

UNIVERSITE DE YAOUNDE 1

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

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE



THE UNIVERSITY OF YAOUNDE 1

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

FACULTY OF SCIENCE

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

LABORATOIRE DE PHARMACOLOGIE ET TOXICOLOGIE
LABORATORY OF PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY

**Modulation des facteurs protéiques impliqués
dans la maladie d'Alzheimer par les extraits de
Khaya grandifolia C. DC.**

THESE

Présentée comme requis partiel en vue de l'obtention du Doctorat/PhD en Biochimie

Option: Pharmacologie moléculaire

Par :

ELLA Fils Armand

Matricule : 05Y005

Master en Biochimie

Sous la co-direction de :

NJAYOU Frédéric Nico

Maître de Conférences

et

MOUNDIPA FEWOU Paul

Professeur



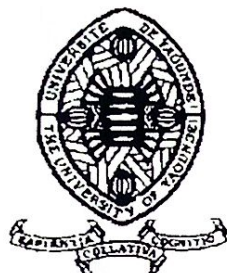
Année académique 2021-2022

UNIVERSITÉ DE YAOUNDE I

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

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

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE



UNIVERSITY OF YAOUNDE I

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

RESEARCH AND DOCTORATE TRAINING
UNIT IN LIFE SCIENCES

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

ATTESTATION DE CORRECTION

Nous soussignés, Prof. **PIEME Constant Anatole** et Prof. **FEKAM BOYOM Fabrice** respectivement Examinateur et Président du jury de Thèse de Doctorat/Ph.D en Biochimie spécialité Pharmacologie moléculaire, soutenue par Monsieur **ELLA Fils Armand** (Matricule **05Y005**) le Mercredi 26 Janvier 2022 à 10 heures dans la Salle S01/S02 du Nouveau Bloc Pédagogique de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I, sous le thème: « **Modulation des facteurs protéiques impliqués dans la maladie d'Alzheimer par les extraits de *Khaya grandifolia* C. DC.** », attestons que le candidat a effectué les corrections conformément aux exigences du jury.

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


Fait à Yaoundé, le 08/02/2022...

Examinateur

Pr. PIEME Constant Anatole
Maître de Conférences de Biochimie
FMSB / UYI

Président du jury

Fabrice F. Boyom, Sc.I
Professor of Biochemistry

UNIVERSITE DE YAOUNDE I FACULTE DES SCIENCES Division de la Programmation et du Suivi des Activités Académiques		The University of Yaoundé I Faculty of Science Division of Programming and follow-up of Academic Affairs
LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS	LIST OF PERMENENT TEACHING STAFF	

ANNÉE ACADEMIQUE 2021/2022

(Par Département et par Grade)

DATE D'ACTUALISATION 22 Septembre 2021

ADMINISTRATION

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

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

VICE-DOYEN / DSSE : NYEGUE Maximilienne Ascension, *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 Sclolarité et de la Recherche DAASR : AJEAGAH Gideon AGHAINDUM, *Professeur*

1- DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (38)

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 Wilfried	Professeur	En poste
6	MOUNDIPA FEWOU Paul	Professeur	Chef de Département
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	Maître 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 NGOUNOU Marcelline	Maître de Conférences	En poste
15	EFFA ONOMO Pierre	Maître de Conférences	En poste
16	EWANE Cécile Anne	Maître de Conférences	En poste
17	MOFOR née TEUGWA Clotilde	Maître de Conférences	Inspecteur de Service MINESUP
18	NANA Louise épouse WAKAM	Maître de Conférences	En poste
19	NGONDI Judith Laure	Maître de Conférences	En poste
20	NGUEFACK Julienne	Maître de Conférences	En poste
21	NJAYOU Frédéric Nico	Maître de Conférences	En poste
22	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Maître de Conférences	En poste

23	AKINDEH MBUH NJI	Chargé de Cours	En poste
24	BEBOY EDZENGUELE Sara Nathalie	Chargé de Cours	En poste
25	DAKOLE DABOY Charles	Chargé de Cours	En poste
26	DJUIKWO NKONGA Ruth Viviane	Chargé de Cours	En poste
27	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	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 Marlyse Joséphine	Chargé de Cours	En poste
33	MBONG ANGIE M. Mary Anne	Chargé de Cours	En poste
34	PECHANGOU NSANGOU Sylvain	Chargé de Cours	En poste
35	Palmer MASUMBE NETONGO	Chargé de Cours	En poste

36	MBOUCHE FANMOE Marceline Joëlle	Assistante	En poste
37	OWONA AYISSI Vincent Brice	Assistant	En poste
38	WILFRIED ANGIE Abia	Assistant	En poste

2- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES (BPA) (46)

1	AJEAGAH Gideon AGHAINDUM	Professeur	<i>DAARS / FS</i>
2	BILONG BILONG Charles-Félix	Professeur	Chef de Département
3	DIMO Théophile	Professeur	En Poste
4	DJIETO LORDON Champlain	Professeur	En Poste
5	DZEUFIEF DJOMENI Paul Désiré	Professeur	En poste
6	ESSOMBA née NTSAMA MBALA	Professeur	<i>Vice Doyen/FMSB/UUI</i>
7	FOMENA Abraham	Professeur	En Poste
8	KAMTCHOUING Pierre	Professeur	En poste
9	KEKEUNOU Sévilor	Professeur	En poste
10	NJAMEN Dieudonné	Professeur	En poste
11	NJIOKOU Flobert	Professeur	En Poste
12	NOLA Moïse	Professeur	En poste
13	TAN Paul VERNYUY	Professeur	En poste
14	TCHUEM TCHUENTE Louis Albert	Professeur	<i>Inspecteur de service Coord.Progr./MINSANTE</i>
15	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	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	LEKEUFACK FOLEFACK Guy B.	Maître de Conférences	En poste
20	MEGNEKOU Rosette	Maître de Conférences	En poste
21	MONY Ruth épouse NTONE	Maître de Conférences	En Poste
22	NGUEGUIM TSOFAK Florence	Maître de Conférences	En poste
23	TOMBI Jeannette	Maître de Conférences	En poste

24	ALENE Désirée Chantal	Chargé de Cours	En poste
25	ATSAMO Albert Donatien	Chargé de Cours	En poste
26	BELLET EDIMO Oscar Roger	Chargé de Cours	En poste
27	DONFACK Mireille	Chargé de Cours	En poste
28	ETEME ENAMA Serge	Chargé de Cours	En poste
29	GOUNOUE KAMKUMO Raceline	Chargé de Cours	En poste
30	KANDEDA KAVAYE Antoine	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 LucianeMarlyse	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	MBOLO Marie	Professeur	En poste
5	MOSSEBO Dominique Claude	Professeur	En poste
6	YOUMBI Emmanuel	Professeur	Chef de Département
7	ZAPFACK Louis	Professeur	En poste

8	ANGONI Hyacinthe	Maître de Conférences	En poste
9	BIYE Elvire Hortense	Maître de Conférences	En poste
10	KENGNE NOUMSI Ives Magloire	Maître de Conférences	En poste
11	MALA Armand William	Maître de Conférences	En poste
12	MBARGA BINDZI Marie Alain	Maître de Conférences	CT/ MINESUP
13	NDONGO BEKOLO	Maître de Conférences	CE / MINRESI
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	NGOOU 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	En poste
28	KABELONG BANAHOU Louis-Paul-Roger	Assistant	En poste
29	KONO Léon Dieudonné	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	Assistant	En poste
----	---------------------	-----------	----------

4- DÉPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (CI) (33)

1	AGWARA ONDOH Moïse	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2	DJOUFAC WOUMFO Emmanuel	Professeur	En poste
3	Florence UFI CHINJE épouse MELO	Professeur	<i>Recteur Univ. Ngaoundere</i>
4	GHOOGOMU Paul MINGO	Professeur	<i>Ministre Chargé de Miss.PR</i>
5	NANSEU Njiki Charles Péguy	Professeur	En poste
6	NDIFON Peter TEKE	Professeur	<i>CT MINRESI</i>
7	NDIKONTAR Maurice KOR	Professeur	<i>Vice-Doyen Univ. Bamenda</i>
8	NENWA Justin	Professeur	En poste
9	NGAMENI Emmanuel	Professeur	<i>DOYEN FS Uds</i>
10	NGOMO Horace MANGA	Professeur	<i>Vice Chancellor/UB</i>

11	ACAYANKA Elie	Maître de Conférences	En poste
12	BABALE née DJAM DOUDOU	Maître de Conférences	<i>Chargée Mission P.R.</i>
13	EMADACK Alphonse	Maître de Conférences	En poste
14	KAMGANG YOUNBI Georges	Maître de Conférences	En poste
15	KEMMEGNE MBOUGUEM Jean C.	Maître de Conférences	En poste
16	KONG SAKEO	Maître de Conférences	En poste
17	NDI NSAMI Julius	Maître de Conférences	En poste
18	NJIOMOU C. épse DJANGANG	Maître de Conférences	En poste
19	NJOYA Dayirou	Maître de Conférences	En poste
20	TCHAKOUTE KOUAMO Hervé	Maître de Conférences	En poste

21	BELIBI BELIBI Placide Désiré	Chargé de Cours	CS/ ENS Bertoua
22	CHEUMANI YONA Arnaud M.	Chargé de Cours	En poste
23	KENNE DEDZO GUSTAVE	Chargé de Cours	En poste
24	KOUOTOU DAOUDA	Chargé de Cours	En poste
25	MAKON Thomas Beauregard	Chargé de Cours	En poste
26	MBEY Jean Aime	Chargé de Cours	En poste
27	NCHIMI NONO KATIA	Chargé de Cours	En poste
28	NEBA nee NDOSIRI Bridget NDOYE	Chargé de Cours	CT/ MINFEM
29	NYAMEN Linda Dyorisse	Chargé de Cours	En poste
30	PABOUDAM GBAMBIE A.	Chargé de Cours	En poste
31	NJANKWA NJABONG N. Eric	Assistant	En poste
32	PATOUOSSA ISSOFA	Assistant	En poste
33	SIEWE Jean Mermoz	Assistant	En Poste

5- DÉPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (CO) (34)

1	DONGO Etienne	Professeur	Vice-Doyen/FSE/UIYI
2	GHOOGOMU TIH Robert Ralph	Professeur	Dir. IBAF/UDA
3	NGOUELA Silvère Augustin	Professeur	Chef de Département UDS
4	NYASSE Barthélemy	Professeur	En poste
5	PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel	Professeur	<i>Directeur/ MINESUP</i> Chef de Département
6	WANDJI Jean	Professeur	En poste

7	Alex de Théodore ATCHADE	Maître de Conférences	Vice-Doyen / DPSAA
8	AMBASSA Pantaléon	Maître de Conférences	En poste

9	EYONG Kenneth OBEN	Maître de Conférences	<i>Chef Service Programme & Diplomes</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	MVOT AKAK CARINE	Maître de Conférences	En poste
18	NOTE LOUGBOT Olivier Placide	Maître de Conférences	Chef Service/MINESUP
19	NGO MBING Joséphine	Maître de Conférences	Sous/Direct. MINRESI
20	NGONO BIKOBO Dominique Serge	Maître de Conférences	En poste
21	NOUNGOUE TCHAMO Diderot	Maître de Conférences	En poste
22	TABOPDA KUATE Turibio	Maître de Conférences	En poste
23	TAGATSING FOTSING Maurice	Maître de Conférences	
24	TCHOUANKEU Jean-Claude	Maître de Conférences	<i>Doyen /FS/ UYI</i>
25	TIH née NGO BILONG E. Anastasie	Maître de Conférences	En poste
26	YANKEP Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
27	ZONDENDEGOUMBA Ernestine	Maître de Conférences	

28	KAMTO Eutrophe Le Doux	Chargé de Cours	En poste
29	NGNINTEDO Dominique	Chargé de Cours	En poste
30	NGOMO Orléans	Chargé de Cours	En poste
31	OUAHOUE WACHE Blandine M.	Chargé de Cours	En poste
32	SIELINOUE TEDJON Valérie	Chargé de Cours	En poste

33	MESSI Angélique Nicolas	Assistant	En poste
34	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	ABESOLO ALO'O Gislain	Chargé de Cours	En poste
5	AMINOUE Halidou	Chargé de Cours	Chef de Département
6	DJAM Xaviera YOUH - KIMBI	Chargé de Cours	En Poste
7	DOMGA KOMGUEM Rodrigue	Chargé de Cours	En poste
8	EBELE Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
9	KOUOKAM KOUOKAM E. A.	Chargé de Cours	En poste
10	MELATAGIA YONTA Paulin	Chargé de Cours	En poste
11	MONTHÉ DJIADEU Valéry M.	Chargé de Cours	En poste
12	MOTO MPONG Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
13	OLLE OLLE Daniel Claude Delort	Chargé de Cours	Dir adj Enset. Ebolowa
14	TAPAMO Hyppolite	Chargé de Cours	En poste
15	TINDO Gilbert	Chargé de Cours	En poste
16	TSOPZE Norbert	Chargé de Cours	En poste
17	WAKU KOUAMOU Jules	Chargé de Cours	En poste

18	BAYEM Jacques Narcisse	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	AYISSI Raoult Domingo	Professeur	Chef de Département
2	EMVUDU WONO Yves S.	Professeur	Inspecteur MINESUP
3	KIANPI Maurice	Maître de Conférences	En poste
4	MBANG Joseph	Maître de Conférences	En poste
5	MBEHOU Mohamed	Maître de Conférences	En poste
6	MBELE BIDIMA Martin Ledoux	Maître de Conférences	En poste
7	NKUIMI JUGNIA Célestin	Maître de Conférences	En poste
8	NOUNDJEU Pierre	Maître de Conférences	En poste
9	TCHAPNDA NJABO Sophonie B.	Maître de Conférences	Directeur/AIMS Rwanda
10	TCHOUNDJA Edgar Landry	Maître de Conférences	En poste

11	AGHOUKENG JIOFACK Jean Gérard	Chargé de Cours	Chef Cellule MINPLAMAT
12	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
13	DJIADU NGAHA Michel	Chargé de Cours	En poste
14	DOUANLA YONTA Herman	Chargé de Cours	En poste
15	FOMEKONG Christophe	Chargé de Cours	En poste
16	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste
17	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
18	MENGUE MENGUE David Joe	Chargé de Cours	En poste
19	NGUEFACK Bernard	Chargé de Cours	En poste
20	NIMPA PEFOUNKEU Romain	Chargé de Cours	En poste
21	POLA DOUNDOU Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
22	TAKAM SOH Patrice	Chargé de Cours	En poste
23	TCHANGANG Roger Duclos	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	MBATAKOU Salomon Joseph	Assistant	En poste
28	MBIAKOP Hilaire George	Assistante	En poste
29	MEFENZA NOUNTU Thiery	Assistant	En poste
30	TCHEUTIA Daniel Duviol	Assistant	En poste

8- DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MIB) (18)

1	ESSIA NGANG Jean Justin	Professeur	Chef de Département
2	NYEGUE Maximilienne Ascension	Professeur	VICE-DOYEN / DSSE
3	NWAGA Dieudonné M.	Professeur	En poste

4	ASSAM ASSAM Jean Paul	Maître de Conférences	En poste
5	BOYOMO ONANA	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	BODA Maurice	Chargé de Cours	En poste
9	BOUGNOM Blaise Pascal	Chargé de Cours	En poste
10	ESSONO OBOUGOU Germain G.	Chargé de Cours	En poste
11	NJIKI BIKOÏ Jacky	Chargé de Cours	En poste

12	TCHIKOUA Roger	Chargé de Cours	En poste
13	ESSONO Damien Marie	Assistant	En poste
14	LAMYE Glory MOH	Assistant	En poste
15	MEYIN A EBONG Solange	Assistante	En poste
16	NKOUDOU ZE Nardis	Assistant	En poste
17	SAKE NGANE Carole Stéphanie	Assistante	En poste
18	TOBOLBAÏ Richard	Assistant	En poste

9. DEPARTEMENT DE PYSIQUE(PHY) (40)

1	BEN- BOLIE Germain Hubert	Professeur	En poste
2	DJUIDJE KENMOE épouse ALOYEM	Professeur	En poste
3	EKOBENA FOU DA Henri Paul	Professeur	<i>Vice-Recteur UN</i>
4	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	En poste
5	KOFANE Timoléon Crépin	Professeur	En poste
6	NANA ENGO Serge Guy	Professeur	En poste
7	NANA NBENDJO Blaise	Professeur	En poste
8	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	Chef de Département
9	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Professeur	En poste
10	NOUAYOU Robert	Professeur	En poste
11	PEMHA Elkana	Professeur	En poste
12	TABOD Charles TABOD	Professeur	Doyen FS Univ/Bda
13	TCHAWOUA Clément	Professeur	En poste
14	WOAFO Paul	Professeur	En poste
15	ZEKENG Serge Sylvain	Professeur	En poste

16	BIYA MOTTO Frédéric	Maître de Conférences	DG/HYDRO Mekin
17	BODO Bertrand	Maître de Conférences	En poste
18	ENYEGUE A NYAM épse BELINGA	Maître de Conférences	En poste
19	EYEBE FOU DA Jean sire	Maître de Conférences	En poste
20	FEWO Serge Ibraïd	Maître de Conférences	En poste
21	HONA Jacques	Maître de Conférences	En poste
22	MBANE BIOUELE César	Maître de Conférences	En poste
23	MBINACK Clément	Maître de Conférences	En poste
24	NDOP Joseph	Maître de Conférences	En poste
25	SAIDOU	Maître de Conférences	MINRESI
26	SIEWE SIEWE Martin	Maître de Conférences	En poste
27	SIMO Elie	Maître de Conférences	En poste
28	VONDOU Derbetini Appolinaire	Maître de Conférences	En poste
29	WAKATA née BEYA Annie	Maître de Conférences	<i>Directeur/ ENS/ UYI</i>

30	ABDOURAHIMI	Chargé de Cours	En poste
31	CHAMANI Roméo	Chargé de Cours	En poste
32	EDONGUE HERVAIS	Chargé de Cours	En poste
33	FOUEDJIO David	Chargé de Cours	Chef Cell. MINADER
34	MBONO SAMBA Yves Christian U.	Chargé de Cours	En poste
35	MELI'I Joelle Larissa	Chargé de Cours	En poste
36	MVOGO Alain	Chargé de Cours	En poste
37	OBOUNOU Marcel	Chargé de Cours	DA/Univ Inter Etat/Sangmélina
38	WOULACHE Rosalie Laure	Chargé de Cours	En poste

39	AYISSI EYEBE Guy François Valérie	Assistant	En poste
40	TEYOU NGOUPOU Ariel	Assistant	En poste

10- DÉPARTEMENT DE SCIENCES DE LA TERRE (ST) (43)

1	BITOM Dieudonné	Professeur	<i>Doyen / FASA / UDs</i>
2	FOUATEU Rose épouse YONGUE	Professeur	En poste
3	NDAM NGOUPAYOU Jules-Remy	Professeur	En poste
4	NDJIGUI Paul Désiré	Professeur	Chef de Département
5	NGOS III Simon	Professeur	En poste
6	NKOUMBOU Charles	Professeur	En poste
7	NZENTI Jean-Paul	Professeur	En poste

8	ABOSSOLO née ANGUE Monique	Maître de Conférences	<i>Vice-Doyen / DRC</i>
9	BISSO Dieudonné	Maître de Conférences	<i>Directeur/Projet Barrage Memve'ele</i>
10	EKOMANE Emile	Maître de Conférences	En poste
11	GANNO Sylvestre	Maître de Conférences	En poste
12	GHOGOMU Richard TANWI	Maître de Conférences	CD/Uma
13	MOUNDI Amidou	Maître de Conférences	<i>CT/ MINIMDT</i>
14	NGUEUTCHOUA Gabriel	Maître de Conférences	CEA/MINRESI
15	NJILAH Isaac KONFOR	Maître de Conférences	En poste
16	NYECK Bruno	Maître de Conférences	En poste
17	ONANA Vincent Laurent	Maître de Conférences	<i>Chef service Maintenance & du Matériel/UYII</i>
18	TCHAKOUNTE J. épouse NOUMBEM		<i>Chef.cell / MINRESI</i>
19	TCHOUANKOUE Jean-Pierre	Maître de Conférences	En poste
20	TEMDJIM Robert	Maître de Conférences	En poste
21	YENE ATANGANA Joseph Q.	Maître de Conférences	<i>Chef Div. /MINTP</i>
22	ZO'O ZAME Philémon	Maître de Conférences	<i>DG/ART</i>

23	ANABA ONANA Achille Basile	Chargé de Cours	En poste
24	BEKOA Etienne	Chargé de Cours	En poste
25	ELISE SABABA	Chargé de Cours	En poste
26	ESSONO Jean	Chargé de Cours	En poste
27	EYONG JOHN TAKEM	Chargé de Cours	En poste
28	FUH Calistus Gentry	Chargé de Cours	<i>Sec. D'Etat/MINMIDT</i>
29	LAMILLEN BILLA Daniel	Chargé de Cours	En poste
30	MBESSE CECILE OLIVE	Chargé de Cours	En poste
31	MBIDA YEM	Chargé de Cours	En poste
32	METANG Victor	Chargé de Cours	En poste
33	MINYEM Dieudonné-Lucien	Chargé de Cours	CD/Uma
34	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargé de Cours	En poste
35	NGO BIDJECK Louise Marie	Chargé de Cours	En poste
36	NOMO NEGUE Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
37	NTSAMA ATANGANA Jacqueline	Chargé de Cours	En poste
38	TCHAPTCHET TCHATO De P.	Chargé de Cours	En poste
39	TEHNA Nathanaël	Chargé de Cours	En poste
40	TEMGA Jean Pierre	Chargé de Cours	En poste

41	FEUMBA Roger	Assistant	En poste
42	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	8 (01)	14 (10)	13 (05)	3 (2)	39 (18)
BPA	15 (01)	08 (06)	18 (05)	05 (2)	46 (14)
BPV	07 (01)	10(02)	9 (06)	07 (01)	33 (9)
CI	10 (01)	10(02)	10 (02)	03 (0)	33 (5)
CO	6 (0)	21(05)	05 (02)	02 (0)	34(7)
IN	2 (0)	1 (0)	14 (01)	08 (01)	25 (2)
MAT	2 (0)	8 (0)	15 (01)	05 (02)	30 (3)
MIB	3 (0)	4 (02)	05 (01)	06 (02)	18 (5)
PHY	15 (0)	14 (02)	09 (03)	02 (0)	40 (5)
ST	7 (1)	15 (01)	18 (05)	02 (0)	42(7)
Total	75 (5)	105 (29)	116 (31)	43 (10)	339 (75)

Soit un total de **339 (75)** dont :

- Professeurs **75 (5)**
- Maîtres de Conférences **105(29)**
- Chargés de Cours **116 (31)**
- Assistants **43(10)**

() = Nombre de Femmes **75**

*« C'est dans l'effort que l'on trouve la satisfaction et non dans la réussite.
Un plein effort est une pleine victoire »*

Mahatma Gandhi

DEDICACE



REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à exprimer toute ma reconnaissance au Professeur Moundipa Fewou Paul, pour l'accueil au sein de l'équipe de recherche du laboratoire, pour vos encouragements, votre patience, soutien et surtout pour m'avoir fait confiance tout au long de la préparation et la réalisation de ce travail. Trouvez ici toute ma gratitude et ma sympathie.

Je voudrais ensuite témoigner toute ma gratitude au Professeur Njayou Frédéric Nico qui m'a suivi de bout en bout dans la réalisation de ce travail. Votre accompagnement a permis qu'il puisse arriver à son terme. Vos encouragements ont été une source de motivation pour moi. Grand merci.

Je voudrais dire un grand merci aux enseignants du département de Biochimie de l'Université de Yaoundé pour la solide formation reçue.

Je tiens à remercier le Professeur Manjula Shantaram, Directrice du *Post Graduate Centre PG Jnana Kaveri* et Responsable du « *Department of Studies and Research in Biochemistry, Mangalore University* » en Inde pour m'avoir accueilli au sein de son centre. La confiance que vous m'avez accordée, vos conseils et votre bonne humeur m'ont permis de mener à bien mon projet de recherche.

J'adresse tous mes remerciements au Dr Ngamli Fewou Simon de la faculté des Sciences de santé de l'Université des Montagnes pour sa disponibilité et sa patience. Merci de m'avoir tant appris en recherche et de savoir si bien transmettre votre savoir avec passion. J'ai tellement appris à vos côtés.

Je tiens à adresser mes remerciements aux Docteurs Rekha et Prashant Modi ; et aux étudiants Pratap et Sayali pour l'accueil, l'accompagnement et le plateau technique mis à ma disposition au sein du laboratoire « *Stem Cells, Tissue Engineering and Molecular Biology* » de l'Université de Yenepoya en Inde.

Je tiens à remercier le programme d'échange « *Research Training Fellowship for Developing Country Scientists (RTF-DCS)* », et le « *Department of Science & Technology (DST), Ministry of Science & Technology (Government of India)* » pour m'avoir accordé une bourse de mobilité (N° DCS/2018/000007).

J'adresse mes vifs remerciements aux Professeurs Tchana et Djuidje, aux Docteurs Beboy, Pechangou, Owona, Kouoh pour leurs conseils et encouragements.

J'adresse de chaleureux remerciements à tous les chercheurs seniors et juniors du laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie pour l'aide et la disponibilité.

Un grand merci à toute ma famille qui a été une véritable source de soutien au quotidien, à Maman et Papa qui m'ont appris à me battre jusqu'au bout pour réussir et m'ont poussé sans relâche à poursuivre dans cette voie ; c'est à eux également que je dois mon énergie débordante. Merci d'avoir cru en moi, ainsi qu'en mes projets passés, actuels et à venir...

J'adresse une pensée particulière à mon fils Uriel Ethan Elimbi Ella ainsi qu'à sa maman Madeleine Sandrine Eboumbou pour les sacrifices consentis tout au long de ce travail.

Mille merci au grand frère Emati Mbella Jacques René et à son épouse pour le soutien inconditionnel. Je vous serai infiniment reconnaissant.

Je passe ensuite un remerciement spécial à mes amis : Gompong Emeline, Dr Eke Pierre, Mukam Idriss, Mbarga Simon, Kono Constatin, Bekondo Dieunedort et son épouse pour les moments de partage. Vos encouragements ont toujours été pour moi une motivation. Vous avez été présents dès le début de mon parcours jusqu'à l'aboutissement de cette thèse.

Un grand merci aux familles Etroukang, Essengue, Ekoume qui m'ont toujours soutenu tout au long de mon parcours. Trouvez ici toute ma reconnaissance.

Que tous ceux qui ont participé de près ou de loin à ce travail trouvent dans ces lignes mes remerciements les plus chaleureux.

Table des matières

DEDICACE.....	xi
REMERCIEMENTS	xii
LISTE DES FIGURES	xix
LISTE DES TABLEAUX.....	xxii
LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES	xxiii
RESUME.....	xxv
ABSTRACT	xxvii
INTRODUCTION GENERALE.....	1
HYPOTHESES DE RECHERCHE	3
OBJECTIFS	3
OBJECTIF GÉNÉRAL	3
OBJECTIFS SPÉCIFIQUES.....	3
CHAPITRE 1 : REVUE DE LITTERATURE	4
1.1. LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL.....	4
1.1.1. Généralités	4
1.1.2. Bases biologiques de la mémoire.....	6
1.1.3. Cellules gliales du système nerveux central	8
1.2. LA MALADIE D'ALZHEIMER	8
1.2.1. Les différentes formes de la maladie d'Alzheimer	9
1.2.1.1. La forme familiale	9
1.2.1.2. La forme sporadique.....	10
1.2.2. Caractéristiques cliniques	10
1.2.3. Physiopathologie de la maladie d'Alzheimer	11
1.2.4. Facteurs de risque	12
1.3. LES TRAITES HISTOPATHOLOGIQUES DE LA MALADIE D'ALZHEIMER.....	14
1.3.1. L'Amyloïde Précurseur de Protéine (APP).....	14
1.3.1.1. L'APP.....	14
1.3.1.2. Structure de l'APP	14
1.3.1.3. Traitement protéolytique de l'APP: sécrétases α -, β -, γ -	15
1.3.2. Le peptide bêta amyloïde	16
1.3.2.1. Les isoformes du peptide bêta amyloïde	16
1.3.2.2. La fibrillation du peptide $A\beta_{1-42}$	17

1.3.2.3. Les oligomères du peptide A β ₁₋₄₂	17
1.3.3. Les plaques séniles.....	18
1.3.4. La protéine tau	19
1.3.4.1. Génétique de la protéine tau.....	20
1.3.4.2. Structure et fonctions de la protéine tau.....	23
1.3.4.3. Modifications post-traductionnelles de tau : la phosphorylation	26
1.3.4.4. Mécanismes par lesquels la protéine tau pourrait contribuer au phénotype mémoire de la MA.....	29
1.3.4.5. Toxicité des fibres amyloïdes du peptide A β et de la protéine tau dans la maladie d'Alzheimer	32
1.4. STRESS OXYDATIF ET MALADIE D'ALZHEIMER.....	35
1.5. MITOCHONDRIE ET MALADIE D'ALZHEIMER.....	37
1.5.1. Implication des mitochondries dans la maladie d'Alzheimer.....	37
1.5.2. Dysfonctionnement mitochondrial et maladie d'Alzheimer.....	37
1.5.3. L'apoptose.....	39
1.6. MODÈLE D'ÉTUDE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER.....	42
1.6.1. Modèles <i>in vitro</i>	42
1.6.2. Modèles <i>in vivo</i>	42
1.6.3. Modèles animaux naturels	42
1.6.4. Modèles murins transgéniques de la maladie d'Alzheimer	42
1.6.5. Les composés chimiques utilisés pour reproduire un modèle de la maladie d'Alzheimer	45
1.6.5.1. La colchicine	45
1.6.5.2. L'azide de sodium	46
1.6.5.3. L'aluminium.....	46
1.6.5.4. La scopolamine	46
1.7. LES CIBLES THERAPEUTIQUES POUR LA MALADIE D'ALZHEIMER	46
1.7.1. Traitement conventionnel	47
1.7.2. Stratégies thérapeutiques ciblant le peptide A β	49
1.7.3. Stratégies thérapeutiques ciblant la protéine tau.....	50
1.7.4. Immunothérapie	51
1.7.5. Neuroprotection	52
1.7.6. Thérapies complémentaires et alternatives pour la MA	53
1.7.7. Utilisation des plantes médicinales	54

1.8. TRAVAUX ANTERIEURS EFFECTUES SUR <i>KHAYA GRANDIFOLIOLA</i>	55
CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES	57
2.1. MATERIEL	57
2.1.1. Materiel végétal	57
2.1.2. Animaux de laboratoire et lignée cellulaire	57
2.1.2.1. Lignée cellulaire IMR32	57
2.1.2.2. Animaux de laboratoire	57
2.1.3. Appareils et réactifs	57
2.1.3.1. Appareils	57
2.1.3.2. Réactifs	58
2.2. METHODES	59
2.2.1. Préparation de l'extrait brut et fractionnement de KG.....	59
2.2.1.1. Préparation de l'extrait brut de KG	59
2.2.1.2. Fractionnement de l'extrait brut de KG	59
2.2.1.3. Détermination de la composition phytochimique de l'extrait de <i>K. grandifoliola</i>	60
2.2.2. Evaluation de l'effet des extraits de KG sur la production des espèces oxygénées réactives (EOR) et l'apoptose cellulaire	63
2.2.2.1. Culture cellulaire et différenciation.....	63
2.2.2.2. Traitement des cellules IMR32 différenciées.....	65
2.2.2.3. Détermination de l'effet de l'extrait et des fractions de KG sur la viabilité des cellules IMR 32 différenciées	65
2.2.2.3. Analyse de la morphologie cellulaire par microscopie en contraste de phase .	67
2.2.2.4. Mesure de la production des espèces oxygénées réactives induite par le peptide A β ₄₂ sur les cellules IMR32.....	67
2.2.2.5. Test de viabilité cellulaire par coloration au Hoescht 33342	68
2.2.2.6. Test de viabilité cellulaire par coloration à l'iodure de propidium	69
2.2.3. Analyse du mécanisme neuroprotecteur de l'extrait et des fractions de KG	69
2.2.3.1. Extraction et quantification des protéines	70
2.2.3.2. Séparation des protéines par électrophorèse	71
2.2.3.3. Préparation du gel et de cuve d'électrophorèse.....	71
2.2.3.4. Transfert des protéines sur la membrane de nitrocellulose	72
2.2.4. Evaluation de l'effet brut de KG sur les paramètres biochimiques et les déficits comportementaux induit par la scopolamine chez le rat.....	74

2.2.4.1. Conditions d'élevage et traitement des animaux.....	74
2.2.4.2. Contrôle du poids des rats	76
2.2.4.3. Etude de comportement des rats.....	76
2.2.4.4. Sacrifice des rats et prélèvements des organes.....	79
2.2.4.5. Dosages des activités enzymatiques chez le rat	80
2.2.4.6. Mesure de l'activité de l'acetylcholine esterase.....	83
2.2.4.7. Mesure de l'activité des phosphatases alcalines	84
2.2.4.8. Mesure du taux de fibrillation dans l'homogénat de cerveau par le rouge Congo	85
2.2.4.9. Coupes histologiques.....	86
2.2.5. Analyse statistique	87
CHAPITRE 3: RESULTATS ET DISCUSSIONS	88
3.1. RESULTATS	88
3.1.1. Composition phytochimique de l'extrait hydroéthanolique de <i>Khaya grandifolia</i> (KG) et teneur en flavonoïdes et polyphénols totaux	88
3.1.2. Effet des extraits de KG sur la production des espèces oxygénées réactives et l'apoptose cellulaire	89
3.1.2.1. Effet de l'extrait brut et des fractions de KG sur la viabilité cellulaire.....	89
3.1.2.2. Effet des extraits de KG sur la morphologie des cellules IMR32 différenciées	90
3.1.2.3. Effet de l'extrait brut de KG sur la production des espèces oxygénées réactives (EOR) et l'apoptose induite par le peptide amyloïde bêta 42 (A β ₄₂)	91
3.1.2.4. Conclusion partielle.....	96
3.1.3. Effet de l'extrait brut et la fraction plus active KGf2 sur le dysfonctionnement mitochondrial (SODmt), la toxicité synaptique (SNAP25, SYP) et l'hyperphosphorylation de la protéine tau	96
3.1.3.1. Effet de l'extrait brut et de la fraction KGf2 sur l'activation de la SOD induite par le peptide A β ₄₂ sur les cellules neuroblastomes IMR32 différenciées	96
3.1.3.2. Effet de l'extrait brut et la fraction KGf2 sur l'inhibition de l'activité de la Caspase-3 clivée induite par le peptide A β ₄₂ sur les cellules neuroblastomes IMR32 différenciées	97
3.1.3.3. Effet activateur de l'extrait brut et la fraction KGf2 de sur la toxicité synaptique induite par le peptide A β ₄₂ sur les cellules neuroblastomes IMR32 différenciées	98

3.1.3.4. Effet inhibiteur de l'extrait et la fraction KGf2 sur l'hyperphosphorylation de la protéine tau induite par le peptide A β ₄₂ sur les cellules neuroblastomes IMR32 différenciées	100
3.1.3.5. Effet inhibiteur de l'extrait brut et la fraction KGf2 sur l'activité de la kinase ERK induite par le peptide A β ₄₂ sur les cellules neuroblastomes IMR32 différenciées	101
3.1.3.6. Conclusion partielle.....	102
3.1.4. Effet de l'extrait brut de KG sur les paramètres biochimiques et les déficits comportementaux induit par la scopolamine chez le rat.....	102
3.1.4.1. Evolution du poids des animaux au cours du traitement.....	102
3.1.4.2. Tests comportementaux effectués pour évaluer l'effet de l'extrait brut de KG	102
3.1.4.3. Effets nootrophique de l'extrait brut de KG sur le comportement des rats intoxiqués ou non à la scopolamine	103
3.1.4.4. Effet antiamnésique de l'extrait brut de KG sur le comportement des rats intoxiqués ou non à la scopolamine	104
3.1.4.5. Effet de l'extrait brut de KG sur les marqueurs du stress oxydatif intracellulaire chez les rats intoxiqués à la scopolamine.....	106
3.1.4.6. Effet inhibiteur de l'extrait brut de KG de l'activité de l'acétylcholine estérase chez les rats intoxiqués à la scopolamine.....	109
3.1.4.7. Effet inhibiteur de l'extrait brut de KG de l'activité des phosphatases alcalines dans l'homogénat de cerveau et le sérum chez les rats intoxiqués à la scopolamine..	110
3.1.4.8. Effet inhibiteur de l'extrait brut de KG sur le processus de fibrillation dans l'homogénat de cerveau des intoxiqués à la scopolamine.....	111
3.1.4.9. Effet de l'extrait de KG et de la scopolamine sur la microarchitecture du cortex cérébral	112
3.1.4.10. Conclusion partielle	113
3.2. DISCUSSION GENERALE	114
CONCLUSION GENERALE	126
PERSPECTIVES.....	126
RESUME GRAPHIQUE.....	127
REFERENCES.....	128
ANNEXES	a
PUBLICATIONS	b

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Les zones du cerveau et la mémoire.	5
Figure 2. Schéma d'un neurone en connexion avec d'autres neurones.	6
Figure 3. Les différents types de mémoire	8
Figure 4. Schéma de l'amyloïde précurseur de protéine (APP).	15
Figure 5. Clivage protéolytique de l'APP par les secrétases.....	15
Figure 6. Les différents stades de progression de la formation des DNF dans les compartiments du cerveau dans le cas d'un vieillissement normal et dans le cas de la MA.	20
Figure 7. Schéma de l'expression des six isoformes de la protéine Tau.....	21
Figure 8. Les différentes isoformes de tau obtenues par l'épissage alternatif du gène MAPT montrant ses différentes régions.....	22
Figure 9. Eléments structuraux de la protéine tau.	23
Figure 10. Points isoélectriques de la protéine tau en fonction des domaines particuliers.	23
Figure 11. Régulation de la dynamique microtubulaire par tau.	24
Figure 12. Diagramme non exhaustif des différents sites de phosphorylation de tau par ses kinases.	26
Figure 13. Sites de phosphorylation de tau et les anticorps spécifiques des épitopes.....	27
Figure 14. Pyramide des kinases de tau	28
Figure 15. Contribution des phosphatases de la protéine tau dans la maladie d'Alzheimer. ...	29
Figure 16. Les trois modes d'interaction possibles tau/A β	33
Figure 17. Hypothèse axée sur la protéine tau de la maladie d'Alzheimer.....	34
Figure 18: Production d'EOR au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale	35
Figure 19: Le stress oxydant, conséquence d'un déséquilibre de l'homéostasie rédox	36
Figure 20. Les étapes de l'apoptose cellulaire.	39
Figure 21. Les voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose.....	40
Figure 22. Structures des molécules utilisées dans le traitement de la maladie d'Alzheimer..	48
Figure 23. Agents en essais cliniques pour le traitement de la maladie d'Alzheimer.....	51
Figure 24. Photographie de la plante <i>Khaya grandifolia</i>	56
Figure 25. Procédure de transfert des protéines du gel sur la membrane.....	73
Figure 26: Protocole expérimental de traitement des rats et les tests comportementaux réalisés au cours du traitement	75
Figure 27. Effet de l'extrait brut et des fractions KGf1 et KGf2 sur la viabilité des cellules neuroblastes humaines IMR32.....	89
Figure 28. Effet de l'extrait et des fractions de KG à différentes concentrations sur la morphologie des cellules IMR32.	90
Figure 29. Effet de l'extrait brut de KG sur la production des espèces oxygénées réactives (EOR) induit par A β 42 sur les cellules IMR32.....	91
Figure 30. Expression relative de la fluorescence induit par A β 42 sur les cellules IMR32. ...	92
Figure 31. Inhibition de la mort cellulaire par apoptose induite par A β 42 sur les cellules IMR32.	93

Figure 32. Effet de la fraction KGf1 sur la production des espèces oxygénées réactives (EOR) induit par A β 42 sur les cellules IMR32.	94
Figure 33. Effet de la fraction KGf2 sur la production des espèces oxygénées réactives (EOR) induit par A β 42 sur les cellules IMR32.	94
Figure 34. Expression relative de la fluorescence induit par A β 42 sur les cellules IMR32. ...	95
Figure 35. Inhibition de la génération des cellules apoptotiques sur les cellules IMR32 induit par A β 42 sur les cellules IMR32.....	96
Figure 36. Activation de la superoxyde dismutase (SOD) induit par l'A β 42 sur les cellules IMR32 par l'extrait brut et la fraction KGf2.....	97
Figure 37. Inhibition de la Caspase-3 clivée induit par A β ₁₋₄₂ sur des cellules IMR32 par l'extrait brut et la fraction KGf2.	98
Figure 38. Activation de l'expression de la SNAP25 induite par A β 42 sur les cellules IMR32 par l'extrait brut et la fraction KGf2.	99
Figure 39. Activation de l'expression de SYP induit par A β 42 sur les cellules IMR32 par l'extrait brut et la fraction KGf2.	99
Figure 40. Inhibition de l'hyperphosphorylation de la protéine tau induite par A β 42 sur les cellules IMR32 par l'extrait brut et la fraction KGf2.	100
Figure 41. Inhibition de pERK induit par A β ₁₋₄₂ sur les cellules IMR32 par l'extrait brut et la fraction KGf2.	101
Figure 42. Evolution du poids des rats dans les différents groupes durant le traitement.....	102
Figure 43. Effet activateur de l'extrait brut de KG sur l'activité de la superoxyde dismutase (SOD) dans l'homogénat de cerveau des rats intoxiqués à la scopolamine.....	106
Figure 44. Effet activateur de l'extrait brut de KG sur l'activité de la catalase (CAT) chez les rats intoxiqués à la scopolamine.	107
Figure 45. Inhibition de la déplétion du glutathion réduit (GSH) chez les rats intoxiqués....	108
Figure 46. Inhibitor de la production de MDA chez les rats intoxiqués à la scopolamine. (A) : homogénat de cerveau ; (B) : Sérum.....	109
Figure 47. Inhibition de l'activité de l'acétylcholine estérase (AChE) dans l'homogénat de cerveau de rat intoxiqué à la scopolamine par l'extrait brut de KG.....	110
Figure 48. Inhibition de l'activité des phosphatases l'extrait brut de KG chez les rats intoxiqués à la scopolamine. (A) : homogénat de cerveau ; (B) : sérum.	111
Figure 49. Inhibition de la formation des fibrilles chez les rats intoxiqués à la scopolamine par l'extrait brut de KG.....	112
Figure 50. Effet inhibiteur de l'extrait brut de KG sur la nécrose des cellules du cortex cérébral des rats intoxiqués à la scopolamine.	113
Figure 51. Dispositif utilisé pour la préparation et la migration du gel.....	g
Figure 52. (A) Rats male Albino de souche Wistar (B) Scopolamine Copper ampoules injectables.....	g
Figure 53. Dispositif de suspension caudale avec les comportements de balancement et d'immobilité.....	h
Figure 54. Dispositif de la piscine de Morris avec un exemple de trajectoires suivie par un rat depuis le premier point de lâché jusqu'à la plateforme.....	h
Figure 55. Dispositif du test à l'alimentation supprimé par la nouveauté.....	h

Figure 56. Observations du comportement de balancement (a) et comportement d'immobilité (b).....	i
Figure 57. Comportement du rat dans le bassin ayant servi au test de Morris (a) rat entrain de nager ; (b) rat ayant retrouvé la plate-forme d'échappement.....	i
Figure 58. Comportement du rat dans l'arène servant au test de l'aliment supprimé par la nouveauté en présence d'une source de lumière.....	i

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Résumé des modèles animaux transgéniques de la MA.....	43
Tableau 2. Liste des composés isolés des plantes médicinales approuvés par la FDA.....	48
Tableau 3. Essais en double aveugle en cours contrôlés par placebo sur des médicaments potentiellement modificateurs de la maladie pour le traitement des tauopathies primitives	52
Tableau 4. Plantes médicinales au potentiel neuroprotecteur sur des modèles <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	54
Tableau 5. Analyse qualitative de l'extrait de KG	88
Tableau 6. Le dosage des polyphénols totaux et flavonoïdes	88
Tableau 7. Réduction des temps des temps d'immobilité et de latence des rats à rejoindre la plateforme chez les rats intoxiqués à la scopolamine et traités avec l'extrait de KG à différentes doses.....	104
Tableau 8. Réduction des temps d'immobilité, de latence des rats à rejoindre la plateforme et à mordre l'aliment chez les rats intoxiqués à la scopolamine et traités avec l'extrait de KG à différentes doses.	105

LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES

Ach	: Acétylcholine
AchE	: Acétylcholine estérase
ATCI	: Acétyl thiocholine iodide
AND	: Acide désoxyribonucléique
AIF	: <i>Apoptosis inducing factor</i>
Apaf1	: <i>Apoptotic protease activating factor-1</i>
APOE	: Apolipoprotéine E
A β	: Amyloïde beta
BSA	: <i>Bovine serum albumin</i>
CAT	: Catalase
CTF	: Carboxyterminaux
DCF-DA	: 2'-7' dichlorofluorocéine diacétate
DMEM	: <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	: Diméthylsulfoxyde
DNF	: Dégénérescences neurofibrillaires
DO	: densité optique
DTNB	: 5-5'-dithiobis (acide-2-nitrobenzoïque)
EDTA	: Acide ethylènediaminetétraacétique
EGTA	: Acide 1,2-di-(2-aminoethoxy) éthanetétraacétique
EOR	: Espèces oxygénées réactives
GSH	: Gluthation réduit
GSSG	: Gluthation oxydé
H ₂ O ₂	: Eau oxygénée ou peroxyde d'hydrogène
KG	: <i>Khaya grandifolia</i>
MA	: Maladie d'Alzheimer
MAPT	: <i>Microtubule Associated Protein Tau</i>
MCT	: Mémoire à court terme
MDA	: Malonalaldéhyde
MEEM	: Mini Evaluation de l'Etat Mental
MLT	: Mémoire à long terme
NMDA	: N-méthyl-D-aspartate

O ₂ ^{•-}	: Anion superoxyde
PBS	: <i>Phosphate Buffer Salin</i>
PPA	: Protéine Précurseur d'Amyloïde
SFV	: Sérum Foetal de Veau
SN	: Système Nerveux
SNAP25	: <i>Symptosomal associated protein 25</i>
SNC	: Système Nerveux Central
SNP	: Système Nerveux Périphérique
SOD	: Superoxyde dismutase
SYP	: <i>Synaptosin</i>
TBA	: Acide thiobarbiturique
TCA	: Acide trichloroacétique
TNF	: <i>Tumor necrosis factor</i>

RESUME

Les maladies neurodégénératives dont la plus commune est la maladie d'Alzheimer représentent un problème majeur de santé publique dans le monde. La recherche de nouvelles sources thérapeutiques est impérative car les traitements disponibles ne soulagent que les symptômes de la maladie avec une efficacité non seulement réduite mais et variant d'un individu à un autre. *Khaya grandifoliola* (Meliaceae) est utilisé en médecine traditionnelle dans le traitement de diverses affections. Les études réalisées avec les extraits de cette plante ont montré des activités antiinflammatoires, immunomodulatoires et hepatoprotectrices témoignant de la capacité de la plante à protéger les organes. Cependant, les études sur le potentiel neuroprotecteur de la plante n'ont pas encore été effectuées. Ainsi, le but de ce travail a été d'étudier les activités neuroprotectrices en insistant sur la modulation des facteurs protéiques impliqués dans la maladie d'Alzheimer. Pour cela, l'extrait hydroéthanolique de *Khaya grandifoliola* (KG) a été préparé par macération de la poudre des écorces dans le mélange eau/éthanol (65:35, v/v). Ensuite, l'extrait a été fractionné par chromatographie sur colonne de gel de silice et les activités neuroprotectrices ainsi que le mécanisme de protection ont été investigués. S'agissant de l'activité neuroprotectrice des extraits, le modèle de neurotoxicité induit par le peptide A β ₄₂ a été utilisé. Les tests de viabilité cellulaire au bromure de 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT) et au crystal violet ainsi que la coloration des noyaux des cellules neuroblastomes différenciées au 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCDA), au Hoescht 33342 et à l'iodure de propidium (IP) ont été réalisés. Les propriétés neuroprotectrices des extraits ont été évaluées par la suite en mesurant leur effet sur la viabilité cellulaire et la génération des espèces oxygénées réactives (EOR) par fluorescence. Pour comprendre le mécanisme de neuroprotection de ces extraits, l'expression de différentes protéines : SOD mitochondriale, caspase-3, *Symptosomal associated protein 25* (SNAP25), synaptosine (SYP), protéine tau (tau T181) et *Extracellular signal-related kinase* (ERK) a été quantifiée par western blot. La β -actine a été utilisée comme contrôle interne. Concernant l'activité anti-amnésique de l'extrait de plante, les rats mâles albino de souche wistar ont été intoxiqués avec la scopolamine pour induire l'amnésie. Les tests comportementaux ont été effectués pour évaluer la dépression (test de suspension caudale), l'anxiété (test de l'alimentation supprimée par la nouveauté) et la mémoire (test de la piscine de Morris). L'effet de l'extrait sur les activités des enzymes du système antioxydant intracellulaire, de l'acétylcholine estérase, des phosphatases et sur le processus de fibrillation ont été évalués. Comme résultats, le maintien de la viabilité cellulaire et l'inhibition de la

production des EOR ont démontré l'action neuroprotectrice des extraits de KG. L'analyse par western blot a révélé que les extraits de KG inhibent le dysfonctionnement mitochondrial, l'apoptose, la toxicité synaptique et l'hyperphosphorylation de la protéine tau. L'extrait de KG présente des effets nootrophiques et anti-amnésiques chroniques. L'effet anti-amnésique chronique a été attribué à la stimulation de l'activité des enzymes antioxydantes (SOD et CAT) et au rélevement du niveau du glutathion réduit. L'effet inhibiteur s'est manifesté par la diminution de l'activité de l'acétylcholine estérase et la normalisation de l'activité des phosphatases. Mais également l'inhibition de la formation des fibrilles qui est une étape clé de la formation des agrégats qui se déposent sous forme de plaques séniles ou de dégénérescences neurofibrillaires. Cette étude a démontré que les extraits de KG possèdent des propriétés neuroprotectrices contre la toxicité du peptide β -amyloïde et la scopolamine. Ces observations suggèrent que l'extrait hydroéthanolique de KG serait un bon candidat pour le développement de nouveaux traitements contre les maladies neurodégénératives en général et la maladie d'Alzheimer en particulier.

Mots clés : *Khaya grandifolia*, neurotoxicité, peptide $A\beta_{42}$, scopolamine, tau protein, fibrillation.

ABSTRACT

Neurodegenerative diseases, the most common of which is Alzheimer's disease, represent a major public health problem in the world. The search for new therapeutic sources is imperative because the available treatments only alleviate the symptoms of the disease with a reduced effectiveness and varying from one individual to another. *Khaya grandifoliola* (Meliaceae) is used in traditional medicine for the treatment of various ailments. Studies with the extracts of this plant have shown anti-inflammatory, immunomodulatory and hepatoprotective activities testifying to the plant's ability to protect organs. However, studies showing the neuroprotective potential of the plant have not yet been carried out. Thus, the aim of this work was to study neuroprotective activities with emphasis on the modulation of protein factors involved in Alzheimer's disease. For this purpose, a hydroethanolic extract of *Khaya grandifoliola* (KG) was prepared by maceration of the bark powder in a water/ethanol mixture (65:35, v/v). The extract was fractionated by silica gel column chromatography and the neuroprotective activities as well as the mechanism of protection of extract and fractions were investigated. Regarding the neuroprotective activity of the extracts, the A β ₄₂ peptide-induced neurotoxicity induced was used. Cell viability tests were conducted with 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT) bromide and crystal violet. The staining of the nuclei of differentiated neuroblastoma cells was performed with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCDA), Hoescht 33342 and propidium iodide (PI) were performed. The neuroprotective properties of the extracts were subsequently evaluated by fluorescence detection of their effect on cell viability and the generation of reactive oxygen species (ROS). To understand the neuroprotective mechanism of these extracts, the expression of some proteins: mitochondrial SOD, caspase-3, Synptosomal associated protein 25 (SNAP25), synaptosin (SYP), tau protein (tau T181) and Extracellular signal-related kinase (ERK) was quantified by western blot. β -actin was used as an internal control. Regarding anti-amnesic activity of the extract, male albino wistar rats were intoxicated with scopolamine to induce amnesia. Behavioral tests were performed to assess depression (tail suspension test), anxiety (novelty suppressed feeding test), and memory (Morris water maze test). The effect of the extract on the activities of enzymes of the intracellular antioxidant system, acetylcholine esterase, phosphatases and the process of fibrillation were evaluated. The results demonstrated the maintenance of cell viability and the inhibition of the production of ROS demonstrated the neuroprotective action of extract. Western blot analysis revealed that KG extracts inhibit mitochondrial dysfunction, apoptosis, synaptic toxicity and tau protein hyperphosphorylation.

KG extract exhibits nootropic and chronic anti-amnesic effects. The chronic anti-amnesic effect was attributed to the increase of activity of antioxidant enzymes (SOD and CAT) and the level of reduced glutathione. The inhibitory effect was manifested by the decrease in acetylcholine esterase activity and the normalization of phosphatase activity. But also, the inhibition of the formation of fibrils which is a key step in the formation of aggregates that are deposited in the form of senile plaques or neurofibrillary tangles. This study demonstrated that KG extracts could possess neuroprotective properties against β -amyloid peptide and scopolamine toxicities. These observations suggest that the hydroethanolic extract of KG could be a good candidate for the development of new treatments against neurodegenerative diseases in general and Alzheimer's disease in particular.

Key words: *Khaya grandifolia*, neurotoxicity, A β 42 peptide, scopolamine, tau protein, fibrillation.

INTRODUCTION

INTRODUCTION GENERALE

La maladie d'Alzheimer (MA) est un trouble neurodégénératif qui altère la mémoire, les fonctions cognitives et conduit progressivement à une démence, une déchéance physique, une perte d'autonomie, ou à la mort de l'individu. La MA peut être d'origine familiale mais elle est le plus souvent sporadique (Selkoe, 2001). Elle est la première cause de démence dégénérative (environ 60 à 70% des cas) (Kuca *et al.*, 2016). L'évolution de la maladie provoque un déclin progressif de l'autonomie du patient et les premiers neurones atteints dans sont ceux situés dans l'hippocampe, zone responsable de la mémoire. L'âge est le premier facteur de risque. En effet, 5% de la population est affectée à partir de 65 ans et 20% à partir de 80 ans. Actuellement, 50 millions de personnes souffrent de démence et des études montrent que l'on devrait atteindre 152 millions d'ici 2050 (Cummings *et al.*, 2019). En Afrique, on dénombre près de 3,5 millions de cas de démence (*Alzheimer disease international*, 2018). Au Cameroun, on note une prévalence de 3,9% (Massi *et al.*, 2020). Cependant, une étude menée en 2018 a clairement démontré que 3,5% de la population camerounaise était âgée de 65 ans et plus (Tianyi *et al.*, 2019). Le diagnostic de la MA est très complexe et repose essentiellement sur les techniques d'imagerie. En absence de réel marqueur, la MA est le plus souvent confirmée sans ambiguïté *post mortem*. Les premières lésions cérébrales apparaissent 10 à 15 ans avant l'apparition des symptômes cliniques (Bourdenx *et al.*, 2017). L'absence d'outil diagnostique, le manque de traitement curatif, ainsi que le vieillissement de la population en font un véritable problème majeur de santé publique (Tanner *et al.*, 2014).

Les changements morphologiques du cerveau associés à la maladie sont une forte atrophie corticale, une dégénérescence neuronale, une altération des connections synaptiques, une gliose et une astrocytose. On note aussi la présence dans le tissu cérébral de deux types de lésions caractéristiques : les dépôts amyloïdes ou plaques séniles extracellulaires et des amas neurofibrillaires intracellulaires (Cummings *et al.*, 1998). Mais également une atteinte du système cholinergique à l'origine de troubles cognitifs importants, une perte neuronale et synaptique spécifiques à certaines régions antérieures de l'encéphale, une baisse du débit sanguin cérébral et de l'activité métabolique cérébrale (Vickers *et al.*, 2000).

Le peptide β -amyloïde et la protéine tau sont les deux protéines à l'origine de la MA. En effet, les plaques amyloïdes sont formées après la fibrillation des oligomères du peptide $A\beta$. Tandis que, les dégénérescences neurofibrillaires sont issues de l'hyperphosphorylation de la protéine tau à l'origine de la désorganisation des neurones qui

entraînerait, à terme, la mort de ceux-ci. Cette hyperphosphorylation de la protéine tau est due à un déséquilibre entre l'activité des kinases (enzymes responsables de la phosphorylation), et des phosphatases (enzymes responsables de la déphosphorylation) (Trojanowski, 1995).

Des efforts déployés pour combattre la MA sont focalisés sur le traitement des symptômes cliniques. Or, les changements neuropathologiques observés cliniquement apparaissent avant et deviennent essentiellement irréversibles au moment où ces signes apparaissent (Arshavsky, 2014). Les médicaments disponibles sont les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (donépézil, rivastigmine, galantamine) et la memantine qui est un antagoniste du récepteur N-méthyl-D-aspartate (NMDA) (Aisen *et al.*, 2012). Actuellement, aucun médicament modifiant la maladie n'est disponible et la prise en charge reste exclusivement symptomatique. Ces traitements symptomatiques tentent de contrebalancer la perturbation des neurotransmetteurs. Cependant, aucun nouveau médicament important n'a été approuvé au cours des 14 dernières années, malgré des essais cliniques approfondis. Plus de 400 essais menés ont échoué depuis l'approbation du dernier médicament symptomatique contre la MA (Jadhav *et al.*, 2019). Les médicaments approuvés pour le traitement de la MA concernent le stade de démence clinique et ciblent les systèmes neurochimiques sous-jacents au dysfonctionnement cognitif et aux symptômes comportementaux, avec seulement des effets symptomatiques à court terme (Hampel *et al.*, 2021). C'est une pathologie à laquelle apporter des solutions thérapeutiques constitue un enjeu sociétal majeur. Aussi, l'hétérogénéité de la MA, le manque de connaissances approfondies sur sa pathogenèse, les effets indésirables des anticholinergiques, leurs avantages limités (variant d'un individu à l'autre) et les approches thérapeutiques restreintes ouvrent de nouvelles perspectives pour la recherche de candidats anti-MA plus efficaces (Davinelli *et al.*, 2012).

Les plantes médicinales constituent une source intéressante dans la recherche de molécules bioactives, entre autres douées de propriétés neuroprotectrices (Bazzari A et Bazzari F, 2018; Roy, 2018 ; Tewari *et al.*, 2018 ; Khazdair *et al.*, 2019). Les activités neuroprotectrices des plantes médicinales ainsi que leurs composés actifs reposent essentiellement sur les propriétés antioxydantes (Penido *et al.*, 2017, Sereia *et al.*, 2019), inhibitrices de l'activité de l'acétylcholine estérase (Jazayeri *et al.*, 2014 ; Sobhani *et al.*, 2017), - inhibitrices de la fibrillation du peptide A β (Witter *et al.*, 2018), - anti-inflammatoires (Dzoyem et Eloff, 2015 ; Iskandar *et al.*, 2018), - anti-amyloïdogéniques (Chethana *et al.*, 2017 ; Panzella *et al.*, 2018), - inhibitrices des sécrétases (Seong *et al.*, 2017), - anti-veillessement et antiamnésique (Elufioye *et al.*, 2012). Toutes ces activités démontrent l'effet

des plantes médicinales ainsi que leurs composés actifs à protéger le cerveau. C'est le cas de *Khaya grandifolia* une plante de la famille des Meliaceae. Elle est utilisée en médecine traditionnelle pour soigner le paludisme, le cancer, les maladies fébriles, les ulcères et les convulsions (Mukaila *et al.*, 2021). Les travaux antérieurs effectués sur KG ont montré qu'elle possède des effets immunomodulateurs, anti-inflammatoires (Owona *et al.*, 2015, Mediesse *et al.*, 2018), antioxydants (Njayou *et al.*, 2015), cytoprotecteurs (Essama *et al.*, 2016) et hepatoprotecteurs (Kouam *et al.*, 2017). Cependant, l'effet neuroprotecteur de KG ainsi que son mécanisme d'action n'ont pas encore été explorés. Aussi l'effet protecteur observé au niveau foie nous a amené à penser que KG serait capable de protéger aussi le cerveau et constituerait par la même occasion un candidat potentiel dans le développement d'un médicament contre les maladies neurodégénératives en général et la MA en particulier.

HYPOTHESES DE RECHERCHE

Dans le cadre de notre travail, trois hypothèses ont été formulées en relation avec les objectifs spécifiques.

Hypothèse 1: Les extraits de KG ont des effets antioxydants et anti-apoptotiques ;

Hypothèse 2: Les extraits de KG inhibent les activités de certains paramètres impliqués dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer ;

Hypothèse 3: L'extrait brut de KG atténue les déficits comportementaux induits dans un modèle de la maladie d'Alzheimer.

OBJECTIFS

OBJECTIF GÉNÉRAL

L'objectif général de ce travail est de contribuer à l'identification des substances pouvant permettre de mieux lutter contre la maladie d'Alzheimer par modulation des facteurs protéiques impliqués dans cette affection par les extraits *Khaya grandifolia*.

OBJECTIFS SPÉCIFIQUES

Plus spécifiquement, il s'agissait de:

- (1) Déterminer l'effet des extraits de KG sur la production des espèces oxygénés réactives (EOR) et l'apoptose cellulaire;
- (2) Déterminer l'effet des extraits de KG sur le dysfonctionnement mitochondrial (SODmt), la toxicité synaptique (SNAP25 et SYP) et l'hyperphosphorylation de la protéine tau (ptau et ERK);
- (3) Déterminer l'effet de l'extrait brut de KG sur les paramètres biochimiques et les déficits comportementaux induit par la scopolamine chez le rat.

CHAPITRE 1: REVUE DE LITTERATURE

CHAPITRE 1 : REVUE DE LITTERATURE

1.1. LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL

1.1.1. Généralités

Le système nerveux (SN) effectue de tâches nombreuses et complexes qui se regroupent en 3 fonctions fondamentales :

- ❖ Une fonction sensitive de détection, grâce à des récepteurs qui détectent tous les changements dans l'organisme et l'environnement extérieur ;
- ❖ Une fonction d'intégration, permettant d'analyser et d'interpréter les informations qu'il reçoit des récepteurs ;
- ❖ Une fonction motrice permettant la contraction des diverses cellules musculaires de l'organisme grâce aux neurones moteurs, aussi appelés motoneurones (Purves *et al.*, 2011).

Le SN se subdivise en système nerveux central (SNC) et système nerveux périphérique (SNP). Le SNC est la partie du système nerveux qui se situe dans la boîte crânienne et la colonne vertébrale. Le SNC joue un rôle essentiel dans le comportement conscient et inconscient d'un individu. Il comprend le cerveau et la moelle épinière et il est protégé par la boîte crânienne et la colonne vertébrale. Il est formé de substance blanche et de substance grise (Gall, 2016). Le SNP comprend les filets nerveux retrouvés dans tout le corps. Le SN se caractérise par deux propriétés essentielles que sont l'excitabilité (la capacité de réagir à des stimuli de toute nature) et la conductivité (capacité à propager sur de longues distances l'excitation d'une cellule à l'autre) (Gall, 2016). Lors de la réception d'un signal provenant de l'environnement interne ou externe, diverses formes d'énergie sont traduites et encodées en impulsions électriques ou influx nerveux par des structures spécialisées appelées récepteurs. Ces signaux codés dans l'activité électrique des cellules sont transmis depuis le récepteur vers les centres nerveux où ils évoquent dans d'autres cellules certaines excitations qui sont intégrées puis distribuées aux systèmes effecteurs tels les muscles et les glandes. Cette activité qui est intégrée de façon harmonieuse produit des sensations et des réponses appropriées. Cela permet à l'organisme d'agir aux différents événements externes de façon à maintenir son intégrité et assurer la survie de l'espèce (Goffinet, 1994).

Le cerveau est composé du télencéphale et du diencephale. Le télencéphale est constitué de deux hémisphères séparés par la scissure interhémisphérique où pénètrent les méninges et est formé de :

- La substance grise externe appelée cortex qui contient 70% des neurones du cerveau, et considéré comme étant le centre de la conscience et de l'intelligence ;
- La substance blanche sous-jacente, qui correspond aux axones des neurones. Elle est constituée de fibre de myéline. La couleur blanche est due au contenu lipidique de la gaine de myéline qui entoure l'axone. La substance blanche est connue sous le nom d'hippocampe, qui est le siège de la mémoire, d'attention, d'émotion, et de comportement (Figure 1) ;
- Des structures profondes appelées noyaux gris centraux.

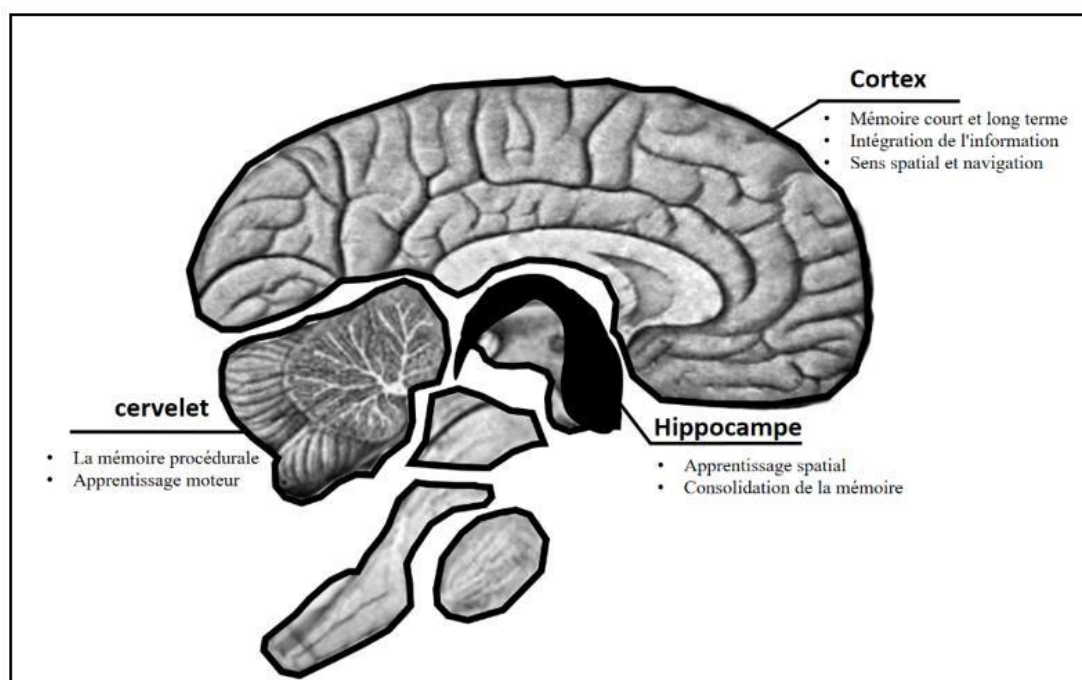


Figure 1. Les zones du cerveau et la mémoire.

Plusieurs zones du cerveau sont impliquées dans la mémoire. L'hippocampe est impliqué dans l'apprentissage spatial et la consolidation de la mémoire. Le cervelet joue un rôle dans la mémoire procédurale et l'apprentissage moteur. Le cortex cérébral joue un rôle clé dans différents types de mémoire (Leuner et al., 2010)

Le diencephale réunit les deux hémisphères cérébraux par le corps calleux et par le trigone cérébral. Il fait la jonction entre le télencéphale et le tronc cérébral. Ses principaux constituants sont le thalamus, où aboutissent toutes les sensations avant qu'elles soient projetées vers la conscience, et l'hypothalamus qui s'occupe du maintien de l'équilibre physiologique du corps. L'encéphale est constitué du tronc cérébral et du cerveau. Il contrôle la plupart des fonctions du corps, dont la perception, les mouvements, les sensations, les pensées, la parole et la mémoire.

L'élément principal du SNC est le neurone. Les neurones sont formés d'un corps cellulaire, d'un centre trophique et des prolongements (dendrites et axone) qui assurent la contiguïté de l'influx nerveux par l'intermédiaire des synapses (Figure 2). Cette communication s'effectue au moyen de neurotransmetteurs, libérés par le neurone et capables de stimuler ou inhiber d'autres (Moore *et al.*, 2010). Certains de ces réseaux sont responsables de fonctions très importantes telles que la mémoire, le langage, la concentration, la résolution de problèmes, l'humeur, le comportement (Paolicelli *et al.*, 2019). Ces réseaux sont spécifiquement touchés dans la maladie d'Alzheimer (MA), alors que ceux contrôlant les fonctions motrice et sensorielle sont épargnés (Stuchlik, 2014).

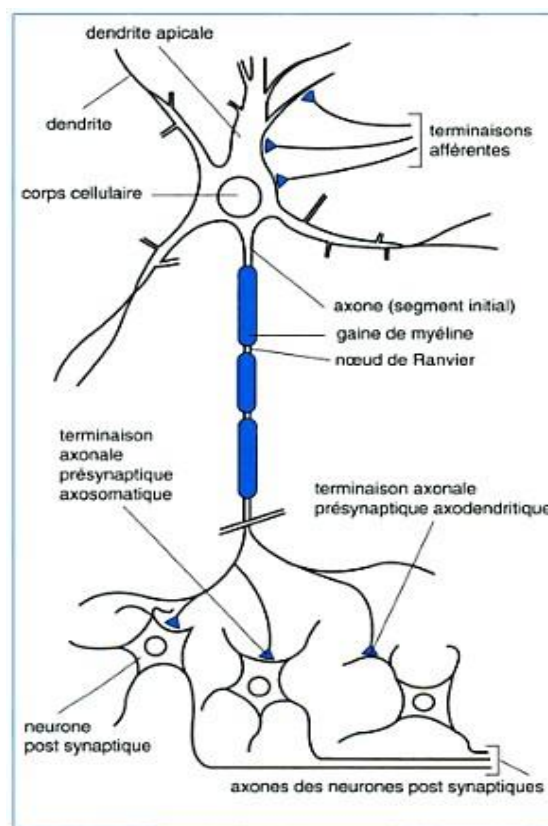


Figure 2. Schéma d'un neurone en connexion avec d'autres neurones (Guénard, 2001).

1.1.2. Bases biologiques de la mémoire

Le SN est constitué de milliards de neurones ayant des fonctions différentes. Le cerveau est l'un des organes les plus complexes du corps humain car il est formé par un réseau de neurones servant à intégrer les informations sensorielles et à décider du type de réponse (réponse motrice ou comportement). Chaque neurone reçoit des informations de milliers d'autres neurones par l'intermédiaire des connexions synaptiques, réparties le long de ses dendrites.

La mémoire est définie comme la capacité à interpréter, stocker et réutiliser les informations. Cependant, il faut noter que le comportement des animaux est très influencé par leur mémoire. L'apprentissage est considéré comme la phase d'acquisition ou d'interprétation de l'information de la mémoire. L'absence ou présence de mémoire est souvent définie comme un changement d'un comportement particulier, ou alors comme un changement de capacité apprendre/souvenir (Stuchlik, 2014). On distingue deux types de mémoire : la mémoire à court terme (MCT) encore appelée mémoire de travail, et la mémoire à long terme (MLT). La MCT est une sorte de bloc-notes où sont stockées les informations utiles pour une durée limitée. Cette capacité de retenir temporairement une information dans le but de mener à bien une tâche est spécifiquement humaine. Son contenu est régulièrement actualisé et effacé une fois les informations traitées. La mémoire de travail est nécessaire pour réaliser des activités cognitives complexes telles que la compréhension, l'apprentissage ou encore le raisonnement. La MLT est définie comme un système à capacité indéfinie, théoriquement illimitée, dans lequel l'information est détenue de façon durable et même pendant toute la vie. La MLT est dépositaire de nos souvenirs, de nos apprentissages, voire de notre histoire. Le passage de la MCT à la MLT s'effectue grâce à l'hippocampe, situé dans le repli du lobe temporal.

Toutes les informations décodées dans les aires sensorielles du cortex convergent vers l'hippocampe, qui les retourne ensuite à leur destination d'origine. Ce sont les multiples passages dans l'hippocampe qui nous permettent de retenir des faits nouveaux. Au bout d'un certain temps, le travail de l'hippocampe ne sera plus nécessaire, le cortex aura appris à lier lui-même les différentes caractéristiques pour en faire un souvenir. L'hippocampe tient donc un rôle essentiel, et indispensable à la formation des souvenirs et à leur conservation (de quelques mois à quelques années). Ces souvenirs restent stockés de façon permanente dans les régions corticales, et comme les neurones de l'hippocampe disposent des prolongements, cela leur permet de communiquer avec d'autres neurones de cortex. Des lésions de l'hippocampe et/ou des régions avoisinantes provoqueront une perte immédiate et dévastatrice de la mémoire (Stuchlik, 2014). Les informations que nous percevons sont organisées et régies par des systèmes qui fonctionnent en relation permanente. On peut noter d'une part une distinction entre la mémoire sémantique (mémoire des faits et des connaissances générales) et la mémoire épisodique (ou mémoire des événements). D'autre part, il existe aussi une différence entre la mémoire procédurale (capacités d'apprentissage d'une habileté motrice: lire, conduire...) et la mémoire déclarative (informations stockées facilement accessibles à la

conscience : langage et image). Le stockage de la MLT commence au niveau de la synapse. La transmission synaptique est considérée comme étant une communication cellule–cellule bidirectionnelle (Jessell et Kandel, 1993). La plasticité synaptique est placée au cœur de nombreux troubles de cerveau, et est caractérisée par deux manifestations électrophysiologiques importantes : la potentialisation à long terme (PLT) et la dépression à long terme (DLT). Les PLT et DLT sont des mécanismes cellulaires responsables de l'apprentissage hippocampique et de la mémoire (Bliss *et al.*, 2014).

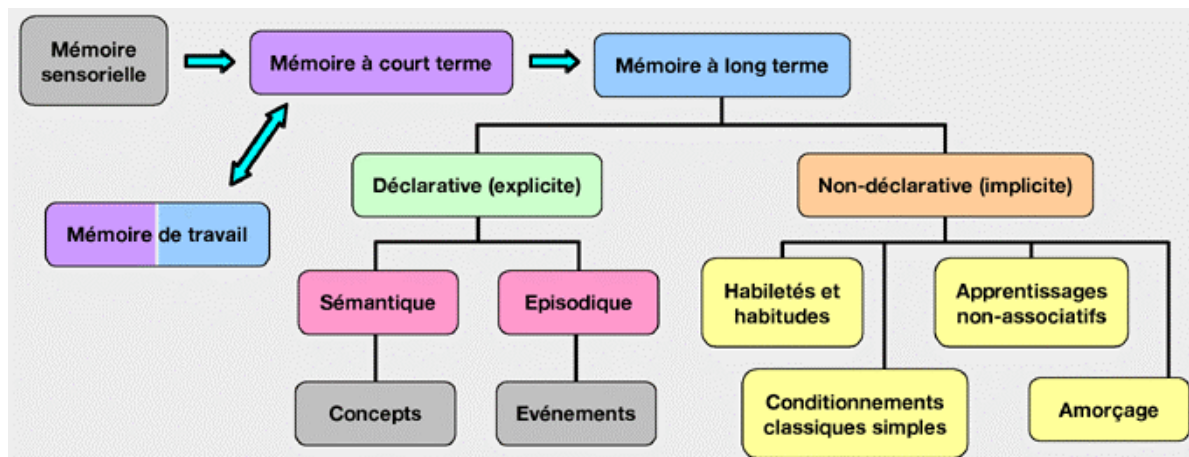


Figure 3. Les différents types de mémoire (Petit, 2006)

1.1.3. Cellules gliales du système nerveux central

Les cellules du SN peuvent être subdivisées en deux grands types : les neurones, qui sont des cellules spécialisées dans la réception, l'intégration et la transmission d'informations ; et les cellules gliales, qui sont 10 fois plus nombreuses que les neurones. Les cellules gliales assurent un support physique et un soutien nutritionnel des neurones (cellules nourricières). Le SNC comprend les cellules microgliales et macrogliales (astrocytes, épendymaires et oligodendrocytes), alors que le SNP comprend les cellules de Shawm.

1.2. LA MALADIE D'ALZHEIMER

La maladie d'Alzheimer (MA) représente 60 à 70% de tous les cas de démence dans le monde et demeure un problème de santé majeur (Alzheimer association, 2020). Elle a été décrite pour la première fois par Aloïs Alzheimer en 1907. La MA est un trouble neurodégénératif chronique et évolutif qui touche majoritairement les personnes âgées de 65 ans et plus. L'un des facteurs de risque majeur est l'âge. La progression de la MA est lente,

insidieuse, et caractérisée par une perte mnésique progressive, puis par un déclin cognitif sévère conduisant à la démence (Scheltens *et al.*, 2021).

Cependant, il est difficile de déterminer la cause véritable de la maladie d'Alzheimer. La cause est donc complexe et semble résulter d'une combinaison de multiples facteurs de risque tels que le régime alimentaire, les antécédents familiaux, l'hérédité génique de l'apolipoprotéine E (APOE)- ϵ 4, l'engagement social et cognitif et les lésions cérébrales traumatiques (Reitz *et al.*, 2020). Plus de 25 gènes ont également été identifiés comme facteurs de risque de la maladie (Verheijen et Sleegers, 2018).

La MA se caractérise par une neurodégénérescence progressive dans le cerveau. Les malades ont des symptômes qui évoluent et s'aggravent tout au long de la pathologie. Les signes caractéristiques de la maladie sont des pertes de mémoire, des difficultés à exécuter les tâches quotidiennes, des troubles du langage, une désorientation spatio-temporelle, un jugement amoindri, des changements d'humeur et de comportement, des modifications de la personnalité, et de la perte d'initiative (Morris *et al.*, 2011). Les patients atteints de la forme sévère de la maladie présentent des symptômes tels la confusion temporelle et spatiale, des problèmes de vision, une perte de la capacité à marcher ou à avaler, et plus tard la mort de la personne. Les patients âgés de plus de 65 ans ne vivent généralement qu'entre 4 à 8 ans après le diagnostic (*World Alzheimer's association*, 2017). La MA est aussi caractérisée par un vieillissement anormal et accéléré du cerveau dû à une neurodégénérescence insidieuse, progressive et irréversible.

1.2.1. Les différentes formes de la maladie d'Alzheimer

Dans plus de 90% des cas, la MA n'est pas héréditaire mais sporadique. C'est un ensemble d'évènements dont l'environnement, le mode de vie et le vieillissement de la population qui sont à l'origine de la maladie et de son développement (Ma *et al.*, 2017).

1.2.1.1. La forme familiale

La forme héréditaire de la MA est très rare (Scheltens *et al.*, 2021). Cette forme touche des patients jeunes et représentent environ 5% des cas observés (Bisht *et al.*, 2018). Elle se caractérise par un début de la maladie à un âge précoce et survient avant l'âge de 65 ans (bien avant 50 ans). Elle se transmet de façon autosomique dominante (si l'un des parents est porteur du gène muté, l'enfant aura une chance sur deux de porter ce gène et donc d'être déclaré malade). Trois gènes sont impliqués dans cette forme : le gène de l'amyloïde

précurseur de protéine (APP), les gènes des préséniles 1 et 2 (PS1, PS2) (Kulminski *et al.*, 2020 ; Levy-Lahad, 1995). Les mutations des gènes de la présénile sont responsables de plus de la moitié des cas génétiques de la MA (St Georges-Hyslop et Petit, 2005) et conduisent de façon directe ou indirecte à une augmentation de la production de peptide β -amyloïde particulièrement la forme $A\beta_{42}$ (Selkoe, 2001). L' $A\beta_{42}$ produit s'accumule dans le cerveau des personnes malades sous formes de plaques qui constituent l'une des principales lésions de la MA (Scheltens *et al.*, 2021, Guerrerio *et al.*, 2012).

1.2.1.2. La forme sporadique

La majeure partie des cas diagnostiqués sont sous la forme sporadique, c'est-à-dire qu'il s'agit d'un cas isolé sans relation avec le génotype de la famille du malade, mais en lien avec la génétique de l'individu lui-même. Cette forme présente les mêmes caractères pathologiques que ce que l'on retrouverait dans la forme familiale (Strittmatter *et al.*, 1993).

1.2.2. Caractéristiques cliniques

La MA est un trouble cérébral dégénératif et fatal qui est inévitable et inguérissable. Les personnes atteintes souffrent d'une perte neuronale continue et progressive ainsi qu'un déficit de connexions entre les cellules du cerveau (Selkoe, 2001). Ces anomalies sont des symptômes précurseurs couramment observés chez les patients atteints de la MA. La gravité des symptômes détermine le stade de la maladie. Il existe plusieurs stades de la maladie : le stade 1 (léger), le stade 2 (modéré) ou le stade 3 (sévère) (Breijyeh et Karaman, 2020). Le diagnostic de la maladie est difficile car les symptômes peuvent être confondus avec des signaux normaux liés au processus normal du vieillissement et peuvent être ignorés. Pour un diagnostic précoce et un traitement rapide, il est important de reconnaître les symptômes dès les premiers stades (Breijyeh et Karaman, 2020).

L'un des symptômes les plus courants de la MA est la perte de mémoire. Concernant la mémoire à court terme (MCT), le malade connaît d'énormes difficultés à se souvenir des informations récentes et nouvelles (Folch *et al.*, 2018). En conséquence, l'interaction sociale est interrompue et difficile à suivre. Avec le temps et l'évolution de la maladie, la mémoire à long terme (MLT) est également affectée. La perte de mémoire s'accompagne généralement de problèmes de langage (aphasie) tels que la difficulté à trouver les mots appropriés, ou le fait d'oublier des phrases couramment utilisées (Lu et Bludau, 2011).

Les activités de raisonnement et de réflexion, comme la résolution de problèmes et la prise de décisions sont également affectées, ce qui démontre une déficience des fonctions cognitives conduisant à une désorientation exprimée par un sens du temps déformé, une difficulté à suivre une séquence d'activités et des routines quotidiennes autrefois faciles à remplir. Les problèmes liés au comportement en sont une autre caractéristique, et un des signes clairs est les sauts d'humeur et de personnalité qui entraînent un changement émotionnel inattendu et rapide (Castellani *et al.*, 2010). Les sentiments d'apathie, d'irritabilité et d'hostilité sont courants, mais aussi la dépression provoquée par des modifications chimiques du cerveau dues à la maladie.

De plus, l'un des tous premiers signes de déclin cognitif est l'apparition de l'agnosie c'est-à-dire la capacité à traiter les informations sensorielles. Les malades ne reconnaissent pas ce qu'ils voient; ils ne comprennent pas la signification de ce qu'ils regardent (Giannakopoulos *et al.*, 1999). Un autre signe crucial de détérioration cognitive est l'apraxie. Il s'agit de l'incapacité à accomplir les activités motrices de base connues telles que s'habiller, marcher ou manger (Lu et Bludau, 2011).

