz P, Paris I, Sulzer D, Sarna T, Casella L, Zecca L.** (2017) Interactions of iron, dopamine and neuromelanin pathways in brain aging and Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*. Aug; 155 :96-119.

**Zeng Xian-Si, Geng Wen-Shuo, Jia Jin-Jing** (2018) Neurotoxin-Induced Animal Models of Parkinson Disease : Pathogenic Mechanism and Assessment. *American Society of Neurochemistry* <sup>[[SEP]]</sup>Volume 10 : 1–15<sup>[[SEP]]</sup>



# **WEBOGRAPHIE**

[www.cours-pharmacie.com/physiologie/systeme-nerveux.html](http://www.cours-pharmacie.com/physiologie/systeme-nerveux.html) Image Chantal Proulx ( visité le 12-12-2019 à 11h)

[www.cours-pharmacie.com/physiologie/systeme-nerveux.html](http://www.cours-pharmacie.com/physiologie/systeme-nerveux.html). Image Chantal Proulx ( visité le 12-12-2019 à 11h)

[www.who.int/whr/2001/media\\_centre/en/whr01\\_fact\\_sheet1\\_en.pdf](http://www.who.int/whr/2001/media_centre/en/whr01_fact_sheet1_en.pdf). (visité le 25-06-2020 à 22h)

<https://www.intechopen.com/books/challenges-in-parkinson-s-disease/animal-models-of-parkinson-s-disease> (visité le 09-10-2020 à 21h)



**ANNEXES**

**A-Fiche d'enquête**

**UNIVERSITE DE YAOUNDE I**

*Facultés des sciences*

**Département de Biochimie**

*Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie*

**Questionnaire concernant les plantes médicinales utilisées par les tradipraticiens pour traiter certains troubles neurologiques**

Fiche n° ..... Date.....

Localité.....

Age.....Sexe..... (Facultatif)

1- Pouvez- vous donner les noms des quelques maladies donc vous êtes capables de traiter ?

a-.....b-.....c-.....

2- Connaissez –vous ces maladies ?

Mal des nerfs

Mal de tête

Epilepsie

Folie

3- Connaissez-vous les causes de ces maladies ?

Problèmes familiaux

Problèmes affectifs

Age

Magie

Sorcellerie

Autres causes.....

4- Est-ce que vous traiter ces maladies ? Oui.....Non.....

Si oui quelles sont ces maladies ?

Mal des nerfs

Mal de tête

Epilepsie

Folie

5- Si oui, qu'est-ce que vous utilisez pour traiter ces maladies ?

- Coran
- Bible
- Plantes
- Animaux
- Rites traditionnels

6- En cas d'utilisation des plantes, quels sont les noms vernaculaires de ces plantes ?

N° de l'échantillon.....

Nom vernaculaire.....

Nom courant.....

Nom latin (après identification et détermination du spécimen).....

7- Quelles sont les parties de la plante utilisée pour traiter ces maladies ?

Racine

Feuilles

Tige

Ecorce

Fleur

Fruit

Plante entière

Rhizome

8- Recette de la préparation :

.....  
 .....  
 .....

9- Posologie :

.....  
 .....

Contre-indications :

.....  
 .....

10- Pendant combien de temps (jours ou mois) le patient doit-il suivre le traitement pour être complètement guérir ?

.....

11- Quand vous donnez un traitement à un patient considérez-vous l'âge comme un facteur très important ? Oui..... Non.....

Pourquoi ?.....  
.....

12- Quelles sont les précautions à observer avant et après avoir donné le traitement à un patient ?  
Avant.....  
Après.....

13- Est-ce que ces précautions sont très importantes pour le suivi de patient?  
.....  
.....  
.....

14- Qu'est-ce qu'il arrive au patient qui consomme le médicament en excès ?  
.....  
.....

15- Dans ce cas, qu'est-ce que vous faites pour réduire les effets du médicament ?  
.....  
.....  
.....

16- Comment savez-vous que le patient est guéri ?  
.....  
.....  
.....

17- Comment agit le médicament ?  
.....  
.....

**Préparation des solutions**

**Activité anti-acétylcholinestérase**

**Réactifs**

Iodure d'acétylthiocholine (ATCI), Acétylcholinestérase (AChE), 5,5 '-dithiobis [2 – nitrobenzoïque] (DTNB), galanthamine

**Préparation des solutions**

Tampon Tris/HCl 50 mM, pH 8



- Peser 1,52 g de Tris
- Dissoudre dans l'eau distillée quelque solution pour 250 ml (solution A)
- Prélever 8,66 ml de HCl (36% ;  $d=1,17$  ;  $PM=36,46$ )
- Verser une quantité d'eau distillée dans la fiole, ensuite le volume de HCl prélevé et compléter le volume avec l'eau distillée qsp 100 ml
- Titrer la solution A avec celle du HCl au pH 8

Tampon A : Tris/HCl (pH 50 Mm ; NaCl 0.1M ;  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  0,02M)

- Peser 0,58g de NaCl et 0,41g de  $MgCl_2$
- Dissoudre dans le tampon Tris/HCl qsp 100 ml

Tampon B : Tris/HCl (50 mM ; pH 8 ; BSA 0,1)

- Peser 0,1 g de BSA
- Dissoudre dans le tampon Tris/HCl qsp 100 ml

ATCI 15 mM  $PM=289,18$  g/mol

- Peser 0,65 g d'ATCI
- Dissoudre dans l'eau distillée qsp 15 ml

DTNB 3 mM dans le tampon A

- Peser 0,24 g de DTNB
- Dissoudre dans le tampon A

Galanthamine 2 mg/ml

- Peser 2 mg de galanthamine
- Dissoudre dans 1 ml de tampon Tris/Hcl

AchE 500UN ; 518 U/mg de solide

- Prélever 1 ml de tampon A
- Verser 1 mg du solide pour avoir une solution de 518 U/ml (solution B)
- Prélever 58  $\mu$ l de la solution B
- Ajouter le tampon A qsp 15 ml

## **Activité anti-oxydante**

### **Activité anti-radicalaire par le test au DPPH**

Réactifs : DPPH, méthanol, Vitamine C

Préparation de la solution méthanolique de DPPH 40 µg/ml

- Peser 0.01 g de DPPH
- Dissoudre dans le méthanol qsp 205 ml

### **Pouvoir réducteur ou Réduction du fer**

Réactifs : Ferricyanure de potassium, acide trichloroacétique, Chlorure ferrique ( $\text{FeCl}_3$ )

#### **Préparation des solutions**

Tampon phosphate (0,2 M pH6,6)

- Peser 17,15g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$
- Dissoudre dans l'eau distillée qsp 500 ml (solution A)
- Peser 13,31g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- Dissoudre dans l'eau distillée qsp 500 ml (solution B)
- Titrer la solution B à l'aide de la solution A jusqu'au pH6,6

Solution Ferricyanure de potassium 0,25%

- Peser 0,25 g de ferricyanure de potassium
- Dissoudre dans l'eau distillée qsp 100 ml

Solution de TCA 10%

- Peser 10g de TCA
- Dissoudre dans l'eau distillée qsp 100 ml

Solution de chlorure ferrique 0,02%

- Prélever 20 µl de  $\text{FeCl}_3$
- Diluer avec de l'eau distillée qsp 100 ml

### **Capacité antioxydante par la réduction du molybdate**

## Préparations des solutions

Solution molybdate d'ammonium 4mM

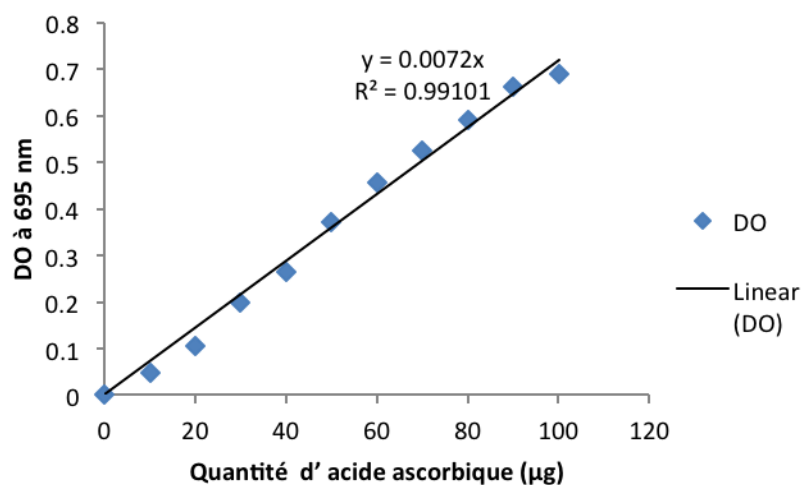
- Peser 7,41 g de molybdate d'ammonium
- Dissoudre dans l'eau distillée qsp 500 ml

Solution de phosphate de sodium 28 mM

- Peser 15,96 g de phosphate de sodium
- Dissoudre dans l'eau distillée qsp 500 ml

Solution d'acide sulfurique 0,6 M ( $H_2SO_4$  98%,  $d=1,848$ ,  $PM=98,079$ )

- Prélever 16 ml de  $H_2SO_4$
- Diluer dans l'eau distillée qsp 500 ml



Courbe d'étalonnage de la détermination de la capacité antioxydante

## Inhibition de la peroxydation lipidique dans l'homogénat du cerveau du rat

### Préparations des solutions

Solution de NaCl 0,9%

- Peser 1,8 g de NaCl

- Dissoudre dans l'eau distillée qsp 200 ml

Solution de KCl 1,15%

- Peser 5,75 g de KCl
- Dissoudre dans l'eau distillée qsp 500 ml

Solution de TCA 15%

- Peser 15 g de TCA
- Dissoudre dans l'eau distillée qsp 100 ml

Solution de TBA 0,67%

- Peser 0,67 g de TBA
- Dissoudre dans l'eau distillée qsp 100 ml

Solution de FeCl<sub>2</sub> 0,5 mM

- Peser 0,2 g de FeCl<sub>2</sub>
- Dissoudre dans l'eau distillée qsp 50 ml

Solution de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM

- Prélever 161 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- Diluer dans l'eau distillée qsp 50 ml

### **Dosage des polyphénols totaux**

**Réactifs** : Folin-Ciocalteu 2N, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 75 g/l

### **Préparation des solutions**

Solution de Folin Ciocalteu 2N

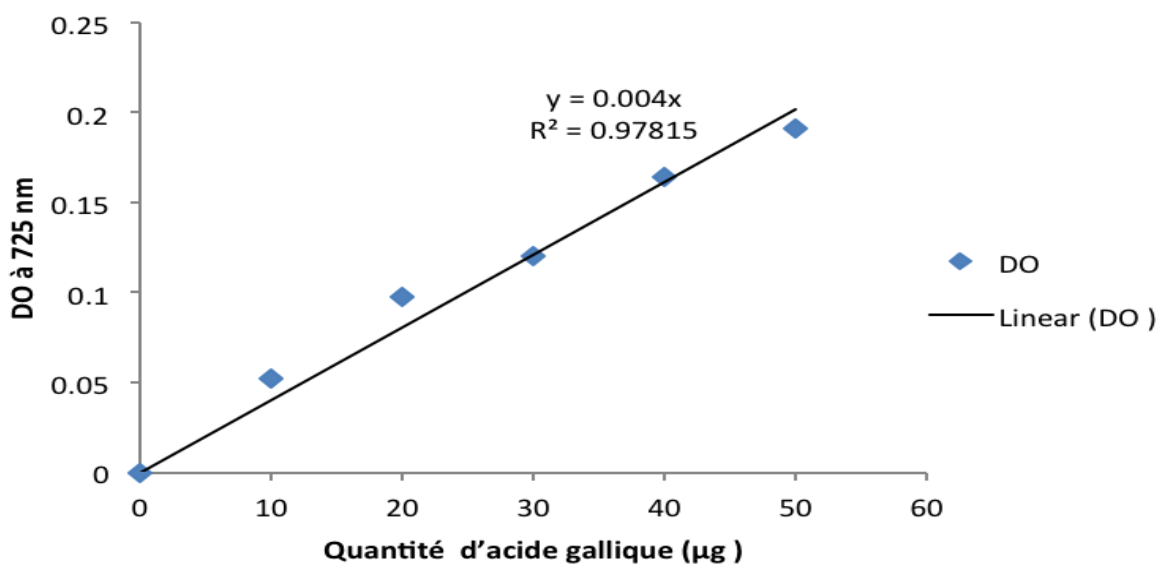
- Prélever 10 ml du réactif
- Diluer dans l'eau distillée qsp 100 ml

Solution de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  20%

- Peser 20 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$
- Dissoudre dans l'eau distillée qsp 100 ml

Solution d'acide gallique 1g/l

- Peser 0,01 g d'acide gallique
- Dissoudre dans le méthanol qsp 10 ml



Courbe d'étalonnage du dosage des polyphénols

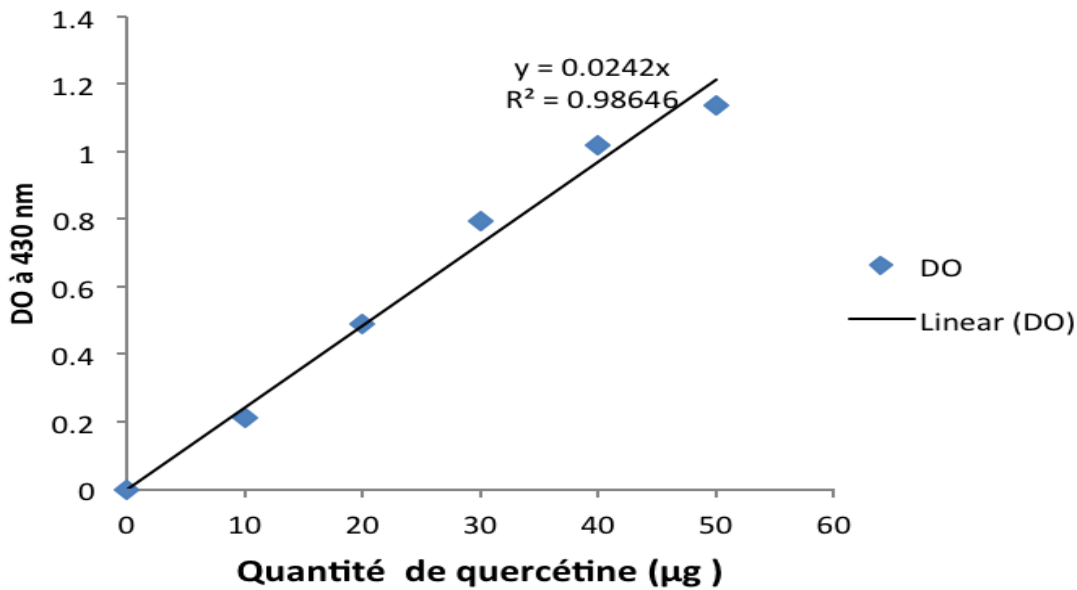
### Dosage des flavonoïdes

Solution d' $\text{AlCl}_3$  2%

- Peser 2 g d' $\text{AlCl}_3$
- Dissoudre dans le méthanol qsp 100 ml

Solution de quercétine 100 µg/ml

- Peser 0,01 g de quercétine
- Dissoudre dans 1 ml de méthanol



**Courbe d'étalonnage du dosage des flavonoides**

### **Activité anti-inflammatoire**

#### **Inhibition de la production du NO**

#### **Kit de réactif Griess pour la détermination de la teneur en nitrite (G-7921)**

##### **Préparation des réactifs**

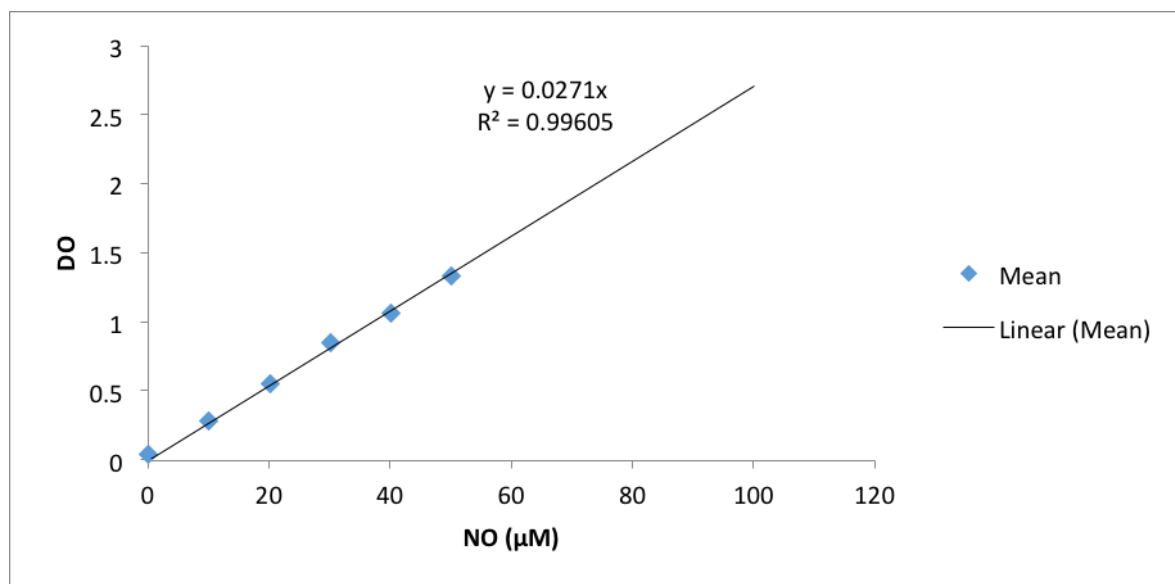
- Solution de N- (1-naphtyl) éthylènediamine Dichlorhydrate (composant A), 25 ml d'une solution à 0,1% (1 mg / ml), scellée sous argon
- Acide sulfanilique (composant B), 25 ml d'une solution à 1% (10 mg / ml) dans 5% d'acide phosphorique
- Solution standard de nitrite (composant C), 1,0 ml de nitrite de sodium (1mM) dans de l'eau déionisée

##### **Préparation du réactif de Griess**

- Mélanger ensemble des volumes égaux de N- (1-naphtyl) éthylènediamine (composant A) et d'acide sulfanilique (composant B) pour former le réactif de Griess. Préparez suffisamment de réactif pour les expériences. Ne pas stocker plus de 8 heures.