1.2.3. Physiopathologie de la maladie d'Alzheimer

La recherche a établi l'existence de deux caractéristiques distinctives dans le cerveau des personnes atteints de la MA. Il s'agit des plaques d'amyloïde bêta ($A\beta$) et des dégénérescences neurofibrillaires (DNF) (D'Errico et Meyer-Luehmann, 2020). Les DNFs sont formées des enchevêtrements de la protéine tau hyperphosphorylée, et les plaques extracellulaires à partir de l'agrégation du peptide bêta-amyloïde (Castellani *et al.*, 2010 ; Dalvi, 2012). Au cours des vingt dernières années, la théorie de la cascade amyloïde s'est développée et a dominé l'orientation de la recherche sur la MA (Bertram *et al.*, 2010). La séquence de cette théorie commence par le clivage de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP) par les sécrétases spécifiques (α et γ) produisant une forme d'oligomères $A\beta$ neurotoxique qui s'agglomèrent pour produire les plaques (D'Errico et Meyer-Luehmann, 2020). La théorie de la cascade amyloïde suggère que les quantités d' $A\beta$ dans le cerveau déclenchent des modifications de la protéine tau et le développement ultérieur des DNFs (Muralidar *et al.*, 2020 ; Nam *et al.*, 2020). Ces traits caractéristiques se disséminent ensuite dans tout le cerveau partant des structures temporales médiales (hippocampe) jusqu'aux structures limbiques adjacentes pour conquérir tout le cortex (Dalvi, 2012).

De nos jours, les chercheurs mettent de plus en plus l'accent sur l'inhibition de l'hyperphosphorylation de la protéine tau aboutissant aux DNFs qui constituent un composant intégral conduisant aux troubles neurocognitifs. La protéine tau est un groupe de protéines solubles produites par l'épissage alternatif de l'ARNm de tau (Johnson et Stoothoff, 2004 ; Stoothoff et Johnson 2005). La caractéristique la plus distinctive de cette phosphoprotéine dans les neurones est de maintenir la stabilité et l'assemblage des microtubules (MTs). De plus, ces fonctions importantes sont régulées par l'état de phosphorylation de cette protéine (Brunello *et al.*, 2020). Cependant, en raison du nombre important de sites de phosphorylation, près de 20% de la protéine peut être phosphorylée ou déphosphorylée par d'innombrables protéines kinases et phosphatases, permettant ainsi une hyperphosphorylation inhabituelle et la transformation d'une protéine tau favorisant l'assemblage de MTs dans les conditions normales (Soeda et Takashima, 2020). La phosphorylation qui se produit dans les neurones provoque le détachement progressif de la protéine tau des microtubules, produisant une phosphorylation et un clivage pathologiques de la protéine par des protéases formant des oligomères (Brunello *et al.*, 2020). Ces oligomères forment des paires de filaments hélicoïdaux (PFH) qui sont des dépôts insolubles s'entrelaçant pour créer les DNFs ; contrairement à la protéine tau normale soluble (Soeda et Takashima, 2020).

En résumé, dans un cerveau en bonne santé, l'information est transférée du corps du neurone à la synapse. Ce signal créé traverse le cytosquelette constitué de MTs stabilisés par la protéine tau. Lorsque la protéine tau est séparée des microtubules, le squelette du neurone perd son intégrité. Ceci provoque la dégénérescence de la cellule ainsi que la perte de connectivité entre les neurones aboutissant finalement à la mort cellulaire.

1.2.4. Facteurs de risque

Plusieurs causes sont proposées pour la MA, mais jusqu'à présent, aucune d'elles n'est en relation directe avec la maladie. De plus, la MA est un processus très complexe affecté par divers facteurs pendant une période prolongée. De nombreux facteurs de risque ont été décrits, parmi lesquels le stress chronique (Bisht *et al.*, 2018), le surpoids (Moser et Pike, 2016), le diabète de type 2 (Butterfield *et al.*, 2014), la dépression (Rodrigues *et al.*, 2014) et le sexe : les deux tiers des malades sont des femmes (Riedel *et al.*, 2016). L'âge est le facteur de risque majeur et le plus puissant. Bien que la MA ne soit pas un stade de vieillissement normal, le risque associé à l'âge adulte augmente avec les années. Après 65 ans, les chances

de présenter la maladie doublent tous les cinq ans et, dans ce cas, le sexe joue également un rôle important car les femmes sont plus affectées que les hommes (Dalvi, 2012).

Les facteurs génétiques représentent également une menace dans la survenue de la MA. Le fait de venir d'une famille avec des antécédents représente un risque plus élevé. Néanmoins, les gènes familiaux ne sont pas déterminants pour la MA, bien qu'ils soient importants (Selkoe, 2001). Au début de la maladie (moins de 1% des cas), trois mutations génétiques prolifèrent : le gène APP (chromosome 21), la préséniline 1 (chromosome 14) et la préséniline 2 (chromosome 2). Lorsqu'un des parents présente une de ces altérations, chaque enfant a une probabilité de 50% d'obtenir les gènes mutés (Uronen et Huttunen, 2016). Le polymorphisme au niveau de l'apolipoprotéine E (APOE) est déterminant, puisque l'allèle $\epsilon 4$ du gène codant cette protéine favorise une hypercholestérolémie, est le principal facteur de risque génétique de la maladie d'Alzheimer sporadique (Yamazaki *et al.*, 2019). Cette protéine existe trois isoformes que sont $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ et $\epsilon 4$. Le gène allèle ApoE, plus précisément l'allèle $\epsilon 4$ présente un risque plus élevé de survenu de la MA avec plus de 70% des cas (Caselli *et al.*, 2017).

La fréquence de l'allèle $\epsilon 4$ est très augmentée (35 à 40 %) chez les sujets atteints de la MA. Cette association allélique a d'abord été retrouvée chez les malades âgés, puis ayant étendu à des sujets ayant un âge de début plus précoce. Il existe un effet de dosage génétique puisque le risque de développer la MA, comparé à celui des individus non porteurs de l'allèle $\epsilon 4$, est augmenté de deux à trois fois pour les porteurs d'un allèle $\epsilon 4$ et de 12 à 15 fois pour les porteurs de deux allèles (El Kadmiri *et al.*, 2013). De plus, la séquestration d'APOE $\epsilon 4$ dans les plaques amyloïdes, à cause de son affinité importante avec $A\beta$ (Manelli *et al.*, 2004), pourrait altérer la distribution du cholestérol et des autres lipides dans le cerveau (Yamazaki *et al.*, 2019). Un effet sur l'agrégation de tau est également observé, mais seulement en présence de plaques amyloïdes : cet effet est donc considéré comme indirect et médié par $A\beta$ (Yamazaki *et al.*, 2019).

Les maladies vasculaires constituent un autre facteur de risque de la MA. Le cerveau consomme une grande quantité de sang transportée par les vaisseaux sanguins. Toute lésion des vaisseaux sanguins perturbant le flux sanguin pourrait désormais porter atteinte aux fonctions cérébrales. Les maladies vasculaires posent un risque de survenu de la MA. L'hypertension, l'hypercholestérolémie et le diabète sont tous des éléments déclencheurs d'une maladie vasculaire (Dalvi, 2012). Le mode de vie et le manque d'activité physique peuvent affecter négativement les fonctions cognitives (Chen *et al.*, 2009).

1.3. LES TRAITS HISTOPATHOLOGIQUES DE LA MALADIE D'ALZHEIMER

Dans le cerveau des patients atteints de la MA, on retrouve deux types de lésions bien distinctes provoqués par l'agrégation et le dépôt de deux protéines : le peptide β -amyloïde et la protéine tau.

1.3.1. L'Amyloïde Précurseur de Protéine (APP)

L'hypothèse de la cascade amyloïde renseigne que l'agrégation de l'A β est la première étape cruciale au début de la pathologie de la MA (Hardy et Selkoe, 2002). L'A β est le constituant principal des plaques amyloïdes qui accélèrent ainsi l'apparition de la maladie (Glennner et Wong, 1984 ; Johnson et Stewart, 2012).

1.3.1.1. L'APP

L'APP est une glycoprotéine transmembranaire de type 1 avec des protéines homologues hautement conservées chez les mammifères qui incluent également d'autres protéines APP telles que la protéine 1 (APLP1) et 2 (APLP2). L'APP est exprimée de manière constitutive dans le corps, mais de façon plus abondante dans le cerveau, en particulier dans les neurones. Le gène humain de l'APP se situe sur le chromosome 21, avec environ 240 kb (Zheng et Koo, 2011) et a été cloné pour la première fois en 1987 (Kang *et al.*, 1987). Elle possède une grande région N-terminal extracellulaire, et une courte région cytoplasmique C-terminal. Il existe huit isoformes sont issues de l'épissage alternatif des ARNm de l'APP et les trois principales sont : APP695, APP751 et APP770. Les isoformes APP751 et APP770 contiennent un domaine extracellulaire appelée domaine de type Kunitz qui possède des propriétés inhibitrices des protéases (De Strooper et Annaert, 2000 ; Zheng et Koo, 2011). La variante APP695 ne contient pas ce domaine spécifique ce qui fait d'elle la forme trouvée principalement dans les neurones (Zheng et Koo 2006). Ces protéines ont en commun plusieurs motifs conservés, comme les domaines extracellulaires E1 et E2 et la séquence en acides aminés YENPTY, impliqués dans l'endocytose de ces protéines. L'APP joue également un rôle important dans la formation et le maintien des synapses, la survie neuronale et la croissance neuritique (Penke *et al.*, 2017).

1.3.1.2. Structure de l'APP

L'APP est caractérisée par un grand ectodomaine N-terminal, soumis à l'excision par les sécrétases α et β , un domaine transmembranaire contenant partiellement la séquence β de

l'amyloïde et un court domaine intracellulaire C-terminal probablement impliqué dans la signalisation intracellulaire (Haass, 2004 ; Kang *et al.*, 1987) (Figure 4).

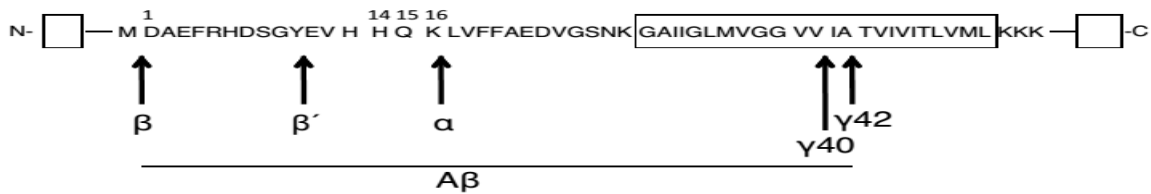


Figure 4. Schéma de l'amyloïde précurseur de protéine (APP).

1.3.1.3. Traitement protéolytique de l'APP: sécrétases α-, β-, γ-

L'APP subit des modifications post-traductionnelles telles que : la N- ou O-glycosylation, la phosphorylation et la sulfatation de la tyrosine (Haass *et al.*, 2012). Suite à ces modifications, le traitement protéolytique séquentiel de l'APP par les sécrétases α, β et γ a lieu dans la voie de la sécrétion. Le clivage du domaine extracellulaire presque complet est réalisé par les sécrétases α- et β-, et il en résulte la production des APP APPα et APPβ solubles, respectivement (Figure 5). La β-sécrétase neuronale principale (BACE1) est une aspartyl protéase transmembranaire connue sous le nom d'enzyme de clivage APP du site β. Les fragments restants attachés à la membrane, appelés fragments α- et β-carboxyterminaux ou CTFα et CTFβ, sont en outre clivés par la sécrétase γ à différentes positions, générant soit le peptide P3 de CTFα, soit les peptides Aβ de CTFβ. Le clivage par la sécrétase γ conduit à la production des domaines intracellulaires de l'APP (Lichtenthaler *et al.*, 2011 ; Haass *et al.*, 2012).

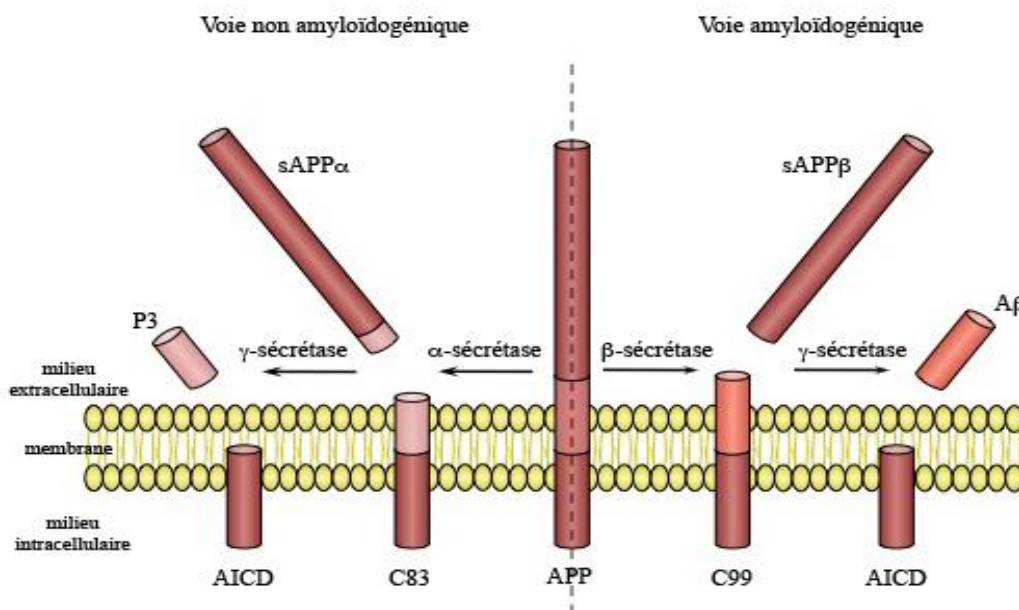


Figure 5. Clivage protéolytique de l'APP par les sécrétases (Chen *et al.*, 2017)

Une production et/ou dégradation non équilibrée de peptides A β ₄₂ fortement agrégés conduit à l'accumulation et à l'agrégation ultérieure de ce peptide. Le peptide A β produit en abondance forme les premiers oligomères appelés protofibrilles, puis les fibrilles et enfin les plaques amyloïdes (Martins *et al.*, 2008 ; Rijal *et al.*, 2012). La neurotoxicité médiée par les récepteurs β est en réalité plus liée aux oligomères des protéines β , plutôt qu'aux monomères ou aux fibrilles. Il a été démontré que les oligomères favorisent la dérégulation du calcium et la perturbation des membranes (Demuro et Parker, 2005).

1.3.2. Le peptide bêta amyloïde

Le peptide A β est une petite protéine composée de 39 à 43 acides aminés. Les deux isoformes majeurs du peptide sont A β ₄₀ (forme soluble) et A β ₄₂ (forme insoluble) dont la concentration est très élevée chez des individus atteints de la maladie. Dans les conditions physiologiques, la forme A β ₄₀ est retrouvée à plus de 90% et A β ₄₂ à près de 5% (Goedert *et al.*, 2015 ; Sun *et al.*, 2015). Le peptide A β est l'initiateur critique de la progression de la MA à travers son accumulation et son agrégation dont le processus peut être provoqué par une surproduction d'A β ou une clairance de perturbation. L'A β étant généré de l'APP par clivage séquentiel impliquant les sécrétases β et γ (Sun *et al.*, 2015).

Cependant, la forme oligomérique du peptide serait la plus toxique. En effet, l'hypothèse des oligomères du peptide A β a été introduite en 1998. Il a été proposé que les dommages observés dans le cerveau lors de la MA sont initiés par les fragments solubles d'A β . Ces oligomères agissent en reproduisant les traits neuropathologiques observés dans la MA comme la pathologie de tau, la perte synaptique, l'inflammation et le stress oxydatif (Cline *et al.*, 2018).

1.3.2.1. Les isoformes du peptide bêta amyloïde

Il existe plusieurs isoformes d'A β . La position spécifique du clivage protéolytique par la γ -sécrétase étant variable, la séquence peut comprendre 38 à 43 acides aminés. Cependant, il existe des voies de clivages préférentielles. Ainsi, l'isoforme A β ₁₋₄₀ est produite de façon prépondérante contrairement à l'A β ₁₋₄₂ espèce faiblement générée ne représentant que 5 à 10 % de la quantité d'A β ₁₋₄₀ (Qi-Takahara *et al.*, 2005). Or, le peptide A β ₁₋₄₂ constitue l'isoforme qui suscite le plus d'intérêt durant les dernières décennies car il est le composant majoritaire des plaques séniles. Ses 2 résidus supplémentaires en bout de chaîne (isoleucine et

alanine) lui confèrent une hydrophobicité accrue et une propension plus importante à s'agréger en milieu physiologique (Gu et Guo, 2013). La séquence de l'A β ₁₋₄₂ est la suivante :

¹DAEFRHDSG¹⁰YEVHHQKLVF²⁰FAEDVGSNKG³⁰AIIGLHVGGV⁴⁰VIA⁴².

Il est important de noter que l'hydrophobicité de la partie C-terminale de ce peptide est le facteur physicochimique qui limite sa solubilité et favorise son agrégation. Cette caractéristique est capitale car elle indique la raison pour laquelle A β ₁₋₄₂ se trouve être le composant initial des plaques séniles observées dans le cerveau, en plus d'en être le composant majoritaire (Iwatsubo *et al.*, 1994). Etant donné la forte corrélation entre l'agrégation de ce peptide et la neurodégénérescence, l'A β ₁₋₄₂ est considéré comme l'agent pathogène central parmi les peptides produits par la voie amyloïdogène dans le développement de la MA. Des études ont démontré que la gravité du déclin cognitif observé chez la forme précoce (familiale) de la maladie d'Alzheimer était associée à une forte production d'A β ₁₋₄₂ (Mayeux *et al.*, 1999) et que l'augmentation du ratio A β ₁₋₄₂/ A β ₁₋₄₀ est associée à la sévérité de la démence (Eckman *et al.*, 1997).

1.3.2.2. La fibrillation du peptide A β ₁₋₄₂

L'agrégation ou autoassemblage du peptide A β ₁₋₄₂ résulte du repliement anormal du peptide qui forme par la suite des fibres amyloïdes. Ces fibres possèdent des propriétés très spécifiques. Elles sont résistantes à la protéolyse, riches en feuillets- β et présentent des propriétés optiques de biréfringence et tinctoriales, notamment au rouge de Congo (Nilsson, 2004) mais aussi à la thioflavine T (ThT) (Biancalana et Koide, 2010). Le processus de fibrillation adopte généralement un profil sigmoïdal caractéristique, associé à trois différentes étapes.

1.3.2.3. Les oligomères du peptide A β ₁₋₄₂

Si l'agrégation du peptide A β ₁₋₄₂ est très étroitement liée à la MA puisque le processus conduit à la formation des plaques séniles, il existe en revanche une discordance entre le développement des plaques et le degré du déclin cognitif. En effet, des observations *postmortem* ont rapporté la présence importante de plaques dans le cerveau d'individus n'ayant montré aucun signe de démence avérée de leur vivant (Soldan *et al.*, 2020). Ceci a fortement remis en question la causalité potentielle de l'agrégation d'A β ₁₋₄₂ sur l'induction de la neurotoxicité et forcé à revoir l'hypothèse amyloïde. L'analyse de ces plaques a démontré

un aspect diffus, lié à la structure dénuée de fibres amyloïdes ce qui les différencie intrinsèquement des plaques séniles (Dickson, 1997).

La distinction majeure ayant été faite entre ces deux types de plaques concerne les proportions résiduelles en espèces oligomériques du peptide A β . Ces espèces solubles de faibles masses molaires sont abondantes dans les plaques amyloïdes alors que les plaques diffuses en sont pauvres (Esparza *et al.*, 2013). Les recherches se sont alors davantage axées sur l'étude des oligomères d'A β ₁₋₄₂ qui constituaient dès lors les acteurs pathogènes potentiels des plaques amyloïdes. Certaines études se sont révélées majeures car elles ont démontré le caractère délétère et neurotoxique de ces espèces oligomériques *in vivo* (Shankar *et al.*, 2008) contrairement à la forme monomérique du peptide (Shankar *et al.*, 2007) ou celle des fibres (Kayed *et al.*, 2003). De nombreux travaux ont depuis consolidé la relation entre la toxicité et l'état d'agrégation oligomérique du peptide (Borlikova *et al.*, 2013). Si la pathogénèse de la MA est aujourd'hui solidement corrélée à ces espèces oligomériques, il n'existe cependant pas de consensus sur l'origine de leur formation.

Différentes hypothèses ont également été avancées pour justifier le caractère toxique propre à ces espèces oligomériques ; elles se démarquent de la forme monomérique et des fibres d'A β ₁₋₄₂. L'origine probable de la toxicité de ces oligomères proviendrait de leurs singularités morphologiques et structurales caractéristiques. Elles sont souvent globulaires et adoptent surtout une structure secondaire en feuillets β antiparallèles (Berthelot *et al.*, 2012). Le monomère est aléatoirement organisé et les fibres sont structurées en feuillets β parallèles (Gremer *et al.*, 2017)

1.3.3. Les plaques séniles

Les plaques séniles sont un des traits neuropathologiques de la MA. Ces plaques sont extracellulaires et constituées majoritairement d'agrégats insolubles de peptides A β _{40/42}. La présence de ces protéines fibrillaires disposées en feuillets plissés pour former les plaques séniles fait de la MA, une amylose (Flavin *et al.*, 2017). Ces dépôts sont retrouvés au niveau cortical, plus particulièrement dans la substance grise des couches néocorticales II et III, mais également dans l'hippocampe, siège de la mémoire. Avec l'évolution de la maladie, ces dépôts tendent à se généraliser à l'ensemble du cerveau (Scheltens *et al.*, 2021).

1.3.4. La protéine tau

La protéine tau « *tubulin associated unit* » est une protéine essentielle à la stabilisation des neurones du cerveau. Dans le cas de la MA, les protéines tau s'agrègent anormalement et seraient à l'origine de la dégénérescence neuronale. La protéine tau est une phosphoprotéine découverte en 1975. En effet, Weingarten et collaborateurs ont pu mettre en évidence un facteur essentiel dans la conversion des dimères de tubuline en anneaux qui, dès lors peuvent s'assembler en microtubules qu'ils ont nommés tau (Weingarten *et al.*, 1975).

La protéine tau est hautement conservée et trouvée exclusivement chez les animaux eucaryotes (Goedert *et al.*, 1989 ; 1996) ; et est associée aux microtubules (Buée *et al.*, 2000). Cette protéine est principalement localisée dans le SNC à l'intérieur des neurones (axones). Son rôle physiologique consiste à stabiliser les dimères de tubuline (microtubules). Ces derniers sont des composants du cytosquelette impliqués dans la morphologie cellulaire, la division cellulaire et le transport d'organelles (mitochondries, lysosomes, vésicules d'endocytose et d'exocytose). Les microtubules peuvent s'assembler et se désassembler selon un processus dynamique. Ainsi la stabilisation de ces assemblages par la protéine tau est essentielle pour assurer le transport axonal dans les neurones. La protéine tau est impliquée dans plusieurs maladies neurodégénératives dont la MA (Buée *et al.*, 2000). Dans la MA, comme la protéine tau est anormalement phosphorylée, la connaissance de sa structure, de ses modes de régulation ainsi que ses fonctions sont importantes pour appréhender cette pathologie.

L'évolution des DNFs dans les différentes structures du cerveau pourrait expliquer le déclin cognitif (Braak et Braak, 1991). Les filaments appariés en hélice constitués de protéine tau se répandent de façon stéréotypée, séquentielle et hiérarchique au sein des structures du cerveau et ont établi une classification en stades reflétant l'envahissement progressif des différentes régions du cerveau (Figure 6).

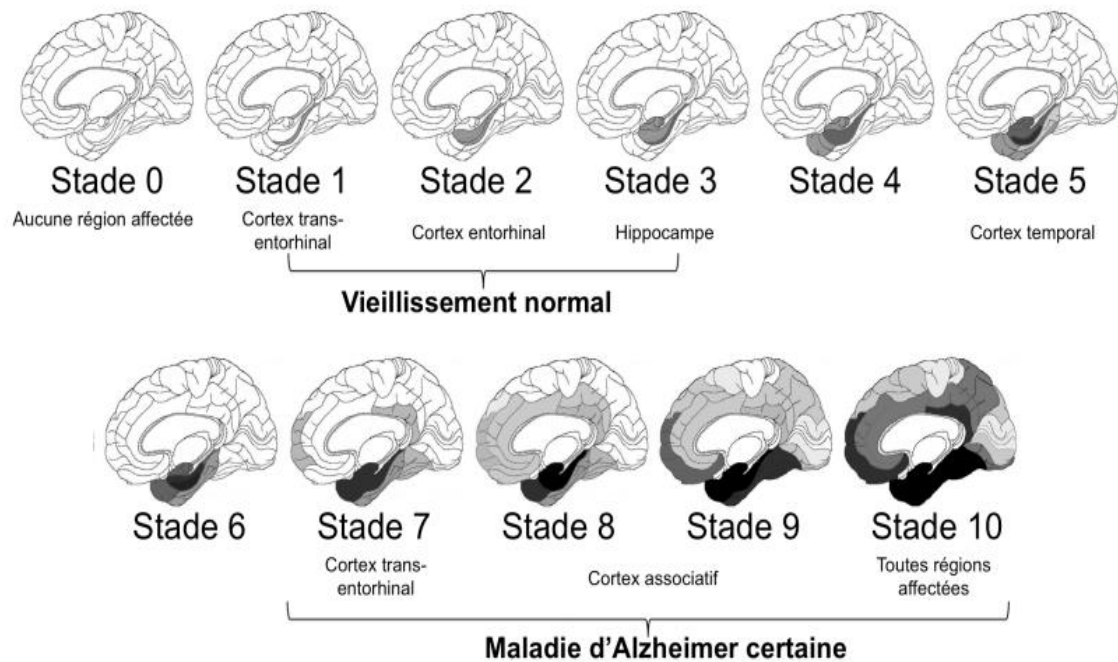


Figure 6. Les différents stades de progression de la formation des DNF dans les compartiments du cerveau dans le cas d'un vieillissement normal et dans le cas de la MA. (Braak et Braak, 1991).

1.3.4.1. Génétique de la protéine tau

La protéine tau humaine est codée par le gène MAPT ("microtubule associated protein tau") qui est situé sur le locus 17q21 et est constitué de 16 exons (Goedert *et al.*, 1989). La protéine tau est considérée comme l'une des protéines les plus particulières du SNC (Jadhav *et al.*, 2019). L'ARNm de tau est principalement exprimé dans les neurones du cerveau. On la retrouve aussi dans les astrocytes et oligodendrocytes (Ahmed *et al.*, 2011), et également dans le cœur, le muscle squelettique, les poumons et les testicules, et en de plus faibles proportions dans l'estomac et le foie (Gu *et al.*, 1996). Aussi, elle est située dans plusieurs compartiments cellulaires, dont l'axone, les dendrites, le noyau, le nucléole, la membrane cellulaire et les synapses. Cependant, tau est également présent dans le liquide interstitiel et peut passer dans le liquide céphalorachidien à des concentrations de 10-25 pg/mL (pT181-tau) ou 300-400 pg/mL (tau) (Jadhav *et al.*, 2019). Le gène de la protéine tau comporte 16 exons numérotés (-1, 1, 2, 3, 4, 4A, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 et 14) (Sotiropoulos *et al.*, 2017) (Figure 7).

Plusieurs domaines au sein de la protéine ont été identifiés. On note qu'une région acide située en position N-terminal, une région riche en proline présente au centre de la protéine et une région C-terminal. Cette région C-terminal est constituée d'un domaine de

liaison aux microtubules contenant quatre motifs de répétition (R1 à R4) et constituant la partie basique de la protéine contenant 352 à 441 acides aminés (Muralidar *et al.*, 2020 ; Buée *et al.*, 2000). Deux familles d'isoformes existent selon la présence ou non du motif R2 résultant de la traduction de l'exon 10 du gène de la protéine (Scholz et Mandelkow, 2014). On distingue ainsi trois isoformes tau-3R (ou 10-) dépourvues du motif R2, des trois isoformes tau-4R (ou 10+) contenant le motif R2. Ces isoformes se différencient également selon l'absence d'une séquence de 29 acides aminés codée par les exons 2 ou 3 (0N ou 2+3-), la traduction d'une de ces séquences (1N ou 2+3-) ou des deux séquences (2N ou 2+3+) (Goedert *et al.*, 2015).

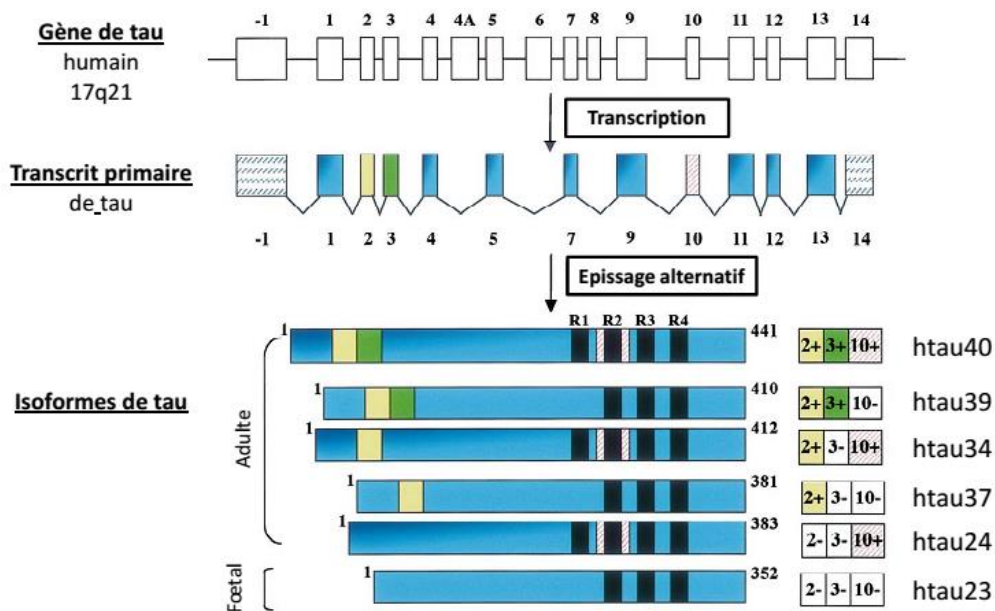


Figure 7. Schéma de l'expression des six isoformes de la protéine Tau (Šimić *et al.*, 2016)

Dans le cerveau, ces six isoformes différents retrouvés (Figure 7), sont générés par épissage alternatif (Šimić *et al.*, 2016). Une isoforme plus longue comprend un exon supplémentaire et est exprimée dans le SNP (Goedert 1992 ; Couchie 1992). L'isoforme 0N4R est la seule isoforme présente au stade fœtal tandis que les autres isoformes sont exprimées à l'âge adulte. Les isoformes 4R possèdent une meilleure affinité pour les microtubules et les stabilisent davantage. Les six isoformes ont été retrouvées en quantités égales dans les DNFs extraits de cerveaux de patients atteints de la MA. Elles apparaissent dans la région de l'hippocampe puis s'étendent dans le cortex cérébral. Les voies de propagation de ces lésions sont corrélées au degré de perte neuronale ce qui a permis une subdivision de la maladie en phases cliniques (Braak et Braak, 1991).

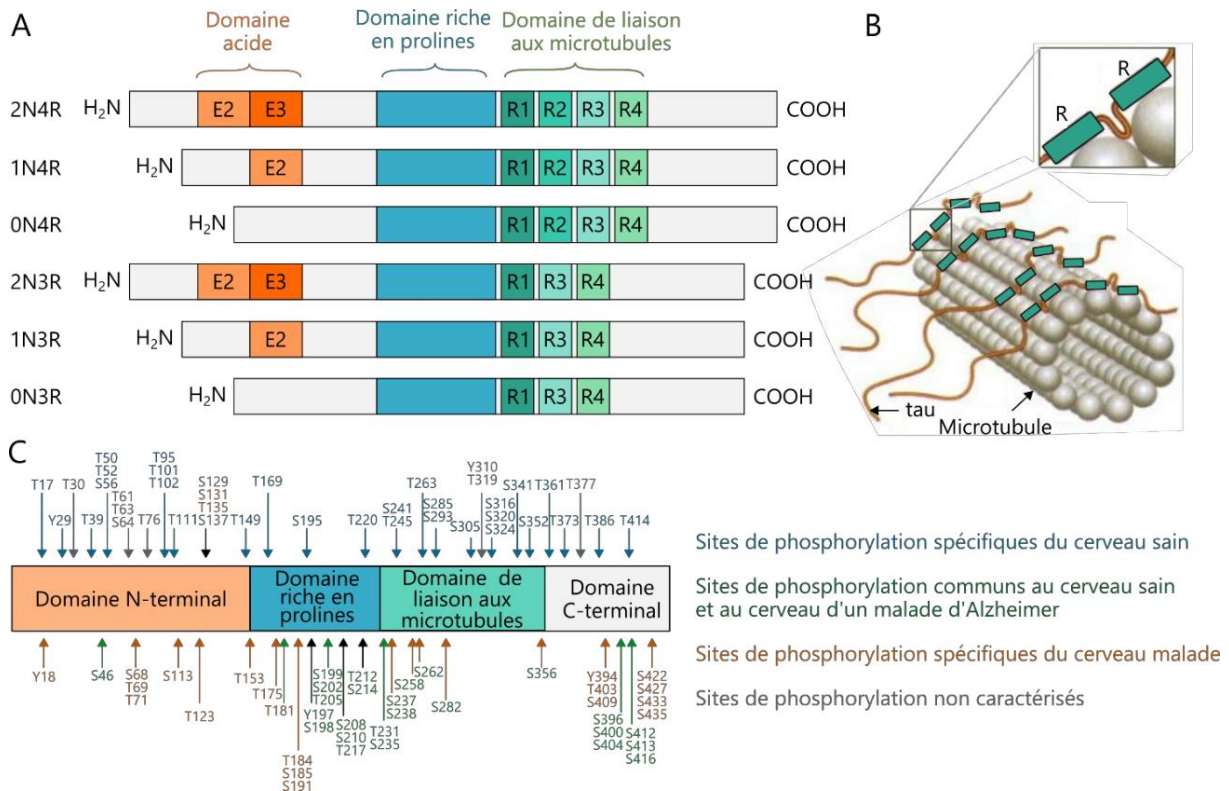


Figure 8. Les différentes isoformes de tau obtenues par l'épissage alternatif du gène MAPT montrant ses différentes régions (Gibbons *et al.*, 2019 ; Šimić *et al.*, 2016).

A: Représentations schématiques des six isoformes de la protéine tau. Les exons 2 et 3 sont notés E2 et E3. Les régions répétées R1, R2, R3 et R4 correspondent aux exons 9, 10, 11 et 12 soumis à un épissage alternatif. B: Schématisation de l'interaction entre la protéine tau et les microtubules. C: Représentation des sites de phosphorylation de la protéine tau dans les conditions physiologiques normales et dans le cerveau d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer. Les sites indiqués en bleu sont spécifiques du cerveau sain, les sites en orange sont spécifiques du cerveau Alzheimer, les sites en vert sont communs au cerveau sain et au cerveau malade et les sites en gris ne sont pas entièrement caractérisés.

La protéine tau est constituée de 2 domaines majeurs : un domaine d'association aux microtubules (MTs) en C-terminal contenant 3 à 4 séquences de 18 acides aminés hautement similaires et un domaine N-terminal appelé domaine de projection et dont la fonction est peu connue. Ce domaine N-terminal est lui-même composé d'une extrémité acide et d'une région riche en proline (Figure 8). La protéine tau remplit de nombreuses fonctions physiologiques, dont la régulation de la dynamique des MTs et intervient aussi dans des cascades de transduction du signal.

Les exons 2, 3 et 10 subissent un épissage alternatif, tandis que les exons 4A, 6 et 8 sont uniquement transcrits dans le SNC (Panda *et al.*, 2003). Chez l'Homme, dans le SNC, l'épissage alternatif du transcrit primaire de tau génère 6 isoformes ayant un poids moléculaire

apparent compris entre 60 et 74 kDa. La plus courte de ces isoformes est la seule exprimée chez le fœtus. Son expression persiste à l'âge adulte (Buee *et al.*, 2000).

1.3.4.2. Structure et fonctions de la protéine tau

La protéine tau est globalement hydrophile. C'est la raison pour laquelle une conformation linéaire (Figure 9) (Mukrasch *et al.*, 2009).

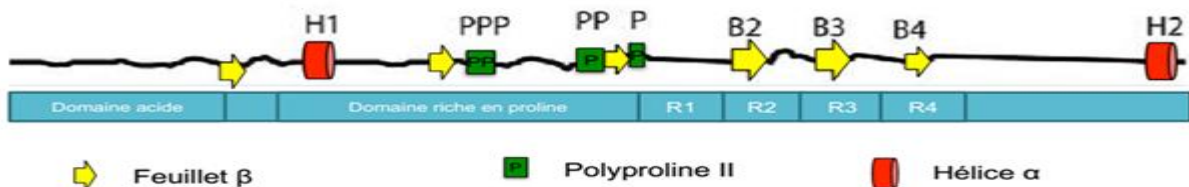


Figure 9. Éléments structuraux de la protéine tau.

La majorité de la chaîne protéique est dépliée (ligne noire). On retrouve quelques éléments adoptant une structure secondaire en feuillets β, hélice α ou domaine polyproline II (Mukrasch *et al.*, 2009).

La protéine tau est une protéine intracellulaire. Au sein du neurone, elle occupe principalement les axones, mais est retrouvée également au niveau des synapses, du noyau ou de la membrane (Buée *et al.*, 2000). En fonction de son emplacement subcellulaire, tau jouera un rôle différent, et adapté à sa localisation. La fonction la plus connue et la plus caractérisée de tau est la liaison aux MTs, qui a lieu dans les axones.

La protéine tau a la particularité d'avoir des points isoélectriques (pI) de charges opposées au niveau de ses régions N- et C-terminales (pI N-term = 3,8 et pI C-term = 10,8) (Figure 10). Le pI de la protéine tau est généralement compris entre 6,5 et 9,5 en fonction de la présence des exons 2, 3 (ce qui augmente le caractère acide de la protéine) ou 10 (ce qui augmente le caractère basique de la protéine). Comme pour toutes protéines, les différentes modifications post-traductionnelles agissent sur le pI de tau (Sergeant *et al.*, 2008).

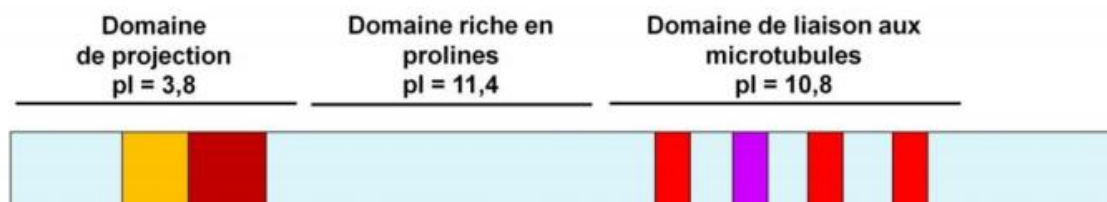


Figure 10. Points isoélectriques de la protéine tau en fonction des domaines particuliers. Selon la nature des domaines de projection, riches en prolines ou de liaison aux microtubules, les points isoélectriques varient et confèrent un caractère acide à la partie N-terminale et un caractère basique dans la partie C-terminale de la protéine tau (Buée *et al.*, 2000).

a. Tau : protéine d'association aux microtubules

La protéine tau est une protéine associée aux MTs (Cleveland *et al.*, 1977). Les MTs, les filaments d'actine et les neurofilaments forment le cytosquelette neuronal intervenant dans divers processus cellulaires. Dans le cerveau, les MTs permettent le transport intracellulaire de protéines, de vésicules et d'organites entre le soma des neurones et les extrémités axonales et dendritiques, jusque et depuis les synapses, bien souvent éloignées du site de synthèse des protéines et neurotransmetteurs. Le transport vers la périphérie ou vers le soma fait intervenir respectivement les protéines motrices, les kinésines ou les dynéines (Hirokawa et Takemura, 2005). La protéine tau, en tant que stabilisateur des MTs participe donc au bon fonctionnement de ces mécanismes de transport (Sotiropoulos *et al.*, 2017). Il est probable que dans un contexte physiologique, le bon fonctionnement du réseau de transport microtubulaire requiert une labilité entre fixation et détachement de tau aux MTs (McVicker *et al.*, 2011).

Les MTs permettent aussi de maintenir le diamètre et la polarité axonales au niveau du neurone. La protéine tau, de par sa liaison aux MTs permet leur maintien à distance les uns des autres (Hirokawa *et al.*, 1989). Deux modifications sur la protéine tau peuvent moduler son efficacité de liaison aux MTs. D'une part, les isoformes de tau contenant 4 domaines de répétitions (4R) ont une plus grande affinité pour les MTs et sont plus efficaces pour promouvoir leur assemblage que les isoformes en contenant 3 (3R) (Gustke *et al.*, 1994). D'autre part, l'affinité de tau pour les microtubules est régulée par son état de phosphorylation. Normalement phosphorylé, tau se lie aux microtubules et permet leur polymérisation. Davantage phosphorylée elle s'en détache (Šimić *et al.*, 2016) (Figure 11).

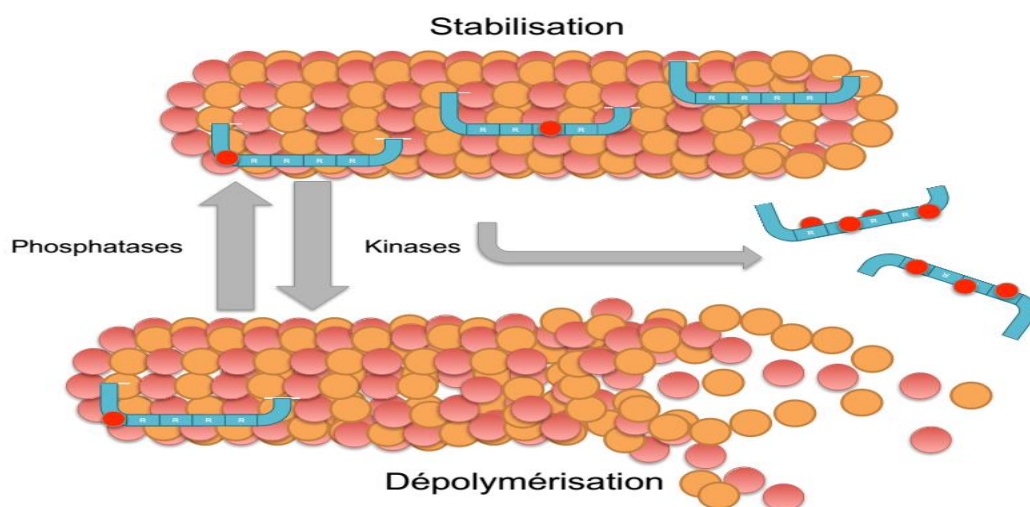


Figure 11. Régulation de la dynamique microtubulaire par tau.

Sous forme globalement déphosphorylée, tau lie et stabilise les microtubules. Sous l'action de kinases (groupements phosphate représentés par un disque rouge), tau davantage phosphorylé a une affinité réduite pour les microtubules, et s'en détache, menant à leur dépolymérisation (Hervy et Bicout, 2019).

Ainsi, l'état de phosphorylation de tau est un point primordial dans la balance d'assemblage et de désassemblage des microtubules. Outre sa fonction de liaison et de stabilisation des microtubules, de nombreux autres partenaires de liaison à la protéine tau ont été identifiés.

b. Autres partenaires et fonctions rapportées de la protéine tau.

Un nombre important d'autres partenaires de tau a été identifié (Buée *et al.*, 2000, Mandelkow et Mandelkow, 2012). La protéine tau joue aussi un rôle fondamental premièrement dans la localisation nucléaire car en se liant aux acides nucléiques, elle est impliquée dans la remodelisation chromatique. Cette association de la protéine tau à l'ADN permet de protéger la cellule contre le stress oxydatif ; et son association à l'ARN permet la stabilité des ribosomes. Par la suite, tau intervient dans la signalisation cellulaire car elle interagit avec plusieurs kinases et phosphatases capables de phosphoryler ou déphosphoryler plus de 85 sites présents sur cette protéine. Enfin, la sécrétion de tau dans le cytosol est stimulée par l'activité neuronale (Jadhav *et al.*, 2019).

Ainsi, la protéine tau peut interagir avec des éléments du cytosquelette dont les filaments d'actine (Fulga *et al.*, 2007), les neurofilaments (Aamodt et Williams, 1984), la dynactine (Magnani *et al.*, 2007), la kinésine (Utton *et al.*, 2005). La protéine tau peut aussi se lier à des kinases comme la GSK-3 β (Sun *et al.*, 2002), la sous unité P85- α de la PI3K et Lck (Reynolds *et al.*, 2008), les tyrosine kinases Fyn et Src (Lee *et al.*, 1998, Ittner *et al.*, 2010, Burnouf *et al.*, 2013). Elle se lie également aux membranes plasmiques et sous forme déphosphorylée et indépendamment de ses domaines répétés (Maas *et al.*, 2000, Pooler *et al.*, 2012). La protéine tau interagit également avec la protéine 14-3-3 (Chen *et al.*, 2011), impliquée dans la régulation du métabolisme de l'insuline (Neukamm *et al.*, 2012). Dans un contexte physiologique, il semblerait que la protéine tau puisse se localiser au niveau synaptique, se fixer aux protéines d'assemblage PSD-95 et, sous forme phosphorylée y jouer un rôle clé dans la signalisation du récepteur NMDA en modulant son activité (Mondragon-Rodriguez *et al.*, 2012).

1.3.4.3. Modifications post-traductionnelles de tau : la phosphorylation

La protéine tau peut subir une dizaine de modifications post-traductionnelles différentes parmi lesquelles la O-glycosylation, la glycation, la prolyl-isomérisation ou la troncation (Martin *et al.*, 2011 ; Šimić *et al.*, 2016 ; Kontaxi *et al.*, 2017 ; Tapia-Rojas *et al.*, 2019). Cependant, la modification posttraductionnelle la plus importante en termes de résidus touchés et de pertinence physiopathologique est la phosphorylation. Aussi, la troncation apparaît comme un mécanisme aux conséquences pathophysiologiques importantes, puisqu'il servirait à la nucléation en faveur de la formation de DNF (de Calignon *et al.*, 2010, Kovacech et Novak, 2010).

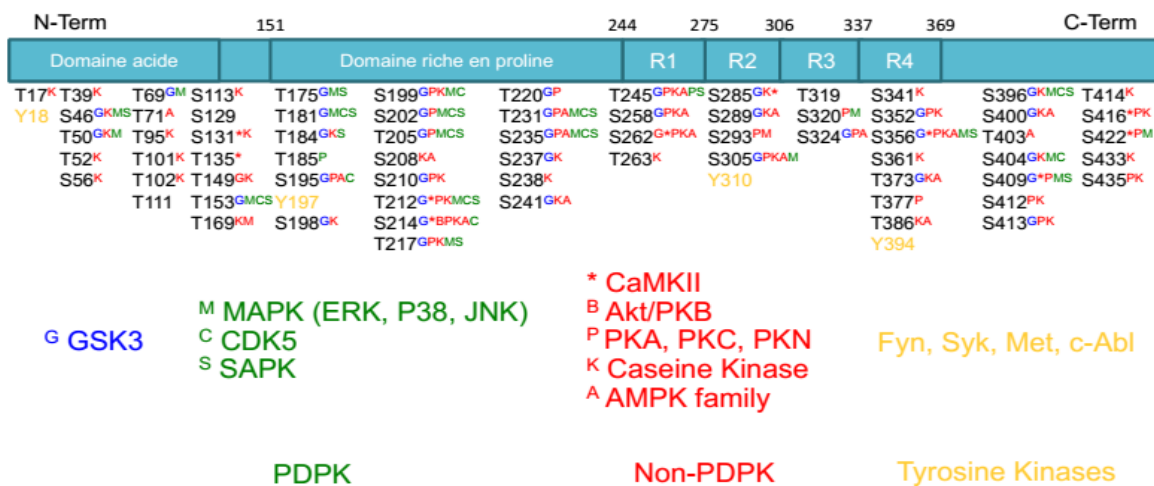


Figure 12. Diagramme non exhaustif des différents sites de phosphorylation de tau par ses kinases.

Ne sont représentés que les sites dont on a éventuellement identifié les kinases qui les phosphorylent (les kinases potentielles de 15 des 85 sites de phosphorylation de tau n'ont pas encore été identifiés). (Mandelkow et Mandelkow, 2012 ; Tapia-Rojas *et al.*, 2019).

Il existe 85 sites potentiels de phosphorylation de la protéine tau (Figure 12). La majorité des sites de phosphorylation sont situés autour des domaines d'interactions aux microtubules, le domaine riche en proline qui le précède, et la région C-terminale de tau. On distingue deux types de phosphorylations. L'hyperphosphorylation consiste en la présence de plusieurs résidus phosphorylés sur une même protéine tau, et/ou une augmentation du nombre de protéines tau phosphorylées sur un résidu (Ksiezak-Reding *et al.*, 1992 ; Köpke *et al.*, 1993), ces résidus pouvant être retrouvés phosphorylés en conditions physiologiques. La phosphorylation anormale est constituée de résidus phosphorylés sur des sites qui, en conditions physiologiques ne le sont jamais (Buée *et al.*, 2000 ; Delobel *et al.*, 2002).

L'étude de la phosphorylation de tau est considérablement facilitée par de nombreux outils immunologiques permettant la détection des épitopes phosphorylés ou non (Figure 13).

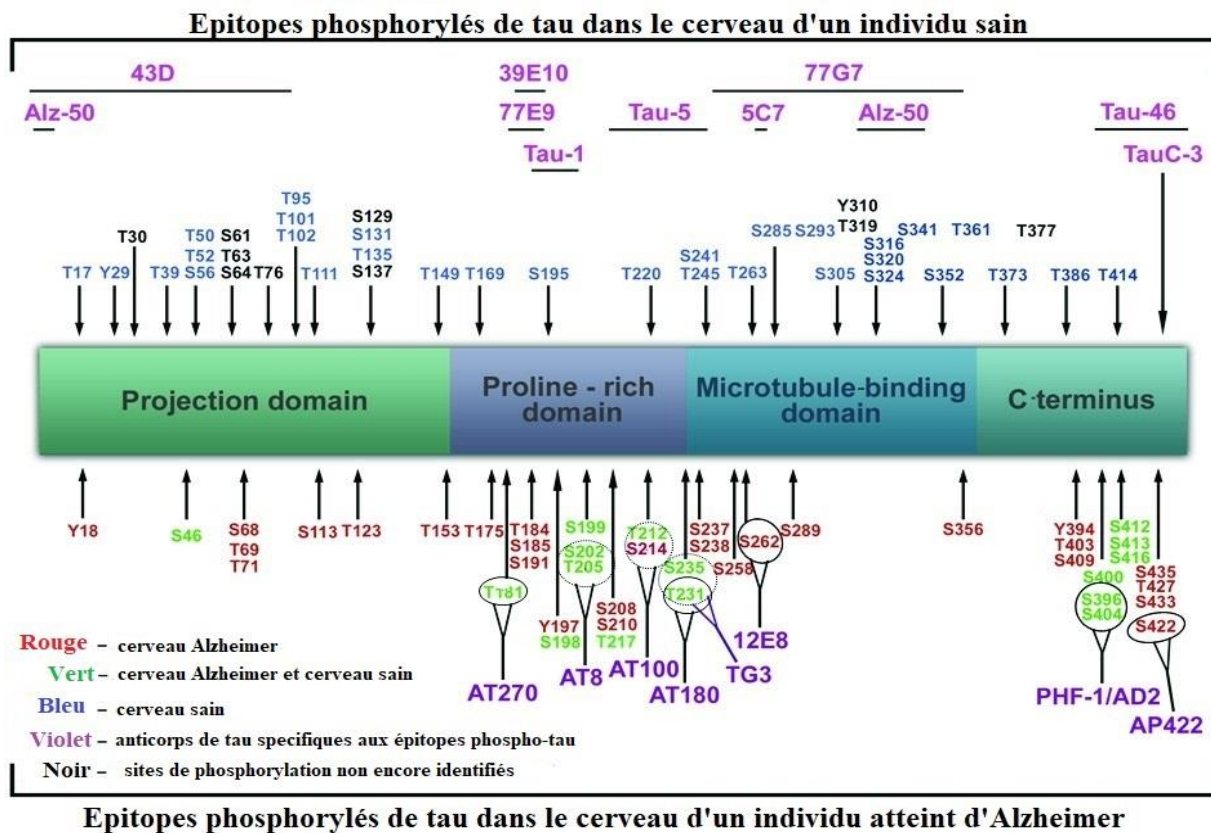


Figure 13. Sites de phosphorylation de tau et les anticorps spécifiques des épitopes.

Alz-50 (aa 2–10, aa 312–342), *43D* (aa 1–100), *77E9* (aa 185–195), *39E10* (aa 189–195), *Tau-5* (aa 210–230), *5C7* (aa 267–278), *Tau-1* (aa 195, 198, 199 et 202), *77G7* (aa 270–375), *Tau-46* (aa 404–441), *TauC-3* (tau clivée sur aa 421). Rouge—cerveau atteint d'Alzheimer; Vert—cerveau atteint d'Alzheimer et cerveau sain; Bleu—cerveau sain; Noir—sites de phosphorylation pas encore caractérisés; Violet—anticorps spécifiques de tau pour les épitopes phospho-tau; Rose—anticorps spécifiques de tau pour les épitopes de tau non phosphorylés (Šimić *et al.*, 2016).

L'état de phosphorylation de tau est sous le contrôle fin de l'action de kinases et de phosphatases.

a. Kinases

Une vingtaine de kinases ont été identifiées et subdivisées en 4 groupes distincts (Sergeant *et al.*, 2008) (Figure 14). Le groupe des kinases qui ciblent les prolines phosphorylent tau sur les sérines ou thréonines qui sont suivies d'un résidu proline (*Proline Dependent phospho Kinase* (PDPK)). Ce groupe inclut les kinases dépendantes des cyclines (CDK), les *Mitogen Activated Protein Kinases* (MAPK) et plusieurs protéines kinases

activées par le stress (JNK). Les non PDPK incluent notamment les MARK, la protéine calcium-calmoduline kinase de type II (CaMKII), la protéine Kinase dépendante de l'AMPc (PKA), la PKB/AKT, les PKC et PKN. Le troisième groupe est constitué d'une kinase phosphorylant tau sur des résidus sérine ou thréonine suivi ou non par une proline. C'est le cas de la glycogène synthétase kinase 3-β (GSK3-β). Le quatrième groupe correspond aux tyrosines kinases tels que les Src kinases dont fait partie Fyn (Sergeant *et al.*, 2008). Les mécanismes conduisant à la phosphorylation de tau par ces kinases sont complexes, pouvant mettre en jeu des phénomènes d'amorçage (Singh *et al.*, 1997 ; Wang *et al.*, 2007) ou d'isomérisation (Hamdane *et al.*, 2006).

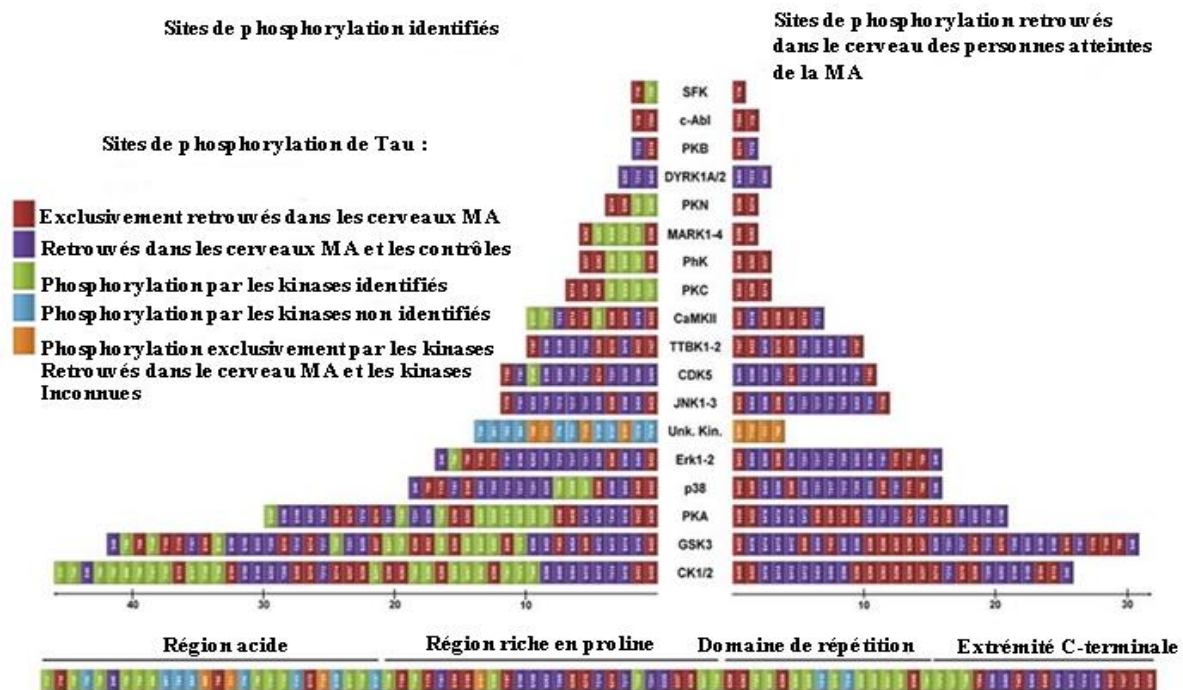


Figure 14. Pyramide des kinases de tau (Martin *et al.*, 2011).

b. Phosphatases

Si les kinases de tau ciblent des résidus particuliers, les phosphatases, au contraire sont moins spécifiques. La déphosphorylation de tau est menée par l'action des phosphatases que sont PP1, PP2A, PP2B et PP5 (Liu *et al.*, 2005). Ces phosphatases sont capables de déphosphoryler tau au niveau des résidus d'acides aminés Thr 181, Ser199, Ser202/Thr205, Thr212, Ser214, Ser235, Thr231, Thr231, Ser262, Ser396, Ser404 et Ser400, Ser404, Ser409 et Ser415 (Buée *et al.*, 2000 ; Kolarova *et al.*, 2012 ; Cao *et al.*, 2018). La phosphatase majeure de tau est PP2A, et son action compte pour 70% de l'activité phosphatase de tau dans le cerveau (Torrent et Ferrer, 2012 ; Pinheiro et Faustino, 2019). La prolyl-isomérase Pin1 de tau, en agissant sur le site Thr231 conduit à un changement conformationnel permettant

l'accès facile de tau à PP2A (Hamdane *et al.*, 2006) et de ce fait peut contribuer à la déphosphorylation de tau (Figure 15).

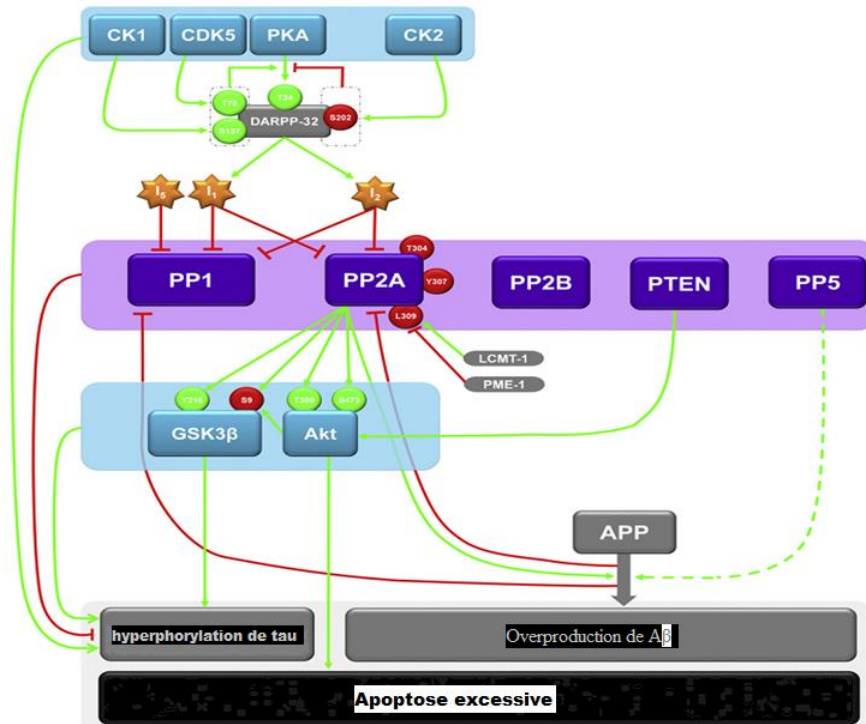


Figure 15. Contribution des phosphatases de la protéine tau dans la maladie d'Alzheimer.

Les phosphatases de tau (en violet) et les kinases de tau (en bleu) sont impliquées dans l'hyperphosphorylation de Tau. La stimulation de la phosphorylation de la phosphatase/kinase est indiquée en vert alors que l'inhibition de la phosphorylation est en rouge. Les inhibiteurs endogènes des phosphatases de tau sont représentés en orange. PP1: protéine phosphatase-1; PP2A: protéine phosphatase-2A; PP2B: protéine phosphatase-2B; PP-5: protéine phosphatase-5; PTEN: homologue de la phosphatase et de la tensine défecté sur le chromosome 10; APP: protéine précurseur de l'amyloïde; I1 PP2A: inhibiteur-1 de PP2A; I2 PP2A: inhibiteur-2 de PP2A; LCMT-1: leucine carboxyméthyltransférase-1; PME-1: phosphatase méthylestérase-1; PKA: protéine kinase dépendante de l'AMP cyclique; PKC: protéine kinase C; CK1: caséine kinase-1; CK2: caséine kinase-2; GSK3: glycogène synthase kinase-3 (Martin *et al.*, 2011).

1.3.4.4. Mécanismes par lesquels la protéine tau pourrait contribuer au phénotype mémoire de la MA

La protéine tau est indéniablement en cause dans la MA. Au cœur des filaments appariés en hélice, constituants de la DNF, tau est abondamment phosphorylée (Sergeant *et al.* 1995, Grundke-iqbal *et al.*, 1986), et ce, à raison de 2 à 3 fois plus de moles de phosphates par mole de protéine tau que dans le cerveau de patients non atteint de MA (Köpke *et al.*, 1993). Ce lien de cause à effet entre tau et la MA est corroboré par la notion que certaines

tauopathies sont causées par des mutations sur le gène tau, et conduisent à sa phosphorylation et son agrégation (Spillantini *et al.*, 1998).

Cependant, chez les patients atteints de MA, le gène de tau ne présente pas de mutation. L'étude des mécanismes conduisant à l'agrégation de tau dans la MA soulève plusieurs hypothèses comme les dérégulations de la phosphorylation (Buée *et al.*, 2000). L'hyperphosphorylation et la phosphorylation anormale de tau sont au cœur des hypothèses mettant en avant tau dans les désordres cognitifs dont souffrent les patients atteints de MA. Cette phosphorylation abondante sur tau peut agir dans la pathologie.

a. La perte de fonctions physiologiques de la protéine tau

La perte de fonction liée à un excès de phosphorylations, qui dans leur proportion et leur localisation ne sont pas physiologiques amènera à l'incapacité de tau de mener à bien ses nombreuses fonctions cellulaires et subcellulaires. Par exemple, la phosphorylation de tau au niveau de certains résidus de serine sur les domaines R1 à R4 réduit l'affinité de tau pour les microtubules (Drewes *et al.*, 1995 ; Dickey *et al.*, 2007). Les observations identiques ont été faites pour la phosphorylation au niveau des résidus de thréonine (Sengupta *et al.*, 1998). De manière générale, un excès de phosphorylation conduit à une désorganisation du cytosquelette microtubulaire (Li *et al.*, 2007) et perturbe le transport axonal (Bramblett *et al.*, 1993). Ensuite, au vu des nombreuses fonctions accessoires de tau, et notamment au niveau de son implication dans diverses voies de signalisation comme celle du récepteur NMDA à la synapse (Mondragon-Rodriguez *et al.*, 2012), son rôle protecteur de l'ADN (Sultan *et al.*, 2011), on peut supposer qu'une perte de fonction de la protéine tau aura des conséquences sur l'ensemble de ses fonctions.

b. Perte de fonctions pathogéniques de la protéine tau

Dans les modèles animaux KO-tau, la délétion de tau réalisée peut avoir des conséquences protectrices dans certains cas. Plusieurs études rapportent le potentiel protecteur de la délétion de tau sur la toxicité de A β (Mamun *et al.*, 2020). Une déficience en protéine tau rétablit les déficits cognitifs induits par le transgène APP humain dans un modèle de souris hAPP (Mucke *et al.*, 2000).

c. Gain de fonction anormale de la protéine tau

L'hypothèse prédominante commence par l'hyperphosphorylation, qui confère à tau un gain de fonction toxique (Mamun *et al.*, 2020). L'hyperphosphorylation de tau semble

favoriser son détachement des MTs, puis son assemblage sous forme de paire de filaments hélicoïdaux (PHF) (Goedert, 1996; Liu *et al.*, 2007) et induire le recrutement de protéines tau normales afin de former des agrégats (Alonso *et al.*, 1996; Sato *et al.*, 2002). D'autres facteurs et modifications post-traductionnelles de tau peuvent influencer son agrégation comme la troncation, la glycation ou la O-glycosylation (de Calignon *et al.*, 2010, Kovacech et Novak., 2010).

Récemment, il a été constaté que les formes solubles de protéines tau agrégées possèdent un pouvoir toxique plus important que les formes non solubles et déposées. Dans un modèle de souris permettant une expression contrôlée dans le temps d'un transgène tau humain pathologique (P301L), qui surexprime la protéine tau mutée et agrégée, l'utilisation d'un inhibiteur de kinases a réduit substantiellement le phénotype moteur de cette souris. Ceci s'est produit en parallèle avec la diminution de la quantité de protéines tau hyperphosphorylées, sans pour autant réduire la quantité de dégénérescences neurofibrillaires (DNFs) (Le Corre *et al.*, 2006). De même, dans ce modèle, l'arrêt de l'expression de tau conduit à une diminution des formes solubles agrégées de tau, sans diminuer le nombre de DNFs, et cela s'accompagne d'améliorations cognitives (Santacruz *et al.*, 2005). Enfin, la DNF à elle seule ne semble pas provoquer de mort neuronale (de Calignon *et al.*, 2010). Ainsi, tout comme dans la recherche sur le peptide β -amyloïde, il est suggéré que les formes hautement agrégées de protéines tau puissent être des réservoirs de protéines tau sous forme peu toxique.

La stabilisation des microtubules par la protéine tau est également régulée par son niveau de phosphorylation. En effet, cette protéine contient 80 résidus sérine et thréonine dont une trentaine se sont avérés être phosphorylés (Buée *et al.*, 2000). Plusieurs de ces sites sont situés notamment de part et d'autre ou à l'intérieur des motifs de répétition. La régulation de la balance entre phosphorylation et déphosphorylation est effectuée respectivement par des kinases et phosphatases, permettant ainsi la régulation de l'affinité de la protéine tau pour les microtubules. La forme non phosphorylée de la protéine tau se lie préférentiellement aux microtubules. Dans sa forme pathologique, la protéine tau est hyperphosphorylée, ce qui entraîne son détachement des microtubules et provoquant ainsi un désassemblage de ces derniers (Kolarova *et al.*, 2012). Cette anomalie de phosphorylation serait causée principalement par un dérèglement de l'activité de kinases et de phosphatases. La glycogène synthétase kinase 3β (GSK- 3β) qui est reconnue comme la kinase qui phosphoryle 50 à 55% des sites de la protéine tau, jouerait un rôle important en conditions physiologiques et pathologiques. Il a été montré *in vitro* et *in vivo* que cette enzyme serait responsable de la

phosphorylation de plusieurs résidus entraînant un changement de conformation et un mauvais repliement de la protéine tau.

Dans sa forme native, la protéine tau est désordonnée, très flexible, hautement soluble et résiste à des traitements agressifs tels que des températures élevées et des traitements acides (Mandelkow *et al.*, 2007). De la même façon, les PHF sont très résistants aux températures et forces ioniques élevées mais sont désassemblés par les détergents et des valeurs extrêmes de pH ce qui pourrait suggérer la formation de ponts salins dans leur structure. La liaison des PHF à des colorants tels que la thioflavine S (ThS) et la thioflavine T (ThT) indique qu'ils possèdent une structuration en feuillets β croisés (Friedhoff *et al.*, 1998 ; Gamblin *et al.*, 2003). Leur motif observé par diffraction aux rayons X confirme qu'ils contiennent des structures en feuillets β croisés (distance entre les brins de 4,7 Å et espacement entre les feuillets β de 10 Å) (Berriman *et al.*, 2003). La fibrillation de la protéine tau est très lente *in vitro* lorsqu'elle n'est pas phosphorylée et nécessite de concentrations élevées en protéine (Gamblin *et al.*, 2003 ; Carlson *et al.*, 2007). Cette fibrillation pour des faibles concentrations en protéine peut être accélérée par des inducteurs polyanioniques (Carlson *et al.*, 2007) tels que l'héparine (Friedhoff *et al.*, 1998 ; Goedert *et al.*, 1996) ou des polyglutamate (Carlson *et al.*, 2007), et des acides gras tels que l'acide arachidonique (Chirita *et al.*, 2003 ; Gamblin *et al.*, 2000).

1.3.4.5. Toxicité des fibres amyloïdes du peptide A β et de la protéine tau dans la maladie d'Alzheimer

La relation entre l'accumulation de peptides A β et le déclin cognitif dans la MA est un processus complexe non encore totalement élucidé. Une perte neuronale massive et une dystrophie des neurones sont observées (Blennow *et al.*, 2006; Jakob-Roetne et Jacobsen, 2009). Cependant, la formation des plaques amyloïdes atteint un plateau au moment où les symptômes permettent de diagnostiquer la maladie. L'exaltation des symptômes serait donc attribuée à d'autres acteurs tels que les oligomères et protofibres (espèces solubles) (Haass et Selkoe, 2007) ou l'apparition des DNFs. De plus, aucune maladie neurodégénérative présentant seulement des plaques amyloïdes n'a été décrite tandis que certaines démences sont attribuées uniquement à la protéine tau (Ballatore *et al.*, 2007). La répartition et la progression des DNFs dans le cortex sont davantage corrélées à l'apparition et l'évolution des symptômes que celles des plaques amyloïdes (Braak et Braak, 1991). Ces dernières sont également retrouvées chez des personnes âgées mais non atteintes de démence ce qui implique un rôle

prédominant de la protéine tau dans la pathologie d'Alzheimer (Haass et Selkoe, 2007; Ittner et Götz, 2011).

Il semblerait donc que la toxicité des oligomères causerait des altérations subtiles reflétant les premiers troubles cognitifs de la MA, plutôt que la mort neuronale qui est observée à un stade plus tardif (Hémar et Mulle, 2011; Benilova *et al.*, 2012). La toxicité de l'A β serait un état transitoire, puis sa combinaison avec la pathologie de la protéine tau conduirait à la neurodégénérescence (Ballatore *et al.*, 2007; Ittner et Götz, 2011; Jin *et al.*, 2011). La toxicité des différentes espèces d'A β pourrait être due à sa liaison à d'autres acteurs cellulaires tels que les protéines ou les lipides membranaires, les récepteurs du glutamate ou de l'acétylcholine (Hémar et Mulle, 2011).

Bien qu'initialement les DNFs étaient supposées être les premières espèces responsables de la toxicité, il est maintenant de plus en plus évident que les premières espèces toxiques sont des oligomères de tau (Ittner et Götz, 2011; Meraz-Ríos *et al.*, 2010). Les oligomères de protéine tau sont des multimères de deux monomères ou plus. Ils peuvent être hyperphosphorylés et/ou non phosphorylés, solubles (pour ceux de petite taille) ou insolubles (pour ceux de taille élevée) (Ittner et Götz, 2011). Ils ont été identifiés dans des cerveaux de personnes atteintes de la MA ou d'autres tauopathies à un stade précoce de la maladie (Lasagna-Reeves *et al.*, 2012). Les oligomères de tau sont neurotoxiques pour des neurones en cultures et altèrent la perméabilité membranaire (Lasagna-Reeves *et al.*, 2010). De plus, il a été montré chez plusieurs modèles souris que la perte neuronale et les lésions synaptiques commencent avant la formation de DNFs (Berger *et al.*, 2007).

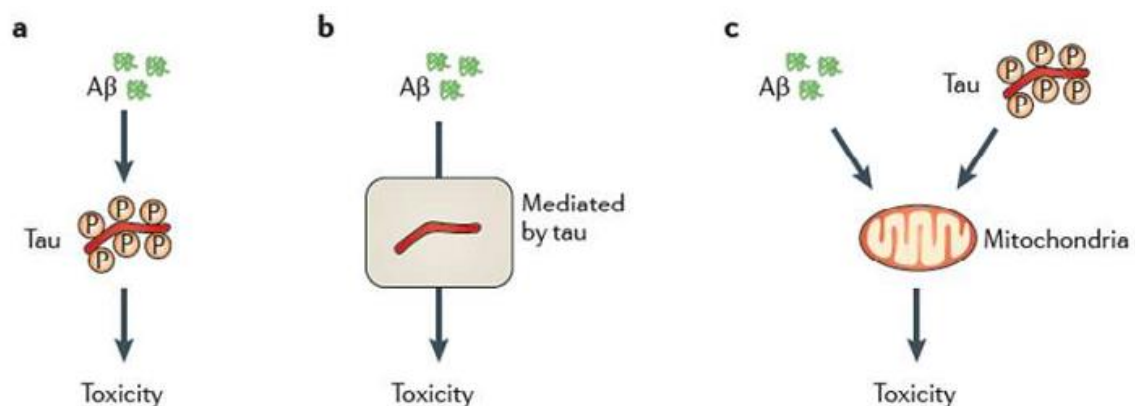


Figure 16. Les trois modes d'interaction possibles tau/A β .

a) L'A β induit la pathologie de tau ; b) La toxicité de tau induit la toxicité de l'A β ; c) Effet synergique de tau et A β (Ittner et Götz, 2011)

Le peptide A β pourrait provoquer la pathologie de tau notamment en induisant son hyperphosphorylation (Figure 16a). Les dimères d'A β extraits de cerveaux des personnes atteintes d'Alzheimer peuvent induire à des concentrations inférieures au nanomolaire la phosphorylation de la protéine tau dans des neurones hippocampiques. Ils causent ensuite la destruction du cytosquelette et la dégénérescence des neurites, le tout en absence de fibres amyloïdes (Jin *et al.*, 2011). La protéine tau est un médiateur de la toxicité du peptide A β (Figure 16b). Ceci est supporté par le fait que des souris transgéniques APP et déficientes en protéine tau sont protégées en partie de la toxicité du peptide A β (Santacruz *et al.*, 2005 ; Roberson *et al.*, 2007 ; Ittner *et al.*, 2011). Enfin, les toxicités de tau et d'A β auraient des effets synergiques sur certaines cibles dans la cellule, amplifiant les effets de l'un et l'autre (Figure 16c). Par exemple, chez des souris transgéniques exprimant tau et A β , la respiration mitochondriale est fortement altérée par rapport aux souris n'exprimant que l'un ou l'autre (Rhein *et al.*, 2009). Le mode d'action de chacun est différent, en ciblant des complexes mitochondriaux différents, ce qui résulte en une forte déficience du système.

Au plan physiologique, la protéine tau est principalement localisée dans les axones des neurones. Lorsqu'elle s'agrège en cas de MA, elle se délocalise dans les dendrites. L'hypothèse axée sur la protéine tau propose que la formation du peptide A β serait à l'initiation de la maladie puis lors de sa progression, induirait la phosphorylation de Tau entraînant l'accumulation de celle-ci dans les dendrites. Cette localisation de la protéine est corrélée à la vulnérabilité du compartiment post-synaptique des neurones aux peptides A β dans les stades plus avancés de la pathologie (Figure 17).

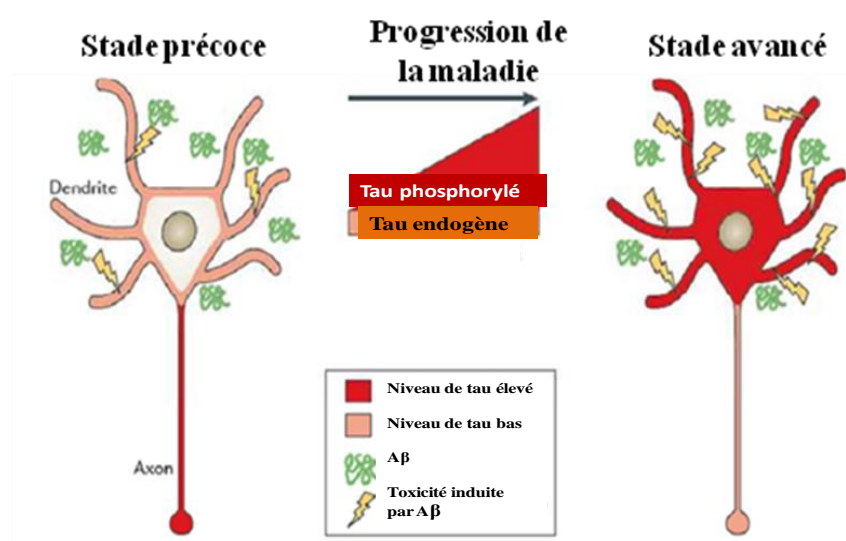


Figure 17. Hypothèse axée sur la protéine tau de la maladie d'Alzheimer

Le niveau d'expression de tau varie avec le stage de la maladie. Durant la phase précoce, la protéine tau est élevée dans l'axone et faible au niveau des dendrites. Par contre, durant la phase avancée, la protéine tau s'accumule au niveau des dendrites (Ittner et Götz, 2011).

1.4. STRESS OXYDATIF ET MALADIE D'ALZHEIMER

Les recherches effectuées ont démontré des preuves convaincantes de l'importance des processus oxydatifs sur la pathogénèse de la maladie d'Alzheimer. Les changements cellulaires montrent que le stress oxydatif est un événement qui précède l'apparition des caractéristiques de la maladie que sont les enchevêtrements neurofibrillaires et les plaques séniles (Luca *et al.*, 2015).

Les maladies neurodégénératives sont associées à un stress oxydant cellulaire précoce, qui apparaît plusieurs années avant les symptômes de démence (Keller *et al.*, 2019). La source principale de production d'ERO est la chaîne respiratoire mitochondriale (Kim *et al.*, 2015). Cette chaîne de transports d'électrons, en particulier au niveau du cycle des ubiquinones et du complexe IV, comporte des intermédiaires réactionnels radicalaires qui peuvent conduire à la libération d'ERO (Figure 18).

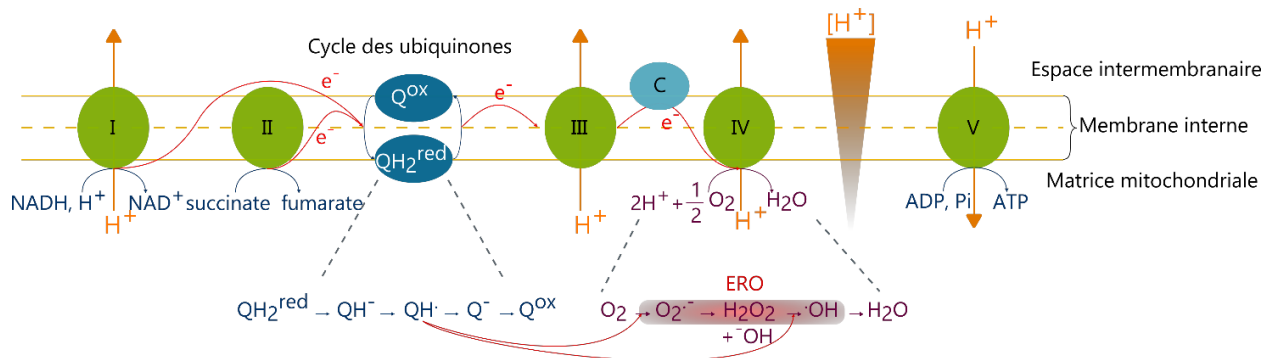


Figure 18: Production d'ERO au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale

Les complexes I et II libèrent des électrons (e^-) par l'oxydation de la nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) et du succinate. Ces électrons interviennent dans le cycle des ubiquinones (QH_2^{red}/Q^{ox}). L'oxydation des ubiquinones libère des électrons qui sont captés par le complexe III, puis le cytochrome C et le complexe IV, mais aussi des intermédiaires réactionnels, dont le radical QH^\cdot , qui pourrait favoriser la formation d'ERO (en rouge). Les complexes I, III et IV couplent des réactions rédox exergoniques avec le transport actif de protons vers l'espace intermembranaire. Le complexe V, ou ATP synthase, couple le transport passif de protons dans la matrice mitochondriale avec la synthèse d'adénosine triphosphate (ATP), monnaie énergétique de la cellule (ref).

La concentration des EORs est régulée par des enzymes comme les superoxyde dismutases (SOD), qui catalysent la dismutation de $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 et O_2 , les catalases, qui catalysent la dismutation de H_2O_2 , et les glutathion peroxydases (Gpx), qui couplent la

réduction des peroxydes à l'oxydation du glutathion, mais aussi par de petites molécules dont la plus abondante est le glutathion (Kamat *et al.*, 2016). L'oxydation du glutathion réduit (GSH) en disulfure de glutathion (GSSG) par formation d'un pont disulfure intermoléculaire est couplée à la réduction des EORs

Le vieillissement cellulaire est caractérisé à la fois par une augmentation de la concentration en EORs (Santos *et al.*, 2018) et par une diminution de l'activité des systèmes antioxydants (Mazzetti *et al.*, 2015), ce qui facilite l'installation d'un stress oxydant chronique.

Le cerveau consomme 20% de l'oxygène total utilisé par l'organisme. Ainsi, le catabolisme oxydatif est très élevé dans cet organe, avec susceptibilité accrue de développer un stress oxydant en cas d'insuffisance des systèmes antioxydants cellulaires (Dringen, 2000). Les EORs en grande concentration peuvent détériorer protéines, lipides et acides nucléiques. Le stress oxydant favorise ainsi la peroxydation des lipides, très abondantes dans le cerveau. Il induit une altération des mitochondries limitant la synthèse d'ATP, à laquelle le cerveau est également très sensible du fait de ses besoins énergétiques élevés (Kim *et al.*, 2015).

Les protéines du système ubiquitine/protéasome peuvent également être atteintes, altérant la dégradation des protéines et favorisant leur agrégation (Korovila *et al.*, 2017) et vice versa (Figure 19).

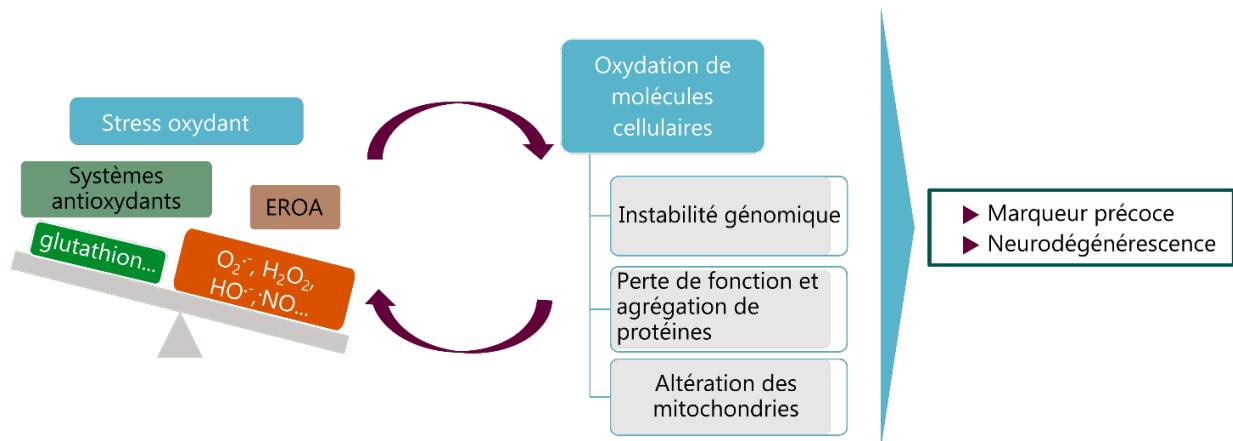


Figure 19: Le stress oxydant, conséquence d'un déséquilibre de l'homéostasie rédox

Le stress oxydant est dû à un déséquilibre entre les EROs et les systèmes antioxydants, causé soit par une altération des systèmes antioxydants, soit par une augmentation de la production des EORs. Cet excès d'EOR conduit à l'oxydation des molécules cellulaires : protéines, lipides, et acides nucléiques, à terme toxique pour les cellules, en particulier les neurones.

Le stress oxydant pourrait être l'un des initiateurs de la cascade amyloïde dans la MA (Behl, 1997; Markesbery, 1997). En effet, il altère les protéases dégradant A β et participe

donc à son accumulation (de Dios *et al.*, 2019). Il favorise également l'hyperphosphorylation et l'accumulation de tau (Lloret *et al.*, 2015), et pourrait être impliqué dans la réintégration du cycle cellulaire par les neurones, qui participe à leur mort (Bonda *et al.*, 2010). De même, l'accumulation de l'A β favorise le stress oxydant par plusieurs mécanismes: (i) la perméabilisation des membranes par certaines espèces oligomériques conduit à un déséquilibre de l'homéostasie ionique (Lal *et al.*, 2007), (ii) les agrégats d'A β peuvent relarguer localement des espèces métalliques (Khan *et al.*, 2006), et (iii) certains assemblages perturbent la chaîne respiratoire mitochondriale, ce qui se manifeste en particulier par une diminution de l'activité de la cytochrome C oxydase (complexe IV) (Figure) qui conduit à une augmentation de la production d'ERO (Lim *et al.*, 2010). Un cercle vicieux se met ainsi en place entre accumulation de peptide A β et stress oxydant, qui aboutit à la mort cellulaire (Caruso *et al.*, 2019).

1.5. MITOCHONDRIE ET MALADIE D'ALZHEIMER

1.5.1. Implication des mitochondries dans la maladie d'Alzheimer

Les mitochondries jouent un rôle central dans la survie comme la mort des cellules car elles assurent à la fois, le métabolisme énergétique et les voies apoptotiques. Elles sont considérées comme un moteur puissant fournissant le carburant cellulaire (ATP). Les mitochondries contribuent à de nombreuses fonctions cellulaires à l'instar de l'apoptose, la croissance, la régulation de l'homéostasie du calcium intracellulaire, la différenciation cellulaire, la modification de l'état cellulaire d'oxydo-réduction et la plasticité synaptique (Grimm et Eckert, 2017 ; Guillet-Pichon et Verny, 2016). Les mitochondries ne sont ni isolées ni figées dans la cellule, leur mouvement et accumulation sont coordonnés, puisqu'elles se déplacent en continue, grâce au réseau mitochondrial dynamique qui est régulé par des phénomènes de fusion et de fission dans les régions nécessitant de l'énergie (Jakobs, 2006).

1.5.2. Dysfonctionnement mitochondrial et maladie d'Alzheimer

Les mitochondries sont particulièrement importantes dans le SN et nécessitent environ 20% de la consommation totale d'oxygène pour le soutien de l'énergie neuronale (Shulman *et al.*, 2004). Les dysfonctionnements mitochondriaux ont été impliqués dans la pathogenèse des maladies neurodégénératives, y compris la MA, qui sont caractérisés par un hypométabolisme cérébral et une homéostasie altérée dans le statut redox.

Une diminution de l'activité mitochondriale, y compris la phosphorylation oxydative, le niveau des protéines et l'activité des complexes impliqués dans la chaîne de transport d'électrons peuvent être observés avec l'âge (Leuner *et al.*, 2012 ; Grimm et Eckert, 2017). Des déformations mitochondriales apparaissent dans les premiers stades de la MA (Wisniewski *et al.*, 1970), en premier lieu dans les neurites puis autour des plaques séniles et dans la cellule autour des DNFs (Johnson et Blum, 1970). Les deux protéines A β et tau hyperphosphorylé, se sont avérées avoir un impact direct sur la fonction mitochondriale (Schmitt *et al.*, 2012). On note lors du processus de phosphorylation oxydative, une proportion significative de l'oxygène subit une réduction partielle au niveau des complexes I et III de la chaîne respiratoire mitochondriale et échappe à la réduction complète en eau, générant ainsi un ion superoxyde O $_2^-$ (Guillet-Pichon et Verny, 2016). Les EOR générées sont dangereux pour la cellule car ils sont instables et très réactifs et peuvent oxyder les protéines, l'ADN et les lipides des membranes cellulaires, endommageant la cellule (Kong *et al.*, 2014).

Les mitochondries sont des organites très dynamiques, qui sont fusionnées et divisées en continue afin de maintenir une population mitochondriale homogène en mélangeant leur teneur en ADN, lipides et protéines (Campello et Scorrano, 2010). Cette dynamique mitochondriale (fusion/fission) est également diminuée en présence d'A β et de la protéine tau hyperphosphorylée. Tout ceci entraîne par conséquent un réseau mitochondrial allongé et fragmenté qui pourrait avoir un impact négatif sur les fonctions bioénergétiques de ces organites (DuBoff *et al.*, 2012). Par ailleurs, la perte du transport axonal modifie aussi la répartition des mitochondries dans les différents compartiments cellulaires des régions comme le cortex cérébral, le thalamus, le striatum, le cervelet ou le locus coeruleus (Lin et Beal, 2006). L'A β semble déclencher un dysfonctionnement de l'activité mitochondriale du complexe IV et plus tard du complexe I, alors que la présence de la protéine tau anormalement hyperphosphorylée altère l'activité du complexe I en premier lieu (Rhein *et al.*, 2009). La dissociation des microtubules induite par l'hyperphosphorylation de tau altère le transport axonal, et réduit le nombre de mitochondries transportées vers la synapse (Eckert *et al.*, 2014), ce qui peut conduire à la dégénérescence synaptique et la mort neuronale. En outre, la présence anormale de la protéine tau affecte l'activité du complexe mitochondrial *in vitro* et *in vivo* (Schulz *et al.*, 2012), diminue le niveau d'ATP et augmente la production des EOR. Comme l'A β , la protéine tau hyperphosphorylée semble avoir un impact négatif sur la dynamique mitochondriale en réduisant la fission, ce qui induit un allongement du réseau mitochondrial (DuBoff *et al.*, 2012).

1.5.3. L'apoptose

Mis à part leur fonction dans le métabolisme énergétique, les mitochondries sont impliquées dans de nombreux autres processus cellulaires. Elles ont un rôle crucial dans l'apoptose. L'apoptose est un processus de mort cellulaire programmée dont la voie intrinsèque fait intervenir la mitochondrie. Cette voie consiste en la libération dans le cytoplasme cellulaire de molécules pro-apoptotiques situées dans l'espace inter-membranaire mitochondrial suite à la perméabilisation de la membrane externe (Guillet-Pichon et Verny, 2016). Ce processus de mort cellulaire entraîne la condensation du cytoplasme, le bourgeonnement des membranes cytoplasmiques et nucléaires et la compaction de la chromatine. L'ADN est ensuite fragmenté, les phosphatidylserines de la membrane plasmique sont externalisées et la cellule est segmentée en vésicules, appelées corps apoptotiques, qui sont phagocytées par les macrophages (Figure 20).

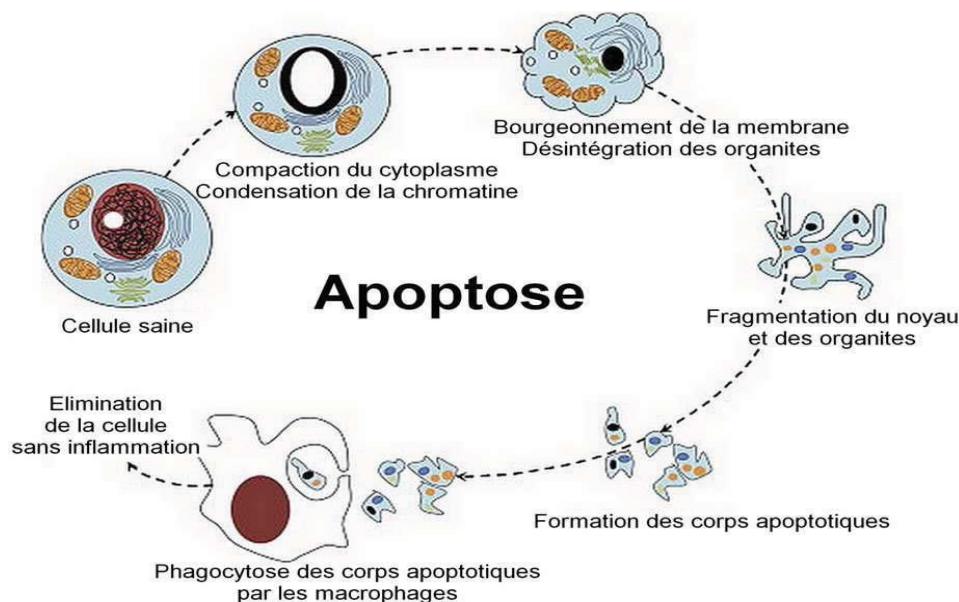


Figure 20. Les étapes de l'apoptose cellulaire.

La cellule subit différents changements morphologiques lors de l'apoptose, jusqu'à son élimination par phagocytose des corps apoptotiques (Abou-Ghali et Stiban, 2015).

L'apoptose possède deux voies d'activation, la voie extrinsèque ou mort programmée, et intrinsèque ou mort accidentelle (Figure 21).

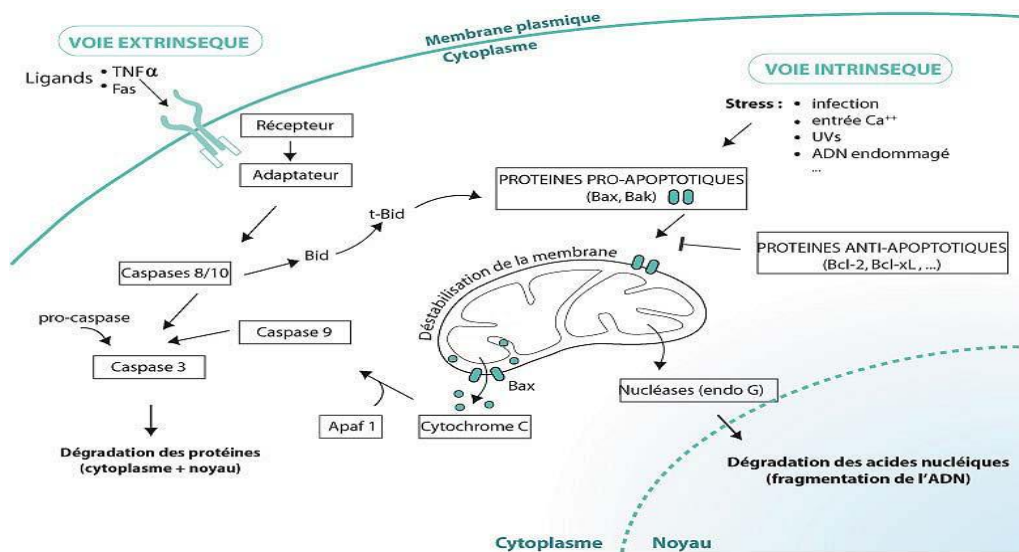


Figure 21. Les voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose.

Schéma simplifié des voies de l'apoptose suite à un signal externe (voie extrinsèque) ou un signal intracellulaire lié à un stress, comme des dommages de l'ADN ou une augmentation des EOR (voie intrinsèque).

TNF- α : tumor necrosis factor α ; FAS : fas cell surface death receptor, protéines antiapoptotiques (Bcl-2, Bcl-xL), protéines proapoptotiques (Bak, Bax), Apaf 1 : apoptotic protease activating factor 1.

La première voie est activée en réponse à un signal externe, par activation de récepteurs de mort présents sur la membrane plasmique, comme le récepteur du tumor necrosis factor (TNF) ou le récepteur FAS, ce qui déclenche une série de mécanismes conduisant à l'activation des caspases. Ces protéines à cystéines reconnaissent chacune une séquence protéique particulière et clivent leurs substrats au niveau d'un résidu aspartate situé en position 1 du site de clivage. La voie extrinsèque peut par exemple être déclenchée par des lymphocytes cytotoxiques (Martínez-Lostao *et al.*, 2015).

Les mitochondries sont principalement impliquées dans la seconde voie, la voie apoptotique intrinsèque. Elle est majoritairement déclenchée par des signaux d'origine intracellulaire, lorsque les cellules sont lésées ou soumises à un stress, par exemple lors de dommages de l'ADN ou de l'augmentation de la quantité des EOR. Suite à ces stimuli, les protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl2, normalement localisées dans le cytosol, s'insèrent dans la membrane mitochondriale externe. Les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl2, comme Bcl2 et Bcl-XL, sont, quant à eux, constitutivement présents dans la membrane externe, séquestrant les molécules pro-apoptotiques activatrices et effectrices et inhibant donc la perméabilisation de cette membrane (Guillet-Pichon et Verny, 2016).

Le rapport molécules pro-apoptotiques/ anti-apoptotiques détermine ainsi l'entrée de la cellule dans le programme d'apoptose (Gibson et Davids, 2015). En effet, des protéines pro-apoptotiques sensibilisatrices comme Bad vont inhiber les protéines anti-apoptotiques. Cela va permettre l'activation des protéines pro-apoptotiques effectrices telles Bax et Bak par les activatrices comme Bid et Bim (Bhola et Letai, 2016). La perméabilisation des mitochondries peut se faire selon deux mécanismes. Les protéines pro-apoptotiques effectrices vont former des pores sur la membrane externe en s'oligomérisant, ce qui permet l'export du cytochrome c de l'espace intermembranaire vers le cytosol (Ma *et al.*, 2013; Westphal *et al.*, 2014). Ces pores non spécifiques vont perméabiliser la membrane interne en s'ouvrant, permettant le passage de molécules jusqu'à 1,5 kDa et détruisant le gradient de protons, ce qui va diminuer le potentiel membranaire mitochondrial. En conséquence les mitochondries vont gonfler, menant à la rupture de la membrane externe et à la libération non spécifique dans le cytosol de molécules auparavant localisées dans l'espace intermembranaire, et notamment du cytochrome c, des procaspases 2, 3 et 9 et du facteur « *apoptosis inducing factor (AIF)* ».

Le cytochrome c cytosolique se fixe à une protéine adaptative appelée « *apoptotic protease activating factor-1 (Apaf1)* », et va l'activer. Un complexe trimoléculaire appelé apoptosome peut alors se former, comprenant le cytochrome c, Apaf1 et la procaspase 9, permettant l'activation de cette dernière en caspase 9 par protéolyse en présence de l'ATP. La caspase 9 initiatrice est alors active et peut à son tour cliver la procaspase 3 effectrice. Il s'ensuit une cascade d'activations de caspases qui ont une activité protéolytique et vont dégrader des protéines cytosoliques et nucléaires ; mais aussi activer des nucléases qui vont fragmenter l'ADN (Goldar *et al.*, 2015). L'une des protéines impliquées dans la dégradation de l'ADN nucléaire lors de l'apoptose est l'endonucléase ENDOG. Elle est localisée dans l'espace intermembranaire mitochondrial et est relocalisée vers le noyau dans certaines conditions (Lin *et al.*, 2016). ENDOG a aussi un rôle régulateur des nucléases apoptotiques puisque sa surexpression induit une augmentation de l'expression de la « *DNA fragmentation factor subunit beta (DFFB)* » aussi appelé « *Caspase-Activated DNase (CAD)* » et des nucléases du groupe DNase I, augmentant la fragmentation de l'ADN (Zhdanov *et al.*, 2015).

Une autre voie indépendante des caspases participe à l'apoptose. Le facteur AIF, suite à son relargage dans le cytosol après perméabilisation de la membrane externe mitochondriale, est relocalisé dans le noyau où il induit l'apoptose nucléaire par condensation de la chromatine et fragmentation de l'ADN (Candé *et al.*, 2002).

1.6. MODÈLE D'ÉTUDE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER

1.6.1. Modèles *in vitro*

L'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans la MA fait intervenir différentes lignées cellulaires. Ces lignées sont des neuroblastomes humains telles que les cellules SHSY-5Y, SK-N-BE, SKNSH-SY5Y qui dérivent de la lignée SKNSH; les cellules IMR-32 (Neill *et al.*, 1994) et les cellules Neuro 2A. Des cultures primaires de cellules neuronales du cortex et de l'hippocampe de souris et de rat peuvent aussi être utilisées (Priller *et al.*, 2006) ou des cellules souches pluripotentes de la peau ou du sang des patients Alzheimer capables de devenir des neurones (Nestor *et al.*, 2013).

1.6.2. Modèles *in vivo*

Les modèles animaux ont pour objectif d'étudier les maladies humaines pour comprendre leurs mécanismes et trouver des pistes de thérapie. En ce qui concerne les maladies neurodégénératives, ces modèles peuvent être utilisés pour explorer des mécanismes physiopathologiques associés aux maladies du cerveau liés à l'âge et pour tester des nouvelles thérapies.

1.6.3. Modèles animaux naturels

Dans le cas de la MA, différentes espèces sont capables de développer de manière spontanée des plaques amyloïdes, la protéine tau anormalement phosphorylée, la perte neuronale. Parmi ces modèles spontanés figurent les modèles: canin, singe, chat, lapin, lémurien *Microcebus murinus*.

1.6.4. Modèles murins transgéniques de la maladie d'Alzheimer

Le principe de souris transgéniques consiste à introduire un gène humain muté ou à l'inactiver chez un animal afin de moduler l'expression des protéines responsables de la maladie. Ces souris expriment la protéine APP humaine qui donnent des protéines amyloïdes aboutissant à des dépôts diffus et à la formation de plaques séniles.

Le modèle PDAPP exprime la protéine APP humaine avec la mutation indienne V717F induite par le promoteur Platelet-Derived Growth Factor β .

Les modèles Tg2576 et APP23 expriment la protéine humaine APP avec la mutation suédoise K670N/M671L sous le contrôle du promoteur du gène prion du hamster pour le modèle

Tg2576 et celui du promoteur du gène murin Thy1 pour le modèle APP23 (Games *et al.*, 1995 ; Sturchler-Pierrat *et al.*, 1997).

Ces souris se caractérisent par la présence de plaques bêta amyloïdes, une atrophie de l'hippocampe, une perte des fonctions cognitives, une perturbation de comportement, un dysfonctionnement des synapses, une modification de la forme et de la fonction des cellules gliales (astrocytose et microgliose). Toutefois, même si des formes hyperphosphorylées de Tau sont détectées, aucune dégénérescence neurofibrillaire n'est observée et la perte neuronale est faible.

Les souris transgéniques PSEN1 et PSEN2 présentent une augmentation du ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$, mais ne développent ni plaques amyloïdes, ni de DNF. Ces souris ont été utilisées pour développer un modèle croisé APP/PSEN dont le ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ élevé et développe des dépôts amyloïdes plus précocement que les souris Tg2576 (Götz *et al.*, 2010 ; Van Dam et De Deyn, 2011).

Un croisement entre les souris avec mutation APP et les souris avec mutation de tau augmente les dépôts amyloïdes et induit une apparition de DNF et une perte neuronale que l'on ne retrouve pas chez les souris APP.

Le modèle 3xTg-AD combinant trois mutations : la mutation de la protéine APP, la mutation de la protéine tau, et la mutation de PSEN1 développe les plaques amyloïdes avant les DNF. Ce modèle se caractérise par une perte neuronale accompagnée d'une réaction inflammatoire et atteinte des synapses (Van Dam and De Deyn, 2011).

Un rôle important de l'apolipoprotéine E dans la formation des dépôts amyloïdes *in vivo* a été démontré chez les souris déficientes en ApoE croisées avec une lignée transgénique APP qui présente une forte réduction des dépôts agrégés (Bales *et al.*, 1997).

Tableau 1. Résumé des modèles animaux transgéniques de la MA

Modèles	Transgène	Changements pathologiques	Déficits neurologiques
Souris transgéniques APP			
PDAPP	happ695(Ind) Promoteur PDGF	$A\beta$ s; plaques de 6-9 mois; perte synaptique; astrocytose; pas de DNFs	Déficits cognitifs à 6 mois
APP23	hAPP751(Swe), Promoteur Thy-1	Plaques à 6 mois; dépôts vasculaires d' $A\beta$; perte synaptique; inflammation; pas de DNFs	Déficits cognitifs à 3 mois

Tg2576	hAPP695(Swe) Promoteur HamPrP	Extension des plaques dans les structures corticales and limbiques à 8 mois; perte synaptique; pas de DNFs	Déficiences cognitive à 9 mois
PS2APP	PSEN2 (N141I), Promoteur Thy-1.	Plaques abondantes à 5 mois; perte synaptique, inflammation; activation des cellules gliales; pas DNFs	Déclin cognitif et comportemental à 8 mois
Souris transgéniques Tau			
PrP-Tau	hTau(P301L), promoteur MurinePrP	Développement des DNFs âge et gène dépendant dans le cerveau et la moelle épinière après 6 mois	Déficits comportementaux et moteurs à 6 mois
Thy-Tau22	hTau(P301S), Promoteur Thy-1.2	DNFs; astrogliose modéré; perte synaptique	Declin apprentissage à 3 mois, mémoire à 6 mois
GFAP-Tau	hTau(P301L), Promoteur GFAP	Pathologie astrocytaire de tau; perturbation modérée de la barrière hématoencéphalique; dommage des neurons focaux	Déficits moteurs
Souris double transgéniques APP et tau			
APP/tau	hAPP695(Swe), hTau(P301L); promoteur PrP	Depôt d'A β ; DNFs; perte nerveuse à 8-15 mois	Perturbations moteurs
Souris triple transgéniques			
3xTg-AD	hAPP695(Swe) promoteur Thy1, hTau(P301L) promoteur Thy1, PSEN1(M146V) Promoteur mPS1	Depôt d'A β à 6 mois; DNFs à 10-12 mois; perte neuronale et synaptique; activation microgliale; inflammation	Déficits comportementaux fonction de l'âge
Souris quintuple transgéniques			
5xTg-AD	hAPP695(Swe, Lon, Flo), PSEN1(M146L, L28V);	Dépôt excessif d'A β 42; plaque d'A β à 2 mois; gliose; perte synaptique; pas de DNFs	Perte cognitive et de la mémoire

	promoteur Thy1		
Rats transgéniques			
APP ^{Swe}	hAPP751(Swe), Promoteur PDGF	Augmentation des peptides A β 40 et A β 42 à 17-18 mois; Formation des plaques	Déclin de l'apprentissage et de la mémoire
PS1APP	hAPP695(Swe), PSEN1(M146V), Promoteur synapsin I	Dépôt d'A β à 7 mois; activation astrocytaire et microgliale; augmentation de la réactivité de p-tau; pas de DNFs	Déficits comportementaux
Thy-Tau	hTau truncated (151-391), Promoteur Thy1	Augmentation de p-tau, fibrilles dans le cortex; pas de perte neuronale	Réduction de la durée de vie

Ce tableau présente les différents modèles qui reproduisent les événements observés au cours de la MA (Li *et al.*, 2016 ; Onos *et al.*, 2016 ; Jankowsky et Zheng, 2017).

A β : amyloïde bêta, DNF : dégénérescences neurofibrillaires, p-tau : phospho tau.

1.6.5. Les composés chimiques utilisés pour reproduire un modèle de la maladie d'Alzheimer

Il existe plusieurs molécules capables lorsqu'elles sont administrées aux animaux de reproduire un modèle de la MA.

1.6.5.1. La colchicine

C'est un alcaloïde isolé dans plusieurs plantes. Ce composé induit la démence au travers du dysfonctionnement des neurones cholinergiques (Mahdi *et al.*, 2019). La colchicine est utilisée dans plusieurs études comme agent potentiel capable d'induire la démence au travers du dysfonctionnement dans la cascade des d'activité des neurones cholinergiques (Kumar *et al.*, 2006; 2009). La colchicine induit des lésions au niveau de l'hippocampe entraînant des déficiences cognitives et la réduction de l'acétylcholine transférase, suggérant son utilisation comme modèle de reproduction de la MA. La colchicine cause la neurotoxicité et le déclin de la mémoire par inhibition des voies cholinergiques, réduisant les nombre de neurones cholinergiques (Evrard *et al.*, 1998). La déficience de mémoire induite par la colchicine résulterait d'une baisse en sérotonine, dopamine au niveau de plusieurs régions du cerveau (Ganguly et Guha, 2008).

1.6.5.2. L'azide de sodium

L'azide de sodium (NaN_3) un cristal solide toxique pour la mitochondrie. Son administration a montré qu'elle est capable d'induire le dysfonctionnement mitochondrial et inhibe la cytochrome c oxydase, une enzyme mitochondriale très importante (Malekzadeh *et al.*, 2017 ; Mahdi *et al.*, 2019).

1.6.5.3. L'aluminium

Les métaux ont un rôle essentiel dans le métabolisme normal des neurones. Les éléments de traces comme le cuivre (Cu), aluminium (Al), le fer (Fe) le manganèse (Mn) et le zinc (Zn) peuvent à la fois perturber le processus métabolique dans le cerveau, et être impliqués dans la neurotoxicité (Prakash *et al.*, 2016). L'Al est un facteur de risque majeur pour la cause et le développement de MA (Singla et Dhawan, 2014). Des études ont révélé que l'Al renforce la neurotoxicité de la protéine $A\beta$ et conduit donc à la formation des agrégats d' $A\beta$ due à la dégénérescence des neurones (Moore *et al.*, 2000). L'administration d'Al stimule la formation de tau dans les inclusions au niveau de cerveau et de la moelle épinière (Exley, 2006). L'Al accélère l'oligomérisation d' $A\beta$, est considéré comme un biomarqueur de neurotoxicité impliquée dans la MA.

1.6.5.4. La scopolamine

L'administration de la scopolamine chez les rats cause l'atrophie cérébrale et la dégénérescence neuronale (Tang *et al.*, 2019). Elle est utilisée comme modèle d'étude de démences car elle induit les déficits cognitifs et de mémoire. Ce composé est utilisé classiquement comme un antagoniste des récepteurs muscariniques de l'acétylcholine impliqué dans la mémoire de travail (Pezze *et al.*, 2017). L'administration de la scopolamine entraîne l'accumulation du peptide β -amyloïde dans le cerveau. Elle augmente le niveau de phosphorylation de la protéine tau et inhibe le gène d'expression de cette protéine (Tang *et al.*, 2019).

1.7. LES CIBLES THERAPEUTIQUES POUR LA MALADIE D'ALZHEIMER

Six classes de composés majeurs contribuent à lutter contre la maladie d'Alzheimer (MA). Il s'agit des inhibiteurs de l'acétylcholine estérase, des antagonistes des récepteurs de la N-méthyl-D-aspartate (NMDA), des inhibiteurs de la monoamine oxydase (MAO), des antioxydants, des chélateurs de métaux et des anti-inflammatoires. Cependant, les inhibiteurs

de l'acétylcholine estérase sont les premiers médicaments utilisés dans le traitement de la MA (Mitra et Dey, 2013). Un traitement pharmacologique efficace des troubles cognitifs liés à la MA et à la démence légère reste un besoin majeur non satisfait au plan clinique.

Parmi les nouveaux agents thérapeutiques développés contre la MA, les inhibiteurs des agrégats de tau ont été largement étudiés en l'occurrence les inhibiteurs des kinases et particulièrement la glycogène synthétase kinase-3 β et les activateurs des phosphatases qui sont responsables de la phosphorylation et la déphosphorylation de tau (Pinheiro et Faustino, 2019).

Une stratégie thérapeutique efficace contre la MA serait d'agir sur les causes sous-jacentes dès les stades précliniques. Parmi les potentielles stratégies thérapeutiques, on peut noter les approches de vaccination et d'immunisation contre l'A β (Cehlar *et al.*, 2018; van Dyck, 2018) ou la protéine tau (Pedersen et Sigurdsson, 2015), des modulateurs d'enzymes comme les α et β sécrétases (Seki *et al.*, 2020), des traitements antioxydants et antiinflammatoires (Jorda *et al.*, 2020 ; Caruso *et al.*, 2019) ou des modulateurs de récepteurs potentiels à l'A β (Elezgarai et Biasini, 2016). Malgré la mise en œuvre de nombreux essais cliniques, aucune de ces approches ne s'est encore révélée curative chez l'homme (Kamat *et al.*, 2016).

Le registre des essais cliniques menés en 2021 montre qu'il y a 126 agents dans 152 essais évaluant de nouvelles thérapies pour la MA. On dénombre 28 traitements dans les essais de phase 3, 74 dans la phase 2 et 24 dans la phase 1 (Cummings *et al.*, 2021). La majorité des médicaments dans ces essais (82,5%) ciblent la biologie sous-jacente de la MA dans le but de modifier la maladie ; 10,3 % sont des agents potentiels d'amélioration cognitive ; et 7,1 % sont des médicaments pour réduire les symptômes neuropsychiatriques (Cummings *et al.*, 2021).

1.7.1. Traitement conventionnel

La MA est toujours incurable bien qu'elle soit connue de l'homme depuis plus de cent ans (Fang *et al.*, 2013). Le traitement actuel ne soulage que les symptômes de en fournissant une thérapie palliative temporaire qui ralentit la déficience cognitive associée à la maladie (Khairallah et Kassem, 2011). Durant le stade initial et le stade modéré, les symptômes cognitifs sont soulagés par les inhibiteurs l'acétylcholine estérase (AChE) (Jeremic *et al.*, 2021). L'AChE est considérée comme l'une des principales stratégies thérapeutiques fournissant des effets modificateurs symptomatiques et modérés de la maladie. Trois

médicaments agissent sur les voies cholinergiques du SNC à savoir le donépézil (Aricept®) depuis 1996, la galantamine (Reminyl®, Razadyne®) depuis 2001 et la rivastigmine (Figure 22). Ces trois médicaments ont une activité anticholinestérase et la galantamine (Exelon®) depuis 2000, un alcaloïde d'origine naturelle, est également active en tant que modulateur allostérique des récepteurs nicotiques de l'acétylcholine. Le donépézil et la galantamine sont des inhibiteurs de l'AchE qui permettent d'améliorer et de maintenir les fonctions cognitives ainsi que les activités de la vie quotidienne. La rivastigmine inhibe l'AchE et la BuChE entraînant une amélioration des fonctions cognitives. Les inhibiteurs de cholinestérase sont proposés pour améliorer les déficits cognitifs et stabiliser les fonctions comportementales des patients atteints de MA. Même si le traitement par ces inhibiteurs semble retarder de 6 mois les déficits cognitifs (Takeda *et al.*, 2006), il apparaît clairement que ces inhibiteurs n'interrompent pas la cascade pathologique sous-tendant le dysfonctionnement synaptique responsable de ces déficits. Aussi, la mémantine, un inhibiteur du récepteur N-méthyl D-aspartate (NMDA) est administrée aux stades avancés de la MA. Cette thérapie peut être combinée avec succès aux inhibiteurs de l'AchE (Kovács, 2009). Chacun de ces médicaments est approuvé pour les cas de démence légère comme celle sévères, bien qu'ils soient souvent utilisés pour les patients à des stades de prédémence plus précoces associés à une altération progressive significative de la mémoire sur la base des résultats des tests cognitifs (Graham *et al.*, 2017).

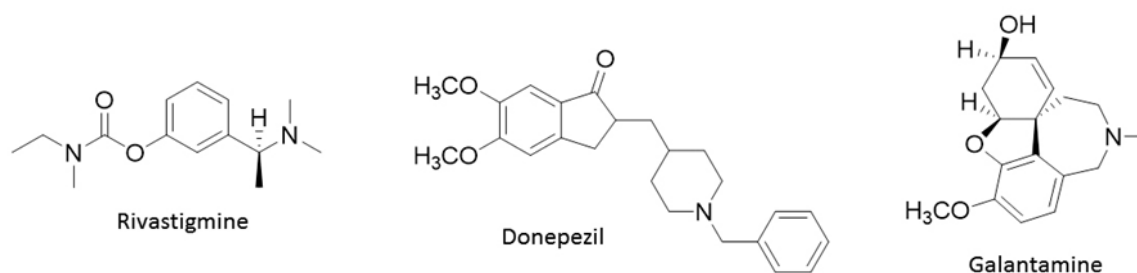


Figure 22. Structures des molécules utilisées dans le traitement de la maladie d'Alzheimer

D'autres composés qui ont montré leur efficacité dans l'inhibition de l'acétylcholine estérase sont consignés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 2. Liste des composés isolés des plantes médicinales approuvés par la FDA. (Kumar *et al.*, 2017)

Composé isolé	Nom commercial	Plante	Mode d'action
---------------	----------------	--------	---------------

Huperzine A	/	<i>Huperzia serrata</i> (Lycopodiaceae)	Restaure le déficit cognitif par inhibition réversible de l'acétylcholine estérase.
Curcumin	Longvida	<i>Curcuma longa L.</i> (Zingiberaceae)	Anti-amyloïdogenique, anti-inflammatoire, anti-acétylcholine estérase, anti- β secrétase
Resveratrol	/	<i>Vitis vinifera L.</i> (Vitaceae)	Prévient les altérations et le stress oxydatif associé en réduisant la formation des plaques

1.7.2. Stratégies thérapeutiques ciblant le peptide A β

Dans le cas de la cascade du peptide A β , la neurodégénérescence est due à la formation, à l'aggrégation et au dépôt des peptides A β qui ont des effets nocifs sur le fonctionnement des neurones, la plasticité synaptique, l'apprentissage et la mémoire (Jeremic *et al.*, 2021). Plusieurs stratégies thérapeutiques sont envisagées pour cibler le peptide β -amyloïde. Il est possible soit de diminuer sa production, soit d'augmenter sa clairance ou soit de prévenir son agrégation (Robinson *et al.*, 2015 ; Orf et Walker, 2017). Ainsi, des inhibiteurs des enzymes β et γ -sécrétases sont développés pour diminuer voire empêcher la production de peptides A β à partir de l'APP (précurseur du peptide A β). Des modulateurs/activateurs de l'enzyme α -sécrétase sont également envisagés afin d'augmenter la production de la sAPP α , qui n'est pas amylogène, par rapport à celle de peptides A β . Afin d'augmenter la clairance des peptides A β , des activateurs des apolipoprotéines (ApoE) ont été développés. Le tamiprosate (Alzhemed) se lie aux formes solubles d'A β et empêche la formation d'espèces neurotoxiques. Une autre étude intéressante a consisté à bloquer l'accessibilité de BACE1 pour la β APP en développant des anticorps dirigés contre le site β de coupure de la protéine β APP (Arbel *et al.*, 2005). Concernant les secretases, plusieurs molécules font l'objet d'essai clinique notamment Etazolate, Acitretin, Bryostatin 1 ont montré leur potentiel à stimuler l'activité de la secretase α (Jeremic *et al.*, 2021).

Des essais cliniques de phase III en cours avec l'anticorps monoclonal humain Aducanumab, qui cible spécifiquement les fibres amyloïdes et les oligomères solubles d'A β , présentant une certaine efficacité clinique (Howard et Liu, 2020; Schneider, 2020) a été approuvé par la *Food and Drug Administration* (FDA) en Juin 2021. C'est un anticorps monoclonal de la classe des immunoglobulines IgG1. Il est capable de détruire les plaques amyloïdes et d'améliorer la qualité de vie des patients atteints de la MA (Alexander *et al.*, 2021). Cependant, des études transversales remettent en question la réelle efficacité de l'Aducanumab (Dunn *et al.*, 2021). D'autres composés de grand intérêt thérapeutique et

ciblant le peptide β -amyloïde sont en étude et présenteraient une efficacité indéniable en phase d'essai clinique. Il s'agit du Donanemab (Lowe *et al.*, 2021 ; Mintun *et al.*, 2021), du Gammagard qui est une combinaison d'anticorps polyclonaux qui s'attaquent au peptide β -amyloïde et capable de promouvoir l'activation microgliale (Jeremic *et al.*, 2021).

1.7.3. Stratégies thérapeutiques ciblant la protéine tau

Les mécanismes conduisant à l'agrégation des protéines tau restent très hypothétiques. Plusieurs mécanismes peuvent conduire à cette agrégation dans la MA. Il y a tout d'abord la phosphorylation (Sergeant *et al.*, 2008) et un changement dans l'équilibre des isoformes de la protéine tau (Glatz *et al.*, 2006). Une stratégie pourrait cibler la régulation des facteurs d'épissage. Cependant, quel que soit le mécanisme impliqué dans l'agrégation de tau, le point commun est la phosphorylation anormale des protéines tau agrégées. De plus en plus de preuves indiquent que la pathologie de la protéine tau peut se déplacer d'une cellule à l'autre et se propager à travers le cerveau (Jadhav *et al.*, 2019).

Plusieurs stratégies thérapeutiques ciblant la protéine tau sont étudiées comme l'inhibition des agrégats de la protéine tau, l'inhibition des modifications post traductionnelles, inhibition de la propagation de la protéine tau et la stabilisation des microtubules (Soeda et Takashima, 2020 ; Panza *et al.*, 2019 ; Orf et Walker, 2017). Des inhibiteurs des enzymes responsables de la phosphorylation ont été développés (Coman et Nemeş, 2017). En effet, ces enzymes possèdent plusieurs substrats du métabolisme cellulaire, ce qui peut entraîner l'altération de plusieurs fonctions physiologiques et rendre difficile l'utilisation d'inhibiteurs chez l'homme. Afin de compenser la perte neuronale observée dans les tauopathies, l'utilisation d'agents stabilisant les microtubules semble prometteuse. L'inhibition de l'agrégation de la protéine tau est une autre stratégie possible (Wischik *et al.*, 2014).

Plusieurs autres approches thérapeutiques ont été proposées, notamment l'inhibition des protéines kinases ou de la protéine-3-O-(N-acétyl-bêta-D-glucosaminy)-L-sérine/thréonine N-acetylglucosaminy hydrolase, l'inhibition de l'agrégation de la protéine tau, les immunothérapies actives et passives. De nouvelles thérapies de la protéine tau, dans tous les domaines, ont démontré la capacité de prévenir ou de réduire les lésions de la protéine tau et d'améliorer la déficience cognitive ou motrice dans une variété de modèles animaux développant une pathologie neurofibrillaire (Jadhav *et al.*, 2019) (Figure 23).

Pipeline du développement des médicaments contre Alzheimer 2021

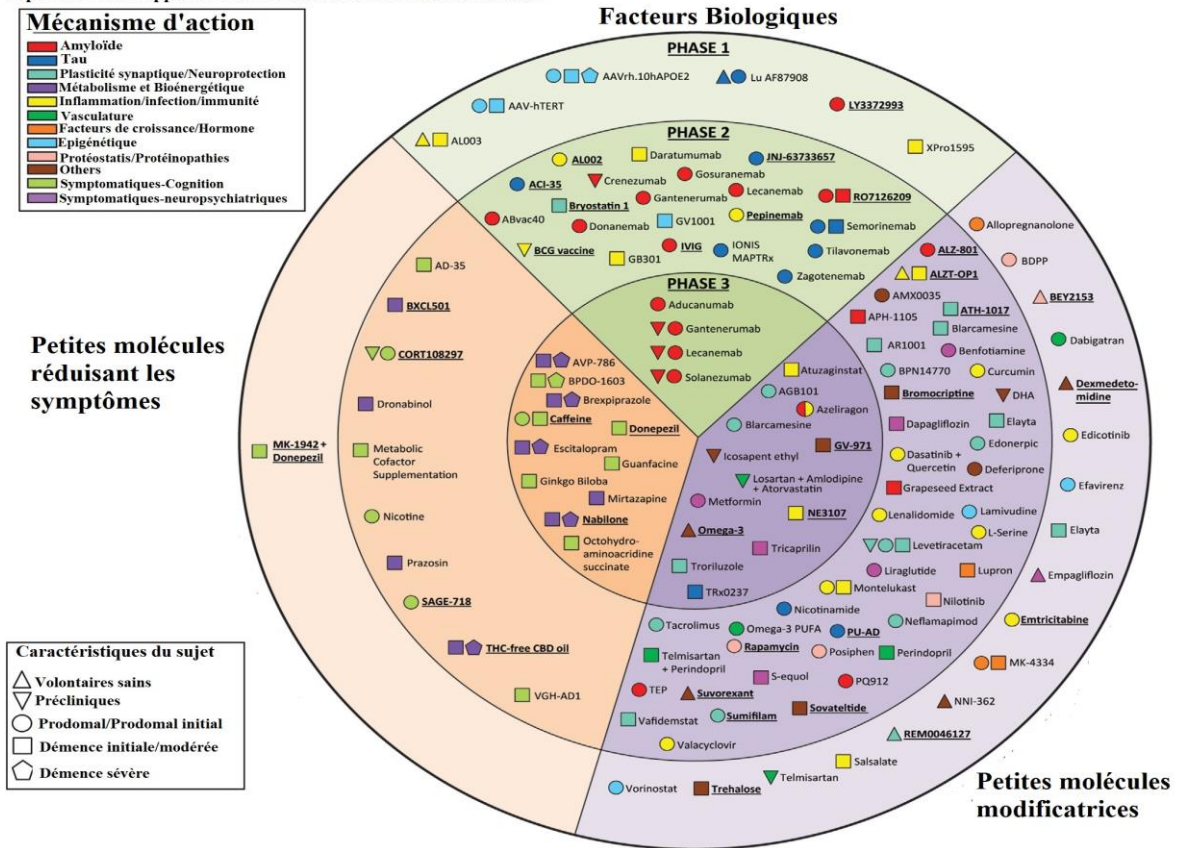


Figure 23. Agents en essais cliniques pour le traitement de la maladie d'Alzheimer en 2018

Ces agents sont regroupés en différentes phases des essais cliniques (Cummings *et al.*, 2021).

1.7.4. Immunothérapie

Une autre approche visant la clairance du peptide Aβ est l'immunothérapie qui peut être active (vaccination) ou passive (anticorps monoclonal) (Jeremic *et al.*, 2021 ; Robinson *et al.*, 2015). Ces stratégies ont permis de diminuer le taux de plaques d'Aβ, de plaques amyloïdes et/ou permettent une amélioration des fonctions cognitives chez des modèles de souris. L'immunothérapie active consiste à injecter le peptide Aβ entier ou un fragment de peptide Aβ afin d'induire une réponse immunitaire chez le patient (Jeremic *et al.*, 2021). La Food and Drug Administration a approuvé la mise sur le marché d'un anticorps monoclonal Ig G1 capable de détruire les plaques d'amyloïde (Jeremic *et al.*, 2021).

La MA étant une maladie multifactorielle, un traitement ciblant un seul acteur de la maladie ne saurait être efficace. De plus, les personnes atteintes d'Alzheimer sont âgées et l'utilisation d'un cocktail de médicaments serait risquée. L'alternative serait des composés multi-cibles permettant de cibler plusieurs acteurs de la pathologie (Muralidar *et al.*, 2020).

Plusieurs molécules ciblant spécifiquement la protéine tau dans le cadre du développement de l'immunothérapie sont consignées dans le tableau 3.

Tableau 3. Essais en double aveugle en cours contrôlés par placebo sur des médicaments potentiellement modificateurs de la maladie pour le traitement des tauopathies primitives (Panza *et al*, 2019)

Médicament	Nom de l'étude ClinicalTrials.gov Identifiant	Mécanisme d'action	Population d'étude
Salsalate	NCT02422485	Inhibiteur de l'acétylation de Tau	PSPS
BIIB092	TauBasket NCT03658135	Anticorps monoclonal Anti-tau	PSPS, FTLD-Tau, nfvPPA, CTE
	PASSPORT NCT03068468		PSPS
C2N-8E12 (ABBV-8E12)	ARISE NCT02985879	Anticorps monoclonal Anti-tau	PSPS
	NCT03391765		PSPS
AADvac-1	NCT03174886	vaccin Anti-tau	nfvPPA
TPI 287	NCT02133846	Stabilisateur des microtubules	PSPS, CBS

PSPS: *progressive supranuclear palsy syndrome*, CBS: *corticobasal syndrome*, nfvPPA : *nonfluent variant of primary progressive aphasia*, CTE : *chronic traumatic encephalopathy*, FTLD : *frontotemporal lobar degeneration*

1.7.5. Neuroprotection

De nombreux travaux indiquent que la MA s'accompagne d'une perte neuronale et d'une altération de l'architecture synaptique, et il est notoire que les facteurs de croissance protègent de la mort neuronale et de la toxicité amyloïde. Le facteur NGF (Nerve Growth Factor) cible plus particulièrement la transmission cholinergique (Levi-Montalcini, 1987). Ainsi le NGF améliore l'atrophie cholinergique et les troubles comportementaux associés chez le rat âgé (Fischer *et al.*, 1987), et réduit la dégénérescence cholinergique induite par lésion chez le macaque (Tuszynski *et al.*, 1990). Il est toutefois peu probable qu'une stratégie visant uniquement la transmission cholinergique soit une manière de « guérir » la MA mais cette

approche, de façon concomitante aux approches anti-amyloïdiques, pourrait s'avérer complémentaire, particulièrement aux stades précoces ou modérés de la MA.

Les polyphénols, connus comme étant des substances à activités biologiques diverses, se sont de plus avérés être des neuroprotecteurs (Han *et al.*, 2007). Certaines études montrent que les polyphénols pourraient être des inhibiteurs de l'agrégation de la protéine tau, responsable de la formation des DNFs (Bulic *et al.*, 2010). La phosphorylation de la protéine tau se fait au niveau des résidus sérine/thréonine situés principalement dans les domaines basiques riches en proline de la protéine. Ces domaines sont des cibles puissantes capables d'être fixés les polyphénols, ce qui pourrait entraîner une inhibition de l'agrégation de la protéine tau (Guéroux *et al.*, 2012). Les injections intrapéritonéales quotidiennes entre 12 et 14 mois et le traitement oral entre 8 et 14 mois avec du thé vert ont induit une diminution de la protéine tau hyperphosphorylée insoluble dans le cerveau de souris transgéniques (Freyssin *et al.*, 2018).

1.7.6. Thérapies complémentaires et alternatives pour la MA

D'autres approches thérapeutiques non cholinergiques comprennent les antioxydants (Teixeira *et al.*, 2013) et la thérapie basée sur l'utilisation des vitamines (Engelborghs *et al.*, 2014 ; Andrade *et al.*, 2019), la thérapie par cellules souches (Li *et al.*, 2014), l'hormonothérapie (Honjo *et al.*, 2003), l'utilisation d'antihypertenseurs ou hypolipémiants (Kivipelto *et al.*, 2002). Aussi, on note l'utilisation des inhibiteurs sélectifs de la phosphodiesterase (PDE) (Ghavami *et al.*, 2006), des sécrétases β et γ (impliquées dans la synthèse du peptide A β) et de l'agrégation A β , l'inhibition de l'hyperphosphorylation de la protéine tau et des dégénérescences neuro-fibrillaires intracellulaires (DNFs), l'utilisation d'anti-inflammatoires non stéroïdiens, des chélateurs de métaux de transition (Sampson *et al.*, 2014), des facteurs neurotrophiques dérivés du cerveau (Wollen, 2010). Des approches basées sur des récepteurs de neurotransmetteurs modulant plusieurs récepteurs et neurotransmetteurs ont également été étudiées (Doraiswamy, 2002). L' α -sécrétase et la néprilysine catalysent la coupure à l'intérieur de la séquence A β ont également été ciblées (Hüll *et al.*, 2006). Parmi les thérapies stimulantes, l'exercice physique, l'entraînement cognitif, la socialisation et la musique ont également été étudiés (Wollen, 2010). Des agents nutritionnels et botaniques tels que les plantes médicinales, les composés phytochimiques, les vitamines, les minéraux, les acides gras oméga-3, l'acétyl-L-carnitine ont également été testés dans un certain nombre d'essais précliniques et cliniques (Wollen, 2010). Depuis, la phytothérapie a été utilisée en

monothérapie ou en complément de thérapie conventionnelle, des essais cliniques rigoureux et des préparations à base de plantes standardisées sont nécessaires afin de tester leur efficacité, leur innocuité, leur tolérance et leurs éventuelles recommandations cliniques (Man *et al.*, 2008).

1.7.7. Utilisation des plantes médicinales

Le traitement actuel n'apporte qu'un soulagement symptomatique en proposant une thérapie palliative temporaire qui diminue le taux de déficience cognitive associée à la MA (Dey *et al.*, 2017). De nombreux composés ayant une activité pharmacologique isolés des plantes, des animaux ou des microorganismes ont des effets bénéfiques dans le traitement de la MA en ciblant différents mécanismes pathologiques (Andrade *et al.*, 2019).

Tableau 4. Plantes médicinales au potentiel neuroprotecteur sur des modèles *in vitro* et *in vivo*

Nom de la plante	Famille	Mode d'action	Référence
<i>Allium sativum</i> L.,	Amaryllidaceae	↑anti-amyloïdogénique ↑anti-inflammatoire, ↑anti-fibrillaire	Chauhan, 2006
<i>Angelica gigas</i>	Apiaceae	↑mémoire, ↑anti amnésique, ↑inhibition AChE ↓ déficience de mémoire	Park <i>et al.</i> , 2012 Yan <i>et al.</i> , 2004
<i>Angelica sinensis</i>	Apiaceae	↓GSK-3β, ↑PI3K, ↑phosphorylation de CREB, ↓hyperphosphorylation de tau	Zhang <i>et al.</i> , 2011
<i>Cajanus cajan</i> (L.)	Fabaceae	↑ ChAT, ↑antioxydant	Ruan <i>et al.</i> , 2009
<i>Chamaecyparis obtusa</i>	Cupressaceae	↓déficits comportementaux, ↑ inhibition AchE ↑mémoire	Bae <i>et al.</i> , 2012
<i>Dendrobium nobile</i> Lindl.,	Orchidaceae	↓hyperphosphorylation de tau ↓apoptose	Yang <i>et al.</i> , 2014
<i>Ginkgo biloba</i> L.,	Ginkgoaceae	↑efficacité contre démence ↓stress oxydatif, ↓caspase-3 ↓apoptose, ↓toxicité	Cong <i>et al.</i> , 2011 Belviranli <i>et al.</i> , 2015 Zhang <i>et al.</i> , 2015
<i>Magnolia officinalis</i>	Magnoliaceae	↑mémoire, ↑antioxydant, ↓glutathione, ↓p38/MAPK	Lee <i>et al.</i> , 2011

<i>Panax ginseng</i> C.A.	Araliaceae	↑ efficacité contre MA ↑ déficits cognitifs	Heo <i>et al.</i> , 2011 Lee <i>et al.</i> , 2008
<i>Polygonum multiflorum</i> Thunb.,	Polygonaceae	↑ fluidité membrane mitochondrial ↑ activité COX mitochondrial	Hou <i>et al.</i> , 2008
<i>Salvia officinalis</i> L.,	Lamiaceae	↑ fonctions cognitives ↓ agitation	Akhondzadeh <i>et al.</i> , 2003
<i>Pinus pinaster</i>	Pinaceae	↑ efficacité contre MA	Peng <i>et al.</i> , 2002
<i>Valeriana amurensis</i>	Caprifoliaceae	↑ fonction cholinergique cérébral, ↓ apoptose	Wang <i>et al.</i> , 2014
<i>Tabernaemontana divaricata</i> (L.)	Apocynaceae	↓ AChE, ↑ mémoire ↑ activité neuronale ↓ agitation	Nakdook <i>et al.</i> , 2010
<i>Valeriana amurensis</i>	Caprifoliaceae	↓ β-APP, ↓ Caspase-3 ↓ iNOS, ↓ COX-2 ↓ IκB	Zuo <i>et al.</i> , 2010 Zhang <i>et al.</i> , 2010
<i>Vitis amurensis</i>	Vitaceae	↓ neurotoxicité Aβ, ↓ démence	Jeong <i>et al.</i> , 2010
<i>Zataria multiflora</i>	Lamiaceae	↑ inhibition AChE, ↑ antioxydant, ↑ antiinflammatoire	Majlessi <i>et al.</i> , 2012

↑ prévient la perte/induit/augmente/élicite/promeut/restaure/active/inhibe la déplétion/protège
↓ atténue/décroit/décline/termine/bloque/prévient/inhibe

AChE : acétylcholine estérase, CREB : *cAMP response element binding protein*, PI3K : *phosphoinositide 3-kinase*, ChAT : *choline acetyl transferase*, MAPK : *mitogen-activated protein kinase*, MA : maladie d'Alzheimer, iNOS : *inducible nitric oxide synthase*, COX-2 : *cyclooxygenase-2*, IκB : I kappa-B.

1.8. TRAVAUX ANTERIEURS EFFECTUES SUR *KHAYA GRANDIFOLIOLA*

Le genre *Khaya* est la principale source d'acajou d'Afrique et huit espèces de ce genre poussent dans la zone tropicale (Figure 24). *Khaya grandifoliola* C. DC. (KG), une plante de la famille des *Meliaceae* utilisée en médecine traditionnelle africaine pour le traitement du paludisme, de la gonorrhée, des maladies de la peau, de la diarrhée, des ulcères gastriques, des hépatites, de la tuberculose, des convulsions. Les parties les plus utilisées sont le tronc et les racines (Mukaila *et al.*, 2021).

Des études antérieures effectués avec différents extraits de cette plante ont montré des activités antipaludiques, antibactériennes, anti-ulcéreuses, antianémiques, anti-

inflammatoires, antifongiques, hypoglycémiques, hypocholestérolémiantes (Bickii *et al.*, 2000 ; Ijarotimi *et al.*, 2010 ; Hashem *et al.*, 2013 ; Mediesse *et al.*, 2018). De plus, des effets antioxydants et hépato-protecteurs ont également été rapportés (Njayou *et al.*, 2015, 2016 ; Galani *et al.*, 2016 ; Kouam *et al.*, 2017). Des études toxicologiques effectuées sur l'extrait aqueux de l'écorce montrent une toxicité subchronique chez le rat à une dose de 500 mg/kg de poids corporel (Njikam et Njikam, 2006). Des études phytochimiques ont permis d'isoler et de caractériser 11 limonoïdes, notamment le grandifotane A, le méthylangolensiate, la gédunine, la 7-déacétylkhivorine, la 1-déacétylkhivorine et la 6-acétylswiéténolide. D'autres composés ont aussi été identifiés, la catéchine, la quercétine-3-O-glucoside/ rhamnoside et des esters méthyliques d'acides gras (Mukaila *et al.*, 2021 ; Olatunji *et al.*, 2021).

Les travaux d'Owona en 2015 ont montré que les extraits et fractions de KG possèdent des activités immunomodulatoires et antiinflammatoires sur une lignée de macrophages et de microglies intoxiqués au LPS. Les extraits de cette plante inhibent la production des cytokines proinflammatoires (IL-6, TNF- α , IL-1 β) et l'activité de la p38MAPKinase réduisant ainsi la neuroinflammation (Owona, 2015).



Figure 24. Photographie de la plante *Khaya grandifolia* (photographie Ella, 2017)

Plante communément appelée Acajou d'Afrique ou à larges feuilles. Arbre caducifolié atteignant jusqu'à 40 m de haut et une circonférence de 5 m. Il pousse généralement dans des forêts semi-décidues de type sec ou dans des savanes. L'arbre est remarquable par ses larges feuilles et ses écorces crevassées sont de saveur amère et caractérisées par une couleur brun-grisâtre à la surface. L'écorce interne est de couleur rose foncée.

CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES

CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES

2.1. MATERIEL

2.1.1. Matériel végétal

Les écorces de *Khaya grandifoliola* (KG) (Méliaceae) ont été récoltées dans la localité de Fouban (Ouest Cameroun) au mois de Juillet 2017. L'identification de la plante a été faite à l'Herbier National du Cameroun sous le code d'identification 23434YA.

Les écorces de la plante ont été nettoyées, découpées, séchées à température ambiante et broyées pour la préparation de l'extrait brut.

2.1.2. Animaux de laboratoire et lignée cellulaire

2.1.2.1. Lignée cellulaire IMR32

C'est une lignée de neuroblastomes humains isolée des tissus des personnes atteintes du cancer du cerveau. Ces cellules ont été fournies par le *National Centre for Cell Science* (NCCS, Pune, Inde). La différenciation des cellules IMR32 mime la structure du cortex cérébral humain et forment des fibrilles intracellulaires communément observées chez des personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer (Rao et Kisaalita, 2002). Elles ont été utilisées pour étudier les mécanismes de neuroprotection des composés d'intérêt.

2.1.2.2. Animaux de laboratoire

Les animaux utilisés étaient des rats mâles *Albino* de souche Wistar. Ces animaux ont été élevés à l'animalerie du laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie. Les rongeurs sont des animaux les plus utilisés expérimentalement car faciles à nourrir et à soigner. Ils résistent à bien aux expérimentations. A l'âge adulte, leur comportement peut être grandement affecté et, on pourra analyser bien des réactions et réaliser ainsi de nombreux tests expérimentaux (Clarac, 2015).

2.1.3. Appareils et réactifs

2.1.3.1. Appareils

Centrifugeuse (*Thermo Fischer Scientific*), sonicateur *Ultrasonic Homogenic 600W Lab Sonicator Processor Cell Disruption Mixer Handling*, hôte de culture cellulaire à flux laminaire (*Thermo Fischer Scientific*), étuve (HP4004), dispositif de western blot (*BioRad*),

Microscope *inverted microscope Primovert with digital camera Axiom 105 color* (Zeiss, NY, USA), lecteur de plaque (*Multiskan, Thermo Fischer Scientific*); spectrophotomètre (*SpectraMax M5, Molecular Devices*); Incubateur à CO₂ (*Thermo Fischer Scientific*); Centrifugeuse réfringente (*Thermo Fischer Scientific*); Vortex; spectrophotomètre (*Thermo Fischer Scientific*); microscope à fluorescence *cell imager ZOE™* (BioRad, Portland, USA), microscope optique à contraste de phase Zeiss Axiovert 100 (Zeiss, NY, USA).

2.1.3.2. Réactifs

Le 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), le milieu de culture *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), le sérum fœtal de veau (SFV) ont été fournis par les laboratoires Himedia, Indie. Le gel de silice 60/120 (MERCK, Vetec™, Germany). Le peptide A β ₁₋₄₂ (rpeptide, Georgia, USA), 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), iodure de propidium (IP), la β -actine, le DMSO, le tampon de lyse RIPA, *skim milk*, le cocktail d'inhibiteurs de protéase et phosphatase, paraformaldéhyde ont été fournis par Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA. L'anticorps secondaire anti-rabbit IgG-alkaline phosphatase a été fourni par Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA. Les anticorps primaires caspase-3 clivée, pERK, SOD, SNAP25, SYP ont été fournis par Cell Signaling (Boston, MA, USA). L'anticorps pT181-tau a été fourni par Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Le Hoescht 33342 a été fourni par Invitrogen Co (Carlsbad, CA, USA). La trypsine-EDTA 0,25% a été fourni par Gibco, BRL (Gaithersburg, MD, USA). Le kit de dosage des protéines *Bicinchoninic Acid assay (BCA) Pierce™* a été fourni par Thermo Scientific, MA, USA. La visualisation du signal western blot a été faite grâce au *Super Signal West Pico using chemiluminescence reagents* (ThermoFisher Scientific, MA, USA). La membrane de nitrocellulose a été fournie par Merck Millipore, (Darmstadt, Germany). La scopolamine solution injectable 0,5mg/2mL a été fourini par les laboratoires Cooper (Seine et Marne, France). Le donépézil hydrochloride (Aricept 10 mg), acide rétinoïque (*SigmaAldrich*, Allemagne).

Les solvants utilisés : éthanol, DMSO, hexane, acétate d'éthyle.

2.2. METHODES

2.2.1. Préparation de l'extrait brut et fractionnement de KG

2.2.1.1. Préparation de l'extrait brut de KG

La poudre de l'écorce a été macérée dans le mélange Ethanol/Eau (65/35 V/V) pendant 48 heures. Le mélange était remué à l'aide d'une baguette de verre. Le macérât collecté a été filtré sur papier whatman N°1. Le filtrat a été centrifugé (4500 g, 15 minutes, température ambiante) et concentré sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif (40°C). L'extrait final obtenu a été séché à l'étuve (50°C). La poudre obtenue a constitué notre extrait brut et le rendement d'extraction a été calculé.

2.2.1.2. Fractionnement de l'extrait brut de KG

Le fractionnement de l'extrait brut a été réalisé par la chromatographie sur colonne de silice.

a. Principe

Cette technique de séparation utilise deux phases : une stationnaire et une mobile. Les constituants du mélange à séparer sont plus ou moins facilement absorbés par la phase fixe et plus ou moins dissous dans la phase mobile. La différence de polarité entre les composés entraîne leur élution de la colonne à des vitesses différentes en fonction de leur affinité avec la silice ou l'éluant.

b. Mode opératoire

15 grammes de l'extrait ont été fixés à 15 g de silice et soumis à la chromatographie sur colonne (colonne: d x h = 3,5 x 65 cm). Les systèmes solvants de polarité croissante hexane/acétate d'éthyle (100:0 v/v à 0:100 v/v) ont été utilisés pour l'élution. En effet, l'extrait a été élué successivement avec 300 mL hexane/acétate d'éthyle (100:0), hexane/acétate d'éthyle (95:5), hexane/acétate d'éthyle (90:10), hexane/acétate d'éthyle (75:25) et hexane/acétate d'éthyle (0:100). 20 éluâts ont été recueillis de la colonne. Après évaporation du solvant et analyse qualitative par chromatographie sur couche mince (CCM) suivie d'une révélation à la lumière ultra-violette, 2 fractions ont été obtenues KGf1 (37 mg) et KGf2 (22 mg) sur la base de la similarité de leur profile CCM.

c. Préparation de la solution stock de l'extrait brut et des fractions de plante

Pour l'étude *in vitro*, l'extrait (ou la fraction) a été préparé à la concentration mère de 50 mg/mL. Pour cela, 1 g de poudre de KG a été dissous dans 5 mL de DMSO et dilué par la suite dans 15 mL de DMEM. Les différentes solutions de travail ont été obtenues en diluant la solution stock dans le DMEM.

Pour l'étude *in vivo*, les travaux de Njingou en 2017 ont montré que l'extrait hydroéthanolique 66% de KG à 25 mg/kg protège mieux le foie contre la toxicité induite par le cisplantine ; la dose de 100 mg/kg ayant montrée une toxicité. Afin de rechercher l'effet de l'extrait de KG sur le cerveau, nous avons choisi de préparer une solution stock de cet extrait à la dose 50 mg/kg. A cet effet, 50 mg de poudre ont été dissous dans 50 mL d'une solution de méthylcellulose 0,5% (vehicule utilisé). Les concentrations 25 mg/kg et 5 mg/kg ont été préparés par dilution de la solution mère dans la solution de méthylcellulose 0,5%.

Le donépézil (anticholinergique de référence) à 1 mg/kg a été préparé en dissolvant un comprimé de 10 mg dans 100 mL de méthylcellulose 0,5%.

Toutes les solutions stocks ont ensuite été filtrées en utilisant des filtres à seringue de 0,22 µm dans les conditions stériles. Les filtrats obtenus ont été répartis en aliquots et conservés à -20°C.

2.2.1.3. Détermination de la composition phytochimique de l'extrait de *K. grandifoliola*

Les produits naturels ont montré leur effet potentiel comme agents thérapeutiques contre la MA. Une variété de métabolites secondaires: flavonoïdes, tannins, terpenoïdes, alcaloïdes et polyphénols sont utilisés pour réduire la progression de la maladie (Varshney et Siddique, 2021; Chougle *et al.*, 2021).

a. Analyse qualitative de la composition phytochimique

Les différentes familles de métabolites secondaires contenues dans notre extrait ont été recherchées selon les protocoles décrits par **Harborne** (1976), **Odebeyi** et **Sofowara** (1978), **Trease** et **Evans** (1989), **Sofowora**, (1993).

Le test de mise en évidence des flavonoïdes : cinq millilitres d'une solution d'ammoniaque diluée à 25% ont été ajoutés à cinq millilitres une solution aqueuse d'extrait concentrée à 2 mg/mL. Cinq millilitres d'acide sulfurique concentré ont été apportés au mélange. L'apparition d'une coloration jaune qui disparaît au fil du temps met en évidence la présence des flavonoïdes.

Le test de mise en évidence des alcaloïdes : un millilitre d'acide sulfurique a été ajouté à un 500 microlitres d'extrait de plante. L'ensemble a été homogénéisé et porté à ébullition pendant 2 minutes. Puis, le réactif de Mayer a été ajouté. Le développement d'une turbidité confirmait la présence des alcaloïdes.

Le test de mise en évidence des saponines : vingt-cinq milligrammes d'extrait ont été mélangés à 15 mL d'eau distillée dans un tube à essai et l'ensemble a été porté au bain-marie bouillant pendant 5 min. Après refroidissement, 5 mL de cette solution ont été introduits dans le tube à essai puis agité vigoureusement pendant 10 secondes au vortex. La présence d'une mousse épaisse d'un centimètre qui persiste plus d'une minute après agitation met en évidence la présence des saponines.

Le test de mise en évidence des tanins : à cinq millilitres de la solution d'extrait concentrée à 2 mg/mL, 3 gouttes de chlorure ferrique 1 M ont été ajoutées. La présence des tanins se manifeste par un changement de coloration de la solution qui vire au bleu foncé (tanins galliques) ou alors au vert noirâtre marquant la présence des tanins catéchiques.

Le test de mise en évidence des stéroïdes : deux cents milligrammes d'extrait ont été dissous dans 10 mL de chloroforme. 2 mL d'acide acétique ont ensuite été introduits dans la solution et l'ensemble a été refroidi dans un bain de glace. Quelques gouttes d'acide sulfurique concentré ont été ajoutées et la formation d'un anneau bleu gris met en évidence la présence des stéroïdes.

Le test de mise en évidence des polyphénols : cinquante milligrammes d'extrait ont été dissous dans 15 mL de méthanol et la solution a été chauffée au bain-marie bouillant pendant 15 min. Ensuite, 3 gouttes d'une solution decyanure ferrique (1 mL de FeCl_3 1% et 1 mL de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) fraîchement préparée ont été ajoutées. La formation d'un précipité vert met en évidence la présence des phénols.

Le test de mise en évidence des triterpènes : à 10 μL d'une solution d'extrait concentrée à 10 % (p/v), 2 mL de chloroforme ont été ajoutés et l'ensemble a été homogénéisé. Puis 3 mL d'acide sulfurique concentré ont été ajoutés. La formation d'une interface brune-rougeâtre met en évidence la présence des terpénoïdes

Le test de mise en évidence des anthraquinones : cinq milligrammes d'extrait ont été dilués dans 4 mL d'un mélange de chloroforme et d'éther de pétrole (v/v), homogénéisés puis filtrés. A 1 mL de filtrat, un volume égal de NaOH 10% a été ajouté. L'apparition d'une coloration rouge met en évidence la présence des anthraquinones.

b. Analyse quantitative

i. Dosage des polyphénols totaux : méthode de Folin-Ciocalteux

Principe

Ce dosage repose sur la réduction du mélange d'acide phosphotungstique et phosphomolybdique par les composés phénoliques en milieu alcalin en oxyde bleu de tungstène et de molybdène absorbant à 765 nm. L'intensité de la coloration étant directement proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans le milieu réactionnel.

Mode opératoire

Dans les tubes à essai marqués blanc et essai, ont été introduits respectivement 100 μL de méthanol et 100 μL de la solution d'extrait (préparé à 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ensuite 200 μL du réactif de Folin-Ciocalteux 2N dilué au dixième et 2mL d'eau distillée ont été introduits dans chacun des tubes. Après 3 min d'incubation à température ambiante, 1mL de la solution saturée de carbonate de sodium (NaCO_3) 20% (m/v) a été ajoutée. L'ensemble des tubes était mélangé à l'aide du vortex puis incubé à température ambiante pendant 1 h et l'absorbance a été lue au spectrophotomètre (*Thermo Fisher Scientific*) à 765 nm contre le blanc. Le dosage a été réalisé en triple et l'acide gallique était utilisé comme étalon. La teneur en polyphénols totaux a été déterminée à l'aide de la droite d'étalonnage réalisée à partir de l'acide gallique et exprimée en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g d'extrait) (Dhar *et al.*, 2012).

ii. Dosage des flavonoïdes

Principe

Les flavonoïdes donnent avec le chlorure d'aluminium des complexes de couleur jaune qui absorbent à 430 nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de flavonoïdes présents dans le milieu réactionnel.

Mode opératoire

Dans les tubes blanc et tests ont été respectivement introduits, 500 μL de méthanol et 500 μL de la solution d'extrait (préparée à 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ensuite 500 μL de trichlorure d'aluminium (AlCl_3) 2% (m/v) ont été introduits dans chacun des tubes. L'ensemble des tubes a été mélangé à l'aide du vortex puis incubé à température ambiante pendant 1 h et les densités optiques de la coloration jaune lues au spectrophotomètre (*Thermo Fisher Scientific*) à 430 nm contre le blanc. Le dosage a été réalisé en triple et la quercétine a été utilisée comme étalon. Les teneurs en flavonoïdes ont été déterminées à l'aide de la droite d'étalonnage

réalisée à partir de la quercétine et exprimées en milligrammes équivalents de quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g d'extrait) (Dhar *et al.*, 2012).

2.2.2. Evaluation de l'effet des extraits de KG sur la production des espèces oxygénées réactives (EOR) et l'apoptose cellulaire

Les propriétés neuroprotectrices des extraits de KG ont été étudiées en évaluant leurs effets sur la toxicité induite par le peptide A β ₄₂ sur les cellules neuroblastomes IMR32 différenciées par mesure de la production des espèces oxygénées réactives (EOR) et la viabilité cellulaire. Les tests de viabilité cellulaire ainsi que la coloration des noyaux des cellules par des fluorochromes ont été effectués.

2.2.2.1. Culture cellulaire et différenciation

a. Culture des cellules (Chaudhari *et al.*, 2017)

Les cellules IMR-32 ont étéensemencées dans des boîtes de culture (T75) à raison de 5x10⁶ cellules pour 10 mL de milieu de culture DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) supplémenté avec 10% sérum de veau, L-glutamine (2 mM), pénicilline (100 IU/mL) et streptomycine (100 µg/mL). Ces cellules ont été cultivées sous atmosphère (5% CO₂, 37°C) et le milieu de culture était changé tous les deux jours. Une fois la culture confluente (au moins 80%), le milieu a été aspiré et les cellules ont été lavées 3 fois avec 5 mL de tampon phosphate salin stérile (PBS 0,1 M; pH 7,4). Après lavage, les cellules ont été détachées par incubation (5% CO₂, 37°C, 3 min) avec 2 mL d'une solution de trypsine-EDTA 0,25%. L'action de la trypsine a été arrêtée par ajout de 3 mL de milieu de culture frais. Par la suite, les cellules ont été collectées après centrifugation (800 g, 5 min, 25°C). Le surnageant a été éliminé et le culot cellulaire a été suspendu dans 10 mL de milieu DMEM frais. Cinquante microlitres de cette suspension ont été prélevés pour le test de viabilité au Bleu Trypan dans une cellule de Malassez. Une partie des cellules a été réensemencé dans de nouvelles boîtes de culture, et le reste a été utilisé directement pour les expériences.

b. Numération cellulaire en présence de bleu trypan

Pour déterminer la viabilité des cellulesensemencées et cultivées, le test au bleu trypan a été réalisé.

Principe

Le bleu de trypan est un colorant vital qui colore les tissus ou les cellules mortes en bleu. Il permet de faire une estimation de la proportion des cellules viables dans une population donnée. Le bleu de trypan a tendance à entrer dans toutes les cellules qu'il rencontre et une fois dans la cellule, celle-ci met en place un mécanisme de son expulsion. Ce mécanisme nécessitant de l'énergie, seules les cellules possédant une source d'ATP peuvent le mettre en place. Ainsi une cellule vivante expulsera le bleu de trypan et restera réfringente (non colorée) au microscope, alors qu'une cellule morte sera colorée en bleu (membrane cellulaire endommagée).

Mode opératoire

Dans un tube eppendorf de 1,5 mL, 50 μ L de la suspension cellulaire (5×10^6 cellules/mL) ont été mélangés à 200 μ L de la solution de bleu trypan 0,4% diluée dans le PBS à l'aide d'une micropipette. Par la suite, 10 μ L du mélange obtenu ont été prélevés et déposés dans la cellule de Malassez. La préparation a été ensuite observée sous microscope optique *Zeiss Axiovert 100* (Zeiss) et les cellules vivantes et mortes ont été comptées à l'aide d'un hémocytomètre.

c. Différenciation cellulaire (Celay *et al.*, 2013)

La différenciation cellulaire est un processus par lequel les cellules prennent des caractères morphologiques et physiologiques particulières et différentes des cellules souches progénitrices. Les cellules neuroblastomes (cellules souches) sont des cellules isolées et leur différenciation en présence de l'acide rétinoïque en neurones entraîne l'apparition des axones permettent aux cellules différenciées (neurones) de s'interconnectées. Les plaques de culture cellulaire (6 et 12 puits) ont été au préalable traitées avec une solution de collagène pendant 24h afin de permettre d'adhérence des cellules au fond de la plaque et d'éviter la perte de celles-ci lors de la manipulation. Les cellules IMR32 ont étéensemencées à une densité de 500 000 cellules par puits dans les plaques de 6 puits (2 mL de milieu de culture), 250 000 cellules par puits dans les plaques de 12 puits (1 mL de milieu de culture). Ces cellules ont été cultivées dans le DMEM complet et incubées (37°C, 5% CO₂) jusqu'à confluence (80-100%) avant le démarrage de la différenciation.

Pour la différenciation, les cellules IMR32 ont été traitées avec une solution d'acide rétinoïque 10 μ M (Jour 0), avec un changement quotidien du milieu de culture. La morphologie des cellules a été examinée à l'aide d'un microscope à inversion de phase

Primovert with digital camera Axiom 105 color (Zeiss). Après 6 à 8 jours (J6 ou J8) de différenciation, les cellules étaient prêtes pour le traitement.

2.2.2.2. Traitement des cellules IMR32 différenciées

Pour examiner l'effet neuroprotecteur de l'extrait et des fractions de plante, les cellules ont étéensemencées à raison de 500 000 cellules dans les plaques de 6 puits et 250 000 dans les plaques de 12 puits et incubées (37°C, 5% CO₂). Ces cellules ont été réparties quatre groupes et traitées pendant 48 heures de la manière suivante :

- Les cellules traitées en absence du peptide A β ₄₂ (groupe témoin);
- Les cellules traitées avec le peptide A β ₄₂ (groupe intoxiqué);
- Les cellules traitées avec le peptide A β ₄₂ et l'extrait ou la fraction de KG (groupe test);
- Les cellules traitées avec l'extrait ou la fraction de KG (groupe contrôle).

Après les différents traitements, les tests suivants ont été effectués : cytotoxicité cellulaire avec le test au MTT, le niveau d'expression des protéines superoxyde dismutase (SOD), caspase-3 clivée, SNAP25, SYP, p-tau, p-ERK) en utilisant la technique du western blot et le test de l'inhibition de l'apoptose à l'aide du microscope à fluorescence.

2.2.2.3. Détermination de l'effet de l'extrait et des fractions de KG sur la viabilité des cellules IMR 32 différenciées

Pour étudier l'effet de l'extrait et des fractions de KG sur la viabilité des cellules, les cellules IMR32 en culture ont été traitées comme précédemment décrit aux concentrations finales respectives de 1 μ M (A β ₄₂) et de 0-50 μ g/mL (extrait ou fraction de KG). Après 48h d'incubation, la viabilité des cellules a été mesurée par le test de viabilité cellulaire au cristal violet et au bromure de 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT).

a. Quantification des cellules adhérentes par coloration au cristal violet

Principe

Le cristal violet est un colorant triarylméthane qui peut se lier à des molécules de type ribose (ADN) dans le noyau. Les cellules adhérentes mortes se détacheront de la plaque et seront éliminées lors des étapes de lavage.

Mode opératoire

Les cellules IMR32 ont étéensemencées à une densité de 250 000/ puits dans une plaque de 12. Après culture et traitement, les surnageants contenant les cellules mortes ont été

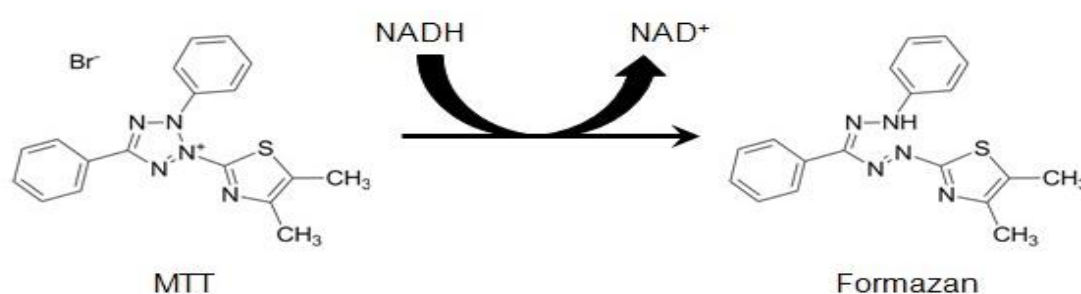
éliminés et le tapis cellulaire a été rincé une fois au PBS pour éliminer les cellules non adhérentes. 500 µL de la solution de crystal violet (Crystal Violet 0,5% dans du méthanol 25%) a été ajoutée aux cellules adhérentes pendant 5 minutes. Plusieurs lavages à de l'eau distillée ont été ensuite réalisés afin d'éliminer l'excès de crystal violet. Les cellules ont alors été séchées, incubées dans une solution de citrate de sodium 0,1 M dans de l'éthanol 50%. Après 10 min d'incubation sous agitation à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 570 nm à l'aide d'un lecteur de plaque *Multiskan, Thermo Fischer Scientific*. Le témoin négatif était constitué du milieu de culture DMEM. Le pourcentage des cellules adhérentes a été calculé par la formule suivante:

$$\% \text{ Viabilité} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO témoin}} \times 100$$

b. Test de cytotoxicité au MTT

Principe

Le test MTT (3[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium bromure) donne une indication sur l'activité mitochondriale et la densité cellulaire. Le principe du test consiste à mesurer l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale. La succinate déshydrogénase par coupure du cycle tétrazolium transforme le MTT de couleur jaune, en cristaux de formazan de couleur pourpre et insoluble. La membrane des cellules est imperméable aux cristaux de formazan conduisant ainsi à leur accumulation intracellulaire. L'addition d'un détergent solubilise les cristaux de formazan.



Mode opératoire

Les cellules IMR32 ont été ensemencées dans une plaque de 96 puits à la densité de 3 000 cellules/puits. Après culture (37°C, 5% CO₂, 24 h) des cellules, elles ont été incubées en présence de l'extrait ou des fractions de KG aux concentrations finales de 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200; 500 et 1000 µg/mL (37°C, 5% CO₂, 48 h). Par la suite, le milieu de culture a été aspiré et 70 µL d'une solution de MTT (0,5 mg/mL) diluée dans du milieu DMEM complet a

été ajouté dans chaque puits. La plaque a été incubée (37°C, 5% CO₂, 4 h). Après aspiration du MTT, les cristaux de formazan insolubles formés ont été dissous par ajout dans chaque puits de 200 µL du mélange DMSO/Ethanol (1:1 V/V). L'absorbance a été mesurée à 570 nm et à 650 nm à l'aide d'un lecteur de plaque. Le témoin négatif était constitué du milieu de culture DMEM. L'activité succinate déshydrogénase a été déterminée en calculant le pourcentage des cellules vivantes à partir de la formule suivante :

$$\% \text{ Viabilité} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO contrôle}} \times 100$$

2.2.2.3. Analyse de la morphologie cellulaire par microscopie en contraste de phase

L'effet de l'extrait ou des fractions de KG sur la morphologie des cellules IMR32 différenciées a été a été investigué. Après culture et traitement par l'extrait et les fractions de KG, les cellules ont été observées.

Principe

Le microscope à inversion de phase est un microscope optique très utilisé pour l'observation des cellules en culture *in vitro*. Il transforme en niveaux de contraste les différences d'indices de réfraction entre deux structures, lesquelles traduisent en différences de phases pour les ondes lumineuses les traversant. La source lumineuse est placée au dessus de l'échantillon et les l'objectif en dessous.

Mode opératoire

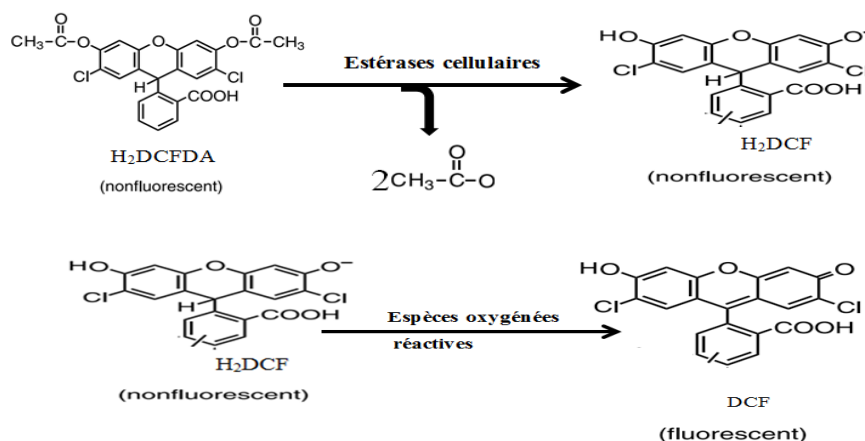
Les cellules IMR32 ont étéensemencées dans une plaque de 6 puits à la densité de 500 000 cellules/puits. Après culture, les cellules ont été incubées (37°C, 5% CO₂, 48 h) en présence l'extrait ou les fractions de KG à la concentration finale de 5 µg/mL (concentration non cytotoxique). Les cellules ont été observées à l'aide d'un microscope à contraste de phase équipé d'une caméra *Primovert with digital camera Axiom 105 color* (Zeiss). Les photographies des cellules ont été réalisées.

2.2.2.4. Mesure de la production des espèces oxygénées réactives induite par le peptide Aβ₄₂ sur les cellules IMR32

Principe

Le 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCF-DA), composé non fluorescent lipophile, traverse la membrane plasmique des cellules et se retrouve au niveau des régions lipidiques hydrophobes. Les estérases cellulaires hydrolysent les groupements

acétates libérant ainsi la molécule non fluorescente H₂DCF. Ce composé a la particularité de rester dans la cellule contrairement au composé parent, à cause de sa polarité. Le H₂DCF non fluorescente s'oxyde en présence d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) pour former le DCF qui est fluorescent. Il s'excite à 485 et 590 nm et l'intensité de fluorescence est directement proportionnelle à la quantité d'EOR produite.