## Calibration du NO

1mM NaNO <sub>2</sub> (μL)	0	2	4	6	8	10	20
Eau deionisée (μL)	100	98	96	94	92	90	80
Reactif du Griess (μL)	100	100	100	100	100	100	100
Incubation dans le noir pendant 10 minutes et lecture de absorbance à 550 nm							
Absorbance (550nm)							
[NaNO <sub>2</sub> ] (μM)	0	10	20	30	40	50	100



### Courbe d'étalonnage de NO

#### Inhibition de la 15-lipoxygénase

Tampon borate 2 M (0,2 M); pH 9,00.

- Préparer à partir d'acide borique et d'hydroxyde de sodium.

- Acide borique, MW : 61,83 g/mol,  $2 \times 61,83 = 123,66$  g d'acide borique à dissoudre dans qsp 1 L d'eau distillée
- Ajustez le pH avec la solution concentrée de NaOH 10M

Solution de substrat (acide linoléique) 250  $\mu$ M

- Mélanger 10  $\mu$ L d'acide linoléique et 30  $\mu$ L d'éthanol
- Ajouter 120 mL de tampon borate
- Préparer cette solution le jour de l'expérience

Solution stock d'enzyme 15-lipoxygénase 10 000 UI / mL

- Préparer une solution de travail à 200 UI / mL (400 UI / mL)
- Recueillir 1 ml de la solution mère et mélanger avec 49 ml de tampon borate
- Gardez cette solution dans la glace tout au long de la période expérimentale

### **Préparation du milieu de culture des cellules d'astrocytomes humaines**

**Réactifs:** RPMI-1640, L-glucose, Bicarbonate de sodium, FBS 10%, Acides aminés non-essentiels 1%, pyruvate de sodium 1%, HEPES 1M, Pénicilline-streptomycine 1X, Amphotericine B 1X

- Peser 5,2g de RPMI-1640, 2,25g de L-glucose et 0,6g du Bicarbonate de sodium
- Dissoudre le mélange avec de l'eau double distillée (ddH<sub>2</sub>O) qsp 425 mL
- Vérifier le pH de la solution (pH=7,4)
- Sous la hotte à flux laminaire, ajouter les restes de composantes: 50 mL FBS 10%, 5 mL Acides aminés non-essentiels 1%, 5 mL pyruvate de sodium 1%, 5 mL HEPES 1M, 5 mL Pénicilline-streptomycine 1X et 5 mL Amphotericine 1X.
- Mélanger la solution puis filtrer
- Conserver le Milieu à 4 °C

Préparation du PBS pH=7,4 pour culture



- Peser 9,6g de PBS
- Dissoudre avec de l'eau double distillée (ddH<sub>2</sub>O) qsp 1 litre et vérifier le pH
- Sous la hotte à flux laminaire, filtrer la solution puis conserver à 4 °C

### **Préparation des solutions pour la synthèse de l'aminochrome**

Préparation du tampon phosphate de potassium 25mM pH=6

- Préparation solution stock 250mM pH=6 : Peser 21,7g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et 17g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> puis dissoudre avec de l'eau double distillée (ddH<sub>2</sub>O) qsp 500 mL et vérifier le pH
- Prélever 50 mL de solution stock puis compléter le volume avec de l'eau double distillée (ddH<sub>2</sub>O) qsp 500 mL et vérifier le pH

Préparation solution de dopamine

- Peser 0,0208g de dopamine
- Dissoudre avec 1 mL d'eau distillée
- Mélanger avec 6 mL d'eau distillée et 1 mL de tampon Phosphate de potassium 25 mM pH=6.

**PUBLICATIONS ISSUES DE LA THESE**

# Acetylcholinesterase inhibitory, anti-inflammatory and antioxidant properties of some Cameroonian medicinal plants used to treat some neurological disorders

Viviane L.N. Ngoungoure<sup>1</sup>, Emmanuel Mfotie Njoya<sup>2</sup>, Simon Ngamli Fewou<sup>3</sup>, Armand Fils Ella<sup>1</sup>, Lyndy J. McGaw<sup>2</sup>, and Paul F. Moundipa<sup>1</sup>.

## Abstract

**Background:** Besides the principal hallmark of Alzheimer's disease (AD) and Parkinson's disease (PD) which is accumulation of mis-folding protein in the brain; cholinergic deficit, neuro-inflammation and oxidative stress are also implicated in the pathogenesis of the above-mentioned diseases. In the present study, different plant parts were collected in an ethnopharmacological survey carried out in the Noun Division (West Region, Cameroon).

**Methods:** A total of 29 methylene chloride-methanol (1:1; v/v) extracts were prepared and screened for their acetylcholinesterase inhibitory activity, anti-inflammatory activity and antioxidant activity. Total phenolic and flavonoid contents were also quantified.

**Results:** The extract of *Crinum purpurascens* had strong activity against acetylcholinesterase with IC<sub>50</sub> value of 99.40 µg/mL. Most of the extracts tested inhibited nitric oxide (NO) production in a dose dependent manner on LPS-stimulated RAW 264.7 macrophage cells. The extract from *C. purpurascens* had strong activity against NO production (IC<sub>50</sub> of 12.8 µg/mL). The extract of *Annona muricata* seeds had the highest 15-lipoxygenase inhibitory activity with IC<sub>50</sub> of 30.43 µg/mL. In addition, most of the extracts had good antioxidant potential, particularly the extracts of *Annona senegalensis*, *Dacryodes edulis* and *Cola acuminata*. High levels of total phenolic content were found in *A. senegalensis* and *C. acuminata*.

**Conclusion:** The traditional use of these medicinal plants for the treatment of neurological disorders was established through this result. Further experiments for the discovery of the components in the most active extract (*C. purpurascens*) are underway.

**Keywords:** Medicinal plants; Bamoun; anticholinesterase; inflammation; antioxidant; neurological disorders.

\*Correspondence: Tel: (+237) 677310383. E-mail: [pmoundipa@hotmail.com](mailto:pmoundipa@hotmail.com); ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2694-5569> (Paul F. Moundipa)

Other authors ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1163-7202> (Emmanuel Mfotie Njoya); <https://orcid.org/0000-0001-8447-0613> (Lyndy J. McGaw)

<sup>1</sup>Laboratory of Pharmacology and Toxicology, Department of Biochemistry, Faculty of Science, University of Yaoundé I, 812 Yaoundé, Cameroon; <sup>2</sup>Phytomedicine Programme, Department of Paraclinical Sciences, Faculty of Veterinary Science, University of Pretoria, Private Bag X04, Onderstepoort, Pretoria 0110, South Africa;

<sup>3</sup>Faculty of Health Sciences, Université des Montagnes, Bangangté, Cameroon.



## Background

Medicinal plants have been used for the development of new drugs and continue to play an invaluable role in the progress of drug discovery. Several medicinal plants are of particular interest in several parts of Africa and therefore they are strongly qualified for drug development [1]. In Africa, medicinal plants are used in traditional practices to treat neurological diseases [2, 3]. Neurodegenerative disease, such as Alzheimer's disease (AD) or Parkinson's disease (PD), is an umbrella term for a range of conditions primarily affecting neurons in the human brain. Besides the principal hallmark of these diseases which is the accumulation of protein in some regions of the brain; cholinergic deficit, neuro-inflammation and oxidative stress are also implicated in their pathogenesis [4, 5]. In addition to AD, acetylcholine esterase (AChE) inhibition is also considered a promising therapeutic strategy for other types of dementia and Parkinson's disease [6]. Current medications for the treatment of AD or PD include AChE inhibitors for mild to moderate cases [6-9]. These acetylcholinesterase inhibitors are donepezil, rivastigmine and galanthamine. Unfortunately, these drugs have been reported to have adverse effects including gastrointestinal disturbances, hepatotoxicity, nausea, vomiting, diarrhea, dizziness, syncope and bradycardia [10, 11]. In order to prevent or to limit the progression of disease, most pharmacological research has focused on acetylcholinesterase (AChE) inhibitors with fewer side effects to alleviate cholinergic deficit and improve neurotransmission [12].

Emerging evidence indicates the role of inflammation in the pathogenesis of neurodegenerative diseases including AD and PD. Neuro-inflammatory processes may contribute to the cascade of events leading to the progressive neuronal damage observed in ageing and age-related cognitive disorders such as PD and AD [13]. During inflammation, many pro-inflammatory mediators including nitric oxide (NO) production and the activation of enzymes such as lipoxygenases (LOX) are increased. In neurodegenerative diseases, a high level of NO is released from nerve cells and this causes extensive damage to surrounding tissues, including neurons. In addition, increased activities of lipoxygenases under pathological situations produce eicosanoids that elicit cytotoxic inflammatory responses. Oxidative stress plays a crucial role in the pathogenesis of many ailments including neurodegenerative diseases such as AD and PD [14-16]. The production of free radicals during metabolism in cells can be deleterious when there is some imbalance between the production and elimination. It has been reported that during aging or brain injury, this production becomes very high and contributes to the modification of biological molecules such as nucleic acids, proteins, lipids and carbohydrates [17]. Therefore, medicinal plants with high phenolic contents and antioxidant activities may have great relevance in the prevention and therapy of neurodegenerative diseases such as AD and PD [18-20]. Taking into account these different structural and pathological conditions that characterize neurodegenerative diseases; a variety of targets and more efficient methods are required for their treatment.

In Cameroon, there is a rich tradition in the use of herbal medicine for the treatment of several ailments [21]. The present investigation was conducted to study *in vitro* anticholinesterase, anti-inflammatory and antioxidant activities of some medicinal plants, which can lead to the discovery of new and promising sources of potential drugs against neurodegenerative diseases.

## Methods

### *Survey and plant collection*

The ethnopharmacological survey was carried out in the Noun Division, located in the West region of Cameroon. A semi-structured questionnaire was developed to investigate what types of medicinal plants were used by the practitioners to improve memory loss or for the treatment of neurological disorders like epilepsy, convulsion, insomnia, schizophrenia, depression, migraine, headaches, agitation etc. During the interviews, each practitioner was interviewed at 3 stages about vernacular name, life form, the current diseases, plant species used for the treatment, their medicinal effects, the plant part used, mode of preparation (e.g., infusion and decoction), route of administration (oral or external), administration form (e.g., juice, fruit, salad or jam, poultice, paste, inhalation, chewing and flavoring). Every herbalist was asked to list the main diseases he treated, and the plants used in the treatment. He was also asked to provide samples of the plant species from his own collection as well as from the field; and if possible, plant photographs. Two voucher specimens per medicinal plant were collected in the field, pressed and then dried prior for identification at the Cameroon National Herbarium (HNC). All plant specimens were collected in both flowering and fruiting conditions. Samples of medicinal plants were collected for scientific identification and herbarium preparation following standard procedures.

### *Extraction*

This survey allowed us to identify twenty-six medicinal plants (Table 1) used to improve memory loss or to treat some neurological disorders such as epilepsy, headaches, depression, anxiety, migraine, convulsions and schizophrenia. Among the 26 medicinal plants identified some of them are used individually or as the mixture of two plants. Different parts of plants (leaves, barks, bulbs, rhizomes, roots, flowers and aerial parts) were collected in the locality of Foubot (Noun Division, West Region, Cameroon) and they were washed with distilled water and dried at room temperature for several weeks. The dried plant materials were powdered using a grinder. The powder obtained was kept at 4°C until the preparation of extracts. A preliminary extraction test with different solvents: ethanol; methanol and the mixture methylene chloride/methanol on Thin Layer Chromatography (TLC) (data not shown) allowed us to select the mixture methylene chloride/methanol as the best solvents for the extraction. Hundred grams of powdered plant materials were soaked in 500 mL of solvent methylene chloride/methanol (1:1; v/v) for 48 hours. The final extracts were passed through Whatman N°1 filter paper and the filtrates obtained were concentrated under vacuum at low pressure on a rotary evaporator (RV10 Basic, IKA). The crude extracts obtained were stored at 4°C until further use.

### *Chemicals*

AChE (type VI-S from electric eel), acetylthiocholine iodide (ATCI), 5,5-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), potassium persulfate, ferrozine, ferrous sulfate, potassium ferricyanide, trichloroacetic acid, ferric chloride, sodium nitroprusside, L-ascorbic acid, Folin-Ciocalteu reagent, gallic acid, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox®), aluminium chloride, quercetin and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) were

purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The 15-lipoxygenase from *Glycine max* purchased from Sigma (Germany) and Tris (hydroxymethyl) aminomethane from Sigma (Switzerland). Foetal calf serum (FCS), penicillin/streptomycin/fungizone (PSF) and Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) were obtained from Highveld Biological Products (South Africa). Phosphate buffered saline (PBS) and trypsin were purchased from Whitehead Scientific (South Africa).

#### Acetylcholinesterase inhibitory activity

The acetylcholinesterase inhibition assay was determined by the Ellman colorimetric method [22] as described by Adewusi et al. [23] with slight modifications. Three buffers were prepared for the assay: Buffer A (50 mM Tris- HCl, pH 8), Buffer B (50 mM, pH 8, containing 0.1% bovine serum albumin) and Buffer C (50 mM Tris-HCl, pH 8, containing 0.1M NaCl and 0.02M MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O). Briefly, 50 µL of plant extracts dissolved in DMSO, 100 µL of 15mM ATCI in water, 500 µL of 3mM DTNB in Buffer C, 250 µL of Buffer B were mixed in a spectrophotometer quartz cuvette. Absorbance was measured at 405 nm every 15s, three times consecutively on a spectrophotometer (Genesys, Hach). Thereafter, 100 µL of AChE (0.28U/mL) were added to the cuvette and the absorbance measured during 5 minutes every 15s. Galanthamine served as positive control. Any increase in absorbance due to the spontaneous hydrolysis of the substrate was corrected by subtracting the absorbance before adding the enzyme from the absorbance after adding the enzyme. The percentage inhibition was calculated using the following formula (1):

$$\% \text{ Inhibition} = 100 - \left[ \frac{\text{Absorbance of sample}}{\text{Absorbance of control}} \right] \times 100$$

Formula (1)

#### Anti-inflammatory assays of extracts

##### Nitric oxide inhibition assay on LPS-activated RAW 264.7 macrophages

##### Cell culture and treatment with extracts

The RAW 264.7 macrophage cell lines obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA) were cultured at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> in 75 cm<sup>2</sup> plastic culture flasks in DMEM containing 4.5 g/L and 4 mM L -glutamine supplemented with 10% FCS and 1% PSF solution. One hundred microliters of a cell suspension (2 × 10<sup>6</sup> cells per mL) was seeded in 96 well-microtitre plates and the cells were incubated overnight at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> to allow attachment at the bottom of the plates. Then, the cells were activated by incubation in medium containing LPS (final concentration: 1 µg/mL) alone (negative control) or LPS with different concentrations (100, 50, 25 and 12.5µg/mL) of the extracts dissolved in DMSO and further diluted in the culture medium. Quercetin, a standard NO inhibitor, served as a positive control [24].

##### Measurement of nitrite

Nitric oxide released from macrophages was determined by measuring the nitrite concentration in cell culture supernatant using the Griess reagent. After 24 hours of incubation, 100 µL of culture supernatant from each well was transferred into new 96-well microtitre plate and an equal volume of Griess reagent was added.

The mixture was left in the dark at room temperature (25°C) for 15 minutes and the absorbance was measured at 550 nm on a microplate reader (Synergy Multi-Mode Reader, BioTek). The concentrations of nitrite were determined by using the linear regression analysis from a sodium nitrite standard curve. Percentage inhibition was then calculated based on the ability of extracts plants to inhibit nitric oxide formation by cells compared with the negative control (LPS-treated cells without extracts), which was considered as 0% inhibition (see formula 1).