Mode opératoire

Les cellules IMR32 ont étéensemencées dans une plaque de 6 puits à la densité de 500 000 cellules/puits. Ces cellules ont été incubées (37°C, 5% CO₂, 48 h) en présence ou absence de 1 µM de Aβ₄₂; co-traitées avec Aβ₄₂ (1 µM) et l'extrait ou les fractions de KG à la concentration finale de 5 µg/mL ou traité avec l'extrait ou les fractions à 5 µg/mL. Le milieu de culture a été aspiré et remplacé par 1 mL de milieu frais contenant 20 µM de H₂DCFDA et l'ensemble réincubé (37°C, 30 min, à l'obscurité). Les cellules ont été visualisées à l'aide d'un microscope à fluorescence aux longueurs d'onde d'excitation à 485 nm et d'émission à 525 nm et les images ont été enregistrées à l'aide d'un microscope à fluorescence *Cell imager ZOETM* (BioRad). Les taux d'EOR ont été exprimés par la formule suivante:

$$\% EOR = \frac{\text{Fluorescence test}}{\text{Fluorescence témoin}} \times 100$$

2.2.2.5. Test de viabilité cellulaire par coloration au Hoechst 33342 (Kim et al., 2018)

Principe

Le Hoechst est un colorant dérivé de benzimidazole traverse facilement les membranes cellulaires et qui émet une fluorescence bleue quand il est excité dans l'UV. Il a une grande affinité pour l'ADN et se lie préférentiellement aux régions riches en adénine et en thymine.

Mode opératoire

Les cellules IMR32 différenciées ont été introduites dans la plaque de 6 à une densité de 2×10^5 cellules/puits. Après traitement pendant 48 h, les cellules ont été par la suite collectées par trypsination, puis fixées avec du paraformaldéhyde 4% pendant 10 minutes à température ambiante. Après lavage au PBS, les cellules sont incubées avec du Hœchst 33342 à 5 µg/mL pendant 30 minutes à l'obscurité puis lavées de nouveau. Les cellules colorées ont été observées au microscope à fluorescence *Cell imager ZOETM* (BioRad) aux longueurs d'onde d'excitation à 350 nm et d'émission à 461 nm et les images ont été enregistrées.

2.2.2.6. Test de viabilité cellulaire par coloration à l'iodure de propidium

Principe

L'intégrité de la membrane cytoplasmique peut être évaluée par coloration à l'iodure de propidium (IP). L'IP est un agent fluorescent capable de s'intercaler dans les molécules d'acides nucléiques (ADN et ARN). Il est utilisé pour quantifier la viabilité cellulaire ; il ne colore que les acides nucléiques des cellules mortes et/ou ayant perdu leur intégrité membranaire. C'est une sonde hydrophile qui ne rentre que dans les cellules ayant une membrane plasmique altérée. L'IP s'excite à 305 et 538 nm et il émet une fluorescence orange/rouge avec un maximum d'émission 617 nm.

Mode opératoire

Les cellules IMR32 différenciées ont été introduites dans la plaque de 6 à une densité de 2×10^5 cellules/puits. Après traitement pendant 48 h, les cellules ont été par la suite collectées par trypsination et resuspendues dans une solution d'IP à 20 µg/mL dans le PBS. Après une incubation de 15 min à 37°C, les cellules colorées ont été observées au microscope à fluorescence *Cell imager ZOETM* (BioRad) à 617 nm et les images ont été enregistrées. Les cellules mortes colorées en rouge ont été comptées et le pourcentage de cellules IP positives correspond au pourcentage de cellules mortes.

2.2.3. Analyse du mécanisme neuroprotecteur de l'extrait et des fractions de KG

Les mécanismes neuroprotecteurs de l'extrait et des fractions de KG ont été étudiés par la technique de *western blot* en ciblant le dysfonctionnement mitochondrial, l'apoptose cellulaire, la toxicité synaptique et l'hyperphosphorylation de la protéine tau. L'expression de quelques protéines : SOD mitochondriale, caspase-3 clivée, *synaptosomal associated protein*

25 (SNAP25), synaptosine (SYP), phosphothréonine 181 (p-tau T181) et *Extracellular signal regulated kinase* (ERK) a été évaluée. La β -actine a été utilisée comme contrôle interne.

2.2.3.1. Extraction et quantification des protéines

a. Extraction des protéines

Après traitement des cellules, les protéines totales ont été extraites à l'aide du kit d'extraction *M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent* contenant 0,2% du cocktail d'inhibiteur de protéases *Halt protease inhibitor cocktail EDTA-free* (Thermo Fischer Scientific) suivant les instructions du fabricant. Les cellules lavées au PBS et 150 μ L de solution d'extraction ont été ajoutés dans chaque puits sous légère agitation pendant 3-5 min à température ambiante. Les lysats obtenus ont par la suite été transférés dans les tubes Eppendorf de 1,5 mL et centrifugés (15 000 g, 15 min, 4°C). Les surnageants obtenus constituaient les protéines totales ont été conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

b. Quantification des protéines

Principe

Le principe de dosage des protéines par l'acide bicinchoninique (BCA) repose sur la formation d'un complexe Cu^{2+} protéine sous des conditions alcalines, suivi d'une réduction du Cu^{2+} en Cu^+ . La quantité de cuivre réduit est proportionnelle à la quantité de protéine présente. Le BCA forme un complexe pourpre-bleue avec le Cu^+ en milieu alcalin, permettant ainsi d'évaluer la réduction alcaline des ions Cu^{2+} par les protéines.

Mode opératoire

La réaction a été réalisée dans une plaque de culture cellulaire de 96 puits. Les puits ont été subdivisés en étalonnage, blanc et essai. Dans les puits étalonnage, 25 μ L (200-1000 μ g/mL) de la solution de BSA et 200 μ L de BCA *Bicinchoninic Acid assay (BCA) Pierce* (Thermo Scientific) ont été introduites. Le blanc a été constitué de 25 μ L d'eau distillée et 200 μ L de BCA dans chaque puits. Les puits essais ont été constitués de 25 μ L de solution protéique à doser et 200 μ L de BCA. L'étalonnage, le blanc et les essais ont été introduits dans la plaque avant ajout de la solution de BCA pour faciliter le mélange. La plaque de culture a été ensuite incubée à 37°C pendant 30 min dans un bain marie. La quantité de protéine dans chaque échantillon a été déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage après lecture à 530 nm au moyen d'un lecteur de plaque (*Multiskan, Thermo Fischer Scientific*).

2.2.3.2. Séparation des protéines par électrophorèse

Principe

L'électrophorèse SDS-PAGE (électrophorèse sur gel de polyacrylamide contenant du dodécylsulfate de sodium) est une technique consistant à faire migrer des protéines dans un gel, sous l'influence d'un champ électrique, permettant ainsi leur séparation. En présence de SDS, les protéines auront donc toutes une charge négative, et migreront toutes vers l'anode. Les protéines ayant un faible poids moléculaire seront moins retenues dans les pores du gel de polyacrylamide et migreront plus loin que les grosses. Cette technique permet la séparation des protéines chargés négativement par le SDS et soumises à un champ électrique. Comme il y a une charge négative par molécule de SDS, sa liaison masque toutes les charges de la protéine, et lui confère une charge globale négative élevée. La dénaturation complète des protéines se fait par la chaleur et en présence du dithiothréitol (DTT) et du SDS.

Mode opératoire

Quarante µl d'échantillon de protéine ont été mélangés avec 20 µL 3x « loading buffer », chauffé pendant 5 min à 95°C et brièvement homogénéisé. Le mélange obtenu a été introduit dans un gel 12% SDS-PAGE. La migration débute à un voltage de 130 V pendant 10 min. Le voltage a été ensuite changé à 200 V jusqu'à ce que la bande de marcation.

2.2.3.3. Préparation du gel et de cuve d'électrophorèse

Le gel d'électrophorèse est constitué d'un gel de concentration de 5% et d'un gel de séparation de 12% en acrylamide/bisacrylamide. Le pourcentage en acrylamide est choisi en fonction de la taille de la protéine à détecter. Plus, la protéine a un poids moléculaire élevé et plus le pourcentage du gel sera faible.

Le gel de séparation a été coulé entre deux plaques de verres d'épaisseur de 1,5 mm. Un petit volume d'isopropanol a été ajouté sur le gel pour éliminer les bulles d'air et avoir une surface régulière. Celui-ci sera éliminé et rincé avec de l'eau distillée une fois le gel est polymérisé. Le gel de concentration est coulé par-dessus du gel de séparation, et le peigne a été immédiatement positionné pour tracer les puits où seront déposés les échantillons.

a. Remplissage de la cuve

Le compartiment intérieur a été rempli (entre la cassette de gel et la plaque de barrage) et le compartiment principal de la cuve ont été remplis avec du tampon de migration pH 8, jusqu'à atteindre environ 5 cm en dessous de la limite de remplissage.

b. Chargement du gel

Le gel comportait en surface 10 puits matérialisés par des créneaux répartis sur la face supérieure du gel. Un dépôt de 10 μ L d'échantillon chauffé de marqueurs de poids moléculaires, et de 10 μ L d'un mélange étalon de protéines ont été chacun soigneusement introduits dans le gel au moyen d'une micropipette.

c. Mise en route de l'électrophorèse

Après réalisation des dépôts, la cuve à électrophorèse a été fermée avec le couvercle porte électrodes. Le couvercle a été ensuite soigneusement verrouillé. Les électrodes ont été raccordées au générateur, puis l'appareil a été mis en service. Les conditions de migration ont été réglées de la manière suivante : 130 V, 90 mA (Figure 52, annexe). Le fonctionnement de la migration a été vérifié quelques instants après le lancement. Pendant la migration, une buée a apparu sur le couvercle, ainsi que de fines bulles dans la cuve, traduisant le bon fonctionnement du champ électrique. Régulièrement en cours de migration, le bon déplacement des bandes au sein du gel a été vérifié visuellement.

d. Récupération du gel

Après la fin de la migration, le couvercle a été ouvert, et le bloc support plus le gel d'électrophorèse a été sorti du dispositif. Le tampon présent dans le compartiment interne a été éliminé. Les différentes fixations ont été démontées pour récupérer la cassette de gel. A ce stade, pour récupérer le gel, nous avons séparé les deux plaques plastiques au sein desquelles le gel a été coulé.

2.2.3.4. Transfert des protéines sur la membrane de nitrocellulose

Une fois la migration achevée, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose imbibée de tampon de transfert (membrane nitrocellulose 0,45 μ M). L'ensemble est composé d'un sandwich comprenant : une éponge, deux feuilles de papier Whatman, le gel d'acrylamide, la membrane de nitrocellulose, deux feuilles de papier Whatman et une éponge (Figure 25). Le montage est ensuite placé dans la cuve de transfert remplie de tampon de transfert. Le transfert a été réalisé à 110 V pendant 2 h à 4°C. Lorsque le transfert est terminé, la membrane est plongée dans une solution de saturation constituée du PBS, additionnée de 5% de lactoprotéines pendant 1 h à température ambiante sous agitation. La membrane est ensuite lavée 3 fois pendant 5 min avec le PBS. L'incubation avec les anticorps primaires est faite toute la nuit à 4°C. Après cette incubation, la membrane est lavée

3 fois avec du PBS, et ensuite incubée pendant une heure sous agitation avec l'anticorps secondaire couplé à la Horse Raddish Peroxidase (HRP) dilué dans du PBS. Un marquage de l'actine a été réalisé. La membrane est lavée encore une fois 3 fois pendant 5 min. La membrane est ensuite révélée en utilisant le kit *Supersignal West Femto Maximum Sensitivity* (Fisher Scientific), le signal est enregistré en utilisant la chemoluminescence et l'analyse de densitométrie des bandes obtenues est effectuée par le logiciel Image J.

Principe

La technique de western blot est une méthode analytique utilisée pour détecter des protéines spécifiques dans un échantillon donné. Cette technique utilise une électrophorèse sur gel pour séparer les protéines natives en fonction de leur taille. Les protéines ainsi séparées sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose, sur laquelle elles sont colorées avec des anticorps spécifiques de la protéine d'intérêt.

Mode opératoire

Les protéines une fois séparées sont transférées du gel à une membrane de nitrocellulose et le transfert s'est effectué pendant 2 h. Après le transfert, les sites de fixation non spécifique ont été bloqués avec du TBST (*Tris-Buffered Saline and Tween 20*) contenant 5% (w/v) de lait sec pendant 1h à température ambiante. Par la suite, la membrane a été lavée avec 15 mL de TBST pendant 3 phases de 5 min chacune. La membrane a été incubée avec des anticorps primaires dirigés contre la SOD, la caspase-3 clivée, SNAP25, SYP, p-T181-tau et p-ERK toute la nuit à 4°C. La revelation a été faite par chemoluminescence.

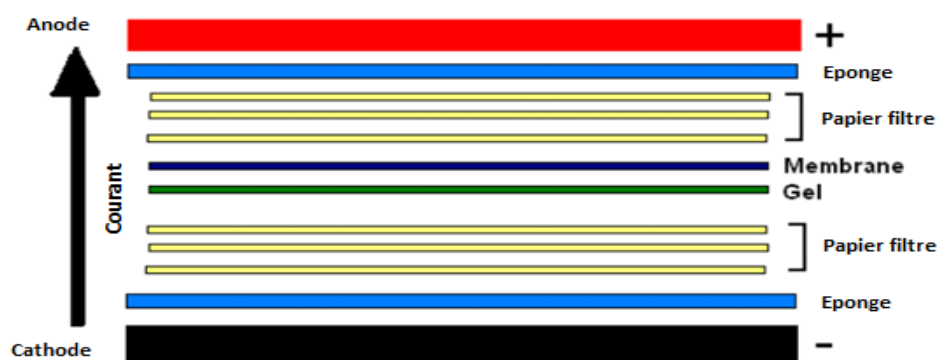


Figure 25. Procédure de transfert des protéines du gel sur la membrane

Le transfert des protéines séparées par SDS-PAGE s'est fait au moyen d'une cassette. Le gel et la membrane dans la cassette sont maintenus de part et d'autre par des papiers filtre et des éponges. Le sens de migration du courant se fait de la cathode vers l'anode.

2.2.4. Evaluation de l'effet brut de KG sur les paramètres biochimiques et les déficits comportementaux induit par la scopolamine chez le rat

2.2.4.1. Conditions d'élevage et traitement des animaux

a. Conditions expérimentales

Les rats mâles *Wistar* dont le poids était compris entre 180-240 g ont été utilisés. Après quelques jours, ils ont été regroupés à raison de 5 rats par cage. Avant le traitement, les rats ont été acclimatés aux conditions expérimentales du laboratoire (humidité, température, lumière) pendant 7 jours. La nourriture des rats (granulés) était composée de maïs, d'orge, sorgho, issus de blé, tourteaux d'oléagineux et de compléments vitamines (A, D3, E). L'eau de boisson a été servie à volonté dans des biberons.

b. Traitement des rats

Les rats ont été traités avec de la scopolamine par injection intraperitonéale pendant 8 jours à la dose de 1 mg/kg de poids corporel (Figure 53, annexe). Les rats du groupe contrôle ont reçu une solution de méthylcellulose 0,5%. Les rats des groupes tests ont été traités avec l'extrait de KG par incubation gastrique à l'aide d'une sonde à différentes concentrations (Tableaux 4 et 5). Toutes les expériences ont été réalisées entre 7 h 00 et 9 h 00. En raison de l'extrême susceptibilité des systèmes de riposte au stress à toutes sortes d'agressions, nous avons attaché la plus grande importance aux conditions de manipulations journalières et à l'environnement où les bruits sont atténués.

Pour évaluer l'effet notrophique de l'extrait brut de KG, tous les animaux des groupes constitués ont reçu par gavage l'extrait à différentes doses pendant 8 jours consécutifs. 25 rats ont donc été repartis en cinq groupes :

Groupe 1 : Témoin, les animaux ont reçu *per os* une solution de méthylcellulose 0,5% (vehicule utilisé);

Groupe 2 : KG 5, les animaux ont reçu *per os* l'extrait à la dose 5 mg/kg pendant 8 jours ;

Groupe 3 : KG 25, les animaux ont reçu *per os* l'extrait à la dose 25 mg/kg pendant 8 jours ;

Groupe 4 : KG 50, les animaux ont reçu *per os* l'extrait à la dose 50 mg/kg pendant 8 jours ;

Groupe 5 : Don, les animaux ont reçu *per os* le donépézil à la dose 1 mg/kg pendant 8 jours.

Après, ces animaux ont été soumis à des tests comportementaux les jours 7 et 8. Ces tests étaient le test de suspension caudale et le test de la piscine de Morris pour mettre en évidence la dépression et l'état de la mémoire respectivement (Figure 26).

Pour évaluer l'effet anti amnésique chronique de l'extrait brut de KG, les animaux des différents groupes ont reçu par gavage un prétraitement de l'extrait à différentes doses pendant 9 jours. Par la suite, les animaux des groupes excepté le groupe témoin ont reçu par injection intra péritonéale (i.p.) une solution de scopolamine à la dose de 1 mg/kg pendant 9 jours pour induire l'amnésie (perte de mémoire). 30 rats ont été repartis en six groupes :

Groupe 1 : Témoin, les animaux ont reçu *per os* une solution de méthylcellulose 0,5% (vehicule utilisé) ;

Groupe 2 : Scopolamine, les animaux ont reçu la scopolamine i.p. (1 mg/kg) pendant 9 jours ;

Groupe 3 : KG 5, les animaux ont reçu l'extrait de KG (5 mg/kg) et la scopolamine i.p. (1 mg/kg) pendant 9 jours ;

Groupe 4 : KG 25, les animaux ont reçu l'extrait de KG (25 mg/kg) *per os* et la scopolamine i.p. (1 mg/kg) pendant 9 jours ;

Groupe 5 : KG 50, les animaux ont reçu l'extrait de KG (50 mg/kg) *per os* et la scopolamine i.p. (1 mg/kg) pendant 9 jours ;

Groupe 6 : Don, les animaux ont reçu le donépézil (1 mg/kg) *per os* et la scopolamine i.p. (1 mg/kg) pendant 9 jours.

Trente minutes après administration de la scopolamine, des tests comportementaux ont été conduits : le test de suspension caudale, le test de la piscine de Morris et le test de l'alimentation supprimée par la nouveauté respectivement les jours 14, 15 et 17 (Figure 26).

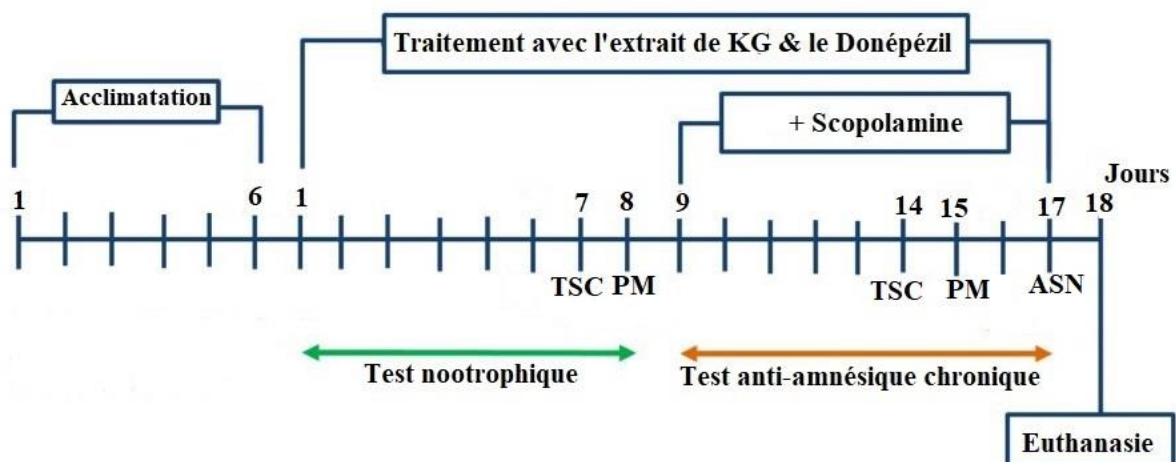


Figure 26: Protocole expérimental de traitement des rats et les tests comportementaux réalisés au cours du traitement

TSC: Test de Suspension Caudale

PM: Piscine de Morris

ASN: Aliment Supprimé par la Nouveauté

2.2.4.2. Contrôle du poids des rats

Avant chaque traitement, les rats ont été pesés. Le poids de chaque rat est consigné dans un tableau et son évolution en fonction du traitement est observée pendant 18 jours. Au 18^{ème} jour, les rats sont sacrifiés.

2.2.4.3. Etude de comportement des rats

L'effet de l'extrait de KG sur la dépression, l'anxiété et la mémoire a été évalué chez les rats intoxiqués avec la scopolamine. En effet, les rongeurs font preuve de grandes capacités mnésiques car ils doivent apprendre et se souvenir de l'environnement spatial afin de survivre dans la nature. Beaucoup de tests mnésiques consistent en l'apprentissage d'un environnement spatial ou se libérer d'une situation aversive.

a. Test de la suspension caudale

Le test de suspension caudale développé initialement par Steru et collaborateurs mesure l'immobilité chez l'animal (Steru *et al.*, 1985). Un scotch a été placé au bout de la partie caudale de l'animal, ce qui permet de le suspendre par la queue. Les mouvements de l'animal sont enregistrés à l'aide d'un chronomètre pendant 6 minutes.

Le principe de ce test repose sur la mesure de la durée des mouvements déployés au cours d'une situation stressante, qui implique le stress hémodynamique d'être pendu de façon incontrôlable par leur queue. Après une phase d'agitation, l'animal cesse de bouger et se fige adoptant un comportement de désespoir, équivalent à un état dépressif chez l'homme. Le temps d'immobilité de l'animal a été ainsi enregistré. Plus ce temps est réduit, moins l'animal est dépressif

i. Dispositif expérimental

Le dispositif est constitué d'une enceinte avec un dispositif permettant d'accrocher l'animal par la queue (Figure 53, annexe).

ii. Protocole expérimental

Une heure après le gavage, les rats ont été suspendus par la queue à l'aide d'un ruban adhésif sur le bord d'une corde tendue placée, à une distance de 60 cm de la paille.

L'animal ne peut ni s'échapper ni s'agripper sur les surfaces voisines. Chaque animal a été pris individuellement pour éviter les interférences pendant le test. Après une période de mobilité, l'animal s'immobilise et adopte un comportement dit de désespoir (considéré comme paramètre de dépression). Le test a été effectué pendant 6 min. La durée de l'immobilité a été enregistrée pendant les 4 dernières minutes du test par un chronomètre et les comportements des rats ont été observés. Les expérimentations ont été réalisées dans une pièce loin de toute sonorisation et de stress.

b. Procédure de labyrinthe aquatique de Morris

Ce test permet d'évaluer les capacités des rats à mémoriser et à gérer l'information spatiale pour échapper à une situation peu agréable et aversive (comme l'eau d'un bassin) en se réfugiant le plus rapidement possible sur une plate-forme non visible immergée à 1 cm sous la surface (Morris, 1984). Ce test repose sur la tendance naturelle présentée par un animal qui, placé dans un environnement stressant et confiné, tente de s'en échapper.

L'animal peut en effet retrouver la plate-forme en utilisant plusieurs types d'indices. Il peut répéter une séquence de mouvements l'ayant déjà mené jusqu'à la plate-forme. Il peut aussi se diriger vers des indices proximaux qu'il aura auparavant associés à la position de la plate-forme. Compte tenu des déficits lourds entraînés par le modèle de lésion choisi, nous avons utilisé une version simplifiée du test, la plate-forme étant maintenue au même endroit tout au long de l'expérience nous nous sommes focalisés sur la mémoire spatiale de référence. La tâche consistait pour l'animal à localiser à l'aide des indices distaux une plate-forme dans un bassin rempli d'eau. Le temps de latence à atteindre la plateforme d'échappement a été enregistré. Plus ce temps est réduit, moins l'animal a des déficits de mémoire.

i. Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental du test de la piscine de Morris est constitué d'une enceinte circulaire de 150 cm de diamètre et de 60 cm de hauteur remplie à moitié (20 cm) par de l'eau rendue opaque par l'adjonction de lait. La température relativement basse de l'eau (20°C) confère à ce test un caractère aversif pour l'animal. Une plate-forme, constituée d'une potence, est disposée à l'une des extrémités de l'enceinte (Figure 54, annexe).

ii. Protocole expérimental

Le protocole de mémoire de référence consiste à localiser la plate-forme immergée invisible dont la position reste inchangée au cours de l'expérimentation. Chaque rat subit une séance quotidienne de 4 essais séparés par un délai de 5 mn durant lequel l'animal est replacé

dans sa cage. A chaque essai, l'animal est déposé dans l'eau face à la paroi depuis un point de départ déterminé qui varie d'essai en essai (la séquence des différents points de lâcher variant également d'un jour à l'autre). L'essai se termine lorsque le rat a atteint la plate-forme, ou bien lorsque 60 s se sont écoulées. Si le rat ne trouve pas la plate-forme durant les 60 s de l'essai, il est guidé par l'expérimentateur jusqu'à la plate-forme. Une fois l'animal sur la plate-forme, il y est laissé pendant 10 s avant que l'expérimentateur ne lui présente une grille métallique de transport. Les principales variables relevées sont la latence d'atteinte de la plate-forme (maximum: 60 s) et la distance parcourue au cours du trajet. Puisque les 4 points de lâchers utilisés au cours des 4 essais quotidiens ne sont pas tous situés à la même distance de la plate-forme. Le trajet effectué par l'animal dans la piscine est filmé à l'aide d'une caméra vidéo. Ce test a été réalisé en milieu de traitement et à la fin du traitement. Le temps de latence à mordre l'aliment dans le nouvel environnement est enregistré. Plus ce temps est réduit, moins l'animal est anxieux.

c. Test d'alimentation supprimé par la nouveauté

Le test d'alimentation supprimé induit une situation de motivation conflictuelle entre celle dirigée vers la nourriture et la peur de s'aventurer au centre de l'enceinte. Ce test a montré son aptitude à mettre en évidence une activité de type antidépressive. Dans la pratique, les animaux ont été soumis à un jeûn non hydrique de 24 h. Après 24 h de privation de nourriture, les animaux étaient placés chacun dans une arène ouverte, avec une ampoule incandescente placée à 1,2 m au-dessus. Un papier format a été placé au centre de l'arène ouverte. Sur ce papier, une quantité (10 g) d'aliment a été déposée. Chaque animal était sorti de la cage habituelle et placé dans une cage d'attente 30 mn avant l'épreuve. Par la suite, l'animal était placé dans un coin de l'arène et le chronomètre immédiatement déclenché pour 5 mn. Après cela, l'animal a été retiré de la cage et a été placée dans sa cage familière pour 5 min. Le temps de latence à mordre l'aliment a été évalué dans la cage familière et dans le milieu aversif (Alena *et al.*, 2003).

i. Dispositif expérimental

Le dispositif consiste en une enceinte de forme carré (30 cm x 30 cm x 20 cm). Une couche de sciure d'environ cm recouvre le sol (Figure 55, annexe).

ii. Protocole expérimental

Les animaux ont été soumis à un jeûn non hydrique de 24 h. Après 24 heures de privation de nourriture, les animaux étaient placés chacun dans une arène ouverte, avec une ampoule incandescente placée à 1,2 m au-dessus. Un papier format contenant une petite pastille de 10 g d'aliment a été déposée au centre de l'arène ouverte. Chaque animal a été sorti de la cage habituelle et placé dans une cage d'attente 30 mn avant l'épreuve. Ensuite, l'animal était placé dans un coin de l'arène et le chronomètre était immédiatement déclenché. Immédiatement après 5 mn de test, l'animal a été retiré de la cage et placée dans sa cage familière pour 5 mn. Le temps de latence à mordre l'aliment a été évalué dans la cage familière et dans le milieu aversif.

Vingt-quatre heures avant le test, toute nourriture est retirée de la cage des animaux. Au moment du test, une granule identique à celle avec lesquelles les animaux se nourrissent quotidiennement, est disposée au centre du dispositif sur une plate-forme. L'animal est alors placé dans un coin du dispositif la tête face à la paroi. La latence pour mordre la granule est enregistrée. Immédiatement après le test, le rat est transféré dans sa cage et la quantité de nourriture consommée en 5 mn était mesurée.

2.2.4.4. Sacrifice des rats et prélèvements des organes

À la fin du traitement, les rats ont été mis à jeun pendant 12 h avant qu'ils soient sacrifiés. Lors du sacrifice, certaines mesures ont été prises en compte : les instruments de dissection étaient lavés avec de l'acide nitrique 5% et rincés plusieurs fois avec de l'eau distillée pour éviter toute contamination des tissus par le matériel. Les tubes eppendorf ont été préalablement lavés avec de l'acide nitrique 5%, rincés avec de l'eau distillée et codifiés afin d'être utilisés pour le stockage des organes.

Au terme des périodes de traitement, les rats ont été décapités. Les cerveaux sont aussi rapidement extraits de la boîte crânienne et placés sur un support en verre en contact avec de la glace (+4°C).

Le sang a été également prélevé lors de la décapitation des rats, puis immédiatement centrifugé à 4°C (8 000 g, 4°C, 10 min), le sérum recueilli a été conservé à -20°C jusqu'à utilisation pour l'analyse des paramètres biochimiques. Les différents organes prélevés sont destinés d'une part aux analyses biochimiques et d'autre part aux coupes histologiques.

2.2.4.5. Dosages des activités enzymatiques chez le rat

a. Préparation des homogénats

Les homogénats 10% (w/v) ont été préparé à partir du cerveau. Le cerveau a été pesé et coupé en petits morceaux avant d'être homogénéisé dans un mortier avec une solution de KCl 1,15 %. Le mélange obtenu a été centrifugé (8 000 g, 10 min, 4°C). Les surnageants récupérés ont été aliquotés en fractions puis conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

b. Dosage des activités enzymatiques des marqueurs de stress oxydatif

L'effet de l'extrait brut sur l'activité des enzymes du système antioxydant intracellulaire a été évalué en intoxiquant les rats avec la scopolamine.

i. Dosage des protéines

Principe

La méthode de Lowry consiste en un dosage colorimétrique particulièrement sensible se basant sur deux réactions colorimétriques (Lowry *et al.*, 1951) : la réaction de Biuret, dans laquelle les ions Cu^{2+} en présence d'une base réagissent avec la liaison peptidique avec formation d'un complexe de couleur bleu-foncé ; et la chimie de Folin-Ciocalteu, dans laquelle un mélange complexe de sels inorganiques réagit avec les résidus tyrosine et tryptophane des protéines en donnant une coloration bleu-vert intense.

Mode opératoire

Ainsi, dans un premier temps, et en parallèle des échantillons à doser, une gamme étalon a été réalisée à partir d'une solution protéique de BSA à 3 mg/mL en prélevant des volumes variés (0, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 μL).

Dans un second temps, 10 μL de l'extrait protéique a été mis en présence de la solution de Lowry A et B (50 :1). Le mélange est ensuite agité au vortex, et 0,1 mL de réactif de Folin-Ciocalteu (1 N) a été ajouté. Après une incubation (37°C, 30 min), l'intensité de la coloration a été mesurée à 750 nm au spectrophotomètre (*Thermo Fisher Scientific*) contre le blanc. La concentration protéique des échantillons a été calculée à partir d'une gamme d'étalonnage de BSA. La quantité de protéine a été exprimée en mg/g d'organe.

ii. Mesure de l'activité de la Superoxyde Dismutase (SOD)

Principe

La SOD (EC 1.15.1.1) est l'une des enzymes anti-oxydantes les plus importantes. Elle catalyse la dismutation des anions superoxydes (O_2^-) pour donner H_2O_2 et l'oxygène moléculaire (O_2) selon la réaction suivante :



Le pyrogallol s'auto-oxyde en milieu alcalin en présence du radical superoxyde produit par réaction entre le peroxyde d'hydrogène et le pyrogallol qui absorbe à 420 nm. Cette auto-oxydation est de 50% en présence de l'EDTA à pH 8,5. La SOD entre en compétition avec le pyrogallol pour le radical superoxyde inhibant l'auto-oxydation du pyrogallol et réduisant le signal. Un signal faible à 420 nm est corrélé à une activité élevée de la SOD (Marklund et Marklund, 1974).

Mode opératoire

Dans une cuve, on a introduit 100 μ L d'échantillon (homogénat de cerveau 10% ou de tampon Tris-EDTA pour le blanc), 2,8 mL de tampon Tris-EDTA pH 8,5, 100 μ L de pyrogallol (20 mM). La densité optique a été lue à 420 nm à l'instant T0 et après toutes les 30 s pendant 3 min à l'aide d'un spectrophotomètre (*Thermo Fisher Scientific*) contre le blanc. Le pourcentage d'inhibition de l'autooxydation du pyrogallol est calculé par la formule :

$$\text{Inhibition de l'autooxydation du pyrogallol} = \frac{DO \text{ témoin} - DO \text{ test}}{DO \text{ témoin}}$$

ΔDO contrôle: différence d'absorbance à 420 nm du contrôle à l'instant 0 et après 1 min.

ΔDO test : différence d'absorbance à 420 nm du test à l'instant 0 et après 1 min.

Une unité de l'enzyme est définie comme 1 μ mol de H_2O_2 consommée par min et l'activité spécifique a été normalisée par rapport à la quantité de protéine totale, elle a été exprimée en unités catalase par mg de protéine. L'activité de la SOD a été déterminée par la formule:

$$\text{Activité SOD} \left(\frac{U}{mL} \right) = \frac{\text{Inhibition de l'autooxydation du pyrogallol}}{50}$$

$$\text{Activité SOD} \left(\frac{U}{g \text{ de cerveau}} \right) = \frac{\text{Activité SOD} \left(\frac{U}{mL} \right)}{\text{masse du cerveau (g)}}$$

iii. Dosage de l'activité catalase (CAT) (Goldblith et Proctor, 1950)

Principe

La catalase (EC 1.11.1.6) est une enzyme qui catalyse la dismutation de l'eau oxygénée :



L'activité de la catalase a été mesurée quantitativement par la méthode de **Goldblith et Proctor (1950)**. L'enzyme réagit avec le peroxyde d'hydrogène et l'excès de peroxyde d'hydrogène a été titré par une solution de permanganate de potassium et l'absorbance a été lue à 515 nm.

Mode opératoire

Un mL de solution de H₂O₂ 0,01 N préparée dans le tampon phosphate (0,007 M, pH 6,8) a été mélangé à 20 µL d'échantillon (homogénat de cerveau 10% ou de KCl 1,15% pour le blanc). Ensuite, 200 µL d'acide sulfurique 5N et 1mL d'une solution de permanganate de potassium 0.005 N ont été ajoutés. Le mélange est homogénéisé et la densité optique a été lue à 515 nm contre le blanc à l'aide d'un spectrophotomètre (*Thermo Fisher Scientific*) contre le blanc. Les résultats ont été exprimés en mM de H₂O₂ consommé à partir de la courbe d'étalonnage et l'activité spécifique a été normalisée par rapport à la masse du cerveau de l'animal, et exprimée en mM de H₂O₂ par g d'organe. L'activité de la catalase a été déterminée à partir de la formule suivante :

$$\text{Activité CAT} = \frac{\Delta\text{DO} \times f}{a \times l \times m}$$

ΔDO : DO blanc – DO test

f : facteur de dilution volume de l'échantillon

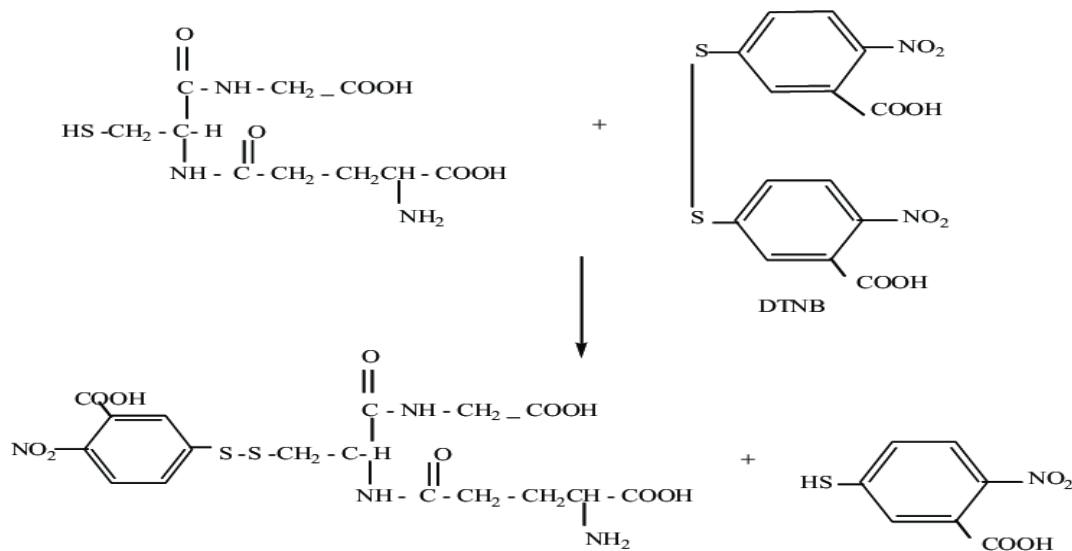
l: longueur de la cuve (1 cm)

m : masse du cerveau de l'animal (g)

iv. Dosage du glutathion réduit (GSH) (Smith et al., 1988)

Principe

Le GSH est oxydé par le DTNB pour donner le disulfure de glutathion (GSSG) avec la formation stœchiométrique de TNB, selon la réaction :



Mode opératoire

A cette étape, la totalité du glutathion de l'échantillon est sous forme oxydée. La concentration de GSH a été déterminée dans un milieu réactionnel de volume contenant 2,9 mL de 5,5-dithiobis (2-nitrobenzoate) (DTNB 3 mM) dans le tampon phosphate (0.1 M, pH 7.4) et 0,1 mL d'homogénat de cerveau 10%. Le mélange est incubé (37°C, 15 min) et la densité optique a été lue à 412 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (*Thermo Fisher Scientific*) contre le blanc. Les résultats ont été exprimés en mol GSH/g de cerveau.

$$\text{Teneur GSH} \left(\frac{\text{mol}}{\text{g de cerveau}} \right) = \frac{\text{DO} \times f}{\epsilon \times l \times m}$$

DO: DO test – DO blanc.

ϵ : coefficient d'extinction molaire du DNTB (13 600 M⁻¹cm⁻¹)

l : longueur d'onde de la cuve (1 cm)

f : facteur de dilution

m: masse du cerveau du rat (g)

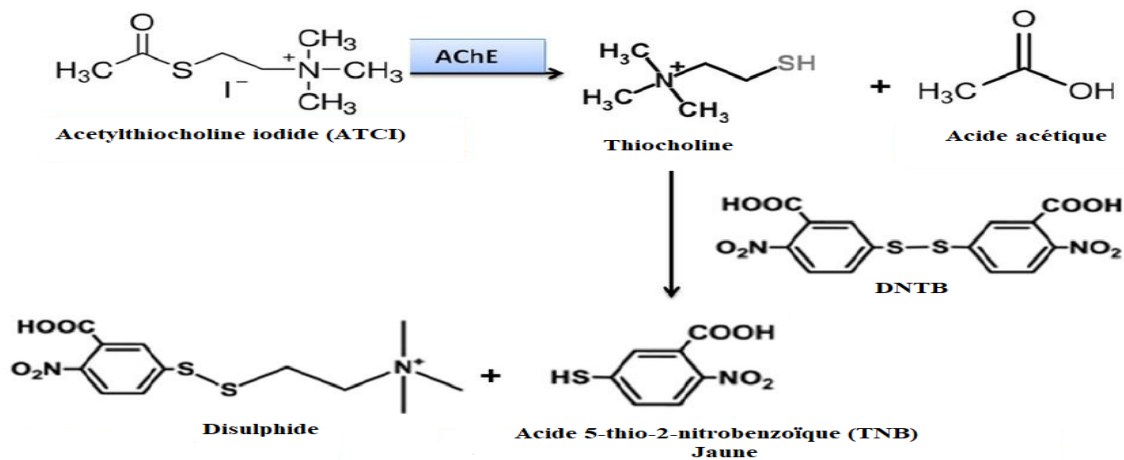
2.2.4.6. Mesure de l'activité de l'acétylcholine esterase (*Ellman et al., 1961*)

L'effet de l'extrait de KG sur l'activité de l'acétylcholine esterase a été évalué en intoxiquant les rats avec la scopolamine.

Principe

En présence de l'acétylcholinestérase (AChE) (EC 3.1.1.7), l'iodure d'acétylthiocholine (IATch) est hydrolysé en acide acétique et en thiocholine. La thiocholine

libérée réagit avec le DTNB pour former un complexe jaune qui absorbe à 405 nm. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la quantité de thiocholine libérée dans le milieu.



Mode opératoire

Dans une microplaque de 96 puits ont été introduit tour à tour 25 μL de substrat IATch 15mM, 75 μL de DNTB 3mM et 75 μL de tampon Tris-HCl (50 mM, pH 8, contenant du BSA 0,1%). La plaque a été incubée (25°C, 5 minutes) et la densité optique a été lue à 405 nm. Par la suite, 25 μL d'homogenat 10% a été ajouté dans les puits tests et 25 μL de KCl 1,15% dans les puits du témoin. La plaque a été de nouveau incubée pendant 5 min et la densité optique a été lue toutes les 30 s pendant 3 minutes à 405 nm à l'aide d'un lecteur de plaque (*Multiskan, Thermo Fischer Scientific*) contre le blanc.

$$\text{Activité de l'AchE} = \frac{\Delta\text{DO}/\text{min} \times Vt}{\varepsilon \times l \times V_s \times m}$$

AchE : activité spécifique de l'acétylcholine estérase en micromole de substrat hydrolysé par minute et par gramme d'organe.

$\Delta\text{DO}/\text{min}$: pente de la droite de regression obtenue apres hydrolyse du substrat par minute.

ε : coefficient d'extinction molaire du DNTB (13 600 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

l : longueur d'onde de la cuve (1 cm)

Vt : volume totale de la cuve (200 μL)

V_s : volume de l'homogenat de cerveau (25 μL)

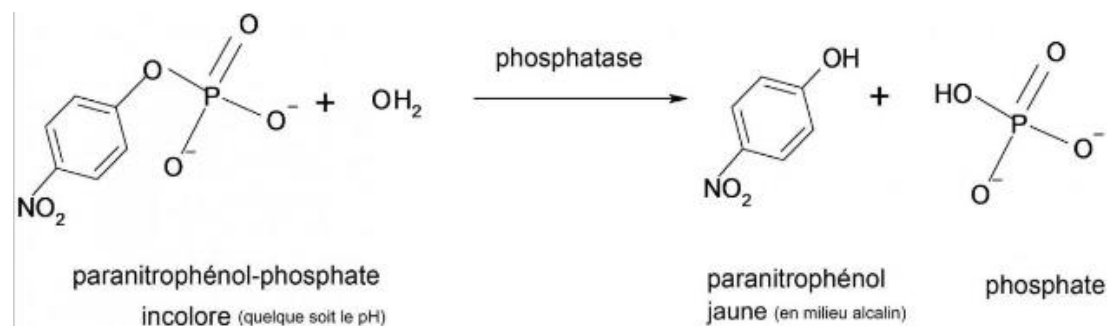
m : masse du cerveau du rat (g)

2.2.4.7. Mesure de l'activité des phosphatases alcalines (McAvoy et Nairn, 2010)

L'effet de l'extrait de KG sur l'activité des phosphatases tissulaires non spécifiques a été évalué sur des rats intoxiqués à la scopolamine.

Principe

Les phosphatases (EC 3.1.3.1) catalysent le transfert du groupe phosphate du p-nitrophénylphosphate (pNPP) en p-nitrophénol et du phosphate. La vitesse de formation du p-nitrophénol, déterminé de manière photométrique est proportionnelle à la concentration catalytique de phosphatase dans l'échantillon testé selon la réaction suivante :



Mode opératoire

Dans une microplaque de 96 puits ont été introduits 50 μL d'homogénat de cerveau 10% ou de sérum dilué dans le tampon Tris (20 mM, pH 7,5 ; contenant MgCl_2 5 mM, EGTA 1 mM, β -mercaptoethanol 0.02% et BSA 0,1 mg/ml) et 50 μL pNPP 10 mM (dissous de Tris 20 mM, pH 7,5). La plaque a été incubée (45 minutes, température ambiante). La réaction a été stoppée en ajoutant 20 μL de NaOH 5N. La plaque a été à nouveau incubée (30 s, température ambiante) et la densité optique a été lue à 405 nm à l'aide d'un lecteur de plaque (*Multiskan, Thermo Fischer Scientific*). Le blanc a été constitué de KCl 1,15% ou de l'eau distillée à la place de l'homogénat ou de sérum.

$$\text{Activité des phosphatases} = \frac{DO \times Vt}{\epsilon \times l \times V_s \times m}$$

DO : pente de la droite de regression obtenue après hydrolyse du substrat par minute.

ϵ : coefficient d'extinction molaire du DNTB ($13\,000\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

l : longueur d'onde de la cuve (1 cm)

Vt : volume totale de la cuve (120 μL)

Vs : volume de l'homogénat de cerveau (25 μL)

m : masse du cerveau de l'animal (g)

2.2.4.8. Mesure du taux de fibrillation dans l'homogénat de cerveau par le rouge Congo (Kang et al., 2011)

L'effet de l'extrait de KG sur la formation des fibrilles et des agrégats de protéines a été évalué en intoxiquant les rats avec la scopolamine.

Principe

L'amyloïde est une structure homogène qui peut être colorée car, elle est constituée de fibrilles protéiques analogues qui se déposent entre les cellules. La coloration au rouge Congo fonctionne sur la base de liaisons hydrogènes au composant d'hydrate de carbone du substrat. Le rouge Congo est un colorant anionique pouvant se déposer dans les fibrilles amyloïdes qui présentent ainsi un dichroïsme visible dans la lumière polarisée.



Mode opératoire

La solution stock de rouge Congo a été préparée dans le tampon phosphate (5 mM, pH 7,4 contenant du NaCl 150 mM). 200 µL d'homogénat de cerveau 10% sont mélangés à 4 mL d'une solution de rouge Congo 5 µM. Le mélange est incubé pendant 30 minutes à température ambiante et la densité optique a été lue à 480 nm et à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (*Thermo Fisher Scientific*) contre le blanc. La concentration de Congo lié est calculée par la formule suivante :

$$[\text{Congo lié}] = \left[\frac{\text{DO } 540\text{nm}}{25\,295} - \frac{\text{DO } 480\text{nm}}{46\,306} \right] \times 1\,000\,000$$

DO : densité optique

2.2.4.9. Coupes histologiques

Les organes prélevés après sacrifice des animaux ont été fixés dans le Bouin. Les recoupes en tranches fines et régulières de chaque organe fixé ont été réalisées à l'aide d'un bistouri. Les coupes obtenues ont été rangées dans des cassettes qui ont séjourné successivement dans des bains d'éthanol de concentration croissante : éthanol 50° (1 h), éthanol 70° (1 h), éthanol 95° (2 h), éthanol 100° (3 h). Par la suite, les cassettes ont séjourné

successivement dans deux bains de xylène pendant 1 heure et 1 heure 30 min. Les organes ont été infiltrés de paraffine par passage dans trois bains de paraffine à 60°C pendant 1 h, 1 h 30 min et 2 h respectivement.

Les tissus ont été placés dans des moules remplis de paraffine en fusion sur des plaques réfrigérantes pour solidification. Les coupes d'épaisseur 5 µm ont été réalisées au microtome. Les sections obtenues ont été dépliées dans un bain marie à 40°C, puis placées sur des lames porte-objets et séchées à l'étuve (45°C) pendant 24 h.

Les coupes ont été déparaffinées et réhydratées par passage successif dans une série de bains de xylène 3 fois pendant 5 min chacune et dans des concentrations décroissantes en éthanol 100° (10 min, 2 fois), éthanol 95° (5 min) et éthanol 70° (5 min). Les lames ont ensuite été rincées à de l'eau distillée. Les coupes ont été immergées pendant 10 min dans l'hématoxyline (colore en bleu noir les composants nucléaires), puis rincées à l'eau courante. Elles ont ensuite été passées dans un bain d'éthanol 95° pendant 5 min, puis ont été immergées pendant 5 min dans de l'éosine alcoolique 0,5% (colore les composants cytoplasmiques en rose-rouge) et dans 40 µL d'acide acétique pour 100 ml de solution. Les coupes ont ensuite été déshydratées dans 3 bains d'éthanol 100° (5 min) chacun et éclaircies dans 3 bains de xylène (5 min) chacun. Après, quelques gouttes de résine ont été déposées sur les coupes, puis recouvertes d'une fine lamelle de verre pour observation au microscope photonique *Olympus* relié à un ordinateur et les photographies ont été réalisées.

2.2.5. Analyse statistique

Les expériences ont été réalisées en triple et les données exprimées sous forme de moyenne ± écart type (n=3). Les intensités des bandes des images de fluorescence et de western blots ont été quantifiées avec le logiciel Image J et exprimées par rapport au contrôle. Les différences entre les moyennes ont été comparées par l'analyse des variances à un facteur (ANOVA) entre les groupes non traités et les groupes traités. Pour les groupes ayant présenté une différence significative entre les variances, les moyennes ont été comparées par le test de Bonferroni. L'analyse statistique a été effectuée à l'aide du logiciel GraphPad prism 5.0 (Graphpad Software Inc., San Diego, CA, USA). La différence a été considérée significative pour $p < 0,05$.

CHAPITRE 3: RESULTATS ET DISCUSSIONS

CHAPITRE 3: RESULTATS ET DISCUSSIONS

3.1. RESULTATS

3.1.1. Composition phytochimique de l'extrait hydroéthanolique de *Khaya grandifolia* (KG) et teneur en flavonoïdes et polyphénols totaux

Le tableau 5 ci-dessous présente les différentes classes de métabolites secondaires détectés dans l'extrait hydroéthanolique de KG et les teneurs en flavonoïdes et polyphénols totaux. Il ressort de ce tableau que les grands groupes de métabolites secondaires présents dans l'extrait sont les composés phénoliques, les alcaloïdes, les terpénoïdes et les hétérosides.

Tableau 5. Analyse qualitative de l'extrait de KG

Classes de métabolites secondaires testés positifs	Composés phénoliques
	Flavonoïdes
	Alcaloïdes
	Saponines
	Triterpènes
	Tanins

Le dosage des phénols totaux a été évalué par la méthode colorimétrique de Folin Ciocalteu. C'est l'une des méthodes les plus anciennes pour déterminer la teneur en polyphénols des plantes médicinales et dans divers autres échantillons. Les polyphénols et les flavonoïdes ont été exprimés en mg d'acide gallique et en mg de quercétine par g d'extrait respectivement. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 6.

Tableau 6. Le dosage des polyphénols totaux et flavonoïdes

Types de Métabolites secondaires	Teneur en polyphénol totaux exprimée en mgEAG/g d'extrait	Teneur en flavonoïdes exprimée en mgEquercétine/g d'extrait
	49,44 ± 0,12	12,55 ± 0,87

3.1.2. Effet des extraits de KG sur la production des espèces oxygénées réactives et l'apoptose cellulaire

3.1.2.1. Effet de l'extrait brut et des fractions de KG sur la viabilité cellulaire

Afin d'étudier la cytotoxicité de l'extrait brut et des fractions de *Khaya grandifolia* (KG), le test MTT a été réalisé sur des cellules neuroblastomes IMR32. Ce test donne une indication sur l'activité mitochondriale et la densité cellulaire. Les cellules ont été traitées en présence ou en absence de l'extrait de plante aux concentrations 0, 2, 5, 10, 20, 30, 40 et 50 $\mu\text{g/mL}$ pendant 48 h. Le pourcentage de viabilité calculé reflète la proportion des cellules capables de réduire le MTT en Formazan (couleur bleue) sous l'action de la succinate déshydrogénase mitochondriale. Les résultats obtenus ont montré que les concentrations testées n'ont présenté aucun effet toxique sur les cellules (Figure 27).

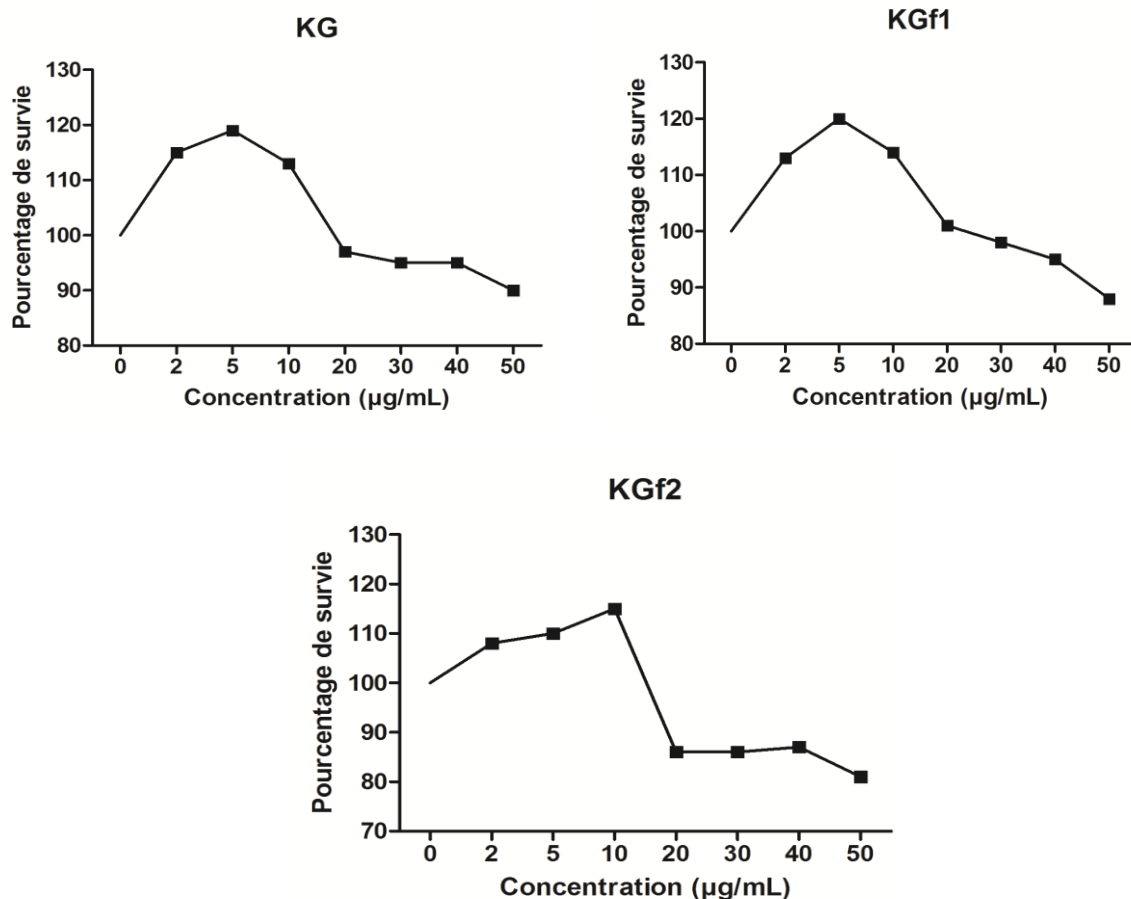


Figure 27. Effet de l'extrait brut et des fractions KGf1 et KGf2 sur la viabilité des cellules neuroblastomes humaines IMR32.

Les cellules ont été traitées avec l'extrait brut ou les fractions KGf1 et KGf2 pendant 48h. Après traitement, la viabilité cellulaire a été évaluée. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm erreur standard pour 3 essais en triple. KG : *Khaya grandifolia*. KG : Extrait brut ; KGf1 : fraction 1 ; KGf2: fraction 2

3.1.2.2. Effet des extraits de KG sur la morphologie des cellules IMR32 différenciées

Après leur différenciation, les cellules ont été traitées ou non avec différentes concentrations en extrait brut ou fractions de KG (0, 5, 10 et 25 $\mu\text{g/mL}$) pendant 48h. Après le traitement, les cellules ont été observées au microscope à contraste de phase. Les images ont été prises pour chaque condition de traitement afin d'évaluer qualitativement la morphologie des cellules. Les résultats obtenus ont montré qu'à la concentration de 5 $\mu\text{g/mL}$, on observe une densité cellulaire importante. Cette concentration a été donc celle qui maintient les cellules vivantes et interconnectées comparativement au groupe témoin (0 $\mu\text{g/mL}$) (Figure 28). La concentration de 5 $\mu\text{g/mL}$ a été retenue pour la suite du travail.

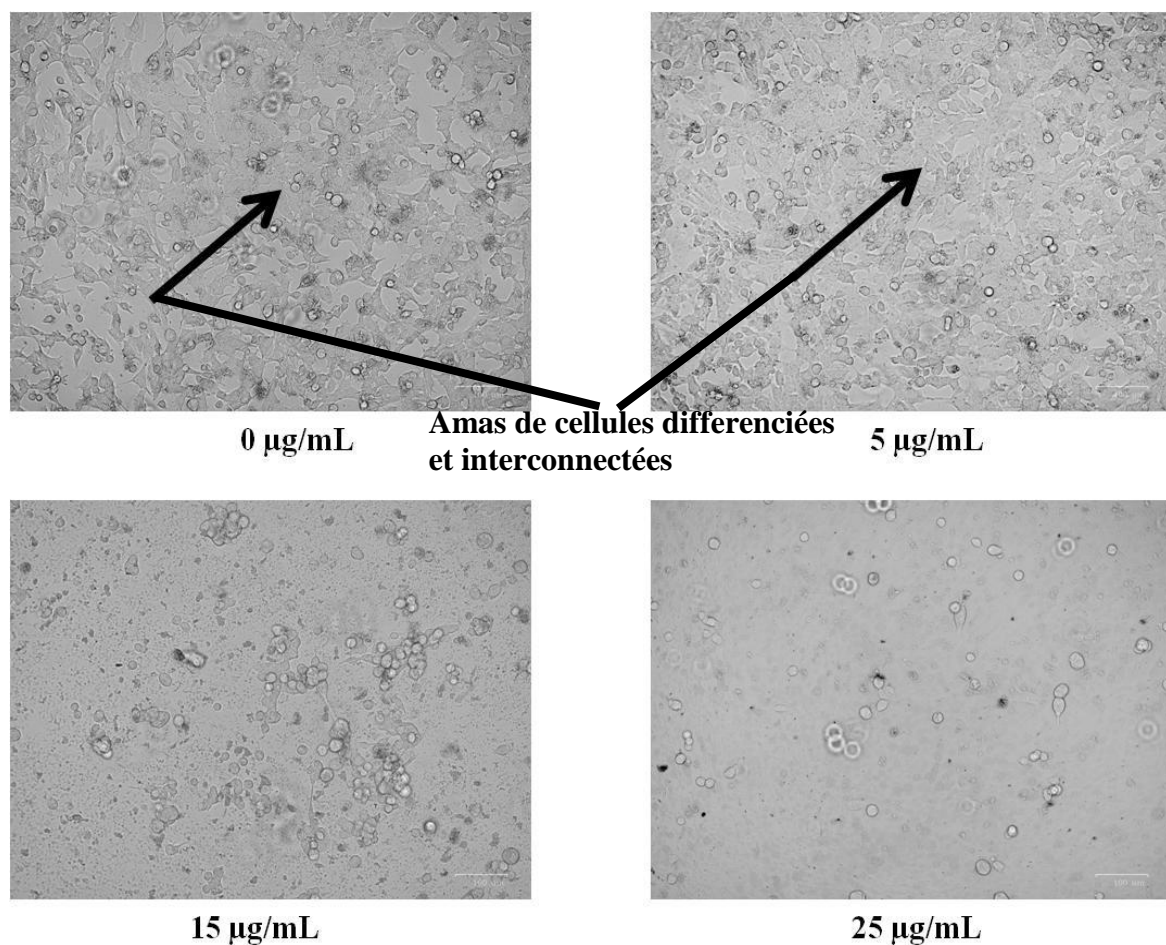


Figure 28. Effet de l'extrait et des fractions de KG à différentes concentrations sur la morphologie des cellules IMR32.

Les cellules IMR32 différenciées ont été traitées avec l'extrait et les fractions de KG à différentes concentrations pendant 48h. Après le traitement, la morphologie des cellules a été déterminée à l'aide d'un microscope inversion de phase (X 20). Barre d'échelle: 100 μm .

3.1.2.3. Effet de l'extrait brut de KG sur la production des espèces oxygénées réactives (EOR) et l'apoptose induite par le peptide amyloïde bêta 42 ($A\beta_{42}$)

a. Inhibition de la production des espèces oxygénées réactives (EOR) induite par le peptide $A\beta_{42}$ par l'extrait de KG

Le DCF-DA est un fluorochrome est utilisé pour évaluer la production des EOR. Ce fluorochrome est hydrolysé par des estérases intracellulaires en 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) et l'intensité de la fluorescence verte émise est proportionnelle à la quantité des EOR intracellulaires produites dans le milieu. Les résultats de notre étude ont montré que pour les cellules IMR32 traitées avec le peptide $A\beta_{1-42}$, une production importante des EORs. Ceci traduit le fait que le peptide $A\beta_{1-42}$ induit un stress oxydatif. Le traitement avec l'extrait brut de KG a inhibé significativement la production des EOR témoignant de leur capacité à protéger les cellules contre le stress oxydatif induit par $A\beta_{1-42}$ (Figure 29).

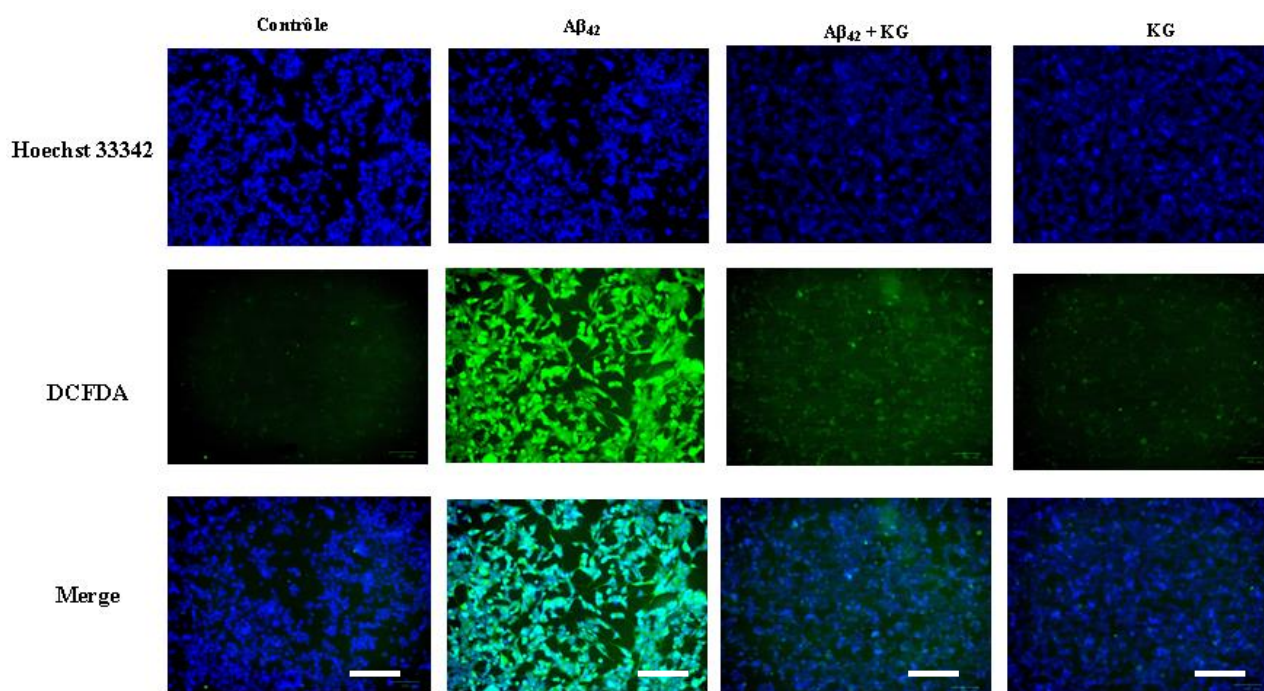


Figure 29. Effet de l'extrait brut de KG sur la production des espèces oxygénées réactives (EOR) induit par $A\beta_{42}$ sur les cellules IMR32.

Les cellules différenciées IMR32 ont été traitées sans ou avec $A\beta_{42}$ ($1 \mu\text{M}$), ou co-traitées avec $A\beta_{42}$ ($1 \mu\text{M}$) et l'extrait de KG ($5 \mu\text{g/mL}$) pendant 48 h. Après le traitement, les EOR ont été colorées avec le DCF-DA (vert) et Hoescht 33342 (bleue) a été utilisé pour colorer les cellules totales. Chaque image enregistrée avec le microscope à fluorescence représente une des trois expériences en triple. EOR: espèces oxygénées réactives; KG: *Khaya grandifolia*. Barre d'échelle: $100 \mu\text{m}$.

La fluorescence émise étant proportionnelle à la quantité d'EOR produit, on a noté une production importante d'EOR chez les cellules IMR32 traitées avec les oligomères du

peptide $A\beta_{1-42}$ (1 μM) durant 48h comparativement au groupe contrôle. Le traitement avec l'extrait brut de KG a montré une inhibition importante ($P < 0,001$) de la production des EOR en comparaison au groupe intoxiqué et non traité (Figure 30).

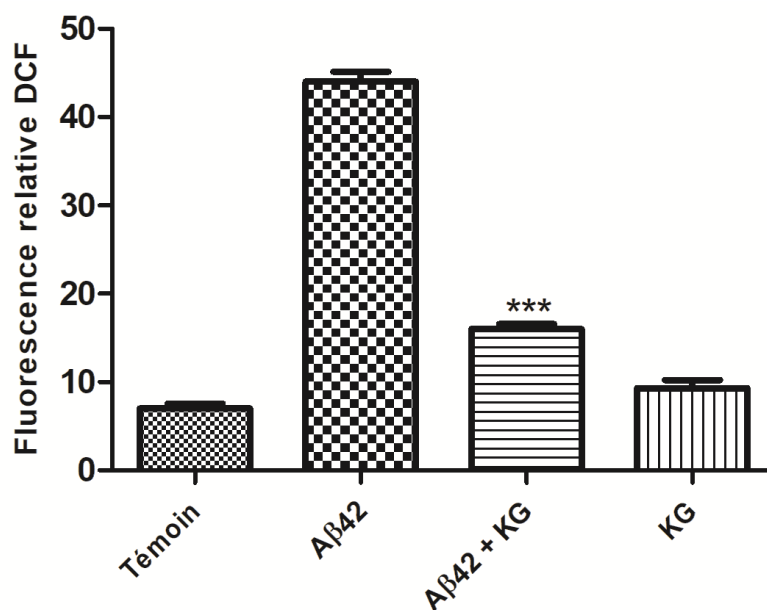


Figure 30. Expression relative de la fluorescence induit par $A\beta_{42}$ sur les cellules IMR32.

Les cellules différenciées IMR32 ont été traitées sans ou avec $A\beta_{42}$ (1 μM), ou co-traitées avec $A\beta_{42}$ (1 μM) et l'extrait de KG (5 $\mu g/mL$) pendant 48 h. Après le traitement, les EOR ont été colorées avec le DCF-DA (vert) et Hoescht 33342 (bleue) a été utilisé pour colorer les cellules totales. Chaque image enregistrée avec le microscope à fluorescence représente une des trois expériences en triple. *** $P < 0,001$ vs groupe $A\beta_{42}$. EOR: espèces oxygénées réactives; KG: *Khaya grandifolia*.

b. Inhibition de l'apoptose cellulaire par l'extrait brut de KG induite sur les cellules neuroblastomes IMR32 par le peptide $A\beta_{42}$

L'apoptose cellulaire a été évaluée en colorant les noyaux des cellules IMR32 différenciées avec le Hoescht 33342 et l'iodure de propidium (IP). Les noyaux des cellules viables sont colorés en bleu par le Hoescht et le noyau des cellules apoptotiques en rouge par l'IP. En dénombrant les cellules, on a noté que plusieurs d'entre elles étaient apoptotiques dans le groupe traité avec le peptide $A\beta_{42}$ comparativement au groupe contrôle. Le nombre de cellules apoptotiques a diminué considérablement ($P < 0,001$) suite au traitement avec l'extrait brut de KG (Figure 31).

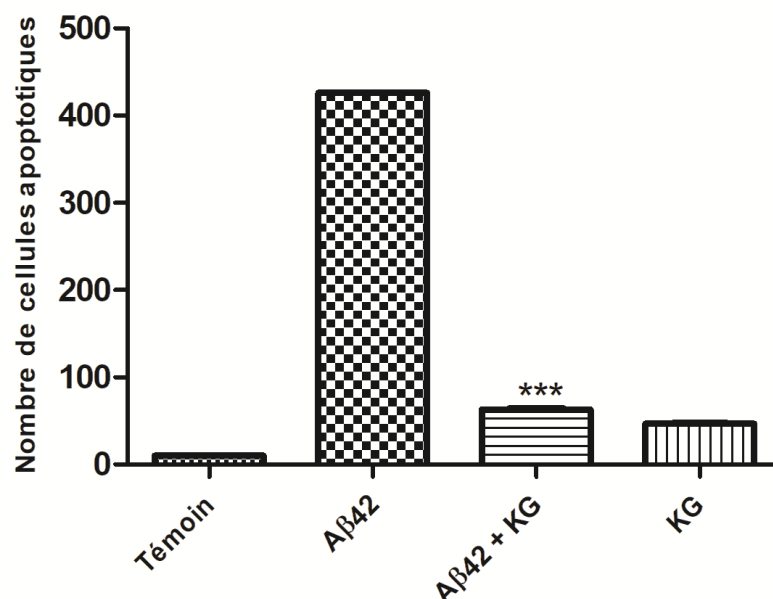


Figure 31. Inhibition de la mort cellulaire par apoptose induite par Aβ₄₂ sur les cellules IMR32.

Les cellules différenciées IMR32 ont été traitées sans ou avec Aβ₄₂ (1 μM), ou co-traitées avec Aβ₄₂ (1 μM) et l'extrait de KG (5 μg/mL) pendant 48 h. Après le traitement, les EOR ont été colorées avec le DCF-DA (vert) et Hoescht 33342 (bleue) a été utilisé pour colorer les cellules totales. Chaque image enregistrée avec le microscope à fluorescence représente une des trois expériences en triple. ***P<0,001 vs groupe Aβ₄₂. EOR: espèces oxygénées réactives; KG: *Khaya grandifolia*.

c. Inhibition de la production des espèces oxygénées réactives (EOR) induite par le peptide Aβ₄₂ par les fractions KGf1 et KGf2

L'effet des fractions de KG sur la production des EOR induite par le peptide Aβ₄₂ a été investigué en mesurant l'intensité de la fluorescence du DCF produite. Après 48 h de traitement avec le peptide Aβ₄₂ (1 μM), on a noté une production importante des EOR dans le milieu de culture au vue de l'intensité de la fluorescence émise après coloration au DCF-DA. Le traitement avec les fractions KGf1 et KGf2 (5 μg/mL) a inhibé significative (P < 0,01) la production des EOR (Figures 32 et 33).

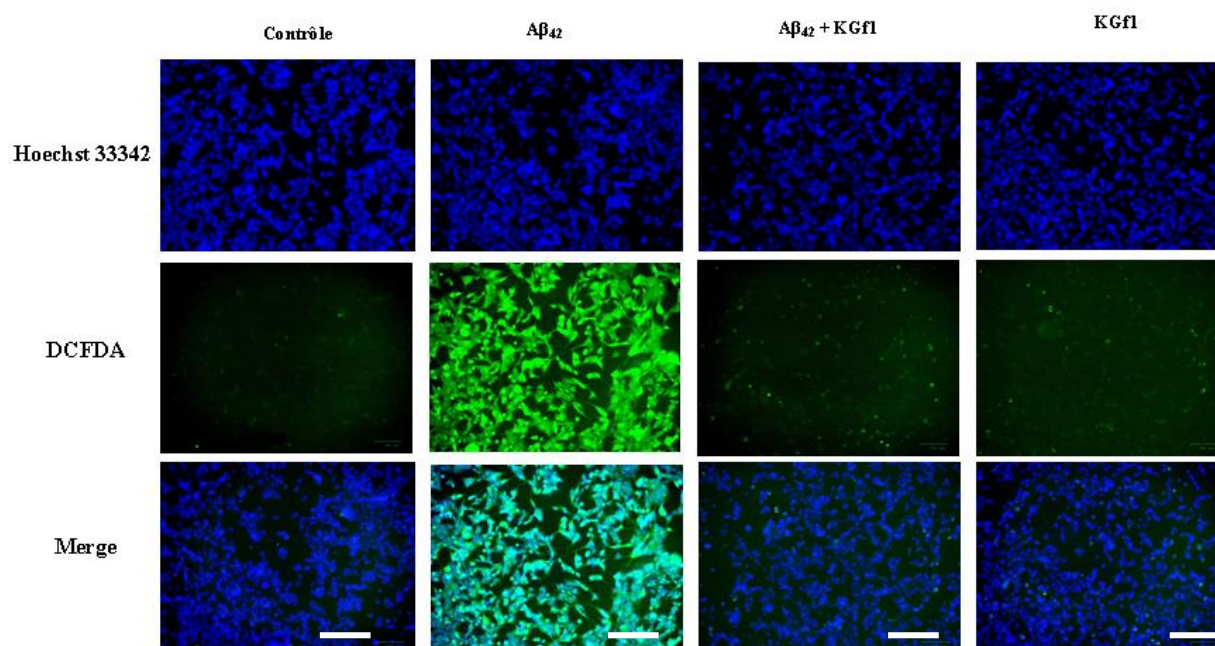


Figure 32. Effet de la fraction KGf1 sur la production des espèces oxygénées réactives (EOR) induit par A β 42 sur les cellules IMR32.

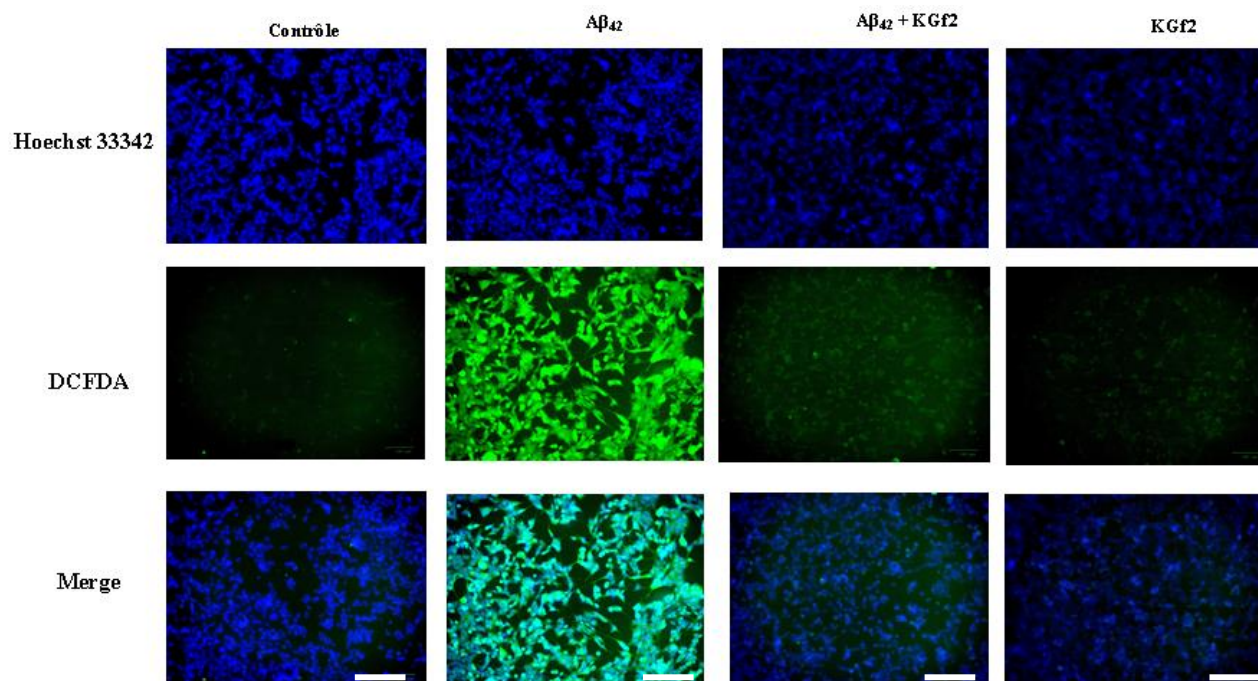


Figure 33. Effet de la fraction KGf2 sur la production des espèces oxygénées réactives (EOR) induit par A β 42 sur les cellules IMR32.

Les cellules différenciées IMR32 ont été traitées sans ou avec A β 42 (1 μ M), ou co-traitées avec A β 42 (1 μ M) et KGf1 et/ou KGf2 (5 μ g/mL) pendant 48 h. Après le traitement, les EOR ont été colorées avec le DCF-DA (vert) et Hoescht 33342 (bleue) a été utilisé pour colorer les cellules totales. Chaque image enregistrée avec le microscope à fluorescence représente une des trois expériences en triple. EOR: espèces oxygénées réactives; KG: *Khaya grandifolia*; f2: fraction f2. Barre d'échelle: 100 μ m.

La production des EOR induite par le peptide $A\beta_{42}$ sur les cellules IMR32 différenciées a été quantifiée en utilisant le DCF-DA qui en s'oxydant produit le DCF fluorescent. La quantification des EOR a révélé une fluorescence importante après 48h d'incubation des cellules avec le peptide $A\beta_{42}$. Le traitement des cellules IMR32 avec les fractions KGf1 et KGf2 a montré une réduction significative ($P < 0.001$) de la production des EOR (Figures 34).

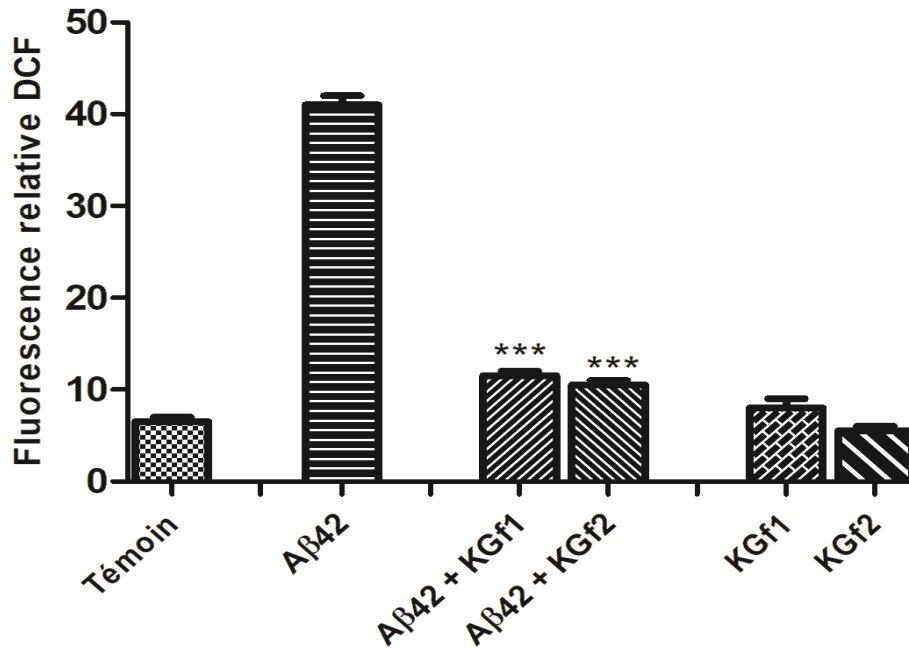


Figure 34. Expression relative de la fluorescence induit par $A\beta_{42}$ sur les cellules IMR32.

Les cellules différenciées IMR32 ont été traitées sans ou avec $A\beta_{42}$ ($1 \mu M$), ou co-traitées avec $A\beta_{42}$ ($1 \mu M$) et les fractions de KG (KGf1 et KGf2) ($5 \mu g/mL$) pendant 48 h. Après le traitement, les EOR ont été colorées avec le DCF-DA (vert) et Hoescht 33342 (bleue) a été utilisé pour colorer les cellules totales. Chaque image enregistrée avec le microscope à fluorescence représente une des trois expériences en triple. (A) : fraction f1 ; (B) : fraction f2. *** $P < 0,001$ vs groupe $A\beta_{42}$. EOR: espèces oxygénées réactives; KG: *Khaya grandifolia*.

d. Effet inhibiteur des fractions (KGf1 et KGf2) sur l'apoptose cellulaire induite par le peptide $A\beta_{42}$ sur les cellules neuroblastes IMR32

Le traitement des cellules IMR32 avec le peptide $A\beta_{42}$ a entraîné la mort des cellules par apoptose. Par contre, le traitement effectué en présence des fractions KGf1 et KGf2 a entraîné une inhibition significative ($P < 0,001$) de l'apoptose (Figure 35).

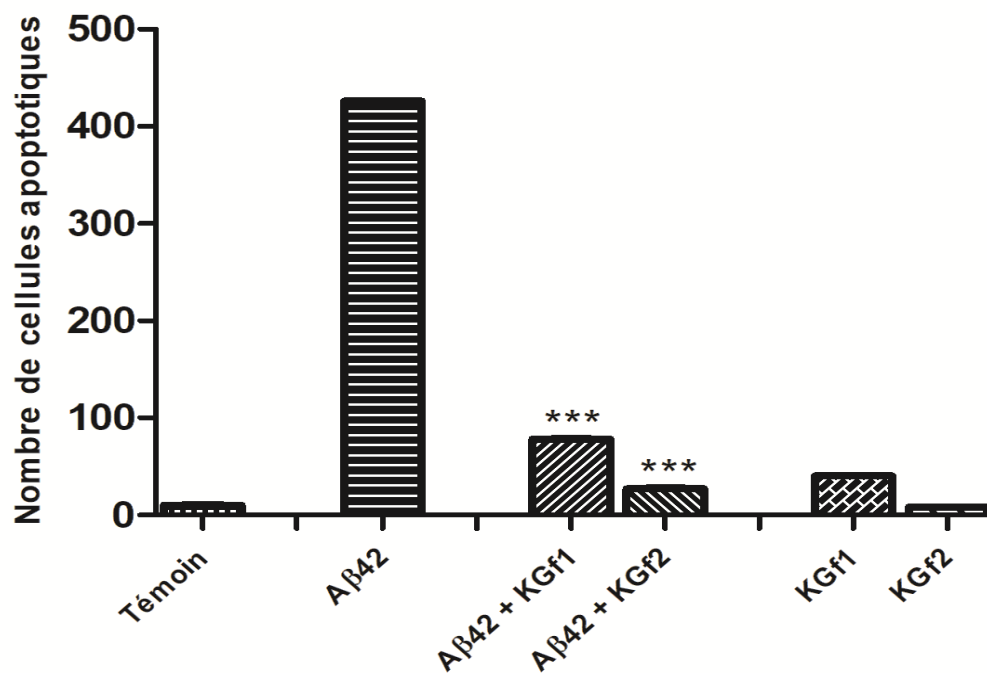


Figure 35. Inhibition de la génération des cellules apoptotiques sur les cellules IMR32 induit par Aβ42 sur les cellules IMR32.

Les cellules différenciées IMR32 ont été traitées sans ou avec Aβ42 (1 μM), ou co-traitées avec Aβ42 (1 μM) et les fractions (KGf1 et KGf2) (5 μg/mL) pendant 48 h. Après le traitement, les EOR ont été colorées avec le DCF-DA (vert) et Hoescht 33342 (bleue) a été utilisé pour colorer les cellules totales. Chaque image enregistrée avec le microscope à fluorescence représente une des trois expériences en triple. ***P<0,001 vs groupe Aβ42. EOR: espèces oxygénées réactives; KG: *Khaya grandifolia* ; f1 : fraction 1 ; f2 : fraction 2.

3.1.2.4. Conclusion partielle

A l'issu de cette partie, l'extrait brut et les fractions KGf1 et KGf2 ont inhibé la production des EOR et l'apoptose induite par le peptide Aβ42 sur les cellules IMR32. Il faut noter que l'extrait KGf2 a été plus efficace que la fraction KGf1. Les extraits de KG possèdent des activités antioxydantes et antiapoptotiques. L'extrait brut et la fraction KGf2 ont été sélectionnés pour la suite de notre étude.

3.1.3. Effet de l'extrait brut et la fraction plus active KGf2 sur le dysfonctionnement mitochondrial (SODmt), la toxicité synaptique (SNAP25, SYP) et l'hyperphosphorylation de la protéine tau

3.1.3.1. Effet de l'extrait brut et de la fraction KGf2 sur l'activation de la SOD induite par le peptide Aβ42 sur les cellules neuroblastomes IMR32 différenciées

La superoxyde dismutase (SOD) est le système antioxydant intracellulaire le plus important. Cette enzyme catalyse la réaction de dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène. Elle neutralise les radicaux libres oxygénés en les convertissant en

molécules non toxiques. On note une baisse significative de l'activité de la SOD chez les cellules traitées avec le peptide A β ₄₂. Par contre, le traitement avec l'extrait brut et la fraction active KGf2 a entraîné une activation de cette enzyme (Figure 36).

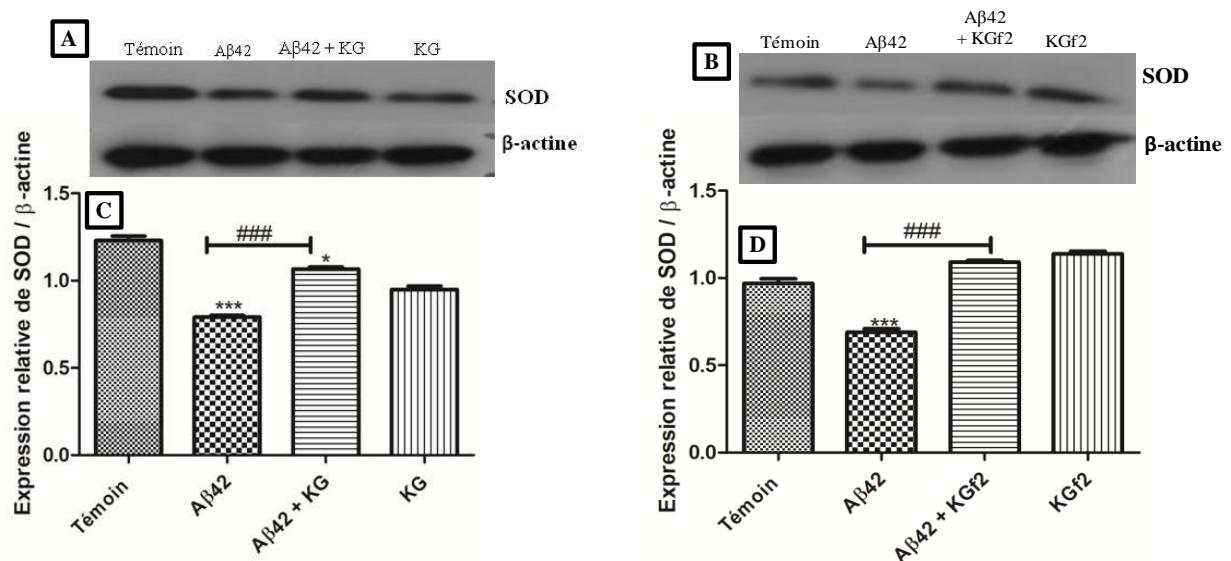


Figure 36. Activation de la superoxyde dismutase (SOD) induit par l'A β ₄₂ sur les cellules IMR32 par l'extrait brut et la fraction KGf2.

Les cellules ont été traitées avec ou sans A β ₄₂ (1 μ M), ou co-traitées avec l'A β ₄₂ (1 μ M) et l'extrait brut et la fraction 2 de KG (5 μ g/mL) durant 48 h. Après le traitement, les protéines totales ont été extraites des cellules et les lysats ont été probés avec l'anticorps SOD par western blot. La β -actine a été utilisée comme contrôle interne. Chaque bande représente une des trois expériences indépendantes. (A, B) Effet de l'extrait brut et de la fraction f2 de KG sur l'activation de la SOD, respectivement. (C, D) Analyse de la densitométrie des bandes, respectivement, pour l'extrait brut et la fraction KGf2. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$ vs groupe contrôle; ### $P < 0,001$ vs groupe A β ₄₂. Bande1: contrôle; Bande2: A β ₄₂; Bande3: A β ₄₂+KG ou A β ₄₂+KGf2; Bande4: KG ou KGf2. KG: *Khaya grandifoliola*, KGf2: fraction 2 de KG.

3.1.3.2. Effet de l'extrait brut et la fraction KGf2 sur l'inhibition de l'activité de la Caspase-3 clivée induite par le peptide A β ₄₂ sur les cellules neuroblastomes IMR32 différenciées

L'extrait de KG et la fraction active ont été testé pour leur capacité à l'inhiber l'expression de la caspase-3 clivée dans IMR32 différenciées. Les cellules IMR32 ont été traitées avec le peptide A β ₄₂ (1 μ M) et/ou l'extrait (5 μ g/mL) pendant 48h. On note une expression importante de la caspase-3 clivée pour les cellules traitées avec A β ₄₂. Le traitement avec l'extrait brut et la fraction active KGf2 a réduit significativement ($P < 0,001$) le clivage de cette protéine (Figure 37).

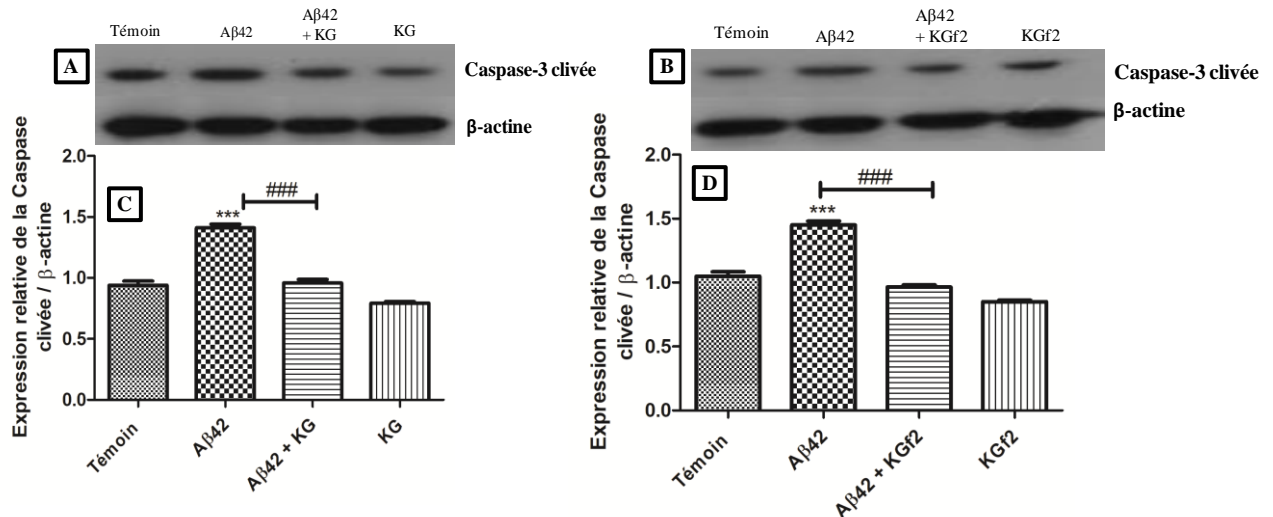


Figure 37. Inhibition de la Caspase-3 clivée induit par Aβ₁₋₄₂ sur des cellules IMR32 par l'extrait brut et la fraction KGf2.

Les cellules ont été traitées avec ou sans Aβ₄₂ (1 μM), ou co-traitées avec l'Aβ₄₂ (1 μM) et l'extrait brut et la fraction 2 de KG (5 μg/mL) durant 48 h. Après le traitement, les protéines totales ont été extraites des cellules et les lysats ont été probés avec l'anticorps caspase-3 clivée par western blot. La β-actine a été utilisée comme contrôle interne. Chaque bande représente une des trois expériences indépendantes. (A, B) Effet de l'extrait brut et de la fraction KGf2 sur l'inhibition du clivage de la caspase-3, respectivement. (C, D) Analyse de la densitométrie des bandes, respectivement, pour l'extrait brut et la fraction KGf2. ****P*<0,001 vs groupe contrôle; ###*P*<0,001 vs groupe Aβ₄₂. Bande 1: contrôle; Bande 2: Aβ₄₂; Bande 3: Aβ₄₂+KG ou Aβ₄₂+KGf2; Bande 4: KG ou KGf2. KG: *Khaya grandifoliola*, KGf2: fraction 2 de KG.

3.1.3.3. Effet activateur de l'extrait brut et la fraction KGf2 de sur la toxicité synaptique induite par le peptide Aβ42 sur les cellules neuroblastomes IMR32 différenciées

Une synapse est formée par l'interconnexion entre deux neurones permettant ainsi à un neurone de passer le signal à un autre. Ce sont des structures anatomiques spécialisées composées du compartiment présynaptique, du compartiment postsynaptique (épine dendritique) et de la fente synaptique. Les épines dendritiques possèdent récepteurs métabotropiques et de protéines telles que SNAP25, SYP. On note une diminution du nombre de synapses chez les personnes atteintes de la MA. Chez les cellules traitées avec le peptide Aβ₄₂, on constate une diminution de l'activité des protéines synaptiques SNAP25 et SYP. Le traitement l'extrait brut et la fraction active KGf2 entraîne une augmentation significative de l'activité de ces deux protéines (Figures 38 et 39).

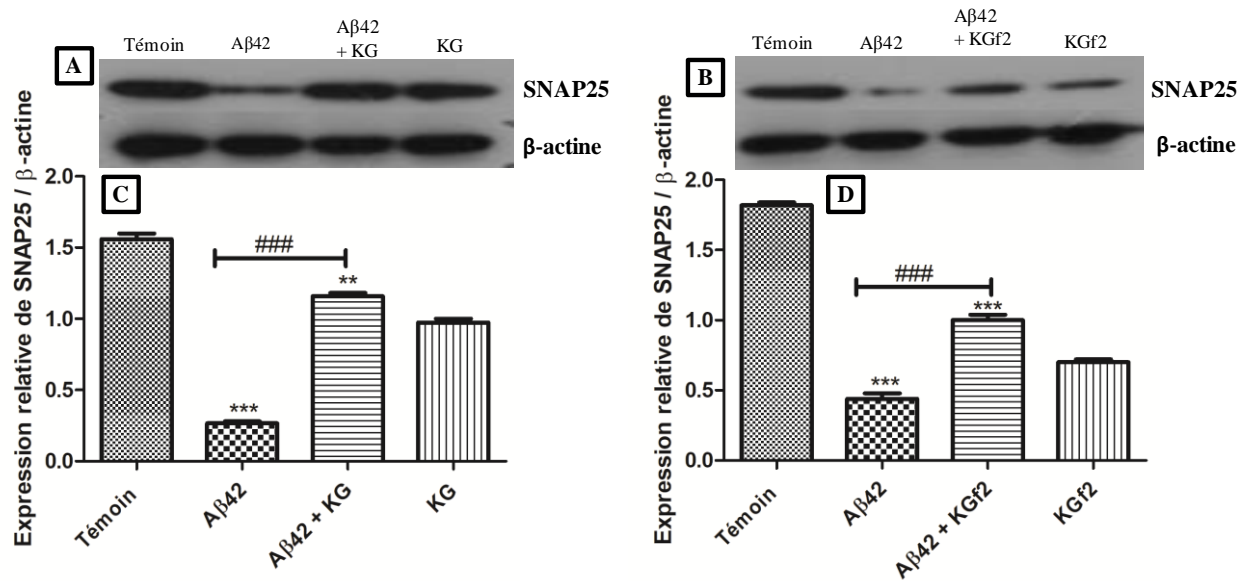


Figure 38. Activation de l'expression de la SNAP25 induite par Aβ42 sur les cellules IMR32 par l'extrait brut et la fraction KGf2.

Les cellules ont été traitées avec ou sans Aβ42 (1 μM), ou co-traitées avec l'Aβ42 (1 μM) et l'extrait brut et la fraction 2 de KG (5 μg/mL) durant 48 h. Après le traitement, les protéines totales ont été extraites des cellules et les lysats ont été probeds avec l'anticorps SNAP25 par western blot. La β-actine a été utilisée comme contrôle interne. Chaque bande représente une des trois expériences indépendantes. (A, B) Effet de l'extrait brut et de la fraction KGf2 sur l'activation de la SNAP25, respectivement. (C, D) Analyse de la densitométrie des bandes, respectivement, pour l'extrait brut et la fraction 2. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ vs groupe contrôle; ### $P < 0,001$ vs groupe Aβ42. Bande 1: contrôle; Bande 2: Aβ42; Bande 3: Aβ42+KG ou Aβ42+KGf2; Bande 4: KG ou KGf2. KG: *Khaya grandifolia*, KGf2: fraction 2 de KG.

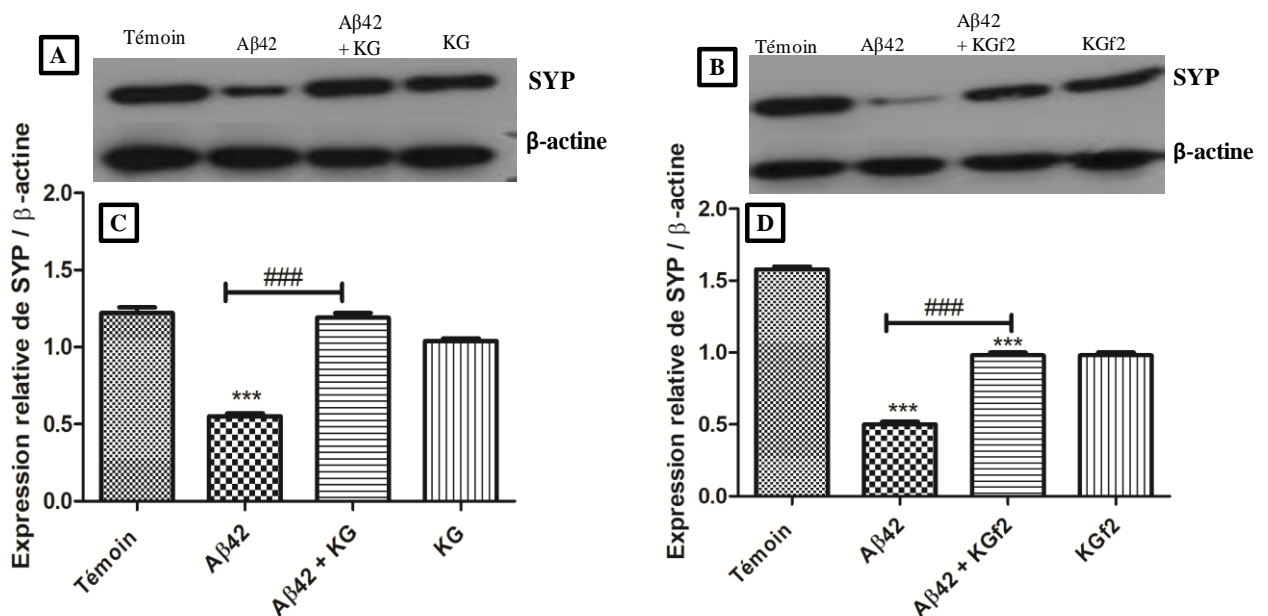


Figure 39. Activation de l'expression de SYP induit par Aβ42 sur les cellules IMR32 par l'extrait brut et la fraction KGf2.

Les cellules ont été traitées avec ou sans $A\beta_{42}$ ($1 \mu M$), ou co-traitées avec l' $A\beta_{42}$ ($1 \mu M$) et l'extrait brut et la fraction 2 de KG ($5 \mu g/mL$) durant 48 h. Après le traitement, les protéines totales ont été extraites des cellules et les lysats ont été probés avec l'anticorps SYP par western blot. La β -actine a été utilisée comme contrôle interne. Chaque bande représente une des trois expériences indépendantes. (A, B) Effet de l'extrait brut et de la fraction KGf2 sur l'activation de SYP, respectivement. (C, D) Analyse de la densitométrie des bandes, respectivement, pour l'extrait brut et la fraction KGf2. *** $P < 0,001$ vs groupe contrôle; ### $P < 0,001$ vs groupe $A\beta_{42}$. Bande 1: contrôle; Bande 2: $A\beta_{42}$; Bande 3: $A\beta_{42} + KG$ ou $A\beta_{42} + KGf2$; Bande 4: KG ou KGf2. KG: *Khaya grandifoliola*, KGf2: fraction 2 de KG.

3.1.3.4. Effet inhibiteur de l'extrait et la fraction KGf2 sur l'hyperphosphorylation de la protéine tau induite par le peptide $A\beta_{42}$ sur les cellules neuroblastomes IMR32 différenciées

La protéine tau joue un rôle très important dans la stabilité du cytosquelette, la signalisation cellulaire, la plasticité synaptique et la neurogenèse. L'hyperphosphorylation de la protéine entraîne une désintégration des microtubules et la mort neuronale. Les résultats de notre étude montrent une hyperphosphorylation de la protéine tau au niveau du site comportant la thréonine 181 (T181) chez les cellules traitées avec le peptide $A\beta_{42}$. Le traitement avec l'extrait brut et la fraction active KGf2 réduisent significativement l'hyperphosphorylation de la protéine tau (Figure 40).

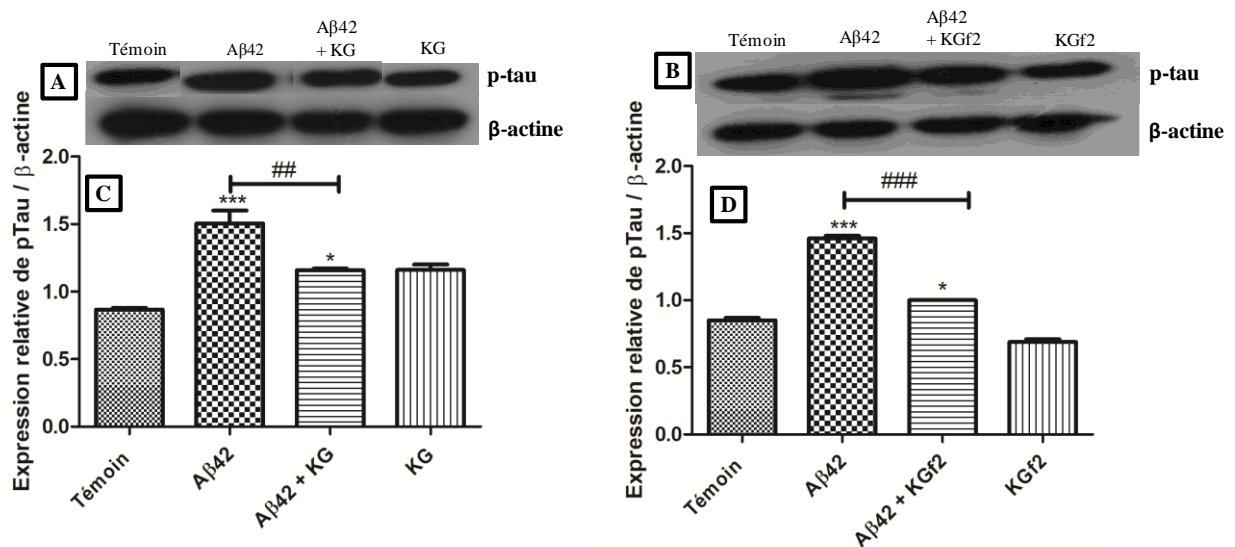


Figure 40. Inhibition de l'hyperphosphorylation de la protéine tau induite par $A\beta_{42}$ sur les cellules IMR32 par l'extrait brut et la fraction KGf2.

Les cellules ont été traitées avec ou sans $A\beta_{42}$ ($1 \mu M$), ou co-traitées avec l' $A\beta_{42}$ ($1 \mu M$) et l'extrait brut et la fraction 2 de KG ($5 \mu g/mL$) durant 48 h. Après le traitement, les protéines totales ont été extraites des cellules et les lysats ont été probés avec l'anticorps pT181-tau par western blot. La β -actine a été utilisée comme contrôle interne. Chaque bande représente une des trois expériences indépendantes. (A, B) Effet de l'extrait brut et de la fraction KGf2 sur l'inhibition de pT181, respectivement. (C, D) Analyse de la densitométrie des bandes, respectivement, pour l'extrait brut et la fraction KGf2. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$ vs groupe contrôle; ## $P < 0,01$; ### $P < 0,001$ vs groupe $A\beta_{42}$. Bande 1: contrôle; Bande 2: $A\beta_{42}$; Bande 3:

$A\beta_{42}+KG$ ou $A\beta_{42}+KGf2$; Bande 4: KG ou $KGf2$. KG : *Khaya grandifoliola*, $KGf2$: fraction 2 de KG .

3.1.3.5. Effet inhibiteur de l'extrait brut et la fraction $KGf2$ sur l'activité de la kinase ERK induite par le peptide $A\beta_{42}$ sur les cellules neuroblastomes IMR32 différenciées

La kinase ERK1/2 (*Extracellular signal-related kinase*) est une kinase serine/threonine qui agit composante essentielle de la famille des MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) dans le mécanisme de transduction du signal. La phosphorylation de ERK (p-ERK) peut être utilisée comme point de mesure final commun de l'activation de diverses classes des récepteurs couplés à la protéine G. Les résultats obtenus de notre étude montrent que le traitement des cellules avec le peptide $A\beta_{42}$ entraînent une phosphorylation de la kinase ERK. Cette phosphorylation est inhibée suite au traitement avec l'extrait brut et la fraction active $KGf2$ de façon significative (Figure 41).

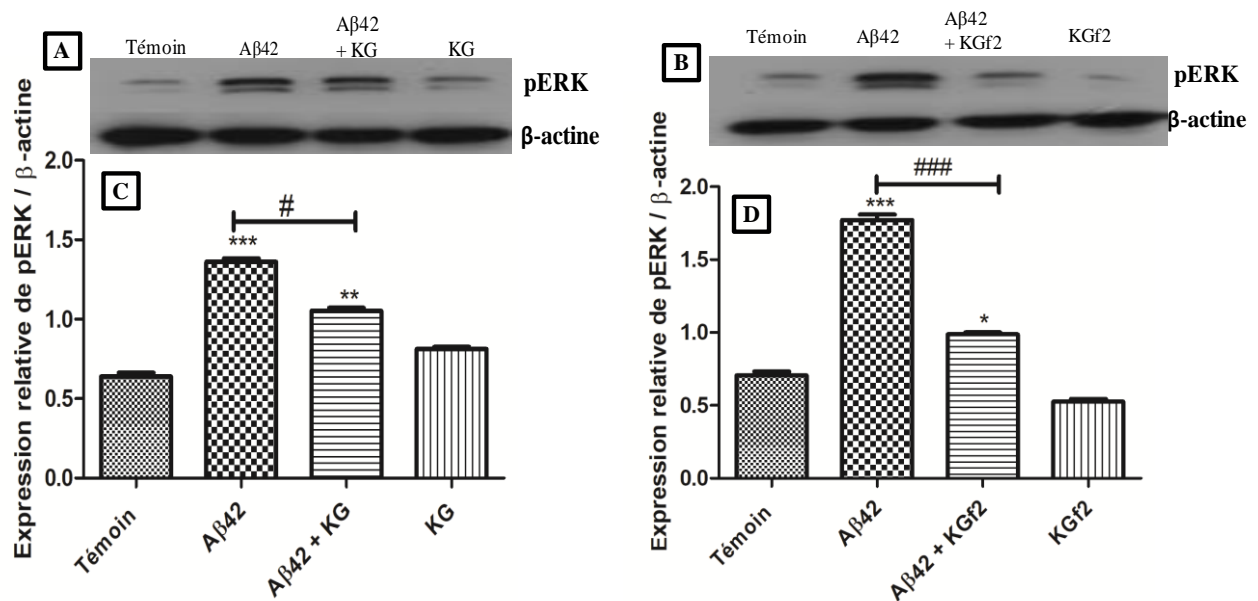


Figure 41. Inhibition de pERK induit par $A\beta_{1-42}$ sur les cellules IMR32 par l'extrait brut et la fraction $KGf2$.

Les cellules ont été traitées avec ou sans $A\beta_{42}$ ($1 \mu M$), ou co-traitées avec l' $A\beta_{42}$ ($1 \mu M$) et l'extrait brut et la fraction 2 de KG ($5 \mu g/mL$) durant 48 h. Après le traitement, les protéines totales ont été extraites des cellules et les lysats ont été probés avec l'anticorps pERK par western blot. La β -actine a été utilisée comme contrôle interne. Chaque bande représente une des trois expériences indépendantes. (A, B) Effet de l'extrait brut et de la fraction $KGf2$ sur l'inhibition de pERK, respectivement. (C, D) Analyse de la densitométrie des bandes, respectivement, pour l'extrait brut et la fraction $KGf2$. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ vs groupe contrôle; # $P < 0,05$; ### $P < 0,001$ vs groupe $A\beta_{42}$. Bande 1: contrôle; Bande 2: $A\beta_{42}$; Bande 3: $A\beta_{42}+KG$ ou $A\beta_{42}+KGf2$; Bande 4: KG ou $KGf2$. KG : *Khaya grandifoliola*, $KGf2$: fraction 2 de KG .

3.1.3.6. Conclusion partielle

En conclusion, les données obtenues lors de cette partie suggèrent que l'extrait brut et la fraction KGf2 stimulent l'activité de la SOD, et des protéines synaptiques (SNAP25 et SYP). Ils inhibent l'activité de la caspase-3, pERK et l'hyperphosphorylation de la protéine tau. Cependant, nous n'avons pas observé une réelle différence significative en termes de résultats entre l'extrait brut et la fraction active KGf2. Dans le souci de mieux valoriser l'extrait de cette plante, nous avons initié une étude *in vivo* sur un modèle animal.

3.1.4. Effet de l'extrait brut de KG sur les paramètres biochimiques et les déficits comportementaux induit par la scopolamine chez le rat

3.1.4.1. Evolution du poids des animaux au cours du traitement

Avant chaque traitement, les rats ont été pesés. Le poids de chaque rat est consigné et son évolution en fonction du traitement est observée durant 17 jours. La consommation journalière de nourriture a été similaire dans chaque groupe. Durant toute la période de l'expérimentation, les animaux traités par l'extrait et ceux témoins n'ont montré aucune différence significative de l'évolution de leur poids corporel (Figure 42).

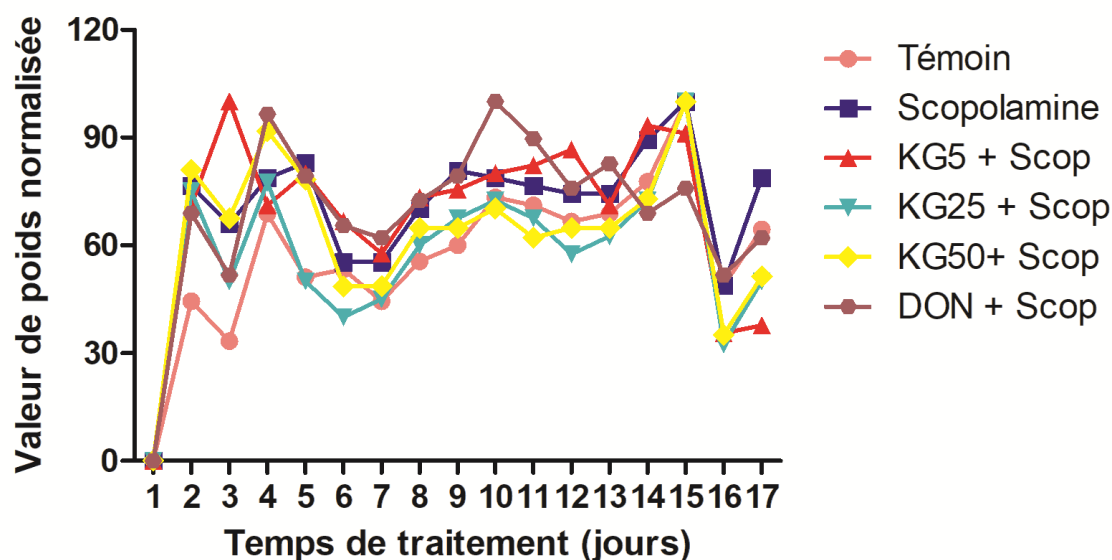


Figure 42. Evolution du poids des rats dans les différents groupes durant le traitement.

3.1.4.2. Tests comportementaux effectués pour évaluer l'effet de l'extrait brut de KG

L'effet de l'extrait brut de KG a été évalué sur quelques paramètres comportementaux chez les rats. Les tests effectués étaient : le test de suspension caudale, le test de la piscine aquatique de Morris et le test de l'alimentation supprimée par la nouveauté.

a. Test de suspension caudale

L'effet de l'extrait brut de KG sur le niveau de dépression chez les rats a été étudié. Pour ce faire, les rats ont été soumis au test de suspension caudale. Ce test est basé sur la mesure de la durée des mouvements déployés par un animal lors de sa suspension par la queue. Il a été observé que les rats se débattaient plus au début (les 2 premières minutes) puis finissaient par abandonnées adoptant une posture immobile, qui correspond à une situation de dépression chez l'Homme (Figure 56, annexe). Le temps d'immobilité des rats a été déterminé au cours du test. Il est important de noter que le temps d'immobilité très long d'un animal traduit une dépression très importante chez celui-ci. Par contre, un temps d'immobilité très court indique la baisse du niveau de dépression.

b. Test de la piscine de Morris

L'effet de l'extrait brut de KG sur la capacité mémorative des rats a été étudié. Le tableau rapporte le suivi des paramètres du test de la piscine de Morris. Le temps de latence pour retrouver la plateforme pour les différents groupes de traitement a été déterminé. Les rats sont déposés dans le bassin à partir d'un point fixe de lâcher et doivent pour se sauver de l'adversité que représente la piscine se réfugier sur une plate-forme invisible localisée à l'une des extrémités de la piscine (Figure 57, annexe). Les performances sont analysées au moyen de 4 essais effectués.

c. Test de l'alimentation supprimée par la nouveauté

Ce test induit une situation de motivation conflictuelle entre celle dirigée vers la nourriture et la peur de s'aventurer au centre de l'enceinte. Ce test a montré son aptitude à mettre en évidence une activité de type antianxiolitique. L'effet de l'extrait brut a été évalué. Vingt-quatre heures avant le test, les animaux ont été mis à jeûn. Au moment du test, l'aliment identique à celui avec lequel les rats se nourrissent quotidiennement, est disposée au centre de l'arène. L'animal est alors placé dans un coin du dispositif et le temps de latence à mordre l'aliment a été enregistré. Ce temps de latence traduit le niveau d'anxiété chez l'animal (Figure 58, annexe).

3.1.4.3. Effets nootrophique de l'extrait brut de KG sur le comportement des rats intoxiqués ou non à la scopolamine

Dans un premier temps, nous avons évalué l'effet de l'extrait brut de KG en absence de maladie. Cet effet est appelé effet nootrophique et permet de d'évaluer la capacité de

l'extrait à améliorer les fonctions cognitives. Les tests de suspension caudale et de la piscine de Morris ont investigués afin d'évaluer cet effet. Ces tests ont été effectués le 7^e et le 8^e jour respectivement. L'analyse des données consignées dans le tableau 7 montre que le traitement avec l'extrait de KG à différentes doses diminuent considérablement le temps d'immobilité et le temps de latence des rats à atteindre la plate forme d'échappement comparativement au groupe témoin. Ces résultats confirment la capacité de l'extrait de KG à booster la mémoire des rats et la dose 25 mg/kg a montré une meilleure activité.

Tableau 7. Réduction des temps des temps d'immobilité et de latence des rats à rejoindre la plateforme chez les rats intoxiqués à la scopolamine et traités avec l'extrait de KG à différentes doses.

Groupes		Dépression	Mémoire
		Temps d'immobilité (s)	Temps de latence (s)
Groupe 1	Témoin	166,67 ± 16,44	55,67 ± 5,78
Groupe 2	KG 5 mg/kg	129,67 ± 15,11 ^a	37,25 ± 1,25 ^b
Groupe 3	KG 25 mg/kg	112,67 ± 12,22 ^a	12,00 ± 0,67 ^b
Groupe 4	KG 50 mg/kg	121,00 ± 9,00 ^a	22,33 ± 1,78 ^b
Groupe 5	Donépézil 1 mg/kg	101,33 ± 7,11 ^a	21,00 ± 3,56 ^b

Les rats ont reçu par gavage l'extrait brut de KG à différentes doses 5, 25 et 50 mg/kg ou une solution de donépézil 1mg/kg pendant 8 jours. Les résultats sont présentés en moyenne ± erreur standard moyen sur les animaux de chaque groupe. La significativité entre les rats contrôle et les rats traités avec l'extrait de KG ou le donépézil est calculée par le test Anova (Tukey's multiple comparisons) ^ap<0,001.

3.1.4.4. Effet antiamnésique de l'extrait brut de KG sur le comportement des rats intoxiqués ou non à la scopolamine

L'effet antiamnésique de l'extrait brut de KG a été évalué au moyen de quelques tests comportementaux (test de suspension caudale, test de la piscine aquatique de Morris et le test de l'alimentation supprimée par la nouveauté). Ces tests permettent de mettre en évidence respectivement la dépression, la mémoire et l'anxiété chez les rats intoxiqués à la scopolamine. Ces tests ont été effectués le 14^e, 15^e et 17^e jour de traitement. Les résultats des tests comportementaux sont consignés dans le tableau 10.

Tout d'abord, on constate que les rats traités avec la scopolamine présentent un niveau élevé de dépression. Ensuite, l'analyse des données comportementales confirme l'existence d'un déficit de mémoire chez les rats traités avec la scopolamine (1 mg/kg) par rapport au groupe témoin ; démontrant que le traitement avec la scopolamine engendre une perturbation de l'acquisition. De même, le traitement des rats avec la scopolamine engendre une anxiété chez les rats.

Par contre, chez les groupes traités avec l'extrait de KG à diverses doses, on note une exhibition de l'activité antidépressive significative, une amélioration des capacités mémoratives qui se manifestent par une réduction du temps de latence et une diminution considérable du niveau d'anxiété chez les rats. Cependant, la meilleure activité a été obtenue avec l'extrait à la 25 mg/kg.

Tableau 8. Réduction des temps d'immobilité, de latence des rats à rejoindre la plateforme et à mordre l'aliment chez les rats intoxiqués à la scopolamine et traités avec l'extrait de KG à différentes doses.

Groupes		Dépression	Mémoire	Anxiété
		Temps d'immobilité (s)	Temps de latence (s)	Temps de latence (s)
Groupe 1	Témoin	101,75 ± 6,75	17,75 ± 6,12	221,00 ± 42,00
Groupe 2	Scopolamine (Scop)	125,20 ± 6,64	33,00 ± 4,00	296,67 ± 4,44
Groupe 3	KG 5 + Scop	115,80 ± 5,68	19,00 ± 6,50 ^a	265,00 ± 35,00
Groupe 4	KG 25 + Scop	76,50 ± 7,00^{a,b}	7,33 ± 0,88^b	108,00 ± 18,67^a
Groupe 5	KG 50 + Scop	78,83 ± 6,88^{a,b}	8,33 ± 1,11^b	212,33 ± 60,22
Groupe 6	Don + Scop	54,00 ± 6,33 ^{a,b}	8,66 ± 0,44 ^b	138,00 ± 2,00

Les rats ont reçu par gavage l'extrait brut de KG à différentes doses 5, 25 et 50 mg/kg ou une solution de donépézil 1 mg/kg et parallèlement une injection intrapéritonéale de scopolamine 1mg/kg pendant 9 jours. Les résultats sont présentés en moyenne ± erreur standard moyen sur les animaux de chaque groupe. La significativité entre les rats traités avec la scopolamine et cotraités avec l'extrait de KG ou le donépézil et la scopolamine est calculée par le test Anova (Tukey's multiple comparisons) ^a*p*<0,001. Scop : scopolamine 1 mg/kg ; KG 5: Khaya grandifolia 5 mg/kg ; KG 25 : Khaya grandifolia 25 mg/kg ; KG 50 : Khaya grandifolia 50 mg/kg ; Don: donépézil 1 mg/kg.

3.1.4.5. Effet de l'extrait brut de KG sur les marqueurs du stress oxydatif intracellulaire chez les rats intoxiqués à la scopolamine

Puisque le stress oxydatif est considéré comme un événement impliqué dans le déclenchement de la MA, un dosage de l'activité enzymatique des marqueurs du stress oxydatif a été réalisé dans l'homogénat de cerveau et le sérum des rats traités à différentes doses en extrait de KG (5 ; 25 et 50 mg/kg) et 1 mg/kg de scopolamine.

a. Incidence sur l'activité enzymatique de superoxyde dismutase totale

La superoxyde dismutase (SOD) est une enzyme capable de dismuter l'anion superoxide en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et en oxygène moléculaire, qui par la suite pourrait être pris en charge par des enzymes à activité peroxydase. Les résultats obtenus montrent que l'activité de la SOD a diminué d'une manière significative chez les rats traités avec la scopolamine. Toutefois, cette activité a augmenté chez les rats traités avec l'extrait de KG. Aucune différence significative n'a été observé entre la dose 25 mg/kg de KG et le donépézil (1 mg/kg) composé de référence (Figure 43).

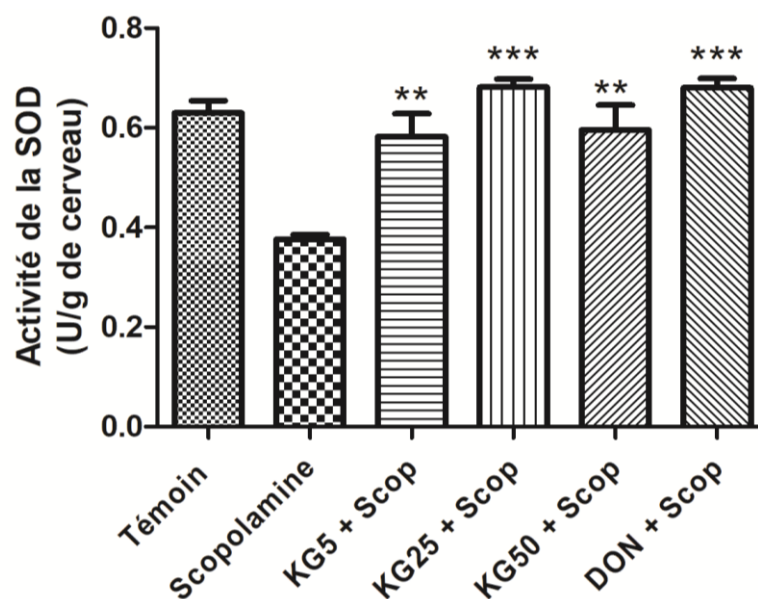


Figure 43. Effet activateur de l'extrait brut de KG sur l'activité de la superoxyde dismutase (SOD) dans l'homogénat de cerveau des rats intoxiqués à la scopolamine.

Les rats ont reçu par gavage l'extrait brut de KG à différentes doses 5, 25 et 50 mg/kg ou une solution de donépézil 1 mg/kg et parallèlement une injection intrapéritonéale de scopolamine 1mg/kg pendant 9 jours. Les résultats sont présentés en moyenne \pm erreur standard moyen sur les animaux de chaque groupe. La significativité entre les rats traités avec la scopolamine et cotraités avec l'extrait de KG ou le donépézil et la scopolamine est calculée par le test Anova (Tukey's multiple comparisons) ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$.

b. Incidence sur l'activité enzymatique de la catalase

La catalase (CAT) est la principale enzyme qui assure le rôle de détoxification de l'organisme. Elle est responsable de la dégradation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire. L'activité enzymatique de la catalase au niveau du cerveau a été étudiée. Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 44. Ces résultats montrent que l'activité enzymatique de la catalase a été diminuée significativement chez les rats traités à la scopolamine. Chez les rats avec l'extrait de KG, l'activité enzymatique de la catalase a augmenté significativement. Les résultats significatifs ont été obtenus seulement avec les doses 25 mg/kg et 50 mg/kg. Aucune différence significative n'a été observée entre le groupe traité à la dose 25 mg/kg et le donépézil 1 mg/kg.

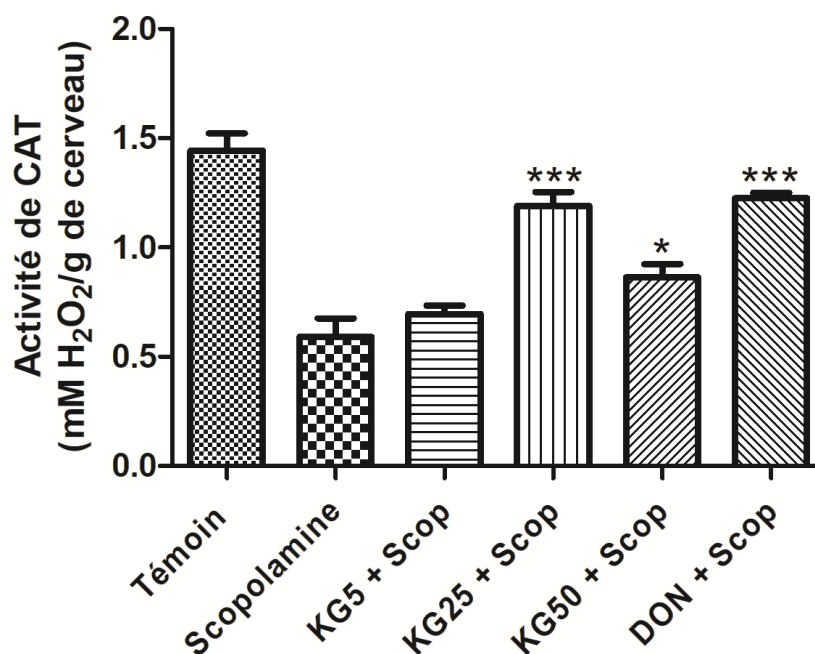


Figure 44. Effet activateur de l'extrait brut de KG sur l'activité de la catalase (CAT) chez les rats intoxiqués à la scopolamine.

Les rats ont reçu par gavage l'extrait brut de KG à différentes doses 5, 25 et 50 mg/kg ou une solution de donépézil 1 mg/kg et parallèlement une injection intrapéritonéale de scopolamine 1mg/kg pendant 9 jours. Les résultats sont présentés en moyenne \pm erreur standard moyen sur les animaux de chaque groupe. La significativité entre les rats traités avec la scopolamine et cotraités avec l'extrait de KG ou le donépézil et la scopolamine est calculée par le test Anova (Tukey's multiple comparisons) * $p < 0,05$; *** $p < 0,0001$.

c. Inhibition de la déplétion du glutathion réduit

Le glutathion est un tripeptide (composé de glutamate, cystéine et glycine) intervenant dans le transport de l'hydrogène et protège les cellules de l'oxydation. Une

diminution significative du niveau du glutathion réduit (GSH) a été observée chez les rats traités à la scopolamine. Ce niveau a été fortement relevé ($p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,0001$) chez les rats intoxiqués à la scopolamine (1 mg/kg) et traités avec l'extrait de KG aux doses de 5, 25 et 50 mg/kg (Figure 45).

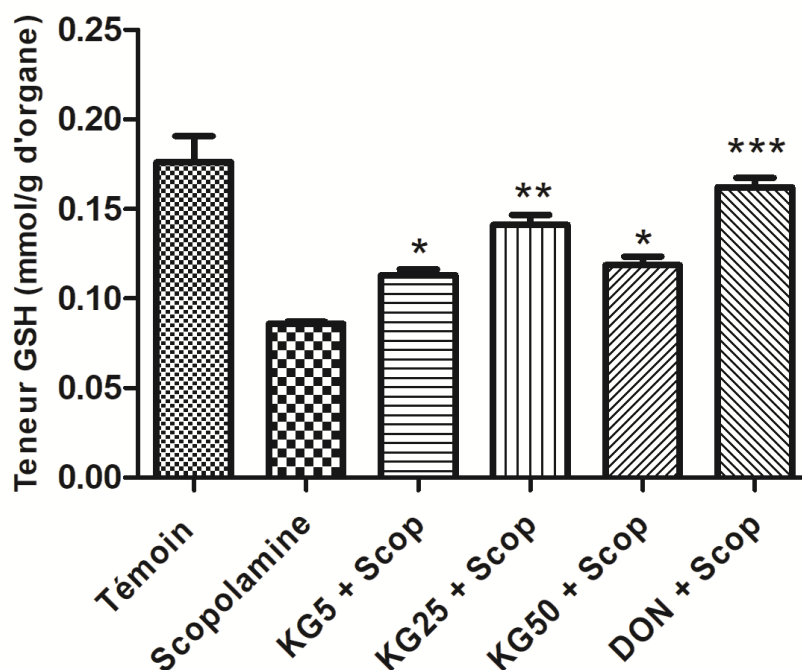


Figure 45. Inhibition de la déplétion du glutathion réduit (GSH) chez les rats intoxiqués

Les rats ont reçu par gavage l'extrait brut de KG à différentes doses 5, 25 et 50 mg/kg ou une solution de donépézil 1 mg/kg et parallèlement une injection intrapéritonéale de scopolamine 1mg/kg pendant 9 jours. Les résultats sont présentés en moyenne \pm erreur standard moyen sur les animaux de chaque groupe. La significativité entre les rats traités avec la scopolamine et cotraités avec l'extrait de KG ou le donépézil et la scopolamine est calculée par le test Anova (Tukey's multiple comparisons) * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$.

d. Inhibition de la surproduction de malonaldehyde (MDA) dans l'homogénat de cerveau et le sérum des rats intoxiqués à la scopolamine

Le malondialdehyde (MDA) un biomarqueur du stress oxydatif généré au cours de la peroxydation lipidique. Les résultats de notre étude montrent que le taux de MDA est élevé chez les rats traités avec la scopolamine. Le traitement des rats avec l'extrait de KG inhibe significativement ($p < 0,05$; $p < 0,0001$) la production du MDA dans l'homogénat de cerveau comme dans le sérum (Figure 46 A et 46 B).

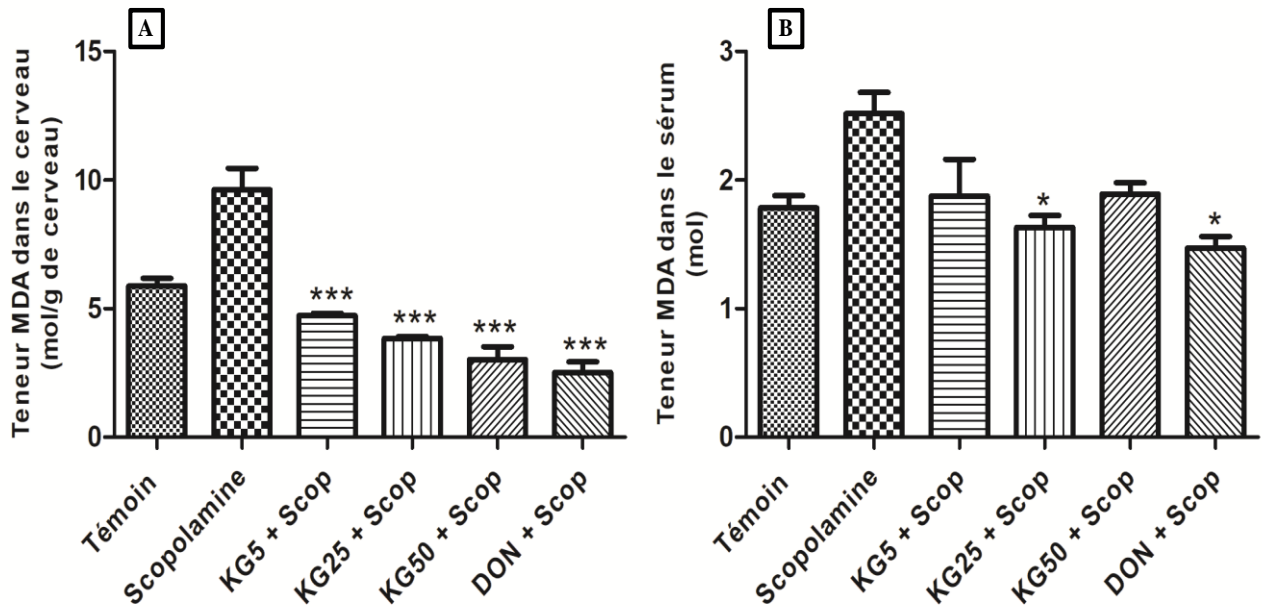


Figure 46. Inhibiton de la production de MDA chez les rats intoxiqués à la scopolamine. (A) : homogénat de cerveau ; (B) : Sérum.

Les rats ont reçu par gavage l'extrait brut de KG à différentes doses 5, 25 et 50 mg/kg ou une solution de donépézil 1 mg/kg et parallèlement une injection intrapéritonéale de scopolamine 1mg/kg pendant 9 jours. Les résultats sont présentés en moyenne \pm erreur standard moyen sur les animaux de chaque groupe. La significativité entre les rats traités avec la scopolamine et cotraités avec l'extrait de KG ou le donépézil et la scopolamine est calculée par le test Anova (Tukey's multiple comparisons) * $p < 0,05$; *** $p < 0,0001$.

3.1.4.6. Effet inhibiteur de l'extrait brut de KG de l'activité de l'acétylcholine estérase chez les rats intoxiqués à la scopolamine

L'acétylcholine estérase (AChE) est une enzyme qui dégrade l'acétylcholine. Le traitement des rats avec la scopolamine entraîne une augmentation de l'activité de l'AChE. Cette action est inversée suite au traitement des rats avec l'extrait de KG ($p < 0,001$; $p < 0,0001$). La dose 25 mg/kg est la plus active et ne présente aucune différence significative par rapport au donépézil (Figure 47).

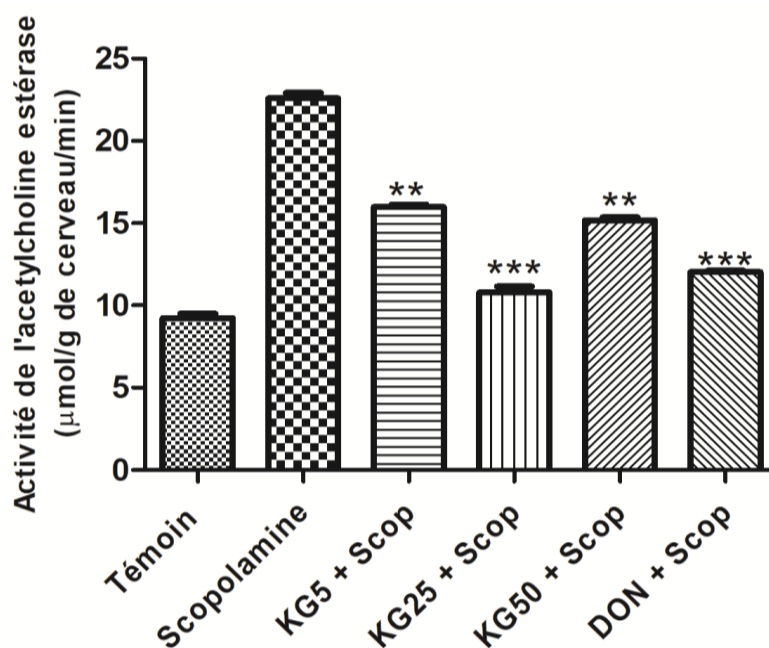


Figure 47. Inhibition de l'activité de l'acétylcholine estérase (AChE) dans l'homogénat de cerveau de rat intoxiqué à la scopolamine par l'extrait brut de KG.

Les rats ont reçu par gavage l'extrait brut de KG à différentes doses 5, 25 et 50 mg/kg ou une solution de donépézil 1 mg/kg et parallèlement une injection intrapéritonéale de scopolamine 1 mg/kg pendant 9 jours. Les résultats sont présentés en moyenne \pm erreur standard moyen sur les animaux de chaque groupe. La significativité entre les rats traités avec la scopolamine et cotraités avec l'extrait de KG ou le donépézil et la scopolamine est calculée par le test Anova (Tukey's multiple comparisons) ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$.

3.1.4.7. Effet inhibiteur de l'extrait brut de KG de l'activité des phosphatases alcalines dans l'homogénat de cerveau et le sérum chez les rats intoxiqués à la scopolamine

Les phosphatases alcalines catalysent la réaction d'hydrolyse des groupements phosphate. En effet, elles scindent une liaison ester phosphorique à partir de substrats très variés et libèrent ainsi de l'acide phosphorique. L'activité des phosphatases a été évaluée dans l'homogénat de cerveau et du sérum des rats. Il ressort de notre étude une augmentation significative de l'activité des phosphatases chez les rats traités avec la scopolamine. Cette activité est réduite suite au traitement des animaux avec l'extrait de KG. Dans l'homogénat de cerveau, on note une différence significative ($p < 0,05$; $p < 0,001$) du traitement à la dose 25 mg/kg par rapport au groupe traité avec la scopolamine (Figure 48 A et 48 B). Par contre dans le sérum, le traitement aux doses 25 mg/kg et 50 mg/kg comparativement au groupe scopolamine et aucune différence significative n'a été observé avec le groupe traité au donépézil.

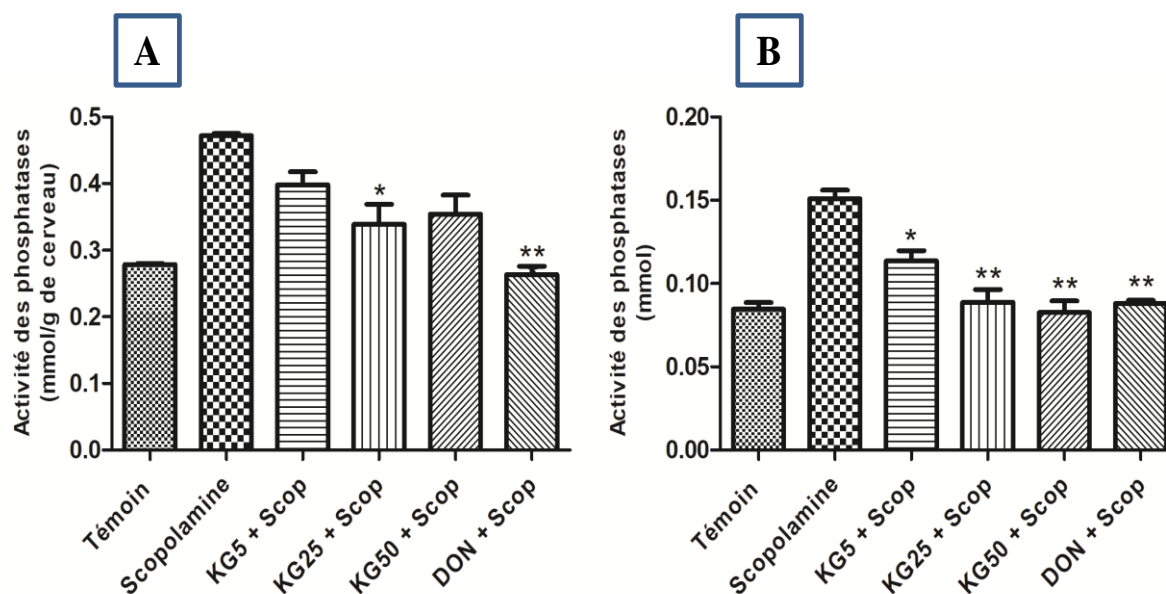


Figure 48. Inhibition de l'activité des phosphatases l'extrait brut de KG chez les rats intoxiqués à la scopolamine. (A) : homogénat de cerveau ; (B) : sérum.

Les rats ont reçu par gavage l'extrait brut de KG à différentes doses 5, 25 et 50 mg/kg ou une solution de donépézil 1 mg/kg et parallèlement une injection intrapéritonéale de scopolamine 1 mg/kg pendant 9 jours. Les résultats sont présentés en moyenne \pm erreur standard moyen sur les animaux de chaque groupe. La significativité entre les rats traités avec la scopolamine et cotraités avec l'extrait de KG ou le donépézil et la scopolamine est calculée par le test Anova (Tukey's multiple comparisons) * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

3.1.4.8. Effet inhibiteur de l'extrait brut de KG sur le processus de fibrillation dans l'homogénat de cerveau des intoxiqués à la scopolamine

Le processus de fibrillogénèse est responsable de la cascade des événements physiologiques qui contribuent directement à l'initiation et à la progression de la MA. Le taux de fibrilles dans l'homogénat de cerveau a été évalué en utilisant la coloration au rouge Congo. Les résultats obtenus montrent que la scopolamine entraîne l'élévation des fibrilles d'A β (Figure 49). Le traitement avec l'extrait de KG a considérablement diminué le taux de fibrilles ($p < 0,05$; $p < 0,001$). Le traitement à la dose 25 mg/kg a été le plus efficace et aucune différence n'a été observée avec le groupe traité au donépézil (composé de référence).

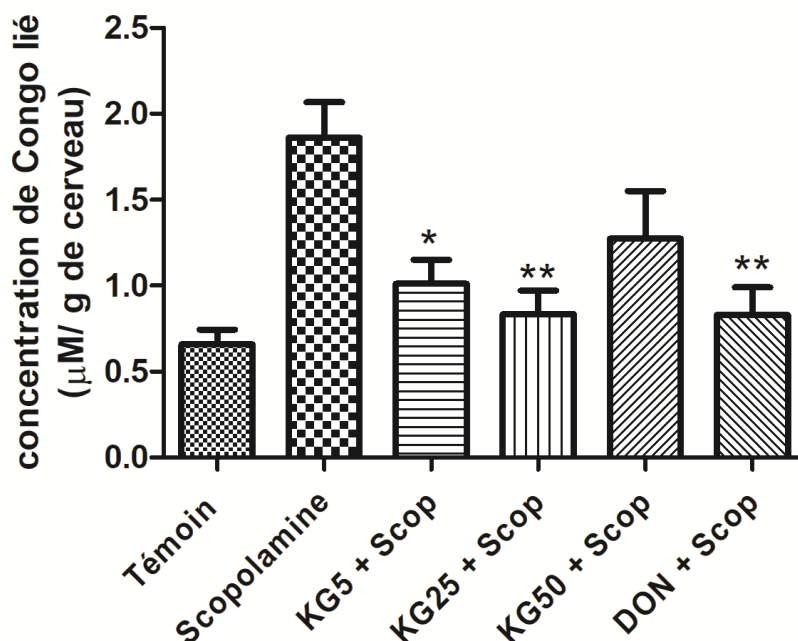


Figure 49. Inhibition de la formation des fibrilles chez les rats intoxiqués à la scopolamine par l'extrait brut de KG

Les rats ont reçu par gavage l'extrait brut de KG à différentes doses 5, 25 et 50 mg/kg ou une solution de donépézil 1 mg/kg et parallèlement une injection intrapéritonéale de scopolamine 1 mg/kg pendant 9 jours. Les résultats sont présentés en moyenne \pm erreur standard moyen sur les animaux de chaque groupe. La significativité entre les rats traités avec la scopolamine et cotraités avec l'extrait de KG ou le donépézil et la scopolamine est calculée par le test Anova (Tukey's multiple comparisons) * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.

3.1.4.9. Effet de l'extrait de KG et de la scopolamine sur la microarchitecture du cortex cérébral

La figure 50 est une illustration des effets de l'injection de la scopolamine et du traitement à l'extrait de KG sur la microarchitecture du cortex cérébral. Il ressort de cette figure que la scopolamine a entraînée une nécrose des neurones et des oligodendrocytes, mais aussi une démyélinisation des neurones comparativement aux animaux du groupe témoin ayant reçu de l'eau distillée. Le traitement à l'extrait de KG au même titre que le donépézil utilisé comme médicament de référence a corrigé ces altérations témoignant de la capacité de l'extrait à protéger les nerveuses de la toxicité induite par la scopolamine.

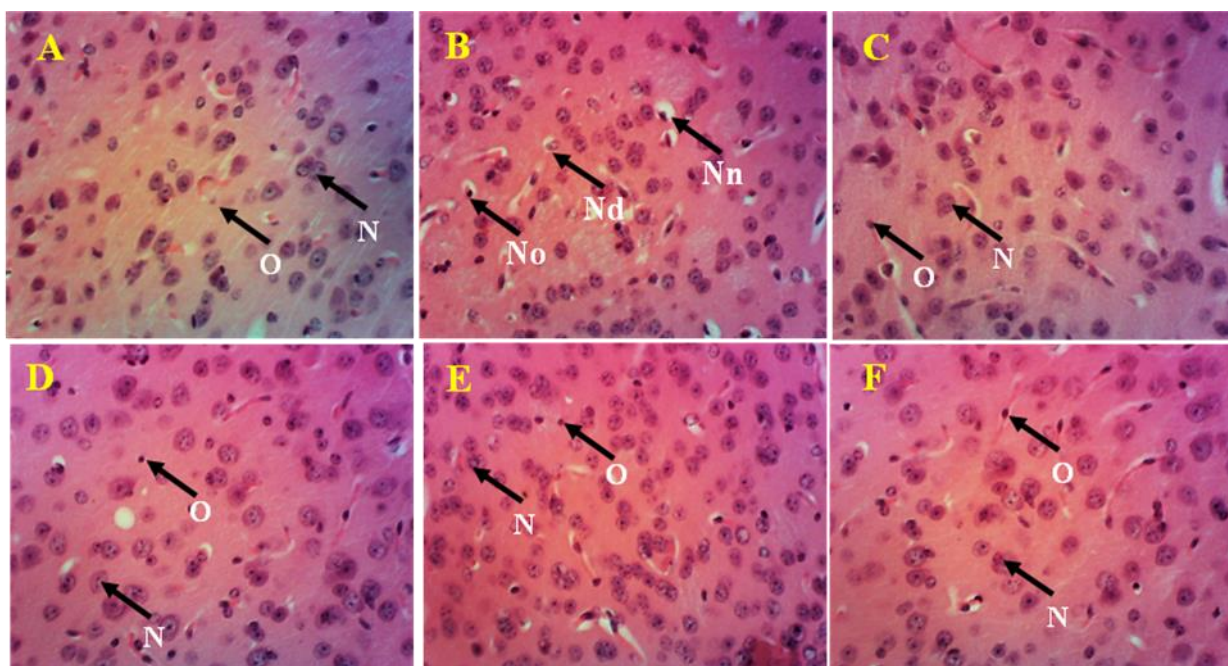


Figure 50. Effet inhibiteur de l'extrait brut de KG sur la nécrose des cellules du cortex cérébral des rats intoxiqués à la scopolamine (200X, HE).

A = animaux du groupe témoin recevant le véhicule utilisé (méthylcellulose ; 10 mL/kg) ; *B* = animaux ayant reçu une injection de scopolamine (1 mg/kg) ; *C*, *D*, *E* = animaux ayant reçu une injection de scopolamine (1 mg/kg) et traités à l'extrait brut de KG aux doses respectives de 5, 25 et 50 mg/kg et *F* = animaux ayant reçu une injection de scopolamine (1 mg/kg) et traités au donépézil 1 mg/kg (control positif).

N = neurone, *O* = Oligodendrocyte, *Nd* = neurone démyélinisé, *Nn* = Nécrose neuronale, *No* = Nécrose d'oligodendrocyte.

3.1.4.10. Conclusion partielle

En somme, nous pouvons dire que l'extrait hydroéthanolique de KG stimule les fonctions cognitives en réduisant le niveau de dépression et d'anxiété mais surtout en améliorant la mémoire chez les rats traitées avec la scopolamine. Cet extrait stimule l'activité de la SOD, la CAT et le taux de glutathion réduit; et inhibe la peroxydation lipidique. Il inhibe l'activité de l'acétylcholine estérase, des phosphatases, mais aussi la fibrillation.

3.2. DISCUSSION GENERALE

La présente étude a enquêté d'une part sur l'effet préventif de l'extrait de *Khaya grandifolia* (KG) sur la toxicité induite par le peptide β -amyloïde sur les cellules neuroblastomes humaines IMR32 différenciées ; et d'autre part sur la capacité de cet extrait à améliorer la mémoire dans un modèle amnésique induit par la scopolamine chez les rats. Le but principal de cette étude a été de moduler l'expression des protéines impliquées dans la maladie d'Alzheimer (MA) par l'extrait brut et les fractions de *Khaya grandifolia*. Les résultats obtenus montrent l'effet protecteur de l'extrait brut en exerçant une inhibition des événements impliqués dans le mécanisme de la neurodégénérescence.

La MA est la forme de démence prépondérante chez les personnes âgées (Liu *et al.*, 2001). Elle affecte sévèrement et progressivement la mémoire, la cognition et le comportement des malades (Papassotiropoulos *et al.*, 2006). Le cerveau des personnes malades présente une taille réduite résultant non seulement d'une dégénérescence des synapses mais aussi d'une mort massive de neurones (Braak *et al.* 1991; Mattson, 2004). Parmi les caractéristiques histopathologiques, on note la présence de dégénérescences neurofibrillaires dans l'environnement intraneuronal dû à l'hyperphosphorylation de la protéine tau (Brunello *et al.*, 2020) et l'accumulation de plaques séniles dans l'environnement extraneuronal. Encore appelées plaques amyloïdes, les plaques séniles sont issues de l'agrégation du peptide neurotoxique amyloïde β ($A\beta$) engendré par le processus protéolytique anormal de la protéine transmembranaire APP, séquentiellement clivée par les sécrétases β et γ (Dreses-Werringloer *et al.*, 2008).

L' $A\beta$ produit possède entre 40 et 42 résidus d'acides aminés et sa séquence a été établie pour la première fois en 1984 (Glennner et Wong, 1984). La surproduction de ce peptide est l'un des principaux facteurs de la pathogenèse de la MA (Forner *et al.*, 2017). Dans le cadre des maladies neurodégénératives et en particulier la MA, les modifications cellulaires associées à la neurodégénérescence s'accompagnent d'une altération des mitochondries, d'une perte synaptique et d'un stress oxydant pouvant conduire à la mort de la cellule. C'est ce qui pourrait plus ou moins expliquer l'atrophie cérébrale observée chez les malades Alzheimer. Le traitement des cellules IMR32 différenciées en présence de l' $A\beta$ identifié en quantité augmentée chez les patients Alzheimer entraîne ces modifications susmentionnées (Clementi *et al.*, 2015 ; Kim *et al.*, 2016). Cependant, l' $A\beta$ pourrait s'avérer plus toxique à l'état d'oligomère soluble qu'à l'issue de son agrégation (Kayed *et al.* 2003).

L'action neurotoxique du peptide A β implique d'autre part la perturbation de l'homéostasie du calcium et la génération d'un stress oxydant. En effet, le taux de dommages oxydatifs aux macromolécules biologiques est particulièrement élevé dans les neurones situés à proximité des plaques amyloïdes, suggérant un rôle important du stress oxydant dans la toxicité neuronale induite par l'A β (Cheignon *et al.*, 2018). Les oligomères de l'A β jouent donc un rôle crucial dans la pathogenèse de la MA car entraînent la mort neuronale. Les travaux de Han *et al.*, ont démontré que l'A β_{42} active la voie de signalisation des caspases et induit l'apoptose (Han *et al.*, 2017). D'autres travaux ont montré que l'exposition des cellules neuroblastomes au fragment A β_{25-35} augmente significativement le stress oxydatif en induisant la production des EOR, l'activité de la caspase-3 et la neurotoxicité (Zhang *et al.*, 2015 ; Mairuae *et al.*, 2019). Les résultats de nos travaux ont montré que l'extrait de KG atténue considérablement le stress oxydant et la mort cellulaire. Il a été également démontré à suffisance que les extraits de plante possèdent des propriétés antioxydantes et anti-apoptotiques induits par le peptide A β (Kim *et al.*, 2018 ; Mairuae *et al.*, 2019).

Le stress oxydatif induit par l'A β crée un microenvironnement qui favorise l'initiation de l'apoptose (Zhuang *et al.*, 2016). L'apoptose contribue aux changements morphologiques observés au sein de la cellule. Ces changements sont la condensation de la chromatine, la fragmentation nucléaire et l'augmentation de la densité cellulaire. Le noyau acquiert ainsi une forme irrégulière et les granules s'élargissent (Wolf *et al.*, 1999 ; Horký *et al.*, 2002). L'étape finale de l'apoptose est caractérisée par la dégradation de l'ADN et la formation des corps apoptotiques (Kalinichenko et Matveeva, 2008). L'apoptose est une mort de type caspases-dépendante, c'est-à-dire, nécessitant l'activation de la cascade protéolytique des caspases lors de ses phases initiatrice et exécutive. Les caspases sont des protéases de type sérine-aspartate qui jouent un rôle clé dans les différentes phases de l'apoptose. Elles sont subdivisées en deux grands groupes que sont les caspases initiatrices (caspase-2, -8, et -9) et exécutrices (caspase-3, -6, et -7). Parmi ces caspases, la caspase-3 est une protéine effectrice dont le clivage est induit (Ostapchenko *et al.*, 2019), et essentielle dans la mise en œuvre de la dernière étape de l'apoptose. Une fois activée, elle forme des tétramères qui vont cliver certaines protéines de la cellule et conduire à la mort programmée de celle-ci (Wang *et al.*, 2017). L'activation de cette caspase constitue ainsi une étape irréversible du processus d'apoptose (Plóciennik *et al.*, 2015). On peut noter que la mort des cellules par l'A β_{42} est médiée par son activité apoptotique (Chen *et al.*, 2019). Globalement, la mort cellulaire est un processus essentiel au maintien de l'homéostasie cellulaire et tissulaire, au développement et à

la différenciation cellulaire. Les résultats de notre étude ont montré que nos extraits inhibent l'apoptose par inhibition de la caspase-3. Des travaux effectués sur les plantes médicinales ont montré qu'elles inhibent la production des EOR et l'apoptose. En effet, Kim *et al.* (2018) ont démontré que le prétraitement des cellules neuroblastomes SK-N-MC par l'extrait éthanolique de *Momordica charantia* à 20 µg/mL atténue significativement la mort cellulaire induite par H₂O₂ (500 µM) pendant 4h. Aussi, d'autres études rapportent que les extraits de plante pourraient inhiber l'apoptose induite par le stress oxydatif au travers de l'inhibition de l'expression des certaines protéines apoptotiques comme le cytochrome c, la caspase-3 et la poly(ADP-ribose) polymérase (PARP), mais aussi les phosphoprotéines p38, JNK, et ERK1/2 MAPKs (Choi *et al.*, 2016; Tian *et al.*, 2014). Park et coll rapportent que l'extrait éthanolique de *Liriope platyphylla* inhibe l'expression de la caspase-3 clivée en modulant l'activation de la voie de signalisation de p38/MAPKs (Park *et al.*, 2015).

Les mécanismes élémentaires de l'apprentissage et de la mémoire reposent sur l'activité des synapses et leur très grande capacité de plasticité structurale et fonctionnelle, d'où l'hypothèse que les synapses sont les premiers éléments affectés par la toxicité des oligomères du peptide β-amyloïde (Marsh et Alifragis, 2018). Il semble que la perte de synapses constitue un meilleur indice du déclin cognitif que le nombre ou la taille des plaques amyloïdes, en particulier au début du développement de la pathologie (Hémar et Mulle, 2011). De nombreuses études ont montré que les altérations de l'expression des protéines synaptiques sont des contributeurs majeurs qui précèdent la perte neuronale dans la MA (Reddy *et al.*, 2016; Kashyap *et al.*, 2019). L'accumulation de l'Aβ provoque une toxicité synaptique. La transmission de l'information au travers des synapses est un modulateur clé dans la plasticité neuronale. Les synapses sont formées de connexions interneuronales qui permettent à une cellule neuronale de faire passer un signal électrique ou chimique à une autre. Cette connexion est le plus endommagée en cas de maladies neurodégénératives. Ce dysfonctionnement synaptique ou perte synaptique contribuent au déficit cognitif observé chez des personnes atteintes de MA. Les mécanismes biochimiques impliqués dans l'apoptose peuvent être activés au niveau de la synapse entraînant l'altération de sa fonction et sa dégénérescence (Kamat *et al.*, 2016). Les protéines associées aux synapses sont des phosphoprotéines présentes au niveau des vésicules synaptiques et sont associées à la fonction cognitive. Parmi ces protéines, on peut citer la SYP (synaptophysine) et SNAP25 (protéine associée à la synaptosome) représentent des marqueurs spécifiques qui reflètent la densité et la distribution des synapses (Liu *et al.*, 2016). Au plan clinique, le niveau d'expression des

protéines SYP et SNAP25 sont diminués dans le cerveau des patients atteints de la MA et dans les cellules traitées avec l'A β (Ali *et al.*, 2015). Pour nos résultats, on a observé une baisse de l'activité des protéines SNAP25 et SYP suite au traitement des cellules avec le peptide A β . Par contre, le traitement avec l'extrait brut et la fraction f2 de KG stimule l'activité de ces protéines. Les pertes synaptiques et neuronales sont observées chez des personnes atteintes de la MA, la réduction de ces protéines contribue donc à la dégénérescence synaptique et jouent un rôle crucial dans la progression de la maladie (Daneshmand *et al.*, 2016). Des travaux effectués ont démontré sur les plantes et leurs composés actifs confirment leurs effets sur l'activation de l'expression de ces protéines synaptiques (Liu *et al.*, 2016 ; Daneshmand *et al.*, 2016 ; Dinda *et al.*, 2019). La régulation positive des protéines synaptiques pourrait être déclenchée comme une option précoce pour le traitement de la MA (Daneshmand *et al.*, 2016). L'inhibition de la progression de la MA serait donc médiée par une amélioration de la fonction synaptique (Ji *et al.*, 2017). Les extraits de *Khaya grandifolia* boostent l'activité des protéines synaptiques (SYP et SNAP25).

Des études effectuées ont trouvé une meilleure corrélation entre la protéine tau et les troubles de la mémoire dans la MA (Adwan *et al.*, 2015). La protéine tau est la composante essentielle des protéines associées aux microtubules avec comme fonction de maintenir sa stabilité. Cette fonction de la protéine tau est fortement perturbée par son statut de phosphorylation au niveau des sites contenant des acides aminés serine et thréonine (Cao *et al.*, 2018). L'hyperphosphorylation de la protéine tau est un événement clé et une étape initiale importante dans la mort des neurones. On note aussi une déstabilisation du cytosquelette dû à un désassemblage des microtubules du neurone (Cao *et al.*, 2018). Dans le cerveau des personnes atteintes de la MA, une hyperphosphorylation de la protéine tau se produit au niveau de plusieurs sites de phosphorylation comportant des acides aminés serine (Ser) ou thréonine (Thr) tels que Thr181, Thr205, Ser202, Ser396, Ser404 (Neddens *et al.*, 2018 ; Miao *et al.*, 2019). La phosphorylation au site T181 est un des sites de phosphorylation de la protéine tau intensément utilisé comme outil de diagnostic dans la MA (Hampel *et al.*, 2010). Les protéines tau hyperphosphorylées entraînent une déstabilisation du cytosquelette, des cellules apoptotiques et éventuellement un dysfonctionnement de la mémoire. De toute évidence, il est important de rechercher et de développer des médicaments ayant un effet inhibiteur sur l'hyperphosphorylation des protéines tau (Yao *et al.*, 2018). Dans la présente étude, l'A β ₄₂ a été utilisé pour construire le modèle d'hyperphosphorylation de la protéine tau, par traitement des cellules avec 1 μ M de ce peptide pendant 48h (Zheng *et al.*, 2017). Le

niveau de phosphorylation de tau T181 a été réduit suite au traitement avec les extraits de KG. Des études ont démontré la capacité des extraits de plante à inhiber l'hyperphosphorylation de la protéine tau (Yang *et al.*, 2014 ; Zhang *et al.*, 2011). Le processus d'hyperphosphorylation de la protéine tau précède son aggrégation. Peterson *et al.* (2009) ont montré que l'extrait de Cinnamon inhibe *in vitro* les agrégats de Tau¹⁸⁷. Plus particulièrement, les composés polyphénoliques ont été récemment décrits comme capables de réduire la concentration de la protéine tau hyperphosphorylée *in vivo* (Chen *et al.*, 2018 ; Santa-Maria *et al.*, 2012), de dissocier les paires de filaments hélicoïdaux (PFHs) pré-formés (Ksiezak-Reding *et al.*, 2010), ou d'inhiber l'assemblage des protofibrilles de la protéine tau (Taniguchi *et al.*, 2005). En effet, les sites riches en Thr et Ser appartiennent aux sites préférentiels d'interaction des polyphénols. Les polyphénols pourraient jouer un rôle de compétiteur (et non d'inhibiteurs) des kinases, conduisant alors à la diminution de l'état d'hyperphosphorylation (Zheng *et al.*, 2019). De plus, la ERK (*Extracellular signal regulated kinase*) est une famille de kinases impliquée dans l'expression génique, la mitose, le métabolisme, l'apoptose, la prolifération, la différenciation et le mouvement cellulaire (Sahu *et al.*, 2021 ; Li *et al.*, 2018). La ERK1/2 est impliquée dans la consolidation de la mémoire spatiale et son activation est nécessaire lors de l'établissement de la potentialisation à long terme (PLT), qui est associée à la plasticité neuronale et au développement de la mémoire (Lu *et al.*, 2018). Elle est également associée à la pathologie de la protéine tau dans la MA et pourrait phosphoryler la protéine tau *in vitro* et *in vivo* (Jhang *et al.*, 2017). Malgré que la voie kinase activée soit importante pour la survie neuronale, son hyperactivation ou son activation aberrante causée par des agents neurotoxiques peut conduire à une apoptose neuronale (Modi *et al.*, 2012). Les extraits de KG ont inhibé l'activité de la kinase ERK. Les travaux effectués avec l'extrait de *Glycyrrhiza glaba* ont montré l'effet neuroprotecteur de cette plante par inhibition de l'hyperactivité de la kinase ERK1/2 (Karthickeyan *et al.*, 2021).

La découverte de médicaments contre la MA s'est concentrée sur le ciblage des intermédiaires mentionnés dans l'hypothèse amyloïde (APP et A β). Mais jusqu'à présent, aucun candidat médicament pour modifier la maladie n'a été trouvé. Cependant, très peu d'attention a été accordée à la protéine tau qui anormalement hyperphosphorylée forme des agrégats au cours de la MA. Les enchevêtrements neurofibrillaires sont des manifestations ultérieures de la pathologie de la protéine tau dont la forme phosphorylée soluble est l'espèce responsable des dommages neurodégénératifs (Adwan *et al.*, 2015). Un grand nombre d'extraits de plantes, de fractions, de composés phytochimiques et de formulations à base de

plantes possèdent des propriétés anti-Alzheimers via leurs activités antioxydantes, anti-inflammatoires, anti-apoptotiques, anti-acétylcholinestérases, anti-glycation, anti- β -amyloïde agrégation (Ma *et al.*, 2018; Sereia *et al.*, 2019). De plus, les composés anti-inflammatoires, antioxydants et qui améliorent la fonction mitochondriale peuvent aussi avoir un effet protecteur contre la dégénérescence des cellules neuronales (Kim *et al.*, 2016). Les extraits de plante contiennent généralement un nombre indéterminé de métabolites secondaires qui jouent un rôle important lors de leur interaction avec le système biologique humain (Cummings *et al.*, 2019). Parmi ces métabolites, les polyphénols, flavonoïdes et alcaloïdes ont montré des effets bénéfiques car peuvent jouer un rôle inhibiteur de la phosphorylation de la protéine tau (Baptista *et al.*, 2014). L'extrait de KG est riche en polyphénols, flavonoïdes et alcaloïdes qui sont des composés doués de plusieurs activités biologiques. Des données scientifiques suggèrent que les polyphénols exercent une action protectrice des neurones contre les dommages induits par les neurotoxines, améliore la mémoire et l'apprentissage (Kovacsova *et al.*, 2010). Ces composés phénoliques peuvent aussi atténuer les dysfonctionnements mitochondriaux et l'apoptose induits par le peptide A β par la suppression des EOR et l'activation du glutathion réduit (GSH) dans les cellules (Lee *et al.*, 2015). En outre, il a été établi que les flavonoïdes ont des actions potentielles neuroprotectrices en empêchant la réduction des performances des tâches cognitives, la mémoire et l'apprentissage (Wang *et al.*, 2014). Ces composés ont également un effet cytoprotecteur contre le stress oxydatif, et sont en mesure de sauver les neurones de la toxicité de l'A β dans des cultures primaires de l'hippocampe (Dore *et al.*, 1999). Cependant, les effets bénéfiques des polyphénols seraient le résultat de leurs capacités à prévenir les lésions cérébrales qui conduisent aux maladies neurodégénératives et plus particulièrement à la MA ; mais aussi des activateurs des enzymes antioxydantes clés dans le cerveau, atténuant ainsi le stress oxydatif et les lésions tissulaires (Zheng *et al.*, 2010 ; Lau *et al.*, 2005), et par conséquent peuvent prévenir la survenue des maladies dégénératives (Del Rio *et al.*, 2010).

Les agents nootrophiques représentent une classe de molécules psychotiques qui ont un effet facilitatoire sélectif sur les fonctions intégratives du SNC, particulièrement sur la performance intellectuelle, la capacité d'apprentissage et la mémoire (Ramrao *et al.*, 2018, Maity et Sandur, 2019). Les résultats de notre étude montrent que l'extrait brut de KG a la capacité de booster les fonctions cognitives. Les tests comportementaux effectués révèlent que cet extrait baisse la dépression, l'anxiété et surtout améliore la mémoire. De nombreuses plantes médicinales ont prouvé leur aptitude à améliorer les fonctions cognitives à l'instar de

Bacopa monnieri, *Ginkgo biloba*, *Celastrus paniculatus*, *Achyranthes aspera* (Bhanumathy *et al.*, 2010 ; Gawande et Goel, 2015 ; Yadav *et al.*, 2016 ; Chaudhari *et al.*, 2017 ; Maity et Sandur, 2019).

Les personnes atteintes de la MA présentent des déficits cognitifs et de mémoire (Stopford *et al.*, 2012). Divers composés sont utilisés chez les animaux pour reproduire ces déficits de mémoire. Le système cholinergique est connu pour son implication dans les processus mnésiques, *via* les récepteurs nicotiniques et muscariniques (Brown, 2019). La scopolamine est l'un de ces composés, utilisée comme antagoniste des récepteurs muscariniques de l'acétylcholine (Ach) impliqué dans la mémoire de travail (Pezze *et al.*, 2017). Il a été démontré que la scopolamine interfère avec les récepteurs muscariniques de l'acétylcholine (Tang *et al.*, 2019). Ce composé est couramment utilisé en expérimentation animale pour l'induction des amnésies antérogrades (Navarro *et al.*, 2017). Il faut relever que les rongeurs font preuve de grandes capacités mnésiques car ils doivent apprendre et se souvenir de l'environnement spatial afin de survivre dans la nature. Dans notre étude, la scopolamine a été administrée en présence ou non de l'extrait de KG et des tests comportementaux ont été effectués en relation avec la dépression, l'anxiété et la mémoire. Des études ont montré que le traitement des rats par injection séquentielle de la scopolamine pendant 21 jours entraîne des déficits de mémoire et d'apprentissage (Rabiei et Setorki, 2018). La scopolamine est capable de traverser la barrière hématoencéphalique et induire un effet antimuscarinique entraînant des déficits cholinergiques et une perte de mémoire. L'administration de la scopolamine reproduit un type de démence expérimental utilisé pour tester des composés nouveaux contre les déficits d'apprentissage et de mémoire (Stone *et al.*, 1988). Il existe une relation très étroite entre les déficits de mémoire et la déficience de choline dans le cerveau des personnes atteintes de la MA. Cette hypothèse suggère que la perturbation du système cholinergique dans le cerveau résulte d'une perte graduelle de la neurotransmission cholinergique qui conduit finalement à l'apoptose neuronale (Yadav *et al.*, 2018). Cependant, l'évaluation des fonctions cognitives se fait au moyen des tests comportementaux (Yadav *et al.*, 2019).