#### Cell viability

To determine whether the observed nitric oxide inhibition was not due to cytotoxicity of the tested sample, a cytotoxicity assay was also performed on the culture as previously described by Mosmann [25] with slight modifications. After removal of media, the cells were topped up with 200 µL of fresh DMEM and 30 µL of 5 mg/mL MTT solution. The cells were further incubated at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> for 4 hours. The medium was carefully removed using a suction pump (Integra, USA), without disturbing the MTT formazan crystals. The formed formazan salts were dissolved in 50 µL of DMSO. The absorbance was read at 570 nm on a microplate reader (Synergy Multi-Mode Reader, BioTek). The percentage cell viability was calculated with the control (LPS-treated cells without extracts) taken as 100% viability.

#### Soybean lipoxygenase inhibition assay

The assay was performed according to procedure described by Dzoyem and Eloff [26]. The assay is based on the formation of the complex Fe<sup>3+</sup>/xylenol orange with absorption at 560 nm. The 15-lipoxygenase from *Glycine max* was incubated with extracts or positive control (quercetin) at room temperature (25°C) for 5 minutes. Then, linoleic acid (final concentration, 140 µM) in Tris-HCl buffer (50 mM, pH 7.4) was added and the mixture was further incubated at room temperature (25°C) for 20 minutes in the dark. The assay was terminated by adding 100 µL of FOX reagent [sulfuric acid (30 mM), xylenol orange (100 µM), iron (II) sulfate (100 µM), methanol/water (9:1)]. The lipoxygenase inhibitory activity was determined by calculating the percentage of the inhibition of hydro-peroxide production from the changes in absorbance values at 560 nm after 30 minutes at 25°C.

$$\% \text{ Inhibition} = \left[ \frac{\text{Absorbance of control} - \text{Absorbance of extract}}{\text{Absorbance of control}} \right] \times 100$$

Formula (2)

#### Antioxidant assays

##### DPPH radical scavenging assay

The capacity of the extracts to reduce the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical was assessed using the method described by Magama et al. [27] with slight modifications. Our reaction mixture consisted of 3.1 mL of a solution of DPPH in methanol (40 µg/mL) and 50 µL of extract. The mixture was kept in dark for 30 minutes at room temperature and the absorbance was recorded spectrophotometrically at 517 nm. The normal purple colour of DPPH will turn into yellow when its single electron is paired with a hydrogen atom coming from a potential antioxidant. Ascorbic acid was used as the positive control. Percentage inhibition was calculated using the formula (2). The IC<sub>50</sub> values were determined by plotting the percentage of DPPH radical

inhibitory activity at different concentrations of the extracts (0.1; 1; 10 and 100 µg/mL).

#### Reducing ability assay

The reducing ability of the extracts was assayed as described by Moyo et al. [28]. Fifty microliters of extract (100 µg/mL) was added to 1.1 mL of phosphate buffer (0.2 mM, pH 6.6) and 1 mL of potassium ferrocyanate [ $K_3Fe(CN)_6$ ] (0.25%). After incubation at 50°C for 20 minutes, 1 mL of trichloroacetic acid (10%) was added to the mixture before centrifugation at 3000 rpm for 10 minutes. The supernatant (1 mL) was collected and mixed with 1 mL of distilled water and 0.2 mL of ferric chloride (0.02%). The absorbance was measured spectrophotometrically at 700 nm. The reducing ability was measured by reading the absorbance of the reaction mixture and a higher absorbance indicated increased reducing power. Ascorbic acid was used as positive control.

#### Total antioxidant assay

The antioxidant potential of the extracts was assessed by the phosphomolybdenum reduction assay with slight modifications. Fifty microliters of extracts (100 µg/mL) were mixed with 1 mL of sulfuric acid (0.6 M  $H_2SO_4$ ), 1.05 mL of sodium phosphate 28 mM and 1.05 mL of ammonium molybdate (4 mM). The tubes were incubated at 95°C for 90 minutes and the mixture was cooled at room temperature. The absorbance of the mixture was measured spectrophotometrically at 695 nm. For standard, the appropriate solution of ascorbic acid was used and calibration curve ( $y=0.0033x$ ) was obtained using the concentrations ranging from 0 to 100 µg/mL of ascorbic acid. The antioxidant capacity is expressed as ascorbic acid equivalents (mg AAE/g of extract).

#### Inhibition of lipid peroxidation using Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS)

The inhibition of lipid peroxidation activity was determined according to the method described by Asaduzzaman et al. [29] with slight modifications. Brains were obtained from rats (Wistar albino), dissected and homogenized in ice-cold KCl (1.15%) to produce a brain tissue homogenate of 10% which was centrifuged at 1300 g for 10 minutes at 4°C. An aliquot (1 mL) of the supernatant was incubated with the sample in the presence of  $FeCl_2$  (0.5 mM; 0.05 mL) and  $H_2O_2$  (0.5 mM; 0.05 mL) at 37°C for 1 hour. The reaction was stopped by the addition of trichloroacetic acid (15% w/v, 1 mL), followed by thiobarbituric acid (TBA, 0.67%, w/v, 1 mL), and the mixture was then heated at 100°C for 15 minutes. After centrifugation at 3000 rpm for 5 minutes to remove the precipitated protein, the colour intensity of the malondialdehyde (MDA)-TBA complex in the supernatant was measured by reading its absorbance spectrophotometrically at 532 nm. Trolox was used as positive control. The inhibition ratio (%) was calculated using the formula (2).

#### Determination of the phytochemical content of the extracts

##### Determination of total phenolic content (TPC)

Total phenolic content was performed according to the Folin-Ciocalteu method [30] with some modifications. Briefly, 0.05 mL of sample (100 µg/mL), 2.4 mL of distilled water and 0.2 mL of Folin-Ciocalteu's reagent (2N) were introduced in a test tube, and then 0.5 mL of  $Na_2CO_3$  (20%) was added. The reaction mixture was incubated in dark at room temperature for 1 hour and the

absorbance of the mixture was read on a spectrophotometer at 765 nm. The sample was tested in triplicate and a calibration curve ( $y=0.0069x$ ) with six data points for gallic acid with the concentration ranging from 0 to 50 µg/mL was obtained. The results were projected to the gallic acid calibration curve and the TPC of the samples was expressed as mg of gallic acid equivalents per gram of extract (mg GAE/g extract).

##### Determination of total flavonoid content (TFC)

Aluminium chloride colorimetric method was used to determine the total flavonoid content of the extracts. Briefly, 0.5 mL of 2%  $AlCl_3$  was added to 0.5 mL of sample and after 30 minutes of incubation at room temperature, the absorbance was measured spectrophotometrically at 430 nm (the final concentration was 100 µg/mL). The calibration curve ( $y=0.0242x$ ) was obtained by using a solution of quercetin dissolved in methanol with the concentration ranging from 0 to 50 µg/mL. The TFC of samples was expressed as mg quercetin equivalent (QE) / gram of extract.

##### Statistical analysis

Data are presented as the mean  $\pm$  standard deviation (SD) of triplicate tests.  $IC_{50}$  values of samples were calculated by plotting the linear regression curve of the percentage of inhibition against the logarithm of the concentrations using GraphPad Prism Software 3.0. Results were analysed statistically using the same software and they were identified as significantly different when  $p < 0.05$ .

## Results

#### Acetylcholinesterase inhibitory activity

All the extracts were tested in a preliminary assay at a single concentration of 200 µg/mL compared to galanthamine (positive control) at 100 µg/mL. The inhibitory activities of extracts are given in Table 2. It was observed from this study that five crude extracts exhibited considerable acetylcholinesterase inhibitory activity (greater than 50% inhibition). The 50% inhibitory concentrations ( $IC_{50}$ ) values were as follow: *Crinum purpurascens* (99.40  $\pm$  1.28 µg/mL); *Emilia coccinea* (150.40  $\pm$  1.43 µg/mL); *Erythrina senegalensis* (166.20  $\pm$  2.98 µg/mL); *Ageratum conyzoides* (176.2  $\pm$  0.06 µg/mL) and *Piper umbellatum* (180.60  $\pm$  1.64 µg/mL). These plants were less active compared to galanthamine ( $IC_{50}$  of 24.65  $\pm$  2.12 µg/mL).

#### Anti-inflammatory activities

The NO production inhibitory activity of extracts was evaluated on LPS-activated RAW 264.7 macrophage cells. This assay was validated by using LPS-activated cells without treatment with the extracts as negative control, LPS-activated cells and treated with quercetin (a standard inhibitor of NO). Most of the extracts showed dose dependent inhibition of NO production at the concentration of 12.5, 25, 50 and 100 µg/mL (data not shown). At the highest concentration (100 µg/mL), most of the extracts evaluated had percentage inhibition greater than 50% (Table 3). In addition, the percentage of viability at 100 µg/mL varied considerably between 48% to 126%. The  $IC_{50}$  values of different extracts were calculated and are presented in Table 3.

The 15-lipoxygenase inhibitory activity was measured using the 96-well microplate-based ferric oxidation of xylenol



orange (FOX) assay. The results summarized in Table 2 indicate that, at 100 µg/mL, the extract of *Annona muricata* seeds had the highest anti-15-lipoxygenase activity with 93.72% inhibition. The extracts of *Cola acuminata*, *Annona senegalensis* bark, *Erythrina senegalensis* and *Anthocleista swainfurtherii* were not active at tested concentrations. The IC<sub>50</sub> values ranged between 30.43 µg/mL (*Annona muricata* seeds) and 93.60 µg/mL (*Acanthus montanus*) and the IC<sub>50</sub> value of less active extracts (less than 50% inhibition) were considered as greater than 100 µg/mL.

#### Antioxidant activities

The free radical scavenging activity of different extracts, along with the standard reference ascorbic acid was carried out, and the concentration of the extract necessary to reduce the initial concentration of DPPH by 50% (IC<sub>50</sub>) was determined for the extract which showed the percentage of inhibition higher than 50% (see Table 4). At 100 µg/ml, fifteen (15) crude extracts exhibited more than 50% DPPH scavenging activity. The results are summarized in Table 4. A lower value of IC<sub>50</sub> indicates higher antioxidant activity. The best free radical scavenging activity was obtained with the barks of *A. senegalensis* extract (IC<sub>50</sub> of 7.40 µg/mL) which was better than ascorbic acid used as positive control (IC<sub>50</sub> of 8.41 µg/mL). Other extracts from *E. senegalensis* (IC<sub>50</sub> of 12.20 µg/mL), *A. swainfurtherii* (IC<sub>50</sub> of 11.03 µg/mL) and *C. acuminata* (IC<sub>50</sub> of 22.35 µg/mL) had also good DPPH scavenging potential.

In the reducing power assay, the presence of reductants (antioxidants) in the extracts would result in the reduction of Fe<sup>+3</sup>/ferricyanide complex to the ferrous form by donating an electron. A higher absorbance indicates a higher reducing power. The greater reducing power was obtained with the extract of *C. acuminata* (0.62 ± 0.032).

The total antioxidant activity of the crude extracts varied between 149.39 to 385.15mg AAE/g extract (See Table 4). The extract of *Dacryodes edulis* had the highest total antioxidant capacity with 385.15 mg AAE/g of extract. A higher absorbance means higher antioxidant capacity.

In the lipid peroxidation inhibition activity, the activity of plant extracts against non-enzymatic lipid peroxidation in rat brain homogenate indicated that at 100 µg/mL, nine crude extracts exhibited more than 50% inhibitory activity in the brain homogenate. The best IC<sub>50</sub> value was obtained with *Alchornea laxiflora* (3.20 µg/mL), *D. Edulis* (6.60 µg/mL), *C. acuminata* (9.50 µg/mL), *Ocimum gratissimum* (11.20 µg/mL) and *A. senegalensis* (29.20 µg/mL) compared to the positive control Trolox (4.35 µg/mL).

#### Phytochemical content of the extracts

The total phenolic content (TPC) obtained as mg GAE/g of extract varied considerably between plant extracts as shown in Table 5. The extract of *A. senegalensis* had the highest TPC (100 mg GAE/g of extract), followed by *C. acuminata* (93,18 mg GAE/g of extract), *A. laxiflora* (92.12 mg GAE/ g of extract), *A. swainfurtherii* (91.81 mg GAE/g of extract), *D. edulis* (85.45 mg GAE/ g of extract). The total flavonoid content (TFC) of plant extracts ranged between 0.111 to 6.43 mg QE/g of extract (Table 5). Very low correlation was found between the antioxidant activities and the total phenolic and flavonoid contents (data not shown).

## Discussion

Many medicinal plants used for the treatment of cognitive dysfunction have been explored for the development of new drugs against neurodegenerative diseases and these plants contain various bioactive compounds [31, 32]. In Cameroon, many plants used to treat various ailments displayed good activities *in vitro* (antimalarial, antimicrobial, antiparasitic, anti-proliferative, anti-inflammatory, antidiabetic, etc.). Most biologically active compounds comprise terpenoids, phenolics, and alkaloids [21]. The ethnopharmacological survey carried out in the Noun Division allowed us to identify twenty-six plants used to improve memory loss or to treat some neurological disorders such as epilepsy, headaches, depression, anxiety, migraine, convulsions and schizophrenia. The anticholinesterase, anti-inflammatory and antioxidant activities of these plants were determined. All the plant extracts used in this study inhibited acetylcholinesterase, but five of them had very good inhibitory activity including the extracts of *C. purpurascens* (99.40 ± 1.28 µg/ml), *E. coccinea* (150.40 ± 1.43µg/ml), *E. senegalensis* (166.20 ± 2.98 µg/ml), *A. conyzoides* (176.2 ± 0.06 µg/ml) and *P. umbellatum* (180.60±1.64 µg/ml). The best inhibitory activity was shown by the extract of *C. purpurascens* belonging to the family Amaryllidaceae. Some studies report the potential of plants from the Amaryllidaceae family as acetylcholinesterase inhibitors (AChEIs), specially *Crinum* species [33-36]. It is known that plants from the Amaryllidaceae family contain various compounds which are inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase [37, 38]. Similarly, this study identified the *C. purpurascens* (Amaryllidaceae) crude extract as containing AChEIs. The activity shown by four other plant extracts, namely *E. coccinea*, *E. senegalensis*, *A. conyzoides* and *P. umbellatum* may be explained by the presence of some bioactive compounds in the extracts [39]; and other studies have reported the neuropharmacological activities of some of these plants [40-44].

In the central nervous system, NO plays important roles in processes such as neurotransmitter release, neurotransmitter reuptake, neurodevelopment, regeneration, synaptic plasticity, and regulation of gene expression; but excessive production leads to neural injury. Nitric oxide (NO) has been linked to neurodegenerative disorders due to the increased expression of several enzymes relevant in neurodegeneration [45]. The inducible forms of nitric oxide synthase are the most important pro-inflammatory enzymes responsible for increasing the levels of NO [46]. Therefore, inhibition of NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells is one of the possible ways to screen various anti-inflammatory drugs [47]. The anti-inflammatory activity of the crude extracts was carried out by assessing inhibition of NO production by RAW 264.7 cells as well as viability testing using the MTT assay. Most of the extracts at 100 µg/mL had no cytotoxic effect, indicating that the inhibitory effect of plant extracts on RAW 264.7 cells is not due to their cytotoxicity. The NO production induced by LPS was inhibited by most of the crude extracts, particularly the extract of *C. purpurascens*. The inhibitory activity of NO production by medicinal plants may arise from inhibition of the expression of nitric oxide synthase. Many natural compounds from medicinal plants have been known as inhibitors of the expression of iNOS in LPS-activated macrophages [48]. Lipoxygenases (LOX) form a family of lipid-peroxidizing enzymes, which play regulatory roles in the inflammatory process and neurodegenerative diseases. These enzymes are widely expressed in the central nervous system [49]. The 15-LOX enzyme converts arachidonic acid into its corresponding lipid peroxides, which are further converted, in the

presence of glutathione, to different inflammatory mediators. It has been shown that lipoxygenase inhibitors are able to rescue both neuronal as well as oligodendrocyte cells from cell death induced by oxidative stress [50]. Therefore, the inhibition of 15-LOX may be an emerging drug target for the treatment of neurodegenerative diseases. The extract of *Annona muricata* seeds (IC<sub>50</sub> of 30.43 µg/mL) had the best 15-LOX inhibitory activity and can therefore be considered as containing potential LOX inhibitors.