Les troubles anxieux et dépressifs sont parmi les formes les plus courantes et plus répandues de la psychopathologie (Barbee, 1998). Bien que ces troubles soient des réactions émotionnelles normales à une situation de stress, les personnes souffrantes de ces troubles montrent une plus grande sensibilité dans leurs réactions physiologiques et comportementales. Concernant l'évaluation de la dépression chez les rongeurs, le test de suspension caudale est

utilisé (Can *et al.*, 2012). Ce test est donc largement utilisé pour évaluer les propriétés antidépressives de nouvelles molécules (Ebrahimzadeh *et al.*, 2013). Parlant de l'anxiété, les animaux ont été soumis au test de l'alimentation supprimée par la nouveauté. L'effet de l'extrait sur le processus d'acquisition des informations a également été investigué. L'apprentissage est le processus par lequel des connaissances acquises sont conservées. L'apprentissage et la mémoire peuvent être conçus à la fois comme un processus psychologique, mais aussi comme un changement de la connectivité neuronale synaptique. Les modifications des processus mnésiques chez l'animal peuvent être testées de plusieurs manières. Un des tests qui permet d'étudier l'influence d'une substance sur les différentes phases de la mémoire est la piscine aquatique de Morris. Ce test est utilisé pour étudier l'apprentissage et la mémoire en liaison avec la potentialisation à long terme (PLT) (Morris, 1984). L'extrait de KG réduit la dépression, l'anxiété et améliore la mémoire des rats intoxiqués à la scopolamine. Diverses études sur les plantes médicinales ont montré leur capacité à booster les fonctions cognitives et à améliorer la mémoire (Retinasamy *et al.*, 2019; Yadav *et al.*, 2019; Mugwagwa *et al.*, 2015; Can *et al.*, 2018). En effet, l'extrait de *Mitragyna inermis* a montré des propriétés neuroprotectrices et antiamnésiques (Foyet *et al.*, 2019, 2016; Zingue *et al.*, 2018; Pahaye *et al.*, 2017).

L'élévation du stress oxydatif dans le cerveau est une des caractéristiques de la MA (Kamat *et al.*, 2016). La scopolamine induit des altérations neurochimiques, une augmentation du stress oxydatif et représente un meilleur modèle de reproduction des démences (Haider *et al.*, 2016). La scopolamine induit aussi des dysfonctionnements cognitifs associés à une altération du statut antioxydant intracellulaire dans le cerveau. Le déséquilibre de la balance entre la production des espèces oxygénées réactives (EOR) et le système de défense antioxydant dans le cerveau affecte les biomolécules essentielles comme les enzymes, les lipides, les protéines, les acides nucléiques entraînant l'apparition et la progression des maladies neurodégénératives liées à l'âge (Sadiq *et al.*, 2015). Les dommages oxydatifs étant médiés par les radicaux libres, il était nécessaire d'enquêter sur l'état endogène des enzymes antioxydantes telles que la catalase, la superoxyde dismutase et les glutathions, qui sont la première ligne de défense contre les dommages des radicaux libres dans les conditions oxydatives. Dans notre étude, l'administration de la scopolamine à la dose (1 mg/kg) a induit une diminution marquée de l'activité de la catalase, la superoxyde dismutase, et le niveau du glutathion réduit. Dans les conditions de stress oxydatif, la SOD constitue la première ligne de défense contre l'anion superoxyde qu'il convertit en H₂O₂ et O₂ (Fridovick, 1975). Par la

suite, la CAT et le GSH assurent la détoxification du radical H_2O_2 , en le convertissant en H_2O . De même, le malondialdéhyde (MDA) généré au cours de la peroxydation lipidique est un composé organique qui constitue un biomarqueur du stress oxydatif (Tsikas, 2017). Des études effectuées montrent que la scopolamine induit le déclin cognitif suite à une élévation importante du taux de MDA chez les rats (Ajami *et al.*, 2012 ; Hancianu *et al.*, 2013 ; Mostafa *et al.*, 2016 ; Qu *et al.*, 2017, Aykac *et al.*, 2019). L'extrait des feuilles de *Butea frondosa* à 400 mg/kg réduit les déficits mnésiques induits par la scopolamine chez les rats (Malik *et al.*, 2013). Cet extrait à la même dose réduit l'activité de l'acétylcholine estérase, inhibe la production du MDA et stimule la production de glutathion réduit (GSH) (Malik *et al.*, 2013). L'extrait hydroalcoolique d'*Echium amoenum* à 100 mg/kg réduit la production de MDA (Rabiei et Setorki, 2018). Dans notre étude, il a été noté une réduction importante de l'activité de la SOD et la CAT, ainsi que le taux de GSH chez les rats traités avec la scopolamine (1 mg/kg). Par contre, le traitement avec l'extrait de KG active ces enzymes et relève le taux de GSH. D'autres études rapportent que le traitement des rats par la scopolamine à 1,5 mg/kg réduit l'activité de la SOD, la GSH-Px, la catalase et la libération de GSH (Demirci *et al.*, 2017 ; Yadav *et al.*, 2019). Les éléments du système de défense antioxydant intracellulaire comme la SOD, la CAT et le GSH jouent un rôle important dans le contrôle de l'équilibre de la balance entre la production et l'élimination des EOR (Kim *et al.*, 2018). Des études antérieures ont montré que l'extrait de KG possède des propriétés antioxydantes. En effet, cet extrait au niveau du foie est capable d'activer le facteur Nrf2 (*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) (Njayou *et al.*, 2015), reconnu comme activateur du système de défense endogène et la production des enzymes antioxydantes (Kim et Keum, 2016). Le même effet pourrait être retrouvé au niveau du cerveau.

L'acétylcholine (Ach) libéré dans la fente synaptique est dégradée par une enzyme, l'acétylcholinestérase (AChE). Afin de limiter la diminution de la concentration d'acétylcholine au niveau cérébral et donc d'améliorer les fonctions cérébrales chez des personnes atteintes de la MA, la stratégie thérapeutique consiste à bloquer l'action de cette enzyme (Tang *et al.*, 2019). L'Ach est un neurotransmetteur important pour la mémoire et l'apprentissage. Au niveau du système nerveux central (SNC), la baisse du niveau de l'Ach est responsable des déficits de mémoire dans les maladies dégénératives. Cependant, une activité élevée de l'AChE réduit le niveau de l'Ach comme observé chez les patients atteints de la MA (Lewis *et al.*, 1967). Le traitement de la MA est focalisé sur l'inhibition de l'activité de l'AChE. Les inhibiteurs de l'AChE que sont le donépézil, la galantamine, la tacrine peuvent

atténués les déficits de mémoire en inhibant la destruction de l'Ach (Weon *et al.*, 2016). L'Ach possède deux types de récepteurs que sont les récepteurs nicotiniques et muscariniques. La scopolamine stimule l'activité de l'acétylcholine estérase et inhibe l'activité de l'acétylcholine transférase (Eun *et al.*, 2017). Elle inhibe la transmission cholinergique de l'Ach en bloquant les récepteurs muscariniques (Weon *et al.*, 2014), causant des troubles de mémoire par augmentation de l'activité de l'AchE ; c'est la raison pour laquelle l'effet sur l'inhibition de l'AchE par l'extrait de KG a été investigué. Les résultats obtenus montrent que cet extrait améliore les déficits de mémoire induit par la scopolamine en boostant l'activité cholinergique à travers l'inhibition de l'activité de l'AchE. En effet, l'extrait a démontré une activité puissante contre l'AchE dont l'activité est l'une des caractéristiques de la pathologie de la MA. Cette enzyme est responsable de la plupart des symptômes de la maladie notamment le déclin de la mémoire et les fonctions cognitives (Jahn, 2013). Les travaux de Foyet et collaborateurs montrent que les extraits des feuilles de *Ziziphus mucronata* et des écorces de *Vitellaria paradoxa* possèdent des activités antiacétylcholine estérase et antioxydante chez les rats intoxiqués à la scopolamine (Foyet *et al.*, 2016, 2019). De plus, l'extrait de *Phyllanthus acidus* atténue significativement les déficits cognitifs et le stress oxydatif induit par la scopolamine en boostant la mémoire et l'apprentissage, le potentiel antioxydant et en exerçant une activité anti acétylcholine estérase (Uddin *et al.*, 2016).

Les phosphatases catalysent l'hydrolyse des groupements phosphates. Elles interviennent dans la régulation de divers processus fondamentaux tels que l'attachement cellulaire, la prolifération, la différenciation et l'apoptose. Ces enzymes sont présentes dans les espaces extracellulaires mais aussi dans les compartiments intracellulaires spécialisés notamment le cerveau. Elles contribuent à la neurotoxicité extracellulaire de la protéine tau et à la progression de la maladie (Vardy *et al.*, 2012). Les isoenzymes retrouvées au niveau du cerveau sont les phosphatases alcalines tissulaires non spécifiques et ont été identifiées comme l'une des enzymes impliquées dans la déphosphorylation de la protéine tau (Sebastián-Serrano *et al.*, 2015). Les monomères extracellulaires de la protéine tau jouent un rôle critique dans la mort neuronale durant la MA car contribuent à la formation des agrégats intracellulaires. Cependant, les formes déphosphorylées de la protéine tau sont très toxiques. Ces formes déphosphorylées sont des agonistes des récepteurs muscariniques M1 et M3 (Vardy *et al.*, 2012). Une fois qu'elles sont produites dans le milieu extracellulaire, elles peuvent entraîner un efflux de calcium au niveau des récepteurs de la cellule qui résulte plus

tard à la mort de celle-ci. Ces formes déphosphorylées de la protéine tau sont issues des formes hyperphosphorylées après action des phosphatases alcalines (Pooler et Hanger, 2010). Ces enzymes sont présentes à la surface des cellules mais aussi dans le sang (Moss, 1999). Les résultats de notre étude montrent que la scopolamine favorise une hyperactivité des phosphatases. L'activité des phosphatases contrebalancent l'activité des kinases impliquées dans l'hyperphosphorylation de la protéine tau (Braithwaite *et al.*, 2012). Des travaux effectués sur les extraits de plante montrent leur potentiel à réguler l'activité des phosphatases (Moon *et al.*, 2020).

Les amyloïdoses sont caractérisées par un dépôt d'agrégats fibrillaires qui affectent les tissus. On note un réarrangement de la structure de ces feuillettes β des protéines natives en fibrilles suivant un axe perpendiculaire. La coloration au rouge Congo met en évidence cette fibrillation (Save et Choudhary, 2017). Les agrégats d'oligomères du peptide A β et de la protéine tau ou leurs protofibrilles sont considérés comme des précurseurs de la fibrillation observée dans la MA (Thakur *et al.*, 2011) et de sa progression. L'accumulation de l'A β dans le cerveau est un indicateur du début de la MA (Rodrigue *et al.*, 2012). On note que l'administration de la scopolamine induit une accumulation d'A β chez les rongeurs. Bihagi et coll ont montré que le traitement quotidien des rats à la scopolamine (2 mg/kg) pendant 4 semaines conduit à une augmentation des formes A β_{1-40} et A β_{1-42} dans le cortex cérébral de ces rats (Bihagi *et al.*, 2012). Aussi, Choi et coll ont trouvé que l'injection intrapéritonéale de la scopolamine (1 mg/kg) augmente la production de l'A β dans le cortex et l'hippocampe des souris (Choi *et al.*, 2012). Les travaux de Gorgani *et al.* (2019) ont démontré que le traitement des rats Wistar avec la scopolamine (3 mg/kg) provoque une augmentation de la densité des plaques d'A β au niveau de l'hippocampe. Or, la prévention de cette fibrillation constituerait une stratégie thérapeutique contre la MA (Lashuel *et al.*, 2002). La fibrillogénèse s'accompagne de changements couplés des structures secondaire et quaternaire de la protéine. Ces changements consistent en une transconformation de la structure secondaire principalement en hélice au voisinage des membranes ou non structurée en milieu aqueux vers une structure en feuillettes β , couplée à une oligomérisation (Barrow, 1992). L'extrait de KG inhibe la fibrillation. Des composés isolés des plantes médicinales inhibent la fibrillation. Les résultats des travaux de Cornejo *et al.* (2017) ont montré que l'acide rosmarinique isolé de *Rosmarinus officinalis* inhibe la fibrillation des feuillettes β de la protéine tau. De même, les polyphénols empêchent l'oligomérisation des peptides amyloïdes en interagissant avec les monomères ou les oligomères. La formation de liaisons hydrogène entre certaines chaînes

latérales des résidus du peptide A β ₄₂ et les polyphénols permet de prévenir la formation d'oligomères et par conséquent d'empêcher leur agrégation (Gaudreault *et al.*, 2021). Des résultats de notre étude, on note que la scopolamine augmente la fibrillation des protéines. Cependant, le traitement avec l'extrait de KG baisse cette fibrillation. Des extraits de plantes ont démontré leur aptitude à inhiber la fibrillation des protéines (Save et Choudhary, 2017).

Les résultats de notre étude démontrent clairement que l'extrait de KG est un candidat potentiel dans le développement d'un médicament contre la MA ainsi que d'autres maladies neurodégénératives.

CONCLUSION GENERALE

Dans notre étude portant sur la recherche de nouvelles alternatives dans le traitement de la maladie d'Alzheimer, nous avons pu montrer durant ce travail que :

- ❖ L'extrait brut et les fractions (KGf1 et KGf2) inhibent la production des EOR et la mort cellulaire par apoptose induit par le peptide $A\beta_{42}$ sur des cellules IMR32. Cet extrait de KG est riche en polyphénols, flavonoïdes, alcaloïdes, saponines, triterpènes et tanins.
- ❖ L'extrait brut et la fraction plus active (KGf2) stimulent l'activité de la SOD et des protéines synaptiques (SNAP25 et SYP) ; inhibent l'activité de la caspase-3 et l'hyperphosphorylation de la protéine tau sur les cellules IMR32 traitées avec le peptide $A\beta_{42}$.
- ❖ L'extrait brut de KG réduit considérablement la dépression, l'anxiété et améliore la mémoire des rats intoxiqués avec la scopolamine. Cet extrait stimule l'activité des enzymes antioxydants intracellulaires (SOD et CAT) et augmente le niveau de glutathion réduit. Il inhibe la peroxydation lipidique en réduisant le niveau de MDA. Il inhibe également l'activité de l'acétylcholine estérase et des phosphatases. Il réduit la formation des plaques d'amyloïde et des dégénérescences neurofibrillaires en inhibant la fibrillation. La dose 25 mg/kg est la plus active.

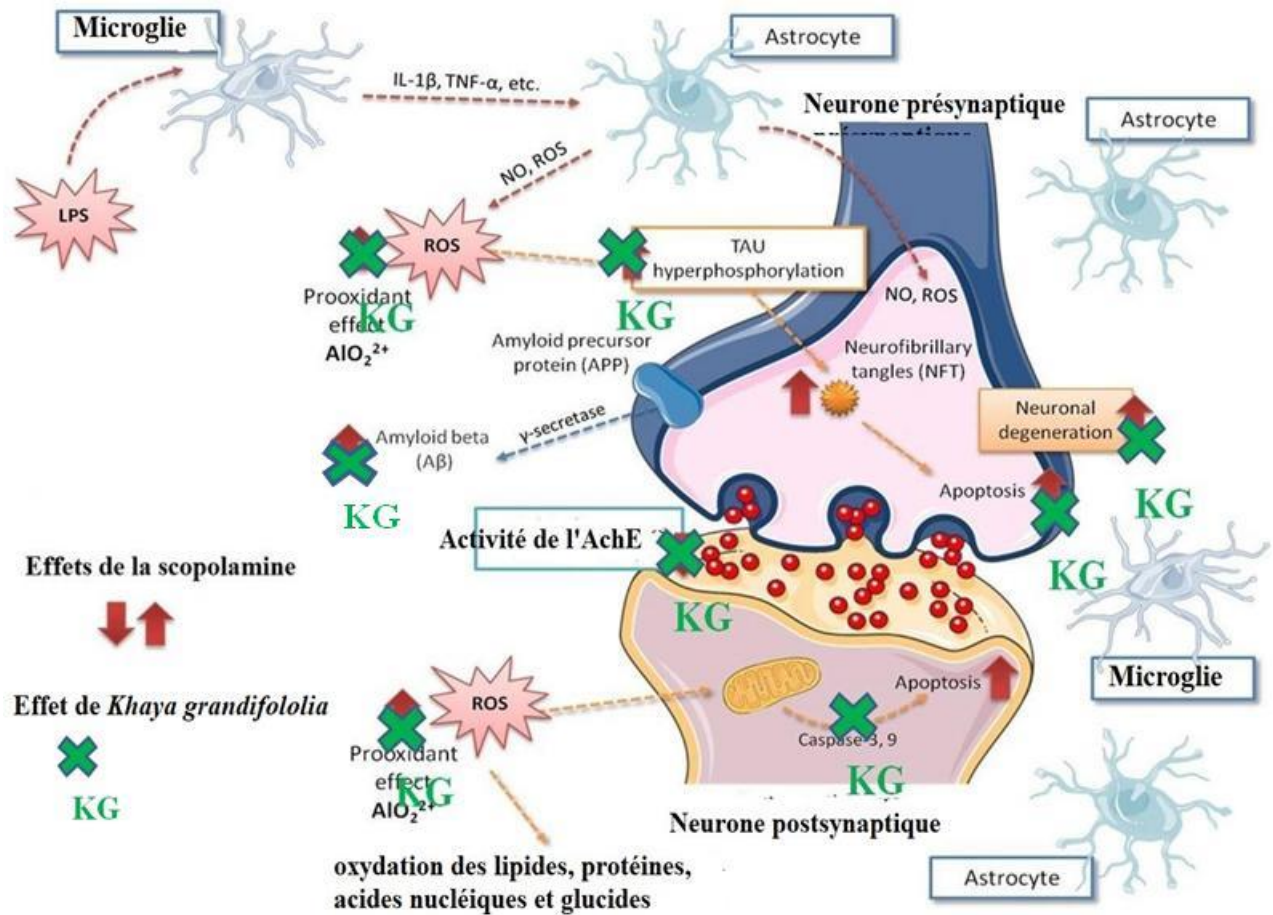
PERSPECTIVES

Dans l'optique de valoriser l'extrait obtenu au cours du travail, nous comptons :

- ❖ Etudier l'effet de l'extrait de KG sur l'activité d'autres kinases (GSK-3 β , CK 1/2...) et sur les autres médiateurs impliqués dans la neurotransmission (glutamate, dopamine, GABA)
- ❖ Etudier la biodisponibilité et la perméabilité de l'extrait au travers de la barrière hémato-encéphalique ;
- ❖ Identifier les composés d'intérêt dans l'extrait de KG et formuler un médicament traditionnellement amélioré.

RESUME GRAPHIQUE

Le schéma ci-après présente de façon générale les effets de l'extrait brut de *Khaya grandifolia* (KG) sur certains paramètres impliqués dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer.



ROS : espèces oxygénées réactives ; KG : *Khaya grandifolia*, NO : oxyde nitrique ; A β : amyloïde bêta ; AchE : acétylcholine estérase ; IL-1 β : interleukine 1 β ; TNF- α : tumor necrosis factor α .

↑ Activation ✕ Inhibition

REFERENCES

REFERENCES

- Aamodt EJ, Williams RC (1984).** Microtubule-associated proteins connect microtubules and neurofilaments in vitro. *Biochem.*, 23(25): 6023-6031.
- Abou-Ghali M, Stiban J (2015).** Regulation of ceramide channel formation and disassembly: Insights on the initiation of apoptosis. *Saudi J. Biol. Sci.*, 22: 760-772.
- Adwan L, Subaiea GM, Basha R, Zawia NH (2015).** Tolfenamic acid reduces Tau and CDK5 Levels: implications for Dementia and Tauopathies. *J. Neurochem.*, 133(2): 266-272.
- Ahmed Z, Doherty KM, Silveira-Moriyama L, Bandopadhyay R, Lashley T, Mamais A, Hondhamuni G, Wray S, Newcombe J, O'Sullivan SS, Wroe S, de Silva R, Holton JL, Lees AJ, Revesz T (2011).** Globular glial tauopathies (GGT) presenting with motor neuron disease or frontotemporal dementia: an emerging group of 4-repeat tauopathies. *Acta Neuropathol.*, 122(4): 415-428.
- Aisen PS, Cummings J, Schneider LS (2012).** Symptomatic and nonamyloid/tau based pharmacologic treatment for Alzheimer disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 2(3): a006395.
- Ajami M, Eghtesadi S, Habibey R, Razaz JM, Peyrovi H, Zarrindast M, Pazoki-Toroudi H (2012).** Effect of short and long-term treatment with omega-3 fatty acids on scopolamine-induced amnesia. *Iran J. Pharm. Res.*, 11: 533-540.
- Akhondzadeh S, Noroozian M, Mohammadi M, Ohadinia S, Jamshidi AH, Khani M (2003).** Melissa officinalis extract in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a double blind, randomised, placebo controlled trial. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 74: 863-866.
- Alena L, Mingming Z, Nathalie C, Mark S, Ansoerge JA, Jasmine H, Maria B, Josko L, Mark D (2003).** Altered depression-related behaviors and functional changes in the dorsal raphe nucleus of serotonin transporter-deficient mice. *Biol. Psychiatry*, 54: 960-971.
- Alexander GC, Knopman DS, Emerson SS (2021).** Revisiting FDA approval of aducanumab. *N. Engl. J. Med.*, 385:769-771.
- Ali T, Yoon GH, Shah SA, Lee HY, Kim MO (2015).** Osmotin attenuates amyloid beta induced memory impairment, tau phosphorylation and neurodegeneration in the mouse hippocampus. *Sci. Rep.*, 5:11708.

- Alonso AC, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1996).** Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules. *Nat. Med.*, 2(7): 783-787.
- Alzheimer's Association (2020).** Alzheimer's disease facts and figures. Chicago, IL: Alzheimers Dementia.
- Alzheimer's Disease International (2018).** Démences en Africa sub-Saharienne: défis et opportunités. 11pages. <https://www.alz.co.uk/africa>.
- Andrade S, Ramalho MJ, Loureiro JA, Pereira MDC (2019).** Natural compounds for Alzheimer's disease therapy: a systematic review of preclinical and clinical studies. *Int. J. Mol. Sci.*, 20, 2313.
- Arbel M, Yacoby I, Solomom B (2005).** Inhibition of amyloid precursor protein processing by – secretase through site –directed antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 102(21): 7718-7723.
- Arendt T, Stieler JT, Holzer M (2016).** Tau and tauopathies. *Brain Res. Bull.*, 126: 238-292.
- Arshavsky YI (2014).** Alzheimer disease and cellular mechanisms of memory storage. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 73(3): 192-205.
- Aykac A, Ozbeyli D, Uncu M, Büsra Ertas B, Kilinc O, Sen A, Orun O, Sener G (2019).** Evaluation of the protective effect of *Myrtus communis* in scopolamine-induced Alzheimer model through cholinergic receptors. *Gene*, 689: 194-201.
- Bae D, Seol H, Yoon HG, Na JR, Oh K, Choi CY, Lee D-W, Jun W, Lee KY, Lee J, Hwang K, Lee Y-H, Kim S (2012).** Inhaled essential oil from *Chamaecyparis obtusa* ameliorates the impairments of cognitive function induced by injection of β -amyloid in rats. *Pharm Biol.*, 50: 900-910.
- Bales KR, Verina T, Dodel RC, Du Y, Altstiel L, Bender M, Hyslop P, Johnstone EM, Little SP, Cummins DJ, Piccardo P, Ghetti B, Paul SM (1997).** Lack of apolipoprotein E dramatically reduces amyloid beta-peptide deposition. *Nat. Genet.*, 17(3): 263-264.
- Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones E (2011).** Alzheimer's disease. *Lancet*, 377(9770): 1019-1031.
- Ballatore C, Lee VMY, Trojanowski JQ (2007).** Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat. Rev. Neurosci.*, 8: 663-672.
- Baptista FI, Henriques AG, Silva AMS, Wiltfang J, da Cruz e Silva, O.A.B. (2014).** Flavonoids as therapeutic compounds targeting key proteins involved in Alzheimer's disease. *ACS Chem. Neurosci.*, 5, 83-92.

- Barbee JG (1998).** Mixed symptoms and syndromes of anxiety and depression: diagnostic, prognostic, and etiologic issues. *Ann. Clin. Psychiatry*, 10:15–29.
- Barrow CJ, Yasuda A, Kenny PT, Zagorski MG (1992).** Solution conformations and aggregational properties of synthetic amyloid beta-peptides of Alzheimer's disease. Analysis of circular dichroism spectra. *J. Mol. Biol.*, 225: 1075-1093.
- Bazzari AH, Bazzari FH (2018).** Medicinal plants for Alzheimer's disease: An updated review. *J. Med. Plants Studies*, 6(2): 81-85.
- Behl C. (1997).** Amyloid β -protein toxicity and oxidative stress in Alzheimer's disease. *Cell Tissue Res.*, 290: 471-480.
- Belviranli M, Okudan N (2015).** The effects of Ginkgo biloba extract on cognitive functions in aged female rats: The role of oxidative stress and brain-derived neurotrophic factor. *Behav. Brain Res.*, 278: 453-461.
- Bemiller SM, McCray TJ, Allan K, Formica SV, Xu G, Wilson G (2017).** TREM2 deficiency exacerbates tau pathology through dysregulated kinase signaling in a mouse model of tauopathy. *Mol. Neurodegener.*, 12:74.
- Benilova I, Karran E, De Strooper B (2012).** The toxic A β oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. *Nat. Neurosci.*, 15(3): 349-357.
- Berger Z, Roder H, Hanna A, Carlson A, Rangachari V, Yue, M, Wszolek Z, Ashe K, Knight J, Dickson D (2007).** Accumulation of pathological tau species and memory loss in a conditional model of tauopathy. *J. Neurosci.*, 27(14): 3650-3662.
- Berriman J, Serpell LC, Oberg KA, Fink AL, Goedert M, Crowther RA (2003).** Tau filaments from human brain and from in vitro assembly of recombinant protein show cross- β structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100(15): 9034-9038.
- Berthelot K, Cullin C, Lecomte S (2013).** What does make an amyloid toxic: morphology, structure or interaction with membrane? *Biochimie*, 95(1): 12-19.
- Bertram L, Lill C, Tanzi R (2010).** The genetics of Alzheimer disease: back to the future. *Neuron*, 68(2): 270-281.
- Bhanumathy M, Harish MS, Shivaprasad HN, Sushma G (2010).** Nootropic activity of *Celastrus paniculatus* seed. *Pharm. Biol.*, 48(3): 324-327.
- Bhola PD, Letai A. (2016).** Mitochondria-judges and executioners of cell death sentences. *Mol. cell*, 61: 695-704.
- Biancalana M, Koide S (2010).** Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochim. Biophys. Acta*, 1804(7): 1405-1412.

- Bickii J, Njifutie N, Foyere JA, Basco LK, Ringwald P (2000).** In vitro antimalarial activity of limonoids from *Khaya grandifoliola* C.D.C. (Meliaceae). *J. Ethnopharmacol.*, 69: 27-33.
- Bihaqi SW, Singh AP, Tiwari M (2012).** Supplementation of *Convolvulus pluricaulis* attenuates scopolamine-induced increased tau and amyloid precursor protein (A β PP) expression in rat brain. *Ind. J. Pharmacol.*, 44: 593-598.
- Bisht K, Sharma K, Tremblay M-E (2018).** Chronic stress as a risk factor for Alzheimer's disease: Roles of microglia-mediated synaptic remodeling, inflammation, and oxidative stress. *Neurobiol. Stress*, 9: 9-21.
- Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H (2006).** Alzheimer's disease. *Lancet*, 368 (9533), 387403.
- Bliss TVP, Collingridge GL, Morris RG (2014).** Synaptic plasticity in health and disease: introduction and overview. *Philos. Trans. R Soc Lond B Biol Sci.*, 369(1633):20130129.
- Bonda DJ, Bajic VP, Spremo-Potparevic B, Casadesus G, Zhu X, Smith MA, Lee HG (2010).** Review: Cell cycle aberrations and neurodegeneration. *Neuropathol. Applied Neurobiol.*, 36: 157-163.
- Borlikova GG, Trejo M, Mably AJ, Mc Donald JM, Frigerio CS, Regan CM, Murphy KJ, Masliah E, Walsh DM (2013).** Alzheimer brain-derived amyloid β -protein impairs synaptic remodeling and memory consolidation. *Neurobiol. Aging*, 34(5): 1315-1327.
- Bourdenx M, Koulakiotis NS, Sanoudou D, Bezard E, Dehay B, Tsarbopoulos A (2017).** *Progress Neurobiol.*, 155: 171-193.
- Braak H, Braak E (1991).** Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.*, 82(4): 239-259.
- Braithwaite SP, Stock JB, Lombroso PJ, Nairn AC (2012).** Protein phosphatases and Alzheimer's disease. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, 106: 343-379.
- Bramblett GT, Goedert M, Jakes R, Merrick SE, Trojanowski JQ, Lee VM (1993).** Abnormal tau phosphorylation at Ser396 in Alzheimer's disease recapitulates development and contributes to reduced microtubule binding. *Neuron*, 10(6): 1089-1099.
- Breijyeh Z, Karaman R (2020).** Comprehensive Review on Alzheimer's disease: Causes and Treatment. *Molecules*, 25, 5789.
- Brown DA (2019).** Acetylcholine and cholinergic receptors. *Brain Neurosc. Adv.*, 3: 1-10.
- Brunello CA, Merezhko M, Uronen R-L, Huttunen HJ (2020).** Mechanisms of secretion and spreading of pathological tau protein. *Cell. Mol. Life Sci.*, 77:1721-1744.

- Buée L, Bussiere T, Buee-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR (2000).** Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res. Rev.* 33(1): 95-130.
- Bulic B, Pickhardt M, Mandelkow EM, Mandelkow E (2010).** Tau protein and tau aggregation inhibitors. *Neuropharmacol.*, 59(4-5): 276-289.
- Burnouf S, Martire A, Derisbourg M, Laurent C, Belarbi K, Leboucher A, Fernandez-Gomez F-J, Troquier L, Eddarkaoui S, Grosjean M-E, Demeyer D, Muhr-Tailleux A, Buisson A, Sergeant N, Hamdane M, Humez S, Popoli P, Buée L, Blum D (2013).** NMDA receptor dysfunction contributes to impaired BDNF-induced facilitation of hippocampal synaptic transmission in a Tau transgenic model. *Aging Cell*, 12(1): 11-23.
- Butterfield DA, Di Domenico F, Barone E (2014).** Elevated risk of type 2 diabetes for development of Alzheimer disease: A key role for oxidative stress in brain. *Biochim. Biophys. Acta*, 1842: 1693-1706.
- Campello S, Scorrano (2010).** Mitochondrial shape changes: orchestrating cell pathophysiology. *EMBO Rep.*, 11: 678-684.
- Can A, Dao DT, Terrillion CE, Piantadosi SC, Bhat S, Gould TD (2012).** The Tail Suspension Test. *J. Vis. Exp.*, (59), e3769 10.3791/3769.
- Can MV, Tran AH, Pham DM, Dinh BQ, Le QV, Nguyen BV, Nguyen MTT, Nguyen HX, Nguyen NT, Nishijo H (2018).** *Willughbeia cochinchinensis* prevents scopolamine-induced deficits in memory, spatial learning, and object recognition in rodents. *J. Ethnopharm.*, 214: 99-105.
- Candé C, Cohen I, Daugas E, Ravagnan L, Larochette N, Zamzami N, Kroemer G (2002).** Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria. *Biochimie*, 84: 215-222.
- Cao F, Wang Y, Peng B, Zhang X, Zhang D, Xu L (2018).** Effects of celastrol on Tau hyperphosphorylation and expression of HSF-1 and HSP70 in SH-SY5Y neuroblastoma cells induced by amyloid- β peptides. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 65(3): 390-396.
- Carlson SW, Branden M, Voss K, Sun Q, Rankin CA, Gamblin TC (2007).** A complex mechanism for inducer mediated tau polymerization. *Biochem.*, 46(30): 8838-8849.
- Caruso G, Spampinato SF, Cardaci V, Caraci F, Sortino MA, Merlo S (2019).** β -amyloid and oxidative stress: perspectives in drug development. *Curr. Pharm. Des.*, 25(45): 4771-4781.
- Caselli RJ, Beach TG, Knopman DS, Graff-Radford NR (2017).** Alzheimer disease: scientific breakthroughs and translational challenges. *Mayo Clin. Proc.*, 92(6): 978-994.

- Castellani RJ, Rolston RK, Smith MA (2010).** Alzheimer Disease. *Disease a-month*, 56(9): 484-546.
- Cehlar O, Skrabana R, Revajova V, Novak M (2018).** Structural aspects of Alzheimer's disease immunotherapy targeted against amyloid-beta peptide. *Bratisl Lek Listy*, 119: 201-204.
- Celay J, Blanco I, Lázcoz P, Rotinen M, Castresana JS, Encío I (2013).** Changes in gene expression profile of apoptotic genes in neuroblastoma cell lines upon retinoic acid treatment. *Plos one* 8(5): e62771.
- Chaudhari KS, Tiwari NR, Tiwari RR, Sharma RS (2017).** Neurocognitive effect of nootropic drug Brahmi (*Bacopa monnieri*) in Alzheimer's disease. *Ann. Neurosci.*, 24: 111-122.
- Chaudhari N, Talwar P, Lefebvre D'hellencourt C, Ravanan P (2017).** CDDO and ATRA instigate differentiation of IMR32 human neuroblastoma cells. *Front.Mol. Neurosci.*, 10:310.
- Chauhan NB (2006).** Effect of aged garlic extract on APP processing and tau phosphorylation in Alzheimer's transgenic model Tg2576. *J. Ethnopharmacol.*, 108: 385-394.
- Cheignon C, Tomas M, Bonnefont-Rousselot D, Faller P, Hureau C, Collin F (2018).** Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer disease. *Redox. Biol.*, 14: 450-464.
- Chen I-C, Chang K-H, Lin T-H, Hsieh Y-H, Lee M-C, Chao C-Y, Lee-Chen, Yih- G-J Ru Wu, Chen C-M (2018).** Formulated Chinese medicine Shaoyao ganciao tang reduces tau aggregation and exerts neuroprotection through anti-oxidation and anti-inflammation. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2018, 9595741.
- Chen G, Xu T, Yan Y, Zhou Y, Jiang Y, Melcher K, Xu HE (2017).** Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacol. Sinica*, 38: 1205-1235.
- Chen J-H, Lin K-P, Chen Y-C (2009).** Risk factors for dementia. *J. Formosan Med. Ass.*, 108(10): 754-764.
- Chen S, Synowsky S, Tinti M, MacKintosh C (2011).** The capture of phosphoproteins by 14-3-3 proteins mediates actions of insulin. *Trends Endocrinol.Metabolism*, 22(11): 429-436.
- Chen Y, Chen X, Yao Z, Shi Y, Xiong J, Zhou J, Su Z, Huang Y (2019).** 14-3-3/Tau Interaction and Tau Amyloidogenesis. *J. Mol. Neurosci.*, 68: 620-630.

- Chethana KR, Senol FS, Erdogan Orhan IE, Anilakumar KR, Keri RS (2017).** Cassia tora Linn.: A boon to Alzheimer's disease for its anti-amyloidogenic and cholinergic activities, *Phytomedicine*, 15(33): 43-52.
- Chirita CN, Necula M, Kuret J (2003).** Anionic micelles and vesicles induce tau fibrillization in vitro. *J. Biol. Chem.*, 278: 25644-25650.
- Choi DJ, Cho S, Seo JY, Lee HB, Park YI (2016).** Neuroprotective effects of the Phellinus linteus ethyl acetate extract against H₂O₂-induced apoptotic cell death of SK-N-MC cells. *Nutr. Res.*, 36: 31-43.
- Choi DY, Lee Y-J, Lee SY, Lee YM, Lee HH, Choi IS, Oh K-W, Han SB, Nam S-Y, Hong JT (2012).** Attenuation of scopolamine-induced cognitive dysfunction by obovatol. *Arch. Pharm. Res.*, 35: 1279-1286.
- Chougale S, Kumar D, Khan A, Zehra S, Ali A (2021).** Treatment of Alzheimer's disease by natural products. *J. Exp. Clin. Med.*, 38: 634-644.
- Clarac F (2015).** Les modèles animaux et leurs limites. *Histoire de la recherche contemporaine* 4(1): 15-22.
- Clementi ME, Tringali G, Triggiani D, Giardina B (2015).** *Aloe arborescens* extract protects IMR-32 cells against Alzheimer amyloid beta peptide via inhibition of radical peroxide production. *Nat. Prod. Commun.*, 10(11): 1993-1995.
- Cleveland DW, Hwo SY, Kirschner MW (1977).** Purification of tau, a microtubule associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J. Mol. Biol.*, 116(2): 207-225.
- Cline EN, Bicca MA, Viola KL, Klein WL (2018).** The amyloid- β oligomer hypothesis: beginning of the third decade. *J. Alzheimer's Dis.*, 64: 567-610.
- Coman H, Nemeş B (2017).** New therapeutic targets in Alzheimer's disease. *Int. J. Gerontol.*, 11: 2-6.
- Cong W, Sheng L, Li Y, Li P, Lin C, Liu J (2011).** Protective effects of ginseng-ginkgo extracts combination on rat primary cultured neurons induced by A β (1-40). *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 36: 908-911.
- Cornejo A, Sandoval FA, Caballero L, Machuca L, Muñoz P, Caballero J, Perry G, Ardiles A, Areche C, Melo F (2017).** Rosmarinic acid prevents fibrillization and diminishes vibrational modes associated to β sheet in tau protein linked to Alzheimer's disease. *J. Enzyme Inh. Med. Chem.*, 32(1): 945-953.

- Couchie D, Mavilia C, Georgieff IS, Liem RK, Shelanski ML, Nunez J (1992).** Primary structure of high molecular weight tau present in the peripheral nervous system. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 89(10): 4378-4381.
- Cummings J, Blennow K, Johnson K, Keeley M, Bateman RJ, Molinuevo JL, Touchon J, Vellas B, the EU/US/CTAD Task Force (2019).** Anti-Tau Trials for Alzheimer's disease: A Report from the EU/US/CTAD Task Force. *J. Prev. Alz. Dis.*, 3(6):157-163.
- Cummings J, Lee G, Ritter A, Zhong K, Fonseca J, Taghva (2021).** Alzheimer's disease drug development pipeline: 2021. *Alzheimer's & Dementia: Alzheimer's Dement.*, 7:e12179.
- Cummings J, Vinters HV, Cole GM, Khachaturian ZS (1998).** Alzheimer's disease: etiologies, pathophysiology, cognitive reserve, and treatment opportunities. *Neurol.*, 51(1 suppl 1): S2-17.
- D'Errico P, Meyer-Luehmann M (2020).** Mechanisms of pathogenic Tau and A β protein spreading in Alzheimer disease. *Front. Aging Neurosci.*, 12:265.
- Dalvi A (2012).** Alzheimer's disease. *Dm Disease-a-month*, 58(12): 666-677.
- Daneshmand P, Saliminejad K, Shasaltaneh MD, Riazi GH, Nazari R, Azimzadeh P, Kamali K, Khorshid HRK (2016).** Neuroprotective Effects of Herbal Extract (*Rosa canina*, *Tanacetum vulgare* and *Urtica dioica*) on Rat Model of Sporadic Alzheimer's disease. *Avicenna J. Med. Biotech.*, 8(3): 120-125.
- Davinelli S, Sapere N, Zella D, Bracale R, Intrieri M, Scapagnini G (2012).** Pleiotropic protective effects of phytochemicals in Alzheimer's disease. *Oxid. Med. Cell Longev.*, 2012:386527.
- De Calignon A, Spires-Jones TL, Hyman BT (2010).** Activation de caspases et formation de dégénérescences neurofibrillaires dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer. *médecine/sciences*, 26(10): 787-816.
- de Dios C, Bartolessis I, Roca-Agujetas V, Barbero-Camps E, Mari M, Morales A, Colell A (2019).** Oxidative inactivation of amyloid beta-degrading proteases by cholesterol-enhanced mitochondrial stress. *Redox Biol.*, 26, 101283.
- De Strooper B, Annaert W (2000).** Proteolytic processing and cell biology functions of the amyloid precursor protein. *J. Cell Sci.*, 113(11): 1857-1870.
- Del Rio D, Costa L, Lean M, Crozier A (2010).** Polyphenols and health: What compounds are involved? *Nutr. Metabol. Cardiovasc. Dis.*, 20: 1-6.

- Delobel P, Flament S, Hamdane M, Mailliot C, Sambo A-V, Bégard S, Sergeant N, Delacourte A, Vilain J-P, Buée L (2002).** Abnormal tau phosphorylation of the Alzheimer-type also occurs during mitosis. *J. Neurochem.*, 83(2): 412-420.
- Demirci K, Naziroglu M, Ovey IS, Balaban H (2017).** Selenium attenuates apoptosis, inflammation and oxidative stress in the blood and brain of aged rats with scopolamine-induced dementia. *Metab. Brain Dis.*, 323: 21-329.
- Demuro A, Parker I (2005).** Optical single-channel recording: imaging Ca²⁺ flux through individual ion channels with high temporal and spatial resolution. *J. Biomed. Opt.*, 10, 11002.
- Dey A, Bhattacharya R, Mukherjee A, Pandey DK (2017).** Natural products against Alzheimer's disease: Pharmacotherapeutics and biotechnological interventions. *Biotechnol. Adv.*, 35(2): 178-216.
- Dhar P, Tayade AB, Sauray SK, Chaurasia OP, Ravi B, Srivastava, Singhshashi B (2012).** Antioxidant capacities and phytochemical composition of *Hippophae hamnoides* L. leaves methanol and aqueous extracts from trans-Himalaya. *J. Med. Plants Res.*, 6(47): 5780-5788.
- Dickey CA, Kamal A, Lundgren K, Klosak N, Bailey RM, Dunmore J, Ash P, Shoraka S, Zlatkovic J, Eckman CB, Patterson C, Dickson DW, Nahman Jr NS, Hutton M, Burrows F, Petrucelli (2007).** The high-affinity HSP90-CHIP complex recognizes and selectively degrades phosphorylated tau client proteins. *J. Clin. Invest.*, 117(3): 648-658.
- Dickson DW (1997).** The Pathogenesis of Senile Plaques. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 56(4): 321-339.
- Dinda B, Dinda M, Kulsi G, Chakraborty A, Dinda S (2019).** Therapeutic potentials of plant iridoids in Alzheimer's and Parkinson's diseases: A review. *Eur. J. Med. Chem.*, 169: 185-199.
- Doraiswamy PM, Leon J, Cummings JL, Marin D, Neumann (2002).** Prevalence and impact of medical comorbidity in Alzheimer's disease. *J. Gerontol. A Biol. Med. Sci.*, 57(3): 173-177.
- Dore S, Bastianetto S, Kar S, Quirion R (1999).** Protective and rescuing abilities of IGF-1 and some putative free radical scavengers against beta-amyloid-induced toxicity in neurons. *Ann. NY Acad. Sci.*, 890: 356-364.
- Dreses-Werringloer U, Lambert JC, Vingtdeux V, Zhao H, Vais H, Siebert A, Jain A, Koppel J, Rovelet-Lecrux A, Hannequin D, Pasquier F, Galimberti D, Scarpini E, Mann D, Lendon C, Campion D, Amouyel P, Davies P, Fosskett JK, Campagne F, Marambaud P (2008).** A polymorphism in CALHM1 influences Ca²⁺ homeostasis, Aβ levels, and Alzheimer's disease risk. *Cell*, 133(7): 1149-1161.

- Drewes G, Trinczek B, Illenberger S, Biernat J, Schmitt-Ulms G, Meyer HE, Mandelkow EM, Mandelkow E (1995).** Microtubule-associated protein/microtubule affinity-regulating kinase (p110mark). A novel protein kinase that regulates taumicrotubule interactions and dynamic instability by phosphorylation at the Alzheimer specific site serine 262. *J. Biol Chem.*, 270(13): 7679-7688.
- Dringen R (2000).** Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progr. Neurobiol.*, 62: 649–671.
- Duboff B, Götz J, Feany MB (2012).** Tau promotes neurodegeneration via DRP1 mislocalization in vivo. *Neuron*, 75(4): 618-632.
- Dunn B, Stein P, Temple R, Cavazzoni P (2021).** Approval of aducanumab for Alzheimer disease- the FDA's perspective. *N. Engl. J. Med.*, 385(9): 856-857.
- 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. *J. Ethnopharmacol.*, 160: 194-201.
- Ebrahimzadeh MA, Nabavi SM, Nabavi SF (2013).** Antidepressant activity of Hibiscus esculentus L. *Eur. Rev. Medical Pharmacol. Sci.*, 17: 2609-2612.
- Eckert A, Nisbet R, Grimm A, Götz J (2014).** March separate, strike together – role of phosphorylated tau in mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta*, 1842(8): 1258-1266.
- Eckman CB, Nitin D, Crook R, Perez-tur J, Prihar G, Pfeiffer E, Graff-Radford N, Hinder P, Yager D, Zenk B, Refolo LM, Prada CM, Younkin SG, Hutton M, Hardy J (1997).** A new pathogenic mutation in the APP gene (I716V) increases the relative proportion of A β 42(43). *Hum. Mol. Genet.*, 6(12): 2087-2089.
- El Kadmiri N, Hamzi K, El Moutawakil B, Slassi I, Nadifi S (2013).** Les aspects génétiques de la maladie d'Alzheimer. *Pathologie Biologie*, 61: 228-238.
- Elezgarai SR, Biasini E (2016).** Common therapeutic strategies for prion and Alzheimer's diseases. *Biol. Chem.*, 397: 1115-1124.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Feather-Stone RM (1961).** A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 7: 88-95.
- Elufioye T, Oladele A, Olutayo C, Agbedahunsi J, Adesanya S (2012).** Ethnomedicinal study and screening of plants used for memory enhancement and antiaging in Sagamu, Nigeria. *Europ. J. Med. Plants*, 2: 262-275.

- Engelborghs S, Gilles C, Ivanoiu, Vandewoude M (2014).** Rationale and clinical data supporting nutritional intervention in Alzheimer's disease. *Acta Clin. Belg.*, 69(1): 17-24.
- Esparza TJ, Wildburger NC, Jiang H, Gangoli M, Cairns NJ, Bateman RJ, Brody DL (2016).** Soluble Amyloid- β aggregates from human Alzheimer disease brain. *Sci. Rep.*, 6, 38187.
- Essama MDS, Mezui C, Nkwengoua ZE, Enow-Orock EG, Tan PV, Nyasse B (2016).** Cytoprotective and Antioxidant Properties of the Stem Bark Aqueous extract of *Khaya grandifoliola* (Meliaceae) in Rats. *BJPR*, 9(2): 1-11.
- Eun CS, Lim JS, Lee J, Lee SP, Yang SA (2017).** The protective effect of fermented *Curcuma longa* L. on memory dysfunction in oxidative stress-induced C6 gliomal cells, proinflammatory-activated BV2 microglial cells, and scopolamine-induced amnesia model in mice. *BMC Complement. Altern. Med.*, 17, 367.
- Evrard PA, Ragusi C, Boschi G, Verbeeck RK, Scherrmann JM (1998).** Simultaneous microdialysis in brain and blood of the mouse: extracellular and intracellular brain colchicine disposition. *Brain Res.*, 786(1-2): 122-127.
- Exley C and Esiri MM (2006).** Severe cerebral congophilic angiopathy coincident with increased brain aluminium in a resident of Camelford, Cornwall, UK. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 77: 877-879.
- Fischer W, Victorin K, Bjorklund A, Williams L, Varon S, Gage F (1987).** Amelioration of cholinergic neuron atrophy and spatial memory impairment in aged rats by nerve growth factor. *Nature*, 329:65-68.
- Flavin WP, Bousset L, Green ZC, Chu Y, Skarpathiotis S, Chaney MJ (2017).** Endocytic vesicle rupture is a conserved mechanism of cellular invasion by amyloid proteins. *Acta Neuropathol.*, 134: 629-653.
- Folch J, Ettcheto M, Petrov D, Abad S, Pedros I, Marin M, Olloquequi J, Camins A (2018).** Review of the advances in treatment for Alzheimer disease: strategies for combating β -amyloid protein. *Neurologia*, 33: 47-58.
- Forner S, Baglietto-Vargas D, Martini AC, Trujillo-Estrada L, LaFerla FM (2017).** Synaptic Impairment in Alzheimer's Disease: A Dysregulated Symphony. *Trends Neurosci.*, 40(6):347-357.
- Foyet HS, Cioanca O, Asongalem AE, Hancianu M, Hritcu L, Oben EK (2016).** Effects of the methanolic extract of *Vitellaria paradoxa* stem bark against scopolamine-induced

cognitive dysfunction and oxidative stress in the rat hippocampus. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 36: 1139-1149.

Foyet HS, Wado EK, Abaïssou HHN, Assongalem EA, Eyong OK (2019). Anticholinesterase and antioxidant potential of hydromethanolic extract of *Ziziphus mucronata* (Rhamnaceae) leaves on scopolamine-induced memory and cognitive dysfunctions in mice. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, 2019, 4568401.

Freyssin A, Page G, Fauconneau B, Bilan AR (2018). Natural polyphenols effects on protein aggregates in Alzheimer's and Parkinson's prion-like diseases. *Neural Regen. Res.*, 13(6): 955-961.

Fridovick I (1975). Superoxide dismutase. *Annu. Rev. Biochem.*, 44: 147-159.

Friedhoff P, Schneider A, Mandelkow E-M, Mandelkow E (1998). Rapid assembly of Alzheimer like paired helical filaments from microtubule-associated protein tau monitored by fluorescence in solution. *Biochem.*, 37(28): 10223-10230.

Fulga TA, Elson-Schwab I, Khurana V, Steinhilb ML, Spires TL, Hyman BT, Feany MB (2007). Abnormal bundling and accumulation of F-actin mediates tau-induced neuronal degeneration in vivo. *Nat. Cell Biol.*, 9(2): 139-148.

Galani BRT, Sahuc M-E, Sass G, Njayou FN, Loscher C, Mkounga P, Deloison G, Brodin P, Rouillé Y, Tiegs G, Séron K, Moundipa FP (2016). *Khaya grandifoliola* C.DC: a potential source of active ingredients against hepatitis C virus in vitro. *Arch Virol.*, 161(5): 1169-1181.

Gall FJ (2016). Anatomie et physiologie du système nerveux en général et du cerveau en particulier. Hachette Bnf, Sciences, 210 pages.

Gamblin TC, Chen F, Zambrano A, Abraha A, Lagalwar S, Guillozet AL, Lu M, Fu Y, Garcia-Sierra F, LaPointe N, Miller R, Berry RW, Binder LI, Cryns VL (2003). Caspase cleavage of tau: linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100: 10032-10037.

Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Borthellette P, Blackwell C, Carr T, Clemens J, Donaldson T, Gillespie F, Guido T, Hagopian S, Johnson-Wood K, Khan K, Lee M, Leibowitz P, Lieberburg I, Little S, Masliah E, McConlogue L, Montoya-Zavala M, Mucke L, Paganini L, Penniman E, Power M, Schenk D, Seubert P, Snyder B, Soriano F, Tan H, Vitale J, Wadsworth S, Wolozin B, Zhao, J. (1995). Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F [beta]-amyloid precursor protein. *Nature*, 373 (6514): 523-527.

- Ganguly R, Guha D (2008).** Alteration of brain monoamines & EEG wave pattern in rat model of Alzheimer's disease & protection by *Moringa oleifera*. *Indian J. Med. Res.*, 128(6): 744-751.
- Gaudreault R, Herve V, Van de ven TGM, Mousseau N, Ramassamy C (2021).** Polyphenol-peptide interactions in mitigation of Alzheimer's disease: Role of biosurface induced aggregation. *J. Alzheimer Dis.*, 81(1): 33-55.
- Gawande DY, Goel RK (2015).** Pharmacological validation of in-silico guided novel nootropic potential of *Achyranthes aspera* L. *J. Ethnopharmacol.*, 175: 324-334.
- Ghavami A, Hirst W, Novak TJ (2006).** Selective phosphodiesterase (PDE)-4 inhibitors: a novel approach to treating memory deficits? *Drugs R&D*, 7(2): 63-71.
- Giannakopoulos P, Gold G, Duc M, Michel JP, Hof PR, Bouras C (1999).** Neuroanatomic correlates of visual agnosia in Alzheimer's disease: a clinicopathologic study. *Neurology*, 52(1): 71-77.
- Gibbons GS, Lee VMY, Trojanowski, J.Q. (2019).** Mechanisms of Cell-to-Cell Transmission of Pathological Tau. *JAMA Neurol.*, 76: 101-108.
- Gibson CJ, Davids MS (2015).** Bcl-2 Antagonism to Target the Intrinsic Mitochondrial Pathway of Apoptosis. *Clinical cancer research: Off. J. Am. Ass. Cancer Res.*, 21: 5021-5029.
- Glatz DC, Rujescu D, Tang Y, Berendt FJ, Hartmann AM (2006).** The alternative splicing of Tau exon 10 and its regulatory proteins Clk2 and Tra2-Beta1 changes in sporadic Alzheimer's disease. *J. Neurochem.*, 96:635-644.
- Glenner GG, Wong CW (1984).** Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 120(3): 885-890.
- Goedert M (1996).** Tau protein and the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease. *Ann. NY Acad. Sci.*, 777: 121-131.
- Goedert M, Spillantini MG, Crowther RA (1992).** Cloning of a big tau microtubule associated protein characteristic of the peripheral nervous system. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 89(5): 1983-1987.
- Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Crowther RA (2015).** A brief history of tau. *Clin. Chem.*, 61(11): 1417-1418.

- Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA (1989).** Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron*, 3(4): 519-526.
- Goedert M, Spillantini MG, Potier MC, Ulrich J, Crowther RA (1989).** Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *EMBO J.*, 8: 393-399.
- Goffinet A (1994).** Anatomie clinique du système nerveux central. Editeur PU Namur, ISBN 2-87037-188-8, 302 pages.
- Goldar S, Khaniani MS, Derakhshan SM, Baradaran B (2015).** Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *APJCP*, 16: 2129-2144.
- Goldblith SA, Proctor BE (1950).** Photometric determination of Catalase activity. *J. Biol. Chem.*, 187: 705-709.
- Gorgani S, Jahanshahi M, Elyasi L (2019).** Taurine prevents passive avoidance memory impairment, accumulation of amyloid- β plaques, and neuronal loss in the hippocampus of scopolamine-treated rats. *Neurophysiol.*, 51: 171-179.
- Götz J, Gladbach A, Pennanen L, Eersel JV, Schild A, David D, Ittner LM (2010).** Animal models reveal role for tau phosphorylation in human disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1802: 860-871.
- Graham WV, Bonito-Oliva A, Sakmar TP (2017).** Update on Alzheimer's disease therapy and prevention strategies. *Annu. Rev. Med.*, 68: 413-430.
- Gremer L, Schölzel D, Schenk C, Reinartz E, Labahn J, Ravelli RBG, Tusche M, Lopez-Iglesias C, Hoyer W, Heise H, Willbold D, Schröder (2017).** Fibril structure of amyloid- β (1-42) by cryo-electron microscopy. *Science*, 358(6359): 116-119.
- Grimm A, Eckert A (2017).** Brain aging and neurodegeneration : from a mitochondrial point view. *J. Neurochem.*, 143: 4.
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI (1986).** Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 83(13): 4913-4917.
- Gu L, Guo Z (2013).** Alzheimer's A β 42 and A β 40 peptides form interlaced amyloid fibrils. *J. Neurochem.*, 126(3): 305-311.

- Gu Y, Oyama F, Ihara Y (1996).** Tau is widely expressed in rat tissues. *J. Neurochem.*, 67(3): 1235-1244.
- Guénard H (2001).** Physiologie humaine 3e édition. Pradel Ed., ISBN2-913996-04-3, 606 pages.
- Guéroux M, Laguerre M, Szlosek-Pinaud M, Fouquet E, Pianet I (2012).** Polyphenols and Alzheimer's disease: Tau/polyphenol interactions investigated by NMR and molecular modelling. *Nutr. Aging*, 1: 201-206.
- Guerreiro RJ, Gustafson DR, Hardy J (2012).** The genetic architecture of Alzheimer's disease: beyond APP, PSENs and APOE. *Neurobiol. Aging*, 33: 437-56.
- Guillet-Pichon V, Verny C (2016).** Mitochondrie et maladies neurodégénératives. *Pratique Neurologique*, 7:117-122.
- Guillet-Pichon V, Verny C. (2016).** Mitochondrie et maladies neurodégénératives. *Pratique Neurologique – FMC*, 7: 117-122.
- Gustke N, Trinczek B, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E (1994).** Domains of tau protein and interactions with microtubules. *Biochem.*, 33(32): 9511-9522.
- Haass C (2004).** Take five-BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation. *EMBO J.*, 23: 483-488.
- Haass C, Kaether C, Thinakaran G, Sisodia S (2012).** Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 2(5): a006270.
- Haass C, Selkoe DJ (2007).** Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 8(2): 101-112.
- Haider S, Tabassum S, Perveen T (2016).** Scopolamine-induced greater alterations in neurochemical profile and increased oxidative stress demonstrated a better model of dementia: A comparative study. *Brain Res. Bull.*, 127:234-247.
- Hamdane M, Dourlen P, Bretteville A, Samba A-V, Ferreira S, Ando K, Kerdraon O, Bégard S, Geay L, Lippens G, Sergeant N, Delacourte A, Maurage C-A, Galas M-C, Buée L (2006).** Pin1 allows for differential tau dephosphorylation in neuronal cells. *Mol. Cell Neurosci.*, 32(1-2): 155-160.
- Hempel H, Blennow K, Shaw LM, Hoessler YC, Zetterberg H, Trojanowski JQ (2010).** Total and phosphorylated tau protein as biological markers of Alzheimer's disease. *Exp. Gerontol.*, 45: 30-40.

- Hampel H, Hardy J, Blennow K, Chen C, Perry G, Kim SH, Villemagne VL, Aisen P, Vendruscolo M, Iwatsubo T, Masters CL, Cho M, Lannfelt L, Cummings JL, Vergallo A (2021).** The Amyloid- β Pathway in Alzheimer's disease. *Mol. Psychiatry*; <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01249-0>.
- Han X, Shen T, Lou H (2007).** Dietary polyphenols and their biological significance. *Int. J. Mol. Sci.*, 8: 950-998.
- Han X-J, Hu Y-Y, Yang Z-J, Jiang L-P, Shi S-L, Li Y-R, Guo M-Y, Wu H-L, Wan Y-Y (2017).** Amyloid β -42 induces neuronal apoptosis by targeting mitochondria. *Mol. Med. Reports*, 16: 4521-4528.
- Hancianu M, Cioanca O, Mihasan M, Hritcu L, (2013).** Neuroprotective effects of inhaled lavender oil on scopolamine-induced dementia via anti-oxidative activities in rats. *Phytomed.*, 20: 446-452.
- Harborne JB (1976).** Phytochemical Methods. A Guide of modern techniques of plants analysis. Chapman and Hall. London, England. P 150.
- Hardy J, Selkoe DJ (2002).** The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 297(5580): 353-356.
- Hashem FA, Aboutabl EA, El Souda SS, Moharam M, Maamoum AA, Shabana M (2013).** Desmutagenic and antimutagenic potential of phenolics from *Khaya grandifoliola* (C.DC.) Meliaceae. *Egypt Pharm J.*, 12: 148-154.
- Hémar A, Mulle C (2011).** Maladie d'Alzheimer, peptide β -amyloïde et synapses. *médecine/sciences*, 27: 733-736.
- Heo JH, Lee ST, Oh MJ, Park HJ, Shim JY, Chu K, Kim M (2011).** Improvement of cognitive deficit in Alzheimer's disease patients by long term treatment with korean red ginseng. *J Ginseng Res.*, 35: 457-461.
- Hervy J, Bicout DJ (2019).** Dynamical decoration of stabilized-microtubules by tau protein. *Sci. Rep.*, 9,12473.
- Hipp MS, Park SH, Hartl FU (2014).** Proteostasis impairment in protein-misfolding and aggregation diseases. *Trends Cell. Biol.*, 24: 506-514.
- Hirokawa N, Pfister KK, Yorifugi H, Wagner MC, Brady ST, Bloom GS (1989).** Submolecular domains of bovine brain kinesin identified by electron microscopy and monoclonal antibody decoration. *Cell*, 56(5): 867-878.

- Hirokawa N, Takemura (2005).** Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons. *Nat. Rev. Neurosci.*, 6(3): 201-214.
- Horký M, Kotala V, Anton M, Wesierska-Gadek J (2002).** Nucleolus and apoptosis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 973: 258-264.
- Hou DR, Wang Y, Xue L, Tian Y, Chen K, Song Z, Yang Q-D (2008).** Effect of *Polygonum multiflorum* on the fluidity of the mitochondria membrane and activity of COX in the hippocampus of rats with A β 1-40-induced Alzheimer's disease. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 33: 987-992.
- Howard R, Liu KY (2020).** Questions EMERGE as Biogen claims aducanumab turnaround. *Nat. Rev. Neurol.*, 16: 63-64.
- Hüll M, Müksch B, Akundi RS, Waschbisch A, Hoozemans JJM, Veerhuis R, Fiebich BL (2006).** Amyloid beta peptide (25-35) activates protein kinase C leading to cyclooxygenase-2 induction and prostaglandin E2 release in primary midbrain astrocytes. *Neurochem. Int.*, 48(8): 663-672.
- Ijarotimi SO, Agbedahunsi JM, Onyeji CO, Adewunmi CO (2010).** Chemotherapeutic interaction between *Khaya grandifoliola* (Welw) CDC stem bark extract and two anti-malarial drugs in mice. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.*, 7(4): 370-376.
- Iskandar S, Gnansounou MS, Robin M, Lorquin J, Di Giorgio C, Piccerelle P (2018).** Antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective activities of a plant extract derived from traditional Chinese medicine: SuHeXiang Wan (AT000). *Chem. Adv. Materials* 3(2): 36-59.
- Ittner LM, Götz J (2011).** Amyloid- β and tau-a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.*, 12: 65-72.
- Ittner LM, Ke YD, Delerue F, Bi M, Gladbach A, Eersel JV, Wölfing H, Chieng BC, Christie MJ, Napier IA, Eckert A, Staufenbiel M, Hardeman E, Götz J (2010).** Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell*, 142(3): 387-397.
- Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, Mizusawa H, Nukina N, Ihara Y (1994).** Visualization of A β 42-43 and A β 40 in senile plaques with end-specific A β monoclonals: Evidence that an initially deposited species is A β 42(43). *Neuron*, 13(1): 45-53.
- Jadhav S, Avila J, Schöll M, Kovacs GG, Kövari E, Skrabana R, Kontseikova E, Evans LD, Malawska B, de Silva R, Buee L, Zilka N (2019).** A walk through tau therapeutic strategies. *J. Acta Neuropathologica Communications* 7:22.

- Jahn H. (2013).** Memory loss in Alzheimer's disease. *Dialogues Clin. Neurosci.*, 15(4), 445-454.
- Jakob-Roetne R, Jacobsen H (2009).** Alzheimer's disease: From Pathology to Therapeutic Approaches. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 48(17): 3030-3059.
- Jakobs S (2006).** High resolution imaging of live mitochondria. *Biochem. Biophys. Acta*, 1763: 561-575.
- Jankowsky JL, Zheng H (2017).** Practical considerations for choosing a mouse model of Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*, 12:89.
- Jazayeri SB, Amanlou A, Ghanadian N, Pasalar P, Amanlou M (2014).** A preliminary investigation of anticholinesterase activity of some Iranian medicinal plants commonly used in traditional medicine. *Daru*, 22(1): 17.
- Jeong HY, Kim JY, Lee HK, Ha do T, Song KS, Bae K, Seong YH (2010).** Leaf and stem of *Vitis amurensis* and its active components protect against amyloid β protein (25-35)-induced neurotoxicity. *Arch Pharm Res.*, 33:1655-1664.
- Jeremic D, Jimenez-Díaz L, Navarro-Lopez JD (2021).** Past, present and future of therapeutic strategies against amyloid- β peptides in Alzheimer's disease: a systematic review. *Ageing Res. Rev.*, 72: 101496.
- Jessell TM, Kandel ER (1993).** Synaptic transmission: a bidirectional and self-modifiable form of cell-cell communication. *Cell*, 72:1-30.
- Jhang KA, Park J-S, Kim H-E, Chong YH (2017).** Resveratrol ameliorates tau hyperphosphorylation at Ser396 site and oxidative damage in rat hippocampal slices exposed to vanadate: implication of ERK1/2 and GSK-3 β signaling cascades. *J. Agric. Food Chem.*, 65(44): 9629-9634.
- Ji X-F, Chi T-Y, Liu P, Li L-Y, Xu J-K, Xu Q, Zou L-B, Meng D-L (2017).** The total triterpenoid saponins of *Xanthoceras sorbifolia* improve learning and memory impairments through against oxidative stress and synaptic damage. *Phytomed.*, 25: 15-24.
- Jin M, Shepardson N, Yang T, Chen G, Walsh D, Selkoe DJ (2011).** Soluble amyloid β -protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce Tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 108(14): 5819-5824.
- Johnson AB, Blum NR (1970).** Nucleoside phosphatase activities associated with the tangles and plaques of Alzheimer's disease: a histochemical study of natural and experimental neurofibrillary tangles. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 29(3): 463-478.
- Johnson G, Stoothoff W (2004).** Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction. *J. Cell Sci.*, 117(24): 5721-5729.

- Johnson VE, Stewart W (2012).** Widespread τ and amyloid β pathology many years after a single traumatic brain injury in humans. *Brain pathol.*, 22(2): 142-149.
- Jorda A, Aldasoro M, Aldasoro C, Guerra-Ojeda S, Iradi A, Vila JM, Campos-Campos J, Valles SL (2020).** Action of low doses of Aspirin in Inflammation and Oxidative Stress induced by $\alpha\beta 1-42$ on Astrocytes in primary culture. *Int. J. Med. Sci.*, 17: 834-843.
- Kalinichenko SG, Matveeva NY (2008).** Morphological characteristics of apoptosis and its significance in neurogenesis. *Neurosci. Behav. Physiol.*, 38: 333-344.
- Kamat PK, Kalani A, Rai S, Swarnkar S, Tota S, Nath C, Tyagi N (2016).** Mechanism of oxidative stress and synapse dysfunction in the pathogenesis of Alzheimer's disease: understanding the therapeutics strategies. *Mol. Neurobiol.*, 53: 648-661.
- Kang I-J, Jeon YE, Yin XF, Nam J-S, You SG, Hong MS, Jang BG, Kim M-J (2011).** Butanol extract of *Ecklonia cava* prevents production and aggregation of beta-amyloid, and reduces beta-amyloid mediated neuronal death. *Food Chem. Toxicol.*, 49: 2252-2259.
- Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Müller-Hill (1987).** The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell surface receptor. *Nature*, 325(6106): 733-736.
- Karthikkeyan G, Pervaje R, Pervaje SK, Prasad TSK, Modi PK (2021).** Prevention of MEK-ERK-1/2 hyper-activation underlines the neuroprotective effect of Glycyrrhiza glabra L. (Yashtimadhu) against rotenone-induced cellular and molecular aberrations. *J. Ethnopharm.*, 274, 114025.
- Kashyap G, Bapat D, Das D, Gowaikar R, Amritkar RE, Rangarajan G, Ravindranath V, Ambika G (2019).** Synapse loss and progress of Alzheimer's disease -A network model. *Sci. Rep.*, 9:6555.
- Kayed R, Head E, Thompson JL, McIntire TM, Milton SC, Cotman CW, Glabe CG (2003).** Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science*, 300(5618): 486-489.
- Kayed R, Head E, Thompson JL, McIntire, Milton SC, Cotman, Glabe CG (2003).** Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science*, 300(5618): 486-489.
- Keller G, Binyamin O, Frid K, Saada A, Gabizon R (2019).** Mitochondrial dysfunction in preclinical genetic prion disease: A target for preventive treatment? *Neurobiol. Dis.*, 124: 57-66.

- Khairallah MI, Kassem LAA (2011).** Alzheimer's disease: current status of etiopathogenesis and therapeutic strategies. *Pak J. Biol. Sci.*, 14(4): 257-272.
- Khan A, Dobson JP, Exley C (2006).** Redox cycling of iron by A β 42. *Free Rad. Biol. Med.*, 40: 557-569.
- Khazdair MR, Anaeigoudari A, Hashemzahi M, Mohebbati R (2019).** Neuroprotective potency of some spice herbs, a literature review. *J. Trad. Complement. Med.*, 9: 98-105.
- Kim GH, Kim JE, Rhie SJ, Yoon S (2015).** The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Exp. Neurobiol.*, 24: 325.
- Kim J, Keum Y-S (2016).** Nrf2, a key regulator of antioxidant with two faces towards cancer. *Oxid. Med. Cell. Long.*, 2016, 2746457.
- Kim KB, Lee SA, Kang I, Kim J-H (2018).** Momordica charantia ethanol extract attenuates H₂O₂-induced cell death by its antioxidant and anti-apoptotic properties in Human Neuroblastoma SK-N-MC cells. *Nutrients*, 10, 1368.
- Kivipelto M, Helkala E-L, Laakso MP, Hanninen T, Hallikainen M, Alhainen K, Livonen S, Mannermaa A, Tuomilehto J, Nissinen A, Soininen H (2002).** Apolipoprotein E epsilon4 allele, elevated midlife total cholesterol level, and high midlife systolic blood pressure are independent risk factors for late-life Alzheimer disease. *Ann. Intern. Med.*, 137(3): 149-155.
- Kolarova M, Garcia-Sierra F, Bartos A, Riczny J, Ripova D (2012).** Structure and pathology of tau protein in Alzheimer disease. *Int. J. Alzheimers Dis.*, 731526.
- Kong Y, Trabucco SE, Zhang H (2014).** Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and the mitochondria theory of aging. *Interdiscip. Top. Gerontol.*, 39: 86-107.
- Kontaxi C, Piccardo P, Gill AC (2017).** Lysine-directed post-translational modifications of tau protein in Alzheimer's disease and related tauopathies. *Front. Mol. Biosci.*, 4:56.
- Köpke E, Tung YC, Shaikh S, Alonso AC, Iqbal K, Grundke-Iqbal I (1993).** Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.*, 268(32): 24374-24384.
- Korovila I, Hugo M, Castro JP, Weber D, Hohn A, Grune T, Jung T (2017).** Proteostasis, oxidative stress and aging. *Redox Biol.*, 13: 550-567.
- Kouam AF, Yuan F, Njyou FN, He H, Tsayem RF, Oladejo BO, Song F, Moundipa PF, Gao GF (2017).** Induction of Mkp-1 and nuclear translocation of Nrf2 by limonoids from *Khaya grandifolia* C.DC protect L-02 hepatocytes against acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Front. Pharmacol.*, 8:653.

- Kovacech B, Novak M (2010).** Tau truncation is a productive posttranslational modification of neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.*, 7(8): 708-716.
- Kovács T (2009).** Therapy of Alzheimer disease. *Neuropsychopharmacol. Hung.*, 11(1): 27-33.
- Kovacsova M, Barta A, Parohova J, Vrankova S, Pechanova O (2010).** Neuroprotective mechanisms of natural polyphenolic compounds. *Act. Nerv. Super. Rediviva*, 52(3): 181-186.
- Ksiezak-Reding H, Ho L, Santa-Maria I, Diaz-Ruiz C, Wang J, Pasinetti GM (2010).** Ultrastructural alterations of Alzheimer's disease paired helical filaments by grape seed-derived polyphenols. *Neurobiol Aging*, 3(7): 1427-1439.
- Ksiezak-Reding H, Liu WK, Yen SH (1992).** Phosphate analysis and dephosphorylation of modified tau associated with paired helical filaments. *Brain Res.*, 597(2): 209-219.
- Kuca K, Soukup O, Maresova P, Korabecny J, Nepovimova E, Klimova B, Honegr J, Ramalho TC, França TCC (2016).** Current approaches against Alzheimer's disease in clinical trials. *J. Braz. Chem. Soc.*, 27(4): 641-649.
- Kulminski AM, Shu L, Loika Y, He L, Nazarian A, Arbeev K, Ukraintseva S, Yashin A, Culminskaya I (2020).** Genetic and regulatory architecture of Alzheimer's disease in the APOE region. *Alzheimers Dement.*, 12, e12008.
- Kumar A, Dogra S, Prakash A (2009).** Neuroprotective effects of *Centella asiatica* against intracerebroventricular colchicine-induced cognitive impairment and oxidative stress. *Int. J. Alzheimers Dis.*, 2009: 972178.
- Kumar A, Seghal N, Padi SV, Naidu PS (2006).** Differential effects of cyclooxygenase inhibitors on intracerebroventricular colchicine-induced dysfunction and oxidative stress in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 551(1-3): 58-66.
- Kumar A, Singh A, Aggarwal A (2017).** Therapeutic potentials of herbal drugs for Alzheimer's disease – An overview. *Ind. J. Exp. Biol.*, 55: 63-73.
- Lal R, Lin H, Quist AP (2007).** Amyloid beta ion channel: 3D structure and relevance to amyloid channel paradigm. *Biochim. Biophys. Acta*, 1768: 1966–1975.
- Lasagna-Reeves CA, Castillo-Carranza DL, Guerrero-Muñoz MJ, Jackson GR, Kaye R (2010).** Preparation and characterization of neurotoxic tau oligomers. *Biochemistry*, 49 (47): 10039-10041
- Lasagna-Reeves CA, Castillo-Carranza DL, Sengupta U, Guerrero-Munoz MJ, Kiritoshi T, Neugebauer V, Jackson GR, Kaye R (2012).** Alzheimer brain-derived tau oligomers propagate pathology from endogenous tau. *Sci Rep.*, 2: 700.

- Lashuel HA, Hartley DM, Balakhaneh D, Aggarwal A, Teichberg S, and Callaway DJE (2002).** New class of inhibitors of Amyloid- β fibril formation. Implications for the mechanism of pathogenesis in Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.*, 277(45): 42881-42890.
- Lau FC, Shukitt-Hale B, Joseph JA (2005).** The beneficial effects of fruit polyphenols on brain aging. *Neurobiol Aging*, 26: 128-132.
- Le Corre S, Klafki HW, Plesnila N, Hübinger G, Obermeier A, Sahagún H, Monse B, Seneci P, Lewis J, Eriksen J, Zehr C, Yue M, McGowan E, Dickson DW, Hutton M, Roder HM (2006).** An inhibitor of tau hyperphosphorylation prevents severe motor impairments in tau transgenic mice. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 103(25): 9673-9678.
- Lee da H, Nam YJ, Lee CS (2015).** Apocynin attenuates cholesterol oxidation product induced programmed cell death by suppressing NF- κ B-mediated cell death process in differentiated PC12 cells. *Neurochem Int.*, 89: 28-39.
- Lee G, Newman ST, Gard DL, Band H, Panchamoorthy G (1998).** Tau interacts with src-family non-receptor tyrosine kinases. *J. cell sci.*, 111(21): 3167-3177.
- Lee JE, Song H-S, Park MN, Kim S-H, Shim B-S, Kim B (2018).** Ethanol Extract of *Oldenlandia diffusa* herba attenuates scopolamine-induced cognitive impairments in mice via activation of BDNF, P-CREB and inhibition of acetylcholinesterase. *Int. J. Mol. Sci.*, 19, 363; doi:10.3390/ijms19020363.
- Lee ST, Chu K, Sim JY, Heo JH, Kim M (2008).** Panax ginseng enhances cognitive performance in Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord.*, 22: 222-226.
- Lee YK, Choi IS, Ban JO, Lee HJ, Lee US, Han SB, Jung JK, Kim YH, Kim YH, Oh K-W, Hong JT (2008).** 4-O-methylhonokiol attenuated β -amyloid-induced memory impairment through reduction of oxidative damages via inactivation of p38 MAP kinase. *J Nutr Biochem.*, 22: 476-486.
- Leuner B, Caponiti JM, Gould E (2012).** Oxytocin stimulates adult neurogenesis even under conditions of stress and elevated glucocorticoids. *Hippocampus*, 22(4): 861-868.
- Leuner B, Gould E (2010).** Structural plasticity and hippocampal function. *Annu. Rev. Psychol.*, 61: 111-140.
- Levi-Montalcini R (1987).** The nerve growth factor 35 years later. *Science*, 237:1154-1162.
- Levy-Lahad E (1995).** A familial Alzheimer locus on chromosome 1. *Science*, 269: 970-973.
- Lewis PR, Shute CC, Silver A (1967).** Confirmation from choline acetylase analyses of a massive cholinergic innervation to the rat hippocampus. *J. Physiol.*, 191:215-224.

- Li B, Chohan MO, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2007).** Disruption of microtubule network by Alzheimer abnormally hyperphosphorylated tau. *Acta neuropathol.*, 113(5): 501-511.
- Li JG, Chu J, Barrero C, Merali S, Praticò D (2014).** Homocysteine exacerbates β -amyloid pathology, tau pathology and cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease with plaques and tangles. *Ann. Neurol.*, 75: 851-863.
- Li T, Shi H, Zhao Y (2018).** Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by mitogen-activated protein kinase in Alzheimer's disease. *Mat. Sci. Eng.*, 394:022023.
- Li X, Bao X, Wang R (2016).** Experimental models of Alzheimer's disease for deciphering the pathogenesis and therapeutic screening (Review). *Int. J. Mol. Med.*, 37: 271-283.
- Lichtenthaler SF, Haass C, Steiner H (2011).** Regulated intramembrane proteolysis-lessons from amyloid precursor protein processing. *J. Neurochem.*, 117: 779-796.
- Lim YA, Rhein V, Baysang G, Meier F, Poljak A, Raftery MJ, Guilhaus M, Ittner LM, Eckert A, Gotz J (2010).** Abeta and human amylin share a common toxicity pathway via mitochondrial dysfunction. *Proteomics*, 10: 1621-1633.
- Lin JL, Wu, C-C, Yang W-Z, Yuan HS (2016).** Crystal structure of endonuclease G in complex with DNA reveals how it non specifically degrades DNA as a homodimer. *Nucleic Acids Res.*, 44(21): 10480-10490.
- Lin MT, Beal MF (2006).** Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegeneration disease. *Nature*, 443(7113): 787-795.
- Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong C-X (2005).** Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. *Eur. J. Neurosci.*, 22(8): 1942-1950.
- Liu F, Li B, Tung E-J, Grundke-Iqbal I, Iqbal K., Gong C-X (2007).** Site-specific effects of tau phosphorylation on its microtubule assembly activity and self-aggregation. *Eur. J. Neurosci.*, 26: 3429-3436.
- Liu Q, Kawai H, Berg DK (2001).** Beta -Amyloid peptide blocks the response of alpha 7-containing nicotinic receptors on hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98(8): 4734-4739.
- Liu S-J, Yang C, Zhang Y, Su R-Y, Chen J-L, Jiao M-M, Chen H-F, Zheng N, Luo S, Chen Y-B, Quan S-J, Wang Q (2016).** Neuroprotective effect of β -asarone against Alzheimer's disease: regulation of synaptic plasticity by increased expression of SYP and GluRI. *Drug Des. Devel. Ther.*, 10: 1461-1469.

- Lloret A, Fuchsberger T, Giraldo E, Viña J (2015).** Molecular mechanisms linking amyloid β toxicity and Tau hyperphosphorylation in Alzheimer's disease. *Free Rad. Biol. Med.*, 83: 186-191.
- Lobello K, Ryan JM, Liu E, Rippon G, Black R (2012).** Targeting beta amyloid: a clinical review of immunotherapeutic approaches in Alzheimer's disease. *Int. J. Alzheimers Dis.*, 2012.
- Lowe SL, Willis BA, Hawdon A, Natanegara F, Chua L, Foster J, Shcherbinin S, Ardayfio P, Sims JR (2021).** Donanemab (LY3002813) dose-escalation study in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.*, 7(1): e12112.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951).** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193(1): 265-275.
- Lu C, Wang Y, Wang D, Zhang L, Lv J, Jiang N, Fan B, Liu X, Wang F (2018).** Neuroprotective effects of soy isoflavones on Scopolamine-induced amnesia in mice. *Nutrients*, 10, 853.
- Lu LC, Bludau J (2001).** Alzheimer's disease. Santa Barbara, Calif.: Greenwood, c2001. Biographies of disease. ISBN 0313381100.
- Luca M, Luca A, Calandra C (2015).** The role of oxidative damage in the pathogenesis and progression of Alzheimer's disease and vascular dementia. *Oxid. Med. Cell. Long.*, 2015, 504678.
- Ma H, Johnson SL, Liu W, DaSilva NA, Meschwitz S, Dain JA, Seeram NP (2018).** Evaluation of polyphenol anthocyanin-enriched extracts of blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry for free radical scavenging, reactive carbonyl species trapping, anti-glycation, anti- β -amyloid aggregation, and microglial neuroprotective effects. *Int. J. Mol. Sci.*, 19:461.
- Ma S, Hockings C, Anwari K, Kratina T, Fennell S, Lazarou M, Ryan MT, Kluck RM, Dewson G (2013).** Assembly of the Bak apoptotic pore: a critical role for the Bak protein alpha6 helix in the multimerization of homodimers during apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 288: 26027-26038.
- Ma W-W, Tao Y, Wang Y-Y, Peng I-F (2017).** Effects of Gardenia jasminoides extracts on cognition and innate immune response in an adult *Drosophila* model of Alzheimer's disease. *Chinese J. Nat. Med.*, 15(12), 899-904.