Several studies have reported the implication of oxidative stress in the pathogenesis of AD and PD. The brain is very sensitive to free radicals which lead to oxidation of protein, lipid peroxidation and oxidation of some macromolecules found in the brain [51, 52]. An appropriate way to delay oxidative stress in the brain is the use of antioxidants presents in fruits, vegetables and plants. Many methods are used to evaluate antioxidant activities of plants. In this study, the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging, lipid peroxidation (MDA), total antioxidant and ferrous ion-chelating power tests were used to evaluate the antioxidant activities of the crude extracts. The DPPH free radical scavenging activity is a widely used model for evaluating the free radical scavenging ability of various compounds [28]. The decreased of the absorbance in this assay is a result of a colour change from purple to yellow, as radicals are scavenged by antioxidants through the donation of hydrogen to form the stable DPPH molecule. Substances that are able to perform this reaction can be considered as antioxidants or radical scavengers [53]. The reducing power of a compound is a supporting feature for its antioxidant capacity. In the reducing power assay, antioxidant compounds convert the oxidative form of iron (Fe<sup>+3</sup>) in ferric chloride to ferrous (Fe<sup>+2</sup>). Some authors have reported that the reducing properties of antioxidants are generally associated with the presence of reductants. The extract of *C. acuminata* showed the highest reducing power, therefore suggesting the presence of reductants within this extract. Many studies carried out on *C. acuminata* concern the antioxidant activity of the seeds, commonly called kola nuts [54-56]. To the best of our knowledge, this is the first report of the antioxidant activity of the bark extract of *C.*

*acuminata*. The phosphomolybdenum method was used to determine the total antioxidant activity of the different extracts, and the extract of *D. edulis* had the highest antioxidant capacity (385.15 mg AAE/g of extract). This high antioxidant capacity can be attributed to the presence of phenols (85.45±7.71 mg GAE/g extract) in the extract. Lipid peroxidation is the mechanism by which lipids are attacked by reactive oxygen species (ROS) that have sufficient reactivity to abstract a hydrogen atom from a methylene carbon in their side chain [51]. Lipid peroxidation has been reported to be elevated in the brain of patients suffering from AD [52]. During lipid peroxidation, low molecular weight end products, generally malonaldehyde, are formed by oxidation of poly-unsaturated fatty acids that may react with two molecules of thiobarbituric acid to give a pinkish red chromogen. The lipid peroxidation is induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ Fe<sup>2+</sup>. The extract of *A. laxiflora* (3.20 µg/mL) was the most active compared to the standard trolox (4.35 µg/mL) and this activity may be due to its high content of phenolic compounds (92.12 mg GAE/g extract).

Phenolic compounds, which include flavonoids, are commonly found in the plant kingdom, and they have been reported to have multiple biological effects, including antioxidant activity. Phenolic compounds are known as powerful chain-breaking antioxidants and they are very important plant constituents because of their scavenging ability, which is due to their hydroxyl groups [28]. Several studies have evaluated the relationship between the antioxidant activity of plant products and their phenolic content. Flavonoids are a group of polyphenolic compounds, which exhibit various biological effects relevant in neurodegenerative diseases [57, 58]. High total phenolic and flavonoid contents lead to better antioxidant activity. Indeed, data presented in Table 5 shows that the type and quantity of phytochemicals found varies among different plant extracts. Unfortunately, very low correlation was observed between antioxidant activities and phenolic or flavonoid content and this may be due to the diversity of the plants used that belong to different families or species.00



**Table 1.** Medicinal plant used for the treatment of neurological diseases as identified by the ethnopharmacological survey.

Family	Scientific name Voucher Specimen Number	Vernacular name in Bamoun*	Part(s) used	Mode of preparation	Disease treated
<b>Acanthaceae</b>	<i>Acanthus montanus</i> (Nees) T.Anderson 23603/SRF/Cam.	Fozem	Leaves	Decoction	Depression
<b>Agavaceae</b>	<i>Draceana deisteliana</i> Engl 27673/YA	Nkunkù	Leaves	Decoction	Convulsion
<b>Amaryllidaceae</b>	<i>Crinum purpurascens</i> Herb. 40058/HNC	Nduéké	Bulbs	Decoction	Epilepsy
<b>Annonaceae</b>	<i>Annona muricata</i> L. 32879/HNC	Chawa-chawa	Leaves, seeds	Decoction	Depression/badly nerves
	<i>Annona senegalensis</i> Pers. 7783 YA	Kuopshe-kuopshe	Leaves, barks	Decoction	Convulsion/Epilepsy
<b>Apocynaceae</b>	<i>Voacanga africana</i> Stapf 47215 YA	Pè pepkèn	Barks	Decoction	Schizophrenia
	<i>Dacryodes edulis</i> (G.Don) H.J.Lam 18258/HNC	Youom	Barks	Decoction	Depression/Epilepsy
<b>Araliaceae</b>	<i>Polyscias fulva</i> Hiern 2990 YA	Pugue (Pùngùè)	Barks	Decoction	Anxiety/Depression
<b>Asteraceae</b>	<i>Ageratum conyzoides</i> L. 20074/ SRF/ Cam	Menjotefu	Aerial part	Maceration	Epilepsy/Depression
	<i>Emilia coccinea</i> (Sims) G. Don 29441/HNC	Shin Mù	Leaves	Decoction	Headache
	<i>Vernonia guineensis</i> benth 11133/SRF/Cam	Mgbùkwet	Rhizomes	Decoction	Epilepsy /memory loss
	<i>Spilanthes africana</i> DC. 33075/HNC	Mba kouom	Flowers	Decoction	Headache
	<i>Bidens pilosa</i> L. 41693/HNC	Fuwen	Whole plant	Decoction	Epilepsy/Depression
<b>Cesalpiniaceae</b>	<i>Senna alata</i> L. 29494/HNC	Sùé nâsa	Leaves	Decoction	Convulsion/agitation
<b>Clusiaceae</b>	<i>Allanblackia floribunda</i> Oliv. 1380/HNC	/	Leaves	Decoction	Epilepsy
<b>Euphorbiaceae</b>	<i>Euphorbia hirta</i> L. 14288/SRF/Cam	Bùmon	Aerial part	Decoction	Depression
	<i>Croton macrostachyus</i> Hochst et Del 17909/SRF/Cam	Kùteshâ	Roots Barks	Decoction	Epilepsy
	<i>Alchornea laxiflora</i> (Benth.) Pax & K.Hoffm. 2093 YA	Meshé	Leaves	Decoction	Anxiety/Depression
<b>Fabaceae</b>	<i>Erythrina senegalensis</i> DC. 35259 YA	Megham	Leaves, barks	Decoction	Epilepsy
	<i>Piliostigma thonningii</i> (Schum.) Milne- Redh. 2689 YA	Pien	Leaves, barks	Decoction	Depression
<b>Labiaceae</b>	<i>Ocimum gratissimum</i> L. 42852 YA	Sem mvù	Leaves	Decoction	Depression
<b>Loganiaceae</b>	<i>Anthocleista schweinfurthii</i> Gilg 2281 YA	Yù'rum	Leaves	Decoction	Convulsion/agitation
<b>Moraceae</b>	<i>Fiscus exasperata</i> Vahl 5123/SRF/Cam	Ghùghu	Leaves, barks	Decoction	Epilepsy
<b>Piperaceae</b>	<i>Piper umbellatum</i> L. 20934/SRF/Cam	Boupouete	Leaves	Decoction	Anxiety/depression
<b>Sterculiaceae</b>	<i>Cola acuminata</i> (P. Beauv.) Schott & Endl. 1729/SRF/Cam	Shin pé'	Barks	Decoction	Schizophrenia/ memory loss
<b>Solanaceae</b>	<i>Nicotiana tabacum</i> L. 18637/SRF/Cam	Dapâ	Leaves	Decoction	Headache /migraine

\* Bamoun is the traditional language spoken in the study area. SRF/Cam: Société des Réserves forestières du Cameroun. HNC: Cameroon National Herbarium; YA:Yaounde Authentication

**Table 2.** Acetylcholinesterase (AChE) and 15-lipoxygenase (15-LOX) inhibitory potential of some Cameroonian medicinal plants used traditionally to treat neurological disorders

Medicinal plant	Plant part used	AChE % Inhibition (at 200 µg/ml)	AChE IC <sub>50</sub> (µg/ml)	15-LOX % Inhibition (at 100 µg/mL)	15-LOX IC <sub>50</sub> (µg/mL)
<i>Acanthus montanus</i>	Leaves	34.29±3.26	> 200	56.91±6.24	96.60±4.40
<i>Ageratum conyzoides</i>	aerial part	60.22±4.75	<b>176.2±0.06</b>	76.36±3.23	58.97±0.69
<i>Alchornea laxiflora</i>	Leaves	36.02±0.81	> 200	54.58±2.39	90.42±0.42
<i>Voacanga Africana</i>	Bark	7.49±2.03	> 200	38.11±7.66	> 100
<i>Annona muricata</i>	Leaves	45.82±0.818	> 200	86.19±3.05	37.12±2.23
<i>Bidens pilosa</i>	Whole plant	34.29±1.63	> 200	85.82±1.71	41.63±2.10
<i>Dacryodes edulis</i>	bark	46.10±2.85	> 200	39.34±4.54	> 100
<i>Cola acuminata</i>	bark	25.93±0.40	> 200	-75.87±28.77	NA
<i>Crinum purpurascens</i>	bulbs	66.38± 1.58	<b>99.40±1.28</b>	69.34±7.21	67.94±5.56
<i>Croton macrostachyus</i>	root bark	40.05±1.63	> 200	42.22±2.32	> 100
<i>Emilia coccinea</i>	leaves	70.86±0.79	<b>150.40±1.43</b>	45.71±6.57	> 100
<i>Euphorbia hirta</i>	aerial part	28.53±0.81	> 200	83.87±4.61	38.10±2.45
<i>Ficus exasperata</i>	leaves	30.54±1.22	> 200	93.16±12.08	35.44±1.55
<i>Nicotiana tabacum</i>	leaves	42.93±3.26	> 200	93.63±2.00	36.51±0.29
<i>Piliostigma thonningii</i>	leaves	35.44±0.00	> 200	85.17±4.84	36.07±5.48
<i>Piliostigma thonningii</i>	bark	21.61±1.63	> 200	9.95±4.16	> 100
<i>Piper umbellatum</i>	leaves	59.38±0.39	<b>180.60±1.64</b>	70.73±8.89	45.88±5.63
<i>Polyscias fulva</i>	bark	45.24±0.81	> 200	17.94±0.66	> 100
<i>Senna alata</i>	leaves	39.76±4.48	> 200	32.70±3.80	> 100
<i>Spilanthes Africana</i>	flowers	38.61±1.22	> 200	44.67±5.15	> 100
<i>Vernonia guineensis</i>	rhizomes	8.93±1.63	> 200	13.51±5.91	> 100
<i>Annona muricata</i>	seeds	10.37±2.85	> 200	93.72±0.39	<b>30.43±1.40</b>
<i>Allanblackia floribunda</i>	leaves	37.17±3.26	> 200	19.90±3.36	> 100
<i>Annona senegalensis</i>	bark	8.79±0.51	> 200	-43.90±12.69	NA
<i>Annona senegalensis</i>	leaves	35.89±2.59	> 200	77.54±0.42	39.02±11.54
<i>Draceana deisteliana</i>	leaves	28.93±1.03	> 200	85.86±1.65	40.22±2.56
<i>Ocimum gratissimum</i>	leaves	36.26±2.07	> 200	86.00±1.35	35.22±1.88
<i>Erythrina senegalensis</i>	bark	67.39±1.55	<b>166.20±2.98</b>	-16.48±14.35	NA
<i>Anthocleista swainfurthii</i>	bark	41.75±0.51	> 200	-74.46±3.70	NA
Galanthamine		92.99±0.39	24.65±2.12***	ND	ND
Quercetin		ND	ND	93.07±8.39	16.14±1.15*

Results are represented as mean ± standard deviation, n = 3. ND: not determined, NA: Not active. Significant difference \* (p<0.05); \*\*\*(p<0.001) compare to positive control.

**Table 3.** Nitric oxide inhibitory activities of plant extracts on LPS-activated RAW 264.7 macrophages and their percentage of viability after 24 hours of incubation.

Medicinal plant	Plant part used	NO ( $\mu\text{M}$ )	% NO inhibition (at 100 $\mu\text{g/mL}$ )	% viability (at 100 $\mu\text{g/mL}$ )	NO $\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
<i>Acanthus. Montanus</i>	leaves	0.65 $\pm$ 0.11	94.35 $\pm$ 1.01	74.60 $\pm$ 16.29	22.73 $\pm$ 5.19
<i>Ageratum conyzoides</i>	aerial part	2.91 $\pm$ 0.22	84.71 $\pm$ 1.16	95.96 $\pm$ 1.04	35.14 $\pm$ 0.31
<i>Alchornea laxiflora</i>	leaves	6.07 $\pm$ 0.31	68.10 $\pm$ 1.64	75.39 $\pm$ 2.43	66.57 $\pm$ 4.01
<i>Voacanga Africana</i>	bark	13.76 $\pm$ 0.05	27.70 $\pm$ 0.27	119.55 $\pm$ 1.44	> 100
<i>Annona muricata</i>	leaves	4.44 $\pm$ 0.11	76.67 $\pm$ 0.61	67.63 $\pm$ 2.29	51.59 $\pm$ 2.46
<i>Bidens pilosa</i>	whole plant	5.55 $\pm$ 0.15	70.81 $\pm$ 0.82	91.93 $\pm$ 3.74	51.05 $\pm$ 0.82
<i>Dacryodes edulis</i>	bark	5.47 $\pm$ 0.02	72.51 $\pm$ 0.13	103.13 $\pm$ 5.20	49.16 $\pm$ 2.39
<i>Cola acuminata</i>	bark	17.06 $\pm$ 0.05	14.35 $\pm$ 0.26	124.46 $\pm$ 5.58	> 100
<i>Crinum purpurascens</i>	bulbs	0.73 $\pm$ 0.18	<b>96.31<math>\pm</math>0.91</b>	48.10 $\pm$ 0.08	<b>12.08<math>\pm</math>1.68</b>
<i>Croton macrostachyus</i>	root bark	1.48 $\pm$ 0.02	92.52 $\pm$ 0.13	96.20 $\pm$ 1.30	24.85 $\pm$ 0.99
<i>Emilia coccinea</i>	Leaves	8.15 $\pm$ 0.22	56.51 $\pm$ 1.18	83.78 $\pm$ 9.22	99.41 $\pm$ 5.09
<i>Euphorbia hirta</i>	aerial part	8.18 $\pm$ 0.31	56.36 $\pm$ 1.66	62.96 $\pm$ 0.44	88.98 $\pm$ 9.52
<i>Ficus exasperata</i>	Leaves	9.83 $\pm$ 0.14	47.56 $\pm$ 0.76	102.96 $\pm$ 0.85	> 100
<i>Nicotiana tabacum</i>	Leaves	7.85 $\pm$ 0.31	58.14 $\pm$ 1.66	95.82 $\pm$ 2.52	95.01 $\pm$ 12.14
<i>Piliostigma thonningii</i>	Leaves	5.03 $\pm$ 0.30	73.14 $\pm$ 1.59	92.72 $\pm$ 2.01	51.98 $\pm$ 1.40
<i>Piliostigma thonningii</i>	Bark	10.80 $\pm$ 0.22	44.41 $\pm$ 1.14	111.95 $\pm$ 9.03	> 100
<i>Piper umbellatum</i>	Leaves	4.87 $\pm$ 0.13	74.92 $\pm$ 0.67	84.51 $\pm$ 1.74	46.19 $\pm$ 1.12
<i>Polyscias fulva</i>	Bark	9.60 $\pm$ 0.24	50.58 $\pm$ 1.27	115.77 $\pm$ 3.43	111.77 $\pm$ 10.85
<i>Senna alata</i>	leaves	6.97 $\pm$ 0.09	64.82 $\pm$ 0.46	124.36 $\pm$ 10.42	64.93 $\pm$ 1.42
<i>Spilanthes Africana</i>	flowers	8.39 $\pm$ 0.06	57.65 $\pm$ 0.32	108.84 $\pm$ 1.54	78.03 $\pm$ 8.89
<i>Vernonia guineensis</i>	rhizomes	9.97 $\pm$ 0.28	49.69 $\pm$ 1.44	107.36 $\pm$ 4.66	> 100
<i>Annona muricata</i>	seeds	3.10 $\pm$ 0.52	84.31 $\pm$ 2.63	106.17 $\pm$ 7.73	40.25 $\pm$ 2.49
<i>Allanblackia floribunda</i>	leaves	1.05 $\pm$ 0.01	90.82 $\pm$ 0.11	71.62 $\pm$ 4.03	37.55 $\pm$ 1.80
<i>Annona senegalensis</i>	bark	8.46 $\pm$ 0.22	57.63 $\pm$ 0.61	117.15 $\pm$ 16.82	86.77 $\pm$ 7.54
<i>Annona senegalensis</i>	leaves	0.85 $\pm$ 0.03	92.59 $\pm$ 0.33	70.14 $\pm$ 7.30	33.83 $\pm$ 2.34
<i>Draceana deisteliana</i>	leaves	10.81 $\pm$ 0.14	46.34 $\pm$ 0.71	95.94 $\pm$ 4.46	> 100
<i>Ocimum gratissimum</i>	leaves	10.54 $\pm$ 0.52	47.67 $\pm$ 2.58	126.04 $\pm$ 1.52	> 100
<i>Erythrina senegalensis</i>	bark	1.57 $\pm$ 0.13	92.17 $\pm$ 0.64	55.34 $\pm$ 0.97	33.58 $\pm$ 1.08
<i>Anthocleista sweinfurthii</i>	bark	6.36 $\pm$ 0.05	44.77 $\pm$ 0.45	86.79 $\pm$ 3.64	> 100
<b>Quercetin</b>		0.47 $\pm$ 0.00	97.66 $\pm$ 0.00	67.85 $\pm$ 3.64	6.59 $\pm$ 0.87**

Results are represented as means  $\pm$  standard deviation, n = 3. Significant difference \*(p<0.01); compare to quercetin (positive control).

**Table 4.** Antioxidant activities and inhibitory concentrations (IC<sub>50</sub>) values of plant extracts

Medicinal plant	Plant part used	DPPH radical scavenging activity IC <sub>50</sub> (µg/mL)	Total antioxidant capacity at 100µg/ml (mg AAE/g)	Reducing power ability (Absorbance at 700 nm)	Lipid Peroxidation IC <sub>50</sub> (µg/mL)
<i>Acanthus montanus</i>	leaves	> 100	198.18±0.42	0.134±0.024	> 100
<i>Ageratum conyzoides</i>	Aerial part	> 100	200.60± 5.99	0.149±0.002	> 100
<i>Alchornea laxiflora</i>	leaves	38.02±1.74 <sup>***</sup>	296.96±2.99	0.501±0.007	<b>3.20±0.10<sup>ns</sup></b>
<i>Voacanga Africana</i>	bark	71.10±2.57 <sup>***</sup>	165.75±6.21	0.436±0.014	> 100
<i>Annona muricata</i>	leaves	91.04±4.55 <sup>***</sup>	254.54±2.57	0.276±0.014	> 100
<i>Bidens pilosa</i>	whole plant	49.49±2.76 <sup>***</sup>	344.84±0.85	0.454±0.002	> 100
<i>Dacryodes edulis</i>	bark	36.57±2.87 <sup>***</sup>	<b>385.15±3.64</b>	<b>0.516±0.002</b>	<b>6.60±2.77<sup>ns</sup></b>
<i>Cola acuminata</i>	bark	22.35±0.27 <sup>***</sup>	289.09±2.57	<b>0.620±0.037</b>	<b>9.50±0.04<sup>**</sup></b>
<i>Crinum purpurascens</i>	bulbs	> 100	191.51±1.28	0.200±0.009	39.60± 1.97 <sup>***</sup>
<i>Croton macrostachyus</i>	Root bark	> 100	257.57±4.71	0.169±0.015	59.80±3.81 <sup>***</sup>
<i>Emilia coccinea</i>	Leaves	> 100	203.63±1.28	0.22±0.009	> 100
<i>Euphorbia hirta</i>	Aerial part	> 100	268.48±4.28	0.273±0.096	> 100
<i>Ficus exasperata</i>	Leaves	> 100	292.72±5.57	0.183±0.009	> 100
<i>Nicotiana tabacum</i>	Leaves	> 100	249.39±2.78	0.342±0.007	> 100
<i>Piliostigma thonningii</i>	Leaves	> 100	253.33±0.85	0.354±0.00	> 100
<i>Piliostigma thonningii</i>	Bark	40.05±3.48 <sup>***</sup>	350.60±3.64	0.571±0.032	68.10±2.40 <sup>***</sup>
<i>Piper umbellatum</i>	Leaves	63.30±2.13 <sup>***</sup>	335.75±5.99	0.391±0.118	53.50±3.32 <sup>***</sup>
<i>Polyscias fulva</i>	Bark	56.74±0.61 <sup>***</sup>	346.36±4.49	0.566±0.012	> 100
<i>Senna alata</i>	Leaves	95.35±1.43 <sup>***</sup>	290.60±2.78	0.439±0.047	63.15±0.21 <sup>***</sup>
<i>Spilanthes Africana</i>	Flowers	> 100	210.90±4.71	0.284±0.007	> 100
<i>Vernonia guineensis</i>	Bark	> 100	295.15±0.42	0.311±0.003	> 100
<i>Annona muricata</i>	Seeds	> 100	193.93±3.85	0.162±0.015	> 100
<i>Allanblackia floribunda</i>	Leaves	> 100	149.39±0.64	0.220±0.031	> 100
<i>Annona senegalensis</i>	Bark	<b>7.40±0.00<sup>ns</sup></b>	318.19±8.44	<b>0.520±0.010</b>	29.20±2.61 <sup>***</sup>
<i>Annona senegalensis</i>	Leaves	48.04±0.10 <sup>***</sup>	135.41±18.26	0.512±0.004	> 100
<i>Draceana deisteliana</i>	Leaves	> 100	98.05±11.78	0.258±0.033	> 100
<i>Ocimum gratissimum</i>	Leaves	56.40±3.28 <sup>***</sup>	87.22±8.24	0.383±0.006	11.20±0.35 <sup>***</sup>
<i>Erythrina senegalensis</i>	Bark	<b>12.20±1.74<sup>ns</sup></b>	83.33±5.89	0.333±0.010	Nd
<i>Anthocleista sweinfurthii</i>	Bark	<b>11.03±0.51<sup>ns</sup></b>	192.22±7.85	0.532±0.022	> 100
Ascorbic acid		8.41±0.205	Nd	0.655±0.028	Nd
Trolox		Nd	Nd	Nd	4.35±0.00

Results are represented as means ± standard deviation, n = 3. Nd: Not determined. ns: not significant difference, \*\*: significant difference (p<0.001); \*\*\*: significant difference (p<0.0001) compare to standard (ascorbic acid and trolox).

**Table 5.** Phytochemical content (Total phenolics and total flavonoids) of plants extracts

Medicinal plants	Plants part used	Total phenolics (mg GAE/g extract)	Total flavonoids (mg QE/g extract)
<i>Acanthus montanus</i>	Leaves	25.30±1.49	1.45±0.12
<i>Ageratum conyzoides</i>	Aerial part	33.48 ± 1.92	1.57±0.08
<i>Alchornea laxiflora</i>	Leaves	<b>92.12±1.71</b>	3.92±0.55
<i>Voacanga Africana</i>	Bark	42.72±1.71	0.15±0.02
<i>Annona muricata</i>	Leaves	35.60±1.78	1.33±0.14
<i>Bidens pilosa</i>	Whole plant	75.45±1.28	<b>6.43±0.47</b>
<i>Dacryodes edulis</i>	Bark	85.45±7.71	0.27±0.00
<i>Cola acuminata</i>	Bark	<b>93.18±2.78</b>	0.50±0.01
<i>Crinum purpurascens</i>	Bulbs	27.87±4.71	0.76±0.04
<i>Croton macrostachyus</i>	Root bark	22.12±0.85	0.11±0.01
<i>Emilia coccinea</i>	Leaves	15.75±0.00	3.57±0.33
<i>Euphorbia hirta</i>	Aerial part	42.27±0.21	3.88±0.53
<i>Ficus exasperata.</i>	Leaves	13.93±0.42	1.98±0.35
<i>Nicotiana tabacum</i>	Leaves	24.54±3.42	1.48±0.26
<i>Piliostigma thonningii</i>	Leaves	36.51±1.92	5.02±0.56
<i>Piliostigma thonningii</i>	Bark	46.51±4.07	0.21±0.00
<i>Piper umbellatum</i>	Leaves	33.78±6.64	3.73±0.56
<i>Polyscias fulva</i>	Bark	62.12±1.71	0.47±0.00
<i>Senna alata</i>	Leaves	26.81±1.07	3.26±0.45
<i>Spilanthes Africana</i>	Flowers	36.06±3.42	2.78±0.38
<i>Vernonia guineensis</i>	Rhizomes	22.72±2.99	0.21±0.00
<i>Annona muricata</i>	Seeds	7.42±0.21	0.19±0.04
<i>Allanblackia floribunda</i>	Leaves	20.90±0.85	2.26±0.38
<i>Annona senegalensis</i>	Bark	<b>100±1.28</b>	2.95±0.01
<i>Annona senegalensis</i>	Leaves	90.45±0.21	3.46±0.00
<i>Draceana deisteliana</i>	Leaves	52.27±5.78	2.88±0.01
<i>Ocimum gratissimum</i>	Leaves	81.96±1.49	4.36±0.07
<i>Erythrina senegalensis</i>	Bark	85.90±0.21	3.69±0.01
<i>Anthocleista sweinfurthii</i>	Bark	<b>91.81±1.28</b>	2.67±0.00

Results are represented as means ± standard deviation, n = 3.  
GAE = gallic acid equivalents; QE = quercetin equivalents.

## Conclusions

The primary findings of this study suggest that all plants used in this study exhibited to some extent AChE inhibitory, anti-inflammatory and antioxidant properties. This result supports the use of these medicinal plants by traditional healers to improve memory loss or to treat neurological disorders. The extracts of *C. purpurascens*, *D. edulis* and *A. laxiflora* have promising potential to be valorised for use against neurodegenerative diseases. Therefore, the isolation of active compound(s) from these extracts

will help to identify the potent natural antioxidant, anti-inflammatory and AChEi compounds, which can be used in the near future to prevent and/or to treat neurodegenerative diseases.

## Abbreviations

AD: Alzheimer's disease; PD: Parkinson's disease; AChE: acetylcholinesterase; LPS: Lipopolysaccharide; MTT: Methyl thiazol tetrazolium; NO: Nitric oxide; LOX: Lipoxigenase; ROS:

Reactive Oxygen Species; DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; MDA: Malondialdehyde.

## Authors' Contribution

VLNN designed, carried out the experiment and wrote the manuscript; EMN carried out the cell culture and biochemical experiments. AFE contributed to plant collection and extraction. SNF, LJM and PFM supervised the work and provided the facilities for the study. All authors read the manuscript and approved the final version.

## Acknowledgments

The authors are grateful to the traditional healers for volunteering cheer the information about their rich heritage. Authors are thankful to the Cameroon National Herbarium for identification of plants. This research was supported by the African Intellectual Property Organization (OAPI) (Grant N°48/14).

## Conflict of interest

The authors declare that they have no competing interests.

## Article history:

Received: 11 September 2019

Received in revised form: 10 October 2019

Accepted: 12 October 2019

Available online: 13 October 2019

## References

- Elujoba AA, Odeleye O. M., Ogunyemi C. M. Traditional medicine development for medical and dental primary health care delivery system in Africa. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 2005; 2(1):46-61.
- Kantati YT, Kodjo KM, Dogbeavou KS, Vaudry D, Leprince J, Gbeassor M. Ethnopharmacological survey of plant species used in folk medicine against central nervous system disorders in Togo. *J Ethnopharmacol*. 2016; 181:214-220.
- Bum EN, Taiwe GS, Moto FCO, Ngoupaye GT, Vougat RRN, Sakoue VD, Gwa C, Ayissi ER, Dong C, Rakotonirina A, et al. Antiepileptic Medicinal Plants used in Traditional Medicine to Treat Epilepsy. In: *Clinical and Genetic Aspects of Epilepsy*. Edited by Afawi Z. Rijeka: InTech; 2011: Ch. 08.
- Niranjan R. The role of inflammatory and oxidative stress mechanisms in the pathogenesis of Parkinson's disease: focus on astrocytes. *Mol Neurobiol*. 2014; 49(1):28-38.
- Singh S. Antioxidants as a preventive therapeutic option for age related neurodegenerative diseases. *Ther Targets Neurolog Dis*. 2015; 2:e592.
- Pagano G, Rengo G, Pasqualetti G, Femminella GD, Monzani F, Ferrara N, Tagliati M. Cholinesterase inhibitors for Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psych*. 2015; 86(7):767-773.
- Anand R, Gill KD, Mahdi AA. Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future. *Neuropharmacol*. 2014, 76, Part A: 27-50.
- Bishara D, Sauer J, Taylor D. The pharmacological management of Alzheimer's disease. *Prog Neurolo Psych*. 2015; 19(4):9-16.
- Henderson EJ, Lord SR, Brodie MA, Gaunt DM, Lawrence AD, Close JCT, Whone AL, Ben-Shlomo Y. Rivastigmine for gait stability in patients with Parkinson's disease (ReSPonD): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Neurolo*. 2016; 15(3):249-258.
- Mukherjee PK, Kumar V, Mal M, Houghton P.J. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomed*. 2007; 14:289-300.
- Čolović MB, Krstić DZ, Lazarević-Pašti TD, Bondžić AM, Vasić VM: Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Curr Neuropharmacol*. 2013; 11(3):315-335.
- Prakash A, Kalra J, Mani V, Ramasamy K, Majeed ABA. Pharmacological approaches for Alzheimer's disease: neurotransmitter as drug targets. *Expert Rev of Neurotherap*. 2015; 15(1):53-71.
- Hirsch EC, Vyas S, Hunot S. Neuroinflammation in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2012; 18.
- Chen Z, Zhong C. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurosci Bull*. 2014; 30(2):271-281.
- Diana Gallego, Rojas M, Orozco C. Free Radicals, Neuronal Death and Neuroprotection, Neurodegenerative Diseases - Processes, Prevention, Protection and Monitoring. Dr Raymond Chuen-Chung Chang (Ed), ISBN: 978-953-307-485-6, InTech, 2011.
- Hwang O. Role of oxidative stress in Parkinson's disease. *Exp Neurobiol*. 2013; 22(1):11-17.
- Gandhi S, Abramov A.Y. Mechanism of Oxidative Stress in Neurodegeneration. *Oxi Med Cell Longevity*. 2012; Article ID 428010:11 pages.
- Zhao Y, Zhao B. Oxidative Stress and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Oxi Med Cell Longevity*. 2013; Article ID 316523; 10 pages.
- Elena CI, Annalisa L., Cecilia C., Daniele O., Giulia R., Michelangelo M., S. G. Oxidative Stress Treatment for Clinical Trials in Neurodegenerative Diseases. *J Alzheimer's Dis*. 2011; 24:111-126.
- Madeo J, Elsayad C. The Role of Oxidative Stress in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis Parkinsonism*. 2013; 3(2):116.
- Kuete V, Efferth T. Cameroonian medicinal plants: pharmacology and derived natural products. *Front Pharmacol*. 2010; 1(Article 123).
- Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Feather-stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*. 1961; 7.
- Adewusi EA, Fouche G, Steenkamp V. Antioxidant, acetylcholinesterase inhibitory activity and cytotoxicity assessment of the crude extracts of *Boophae disticha*. *Afr J Pharmacol Ther*. 2012; 1(3):78-83.
- Mu MM, Chakravorty D, Sugiyama T, Koide N, Takahashi K, Mori I, Yoshida T, Yokochi T. The inhibitory action of quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 macrophage cells. *J Endotoxin Res*. 2001; 7(6):431-438.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunolog Meth*. 1983; 65(1):55-63.
- Dzoyem JP, Eloff JN. Anti-inflammatory, anticholinesterase and antioxidant activity of leaf extracts of twelve plants used traditionally to alleviate pain and inflammation in South Africa. *J Ethnopharmacol*. 2015; 160:194-201.
- Magama S, Lieta M.I., Asita AO: Antioxidant and free radical scavenging properties of four plant species used in traditional medicine in Lesotho. *Int J Med Plant Res* 2013; 2(3):170-178.
- Moyo M., Ndhlala A.R., Finnie J.F., Van Staden J. Phenolic composition, antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities of *Sclerocarya birrea* and *Harpephyllum caffrum* (Anacardiaceae) extracts. *Food Chem*. 2010; 123:69-76.
- Asaduzzaman M., Uddin M., Kader M., Alam A., Rahman A.A., Rashid M., Kato K., Tanaka T., Takeda M., Sadik G. In vitro acetylcholinesterase inhibitory activity and the antioxidant properties of *Aegle marmelos* leaf extract: implications for the treatment of Alzheimer's disease. *Psychogeriatrics*. 2014; 14(1):1-10.
- Singleton V.L., Rossi J.A.: Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic*. 1965; 16.
- Eckert G.P.. Traditional used plants against cognitive decline and Alzheimer disease. *Front Pharmacol*. 2010; 1(138):1-10.