- Maas T, Eidenmüller J, Brandt R (2000).** Interaction of Tau with the Neural Membrane Cortex Is Regulated by phosphorylation at sites that are modified in paired helical filaments. *J. Biol. Chem.*, 275(21): 15733-15740.
- Magnani EJJ, Gasparini L, Golding M, Williams M, Schiavo G, Goedert M, Amos LA, Spillantini MG (2007).** Interaction of tau protein with the dynactin complex. *EMBO J.*, 26(21): 4546-4554.
- Mahdi O, Baharuldin MTH, Nor NHM, Chiroma SM, Jagadeesan S, Moklas MAM (2019).** Chemicals used for the induction of Alzheimer's disease-like cognitive dysfunctions in rodents. *Biomed. Res. Ther.*, 6(11): 3460-3484.
- Mairuae N, Connor JR, Buranrat B, Lee S (2019).** Oroxyllum indicum (L.) extract protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against β -amyloid-induced cell injury. *Mol. Med. Reports*, 20: 1933-1942.
- Maity D, Sandur VR (2019).** An updated review on herbal drugs: nootropic activity and possible mechanisms. *Asian J. Pharm. Clin. Res.*, 12(6): 19-26.
- Majlessi N, Choopani S, Kamalinejad M, Azizi Z (2012).** Amelioration of amyloid β -induced cognitive deficits by Zataria multiflora Boiss. essential oil in a rat model of Alzheimer's disease. *CNS Neurosci Ther.*, 18: 295-301.
- Malekzadeh S, Edalatmanesh MA, Mehrabani D, Shariati M (2017).** Drugs induced Alzheimer's disease in animal model. *GMJ*, 6(3): 185-196.
- Malik J, Kumar M, Deshmukh R, Kumar P (2013).** Ameliorating effect of lyophilized extract of *Butea frondosa* leaves on scopolamine-induced amnesia in rats. *Pharm. Biol.*, 51(2): 233-239.
- Mamun AA, Uddin MS, Mathew B, Ashraf GM (2020).** Toxic tau: structural origins of tau aggregation in Alzheimer's disease. *Neural Regen. Res.*, 15(8):1417-1420.
- Man SC, Durairajan SS, Kum WF, Lu JH, Huang JD, Cheng CF, et al (2008).** Systematic review on the efficacy and safety of herbal medicines for Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.*, 14: 209-223.
- Mandelkow E, Von Bergen M, Biernat J, Mandelkow E-M (2007).** Structural principles of Tau and the paired helical filaments of Alzheimer's disease. *Brain Pathol.*, 17(1): 83-90.
- Mandelkow E-M, Mandelkow E (2012).** Biochemistry and cell biology of tau protein in neurofibrillary degeneration. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 2(7): a006247.
- Manelli AM, Stine WB, Van Eldik LJ, LaDu MJ (2004).** ApoE and Abeta1-42 interactions: effects of isoform and conformation on structure and function. *J. Mol. Neurosci.*, 23: 235-246.

- Markesbery WR (1997).** Oxidative Stress Hypothesis in Alzheimer's Disease. *Free Rad. Biol. Med.*, 23: 134-147.
- Marklund S, Marklund G (1974).** Involvement of the superoxide anion radical in the autooxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.*, 47(3): 469-474.
- Marsh J, Alifragis P (2018).** Synaptic dysfunction in Alzheimer's disease: the effects of amyloid- β on synaptic vesicle dynamics as a novel target for therapeutic intervention. *Neural Regen. Res.*, 13(4): 616-623.
- Martin L, Latypova X, Terro F (2011).** Post-translational modifications of tau protein: implications for Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.*, 58(4): 458-471.
- Martínez-Lostao L, Anel A, Pardo J (2015).** How Do Cytotoxic Lymphocytes Kill Cancer Cells? *Clinical cancer research: an official journal of the Am. Ass. Cancer Res.*, 21: 5047-5056.
- Martins IC, Kuperstein I, Wilkinson H, Maes E, Vanbrabant M, Jonckheere W, Van Gelder P, Hartmann D, D'Hooge R, De Strooper B, Schymkowitz J, Rousseau F (2008).** Lipids revert inert Abeta amyloid fibrils to neurotoxic protofibrils that affect learning in mice. *EMBO J.*, 27: 224-233.
- Massi DG, Aretoutap MA, Kenmegne C, Mapoure YN (2020).** Epidémiologie hospitalière des démences à Douala, Cameroun. *Revue neurologique*, 176: S2-S43.
- Mattson MP (2004).** Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature*, 430(7000): 631-639.
- Mayeux R, Tang MX, Jacobs DM, Manly J, Bell K, Merchant C, Small SA, Stern Y, Wisniewski HM, Metha PD (1999).** Plasma amyloid β -peptide 1-42 and incipient Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.*, 46(3): 412-416.
- Mazzetti AP, Fiorile MC, Primavera A, Lo Bello M (2015).** Glutathione transferases and neurodegenerative diseases. *Neurochem. Intern.*, 82: 10-18.
- McAvoy T, Nairn AC (2010).** Serine/Threonine Protein Phosphatase Assays. *Curr Protoc Mol Biol.*, 18.18.
- McVicker DP, Chrin LR, Berger CL (2011).** The nucleotide-binding state of microtubules modulates kinesin processivity and the ability of Tau to inhibit kinesin-mediated transport. *J. Biol. Chem.*, 286(50): 42873-42880.

- Mediesse FK, Boudjeko T, Hasitha A, Gangadhar M, Mbacham WF, Yogeeswari P (2018).** Inhibition of lipopolysaccharide (LPS)-induced neuroinflammatory response by polysaccharide fractions of *Khaya grandifoliola* (C.D.C.) stem bark, *Cryptolepis sanguinolenta* (Lindl.) Schltr and *Cymbopogon citratus* Stapf leaves in raw 264.7 macrophages and U87 glioblastoma cells. *BMC Complem. Altern. Med.*, 18:86.
- Meraz-Ríos MA, Lira-De León KI, Campos-Peña V, De Anda-Hernández MA, MenaLópez R (2010).** Tau oligomers and aggregation in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.*, 112(6): 1353-1367.
- Miao J, Shi R, Li L, Chen F, Zhou Y, Tung YC, Hu W, Gong C-X, Iqbal K, Liu F (2019).** Pathological Tau from Alzheimer's brain induces site-specific hyperphosphorylation and SDS- and reducing agent-resistant aggregation of Tau in vivo. *Front. Aging Neurosci.*, 11:34.
- Mintun MA, Lo AC, Evans CD, Wessels AM, Ardayfio PA, Andersen SW, Shcherbinin S, Sparks J, Sims JR, Brys M, Apostolova LG, Salloway SP, Skovronsky DM (2021).** Donanemab in Early Alzheimer's disease. *N Engl. J. Med.*, 384:1691-1704.
- Mitra A, Dey B (2013).** Therapeutic interventions in Alzheimer disease. *Neurodegen. Dis.*, 12: 291-317.
- Modi PK, Komaravelli N, Singh N, Sharma P (2012).** Interplay between MEK-ERK signaling, cyclin D1, and cyclin-dependent kinase 5 regulates cell cycle reentry and apoptosis of neurons. *Mol. Biol. Cell.*, 23: 3722-3730.
- Mondragon-Rodriguez S, Perry G, Zhu X, Boehm J (2012).** Amyloid beta and tau proteins as therapeutic targets for Alzheimer's disease treatment: rethinking the current strategy. *Int. J. Alzheimers Dis.*, 2012: 630182.
- Moon K, Lee S, Cha J (2020).** *Bacillus subtilis* fermentation of *Malva verticillata* leaves enhances antioxidant activity and Osteoblast differentiation. *Foods*, 9, 671.
- Moore K, Dalley A, Dhem A (2010).** Anatomie médicale: Aspects fondamentaux et applications cliniques - De Boeck Supérieur, Bruxelles.
- Moore PB, Day JP, Taylor GA, Ferrier IN, Fifield LK, Edwardson JA (2000).** Absorption of aluminium-26 in Alzheimer's disease, measured using accelerator mass spectrometry. *Dem. Ger. Cogn. Disord.*, 11(2): 66-69.
- Morris M, Maeda S, Vessel K and Mucke L (2011).** The many faces of tau. *Neuron*, 70: 410-426.

- Morris R (1984).** Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Methods*, 11 : 47-60.
- Moser, VA, Pike CJ (2016).** Obesity and sex interact in the regulation of Alzheimer's disease. *Neurosc. Biobehav. Rev.*, 67: 102-118.
- Moss DW (1997).** Physicochemical and pathophysiological factors in the release of membrane bound alkaline phosphatase from cells. *Clin. Chim. Acta*, 257: 133-140.
- Mostafa DK, Ismail CA, Ghareeb DA (2016).** Differential metformin dose-dependent effects on cognition in rats: role of Akt. *Psychopharmacol.*, 233: 2513-2524.
- Mucke L, Masliah E, Yu GQ, Mallory M, Rockenstein EM, Tatsuno G, Hu K, Kholodenko D, Johnson-Wood K, McConlogue L (2000).** High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J. Neurosci.*, 20(11): 4050-4058.
- Mugwagwa AT, Gadaga LL, Pote W, Tagwireyi D (2015).** Antiamnesic Effects of a Hydroethanolic Extract of *Crinum macowanii* on Scopolamine-Induced Memory Impairment in Mice. *J. Neurodegen. Dis.*, 2015, 242505.
- Mukaila YO, Ajao AA-N, Moteetee AN (2021).** *Khaya grandifoliola* C. DC. (Meliaceae: Sapindales): Ethnobotany, phytochemistry, pharmacological properties, and toxicology. *J. Ethnopharmacol.*, 278, 114253.
- Mukrasch MD, Bibow S, Korukottu J, Jeganathan S, Biernat J, Griesinger C, Mandelkow E, Zweckstetter M (2009).** Structural polymorphism of 441-residue tau at single residue resolution" ed. Gregory A Petsko. *PLoS Biol.*, 7(2): e1000034.
- Muralidar S, Ambi SV, Sekaran S, Thirumalai D, Palaniappan B (2020).** Role of tau protein in Alzheimer's disease: The prime pathological player. *Int. J. Biol. Macromol.*, 163: 1599-1617.
- Nakdook W, Khongsombat O, Taepavarapruk P, Taepavarapruk N, Ingkaninan K (2010).** The effects of *Tabernaemontana divaricata* root extract on amyloid beta-peptide 25-35 peptides induced cognitive deficits in mice. *J. Ethnopharmacol.*, 130: 122-126.
- Nam E, Lee Y-B, Moon C, Chang K-A (2020).** Serum Tau Proteins as Potential Biomarkers for the Assessment of Alzheimer's disease Progression. *Int. J. Mol. Sci.*, 21, 5007.
- Navarro NM, Krawczyk MC, Boccia MM, Blake MG (2017).** Extinction and recovery of an avoidance memory impaired by scopolamine. *Physiol. Behav.*, 171: 192-198.

- Neddens J, Temmel M, Flunkert S, Kerschbaumer B, Hoeller C, Loeffler T, Niederkofler V, Daum G, Attems J, Hutter-Paier B (2018).** Phosphorylation of different tau sites during progression of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. Commun.*, 6(1):52.
- Neill D, Hughes D, Edwardson JA, Rima BK, Allsop D (1994).** Human IMR-32 neuroblastoma cells as a model cell line in Alzheimer's disease research. *J. Neurosci. Res.*, 39(1): 482-493.
- Nestor MW, Paull D, Jacob S, Sproul AA, Alsaffar A, Campos BA, Noggle SA (2013).** Differentiation of serum-free embryoid bodies from human induced pluripotent stem cells into networks. *Stem Cell Res.*, 10(3): 454-463.
- Neukamm SS, Toth R, Morrice N, Campbell DG, Mackintosh C, Lehmann R, Haering H-U, Schleicher E, Weigert C (2012).** Identification of the amino acids 300-600 of IRS-2 as 14-3-3 binding region with the importance of IGF-1/insulin regulated phosphorylation of Ser-573. *Plos One*, 7(8): e43296.
- Nilsson MR (2004).** Techniques to study amyloid fibril formation *in vitro*. *Methods*, 34(1): 151-160.
- Njayou FN, Amougou AM, Tsayem FR, Manjia NJ, Rudraiah S, Bradley B, Manautou JE, Moundipa PF (2015).** Antioxidant fractions of *Khaya grandifoliola* C.DC. and *Entada Africana* Guill. et Perr. induce nuclear translocation of Nrf2 in HC-04 cells. *Cell Stress Chaper.*, 20: 991-1000.
- Njayou FN, Kouam AF, Simo FBN, Tchana AN, Moundipa PF (2016).** Active chemical fractions of stem bark extract of *Khaya grandifoliola* C.DC. and *Entada africana* Guill et Perr. synergistically protect primary rat hepatocytes against paracetamol-induced damage. *BMC Complement. Altern. Med.*, 16:190.
- Njikam RN, Njikam N (2006).** Curative dose of *Khaya grandifoliola* stem bark for the treatment of gastric ulcers using Wistar rats. *Pharm. Biol.*, 44(2): 152-155.
- Odebeyi OO, Sofowora FH (1978).** Antimicrobial alkaloids from a Nigerian Chewing Stick (*Fagara zanthoxyloides*). *Planta Medica*, 36 : 204-207.
- Olatunji TL, Odebunmi CA, Adetunji AE (2021).** Biological activities of limonoids in the Genus *Khaya* (Meliaceae): a review. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 7:74.
- Onos KD, Rizzo SJS, Howell GR, Sasner M (2016).** Toward more predictive genetic mouse models of Alzheimer's disease. *Brain Res. Bull.*, 122: 1-11.
- Orf J, Walker S (2017).** BACE inhibitors and tau protein targeting drugs in prevention of Alzheimer's disease. *Hosp. Pharm.*, 1-3.

- Ostapchenko VG, Snir J, Suchy M, Fan J, Cobb MR, Chronik BA, Kovacs M, Prado VF, Hudson RHE, Pasternak SH, Prado MAM, Bartha R (2019).** Detection of Active Caspase-3 in Mouse Models of Stroke and Alzheimer's Disease with a Novel Dual Positron Emission Tomography/Fluorescent Tracer [⁶⁸Ga]Ga-TC3-OGDOTA. *Contrast Media Mol. Imaging*, 2019, 6403274.
- Owona AVB (2015).** Etude des activités immunomodulatoires et anti-inflammatoires *in vitro* et *in vivo* de *Khaya grandifoliola* (Méliaceae), *Entada africana* (Fabaceae), et de la Baicalin : Cas de la maladie d'Alzheimer. Thèse de Doctorat, 209 pages.
- Pahaye DB, Ngo Bum E, Taiwé GS, Ngoupaye GT, Sidiki N, Moto FCO, Kouemou N, Njapdounke SJK, Nkantchoua G, Kandeda A, Omam Omam JP, Mairaira V, Ojong JL (2017).** Neuroprotective and anti-amnesic effects of *Mitragyna inermis* Willd (Rubiaceae) on scopolamine-induced memory impairment in mice. *Behav. Neurol.*, 2017, 5952897.
- Panda D, Samuel JC, Massie M, Feinstein SC, Wilson L (2003).** Differential regulation of microtubule dynamics by three- and four- repeat tau: implications for the onset of neurodegenerative disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100(16): 9548-9553.
- Panza F, Imbimbo BP, Lozupone M, Greco A, Seripa D, Logroscino G, Daniele A, Colosimo C (2019).** Disease-modifying therapies for tauopathies: agents in the pipeline, *Exp. Rev. Neurother.*, 19(5): 397-408.
- Panzella L, Eidenberger T, Napolitano A (2018).** Anti-amyloid aggregation activity of black sesame pigment: toward a novel Alzheimer's disease preventive agent. *Molecules*, 23, 676.
- Paolicelli RC, Bergamini G, Rajendran L (2018).** Cell-to-cell communication by extracellular vesicles: Focus on Microglia. *Neuroscience*, 405: 148-157.
- Papassotiropoulos A, Fountoulakis M, Dunckley T, Stephan DA, Reiman EM (2006).** Genetics, transcriptomics, and proteomics of Alzheimer's disease. *J. Clin. Psychiatry*, 67(4): 652-670.
- Park HR, Lee H, Park H, Jeon JW, Cho W-K, Ma JY (2015).** Neuroprotective effects of *Liriope platyphylla* extract against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *BMC Complement. Altern. Med.*, 15, 171.
- Park SJ, Jung JM, Lee HE, Lee YW, Kim DH, Kim JM, Hong JG, Lee CH, Jung IH, Cho YB, Jang DS, Ryu JH (2012).** The memory ameliorating effects of INM-176, an ethanolic extract of *Angelica gigas*, against scopolamine- or A β (1-42)-induced cognitive dysfunction in mice. *J. Ethnopharmacol.*, 143: 611-620.

- Pedersen JT, Sigurdsson EM (2015).** Tau immunotherapy for Alzheimer's disease. *Trends Mol. Med.*, 21: 394-402.
- Peng QL, Buz'Zard AR, Lau BH (2002).** Pycnogenol protects neurons from amyloid-beta peptide-induced apoptosis. *Brain Res Mol Brain Res.*, 104: 55-65.
- Penido AB, De Moraes SM, Ribeiro AB, Alves DR, Rodrigues ALM, dos Santos LH, de Menezes JESA (2017).** Medicinal plants from northeastern Brazil against Alzheimer's disease. *Evid. Complem. Altern. Med.*, 2017: 1753673.
- Penke B, Bogár F, Fülöp L (2017).** β -Amyloid and the pathomechanisms of Alzheimer's disease: a comprehensive view. *Molecules*, 22, 1692.
- Peterson DW, George RC, Scaramozzino F, LaPointe NE, Anderson RA, Graves DJ, Lew J (2009).** Cinnamon extract inhibits tau aggregation associated with Alzheimer's disease *in vitro*. *J. Alzheimer's Dis.*, 17: 585-597.
- Petit L (2006).** Taxinomie de la mémoire humaine. Editeur Universitaires de France, chapitre II, pages 23-62.
- Pezze MA, Marshall HJ, Cassaday HJ (2017).** Scopolamine impairs appetitive but not aversive trace conditioning: role of the medial prefrontal cortex, *J. Neurosci.*, 37: 6289-6298.
- Pinheiro L, Faustino CMC (2019).** Therapeutic strategies targeting amyloid β in Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.*, 16(5): 418-452.
- Plóciennik A, Prendecki M, Zuba E, Siudzinski M, Dorszewska J (2015).** Activated caspase-3 and neurodegeneration and synaptic plasticity in Alzheimer's disease. *Adv. Alzheimer's Dis.*, 4: 63-77.
- Pooler AM, Hanger DP (2010).** Functional implications of the association of tau with the plasma membrane. *Biochem. Soc. Trans.*, 38: 1012-1015.
- Pooler AM, Usardi A, Evans CJ, Philpott KL, Noble W, Hanger DP (2012).** Dynamic association of tau with neuronal membranes is regulated by phosphorylation. *NBA*, 33(2): 431.e27-431.e38.
- Prakash A, Dhaliwal GK, Kumar P, Majeed AB (2016).** Brain biometals and Alzheimer's disease - boon or bane? *Int. J. Neurosci.*, 25: 1-10.
- Priller C, Bauer T, Mitteregger G, Krebs B, Kretschmar HA, Herms J (2006).** Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. *J. Neurosci.*, 26(27):7212-7221.

- Purves D, McNamara JO, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, Lamantia A-S, White LE, Coquery J-M (2011).** Neurosciences et Sylvius 4 : Le système nerveux humain, Édition : 4e édition. ed. De Boeck, Bruxelles.
- Qi-Takahara Y, Morishima-Kawashima M, Tanimura Y, Dolios G, Hirotani N, Horikoshi Y, Kametani F, Maeda M, Saido TC, Wang R, Ihara Y (2005).** Longer forms of amyloid beta protein: implications for the mechanism of intramembrane cleavage by gamma-secretase. *J. Neurosci.*, 25(2): 436-445.
- Qu Z, Zhang J, Yang H, Gao J, Chen H, Liu C, Gao W (2017).** *Prunella vulgaris* L., an edible and medicinal plant, attenuates scopolamine-induced memory impairment in rats. *J. Agric. Food Chem.*, 65: 291-300.
- Rabiei Z, Setorki M (2018).** Effect of hydroalcoholic *Echium amoenum* extract on scopolamine-induced learning and memory impairment in rats. *Pharmaceutical Biology*, 56(1): 672-677.
- Ramrao MR, Burande MD, Jangme CM, Ladde SS (2018).** Evaluation of nootropic effects of aqueous extract of *Tridax procumbens* Linn on cognitive functions in mice. *RJLBPCS*, 4(6): 242-251.
- Rao RR, Kisaalita WS (2002).** Biochemical and electrophysiological differentiation profile of a human neuroblastoma (IMR-32) cell line. *In Vitro Cell Dev. Biol. Amin.*, 38(8): 450-456.
- Reddy PH, Manczak M, Yin X, Grady MC, Mitchell A, Kandimalla R, Kuruva CS (2016).** Protective effects of a natural product, curcumin, against amyloid β induced mitochondrial and synaptic toxicities in Alzheimer's disease. *J. Investig. Med.*, 64: 1220–1234.
- Reitz C, Rogaeva E, Beecham GW (2020).** Late-onset vs nonmendelian early-onset Alzheimer disease: a distinction without a difference? *Neurol. Genet.*, 6, e512.
- Retinasamy T, Shaikh MF, Kumari Y, Othman I (2019).** Ethanolic extract of *Orthosiphon stamineus* improves memory in scopolamine-induced amnesia model. *Front. Pharmacol.*, 10:1216.
- Reynolds CH, Garwood CJ, Wray S, Price C, Kellie S, Perera T, Zvelebil M, Yang A, Sheppard PW, Varndell IM, Hanger DP, Anderton BH (2008).** Phosphorylation regulates tau interactions with Src homology 3 domains of phosphatidylinositol 3-kinase, phospholipase Cgamma1, Grb2, and Src family kinases. *J. Biol. Chem.*, 283(26): 18177-18186.

- Rhein V, Song X, Wiesner A, Ittner LM, Baysang G, Meier F, Ozmen L, Bluethmann H, Dröse S, Brandt U (2009).** Amyloid- β and tau synergistically impair the oxidative phosphorylation system in triple transgenic Alzheimer's disease mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 106(47): 20057-20062.
- Riedel BC, Thompson PM, Brinton RD (2016).** Age, APOE and sex: Triad of risk of Alzheimer's disease. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 160: 134-147.
- Rijal UA, Capetillo-Zarate E, Kosterin I, Abramowski D, Kumar S, Yamaguchi H, Walter J, Fandrich M, Staufenbiel M, Thal DR (2012).** Dispersible amyloid beta-protein oligomers, protofibrils, and fibrils represent diffusible but not soluble aggregates: their role in neurodegeneration in amyloid precursor protein (APP) transgenic mice. *Neurobiol. Aging*, 33: 2641-2660.
- Roberson ED, Scearce-Levie K, Palop JJ, Yan F, Cheng IH, Wu T, Gerstein H, Yu GQ, Mucke L (2007).** Reducing endogenous tau ameliorates Amyloid- β -induced deficits in an Alzheimer's disease Mouse Model. *Science*, 316(5825): 750-754.
- Robinson M, Lee BY, Leonenko Z (2015).** Drugs and drug delivery systems targeting amyloid- β in Alzheimer's disease. *AIMS Mol. Sci.*, 2(3): 332-358.
- Rodrigue KM, Kennedy KM, Devous MD, Rieck JR, Hebrank AC, Diaz-Arrastia R, Mathews D, Park DC (2012).** "A β -Amyloid burden in healthy aging regional distribution and cognitive consequences". *Neurol.*, 78: 387-395.
- Rodrigues R, Petersen RB, Perry G (2014).** Parallels between major depressive disorder and Alzheimer's disease: role of oxidative stress and genetic vulnerability. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 34: 925-949.
- Roy A (2018).** Role of medicinal plants against Alzheimer's disease. *Int. J. Complement. Alt. Med.*, 11(4): 205-208.
- Ruan CJ, Si JY, Zhang L, Chen DH, Du GH, Su L (2009).** Protective effect of stilbenes containing extract-fraction from *Cajanus cajan* L. on A β (25-35)-induced cognitive deficits in mice. *Neurosci Lett.*, 467:159-163.
- Sadiq A, Mahmood F, Ullah F, Ayaz M, Ahmad S, Haq FU, Khan G, Jan MS (2015).** Synthesis, anticholinesterase and antioxidant potentials of ketoesters derivatives of succinimides: a possible role in the management of Alzheimer's. *Chem. Cent. J.*, 9:31.
- Sahu R, Upadhyay S, Mehan S (2021).** Inhibition of extracellular regulated kinase (ERK)-1/2 signaling pathway in the prevention of ALS: Target inhibitors and influences on neurological dysfunctions. *Eur. J. Cell Biol.*, 100, 151179.

- Sampson EL, White N, Leurent B, Scott S, Lord K, Round J, Jones L (2014).** Behavioural and psychiatric symptoms in people with dementia admitted to the acute hospital: prospective cohort study. *Br. J. Psychiatry*, 205(3): 189-196.
- Santacruz K, Lewis J, Spires T, Paulson J, Kotilinek L, Ingelsson M, Guimaraes A, DeTure M, Ramsden M, McGowan E, Forster C, Yue M, Orne J, Janus C, Mariash A, Kuskowski M, Hyman B, Hutton M, Ashe KH (2005).** Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science*, 309(5733): 476-481.
- Santa-Maria I, Diaz-Ruiz C, Ksiezczak-Reding H, Chen A, Ho L, Wang J and Pasinetti GM (2012).** GSPE interferes with tau aggregation in vivo: implication for treating tauopathy. *Neurobiol. Aging*, 33(9): 2072-2081.
- Santos AL, Sinha S, Lindner AB (2018).** The Good, the Bad, and the Ugly of ROS: New Insights on Aging and Aging-Related Diseases from Eukaryotic and Prokaryotic Model Organisms. *Oxi. Med. Cell. Longev.*, 2018, 1941285.
- Sato S, Tatebayashi Y, Akagi T, Chui D-H, Murayama M, Miyasaka T, Planel E, Tanemura K, Sun X, Hashikawa T, Yoshioka K, Ishiguro K, Takashima A (2002).** Aberrant tau phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 beta and JNK3 induces oligomeric tau fibrils in COS-7 cells. *J. Biol. Chem.* 277(44): 42060-42065.
- Save SN, Choudhary S (2017).** Effects of triphala and guggul aqueous extracts on inhibition of protein fibrillation and dissolution of preformed fibrils. *RSC Adv.*, 7: 20460-20468.
- Scheltens P, De Strooper B, Kivipelto M, Holstege H, Chételat G, Teunissen CE, Cummings J, van der Flier WM (2021).** Alzheimer's disease. *Lancet*, 397: 1577-1590.
- Schmitt K, Grimm A, Kazmierczak A, Strosznajder JB, Götz J, Eckert A (2012).** Insights into mitochondrial dysfunction: aging, amyloid-beta, and tau-A deleterious trio. *Antioxid. Redox. Signal*, 16: 1456-1466.
- Schneider L (2020).** A resurrection of aducanumab for Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.*, 19: 111-112.
- Schulz KL, Eckert A, Rhein V, Mai S, Haase W, Reichert AS, Jendrach M, Müller WE, Leuner K (2012).** A new link to mitochondrial impairment in tauopathies. *Mol. Neurobiol.*, 46(1): 205-216.
- Sebastián-Serrano A, de Diego-García L, Martínez-Frailes C, Ávila J, Zimmermann H, Millán JL, Miras-Portugal MT, Díaz-Hernández M (2015).** Tissue-nonspecific alkaline phosphatase regulates purinergic transmission in the central nervous system during development and disease. *Comp. Struc. Biotechnol. J.*, 13: 95-100.

- Seki T, Kanagawa M, Kobayashi K, Kowa H, Yahata N, Maruyama K, Iwata N, Inoue H, Toda T (2020).** Galectin 3-binding protein suppresses amyloid- β production by modulating β -cleavage of amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.*, 295: 3678-3691.
- Selkoe DJ (2001).** Alzheimer's disease: Genes, Proteins, and Therapy. *Physiol. Rev.*, 81(2): 741-766.
- Sengupta A, Kabat J, Novak M, Wu Q, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1998).** Phosphorylation of tau at both Thr 231 and Ser 262 is required for maximal inhibition of its binding to microtubules. *Archives Biochem. Biophys.*, 357(2): 299-309.
- Seong SH, Ali MY, Kim H-R, Jung HA, Choi JS (2017).** BACE1 inhibitory activity and molecular docking analysis of meroterpenoids from *Sargassum serratifolium*. *Biorg. Med. Chem.*, 25(12): 3964-3970.
- Sereia AL, de Oliveira MT, Baranoski A, Marques LLM, Ribeiro FM, Isolani RG, de Medeiros DC, Chierrito D, Lazarin-Bidoia D, Zielinski AAF, Novello CR, Nakamura CV, Mantovani MS, de Mello JCP (2019).** In vitro evaluation of the protective effects of plant extracts against amyloid-beta peptide-induced toxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *PLoS ONE* 14(2): e0212089.
- Sergeant N, Bretteville A, Hamdane M, Caillet-Boudin M-L, Grognet P, Bombois S, Blum D, Delacourte A, Pasquier F, Vanmechelen E, Schraen-Maschke S, and Buée L (2008).** Biochemistry of Tau in Alzheimer's disease and related neurological disorders. *Expert Rev. Proteomics*, 5(2): 207-224.
- Sergeant N, Bussière T, Vermersch P, Lejeune JP, Delacourte A (1995).** Isoelectric point differentiates PHF-tau from biopsy-derived human brain tau proteins. *Neuroreport.*, 6: 2217-2220.
- Shankar GM, Bloodgood BL, Townsend M, Walsh DM, Selkoe DJ, Sabatini (2007).** Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J. Neurosci.*, 27(11): 2866-2875.
- Shankar GM, Li S, Metha TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, Brett FM, Farrell MA, Rowan MJ, Lmere CA, Walsh DM, Sabatini BL, Selkoe DJ (2008).** Amyloid- β protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat. Med.*, 14(8): 837-842.
- Shulman RG, Rothman DL, Behar KL, Hyder F (2004).** Energetic basis of brain activity : implications for neuroimaging. *Trends Neurosci.*, 27(8): 489-495.

- Šimić G, Leko MB, Wray S, Harrington C, Delalle I, Jovanov-Milošević N, Bažadona D, Buée L, de Silva R, Di Giovanni G, Wischik C, Hof PR (2016). Tau protein hyperphosphorylation and aggregation in Alzheimer's disease and other tauopathies, and possible neuroprotective strategies. *Biomolecules* 6, 6.
- Singh TJ, Grundke-Iqbal I, Wu WQ, Chauhan V, Novak M, Kontzekova E, Iqbal K (1997). Protein kinase C and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylate three-repeat and four-repeat tau isoforms at different rates. *Mol. Cell. Biochem.*, 168(1-2): 141-148.
- Singla N, Dhawan DK (2014). Zinc modulates aluminium-induced oxidative stress and cellular injury in rat brain. *Metallomics*, 6: 1941-1950.
- Smith IK, Vierheller TL, Thorne CA (1988). Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5, 5'-dithiobis (2nitrobenzoic acid). *Analytical Biochem.*, 175(2):408-413.
- Sobhani R, Pal AK, Bhattacharjee A, Mitra S, Aguan K (2017). Screening indigenous medicinal plants of northeast India for their anti-Alzheimer's properties. *Pharmacog. J.*, 9(1): 46-54.
- Soeda Y, Takashima A (2020). New insights into drug discovery targeting tau protein. *Front. Mol. Neurosci.*, 13: 590896.
- Sofowara A (1993). Medicinal Plants and Traditional Medicine in Africa. 2nd ed. Spectrum Books Limited, Ibadan, Nigeria. 97-145.
- Soldan A, Pettigrew C, Albert M (2020). Cognitive reserve from the perspective of preclinical Alzheimer disease: 2020 update. *Clin. Geriatr Med.*, 36(2): 247-263.
- Sotiropoulos I, Galas M-C, Silva JM, Skoulakis E, Wegmann S, Maina MB, Blum D, Sayas CL, Mandelkow E-M, Mandelkow E, Spillantini MG, Sousa N, Avila J, Medina M, Mudher A and Buee L (2017). Atypical, non-standard functions of the microtubule associated Tau protein. *Acta Neuropathol Com.*, 5:91.
- Spillantini MG, Murrell JR, Goedert M, Farlow MR, Klug A, Ghetti B (1998). Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95: 7737-7741.
- St George-Hyslop P, Petit A (2005). Molecular biology and genetics of Alzheimer's disease. *C. R. Biol.*, 328(2): 119-130.
- Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P (1985). The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacol.*, 85(3): 367-370.

- Stone WS, Croul CE, Gold PE (1988).** Attenuation of scopolamine-induced amnesia in mice. *Psychopharmacol.*, 96: 417-420.
- Stoothoff W, Johnson G (2005).** Tau phosphorylation: physiological and pathological consequences. *BBA – Mol. Basis Dis.*, 1739(2): 280-297.
- Stopford CL, Thompson JC, Neary D, Richardson AM, Snowden JS (2012).** Working memory, attention, and executive function in Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Cortex*, 48: 429-446.
- Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD (1993).** Apolipoprotein-E – High-avidity binding to β -amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 90: 9649-9653.
- Stuchlik A (2014).** Dynamic learning and memory, synaptic plasticity and neurogenesis: an update. *Front. Behav. Neurosci.*, 8, 106.
- Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Duke M, Wiederhold KH, Mistl C, Rothacher S, Ledermann B, Bürki K, Frey P, Paganetti PA, Waridel C, Calhoun ME, Jucker M, Probst A, Staufenbiel M, Sommer B (1997).** Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(24): 13287-13292.
- Sultan A, Nessler F, Violet M, Begard S, Loyens A, Talahari S, Mansuroglu Z, Marzin D, Sergeant N, Humez S, Colin M, Bonnefoy E, Buée L, Galas MC (2011).** Nuclear Tau, a Key Player in Neuronal DNA Protection. *J. Biol. Chem.*, 286(6): 4566-4575.
- Sun W, Qureshi HY, Cafferty PW, Sobue K, Agarwal-Mawal A, Neufeld KD, Paudel HK (2002).** Glycogen synthase kinase-3 beta is complexed with tau protein in brain microtubules. *J. Biol. Chem.*, 277(14): 11933-11940.
- Sun X, Chen W-D, Wang Y-D (2015).** β -Amyloid: the key peptide in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Front. Pharmacol.*, 6:221.
- Takeda A, Itoh H, Tamodo H, Oku N (2006).** Responsiveness to kainate in young rats after 2 – week zinc deprivation. *Biometals*, 19: 565-572.
- Tang KS (2019).** The cellular and molecular processes associated with scopolamine-induced memory deficit: A model of Alzheimer's biomarkers. *Life Sciences*, 233 (2019) 116695.

- Taniguchi S, Suzuki N, Masuda M, Hisanaga S, Iwatsubo T, Goedert M, Hasegawa M (2005).** Inhibition of heparin-induced tau filament formation by phenothiazines, polyphenols, and porphyrins. *J. Biol. Chem.*, 280(9): 7614-7623.
- Tanner CM, Goldman SM, Webster Ross G, Grate SJ (2014).** The disease intersection of susceptibility and exposure: Chemical exposures and neurodegenerative disease risk. *Alzheimer's Dis Demen.*, 10: 213-225.
- Tapia-Rojas C, Cabezas-Opazo F, Deaton CA, Vergara EH, Johnson GVW, Quintanilla RA, (2019).** It's all about tau. *Prog. Neurobiol.*, 175: 54-76.
- Teixeira J, Silva T, Andrade PB, Borges F (2013).** Alzheimer's disease and antioxidant therapy: how long how far? *Curr. Med. Chem.*, 20(24): 2939-2952.
- Tewari D, Stankiewicz AM, Mocan A, Sah AN, Tzvetkov NT, Huminiecki L, Horbanczuk JO, Atanasov AG (2018).** Ethnopharmacological approaches for dementia therapy and significance of natural products and herbal drugs. *Front. Aging Neurosci.*, 10:3.
- Thakur G, Micic M, Yang Y, Li W, Movia D, Giordani S, Zhang H, Leblanc RM (2011).** Conjugated quantum dots inhibit the amyloid β (1–42) fibrillation process. *Int. J. Alzheimer's Dis.*, 2011, 502386.
- Tian X, Sui S, Huang J, Bai JP, Ren TS, Zhao QC (2014).** Neuroprotective effects of *Arctium lappa* L. roots against glutamate-induced oxidative stress by inhibiting phosphorylation of p38, JNK and ERK 1/2 MAPKs in PC12 cells. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 38: 189-198.
- Tianyi FL, Agbor VN, Njamnshi AK, Atashili J (2019).** Factors associated with the prevalence of cognitive impairment in rural elderly Cameroonian population: a community-based study in Sub-saharan Africa. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.*, 47: 104-113.
- Torrent L, Ferrer I (2012).** PP2A and Alzheimer disease. *Curr. Alzheimer Res.*, 9(2): 248-256.
- Trease GE, Evans WC (1989).** Pharmacognosy, 13th edition, Bailliere Tindall, London, England. 683-684.
- Trojanowski JQ, Lee V M-Y (1995).** Phosphorylation of paired helical filament tau in Alzheimer's disease neurofibrillary lesions: focusing in phosphatases. *FASEB J.*, 9: 1570-1576.
- Tsikakos D (2017).** Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: analytical and biological challenges. *Anal. Biochem.*, 524: 13-30.

- Tuszynski MH, U H-S, Amaral DG, Gage FH (1990).** Nerve growth factor infusion in primate brain reduces lesion-induced cholinergic neuronal degeneration. *J. Neurosci.*, 10: 3604-3614.
- Uddin S, Nasrullah, Hossain S, Rahman M, Sarwar S, Amran S, Sadik G, Rashid M, Asaduzzaman (2016).** Evaluation of nootropic activity of *Persicaria flaccida* on cognitive performance, brain antioxidant markers and acetylcholinesterase activity in rats: implication for the management of Alzheimer's disease. *American J. Psychiatry Neurosci.*, 4(2): 26-37.
- Uronen RL, Huttunen HJ (2016).** Genetic risk factors of Alzheimer's disease and cell-to-cell transmission of Tau. *J. Neurol. Neuromed.*, 1(2): 17-22.
- Utton MA, Noble WJ, Hill JE, Anderton BH, Hanger DP (2005).** Molecular motors implicated in the axonal transport of tau and alpha-synuclein. *J. Cell Sci.*, 118(20): 4645-4654.
- Van Dam D, De Deyn PP (2011).** Animal models in the drugs discovery pipeline for Alzheimer's disease. *Brit. J. Pharmacol.*, 164: 1285-1300.
- Vardy ERLC, Kellett KAB, Cocklin SL, Hooper NM (2012).** Alkaline phosphatase is increased in both brain and plasma in Alzheimer's disease. *Neurodegener. Dis.*, 9: 31-37.
- Varshney H, Siddique YH (2021).** Role of natural products against Alzheimer's disease. *CNS Neurol. Disord, Drug Targets*, 20(10): 904-941.
- Verheijen J, Sleegers K (2018).** Understanding Alzheimer Disease at the Interface between Genetics and Transcriptomics. *Trends in Genetics*, 34. 6.
- Vickers MH, Breier BH, Cutfield WS, Hofman PL, Gluckman PD (2000).** Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 279(1): E83-87.
- Wang C, Xiao Y, Yang B, Wang Z, Wu L, Su X, Brantner A, Kuang H, Wang Q (2014).** Isolation and screened neuroprotective active constituents from the roots and rhizomes of *Valeriana amurensis*. *Fitoterapia*, 96: 48-55.
- Wang J, Bi W, Cheng A, Freire D, Vempati P, Zhao W, Gong B, Janle EM, Chen TY, Ferruzzi MG, Schmeidler J, Ho L, Pasinetti GM (2014).** Targeting multiple pathogenic mechanisms with polyphenols for the treatment of Alzheimer's disease-experimental approach and therapeutic implications. *Front Aging Neurosci.*, 14; 6:42.
- Wang J-Z, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2007).** Kinases and phosphatases and tau sites involved in Alzheimer neurofibrillary degeneration. *Eur. J. Neurosci.*, 25(1): 59-68.

- Wang Z, Lin D, Zhang L, Liu W, Tan H, Ma J (2017).** Penehyclidine hydrochloride prevents anoxia/reoxygenation injury and induces H9c2 cardiomyocyte apoptosis via a mitochondrial pathway. *Eur. J. Pharmacol.*, 797: 115-123.
- Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, and Kirschner MW (1975).** A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 72(5): 1858-1862.
- Weon JB, Jung YS, Ma CJ (2016).** Cognitive-Enhancing Effect of *Dianthus superbis* var. *Longicalycinus* on Scopolamine-Induced Memory Impairment in Mice. *Biomol. Ther.*, 24(3): 298-304.
- Weon JB, Lee J, Eom MR, Jung YS, Ma CJ (2014).** The effects of *Loranthus parasiticus* on scopolamine-induced memory impairment in mice. *Evi Based Complement Alternat Med.*, 2014:860180.
- Westphal D, Kluck RM, Dewson G (2014).** Building blocks of the apoptotic pore: how Bax and Bak are activated and oligomerize during apoptosis. *Cell Death and Differ.*, 21: 196-205.
- Wischik CM, Harrington CR, Storey JMD (2014).** Tau-aggregation inhibitor therapy for Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol.*, 88: 529-539.
- Wisniewski H, Terry RD, Hirano A (1970).** Neurofibrillary pathology. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 29: 163-176.
- Witter S, Witter R, Vilu R, Samoson A (2018).** Medical Plants and Nutraceuticals for Amyloid- β Fibrillation Inhibition. *J. Alzheimer's Dis. Reports*, 2: 239-252.
- Wolf BB, Schuler M, Echeverri F, Green DR (1999).** Caspase-3 is the primary activator of apoptotic DNA fragmentation via DNA fragmentation factor-45/inhibitor of caspase-activated DNase inactivation. *J. Biol. Chem.*, 274: 30651-30656.
- Wollen KA (2010).** Alzheimer's disease: the pros and cons of pharmaceutical, nutritional, botanical, and stimulatory therapies, with a discussion of treatment strategies from the perspective of patients and practitioners. *Altern. Med. Rev.*, 15(3): 223-244.
- World Alzheimer Association (2017).** Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia: J. Alzheimer's Ass.*, 13(4): 325-373.
- Yadav E, Singh D, Yadav P, Verma A (2018).** Comparative Evaluation of *Prosopis cineraria* (L.) Druce and Its ZnO Nanoparticles on Scopolamine Induced Amnesia. *Front. Pharmacol.*, 9:549.

- Yadav MK, Singh SK, Singh M, Mishra SS, Singh AK, Tripathi JS, Tripathi YB (2019).** Neuroprotective Activity of *Evolvulus alsinoides* & *Centella asiatica* Ethanolic Extracts in Scopolamine-Induced Amnesia in Swiss Albino Mice. *Maced. J. Med. Sci.*, 7(7): 1059-1066.
- Yadav MK, Singh SK, Tripathi JS, Tripathi YB (2016).** Medicinal plants with nootropic effect: A review. *Eur. J. Biomed. Pharm. sci.*, 3(8): 128-132.
- Yamazaki Y, Zhao N, Caulfield TR, Liu C-C, Bu G (2019).** Apolipoprotein E and Alzheimer disease: pathobiology and targeting strategies. *Nat. Rev. Neurol.*, 15: 501-518.
- Yan JJ, Kim DH, Moon YS, Jung JS, Ahn EM, Baek NI, Song DK (2004).** Protection against beta-amyloid peptide induced memory impairment with long-term administration of extract of *Angelica gigas* or decursinol in mice. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 28: 25-30.
- Yang S, Gong Q, Wu Q, Li F, Lu Y, Shi J (2014).** Alkaloids enriched extract from *Dendrobium nobile* Lindl. attenuates tau protein hyperphosphorylation and apoptosis induced by lipopolysaccharide in rat brain. *Phytomed.*, 21:712-716.
- Yao Y, Wang Y, Kong L, Chen Y, Yang J (2018).** Osthole decreases tau protein phosphorylation via PI3K/AKT/GSK-3 β signaling pathway in Alzheimer's disease. *Life Sci.*, 217: 16-24.
- Zhang D, Wang Z, Sheng C, Peng W, Hui S, Gong W, Chen S (2015).** Icariin prevents amyloid beta-induced apoptosis via the PI3K/Akt pathway in PC-12 cells. *Evidence-Based Complem. Altern. Med.*, 235265.
- Zhang L-D, Ma L, Zhang L, Dai J-G, Chang L-G, Huang P-L, Tian X-Q (2015).** Hyperbaric Oxygen and Ginkgo Biloba Extract Ameliorate Cognitive and Memory Impairment via Nuclear Factor Kappa-B Pathway in Rat Model of Alzheimer's disease. *Chin. Med. J.*, 128: 3088-3093.
- Zhang Z, Zhao R, Qi J, Wen S, Tang Y, Wang D (2011).** Inhibition of glycogen synthase kinase-3 β by *Angelica sinensis* extract decreases β -amyloid-induced neurotoxicity and tau phosphorylation in cultured cortical neurons. *J Neurosci Res.*, 89: 437-447.
- Zhang ZL, Zuo YM, Wang QH, Xiao HB, Kuang HX (2010).** Effects of *Valeriana amurensis* on the expressions of iNOS, COX-2 and IkappaCB-alpha in Alzheimer's disease model rat's brain. *Zhong Yao Cai*, 33:581-583.
- Zhdanov DD, Fahmi T, Wang X, Apostolov EO, Sokolov NN, Javadov S, Basnakian AG (2015).** Regulation of apoptotic endonucleases by EndoG. *DNA Cell Biol.*, 34 (5): 316-326.

- Zheng H, Koo EH (2006).** The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Mol. Neurodegener.*, 1: 5.
- Zheng H, Koo EH (2011).** Biology and pathophysiology of the amyloid precursor protein. *Mol. Neurodegener.*, 6(1): 27.
- Zheng M, Zou C, Li M, Huang G, Gao Y, Liu H (2017).** Folic acid reduces Tau phosphorylation by regulating PP2A methylation in streptozotocin-induced diabetic mice. *Int. J. Mol. Sci.*, 18:861.
- Zheng R, Shi Y, Jia Z, Zhao C, Zhang Q, Tan X (2010).** Fast repair of DNA radicals. *Chem. Soc. Rev.*, 39: 2827-2834.
- Zhuang J, Li Y, Chi Y (2016).** Role of p38 MAPK activation and mitochondrial cytochrome-c release in allicin-induced apoptosis in SK-N-SH cells. *Anti-Cancer Drugs*, 27(4): 312-317.
- Zingue S, Foyet HS, Abaïssou HHN, Djiogue S, Fachagbo P, Ezo'o Ezo'o Y, Njamen D (2018).** Effects of *Ficus umbellata* (Moraceae) aqueous extract and 7-methoxycoumarin on scopolamine induced spatial memory impairment in ovariectomized wistar rats. *Behav. Neurol.*, 2018, 5751864.
- Zuo YM, Zhang ZL, Wang QH, Xie N, Kuang HX (2010).** Effects of *Valeriana amurensis* on the expressions of betaAPP, Abeta(1-40) and caspase-3 in Alzheimer's disease model rat's brain. *Zhong Yao Cai*, 33: 233-236.

ANNEXES

ANNEXES

Annexe 1 : Préparation des réactifs

Dosage des polyphénols totaux

Solution d'acide gallique 100 µg/mL

Peser 0,01g d'acide gallique et dissoudre dans le méthanol qsp 100 mL

Solution de Folin-Ciocalteu 2 N

Prelever 10 mL du réactif de Folin-Ciocalteu et compléter le volume avec de l'eau distillée qsp 100 mL

Solution de Na₂CO₃ 20%

Peser 20 g de Na₂CO₃ et dissoudre dans d'eau distillée qsp 100 mL

Dosage des flavonoïdes

Solution de quercétine 10 µg/mL

Peser 0,001 g de Quercétine et dissoudre dans le méthanol qsp 100 mL

Solution d'AlCl₃ 2%

Peser 2g d'AlCl₃ et dissoudre dans le méthanol qsp 100 mL

Peptide Aβ₄₂

Le peptide Aβ (Aβ₄₂) a été reconstitué en dissolvant la poudre d'Aβ₄₂ dans une solution d'hydroxyde d'ammonium stérile 1%. Le mélange est passé aux ultrasons (sonication) pendant 30 s et incubé à 37°C pendant 5 jours afin d'obtenir les formes oligomériques du peptide.

Iodure de propidium

La solution mère d'iodure de propidium est préparée dans de l'eau milliQ à la concentration de 1 mg/mL. Cette solution est stockée à +4°C à l'abri de la lumière.

DCF-DA 20 µM

Prélever 10 µL de la solution stock de DCF-DA 20 mM et compléter le volume à 100 mL avec le PBS

Méthylcellulose 0,5%

Dissoudre 0,5 g de méthylcellulose dans qsp 100 mL d'eau distillée.

Donépézil 1 mg/kg

Dissoudre un comprimé de chlorhydrate de donépézil (10 mg) dans qsp 91,2 mL de méthylcellulose 0,5%.

Extrait de KG 50 mg/kg

Dissoudre 0,25 g de poudre d'extrait de KG dans qsp 50 mL de méthylcellulose 0,5%.

Préparation du Bouin

Mélanger 300 mL d'acide picrique, 80 mL de formol 40%, 20 mL d'acide acétique glacial.

KCl 1,15%

Dissoudre 1,15 g de poudre de KCl dans qsp 100 mL d'eau distillée.

Dosage des protéines**➤ Biuret**

Dissoudre 1,5g de sulfate de cuivre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), 6g de tartrate Na/K. $4\text{H}_2\text{O}$ et 30 g de NaOH dans 1L d'eau distillée.

➤ BSA (3 mg/mL)

Dissoudre 45 mg de BSA dans qsp 15 mL d'eau distillée.

Catalase

Tampon phosphate

➤ H_2O_2 0,01N

Prélever 560 μL de H_2O_2 20% et compléter le volume à qsp 100 mL de tampon phosphate.

➤ Permanganate de potassium 0,005N

Dissoudre 0,079 g de permanganate de potassium dans qsp 100 mL d'eau distillée.

➤ H_2SO_4 5N

Prélever 14,2 mL de H_2SO_4 et compléter le volume à qsp 100 mL d'eau distillée.

Activité phosphatase alcaline**➤ Tampon de coloration Tris 20 mM pH 7,5, MgCl_2 5 mM, EGTA 1 mM, β -mercaptoéthanol 0,02%, BSA 0,1 mg/mL**

Mélanger 0,242g Tris; 0,048g MgCl_2 ; 0,038g EGTA; 20 μL de β -mercaptoéthanol et 10 mg BSA dans 100 mL d'eau distillée et ajuster le pH à 7,5.

➤ pNPP 10 mM

Dissoudre 0,037 g de pNPP dans qsp 10 mL de tampon Tris.

➤ NaOH 5N

Dissoudre 10 g de NaOH dans qsp 50 mL d'eau distillée.

Rouge Congo

Tampon phosphate 5 mM pH 7,4

Solution 1 : Dissoudre 0,15 g de NaH_2PO_4 dans qsp 250 mL d'eau distillée.

Solution 2 : Dissoudre 0,627 g de Na_2HPO_4 dans qsp 350 mL d'eau distillée.

Titrer la solution 2 par la solution 1 jusqu'au pH 7,4.

Solution stock : Dissoudre 0,7 g de rouge Congo et 1,755 g de NaCl dans 200 mL de tampon phosphate.

SDS PAGE

Gel de séparation 12% de polyacrylamide à partir d'une solution mère

Pour 10 mL

Composantes	Volume (mL)
Eau distillée et désionisée (ddH ₂ O)	3,3
Mélange d'acrylamide 30%	4
Tris 1,5M, pH 8,8	2,6
SDS 10%	0,1
persulfate d'ammonium 10%	0,1
TEMED	0,004

Gel de concentration (stacking)

Pour 5 mL

Composantes	Volume (mL)
Eau distillée et désionisée (ddH ₂ O)	2,975
Mélange d'acrylamide 30%	0,67
Tris 0,5M pH 6,8	1,25
SDS 10%	0,05
persulfate d'ammonium 10%	0,05
TEMED	0,005

Tampon d'échantillon (5X)

SDS 10% (m/v)

Dithiothréitol ou β -mercapto-éthanol 10 mM

Glycérol 20% (v/v)

Tris-HCl 0.2 M, pH 6.8

Blue de bromophénol 0.05% (m/v)

Tampon de migration (1X)

Tris-HCl 25 mM

Glycine 200 mM

SDS 0.1% (m/v)

Solution de BCA

- la solution A est constituée de: 2 g d'hydroxyde de sodium NaOH (4 mg/mL) (Sigma Aldrich), 10 g de carbonate de sodium Na₂CO₃ (20 mg/mL) (Sigma, Aldrich) et 400 mL d'H₂O. Compléter avec l'eau jusqu'à un volume final de 500 mL.

- la solution B est constituée de 100 mg de potassium sodium tartrate KNaC₄H₄O₆•4H₂O (10 mg/mL) (Sigma, Aldrich), 50 mg de sulfate de cuivre CuSO₄ (5 mg/mL) (Sigma-Aldrich) et 8 mL d'H₂O. Compléter avec l'eau jusqu'à 10 mL.

Le kit de dosage des protéines est constitué de trois réactifs :

- Une solution d'acide bicinchonique constituée de 1000 ml d'une solution contenant l'acide bicinchonique, le carbonate de sodium, le tartrate de sodium, et le bicarbonate de sodium dans du NaOH 0,1 N (Réactif A).

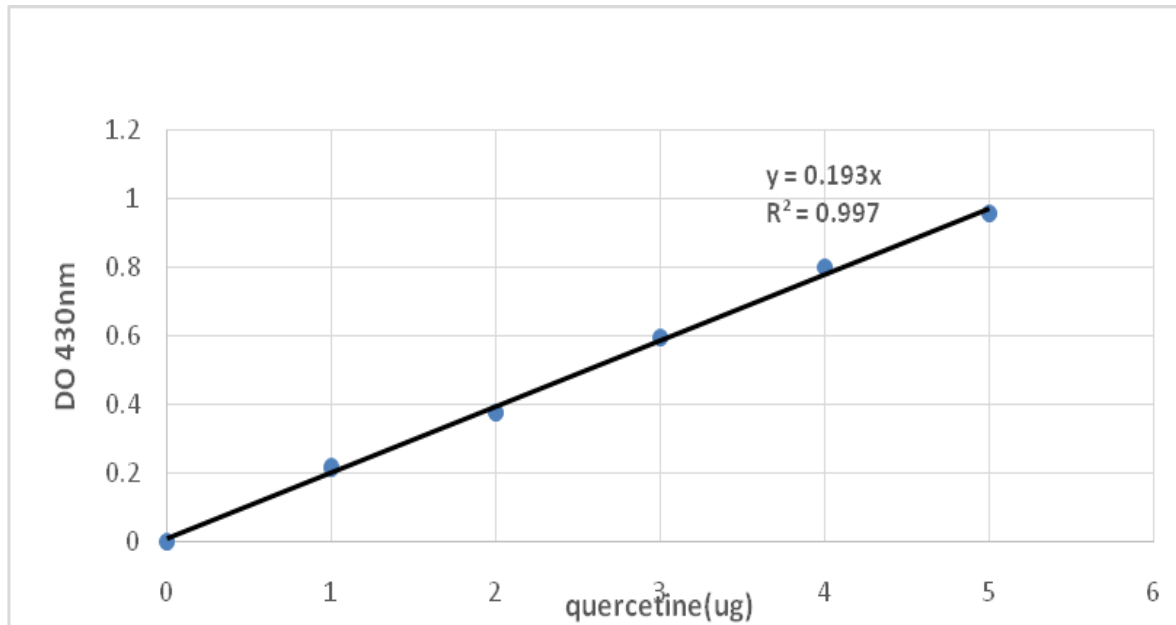
- Une solution de sulfate de cuivre qui est constitué de 25 ml d'une solution contenant 4% (w/v) de sulfate de cuivre (II) pentahydraté (Réactif B).

- Une solution étalon d'albumine de sérum bovin (2 mg/mL).

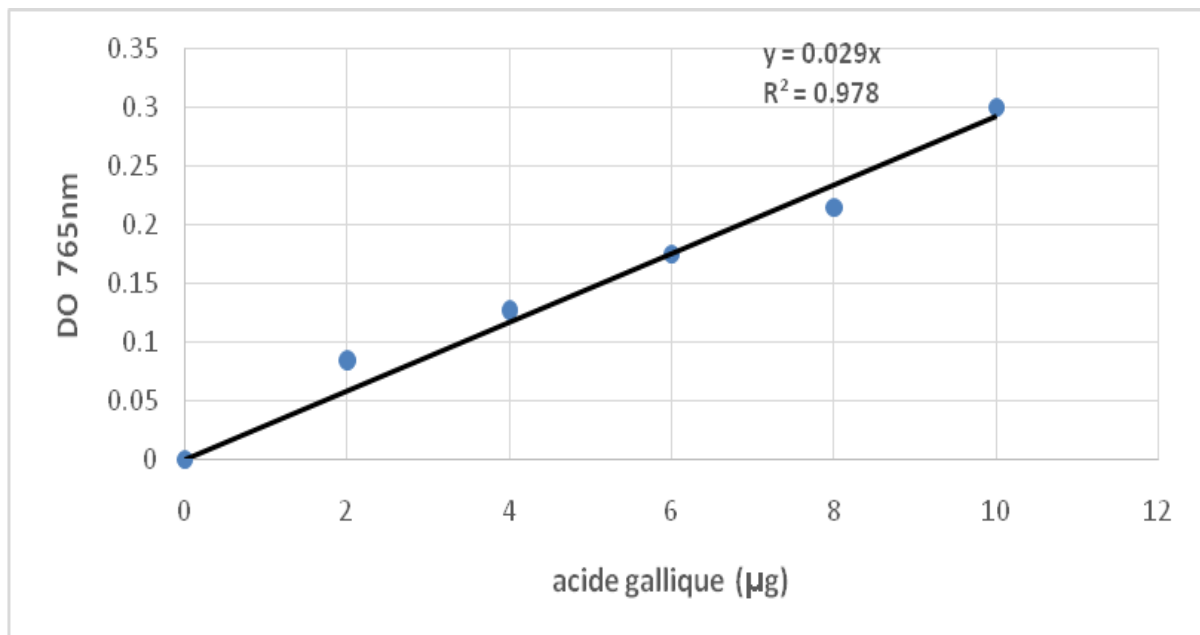
La solution de travail de BCA est obtenue en mélangeant la solution A et la solution B dans les proportions 50 : 1.

Annexe 2 : Courbes d'étalonnage**Etalonnage flavonoïdes**

Quercétine 10 µg/mL

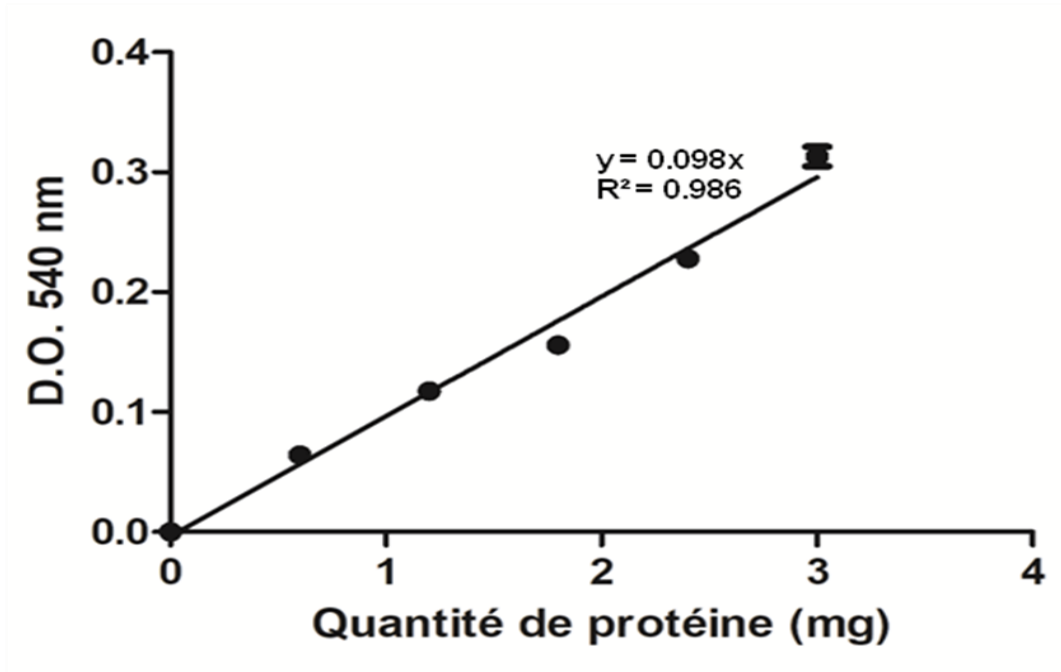
**Etalonnage polyphénols totaux**

Acide gallique 100 µg/mL



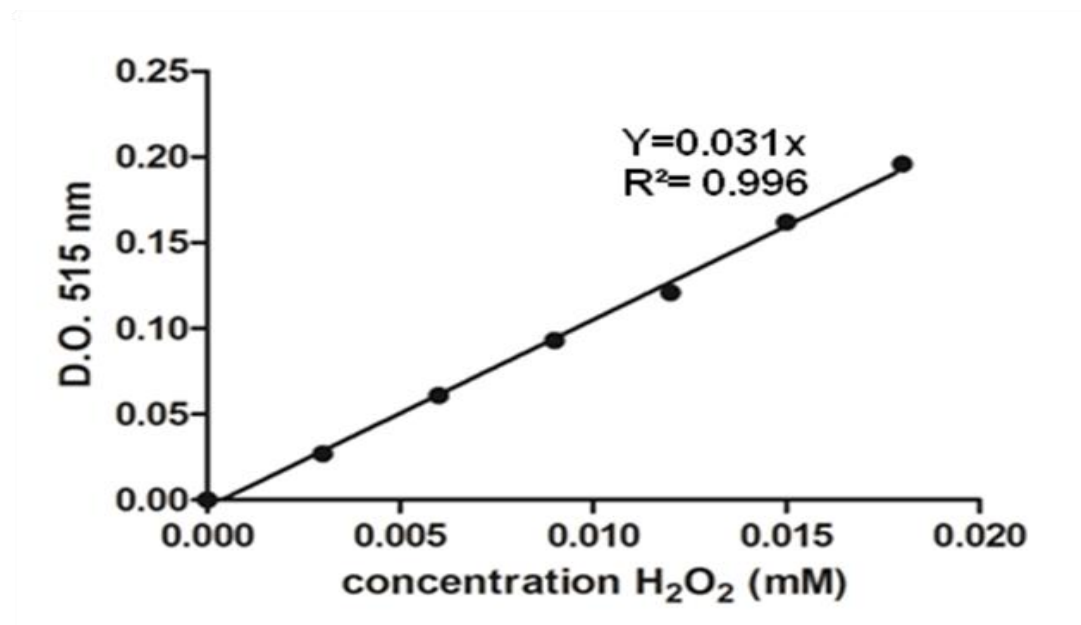
Dosage des protéines

Courbe d'étalonnage (BSA 3mg/mL)



Activité de la Catalase

Etalonnage de H_2O_2 (0,3%)



Annexe 3 : Figures supplémentaires

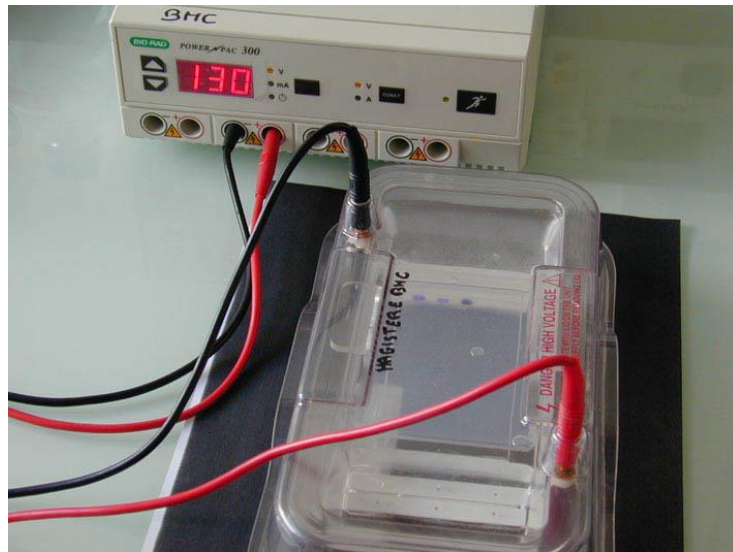


Figure 51. Dispositif utilisé pour la préparation et la migration du gel (Photographie Ella, 2019)

Le générateur permet d'appliquer une tension aux bornes du gel de polyacrylamide contenant l'échantillon. Les protéines chargées négativement (tampon contenant le SDS) migrent de la cathode (borne négative) vers l'anode (borne positive).

A**B**

Figure 52. (A) Rats male Albino de souche Wistar (B) Scopolamine Copper ampoules injectables (Photographie Ella, 2019)

Les animaux utilisés étaient des rats mâles adultes de souche Wistar et la scopolamine utilisée pour induire l'amnésie chez ces était sous forme d'ampoules injectables à la concentration de 0,5 mg/2mL.

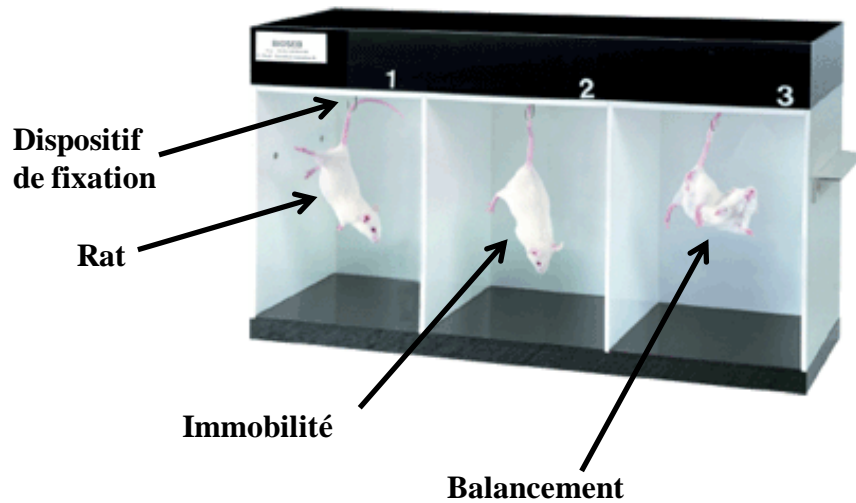


Figure 53. Dispositif de suspension caudale avec les comportements de balancement et d'immobilité.

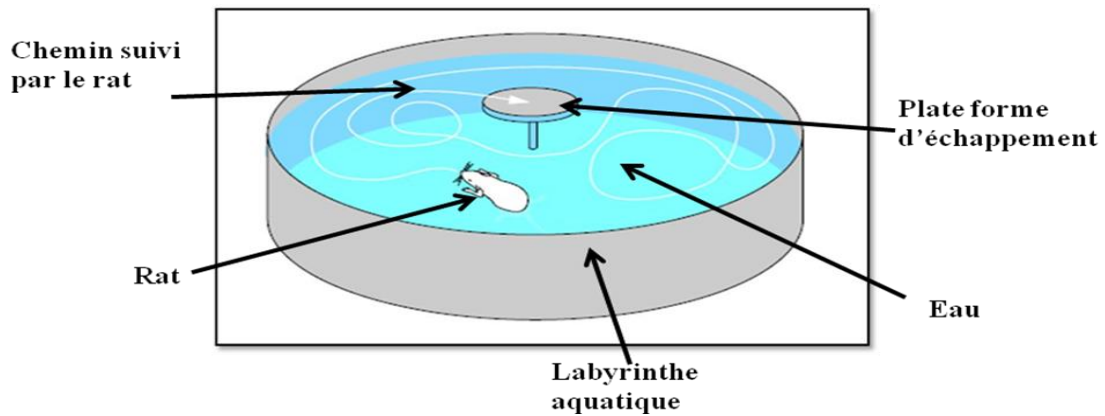


Figure 54. Dispositif de la piscine de Morris avec un exemple de trajectoires suivie par un rat depuis le premier point de lâché jusqu'à la plateforme

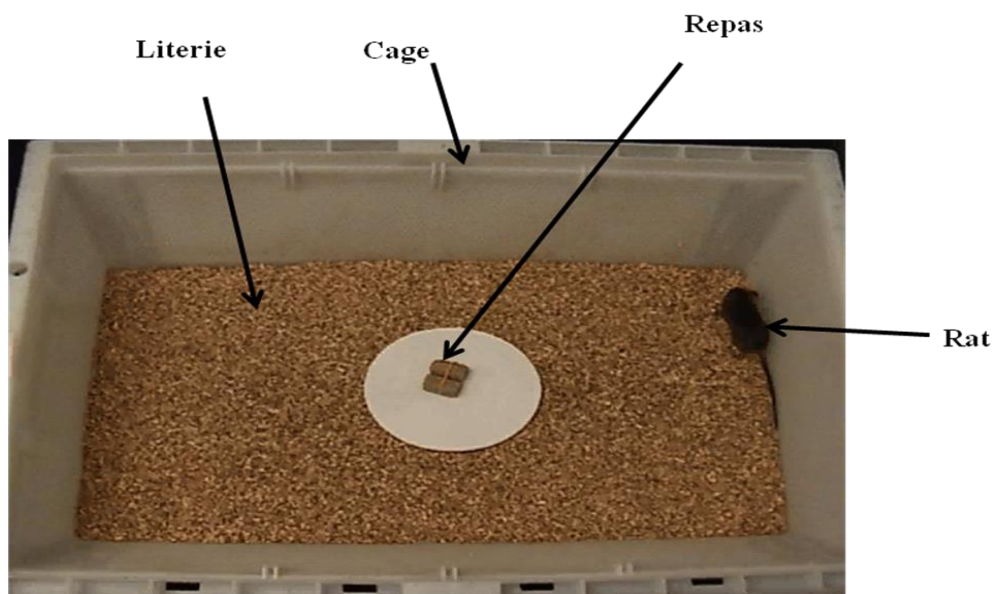


Figure 55. Dispositif du test à l'alimentation supprimé par la nouveauté

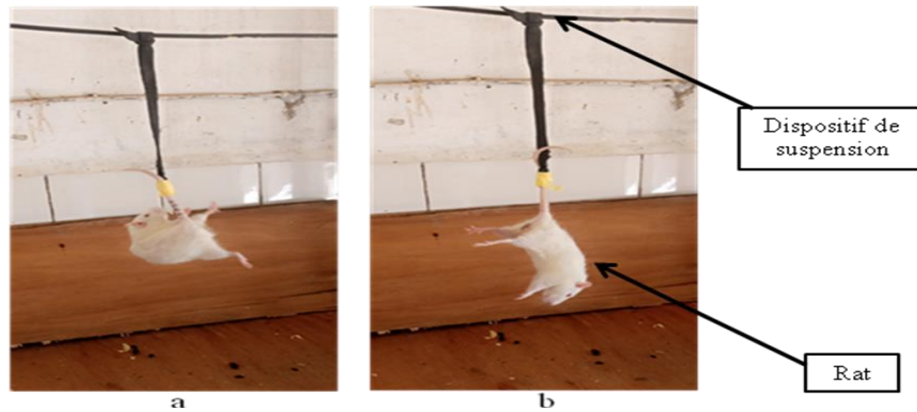


Figure 56. Observations du comportement de balancement (a) et comportement d'immobilité (b)

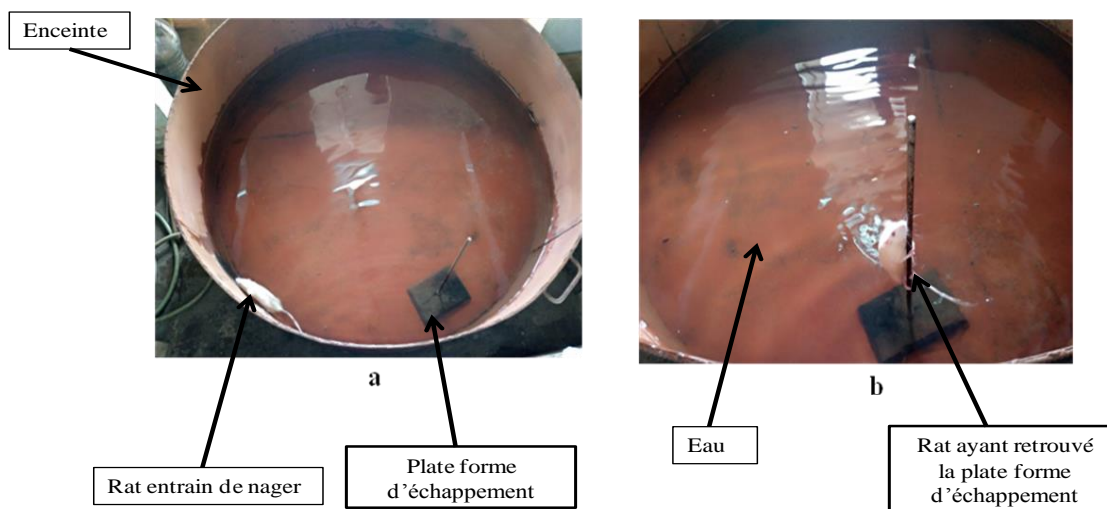


Figure 57. Comportement du rat dans le bassin ayant servi au test de Morris (a) rat entrain de nager ; (b) rat ayant retrouvé la plate-forme d'échappement.

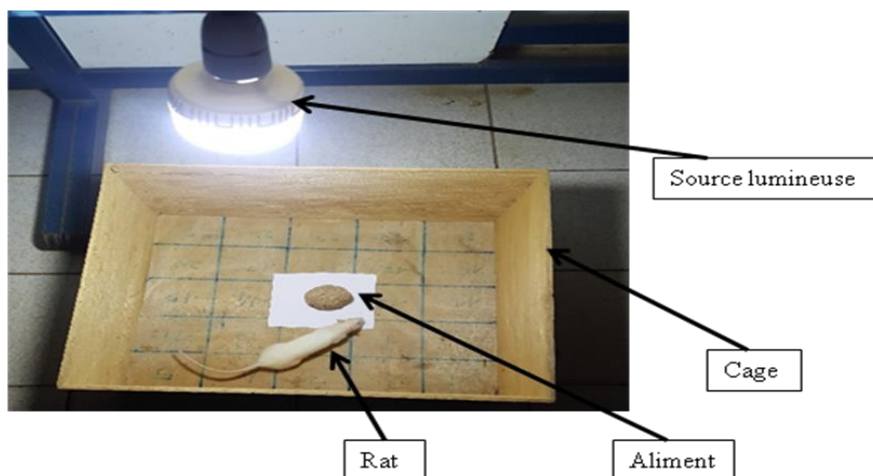


Figure 58. Comportement du rat dans l'arène servant au test de l'aliment supprimé par la nouveauté en présence d'une source de lumière.

PUBLICATIONS

PUBLICATIONS

Ella Fils Armand, Manjula Shantaram, Njyou Frédéric Nico, Fewou Ngamli Simon, Moundipa Fewou Paul (2019). **Potential of medicinal plant compounds to targeting Tau protein in the therapy of Alzheimer's disease – A review.** *Biomedicine*, 39(2): 217-227. <http://doi.org/10.51248/.v39i2.184>.

Fils Armand Ella, Manjula Shantaram, Simon Ngamli Fewou, Frédéric Nico Njyou, Sayali Chandrashekar Deolankar, Prashant Kumar Modi, Paul Fewou Moundipa (2020). **Prevention of β -amyloid-induced toxicity in a differentiated neuronal (IMR32) cell line by *Khaya grandifolia* (Welw) C.DC.** *International Journal of Phytomedicine*, 12(4): 107-118. <http://dx.doi.org/10.5138/09750185.2443>.

Potential of medicinal plant compounds to targeting Tau protein in the therapy of Alzheimer's disease– A review

Ella Fils Armand^{1,2}, Manjula Shantaram², Njyou Frédéric Nico¹, Fewou Ngamli Simon³,
Moundipa Fewou Paul^{1*}

¹Laboratory of Pharmacology and Toxicology, Department of Biochemistry, Faculty of Science, University of Yaoundé 1, Yaoundé, Cameroon.

²Department of Studies & Research in Biochemistry, Mangalore University, Post Graduate Centre, Chikka Aluvara-571232, Kodagu, Karnataka, India.

³Faculty of Health Science, Université des Montagnes, Bangangté, Cameroon.

(Received: April 2019 Revised: May 2019 Accepted: June 2019)

*Corresponding author: **Moundipa Fewou Paul**. Email: pmoundipa@hotmail.com

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a devastating neurodegenerative disorder with complex etiology. AD is characterized by blood-brain barrier disruption, oxidative stress, mitochondrial impairment, neuro-inflammation, hypo-metabolism; it decreases in acetylcholine levels and a reduction of cerebral blood flow. It is also not solely the end-product of aberrantly processed, misfolded, and aggregated oligomeric amyloid-beta peptides but hyper phosphorylated Tau (tubulin binding protein) which formed senile plaque and intracellular neurofibrillary tangles respectively. However, despite the long-term and worldwide effort for a more effective therapy, the only available treatment is a symptomatic use of acetylcholinesterase inhibitors and memantine. Then, many researchers focused their attention to modulate amyloid-beta peptides. These therapeutic approaches as well as those based on cholinergic or amyloid theory have not brought the desired benefits yet. Thus, the main features related with the Tau pathology found in AD are Tau phosphorylation and aggregation. Based on the biochemically diverse range of pathological Tau protein, a number of approaches have been proposed to develop new potential therapeutics like inhibition of Tau phosphorylation, proteolysis and aggregation; promotion of intra- and extracellular Tau clearance and stabilization of microtubules (MTs). Medicinal plants have been used in different systems of medicine and exhibited their powerful roles in the management and cure of memory disorders. This review paper discusses the potential of medicinal plant molecules to targeting Tau protein in Alzheimer's disease therapy.

Keywords: Alzheimer's disease; medicinal plants; Tau protein; hyper phosphorylation; aggregation therapy; natural compound.

INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is a chronic neurodegenerative disorder that leads to progressive disturbance of cognition function including memory, decision making, orientation to physical surrounding and language (1). 47 million people live with dementia worldwide. This number is projected to increase to more than 131 million by 2050, as population age. It is the most common form of neurodegenerative diseases and represents a major public health problem and then, the most

common cause of progressive dementia in the aging population globally (2). AD is a progressive neurodegenerative disease characterized by senile plaques, neurofibrillary tangles (NFTs); and loss of neurons and synapses in the brain. NFTs are intra-neuronal aggregations mainly composed of abnormally phosphorylated Tau protein. However, Tau phosphorylation is regulated by a balance between Tau kinase and phosphatase activities. Disruption of this equilibrium was suggested to be at the origin of abnormal Tau

phosphorylation and thereby contributes to Tau aggregation (1).

For instance, natural polyphenols, flavonoids and others compounds have reported anti-aggregating capacity to prevent amyloid formation, and a standardized plant extract reduced both amyloid- β and phosphorylated Tau levels in a many transgenic models (3). Tau expression, stabilizing Tau conformations, or clearing hyper phosphorylated Tau aggregates represent challenges for the therapeutic that targeting Tau toxicity in AD. Another approach is to re-stabilize microtubules for preserving neuronal health and axonal transport (4). Pharmacologically, these polyphenols and their derivatives exhibit potential for preventive and therapeutic purposes against protein aggregation during neurodegeneration. Although compounds act on various biochemical pathways, their role in stabilizing the protein degradation machinery at different stages may be an attractive therapeutical strategy to halt the accumulation of misfolded proteins (5).

However, some studies have shown that medicinal plants with potential sources of molecules (natural polyphenols, flavonoids and alkaloids) have neuroprotective effects (5) and can be helpful for the development of the news drugs for Alzheimer's disease.

Now, the current treatments of Alzheimer's disease are symptomatic and do not affect the underlying course of the disease, and clinical trials with research derived molecules have proven inconclusive. Therefore, it is imperative to find new and alternative treatments like phytotherapy which is a science-based approach to the use of natural products with medicinal

purposes. It is now widely accepted that Tau is an important therapeutic target in neurodegenerative disease (6). These therapeutic include; (a) reduction of Tau hyper phosphorylation using kinase inhibitors and phosphatase activators, (b) activation of proteasome degradation pathways of Tau, (c) Tau clearance by immunotherapy, (d) inhibition of Tau aggregation using small molecules and stabilizing microtubules (MTs; 7). In this paper, we review current ideas regarding the use of medicinal plant compounds as a potential source for development of cure of Alzheimer's disease targeting specifically Tau protein.

Alzheimer disease overview

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia. Ageing is the primary risk for AD. Most common forms of AD are sporadic which start at age 65 around and progressing slowly over. Less than 1% of all cases are early onset familial AD, which is inherited in an autosomal dominant manner and develops similar symptoms as sporadic AD prior to age 65. AD symptoms are associated with progressive loss of neurons and synapses in multiple brain regions, especially in the frontal cortex and hippocampus (8) (Fig. 1A). Literature reports changes in Tau protein and amyloid β oligomers as the most important factors responsible for neuronal dysfunction in the pathogenesis of AD. NFTs observed initially in the entorhinal cortex and hippocampus subsequently extend to the amygdala and cortical areas (temporal, frontal, and parietal) (Fig. 1B; 9).

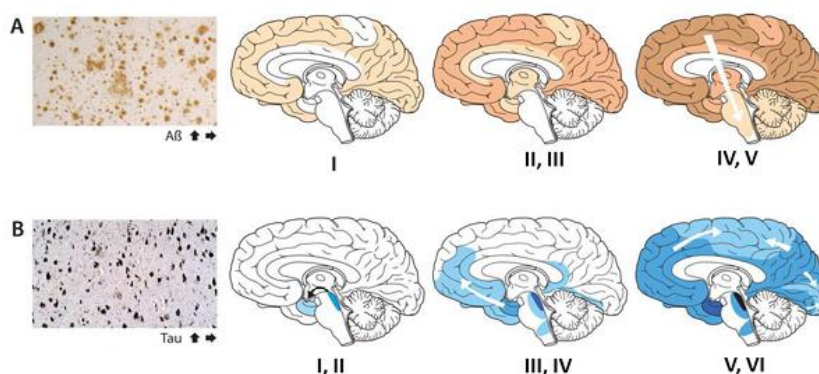


Fig. 1: Spacio-temporal evolution of the lesions in AD. A: Amyloid deposits progression; B: NFTs progression. I, II; III, IV; V, VI: different regions of brain (10).

Ella et al.,: Potential ofAlzheimer's Disease- A review

AD is a progressive neurodegenerative disease that is characterized by the increased abundance of amyloid beta (A β) plaques, and neurofibrillary tangles composed of hyperphosphorylated Tau. Normally, Tau is phosphorylated by kinases like cyclin-dependent kinase 5 (CDK5) and glycogen synthase kinase 3 beta (GSK-3 β). When Tau becomes hyperphosphorylated at phosphorylation sites, it can no longer bind to the MTs. This phosphorylation has been reported to be abnormal in AD. Tau has phosphorylation sites (Threonine or Serine) located in the proline-rich region (P-region) (residues 172–251) and the C-terminal tail region (C-region) (residues 368-441). It is reported that these sites of phosphorylation of Tau are Ser396, Ser262, Ser 202/Thr205 (11).

Alzheimer and TAU protein

Tau is a member of the microtubule-associated protein (MAPs) family. It is a protein that is

highly enriched in neurons and was originally defined by its ability to bind and stabilize MTs. Tau plays a role in mediating axonal transport, neurite outgrowth, synaptic structure and function, and neuronal signaling pathways. Physiologically, Tau involves in neurodegenerative diseases, and most prominently in the pathogenesis of AD. The soluble hyper phosphorylated Tau is, however, clearly distinct from aggregated fibrillary Tau in NFTs, despite both being implicated in Tau toxicity (12).

Tau is a highly soluble and natively unfolded protein that binds and promotes the assembly of MTs. Tau protein contains a tandem repeat of 31 or 32 amino acids in the C-terminal half. The repeat region was shown to have a microtubule binding function, and Tau promotes assembly of tubulin and stabilizes MTs (12; Fig. 2).