32. Dastmalchi K., Dorman H.J.D., Vuorela H., Hiltunen R. Plants as potential sources for drug development against Alzheimer's disease. *Int J Biomed Pharm Sci.* 2007; 1(2): 83-104.
33. Calderon A.I., Cubilla M., Espinosa A., Gupta M.P. Screening of plants of Amaryllidaceae and related families from Panama as sources of acetylcholinesterase inhibitors. *Pharm Biol.* 2010; 48(9): 988-993.
34. Ding Y., Qu D., Zhang K., Cang X., Kou Z., Xiao W., Zhu J. Phytochemical and biological investigations of Amaryllidaceae alkaloids: a review. *J Asian Nat Prod Res.* 2017. 19(1):53-100.
35. Marston A., Van der Westhuizen J., Zietsman P. Investigation of South African Amaryllidaceae for inhibitors of acetylcholinesterase. *Planta Med.* 2009. 75(09): PC20.
36. Abou-Donia A.H., Shawky E.A., El-Din M.M.M., Takayama H., El Din A.A.S. Bio-guided isolation of acetylcholinesterase inhibitory alkaloids from the bulbs of *Crinum bulbispermum*. *Nat Prod: An Indian J.* 2012; 8(3):107-114.
37. Elgorashi E., Stafford G., Van Staden J. Acetylcholinesterase enzyme inhibitory effects of amaryllidaceae alkaloids. *Planta Med.* 2004; 70(3):260-262.
38. Houghton P.J., Agbedahunsi J.M., Adegbulugbe A. Choline esterase inhibitory properties of alkaloids from two Nigerian *Crinum* species. *Phytochemistry.* 2004; 65(21):2893-2896.
39. Martha Perez Gutierrez R., Maria Neira Gonzalez A., Hoyo-Vadillo C. Alkaloids from piper: a review of its phytochemistry and pharmacology. *Mini Rev Med Chem.* 2013; 13(2):163-193.
40. Ndam L., Mih A., Fongod A., Tening A., Tonjock R., Enang J., Fujii Y. Phytochemical screening of the bioactive compounds in twenty (20) Cameroonian medicinal plants. *Int J Curr Microbiol App Sci.* 2014; 3(12): 768-778.
41. Togola A., Astarheim I., Theis A., Diallo D., Paulsen B.S. Ethnopharmacological uses of *Erythrina senegalensis*: a comparison of three areas in Mali, and a link between traditional knowledge and modern biological science. *J. Ethnobiol Ethnomed.* 2008; 4(1):6.
42. Simplicio F.H., Abdou B.A., Abaïssou N., Hervé H., Lucy M.F., Annabel M.N., Nyenti S., Neh P., Acha A.E. Neuroprotective and memory improvement effects of a standardized extract of *Emilia coccinea* (SIMS) G. on animal models of anxiety and depression. *J Pharmacog Phytochem.* 2014; 3(3):146-154.
43. Shakir T., Coulibaly A.Y., Kehoe P.G. An exploration of the potential mechanisms and translational potential of five medicinal plants for applications in Alzheimer's disease. *Am J Neurodegener Dis.* 2013; 2(2):70-88.
44. Biradar S., Joshi H.K. Psychopharmacological investigations on the benefits of *Ageratum conyzoides* in the modulation of neurodegenerative disorder of Alzheimer's type. *Int J Green Pharm (IJGP).* 2011; 5(3).
45. Yuste J.E., Tarragon E., Campuzano C.M., Ros-Bernal F. Implications of glial nitric oxide in neurodegenerative diseases. *Front Cell Neurosci.* 2015; 9(322).
46. Yang E-J., Yim E-Y., Song G., Kim G-O., Hyun C-G. Inhibition of nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 macrophages by Jeju plant extracts. *Interdisciplinary Toxicol.* 2009; 2(4): 245-249.
47. Joo T., Sowndhararajan K., Hong S., Lee J., Park S-Y., Kim S., Jhoo J-W. Inhibition of nitric oxide production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells by stem bark of *Ulmus pumila* L. *Saudi J Biol Sci.* 2014; 21(5): 427-435.
48. Owona B.A., Njajou N.F., Laufer S., Moundipa P.F., Schluesener H.J. A fraction of stem bark extract of *Entada africana* suppresses lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW 264.7 cells. *J Ethnopharmacol.* 2013; 149(1):162-168.
49. Eleftheriadis N., Poelman H., Leus N.G.J., Honrath B., Neochoritis C.G., Dolga A., Dömling A., Dekker F.J. Design of a novel Thiophene Inhibitor of 15-Lipoxygenase-1 with both Anti-inflammatory and Neuroprotective Properties. *Eur J Med Chem.* 2016; 122:786-801.
50. Van Leyen K., Arai K., Jin G., Kenyon V., Gerstner B., Rosenberg P.A., Holman T.R., Lo E.H. Novel Lipoxygenase Inhibitors as Neuroprotective Reagents. *J Neurosci Res.* 2008; 86(4): 904-909.
51. Praticó D., Sung S. Lipid Peroxidation and Oxidative imbalance: Early functional events in Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis.* IOS Press 2004; 6: 171-175
52. Butterfield D.A., Lauderback C.M. Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's Disease brain. Potential causes and consequences involving Amyloid  $\beta$  peptide associated free radical oxidative stress. *Free Rad Biol Med.* 2002; 32(11): 1050 -1060.
53. Dimitrios B. Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends Food Sci Technol.* 2006; 17:505-512.
54. Ogunlade I., Awosanmi I.A., Osukoya O.A. Antioxidant activity and total phenolic content of some nuts commonly consumed in South-Western Nigeria. *J Phytopharmacol.* 2014; 3(4):248-253.
55. Oboh G., Akinyemi A.J., Omojokun O.S., Oyeleye I.S. Anticholinesterase and antioxidative properties of aqueous extract of *Cola acuminata* seed in vitro. *Int J Alzheimer's Dis.* Vol. 2014, Article ID 498629, 8 pages, 2014.
56. Lowe H.I., Watson C.T., Badal S., Peart P., Toyang N.J., Bryant J. Promising efficacy of the *Cola acuminata* plant: a mini review. *Adv Biol Chem.* 2014; 4:240-245
57. Jitin Ahuja, J. Suresh, A. Deep, Madhuri, Pratyusha, Ravi. Phytochemical Screening of Aerial Parts of *Artemisia parviflora* Roxb.: A medicinal plant. *Der Pharmacia Lett.* 2011; 3 (6):116-124.
58. Costa S.L., Silva V.D.A., dos Santos Souza C., Santos C.C., Paris I., Muñoz P., Segura-Aguilar J. Impact of plant-derived flavonoids on neurodegenerative diseases. *Neurotox Res.* 2016; 30(1): 41-52.



Published in final edited form as:

*Clin Pharmacol Transl Med.* 2019 ; 3(1): 125–133.

## Protective Effects of Crude Plant Extracts against Aminochrome-induced toxicity in Human Astrocytoma Cells: Implications for Parkinson's Disease

Viviane L. Ndam Ngougoure<sup>1,2,\*</sup>, Patricia Muñoz<sup>2</sup>, Yousef Tizabi<sup>3</sup>, Raul Valdes<sup>2</sup>, Paul Fewou Moundipa<sup>1</sup>, and Juan Segura-Aguilar<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Pharmacology and Toxicology, Department of Biochemistry, Faculty of Sciences, University of Yaoundé I, Cameroon.

<sup>2</sup>Department of Molecular & Clinical Pharmacology, Faculty of Medicine, ICBM, University of Chile, Santiago, Chile.

<sup>3</sup>Department of Pharmacology, Howard University College of Medicine, 520 W Street NW, Washington, DC 20059, USA.

### Abstract

**Background/Aims:** Aminochrome, an endogenous compound formed during dopamine oxidation can induce neurotoxicity under certain aberrant conditions and induce Parkinson-like syndrome. Glutathione transferase M2 (GSTM2) activity of astrocytes by catalysing the conjugation of aminochrome with glutathione, can offer protection against aminochrome toxicity. Some medicinal toxicity through this plants may exert protective effect against aminochrome mechanism.

**Methods:** In the present study, extracts from plants native to Cameroon, such as *Alchornea laxiflora* (leaves), *Dacryodes edulis* (barks), *Annona muricata* (seeds), *Annona senegalensis* (barks) were evaluated for their protection against aminochrome-induced toxicity in human glioblastoma/ astrocytoma U373MG wild type and U373MGsiGT6 cells in which GSTM2 expression was 74% silenced. The cells were pre-incubated with the plant extracts for 2 hr before addition of aminochrome (75  $\mu$ M) and measurement of cell death/viability by flow cytometry after 24 hr incubation.

**Results:** The extract of *A. laxiflora* (1  $\mu$ g/ml), *D. edulis* (25  $\mu$ g/ml), *A. muricata* (25  $\mu$ g/ml) and *A. senegalensis* (25 $\mu$ g/ml) significantly decreased aminochrome-induced toxicity in U373siGST6 and U373MG cells. However, only *A. laxiflora* and *A. muricata* significantly increased the mitochondria membrane potential in U373siGST6 cells following aminochrome treatment.

**Conclusion:** The results indicate that extracts of some Cameroon plants can provide protection against aminochrome-induced toxicity and mitochondria dysfunction in human glioblastoma/ astrocytoma cells. Although further identification of active components of these extracts is needed, potential usefulness of these compounds in Parkinson's disease may be suggested.

\*Address for Correspondence: Viviane L. Ndam Ngougoure, Laboratory of Pharmacology and Toxicology, Department of Biochemistry, Faculty of Sciences, The University of Yaounde, P.O.BOX 812 Yaounde; Tel: 00 (+237) 699026054; ndamlaure5@yahoo.fr.



## Keywords

Aminochrome; Medicinal Plants; U373MG cells; Neurotoxicity; Neuroprotection; Mitochondria Dysfunction.

---

## Introduction

Parkinson's disease (PD) is the second most common progressive neurodegenerative disorder after Alzheimer's disease [1]. It is characterized primarily by progressive degeneration of dopaminergic neurons containing neuromelanin in the substantia nigra pars compacta, which ultimately result in motor symptoms such as resting tremor, rigidity, bradykinesia and postural instability [2]. The most common drug used for PD is levodopa (L-dopa), a dopamine precursor, which increases dopamine levels in the brain and alleviates the symptoms. However, this drug has many side effects and loses its effectiveness in few years [3]. Hence, more novel therapies are needed.

Several cellular models of PD including exposure to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), rotenone and the 6-hydroxydopamine (6-OHDA) are commonly used [4]. However, these drugs induce a rapid loss of dopaminergic cells in vitro [5], whereas the symptoms of Parkinsonism in humans may take up to years following nigral degeneration [6]. Moreover, in-vitro protection against these toxins does not necessarily translate into effective pharmacotherapy in PD [7, 8]. Dopamine oxidation to o-quinones appears to be a natural process as it accumulates with age [9]. However, under certain conditions, the o-quinones formed during dopamine oxidation, result in neurotoxicity through mitochondria dysfunction, formation and stabilization of neurotoxic protofibrils of alpha synuclein, protein degradation, dysfunction of both proteasomal and lysosomal systems, neuroinflammation, endoplasmic reticulum stress and oxidative stress [10, 11].

Astrocytes, the most abundant cells in the central nervous system (CNS), play an important role in the maintenance of neuronal activity through release of neurotrophic factors, maintenance of ion gradients such as extracellular  $K^+$  and construction of the blood-brain barrier [12]. Studies suggest that neurotrophic mechanism has a powerful ability to protect degenerating dopamine neurons as well as promoting regeneration of the nigrostriatal dopamine system. Dopamine that is released during neurotransmission is removed from the synaptic cleft and back to the neuron by dopamine transporters. However, the synaptic terminals of dopaminergic neurons are surrounded by other neurons and astrocytes, which are also able to take up dopamine. In astrocytes, dopamine may be converted to aminochrome, but the astrocytes via their glutathione transferase M2 (GSTM2) are capable of catalysing the conjugation of aminochrome with glutathione and hence prevent aminochrome toxicity [13, 14, 15].

The search for novel therapeutic approaches targeting the presumed pathogenic mechanisms has been a major focus of research and it is expected that novel medications with disease-modifying properties will emerge from these efforts in the future. Medicinal plants were the first method of treating diseases in ancient world and are still an important part of various cultures. In Africa, despite widespread use of modern medicines, a high proportion of the

rural people still use traditional medicines for health purposes and the plants used are potential source for drug development [16]. Cameroonian medicinal plants have been screened for a number of bioactive compounds including polyphenols, alkaloids, sterols, tannins, and triterpenes [17], which possess a wide spectrum of pharmacological activities. Moreover, some studies have shown that medicinal plants containing polyphenols have anti-oxidant and neuroprotective effects [18, 19] and may represent a potential source for drug development against PD.

In this perspective, an ethno pharmacological survey carried out in the Noun Division (western region of Cameroon) allowed identification of some medicinal plants where voucher specimens were deposited at the National Herbarium of Cameroon (Yaoundé). Preliminary experiments suggested that the methylene chloride-methanolic extracts of some of these plants contain considerable phenolic and flavonoids compounds with significant antioxidant and anti-inflammatory activities. Since oxidative stress and inflammation have been strongly implicated in the pathogenesis of PD, we hypothesized that some of these extracts will be capable of protecting the astrocytes against aminochrome toxicity.

## Materials and Methods

### Description of Cell Lines

A human glioblastoma astrocytoma (U373MG) is a cell line derived from a malignant tumour by explant technique. Two cell lines were used in this study: U373MG as the wild-type and U373MGsiGT6, in which GSTM2 expression is 74% silenced by siRNA.

### Chemicals and Reagents

For viability/cytotoxicity analysis we used calcein AM (Invitrogen, Carlsbad, CA) and propidium iodide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Dopamine and tyrosinase were also purchased from Sigma- Aldrich. MitoProbe™ JC-1 Assay Kit for Flow Cytometry was purchased from Molecular Probes (Eugene, OR).

### Plant collection and Preparation of Extracts

Different parts of plants (leaves, barks and seeds) were collected in the locality of Foubot (Noun Division, West Region, Cameroon). These plants are used by traditional healers to improve memory loss or to treat some neurological/neuropsychiatric disorders such as epilepsy, headaches, depression, anxiety, migraine, convulsion and schizophrenia [See Table 1]. The different parts of plants collected were washed with distilled water and dried at room temperature for several weeks. The dried materials were powdered using a grinder. The powder obtained was kept at 4°C until the preparation of extracts. Hundred grams of powdered plant materials were soaked in 500 mL of solvent methylene chloride/methanol (1:1; v/v) for 48 hours. The final extracts were passed through Whatman N°1 filter paper and the filtrates obtained were concentrated under vacuum at low pressure on a rotary evaporator (RV10 Basic, IKA). The crude extracts obtained were stored at 4°C until further use.

## Evaluation of cytotoxicity of extracts plants

### Cell culture and treatment with extracts

The different cells lines (U373MG and U373MGsiGST6) were cultured at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> in the petri dishes in RPMI-1640 medium (ATCC, Manassas, VA) containing 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate, 4.5g/l glucose, and 1500 mg/l sodium bicarbonate, supplemented with 10% fetal bovine serum (Hyclone Fetalclone III) (Thermo Scientific, Waltham, MA), 10 U/ml sodium penicillin, 10 U/ml streptomycin sulfate, and amphotericin. One mL of a cell suspension ( $5 \times 10^6$  cells) was seeded in 24 well plates and the cells were incubated overnight at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> to allow attachment of the cells to the bottom of the plate. Then, after removing the medium using a suction pump, fresh media was added, and the cells were incubated with different concentrations (12.5, 25, 50 and 100 µg/mL) of the extracts dissolved in DMSO and further diluted in the culture medium for 24 hours.

### Cell death/viability assay by Flow Cytometry

Cell death/viability was measured by counting live and dead cells with flow cytometry apparatus (FACSCalibur, BD Biosciences, San Jose, CA), after staining with calcein AM and propidium iodide. These are fluorescent reagents that discriminate the population of live cells from the dead cells using 510-560 nm (excitation) and LP-590 nm (emission) for propidium iodide and 450-490 nm (excitation) and 515-565 nm (emission) for calcein AM. Calcein AM is a marker for live cells as these cells with intact membrane are distinguished by their ability to exclude propidium iodide (PI), which readily penetrates dead or damaged cells and intercalates into the DNA of these cells. Dual analysis was introduced using a quadrant dot plot, in which dead cells were identified as single PI-positive, live cells as calcein AM positive only, and cells in late apoptosis as double-positive for calcein AM and PI. Cells that stained negative for both calcein AM and PI were classified as live cells. Finally, the number of cells in each category was expressed as a percentage of the total number of stained cells.

## Evaluation of the protective effect of plant extracts against aminochrome toxicity

### Synthesis and Purification of Aminochrome

For synthesis of aminochrome, dopamine (7.5 mM) and 10 ng of tyrosinase were incubated in 25 mM potassium phosphate buffer pH 6 for 15-20 min at room temperature. For purification of aminochrome, the incubation solution was loaded on a CM-Sephadex C50-1000 (18 × 0.7 cm) column (Sigma-Aldrich) [20]. The red–orange solution corresponding to aminochrome was collected and detected spectrophotometrically by measuring the absorbance at 480 nm. Aminochrome concentration was determined by the molar extinction coefficient of  $3058 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Hence, concentration of aminochrome in micro molar = absorbance at 480 nm/molar extinction coefficient ×  $10^4$  [21].

## Cell culture and treatments

The different cell lines were cultured as described previously [22]. The cells were pre-incubated for 2 hours with the plant extracts dissolved in DMSO and further diluted in the culture medium before addition of aminochrome (final concentration: 75  $\mu$ M) or aminochrome alone (negative control). Nicotine, a protector against aminochrome toxicity, served as a positive control [12]. The concentration of aminochrome (75  $\mu$ M) was based on the previous study showing significant toxicity of this concentration after 24 h in the same cells lines [15]. After treatment, cell death/viability assay was measured as described previously.

## Evaluation of the effect of plant extracts on aminochrome-induced mitochondrial membrane-potential impairment

The evaluation of mitochondria membrane potential was done according to the MitoProbe™ JC-1 Assay Kit. The cells lines were treated as described above for 24 h at 37°C before analysis with flow cytometry apparatus (FACSCalibur, BD Biosciences, USA). The ratio of red to green fluorescence was determined.

## Statistical Analysis

All data are expressed as mean  $\pm$  SD values. Statistical significance was assessed using analysis of variance (ANOVA) for multiple comparisons. Post hoc test was conducted using to distinguish which groups differed specifically  $P < 0.05$  was set a priori as significant.

## Results

An initial study was performed using various concentrations of the plant extracts to determine an optimal (non-toxic) concentration of each extract. The human astrocytoma cell line U373MG and U373MGsiGST6 (U373MG cells expressing a siRNA against GSTM2 with only 26% of GSTM2 expression) were used. The incubation of these cells with higher concentrations of the extracts (e.g. 50  $\mu$ g/ml or 100  $\mu$ g/ml of *D. edulis*, *A. muricata*, *A. senegalensis*) for 24 hours induced significant cell death. However, at 12.5  $\mu$ g/ml or 25  $\mu$ g/ml no toxicity compared to control (DMSO at 0.2 %) was observed (Data not shown). *A. laxiflora*, on the other hand had no toxicity at 0.1 and 1.0  $\mu$ g/ml. Hence these lower concentrations were used in subsequent studies to determine potential protection against aminochrome-induced cell death and mitochondrial membrane potential impairments.

*A. Laxiflora* at both 0.1 and 1.0  $\mu$ g/ml caused significant protection in both U373MG and U373siGST6 cells. Thus, the toxicity and U373siGST6, respectively) was reduced by *A. Laxiflora* to (2.1% and 20.8%, respectively with 0.1  $\mu$ g/ml,  $P < 0.001$ ) and to (2.0% and 16.9%, respectively with 1.0  $\mu$ g/ml,  $P 0.001$ ) [Figure 1A and B]. We then measured the mitochondrial membrane potential using 1.0  $\mu$ g/ ml *A. laxiflora*. Whereas 75  $\mu$ M aminochrome caused significant reduction in membrane potential in both cell lines (0.55 and 0.32, respectively,  $P 0.001$ ), *A. laxiflora* caused significant increase in membrane potential in both cell lines (0.75 and 0.78, respectively,  $P < 0.05$  and  $P < 0.001$ ). Hence *A. laxiflora* at concentration of 1.0  $\mu$ g/ml protected against aminochrome induced impairments in mitochondrial membrane potential [Figure 1C and D].

*D. Edulis* at both 12.5 and 25 µg/ml caused significant protection in both U373MG and U373siGST6 cells. Thus, the toxicity induced by 75 µM aminochrome was reduced by *D. edulis* to (7.8% and 25.6%, respectively with 12.5 µg/ml,  $P<0.05$  -  $P<0.001$ ) and to (8.3% and 16.9%, respectively with 25 µg/ml,  $P<0.05$  -  $P<0.001$ ) (Figure 2A and B). In this case, however, no significant increase in mitochondrial membrane potential was observed following either concentration of *D. dulis* [Figure 2C and D].

*A. Muricata* at both 12.5 and 25 µg/ml caused significant protection in U373MG and/or U373siGST6 cells. Thus, the toxicity induced by 75 µM aminochrome was reduced by *A. muricata* to (9.8% and 17.9%, respectively with 12.5 µg/ml, NS (non-significant) and  $P<0.001$ ) and to (7.0% and 16.9%, respectively with 25 µg/ml,  $P<0.05$  -  $P<0.001$ ) [Figure 3A and B]. In this case, only the higher concentration of *A. muricata* caused a significant increase in mitochondrial membrane potential [Figure 3C and D].

*A. Senegalensis* at 12.5 and 25 µg/ml caused significant protection in U373siGST6 cells only. Thus, the toxicity induced by 75 µM aminochrome was reduced by *A. senegalensis* to (23.5% and 20.4%  $P<0.001$ ) [Figure 4A and B]. However, similar to *D. edulis* no effect on mitochondrial membrane potential was observed [Figure 4C and D].

## Discussion

The results of this study indicate that crude extracts of several native plants to Cameroon can protect against aminochrome-induced toxicity in intact human astrocytoma cells and astrocytomas that were depleted up to 74% from glutathione transferase M2. Since GSTM2 as endogenous enzyme can protect against aminochrome induced toxicity by conjugating it with glutathione, the results strongly suggest induced by 75 µM aminochrome (11.1% and 35.0% in U373MG and that the crude extracts of the plants may at least partially exert their protective property through enhancement of this enzyme. Thus, extracts of the 4 plants: *Alchornea laxiflora*, *Dacryodes edulis*, *Annona muricata* and *Annona senegalensis* were all effective in reducing aminochrome toxicity and since aminochrome has been implicated in PD pathology, the results further suggest potential utility of these plant extracts in PD.

It is of relevance to note that dopamine itself by causing oxidative stress, may in certain circumstances contribute to selective degeneration of dopaminergic neurons of the substantia nigra [23]. Hence, when there is an excess amount of cytosolic DA it can undergo auto-oxidation to generate reactive oxygen species (ROS). ROS by altering mitochondrial respiration can induce changes in the permeability of brain mitochondria and hence cause damage to the neuron [24]. The auto-oxidation of DA may also produce quinones that can be oxidized to aminochrome, whose redox-cycling leads to the generation of the superoxide radicals and ultimate accumulation of neuromelanin, which may cause considerable toxicity to substantia nigra neurons [11, 23-27]. This toxicity may be mediated via PD-related proteins, such as  $\alpha$ -synuclein and parkin, superoxide dismutase-2 (SOD2), inactivation of the DA transporter (DAT) and the rate limiting tyrosine hydroxylase (TH) enzyme as well as mitochondrial dysfunction [28].

As alluded to before, mitochondrial dysfunction is also closely related to increased ROS formation. Thus, complex I deficiencies of the respiratory chain in mitochondria account for the majority of neural apoptosis, which is considered a primary source of ROS in PD. Interestingly, enhanced production of ROS can inhibit complex I, resulting in a vicious cycle of positive feed forward mechanism. Moreover, oxidative phosphorylation, the main mechanism used by the mitochondria to form ATP can lead to formation of superoxide and hydrogen peroxide free radicals hence contributing to further disease progression [28, 29]. This scenario may account for the preferential cytotoxicity to the DA neurons by complex I inhibitors such as MPTP or rotenone [28]. In addition, ROS can interfere with elimination of damaged proteins leading to protein misfolding (e.g. generation of  $\alpha$ -synuclein) which is believed to play a key role in the pathology of PD [30].

Although potential interaction of the examined extracts with protein misfolding is yet to be investigated, our results do suggest interaction of at least one of the extracts, i.e. *Alchornea laxiflora* and to some extent the higher concentration of *Annona muricata* with mitochondrial function. Thus, these specific extracts reduced the damage to mitochondrial membrane potential brought about by aminochrome exposure. However, the extent to which this interaction might contribute to their protective mechanism is also subject to further elucidation.

It is also noteworthy that the compounds tested in our experimental model, in majority of cases did not fully reverse the damage induced by aminochrome. Hence, further purification of the active components and examination of combination treatments of such extracts with other established or novel drugs (e.g. nicotine) would be of significant merit [31].

## Conclusion

We conclude that crude extracts of several native plants to Cameroon such as *Alchornea laxiflora*, *Dacryodes edulis*, *Annona muricata* and *Annona senegalensis* can protect against aminochrome-induced toxicity in human astrocytoma cells. Moreover, two of these compounds (e.g. *Alchornea laxiflora* and *Annona muricata*) also prevented mitochondrial dysfunction induced by aminochrome. Further identification of the active components of these extracts and more detailed elucidation of their mechanism of action and potential utility in PD is warranted.

## Acknowledgements

This work was supported by the International Center for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB) [grant number S/CMR17-01](VNN); FONDECYT 1170033 (JSA) and NIH/NIAAA R03AA022479 (YT). The authors thank the Department of Molecular & Clinical Pharmacology, Faculty of Medicine, ICBM, University of Chile for providing the facilities to carry out this research.

## References

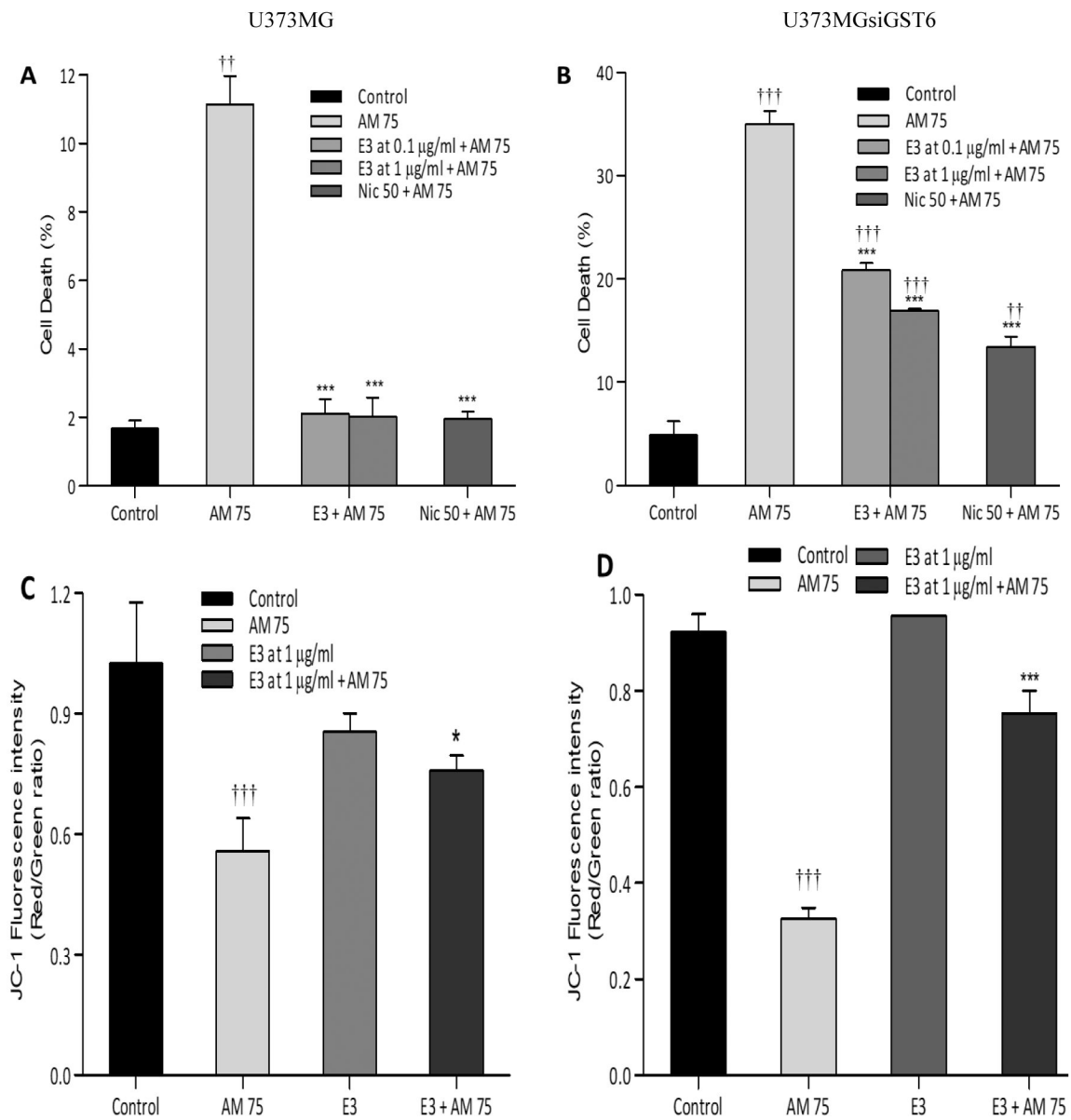
1. Rudnick DA, Davidson NO. Functional relationships between lipid metabolism and liver regeneration. *Int J Hepatol.* 2012; 549241. [PubMed: 22319652]
2. Wirdefeldt K, Adami H-O, Cole P, Trichopoulos D, Mandel J. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. *Eur J Epidemiol.* 2011, 26:S1–58. [PubMed: 21626386]



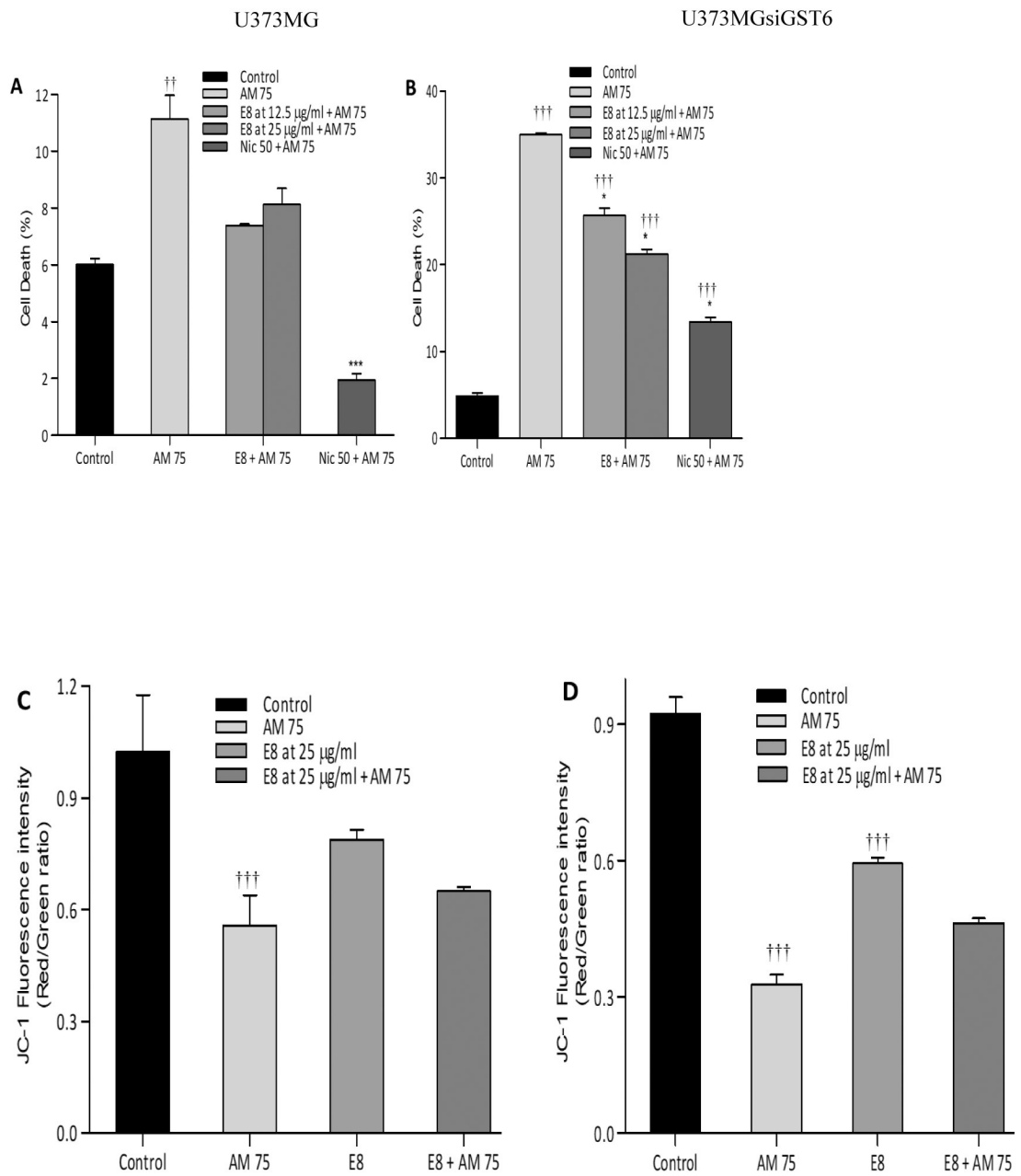
3. Dexter DT, Jenner P. Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. *Free Radic Biol Med.* 2013; 62: 132–144. [PubMed: 23380027]
4. Dorszewska J, Prendecki M, Lianeri M and Kozubski W. Molecular Effects of L-dopa Therapy in Parkinson's Disease. *Curr Genomics.* 2014; 15:11–17. [PubMed: 24653659]
5. Segura-Aguilar J. Neurotoxins as Preclinical Models for Parkinson's Disease. *Neurotox Res.* 2018; 34:870–877. [PubMed: 29313219]
6. Williams A. MPTP toxicity: clinical features. *J Neural Transm Suppl.* 1986; 20:5–9. [PubMed: 3489070]
7. Braak H, Ghebremedhin E, Rüb U, Bratzke H, Tredici K. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res.* 2004; 318: 121–134. [PubMed: 15338272]
8. Segura-Aguilar J, Paris I, Muñoz P. The need of a new and more physiological preclinical model for Parkinson's disease. *Cell Mol Life Sci.* 2016; 73: 1381–1382. [PubMed: 26803841]
9. Segura-Aguilar J. Can we conclude a potential therapeutic action for Parkinson's disease by using postmortem tissue and a preclinical model based on an exogenous neurotoxin? *Cell Death Dis.* 2018; 9:748. [PubMed: 29970885]
10. Zecca L, Fariello R, Riederer P, Sulzer D, Gatti A, Tampellini D. The absolute concentration of nigral neuromelanin, assayed by a new sensitive method, increases throughout the life and is dramatically decreased in Parkinson's disease. *FEES Letters* 2002; 510:216–220.
11. Segura-Aguilar J, Paris I. Mechanisms of Dopamine Oxidation and Parkinson's Disease In: *Handbook of Neurotoxicity.* Edited by Kostrzewa RM. New York, NY: Springer New York; 2014: 865–883.
12. Segura-Aguilar J. On the role of endogenous neurotoxins and neuroprotection in Parkinson's disease. *Neural Regen Res.* 2017; 12:897–901. [PubMed: 28761417]
13. Ben Haim L, Carrillo-de Sauvage M-A, Ceyzériat Kand Escartin C. Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases. *Front Cell Neurosci.* 2015; 9:278. [PubMed: 26283915]
14. Baez S, Segura-Aguilar J, Widersten M, Johansson AS, Mannervik B. Glutathione transferases catalyze the detoxication of oxidized metabolites (o-quinones) of catecholamines and may serve as an antioxidant system preventing degenerative cellular processes. *Biochem J.* 1997; 324:25–28. [PubMed: 9164836]
15. Segura-Aguilar J, Baez S, Widersten M, Welch CJ, Mannervik B. Human class Mu glutathione transferases, in particular isoenzyme M2-2, catalyze detoxication of the dopamine metabolite aminochrome. *J Biol Chem.* 1997; 272:5727–5731. [PubMed: 9038184]
16. Huenchuguala S, Muñoz P, Zavala P, Villa M, Cuevas C, Ahumada U, et al. Glutathione transferase mu 2 protects glioblastoma cells against aminochrome toxicity by preventing autophagy and lysosome dysfunction. *Autophagy.* 2014; 10:618–630. [PubMed: 24434817]
17. Elujoba AA, Odeleye OM, Ogunyemi CM. Traditional medicine development for medical and dental primary health care delivery system in Africa. *African Journal of Traditional, Complementary Alternative Medicines.* 2005; 2:46–61.
18. Kuete V, Efferth T. Cameroonian medicinal plants: pharmacology and derived natural products. *Front Pharmacol.* 2010; 1:123. [PubMed: 21833168]
19. Ebrahimi A, Schluesener H: Natural polyphenols against neurodegenerative disorders: Potentials and pitfalls. *Ageing Res Rev.* 2012; 11:329–345. [PubMed: 22336470]
20. Paris I, Perez-Pastene C, Cardenas S, Iturriaga-Vasquez P, Munoz P, Couve E, et al. Aminochrome induces disruption of actin, alpha- and beta-tubulin cytoskeleton networks in substantia-nigra derived cell line. *Neurotox Res.* 2010; 18: 82–92. [PubMed: 20087799]
21. Segura-Aguilar J, and Lind C. On the mechanism of the Mn3(b)-induced neurotoxicity of dopamine: prevention of quinone-derived oxygen toxicity by DT diaphorase and superoxide dismutase. *Chem Biol Interact.* 1989; 72:309–324. [PubMed: 2557982]
22. Muñoz P, Huenchuguala S, Paris I, Cuevas C, Villa M, Caviedes P, et al. Protective Effects of Nicotine Against Aminochrome-Induced Toxicity in Substantia Nigra Derived Cells: Implications for Parkinson's Disease. *Neurotox Res.* 2012; 22:177–180. [PubMed: 22528249]
23. Segura-Aguilar J, Paris I, Muñoz P, Ferrari E, Zecca L and Zucca FA. Protective and toxic roles of dopamine in Parkinson's disease. *J Neurochem.* 2014; 129: 898–915. [PubMed: 24548101]