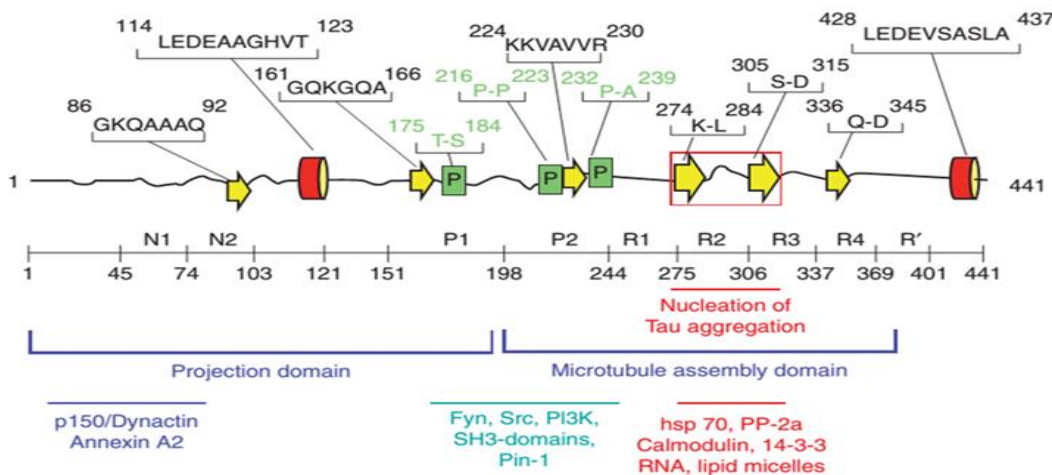


Fig. 2. Domains and structural elements in Tau. Top: Representation of Tau deduced from NMR. Bottom: Approximate location of interaction sites with other proteins (13).

Tau is encoded by a single gene located on chromosome 17 (17q21), possessing 16 exons in its primary transcript. Six different isoforms are expressed by post transcriptional modifications generated by splicing from the primary transcript (6). Mature protein length is about 352 up to 441 amino acid residues, and a molecular- weights of

45–65 k Da depending on the Tau isoforms. The C-terminal region has a domain containing the microtubule binding repeats, which is critical for microtubule assembly, whereas the affinity of Tau for MTs is finely regulated by an orchestrated set of phosphorylation (14; Fig. 3).

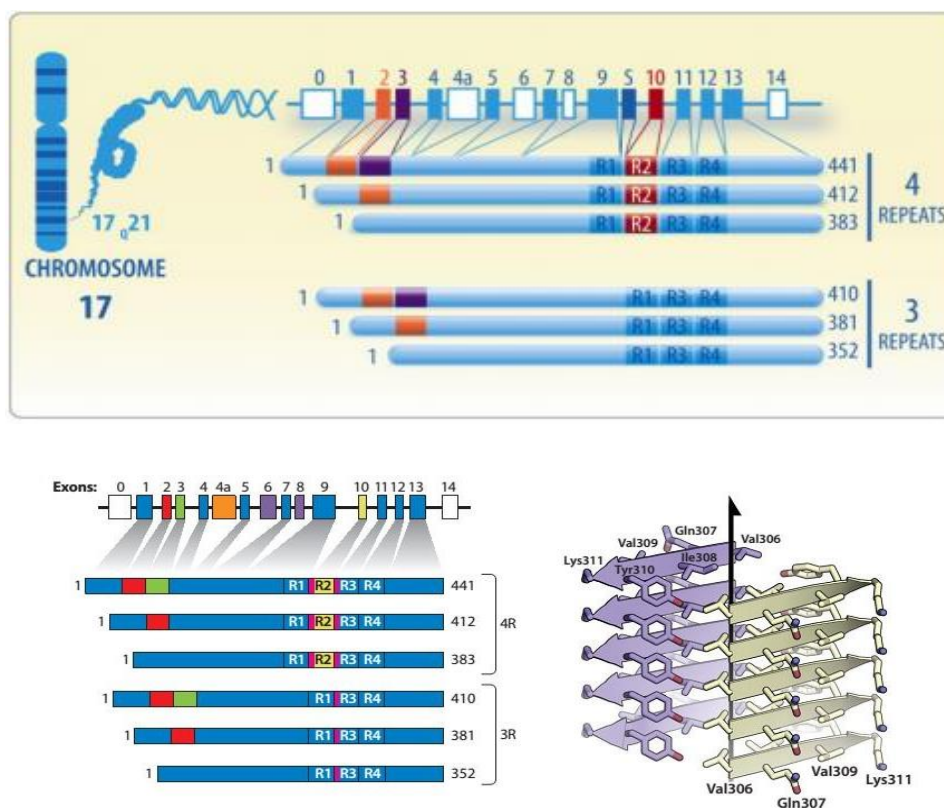


Fig. 3. Domains and alternative splicing of Tau protein. The MAPT (microtubule-associated Protein Tau) gene is situated on the long arm of chromosome 17 at band site 17q21 and encodes to six Tau proteins as product of alternative splicing in the adult human brain. These isoforms are splicing variants of exons 2, 3 and 10 (14).

In tauopathies, Tau accumulates in NFTs that are visualized within dystrophic neurites and cell bodies. The amount of Tau pathology correlates with progressive neuronal dysfunction, synaptic loss, and functional decline in humans. These tangles are bundles of paired helical filaments composed of hyper phosphorylated Tau. Tau promotes tubulin assembly into MTs and stabilizes them. However, the ability of Tau to stabilize MTs is inversely related to the level of Tau hyper phosphorylation. Moreover, Tau may have other post-translational modifications, including glycosylation, ubiquitination, truncations, and nitration (4).

Disruption of this equilibrium of balance between Tau kinase and phosphatase activities was suggested to be at the origin of abnormal tau phosphorylation and thereby might contribute to Tau aggregation. Both kinases and phosphatases have been implicated in the appearance of abnormally phosphorylated Tau (15).

1. Kinases of TAU

It is well-known that some kinases which are involved in the induction of synaptic plasticity modulate Tau phosphorylation (16). Kinases belong to the enzyme group termed “transferases” because they transfer phosphate group from high-energy donor molecules (ATP or GTP) to specific substrates. Tau is a substrate of various protein kinases. Tau kinases include proline-directed Ser/Thr kinases (SP/TP kinases) such as CDK5, GSK3 β , and MAPK, as well as non-SP/TP kinases including microtubule affinity-regulating kinase (MARK)/Par-1, AMPK, protein kinases A, C (PKA, PKC), CK (17).

So, Tau protein kinases are grouped into proline-directed protein kinases (PDPK), protein kinases non-PDPK and tyrosine protein kinases. Among these kinases, GSK-3 β is the major Tau kinase involved in most of the hyper phosphorylated serine/threonine sites in Tau. However, GSK-3 β is a target of the phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/serine/threonine PKB (Akt) signaling pathway (18).

2. Phosphatases of TAU

Ella et al.,: Potential of medicinal plant..... A review

Tau function and subcellular localization are tightly regulated by the orchestrated interplay between phosphorylation and de-phosphorylation events (19). Phosphatases are generally classified into three groups according to their amino acids sequences, the structure of their catalytic site and their sensitivity to inhibitors: phosphoprotein phosphatase (PPP), the metal-dependent protein phosphatase and the protein tyrosine phosphatase (PTP). Tau phosphatases belong to PPP group: PP1, PP2A, PP2B and PP5; and PTP group: phosphatase and tensin homolog (PTEN) (1). Of particular relevance, the phosphatase battlefield is largely led by a distinct pool of protein phosphatase enzymes that are responsible for the bulk of neuronal Tau dephosphorylation particularly protein phosphatase 2A (PP2A) which is the most study. PP2A dysfunction has been linked to Tau hyper phosphorylation and synaptic deficits. Deregulation of PP2A enzymes

also affects the activity of many protein kinases implicated in AD (20).

3. Microtubules

Tau contains a number of lysine residues, of which positive charges are critical for binding to negatively charged microtubules. Tau protein with an abnormal high degree of phosphorylation is hindered from binding to microtubules increasing free Tau protein concentration and is missorted to the somatodendritic compartment (21). When appropriate physiological Tau phosphorylation is maintained, Tau maintains also affinity to MTs and structure of MTs, axon integrity and cellular function are preserved. When Tau is hyper phosphorylated, it is thought to lose affinity from MTs, form insoluble aggregates, leading to impaired axonal transport, neuronal damage and cell death (22; Fig. 4).

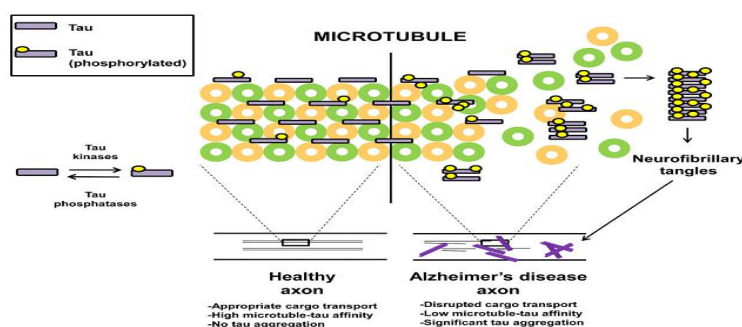


Fig. 4. Tau metabolic pathway (22).

4. Compound as inhibitors of TAU protein

Efforts to develop effective disease-modifying treatments for AD have mostly targeted the amyloid β protein; however, there has recently been increased interest in other targets including phosphorylated Tau and other forms of Tau. Aggregated Tau appears to spread in a characteristic pattern throughout the brain (23). The complexity of Tau biology provides many potential therapeutic targets to prevent Tau production, aggregation, or spread at the level of transcription, phosphorylation, de-polymerization, and transport (4, 23-25). Now, some literature shows that 14-3-3 proteins interact with Tau and regulate Tau

phosphorylation by bridging Tau with various protein kinases (11). 14-3-3 proteins are a family of proteins highly conserved and are mainly expressed in the brain especially in central nervous system. These proteins impact many aspects of brain function like neural signaling, neuronal development and neuroprotection.

a. Immunotherapy

Recently, Tau has become one of the most actively pursued therapeutic targets for AD (26). One strategy used for targeting Tau protein is the immunotherapy. This approach is based in on immunization of subjects against the misfolded Tau protein with the result that hyperphosphorylation and aggregation of Tau are

prevented with direct link and strong association between Tau pathology and loss of cognition (27).

b. Therapeutic targeting of Tau hyper-phosphorylation

Another strategy may be the prevention of Tau hyper-phosphorylation by the inhibition of Tau kinases. Tau hyper-phosphorylation is widely known to be induced by increased phosphokinase activity and/or decreased phosphatase activity (28). Therefore, treatment with chemical inhibitors may reduce the rates of NFTs in AD. However, most attention has been paid to the role of GSK-3 β because high levels of GSK-3 β activity lead to alterations in amyloid beta precursor protein (A β PP) processing and increased neuronal death. Some compound isolated from plants showed strongly inhibition of GSK-3 β the enzyme mainly responsible for this process (29).

c. Therapeutic targeting Tau aggregation

Post-translational modifications and loss of microtubule binding lead to elevated levels of cytosolic Tau, thereby increasing the potential for Tau–Tau interactions and polymerization. In humans, Tau aggregation and the presence of NFTs correlate more closely with symptom severity and neuron loss. Large fibrils might contribute to cell dysfunction via molecular crowding and effects on cell metabolism validity of targeting extracellular Tau in the later stages of the disease. Compounds that could facilitate the proteolytic degradation of tau aggregates and prevent propagation of NFTs are very important. Therefore, there are some natural compounds that are able to inhibit Tau aggregation and possibly, make an impact in neurodegenerative diseases especially AD (26) (Fig. 5).

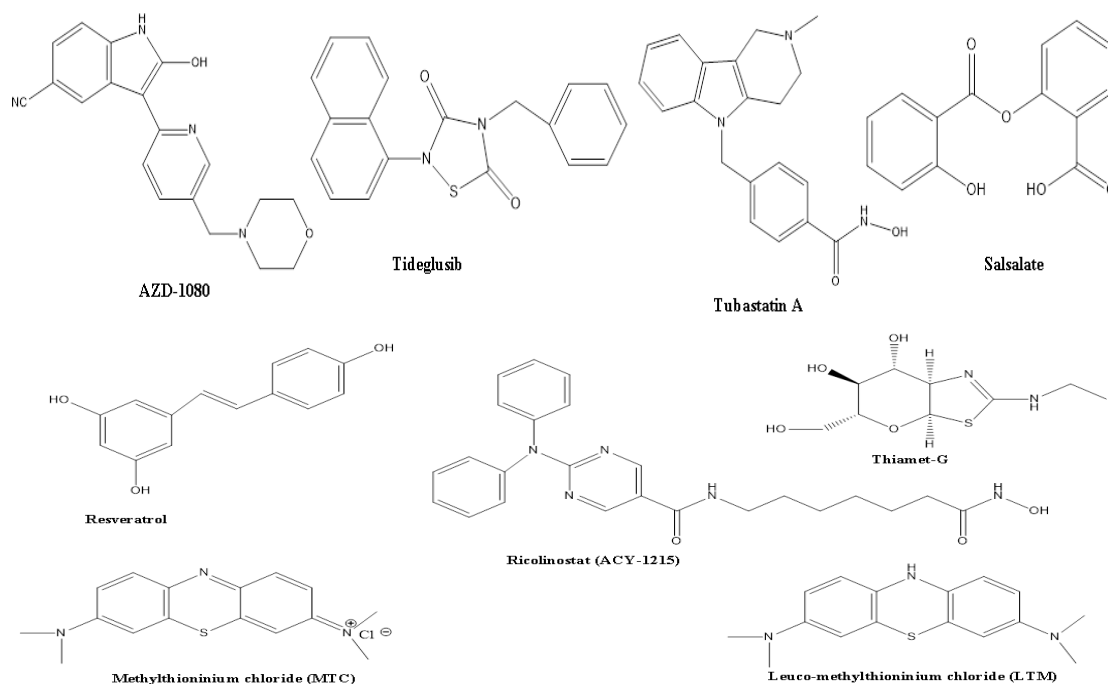


Fig. 5. Some drugs targeting tau pathology, some of them in clinical trials (26).

3.4. Therapeutic targeting microtubule stabilization

In physiological conditions, Tau is normally bound to MTs in axons, modulating tubulin assembly and MT stability. However, hyper phosphorylation of Tau reduces the tubulin binding affinity of the protein and detaches

normal Tau from MTs, leading to MTs destabilization and impaired axonal transport. Thus, MT-stabilizing agents that can compensate for the loss of Tau function and restore axonal transport have therapeutic potential in AD and other tauopathies (30; Fig. 6).

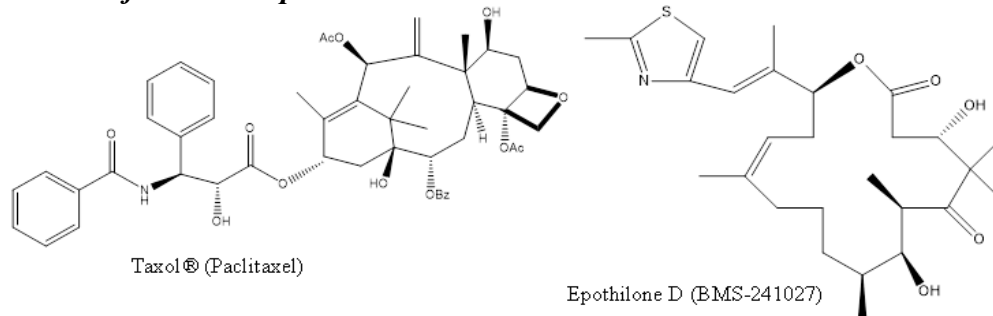


Fig. 6. Structure of MT-stabilizing natural products, paclitaxel and epothilone D (30).

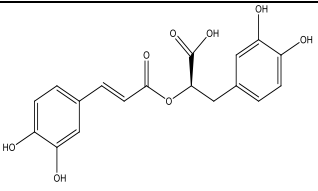
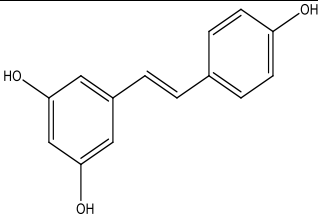
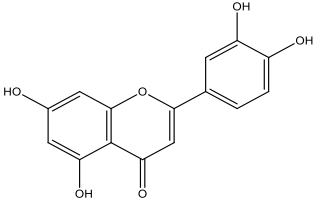
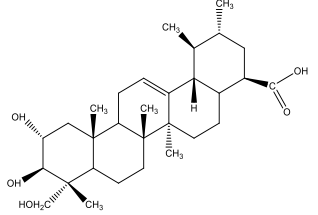
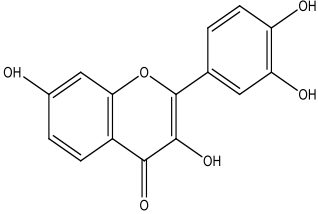
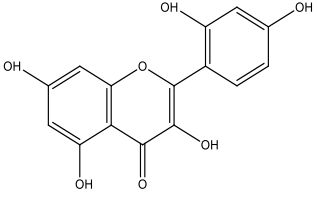
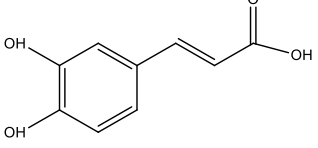
4. Natural Compound of Medicinal Plants as Inhibitors of Tau protein hyper phosphorylation and Aggregation

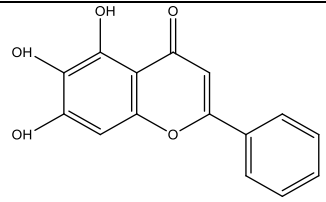
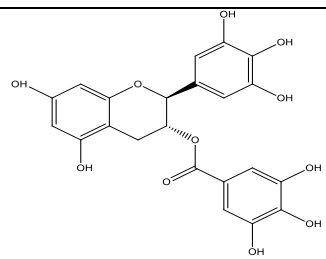
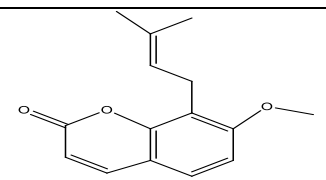
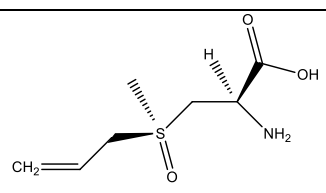
In recent decades, great interest has been raised due to the potential of polyphenols to prevent many diseases like neurodegenerative diseases (31). Phosphorylation of Tau takes place on serine/threonine residues principally located in the basic proline-rich domains of the protein. However, these domains are potent targets able to

fix polyphenols and that polyphenols could inhibit Tau aggregation. Some polyphenols and others compound from plant were also shown to inhibit phosphorylation and aggregation of Tau. Moreover, polyphenols induce disaggregation of aggregated Tau and modify ultrastructure of paired helical filaments isolated from AD brains, decreasing enlargement of filaments (32) (Table 1).

Table1: Natural products for the treatment of Alzheimer’s disease targeting Tau protein

Compound	Structure	Plant	Activities	Ref
Tolfenamic acid			Reduces total Tau as well as in site specific hyperphosphorylation of Tau and lowers tau mRNA and protein, as well as the levels of its phosphorylated form and CDK5.	(33)
Morrisonide		<i>Cornus officinalis</i>	Inhibits Tau hyperphosphorylation in SK-N-SH cells induced by okadaic acid, a PP2A inhibitor.	(34)
Salidroside		<i>Rhodiola rosea</i> L	Up regulates the level of p-GSK-3β and downregulated p-Tau in Tau transgenic Drosophila and inhibiting neuronal loss	(35)
Curcumin		<i>Curcuma longa</i>	Up-regulates an anti-Tau co-chaperone BCL2-Associated Athanogene2 (BAG2) and thus, suggest probable benefit of curcumin against AD-associated tauopathy.	(7)

Rosmarinic acid		<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Acts as Tau inhibitors by avoiding fibril formation <i>in vitro</i> and subsequent β sheet formation and is able to stop aggregation of Tau	(3)
Resveratrol		Red wine, grapes, berries, peanuts	Protects against hyperphosphorylation and/or mediates dephosphorylation of the Tau protein; Inhibits Tau phosphorylation mediated by activation of PP2A and AMPK-induced activation of PI3K/Akt signaling pathway by inhibition of GS3K.	(37, 38)
Luteolin			Reduces the zinc-induced hyperphosphorylation of the Tau protein, the mechanism of which may be explained by its antioxidant activity and ability to regulate the Tau phosphatase/kinase system;	(37)
Asiatic acid		<i>Centella asiatica</i>	Reduces phoshoTau by activating Akt/GSK3 β pathway.	(39)
Fisetin		<i>Rhus succedanea</i> L.	Promotes the <i>in vitro</i> degradation of phosphorylated Tau and reduced the <i>in vivo</i> Tau hyperphosphorylation	(40)
Morin		<i>Maclura pomifera</i>	Reduces Tau hyperphosphorylation	(41)
Caffeic acid			Reduces Tau phosphorylation	(25)

Baicalein		<i>Scutellaria baicalensis</i>	Prevents Tau phosphorylation in AD model and improve cognitive function	(42)
Epigallocatechin gallate			Inhibits the <i>in vitro</i> Tau aggregation and increases the <i>in vivo</i> clearance of phosphorylated Tau	(42)
Osthole		<i>Cnidium monnieri</i> (L.)	Decreases the phosphorylated Tau levels	(43)
Garlic		<i>Allium sativum</i> L.	Inhibits hyperphosphorylation Tau	(42)

CONCLUSION

Medicinal plants have been implicated in health benefits relevant to a number of disease conditions. Much of the evidence has focused on the polyphenol, flavonoid components. These main compounds have been shown to have effects against AD. Therefore, it is important to value medicinal plant, exploring new active compounds against AD.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors of this review were supported by Grants from RTF-DCS (DCS/2018/000007). Authors are grateful to Mangalore University and University of Yaoundé 1 for the support and encouragement.

REFERENCES

- Martin, L., Latypova, X., Wilson, C. M., Magnaudeix, A., Perrin, M. L., Terro, F. Tau protein phosphatases in Alzheimer's disease: The leading role of PP2A. *Ageing Re Rev.* 2013; 12: 39-49.
- Ma, W-W., Tao, Y., Wang, Y-Y., Peng, I-F. Effects of *Gardenia jasminoides* extracts on cognition and innate immune response in an adult *Drosophila* model of Alzheimer's disease. *Chin J Nat Med.* 2017; 15(12): 899-904.
- Cornejo, A., Sandoval, F. A., Caballero, L., Machuca, L., Muñoz, P., Caballero, J., *et al.*, Rosmarinic acid prevents fibrillization and diminishes vibrational modes associated to β sheet in Tau protein linked to Alzheimer's disease. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2017; 32 (1): 945-953.
- Graham, W. V., Bonito-Oliva, A., Sakmar, T. P. Update on Alzheimer's disease therapy and prevention strategies. *Annu. Rev. Med.* 2017; 68: 413-430.
- Hajieva, P. The effect of polyphenols on protein degradation pathways: implications for neuroprotection. *Molecules.* 2017, 22, 159; doi: 10.3390/molecules22010159.
- Chen, Y., Chen, X., Yao, Z., Shi, Y., Xiong, J., Zhou, J., *et al.*, 14-3-3/Tau interaction and Tau amyloidogenesis. *J Mol Neurosci.* 2019; 68(4): 620-630.
- Tang, M. and Taghibiglou, C. The mechanisms of action of Curcumin in Alzheimer's disease. *J Alzheimer Dis.* 2017; 58(4): 1003-1016.
- Chu, D., and Liu, F. Pathological changes of Tau related to Alzheimer's disease. *ACS Chem. Neurosci.* 2019. 10(2): 931-944.
- Sanabria-Castro, A., Alvarado-Echeverría, I., Monge-Bonilla, C. Molecular Pathogenesis of

- Alzheimer's Disease: An Update. *Ann Neurosci*. 2017; 24: 46-54.
10. Jouanne, M., Rault, S., Voisin-Chiret, A-S. Tau protein aggregation in Alzheimer's disease: An attractive target for the development of novel therapeutic agents. *Eur J Med Chem*. 2017; 139: 153-167.
 11. Oliveira, J. M., Henriques, A. G., Martins, F., Rebelo, S., da Cruz e Silva, O. A. B. Amyloid- β Modulates Both A β PP and Tau Phosphorylation. *J Alzheimer Dis*. 2015; 45(2): 495-507.
 12. Goedert, M., Spillantini, M. G., Crowther, R. A. A Brief History of Tau. *Clin Chem*. 2015; 61(11): 1417-1418.
 13. Mandelkow, E-M and Mandelkow, E. Biochemistry and Cell Biology of Tau Protein in Neurofibrillary Degeneration. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012; 2: a006247. doi: 10.1101/cshperspect.a006247.
 14. Tapia-Rojas, C., Cabezas-Opazo, F., Deaton, C. A., Vergara, E. H., Johnson, G. V. W., Quintanilla, R. A. It's all about Tau. *Prog Neurobiol*. 2019; 175: 54-76.
 15. Zhao, L-G., Tang, Y., Tan, J-Z., Wang, J-W., Chen, G-J., Zhu, B-L. The effect of NR4A1 on APP metabolism and Tau phosphorylation. *Genes Dis*. 2018; 5: 342-348.
 16. Babür, E., Tan, B., Delibaş, S., Yousef, M., Dursun, N., Süer, C. Depotential of long-term potentiation is associated with epitope-specific Tau hyper/ hypophosphorylation in the hippocampus of adult rats. *J Mol Neurosci*. 2019; 67(2): 193-203.
 17. Saito, T., Oba, T., Shimizu, S., Asada, A., Iijima, K. M, and Ando, K. Cdk5 increases MARK4 activity and augments pathological Tau accumulation and toxicity through Tau phosphorylation at Ser262. *Hum Mol Genet*. 2019. pii: ddz120. doi: 10.1093/hmg/ddz120.
 18. Alvariano, R., Alonso, E., Lacret, R., Oves-Costales, D., Genilloud, O., Reyes, F., *et al.*, Caniferolide A, a macrolide from *Streptomyces caniferus*, attenuates neuroinflammation, oxidative stress, amyloid-beta and Tau pathology *in vitro*. *Mol Pharm*. 2019; 16(4): 1456-1466.
 19. Taleski, G and Sontag, E. Protein phosphatase 2A and Tau: an orchestrated 'Pas de Deux'. *FEBS Letters*. 2018; 592: 1079-1095.
 20. Sontag, J-M. and Sontag, E. Protein phosphatase 2A dysfunction in Alzheimer's disease. *Front Mol Neurosci*. 2014; 7:16. Doi: 10.3389/fnmol.2014.00016.
 21. Holzer, M., Schade, N., Opitz, A., Hilbrich, I., Stieler, J., Vogel, T., *et al.*, Novel protein kinase inhibitors related to Tau pathology modulate Tau protein-self interaction using a Luciferase complementation assay. *Molecules*. 2018, 23, 2335; doi: 10.3390/molecules23092335.
 22. Joshi, Y. B., Giannopoulos, P. F., and Praticò, D. The 12/15 Lipoxygenase as an emerging therapeutic target for Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci*. 2015; 36(3): 181-186.
 23. Cummings, J., Blennow, K., Johnson, K., Keeley, M., Bateman, R. J., Molinuevo, J. L., *et al.*, Anti-Tau Trials for Alzheimer's disease: A Report from the EU/US/CTAD Task Force. *J Prev Alzheimer Dis*. 2019; 6(3): 157-163.
 24. Gorantla, N. V., Landge, V. G., Nagaraju, P. G., Sunny, L. P., Nair, A., Midya, S. P., *et al.*, Molecular Complexes for Effective Inhibition of Tau Aggregation. *bioRxiv* 363572; 2018 ; doi: <https://doi.org/10.1101/363572>.
 25. Silva, T., Mohamed, T., Shakeri, A., Rao, P. P. N., Soares da Silva, P., Remião, F., *et al.*, Repurposing nitro catechols: 5-Nitro- α -cyanocarboxamide derivatives of caffeic acid and caffeic acid phenethyl ester effectively inhibit aggregation of Tau-derived hexapeptide AcPHF6. *Eur J Med Chem*. 2019; 167:146-152.
 26. Pinheiro, L. and Célia Faustino, C. Therapeutic Strategies Targeting Tau Protein: Implications for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Disease & Treatment*. 2018; Online edition: <http://meddocsonline.org/>
 27. Ameijde, J. V., Crespo, R., Janson, R., Juraszek, J., Siregar, B., Verveen, H., *et al.*, Enhancement of therapeutic potential of a naturally occurring human antibody targeting a phosphorylated Ser⁴²² containing epitope on pathological Tau. *Acta Neuropathol Commun*. 2018; 6(1): 59. Doi: 10.1186/s40478-018-0562-9.
 28. Hu, J., Yang, Y., Wang, M., Yao, Y., Chang, Y., He, Q., *et al.*, Complement C3a receptor antagonist attenuates Tau hyperphosphorylation via glycogen synthase kinase 3 β signaling pathways. *Eur J Pharmacol*. 2019; 850: 135-140.
 29. Coman, H., and Nemes, B. New therapeutic targets in Alzheimer's disease. *Int J Gerontol*. 2017; 11: 2-6.
 30. Ballatore, C., Brunden, K. R., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M-Y., and Smith, A. B. Non-naturally occurring small molecule microtubule-stabilizing agents: A potential tactic for CNS-directed therapies. *ACS Chem Neurosci*. 2017; 8(1): 5-7.
 31. Dhouafi, Z., Cuanalo-Contreras, K., Hayouni El, A., Mays, C. E., Soto, C., Moreno-Gonzalez, I. Inhibition of protein misfolding and aggregation by natural phenolic compounds. *Cell Mol Life Sci*. 2018; 75: 3521-3538.
 32. Freysson, A., Page, G., Fauconneau, B., Bilan, A. R. Natural polyphenols effects on protein aggregates in Alzheimer's and Parkinson's prion-

- like diseases. *Neural Regen Res.* 2018; 13(6): 955-961.
33. Chang, J. K., Leso, A., Subaiea, G. M., Asma Lahouel, A., Masoud, A., Mushtaq, F., Deeb R., *et al.*, Tolfenamic Acid: A Modifier of the Tau Protein and its Role in Cognition and Tauopathy. *Curr Alzheimer Res.* 2018; 15(7): 655-663.
34. Yang, C-C, Kuai, X-X, Gao, W-B, Yu, J-C, Wang, Q, Li, L., *et al.*, Morroniside-induced PP2A activation antagonizes Tau hyperphosphorylation in a cellular model of neurodegeneration. *J Alzheimers Dis.* 2016; 51: 33-44.
35. Zhang, B., Li, Q., Chu, X., Sun, S., Chen, S. Salidroside reduces Tau hyperphosphorylation via up-regulating GSK-3 β phosphorylation in a Tau transgenic *Drosophila* model of Alzheimer's disease. *Translational Neurodegeneration* 2016; 5:21. DOI 10.1186/s40035-016-0068-y.
36. Momtaz, S., Hassani, S., Khan, F., Ziaee, M., Abdollahi, M. Cinnamon, a promising prospect towards Alzheimer's disease. *Pharmacol. Res.* 2018; 130: 241-258.
37. Bui, T. T. and Nguyen, T. H. Natural product for the treatment of Alzheimer's disease. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 2017; 28(5): 413-423.
38. Shati, A. A. and Alfaif, M. Y. *Trans-resveratrol* Inhibits Tau Phosphorylation in the Brains of Control and Cadmium Chloride-Treated Rats by Activating PP2A and PI3K/Akt Induced-Inhibition of GSK3 β . *Neurochem Res.* 2019; 44(2): 357-373.
39. Rather, M. A., Justin-Thenmozhi, A., Manivasagam, T., Saravanababu, C., Guillemin, G. J., Essa, M. M. Asiatic acid attenuated aluminum chloride-induced Tau pathology, oxidative stress and apoptosis via AKT/GSK-3 β signaling pathway in Wistar rats. *Neurotox Res.* 2019; 35(4): 955-968.
40. Ahmad, A., Ali, T., Park, H. Y., Badshah, H., Rehman, S. U., Kim, M. O. Neuroprotective effect of Fisetin against amyloid-beta-induced cognitive/ synaptic dysfunction, neuroinflammation, and neurodegeneration in adult mice. *Mol. Neurobiol.* 2017; 54: 2269-2285.
41. Gong, E. J., Park, H. R., Kim, M. E., Piao, S., Lee, E., Jo, D. G., *et al.*, Morin attenuates Tau hyperphosphorylation by inhibiting GSK3 β . *Neurobiol. Dis.* 2011; 44: 223-230.
42. Andrade, S., Ramalho, M. J., Loureiro, J. M. and do Carmo Pereira, M. Natural compounds for Alzheimer's disease therapy: A systematic review of preclinical and clinical studies. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 2313; doi: 10.3390/ijms20092313.
43. Yao, Y., Wang, Y., Kong, L., Chen, Y., Yang, J. Osthole decreases Tau protein phosphorylation via PI3K/AKT/GSK-3 β signaling pathway in Alzheimer's disease. *Life Sci.* 2019; 217: 16-2. doi: 10.1016/j.lfs.2018.11.038.1.



RESEARCH ARTICLE

Prevention of β -amyloid-induced toxicity in a differentiated neuronal (IMR32) cell line by *Khaya grandifolia* (Welw) C. DC.

Fils Armand Ella^{1,2,3}, Manjula Shantaram², Simon Ngamli Fewou⁴, Frederic Nico Njyou¹, Sayali Chandrashekar Deolankar³, Prashant Kumar Modi³ and Paul Fewou Moundipa^{1*}

Abstract

Alzheimer's disease (AD) belongs to the class of neurodegenerative disorder and is biochemically characterized by amyloid- β ($A\beta$) plaques deposition, accumulation of neurofibrillary tangles (NFTs) and ultimately neuronal loss. Even though, the progress made in developing efficient AD therapy, there is no effective drug capable to stop and/or slow down AD progression. In the current article, we investigated the neuroprotective effect of *Khaya grandifolia* crude extract and fraction 2 against $A\beta_{42}$ -induced cytotoxicity and hyperphosphorylation of tau protein in differentiated neuronal cells (IMR32). Reactive oxygen species production, apoptosis and mitochondrial dynamics and function, synaptic protein, and tau phosphorylation were evaluated using fluorescence microscopy and immunoblotting. Cell viability was assessed using the MTT assay. Findings revealed that exposure of differentiated IMR32 cells to $A\beta_{42}$ alone induced the impairment of mitochondrial dynamics, decrease synaptic protein expression and increase hyperphosphorylation of tau protein (phospho tau181). In contrast, the presence of crude extract and KGf2 significantly inhibited the cleavage of Caspase-3 activation. In addition, the levels of synaptic proteins (Synaptosomal associated protein 25 and Synaptosin) and superoxide dismutase were restored upon treatment with crude extract and fraction 2. Hyper-phosphorylation of tau protein (Thr181) and ERK (Thr202/Tyr205) activities were also significantly reduced after treatment with crude extract and fraction 2. Our findings suggest that KG extract is a potential source for candidate drug against AD and may contribute to the development of efficient therapeutic strategy against AD.

Keywords: Alzheimer's disease; *Khaya grandifolia*; neuroprotection; tau protein; Amyloid β 1-42.

Introduction

Alzheimer's disease (AD) belongs to the class of neurodegenerative disorder that affects the central nervous system and is biochemically characterized by amyloid- β ($A\beta$) plaques deposition, accumulation of neurofibrillary tangles (NFTs), and neuronal loss with a cognitive impairment as consequence [1]. It primarily affects elderly people over 65 years of age and account

for 50-60% dementia cases [2, 3]. Approximately 47.5 million people worldwide are affected by AD and the number of affected people is expected to rise during the next 20 years [4, 5]. The pathological manifestations of AD include extracellular amyloid beta deposits and intracellular tau protein abnormality characterized by hyperphosphorylated tau which eventually forms neurofibrillary tangles (NFTs) inside the cells. In addition, synaptic dysfunction has been observed in other regions of the brain [6]. Overall, clinical manifestations include progressive memory loss, deterioration of intellectual functions, decreased speech function, disorientation, and gait irregularities.

*Correspondence: pmoundipa@hotmail.com

¹Department of Biochemistry, Faculty of Science, University of Yaounde 1, Yaounde, Cameroon

Full list of author information is available at the end of the article.

Received: 06 Aug 2020, Accepted: 14 Dec 2020



The prevalence of disease in a specific population is dependent on factors like incidence and survival. Therefore, AD prevalence rises exponentially with age, increasing markedly after 65 years of age. AD in people 65 years of age and older was about 6% [7]. Overall, approximately 47 million people worldwide were living with AD in 2015 [8]. Since AD has become a major public health because of an increasingly aging population. Epidemiologic studies indicate that the worldwide prevalence of AD will double by the year 2030 and triple by 2050. Regional studies indicate that 3.6 million people in Asia live with AD and in Europe, America and Africa 2.3, 1.2 and 0.5 million people are affected, respectively [9].

Current Medications used for AD treatment include acetylcholinesterase inhibitors (donepezil, tacrine and galantamine) for mild to moderate cases, and memantine, an NMDA (N-methyl-D-aspartate)-receptor antagonist for the treatment of moderate to severe AD. These drugs seem to be able to produce modest symptomatic improvement in some patients [10].

However, no available medication appears to be able to cure or stop AD progression. Previous investigations using medicinal plants that include *Punica granatum*, *Vitis vinifera*, *Olea europaea*, *Cinnamomum verum* [11] have reported some anti-amyloidogenic effects in transgenic mice and also in an in vitro AD model [12]. In other investigations, medicinal plants extract have shown neuroprotective activities [13], therefore can be used or be helpful in the development of new drugs for Alzheimer's disease. For this purpose, we decided to screen Cameroonian medicinal plants used in traditional medicine practices for anti-AD activity. More specifically, *Khaya grandifoliola* (KG) is a plant used in west Cameroon traditional medicine to combat various diseases including neurological disorders.

In addition, numerous investigations have shown that KG possess various activities including anti-malarial, anti-bacterial, anti-ulcer, anti-anaemic, anti-inflammatory, anti-fungal, hypoglycemic, hypocholesterolemic activities [14, 15]. In addition, antioxidant, cytotoxic and hepato-protective effects have also been reported [16, 17]. The current study was undertaken to investigate the anti-amyloidogenic activity of KG. To perform this task, we first generated AD model by exposing differentiated neuronal cells (IMR32) to amyloid beta peptide aggregates ($A\beta_{1-42}$). We found that IMR32 cells were sensitive to $A\beta$ -induced toxicity and also tau hyperphosphorylation as observed in AD patients. Mitochondrial dysfunction was also observed when exposing IMR32 cells to $A\beta_{1-42}$. In contrast, prevention of key parameters of neuronal dysfunction in AD such as tau hyperphosphorylation, apoptosis, and mitochondrial dysfunction was observed in the presence of KG extract and fraction.

Moreover, restoration of the level of reactive oxygen (ROS) production and synaptic proteins (SNAP25 and SYP) was also observed when IMR32 cells were exposed to $A\beta$ presence of KG crude extract and its purified fraction. The present results indicate KG possesses a neuroprotective activity, therefore may be potentially considered in the process of the development of new drug against AD.

Material and Methods

Chemicals

$A\beta_{1-42}$ (peptide, Georgia, USA), 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), Hoescht 33342, propidium iodide (PI), anti-rabbit IgG-alkaline phosphatase conjugated secondary antibody were from Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Fetal Bovine Serum (FBS) and 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) were obtained from Himedia Laboratories, India. Primary antibodies Cleaved Caspase-3 (1:500), pERK (1:500), SOD (1:1000), SNAP25 (1:1000), SYP (1:1000) from Cell Signaling, Beverly, MA; pT181-tau (1:1000) from Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA; and β -actin (1:1000) from Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA.

Methods

Preparation of K haya grandifoliola (KG) crude extract and fraction 2

The stem bark of KG was collected in July 2017 in Fouban in the West Region of Cameroon. The botanical identification of the plant was done at the Cameroon National Herbarium in Yaounde, where voucher specimens are kept under the reference number 23434 YA. The collected plant material was washed with distilled water, air-dried and powdered. A portion (200g) of the powder was extracted twice with 2L of ethanol/water 65/35 (v/v) at room temperature with regular agitations during 48 hours. The extracts were filtered through Whatman paper No.1, pooled, evaporated using a rotary evaporator and dried in an oven (HP-AD070) at 50°C and then subjected to silica gel 60/120 (particle size 40–63 μ m) (MERCCK, Vetec™, Germany) column chromatography by eluting with a gradient of polarity in the hexane/acetyl acetate (60/40 v/v); resulting in the collection of eight fractions. These eight fractions were analyzed using thin layer chromatography (TLC) and combined into 2 fractions labeled KGf1 and KGf2 based on the similarity of their TLC profiles.

For the biological assays, the crude extract and fraction KGf2 were reconstituted in DMSO at a concentration of 50 mg/mL.

Preparation of oligomeric A β stock solution

The 42-amino acid version of A β peptide (A β ₄₂, rpeptide, Georgia, USA) was dissolved in sterile 1% ammonium hydroxide, sonicated for 30 s, and incubated at 37°C for 5 days and was used at a final concentration of 1 μ M as previously reported [18].

Cell culture and differentiation

Human Neuroblastoma cell line IMR32 was purchased from National Centre for Cell Science (NCCS, Pune, India). Cells were maintained in Dulbecco Modified Essential Medium (DMEM) supplemented with 10 % heat-inactivated fetal bovine serum, a mixture of 1 % penicillin/streptomycin at 37 °C. Differentiation was induced by exposing undifferentiated IMR32 cells to retinoic acid (RA, 10 μ M). Cell morphology was examined using an inverted microscope Primovert with digital camera Axiom 105 color (Zeiss, NY, USA) until cells were fully differentiated, which was after 8 to 10 days of culture.

Cell treatment

To determine the effect of the crude extract and fraction 2 on differentiated IMR32 cells physiology, cells were seeded at a density of 500,000 cells/well in 6-well plates and treated as follow: (1) untreated IMR32 cells; (2) IMR32 cells incubated with A β ₄₂ (1 μ M) alone; (3) IMR32 cells treated with the crude extract and fraction 2 at 5 μ g/mL and A β ₄₂ 1 μ M; (4) IMR32 cells treated with the crude extract and fraction 2 alone at 5 μ g/mL final concentration. Cells were incubated for 48 hr and the treatment was terminated by removing the culture medium. Cells were washed with PBS 1x before used for different assays.

Cytotoxicity assay

Test for cytotoxicity was done using 2-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Briefly, IMR32 cells were seeded in 96-well plates at a density of 3 000 cells/well and incubated with the plant extract and fractions at different concentrations (0; 2; 5; 10; 20; 30; 40 and 50 μ g/mL) for 48 hr. Then the culture medium was replaced by fresh serum-free DMEM supplemented with 70 μ L of MTT (0.5 mg/mL) solution and the cells were further incubated at 37 °C for 4 hr. The medium was discarded and 200 μ L of a mixture of DMSO/Ethanol (1:1 V/V) was applied to the well to dissolve the formazan derived from the mitochondrial cleavage of the tetrazolium ring by live cells. The absorbance of the solubilized MTT formazan product was measured at 570 nm and 650 nm using a Multiskan microplate reader (Multiskan Sky, ThermoFisher, MA, USA).

Morphological analysis of IMR32 cells

IMR32 cells treated with KG plant extracts or fraction 2 was compared to untreated cells in order to determine the order to determine the morphological by the plant extracts and fraction 2. IMR32 cells were seeded in 12-well plates, exposed to increasing concentrations (0, 5, 15 and 25 μ g/mL) of KG crude extract and fraction 2 for 48 hr. The change in cell morphology was determined by phase contrast microscopic analysis (Zeiss Axiovert 100; 20 X magnification) (Zeiss, NY, USA).

Determination of cell apoptosis

Differentiated IMR32 cells were seeded and treated with A β ₄₂ and 5 μ g/mL of the extract and fraction 2 for 48 h at 37°C and 5% CO₂. After treatment, IMR32 cells were washed with PBS and fixed in 4% paraformaldehyde for 30 min. After that, cells were washed again with PBS and stained with propidium Iodide (PI) (20 μ g/mL) and Hoechst 33342 (5 μ g/mL). Cells were incubated in dark for 30 min at room temperature. The incubated cells were washed again with PBS and analyzed under by fluorescent microscopy using cell imager ZOE™ (BioRad, Portland, USA).

Determination of intracellular ROS generation

Differentiated IMR32 cells were treated with A β ₄₂ with or without KG crude extract and fraction 2 (5 μ g/mL) for 48 hr. At the end of the incubation period, treated and untreated cells were incubated with 25 μ M 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) at 37 °C in dark for 45 min followed by washing with PBS. The intracellular levels of Reactive Oxygen Species (ROS) generation were monitored by fluorescence detection of DCF that is proportional to the level of production of intracellular ROS. The fluorescence was captured by a fluorescent cell imager ZOE™ (BioRad, Portland, USA) at an excitation and emission wavelength of 488 nm and 560 nm, respectively.

Protein extraction and Western blot

Human neuroblastoma IMR32 cells were cultured in T25 flasks to 80% confluency. Cells were seeded into 6-well plates at a density of 5.0×10^5 cells/well and incubated in the presence of retinoic acid (RA) for 8-10 days. Differentiated cells were further cultured with and without KG extract and/or fraction 2 (5 μ g/mL) in the presence of A β ₄₂ peptide for 48 hr. Cells were then harvested and rinsed with ice-cold PBS and incubated with 150 μ L of lysis buffer (50mM Tris-HCl buffer pH 7.2; 2% SDS) containing a cocktail of protease inhibitor (Thermo Scientific Ltd, MA, USA) on ice and incubated for 30 min. Cell homogenate was then obtained by using a cell scraped and sonicated. The protein extracts were obtained by centrifugation at

14000 × g for 10 min at 4°C. Supernatant (total cell protein) was collected and protein concentration determined using Bicinchoninic Acid (BCA) assay kit (Thermo Scientific, MA, USA). Thirty (30) microgram of total protein extract was separated on 12% SDS-PAGE and blotted onto nitrocellulose membrane (Bio-Rad, Portland, USA). The membranes were incubated in 5% skimmed milk for 2 hours under agitation at room temperature. The membranes were further incubated with the appropriate primary antibodies [(cleaved Caspase-3, SOD, SNAP25, SYP (Cell Signaling, Beverly, MA), β -actin (Sigma Aldrich, MA, USA)] overnight at 4°C. For pERK and pTau (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); membranes were blocked in BSA before incubation with the appropriate primary antibody. Membranes were washed with PBS three times for 10 min and further incubated with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody for 2 hours at room temperature under agitation. Proteins were visualized using chemiluminescence reagents (ThermoFisher Scientific, MA, USA). Relative protein level was determined with normalization to β -actin signal by densitometry using ImageJ software.

Statistical analysis

Results of all analysis are presented as means \pm standard deviation (SD) (n = 3). Band intensities of fluorescence images and western blots were quantified using ImageJ and expressed as relative values to the controls. Multiple comparisons were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's test. Statistical analyses were performed using GraphPad prism version 5.0. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results

Prior to determine whether KG and fraction 2 prevent the β -amyloid-induced toxicity in a human neuroblastoma (IMR32), KG crude extract and fraction 2 were first tested for intrinsic cytotoxicity. Undifferentiated IMR32 cells were incubated with various concentrations of KG crude extract and fraction 2. The cellular viability was estimated by the MTT assay. Results indicate that KG crude extract and fractions 2 alone had no toxic effect on differentiated IMR32 cells till 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (supplemental figure 1). Our results indicates that lowest concentration of KG crude extract and fraction 2, which is not cytotoxic to differentiated IMR32 cells was 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Supplemental figure 2) and used for subsequent experiments.

Protective effect of KG extract and fraction 2 on $A\beta_{42}$ -induced reactive oxygen species (ROS) production and apoptosis.

Effects of KG crude extract and fraction 2 on $A\beta_{42}$ -induced ROS production in cultured differentiated IMR32 cells are shown in figure 1. Treatment of IMR32 cells for 48 hours using $A\beta_{42}$ (1 μM) significantly increased the production of intracellular ROS. Co-treatment of IMR32 cells with KG crude extract and fraction 2 with $A\beta_{42}$ significant reduced the $A\beta$ induced intracellular ROS production.

In figure 2, treatment of IMR32 cells with KG crude extract or fraction 2 alone significantly reduced the intracellular ROS level, indicating that KG protect cells against $A\beta$ -induced ROS production.

The finding that the intracellular levels of reactive oxygen species is controlled through the activities of SOD enzymes, prompted us to investigate whether KG crude extract and fraction 2 induces the affects ROS level through SOD enzymes activity. Therefore, IMR32 cells were treated with $A\beta_{42}$ in the presence and absence of KG crude extract or fraction 2, and later total proteins were extracted from cells and were probed for SOD by immunoblotting revealing. A significant decrease SOD protein expression in $A\beta_{42}$ -treated cells compared to control (figure 3A-D). However, the presence of KG crude extract and fraction 2 during $A\beta_{42}$ treatment of IMR32 restores the level of SOD protein expression ($P < 0.001$).

It is shown that elevated ROS levels are also associated with oxidative damage, increased deposition of $A\beta_{42}$, the formation of senile plaques and cell death. We assessed whether the KG crude extract and fraction 2 protect cells from $A\beta_{42}$ -induced apoptosis.

The extract and fractions of KG Inhibit Cleaved Caspase-3 in $A\beta_{1-42}$ treated IMR32 cells

The effects of crude extract and fraction 2 of KG on cleaved Caspase-3 expression were evaluated by western blot. As shown in figure 3E-H, there was a significant up-regulation of caspase-3 in $A\beta$ -treated cells compared to control cells ($P < 0.001$). However, treatment of these cells with crude extract and fraction 2 of KG inhibit the cleavage of cleaved Caspase-3, confirming therefore KG possesses an anti-apoptotic activity.

KG extract and fraction 2 protect synaptic integrity against $A\beta_{42}$ -induced synaptotoxicity

To assess synaptic integrity after $A\beta_{1-42}$ treatment, we quantified the expression of presynaptic vesicle membrane proteins synaptosomal-associated protein 25 (SNAP-25) and synapto-

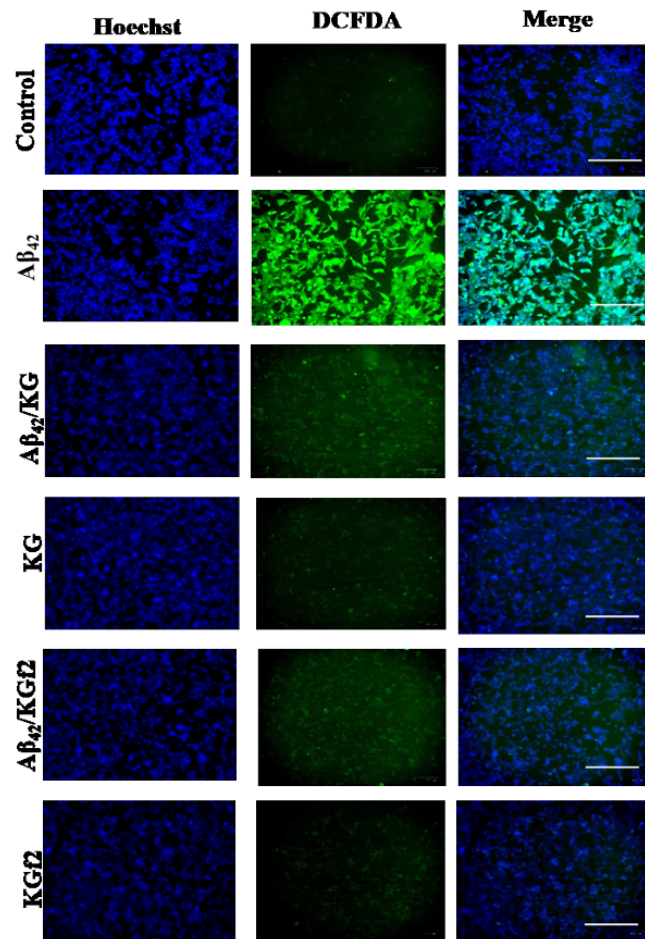


Figure 1 Effect of extract and fraction of KG on ROS level in Aβ₄₂ induced IMR32 cells. ROS: reactive oxygen species; KG: Khaya grandifolia. Aβ₄₂: Amyloid beta 1-42. Scale bars, 100 μm.

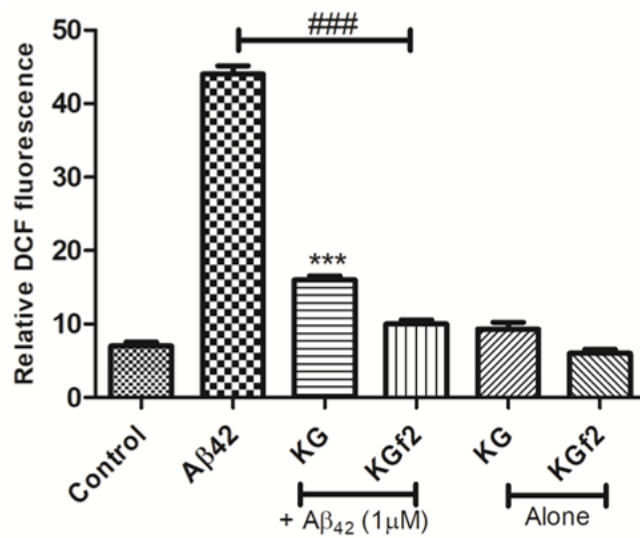


Figure 2 Quantification of ROS level in Aβ₄₂ induced IMR32 cells. ROS: reactive oxygen species; KG: Khaya grandifolia. Aβ₄₂: Amyloid beta 1-42. *** P<0.001 vs control; ### P<0.001 vs Aβ₄₂ group

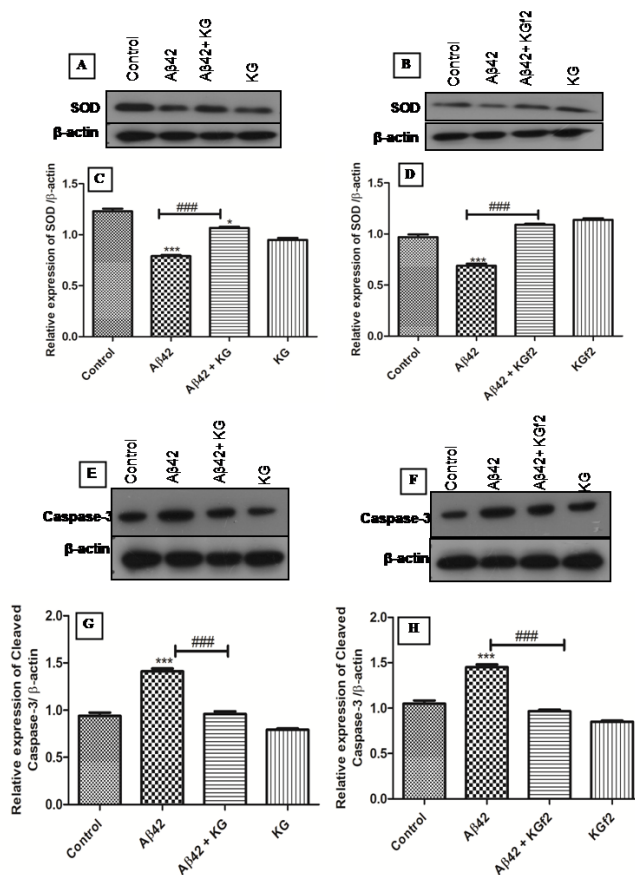


Figure 3 Effect of extract and fraction of KG on apoptosis induced by $A\beta_{42}$ in IMR32 cells. (A, B) Effect of crude extract and fraction 2 of KG on SOD activation, respectively. (C, D) Densitometry analysis of blots, respectively, for crude extract and fraction 2. (E, F) Effect of crude extract and fraction 2 of KG on inhibition of cleavage of Caspase-3, respectively. (G, H) Densitometry analysis of blots, respectively, for crude extract and fraction 2. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$ vs control; ### $P < 0.001$ vs $A\beta_{42}$ group. Lane1: control; Lane2: $A\beta_{42}$; Lane3: $A\beta_{42}$ + KG or $A\beta_{42}$ + KGf2; Lane4: KG or KGf2. KG: Khaya grandifoliola, KGf2: fraction 2 of KG. $A\beta_{42}$: Amyloid beta 1-42.

physin (SYP). Cells were treated without or with $A\beta_{42}$ (1 μM), or co-treated with $A\beta_{42}$ (1 μM) and crude extract and fraction 2 of KG (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 48 h. After treatment, total proteins were extracted from cells and investigated for SNAP25 and SYP respectively. A western blot analysis showed a significant reduction of SNAP25 and SYP levels in $A\beta_{1-42}$ -treated IMR32 cells compared to control, indicating a synaptic dysfunction (Fig. 4AB and Fig. 4EF). However, when IMR32 cells were treated with $A\beta_{42}$ in the presence of KG crude extract and fraction 2, the expression level of SNAP-25 (Fig. 4AD) and SYP (Fig. 4EH) were restored ($P < 0.001$).

Extract and fraction 2 of KG inhibit hyperphosphorylation of tau protein in $A\beta_{1-42}$ -treated IMR32 cells

To determine whether KG crude extract and fraction 2 protect tau protein phosphorylation, cells were treated without or with $A\beta_{42}$ (1 μM), or co-treated with $A\beta_{42}$ (1 μM) and crude extract and fraction 2 of KG (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 48 h. After treatment, total proteins were extracted from cells and the lysates were probed for p-tau. As presented in figure 5, compared with the control group, the level of tau phosphorylation at Thr181 residue was significantly increased in the $A\beta_{42}$ treated group ($P < 0.001$). Conversely, the levels of tau phosphorylation in the extract and fraction KGf2 of KG groups were much lower than in the model group ($P < 0.05$ and $P < 0.001$) respectively. The levels of tau phos-

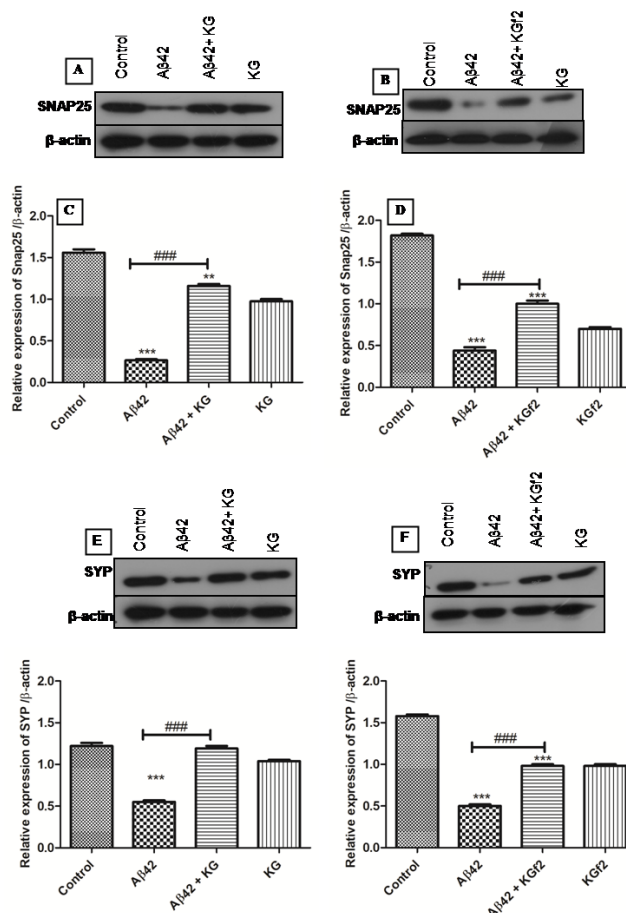


Figure 4 Crude extract and fraction 2 of KG inhibited Aβ₄₂-induced synaptotoxicity. (A, B) Effect of crude extract and fraction 2 of KG on Snap25 activation, respectively. (C, D) Densitometry analysis of blots, respectively, for crude extract and fraction 2. (E, F) Effect of crude extract and fraction 2 of KG on SYP activation, respectively. (G, H) Densitometry analysis of blots, respectively, for crude extract and fraction 2. ***P<0.001, **P<0.01 vs control; ###P<0.001 vs Aβ₄₂ group. Lane1: control; Lane2: Aβ₄₂; Lane3: Aβ₄₂ + KG or Aβ₄₂ + KGf2; Lane4: KG or KGf2. KG: *Khaya grandifoliola*, KGf2: fraction 2 of KG. Aβ₄₂: Amyloid beta 1-42.

phorylation were most significantly decreased following treatment with 5 μg/mL of extract and fraction KGf2.

Inhibition of ERK activity by crude extract and fraction 2 of KG in IMR32 cells exposed to Aβ₄₂

The dysregulation of the ERK signaling pathway, which affects tau hyperphosphorylation has been associated with the Aβ₁₋₄₂ model of AD. The increased level of phosphorylated ERK at Thr202/Tyr204 is a reliable marker of the severity of AD. To investigate whether KG crude extract and fraction 2 prevents Aβ₄₂induced ERK hyperphosphorylation, Western blotting using a pERK antibody specific for the detection of p-ERK (Thr202/Tyr204) was performed. Differentiated IMR32 cells were treated with Aβ₄₂ for 48 h and we found that Aβ₄₂

significantly increased the levels of pERK. As shown in Figure 6, phosphorylation levels of ERK were significantly elevated, indicating that increased kinase activities might have contributed to tau hyperphosphorylation following Aβ₄₂ insult which was reduced upon KG crude extract and its purified fraction (P<0.001).

Discussion

The current investigation was undertaken to investigate whether the *Khaya grandifolia* (KG) extracts prevent the differentiated neuronal cell line (IMR32) from the β-amyloid induced toxicity. Herein, KG crude extract or fraction 2 showed a preventive activity against Aβ-induced cytotoxicity in IMR32 cells. More

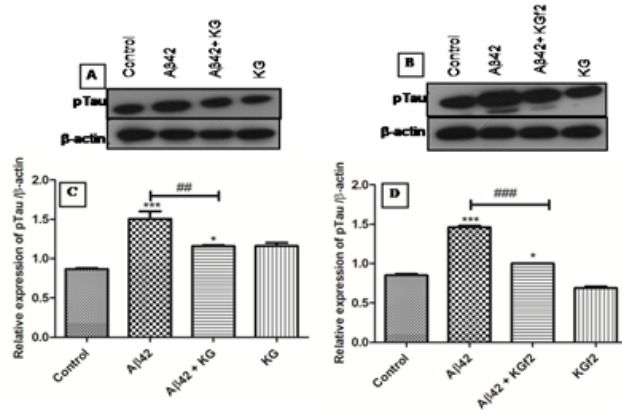


Figure 5 Extract and fraction of KG inhibited tau hyperphosphorylation induced by Aβ₄₂ in IMR32 cells. (A, B) Effect of crude extract and fraction 2 of KG on pTau inhibition, respectively. (C, D) Densitometry analysis of blots, respectively, for crude extract and fraction 2. ***P<0.001, *P<0.05 vs control; ###P<0.001, ##P<0.01 vs Aβ₄₂ group. Lane1: control; Lane2: Aβ₄₂; Lane3: Aβ₄₂ + KG or Aβ₄₂ + KGf2; Lane4: KG or KGf2. KG: Khaya grandifoliola, KGf2: fraction 2 of KG. Aβ₄₂: Amyloid beta 1-42.

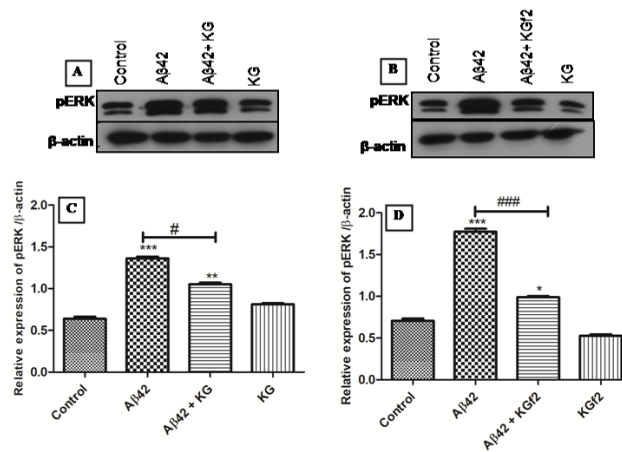


Figure 6 pERK inhibition in response to Aβ₄₂ in IMR32 cells by extract and fraction of KG. (A, B) Effect of crude extract and fraction 2 of KG on pERK inhibition, respectively. (C, D) Densitometry analysis of blots, respectively, for crude extract and fraction 2. ***P<0.001; **P<0.01 vs control; ###P<0.001 vs Aβ₄₂ group. Lane1: control; Lane2: Aβ₄₂; Lane3: Aβ₄₂ + KG or Aβ₄₂ + KGf2; Lane4: KG or KGf2. KG: Khaya grandifoliola, KGf2: fraction 2 of KG. Aβ₄₂: Amyloid beta 1-42.

specifically, KG extracts prevented apoptosis by blocking the intracellular ROS production and inhibition of caspase-3 upon exposure of IMR32 to Aβ₄₂. Moreover, we also observed a significant protection of the synaptic integrity and inhibition of tau hyperphosphorylation by KG extract upon exposure of IMR32 cell to Aβ₄₂. Beside the prevention of Aβ₄₂-induced cytotoxicity by KG extracts observed in the current study, it has already shown that KG extract possesses potent activity against acetylcholine esterase, one of the characteristics of Alzheimer disease (AD) pathology and responsible for most AD symptoms including memory decline and cognition [19]. The findings highlighted in our study demonstrate that KG extracts may be considered as

potential therapeutic source in a strategy of new drug development against AD.

It is shown that Aβ₄₂ dyshomeostasis is one of the main factors in AD pathogenesis [20], and this view point is expanded towards a multi-target approach to achieve better therapeutic effects. Aβ is associated with oxidative stress in neuronal cells and the exposure of differentiated neuronal IMR32 cells to Aβ₄₂ peptides resulted in elevated levels of intracellular reactive oxygen species (ROS) and significantly decreased SOD activity. The consequence is the mitochondrial dysfunction due to a change in the mitochondrial membrane permeability [21]. Thus,

the activity of antioxidant enzymes SOD is often considered a biomarker of the resultant antioxidative response. In this study, using the fluorescent activity as an indicator of the ROS production, DCFH-DA staining demonstrates that the level of ROS in $A\beta_{42}$ induced IMR32 cells were remarkably higher than in the control group. Treatment with KG crude extract and fraction 2 significantly reduced the level of ROS. Concerning antioxidant status, the SOD activity from IMR32 cells treated with $A\beta$ were much lower than the control, but it was significantly reversed following the treatment by crude extract and fraction 2 of KG.

The oxidative stress induced by $A\beta$ creates a micro-environment that promotes the onset of apoptosis [22]. In this study, cell apoptosis was investigated using the PI/Hoescht staining method. When IMR32 cells were exposed to $A\beta_{42}$, apoptotic features were obviously observed after PI and Hoescht double staining, total apoptotic rate was increased, which could be partially abrogated by the plant extract treatment. In order to verify the effect of KG on this process, the caspase activity was also measured. Caspases are serine-aspartyl proteases that are involved in the initiation and execution of apoptosis [23]. Caspase-3 is essential for the implementation of the final step of apoptosis and acts as an executioner [24]. Our results showed that the level of cleaved Caspase-3 was higher in the $A\beta_{42}$ -treated cells compared to the control group. Treatment with extract and fractions of KG ameliorated the $A\beta_{42}$ -induced up-regulation of cleavage of Caspase-3 and significantly decreased the level compared with $A\beta_{42}$ treatment alone. The crude extract and fraction 2 of KG decreased expression of cleaved caspase-3 and inhibits neuronal apoptosis in IMR32 cells. These results agreed with the data from the above cytotoxicity assay, suggesting that the ability of extract and fractions KG to attenuate $A\beta_{42}$ -induced IMR32 cell death was mediated by its anti-apoptotic activity [25].

Taking the mitochondrial apoptosis and oxidative stress results together, crude extract and fraction 2 of KG may inhibit mitochondrial apoptosis-related oxidative stress.

Many studies showed that alterations in synaptic proteins expression are major contributors that precede neuronal loss in AD [26]. $A\beta$ accumulation cause synaptic toxicity. Synaptophysin (SYP) and synaptosomal-associated protein 25 (SNAP-25) levels are decreased in the brain of AD patients and $A\beta$ -induced toxicity in cells. The increase in the synaptic proteins expression could be considered as an early option for treatment of AD [27]. The results from our studies demonstrated that $A\beta$ induced an impaired synaptic structure and also significantly reduce the expression of synaptic proteins that include SNAP25 and SYP. However, crude extract and fraction 2 of KG could

obviously improve the expressions of synaptic related proteins which are significantly increased after treatment.

These data suggest that the inhibition of AD by KG may be mediated by the restoration of the expression of the synaptic proteins.

More recent studies have found a better correlation between tau and memory impairment in AD [28]. Tau hyperphosphorylation is a key event and important initial step in the degradation of neurons occurring in the pathogenesis of AD and because the microtubule structure of the neuron is destroyed after Tau abnormally phosphorylated [29]. In AD brains, hyperphosphorylation of tau protein occurred at several Ser or Thr phosphorylated sites, including Thr181, Thr205, Ser202, Ser396, Ser404 [30]. The destabilization of the cytoskeletal dynamic, apoptosis and ultimately memory dysfunction is caused by tau proteins hyperphosphorylation. It is obviously is an important task for researcher to develop drugs that specifically target tau protein hyperphosphorylation in neuronal cells exposed to $A\beta$ [30]. In the present study, $A\beta$ was used to construct the tau hyperphosphorylation model, treating IMR32 cells with 1 μ M oligomeric peptide $A\beta_{42}$. After 48 hr, a cell model of tau hyperphosphorylation was successfully established and the expression of Tau (pT181) was significantly increased. The level of tau phosphorylation at the site mentioned was reduced, following treatment of the cells with crude extract and fraction 2 of KG at 5 μ g/mL.

Therefore, compound of KG inhibited $A\beta$ -induced hyperphosphorylation of tau. Moreover, extracellular signal regulated kinase (ERK) is a kinase family involved in gene expression, mitosis, metabolism, apoptosis, proliferation, differentiation and movement. It can also affect tau phosphorylation in AD pathology models [31]. Even though the mitogen-activated kinase (MEK-ERK) pathway is important for neuronal survival, neuronal death due to neurotoxic agents can be the consequence of the aberrant activation of this pathway [18]. Our results showed that crude extract and fraction 2 of KG inhibited the expression of ERK showing that KG attenuates hyperphosphorylation of Tau by inhibition of ERK.

AD's drug discovery targeting the amyloid precursor proteins (APP) and $A\beta$ have so far not generated a successful disease modifying candidate for this devastating pathology. Attention to tau protein was almost completely left behind, even though it forms aggregates in AD. Tangles are later manifestations of tau pathology and soluble phosphorylated tau is the species responsible for neurodegenerative damage [28]. A large number of herbal extracts, fractions, phytochemicals and herbal formulations may possess anti-AD properties via their antioxidant, anti-inflammatory, anti-apoptotic and anti-acetylcholinesterase activ-

ities, antiglycation, anti- β -amyloid aggregation, resulting in a reduction in A β -induced toxicity [32].

In addition, the compounds with properties such as mitochondrial function protection, antiinflammation and anti-oxidant activities may also provide the protective effect against neurodegeneration. However, potential beneficial effects of polyphenols, flavonoids in AD may play a role in downstream targets such as tau phosphorylation [33].

Conclusion

In summary, crude extract and fraction 2 of KG protected IMR32 cells from neuronal cell death induced by amyloid β by inducing apoptosis, and it significantly attenuated the A β_{42} -induced hyperphosphorylation of tau at Thr181 through the inhibition of phosphorylation of ERK. These results indicate that the extract and fraction 2 of KG inhibited mitochondrial apoptosis, synaptic toxicity and hyperphosphorylation of tau induced by A β . Taken together, the results presented here increase our knowledge about the neuroprotective effect of extract of KG, and suggest this plant as a candidate for the development of phytotherapeutic agents for Alzheimer's disease and other tau pathology-related neuronal degenerative diseases.

Abbreviations

AD: Alzheimer's disease; A β : Amyloid beta; BCA: Bicinchoninic acid assay; CNS: Central nervous system; DCF-DA: 2',7'-dichlorofluorescein diacetate; DMEM: Dulbecco's modified eagle medium; DMSO: Dimethylsulfoxide; ERK: Extracellular signal regulated kinase; FBS: Fetal bovine serum; KG: *Khaya grandifolia*; KGf2: fraction 2 de KG; NFTs: Neurofibrillary tangles; PI: Propidium iodide; pT181: PhosphoTau at Thr 181; RA: Retinoid acid; ROS: Reactive oxygen species; SNAP25: Symptosomal associated protein 25; SOD: Superoxide dismutase; SYP: Synaptosin; TLC; Thin layer chromatography.

Acknowledgements

The first author of this article is grateful for the financial support rendered by the Department of Science and Technology (DST) of the Government of India; and the Federation of Indian Chambers of Commerce and Industry (FICCI) with the Research Training Fellowship for Developing Countries Scientists (RTFDCS) (No.DCS/2018/000007).

Conflict of interest

The authors have declared no conflicts of interest.

Author contributions

F AE, SNF, FNN, and PFM defined the research subject and the aims, designed the experiments. MS, PMK, and PFM pro-

vided facilities to perform the work. FAE, SCD, PMK performed the experiments. FAE, SNF, FNN, MS, PMK and PFM analyzed the data and wrote the paper.

All the authors read and approved the final version of this manuscript.

Author details

¹Department of Biochemistry, Faculty of Science, University of Yaounde 1, Yaounde, Cameroon. ²Department of Studies & Research in Biochemistry, Post Graduate Centre, Mangalore University, Chikka Aluvara571232, Karnataka, Kodagu, India. ³Yenepoya Research Centre, Yenepoya (Deemed to be University), Mangalore575018, Karnataka, India. ⁴Faculty of Health Science, Université des Montagnes, Bangangté, Cameroon.

References

- [1] Li K, Wei Q, Liu FF, Hu F, Xie A, Zhu LQ, et al. Synaptic Dysfunction in Alzheimer's disease: A β , Tau, and Epigenetic Alterations. *MolNeurobiol*. 2017;55(4):3021–3032.
- [2] Francis PT, Palmer AM, Snape M, Wilcock GK. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 1999;66(2):137–147. Available from: <https://dx.doi.org/10.1136/jnnp.66.2.137>.
- [3] Ma WW, Tao Y, Wang YY, Peng IF. Effects of *Gardenia jasminoides* extracts on cognition and innate immune response in an adult *Drosophila* model of Alzheimer's disease. *Chin J Nat Medicines*. 2017;15(12):899–904.
- [4] Zhifeng Z, Han J, Zhang J, Xiao Q, Hu J, Chen L. Pharmacological activities, mechanisms of action, and safety of salidroside in the central nervous system. *Drug Des Dev Ther*. 2018;12:1479–1489.
- [5] Poirier Y, Grimm A, Schmitt K, Eckert A. Link between the unfolded protein response and dysregulation of mitochondrial bioenergetics in Alzheimer's disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2019;76(7):1419–1431. Available from: <https://dx.doi.org/10.1007/s00018-019-03009-4>.
- [6] Xia W, Li DW, Xiang L, Chang JJ, Xia ZL, Han EJ. Neuroprotective effects of an aqueous extract of *Futokadsura* stem in an A β -Induced Alzheimer's disease-like rat model. *Chin J Physiol*. 2015;58(2):104–113.
- [7] Burns A, Iliffe S. Alzheimer's disease. *BMJ*. 2009;338(feb05 1):b158–b158. Available from: <https://dx.doi.org/10.1136/bmj.b158>.
- [8] Mroczko B, Groblewska M, Litman-Zawadzka A, Kornhuber J, Lewczuk P. Amyloid β oligomers (A β Os) in Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission*. 2018;125(2):177–191. Available from: <https://dx.doi.org/>

- 10.1007/s00702-017-1820-x.
- [9] Kuca K, Soukup O, Maresova P, Korabecny J, Nepovimova E, Klimova B, et al. Current Approaches Against Alzheimer's Disease in Clinical Trials. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2016;27(4):641–649. Available from: <https://dx.doi.org/10.5935/0103-5053.20160048>.
- [10] Clark CM, Karlawish JHT. Alzheimer Disease: Current Concepts and Emerging Diagnostic and Therapeutic Strategies. *Annals of Internal Medicine*. 2003;138(5):400–400. Available from: <https://dx.doi.org/10.7326/0003-4819-138-5-200303040-00010>.
- [11] Andrade S, Ramalho MJ, Loureiro JA, do Carmo Pereira M. Natural Compounds for Alzheimer's Disease Therapy: A Systematic Review of Preclinical and Clinical Studies. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(9):2313–2313. Available from: <https://dx.doi.org/10.3390/ijms20092313>.
- [12] Wang L, Jin GF, Yu HH, Lu XH, Zou ZH, Liang JQ. Protective effects of tenuifolin isolated from *Polygala tenuifolia* Willd roots on neuronal apoptosis and learning and memory deficits in mice with Alzheimer's disease. *Food Funct*. 2019;10:7453–7460.
- [13] Ebrahimi A, Schluesener H. Natural polyphenols against neurodegenerative disorders: Potentials and pitfalls. *Ageing Research Reviews*. 2012;11(2):329–345. Available from: <https://dx.doi.org/10.1016/j.arr.2012.01.006>.
- [14] Ijarotimi SO, Agbedahunsi JM, Onyeji CO, Co A. Chemotherapeutic interaction between *Khaya grandifoliola* (Welw) CDC stem bark extract and two anti-malarial drugs in mice. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 2010;7(4):370–376.
- [15] Hashem F, Aboutabl E, Souda SE, Moharam M, Mamoun A, Shabana M. Desmutagenic and antimutagenic potential of phenolics from *Khaya grandifoliola* (C.DC.), Meliaceae. *Egyptian Pharmaceutical Journal*. 2013;12(2):148–148. Available from: <https://dx.doi.org/10.4103/1687-4315.124018>.
- [16] Njyou FN, Amougou AM, Tsayem RF, Manjia JN, Rudraiah S, Bradley B, et al. Antioxidant fractions of *Khaya grandifoliola* C.DC. and *Entada africana* Guill. et Perr. induce nuclear translocation of Nrf2 in HC-04 cells. *Cell Stress and Chaperones*. 2015;20(6):991–1000. Available from: <https://dx.doi.org/10.1007/s12192-015-0628-6>.
- [17] Kouam AF, Yuan F, Njyou FN, He H, Tsayem RF, Oladejo BO, et al. Induction of Mkp-1 and Nuclear Translocation of Nrf2 by Limonoids from *Khaya grandifoliola* C.DC Protect L-02 Hepatocytes against Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity. *Frontiers in Pharmacology*. 2017;8:653–653. Available from: <https://dx.doi.org/10.3389/fphar.2017.00653>.
- [18] Modi PK, Komaravelli N, Singh N, Sharma P. Interplay between MEK-ERK signaling, cyclin D1, and cyclin-dependent kinase 5 regulates cell cycle reentry and apoptosis of neurons. *Molecular Biology of the Cell*. 2012;23(18):3722–3730. Available from: <https://dx.doi.org/10.1091/mbc.e12-02-0125>.
- [19] Jahn H. Memory loss in Alzheimer's disease. *Dialogues Clin Neurosci*. 2013;15(4):445–454.
- [20] Forner S, Baglietto-Vargas D, Martini AC, Trujillo-Estrada L, LaFerla FM. Synaptic Impairment in Alzheimer's Disease: A Dysregulated Symphony. *Trends in Neurosciences*. 2017;40(6):347–357. Available from: <https://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2017.04.002>.
- [21] Ali T, Yoon GH, Shah SA, Lee HY, Mo K. Osmotin attenuates amyloid beta induced memory impairment, tau phosphorylation and neurodegeneration in the mouse hippocampus. *Scientific Reports*. 2015;5:11708–11708.
- [22] Kim A, Nam YJ, Lee MS, Shin YK, Sohn DS, Lee CS. Apigenin reduces proteasome inhibition-induced neuronal apoptosis by suppressing the cell death process. *Neurochem Res*. 2016;41(11):2969–2980.
- [23] Zhuang J, Li Y, Chi Y. Role of p38 MAPK activation and mitochondrial cytochrome-c release in allicin-induced apoptosis in SK-N-SH cells. *Anti-Cancer Drugs*. 2016;27:312–317.
- [24] Wang Z, Lin D, Zhang L, Liu W, Tan H, Ma J. Penehyclidine hydrochloride prevents anoxia/reoxygenation injury and induces H9c2 cardiomyocyte apoptosis via a mitochondrial pathway. *Eur J Pharmacol*. 2017;797:115–123.
- [25] Chen Z, Tao S, Li X, Zeng X, Zhang M, Yao Q. Anagliptin protects neuronal cells against endogenous amyloid β (A β)-induced cytotoxicity and apoptosis. *Artif Cell Nanomed B*. 2019;47(1):2213–2220.
- [26] Reddy PH, Manczak M, Yin X, Grady MC, Mitchell A, Kandimalla R, et al. Protective effects of a natural product, curcumin, against amyloid β induced mitochondrial and synaptic toxicities in Alzheimer's disease. *Journal of Investigative Medicine*. 2016;64(8):1220–1234. Available from: <https://dx.doi.org/10.1136/jim-2016-000240>.
- [27] Daneshmand P, Saliminejad K, Shasaltaneh MD, Riazi GH, Nazari R, Azimzadeh P, et al. Neuroprotective effects of herbal extract (*Rosa canina*, *Tanacetum vulgare* and *Urtica dioica*) on rat model of sporadic Alzheimer's disease. *Avicenna J Med Biotech*. 2016;8(3):120–125.
- [28] Adwan L, Subaiea GM, Basha R, Zawia NH. Tolfenamic acid reduces tau and CDK5 levels: implications for dementia and tauopathies. *Journal of Neurochemistry*.

- 2015;133(2):266–272. Available from: <https://dx.doi.org/10.1111/jnc.12960>.
- [29] Cao F, Wang Y, Peng B, Zhang X, Zhang D, Xu L. Effects of celastrol on Tau hyperphosphorylation and expression of HSF-1 and HSP70 in SH-SY5Y neuroblastoma cells induced by amyloid- β peptides. *Biotechnol Appl Biochem*. 2018;65(3):390–396.
- [30] Yao Y, Wang Y, Chen Y, Yang J. Osthole decreases tau protein phosphorylation via PI3K/AKT/GSK-3 β signaling pathway in Alzheimer's disease. *Life Sci*. 2019;15(217):16–24.
- [31] Jhang KA, Park JS, Kim HS, Chong YH. Resveratrol ameliorates tau hyperphosphorylation at Ser396 site and oxidative damage in rat hippocampal slices exposed to vanadate: Implication of ERK1/2 and GSK-3 β signaling cascades. *J Agric Food Chem*. 2017;64(44):9626–9634.
- [32] Sereia AL, de Oliveira MT, Baranoski A, Marques LLM, Ribeiro FM, Isolani RG, et al. In vitro evaluation of the protective effects of plant extracts against amyloid-beta peptide-induced toxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *PLOS ONE*. 2019;14(2):e0212089–e0212089. Available from: <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0212089>.
- [33] Baptista FI, Henriques AG, Silva AMS, Wiltfang J, da Cruz e Silva OAB. Flavonoids as Therapeutic Compounds Targeting Key Proteins Involved in Alzheimer's Disease. *ACS Chemical Neuroscience*. 2014;5(2):83–92. Available from: <https://dx.doi.org/10.1021/cn400213r>.