24. Zucca FA, Basso E, Cupaioli FA, Ferrari E, Sulzer D, Casella L, et al. Neuromelanin of the human substantia nigra: an update. *Neurotox Res.* 2014; 25:13–23. [PubMed: 24155156]
25. Zucca FA, Segura-Aguilar J, Ferrari E, Muñoz P, Paris I, Sulzer D, et al. Interactions of iron, dopamine and neuromelanin pathways in brain aging and Parkinson's disease *Prog Neurobiol.* 2017; 155:96–119. [PubMed: 26455458]
26. Zucca FA, Vanna R, Cupaioli FA, Bellei C, De Palma A, Di Silvestre D, et al. Neuromelanin organelles are specialized autolysosomes that accumulate undegraded proteins and lipids in aging human brain and are likely involved in Parkinson's disease. *NPJ Parkinson's Disease.* 2018; 4:17.
27. Sulzer D, Cassidy C, Horga G, Kang UJ, Fahn S, Casella L, et al. Neuromelanin detection by magnetic resonance imaging (MRI) and its promise as a biomarker for Parkinson's disease. *NPJ Parkinson's Disease.* 2018; 4:11.
28. Blesa J, Trigo-Damas I, Quiroga-Varela A, Jackson-Lewis VR. Oxidative stress and Parkinson's disease. *Front Neuroanat.* 2015; 9:91. [PubMed: 26217195]
29. Segura-Aguilar J. Aminochrome as preclinic model for Parkinson's disease. *Oncotarget* 2017, 8:45036–45037. [PubMed: 28586763]
30. Schapira AHV, Cooper JM, Dexter D, Jenner P, Clark JB, and Marsden CD. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem.* 1990; 54: 823–827. [PubMed: 2154550]
31. Tizabi Y, Getachew B. Nicotinic Receptor Intervention in Parkinson's disease: Future Directions. *Clin Pharmacol Transl Med.* 2017; 1:14–19. [PubMed: 29863173]

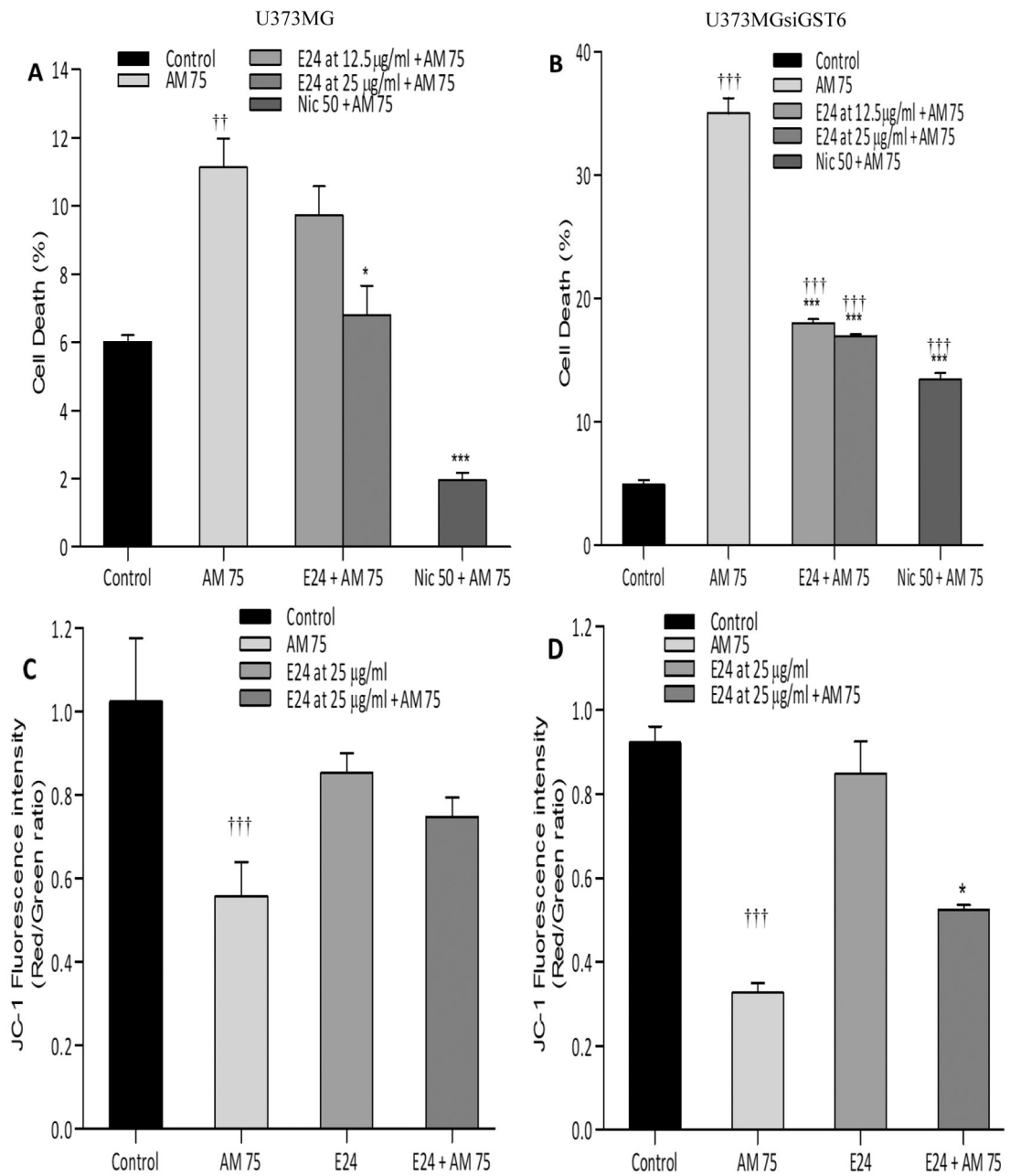




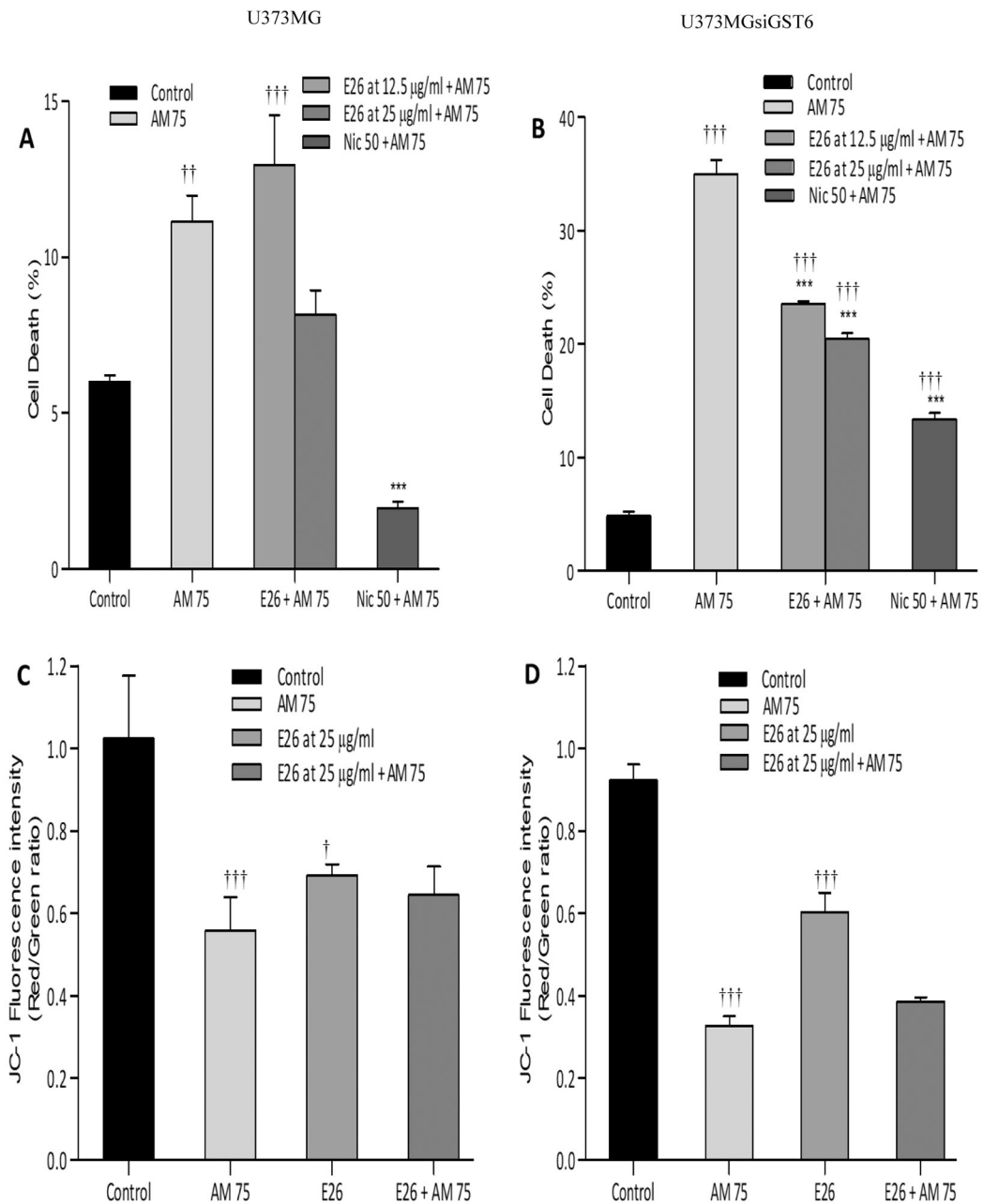
**Figure 1:** Effect of *Alchornea laxiflora* (E3) extracts on aminochrome-induced cell death (A: U373MG; B: U373MGsiGST6) and mitochondrial membrane- potential impairment (C: U373MG; D: U373MGsiGST6). The pre-incubation with 0.1 µg/ml and 1 µg/ml of *A. laxiflora* extracts for 2 hours significantly protected the cells against toxicity induced by aminochrome (AM 75 µM). The statistical significance was assessed using analysis of variance (ANOVA) for multiple comparisons (\* $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ) compared to AM 75 and († $P < 0.05$ ; ††† $P < 0.001$ ) compared to control (DMSO at 0.2%). Nic 50 (Nicotine at 50 µM was used as a positive control).



**Figure 2:** Effect of *Dacryodes edulis* (E8) extracts on aminochrome-induced cell death (A: U373MG; B: U373MGsiGST6) and mitochondrial membrane-potential impairment (C: U373MG; D: U373MGsiGST6). The statistical significance was assessed using analysis of variance (ANOVA) for multiple comparisons (\*\*\*)  $P < 0.001$  compared to AM 75 and (†††)  $P < 0.001$  compared to control (DMSO at 0.2%). Nic 50 (Nicotine at 50  $\mu$ M was used as a positive control).



**Figure 3:** Effect of *Knnona muricata* (E24) extracts on aminochrome-induced cell death (A: U373MG; B: U373MGsiGST6) and mitochondrial membrane-potential impairment (C: U373MG; D: U373MGsiGST6). The statistical significance was assessed using analysis of variance (ANOVA) for multiple comparisons (\*P 0.05; \*\*\*P< 0.001) compared to AM 75 and (††P 0.01; †††P 0.001) compared to control (DMSO at 0.2%). Nic 50 (Nicotine at 50 µM was used as a positive control).



**Figure 4:** Effect of *Annona senegalensis* (E26) extracts on aminochrome-induced cell death (A: U373MG; B: U373MGsiGST6) and mitochondrial membrane-potential impairment (C: U373MG; D: U373MGsiGST6). The statistical significance was assessed using analysis of variance (ANOVA) for multiple comparisons (\*\*\*) $p < 0.001$  compared to AM 75 and (†) $P < 0.05$ ; (††) $P < 0.01$ ; (†††) $P < 0.001$  compared to control (DMSO at 0.2%). Nic 50 (Nicotine at 50  $\mu$ M was used as a positive control).

**Table 1:**

List of the plants used in this study.

Family	Scientific name Voucher Specimen Number	Vernacular name in Bamoun*	Part(s) used	Mode of preparation	Disease treated
Annonaceae	<i>Annona muricata</i> L. 32879/HNC	Chawa-chawa	Seeds	Decoction	Depression/Nervousness
	<i>Annona senegalensis</i> Pers. 7783 YA	Kuopshe-kuopshe	Barks	Decoction	Convulsion/Memory loss
Apocynaceae	<i>Dacryodes edulis</i> (G.Don) H.J.Lam 18258/HNC	Youom	Barks	Decoction	Depression/Epil epsy
Euphorbiaceae	<i>Alchornea laxiflora</i> (Benth.) Pax &K.Hoffm. 2093 YA	Meshé	Leaves	Decoction	Anxiety/Depression